



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA

**POLIEMBRIONÍA EN MANGO MANILA Y ATAULFO:
ANÁLISIS MOLECULAR Y DESARROLLO DE
EMBRIONES CIGÓTICOS Y NUCELARES**

NELY ARELLANO DURÁN

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO
2017

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Nely Arellano Durán, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Angel Villegas Monter, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "Poliembrionía en mango Manila y Ataulfo: análisis molecular y desarrollo de embriones cigóticos y nucelares"

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 05 de Septiembre de 2017

Nely Arellano Durán

Firma del
Alumno (a)

Angel Villegas Monter

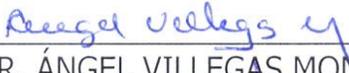
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Poliembrionía en mango Manila y Ataulfo: análisis molecular y desarrollo de embriones cigóticos y nucelares** realizada por la alumna: **Nely Arellano Durán** con la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA

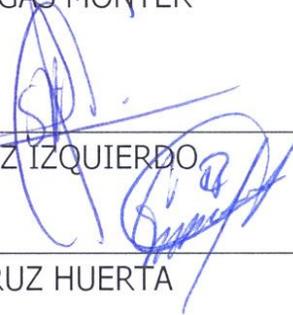
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



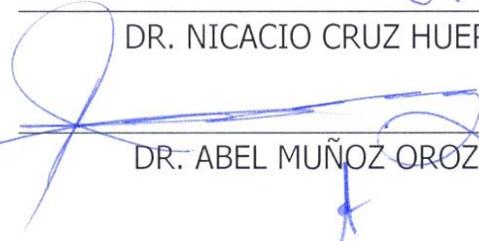
DR. ÁNGEL VILLEGAS MONTER

ASESOR (A)



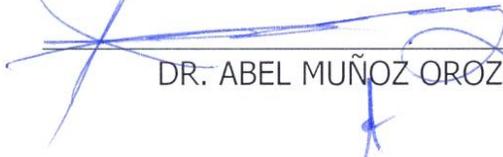
DR. SERAFIN CRUZ IZQUIERDO

ASESOR (A)



DR. NICACIO CRUZ HUERTA

ASESOR (A)



DR. ABEL MUÑOZ OROZCO

ASESOR (A)



DRA. MA. AMPARO MAXIMA BORJA DE LA ROSA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, septiembre de 2017

POLIEMBRIONÍA EN MANGO MANILA Y ATAULFO: ANÁLISIS MOLECULAR Y DESARROLLO DE EMBRIONES CIGÓTICOS Y NUCELARES

NELY ARELLANO DURÁN, Dra.
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2017

RESUMEN

La poliembrionía es una característica importante ya que en una semilla se pueden tener embriones de origen sexual y asexual lo cual da como resultado plantas producto de recombinación genética y clones a la progenitora femenina. En cítricos se ha reportado que plantúlas vigorosas son clones de la madre, lo que se ha generalizado para mango, sin embargo no necesariamente sucede así, por lo cual, se planteó definir el tamaño de muestra óptimo para el estudio de poliembrionía en mango cvs. Manila y Ataulfo, describir características morfológicas de frutos que puedan ser correlacionadas con aspectos de poliembrionía y estimar el porcentaje de plantas idénticas a la progenitora femenina obtenidas del embrión de mayor tamaño por medio de SSRs. Durante 2013 y 2014 se colectaron frutos procedentes de Chiapas, Guerrero y Nayarit. En Chiapas solo se colectó el cv. Ataulfo en 2014. En cada estado se seleccionaron dos huertas y cosecharon frutos de tres árboles por huerta. De acuerdo al método de curvatura máxima, el punto de inflexión en las variables: peso de fruto, semilla, embriones, peso de embrión de mayor tamaño, y número de embriones se determinó como tamaño de muestra óptimo, seis frutos para ambos cultivares y lugares de procedencia. El peso de la semilla fue una característica que sirve en la inferencia del tamaño de los embriones, al igual que del tamaño del embrión más grande. El cv. Manila presentó hasta siete embriones por semilla, y Ataulfo ocho, sin embargo en ambos cultivares fue frecuente encontrar en promedio tres embriones. El color de la radícula es un rasgo distintivo, en el cv. Ataulfo fue de rosado a rojo y en Manila crema. El porcentaje de poliembrionía difiere según el cultivar, localidad y año de evaluación, en el cv. Ataulfo fue superior a 90 % mientras que en Manila fue de 80 %. Los marcadores que mostraron polimorfismos en el cv. Ataulfo fueron: MIAC-5, MIAC-4, mMiCIR003, en el cv. Manila MiSHRS-1+ y en ambos cultivares LMMA1, LMMA9, y mMiCIR030. De acuerdo con dos parámetros de evaluación utilizados, en los cvs Ataulfo y Manila hasta el 10 % de las plantas originadas del embrión de mayor tamaño son diferentes a la progenitora femenina.

Palabras clave: *Mangifera indica* L., reproducción apomíctica, tamaño óptimo de muestra, método de curvatura máxima, SSR.

POLYEMBRYONY IN MANGO MANILA AND ATAULFO: MOLECULAR ANALYSIS AND DEVELOPMENT OF CIGOTIC AND NUCLEARS EMBRYOS

NELY ARELLANO DURÁN, Dra.
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2017

ABSTRACT

Polyembryony is an important characteristic because in a seed can be had embryos of sexual and asexual origin which results in plants product of genetic recombination and clones to the female progenitor. In citrus fruits it has been reported that vigorous plants are clones of the mother, which has been generalized for mango, however it does not necessarily happen that way, therefore, it was proposed to define the optimal sample size for the study of polyembryony in Mango cvs Manila and Ataulfo, to describe morphological characteristics of fruits that can be correlated with aspects of polyembryony and to estimate the percentage of plants identical to the female progenitor obtained from the larger embryo by means of SSRs. During 2013 and 2014 fruits were collected from Chiapas, Guerrero and Nayarit. In Chiapas, only cv Ataulfo was collected in 2014. In each state, two orchards were harvested and harvested from three trees per orchard. According to the maximum curvature method, the inflection point in the variables: fruit weight, seed, embryos, embryo weight, and number of embryos were determined as optimal sample size, six fruits for both cultivars and places of origin. The weight of the seed was a characteristic that serves in the inference of the size of the embryos, as well as the size of the largest embryo. Manila presented up to seven embryos per seed, and Ataulfo eight, however in both cultivars it was common to find on average three embryos. The color of the radicle is a distinctive feature, in the cultivar Ataulfo was from pink to red and in Manila cream. The percentage of polyembryony differs according to the cultivar, locality and year of evaluation, in cv Ataulfo was higher than 90% while in Manila it was 80%. The markers that showed polymorphisms in cv Ataulfo were: MIAC-5, MIAC-4, mMiCIR003, in the cv Manila MiSHRS-1 + and in both cultivars LMMA1, LMMA9, and mMiCIR030. According to two evaluation parameters used, in the cvs Ataulfo and Manila up to 10% of the plants originated from the larger embryo are different from the female progenitor.

Key words: *Mangifera indica*, apomictic reproduction, optimum sample size, maximum curvature method, SSR.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS que con su gracia he logrado realizar una más de mis metas.

A CONACYT por el apoyo económico para poder realizar la presente investigación.

Al Colegio de Postgraduados en especial al Programa de Recursos Genéticos y Productividad- Genética por la oportunidad brindada para realizar mis estudios.

Al Dr. Ángel Villegas Monter por su invaluable apoyo, paciencia y dirección de esta investigación.

Al mi consejo Particular, Dr. Serafín Cruz Izquierdo, Dr. Nicacio Cruz Huerta, Dr. Abel Muñoz Orozco y a la Dra. Amparo Borja de la Rosa por su apoyo y acertadas observaciones en la escritura de la tesis.

A la Sra. Ángeles y al Sr. Mario por todo su apoyo en la fase de laboratorio. En especial a mi padre el Sr. Guillermo Arellano, por su apoyo constante durante los viajes, experimento, laboratorio etc.

A todos los compañeros con quien tuve la oportunidad de coincidir durante esta etapa, gracias por su amistad, compañía y buenos momentos que compartimos a lo largo de este proceso.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

LUCIA DURÁN RAMIREZ Y GUILLERMO ARELLANO HERNANDEZ

Quienes siempre me han guiado por el camino de la bondad, inculcándome aquellos valores que hacen superarme como persona día a día, les agradezco su apoyo incondicional en todo momento.

A RAFAEL

Con quien he compartido muchas emociones y quien me ha brindado la confianza y todo el apoyo que necesito para imponerme nuevas metas.

A RAFITA Y MATEO

Mis grandes tesoros...

A CESAR, ALETHIA Y DIEGO

Mi hermano y su familia, por su tiempo y su cariño.

A MI FAMILIA

Nely Arellano Durán

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 LITERATURA CITADA.....	5
CAPÍTULO II. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA ÓPTIMO EN MANGO PARA ESTUDIO DE POLIEMBRIONÍA	8
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
2.1 INTRODUCCIÓN	10
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
2.4 CONCLUSIONES.....	20
2.5 LITERATURA CITADA.....	21
CAPÍTULO III. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE FRUTOS, SEMILLAS Y EMBRIONES DE MANGO CV. MANILA Y ATAULFO	24
RESUMEN	24
ABSTRACT	25
3.1. INTRODUCCIÓN	26
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
3.3.1. Tamaño de fruto	32
3.3.2. Tamaño de semillas	32
3.3.3. Peso de embriones y peso de embrión de mayor tamaño	33
3.3.4. Forma, arreglo, y facilidad de separación de embriones.....	39
3.3.5. Color de radícula	40
3.3.6. Porcentaje de poliembrionía.....	40
3.3.7. Número de embriones	41
3.4. CONCLUSIONES.....	43
3.5. LITERATURA CITADA	44
CAPÍTULO IV. IDENTIFICACIÓN DEL ORIGEN GENÉTICO DE EMBRIONES DE MAYOR TAMAÑO DE MANGO CVS MANILA Y ATAULFO MEDIANTE MARCADORES SSR´s	47
RESUMEN	47
ABSTRACT	48

4.1 INTRODUCCIÓN	49
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	52
4.2.1. Material Vegetal	52
4.2.2. Disección de semillas para evaluación de poliembrionía	53
4.2.3. Colecta de material vegetal para extracción de ácidos nucleicos	54
4.2.4. Extracción de ADN nuclear	54
4.2.5. Marcadores Microsatélites.....	55
4.2.6. Análisis estadístico.....	56
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
4.3.1 Porcentaje de semillas poliembrónicas	58
4.3.2. Alelos y marcadores polimórficos.....	59
4.3.3. Contenido de información de polimorfismo (PIC)	61
4.3.4. Índice de similaridad Genética (ISG).....	67
4.3.5. Probabilidad de parentesco (W).....	68
4.4. CONCLUSIONES.....	76
4.5 LITERATURA CITADA.....	77
CAPITULO V. DISCUSIÓN GENERAL	81
ANEXOS	84
Anexo 1:Contenido de información polimórfica (PIC) de 16 marcadores SSRs del año 2013.	84
Anexo 2. Contenido de información polimórfica (PIC) de 16 marcadores SSRs del año 2014	86

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentaje de poliembrionía evaluado a partir de tamaño de muestra de 20 frutos de mango cv. Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit.	18
Cuadro 2. Características morfológicas de semillas de mango cv. Manila y Ataulfo evaluados con tamaño de muestra de 20 frutos.....	18
Cuadro 3. Relación de huertos, localidades, estados, ubicación geográfica y clave de los cultivares de mango Manila y Ataulfo caracterizados morfológicamente.....	30
Cuadro 4. Valores promedio por huerto, mínimos, máximos, varianza, desviación estándar y coeficiente de variación para fruto, semilla y embriones de mango cv. Ataulfo de Chiapas, Guerrero y Nayarit.....	36
Cuadro 5. Valores promedio por huerto, mínimos, máximos, varianza desviación estándar y coeficiente de variación para fruto, semilla y embriones de mango cv. Manila de Guerrero y Nayarit.	38
Cuadro 6. Relación largo/ancho de frutos y semillas de mango cvs. Manila y Ataulfo de Chiapas, Guerrero y Nayarit.....	39
Cuadro 7. Correlación entre peso de fruto (PF), peso de semilla (PS), peso de embriones (PE), peso del embrión de mayor tamaño (PEM) y número de embriones (NE) en los cvs. Manila y Ataulfo de Chiapas Guerrero y Nayarit. 2013 y 2014.....	39
Cuadro 8. Porcentaje de poliembrionía de mango cvs. Manila y Ataulfo de Chiapas, Guerrero y Nayarit, durante 2013 y 2014.	41
Cuadro 9. Relación de cultivares poliembriónicos evaluados, Ataulfo y Manila, año de colecta, clave, localización y ubicación geográfica.....	52
Cuadro 10. Iniciadores microsátélites para mango (<i>Mangifera indica</i> L.), lugar de ubicación, secuencia, tamaño de alelo (pb) y temperatura de alineación (T _a).	57
Cuadro 11. Porcentaje de semillas poliembriónicas en mango cvs. Manila y Ataulfo procedentes de Chiapas, Guerrero y Nayarit durante 2013 y 2014.	59
Cuadro 12. Número de alelos detectados a partir de 16 iniciadores SSRs en mango cv. Manila y Ataulfo	61
Cuadro 13. Genotipos de mango cv. Manila y Ataulfo detectados con diferencias a la planta madre e iniciadores SSRs	65

Cuadro 14. Porcentaje de plántulas de mango cvs. Manila y Ataulfo, con polimorfismo con 1, 2 y 3 marcadores SSRs procedentes de Chiapas Guerrero y Nayarit durante 2013 y 2014	66
Cuadro 15 Índice de Similaridad Genética (ISG) en mango cv. Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit del año 2013 de evaluación con 16 iniciadores SSRs.	69
Cuadro 16. Índice de Similaridad Genética (ISG) en mango cv. Manila y Ataulfo de Chiapas, Guerrero y Nayarit del 2014 de evaluación con 16 iniciadores SSRs.	70
Cuadro 17. Probabilidad de parentesco (W) en mango cv. Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit del año 2013 de evaluación con 16 iniciadores SSRs.	71
Cuadro 18. Probabilidad de parentesco (W) en mango cv. Manila y Ataulfo de Chiapas Guerrero y Nayarit del año 2014 de evaluación con 16 iniciadores SSRs.	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Coeficiente de variación en relación al número de frutos (tamaño de muestra) para la variable Peso de Fruto en mango Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit.	14
Figura 2. Coeficiente de variación en relación al número de frutos (tamaño de muestra) para la variable Peso de Semilla en mango Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit.	15
Figura 3. Coeficiente de variación en relación al número de frutos (tamaño de muestra) para la variable Peso de Embriones en mango Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit.	15
Figura 4. Coeficiente de variación en relación al número de frutos (tamaño de muestra) para la variable Número de Embriones en mango Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit.	16
Figura 5. Coeficiente de variación en relación al número de frutos (tamaño de muestra) para la variable Peso de embrión de mayor tamaño en mango Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit.	17
Figura 6. Frutos de mango cultivar a) Ataulfo y b) Manila.	29
Figura 7. Semilla de mango poliembriónico Ataulfo, a)endocarpo, b)cubierta papiracea c) testa, d) conjunto de embrión	31
Figura 8. Disección de semillas y separación de embriones	31
Figura 9 a) Embrión de mayor tamaño cv. Ataulfo b) se aprecia la radícula de embrión de mayor tamaño y radículas de los embriones.	39
Figura 10. Color de radícula de embriones de mango cvs. a) Manila y b) Ataulfo....	40
Figura 11. Frecuencia absoluta en el número de embriones por semilla de los cvs. Manila y Ataulfo procedentes de Guerrero y Nayarit durante 2013.....	42
Figura 12. Frecuencia absoluta en el número de embriones por semilla de los cvs. Manila y Ataulfo procedentes de Chiapas, Guerrero y Nayarit durante 2014.....	42

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Mango (*Mangifera indica* L.) es una especie perteneciente a la familia de las Anacardiáceas, mejor conocida como el “rey de los frutos”, por su sabor, color, variedad y diversas formas de consumo final (Khan *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2016). Se ubica entre los seis frutales de mayor importancia en el mundo junto con plátanos, banano, naranjas, uvas y manzanas. Los principales países productores de mango son India, China, Tailandia, Indonesia, México y Pakistán, representando el 82% de la producción mundial. México es el quinto país con 1,724,609 TM durante 2014 (FAO-STAT, 2014).

Los historiadores y horticultores consensan que es originario de la India, sin embargo, otros investigadores mencionan que es del sureste asiático (Myanmar) debido al nivel de diversidad genético observado (Parrota, 2000; Singh *et al.*, 2016). Aunque, la comparación anatómica y morfología de varias especies aunado a muestras fósiles del género *Mangifera* refuerza la opinión de que el Noreste de India es el centro de origen del género del mango, desde donde se extendió a la zonas del Sureste de Asia y se diversificó hacia las selvas tropicales de Malasia y Sumatra (Singh *et al.*, 2016).

La planta de mango es diploide ($2n=2x=40$), el tamaño del genoma reportado es de 439 Mpb a 880 Mpb (Parrota, 2000; Viruel *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2016). Entre los genomas publicados el de mango mostró mayor similitud con el de naranja dulce (*Citrus sinensis* L.) (Singh *et al.*, 2016). Una característica de importancia en estas especies es la poliembriónía, que implica el desarrollo de más de un embrión por semilla. En mango, los cultivares se pueden agrupar por el tipo de semilla, los cultivares de Filipinas e Indochina, son poliembriónicos, mientras que los de India son monoembriónicos (Mukherjee y Litz, 1997; Parrota, 2000).

La poliembriónía tiene su origen en un proceso apomíctico, el cual hace referencia a la formación asexual de embriones a partir de tejidos maternos del óvulo, sin que

ocurra fecundación, por lo cual las plantas obtenidas se consideran idénticas a la progenitora femenina (Nakano *et al.*, 2013; Hand y Koltunow, 2014).

Se reportan dos tipos de apomixis: gametofítica y esporofítica la primera tiene su origen en la generación de embriones a partir de células gaméticas (sinérgidas, antípodas, óvulos y sacos embrionarios adicionales), mientras que en mango es del tipo esporofítica, específicamente adventicia, la cual se produce a partir de las células somáticas de los tejidos maternos (núcula y tegumentos) manteniendo el genotipo de la planta madre (Batygina y Vinogradova, 2007). Por lo cual dentro de las ventajas que presenta la poliembriónía en *Mangifera* es que puede ser usado como método de propagación clonal, además de que el embrión nucelar permite también la obtención de plantas libres de virus (Batygina y Vinogradova, 2007).

Sin embargo, la identificación temprana de las plántulas nucleares y cigóticas es difícil si se utilizan métodos prácticos. Se ha realizado con técnicas morfológicas, citológicas, bioquímicas y recientemente moleculares (Degani *et al.*, 1993; Schnell *et al.*, 1994; Cordeiro *et al.*, 2006; Martínez-Ochoa *et al.*, 2012; Kishore, 2014). Las más usadas en la actualidad son las técnicas moleculares porque no son influenciadas por el ambiente y se pueden realizar a partir de cualquier parte de la planta en las primeras etapas de desarrollo (Masuelli, 1999; Azofeifa, 2006; Agarwal *et al.*, 2008).

Distintos trabajos en mango y cítricos se tienen reportados en la detección del origen genético de los embriones mediante las técnicas de RAPDs, o combinadas RAPDs y EST-SSR, AFLPs y SSRs (Bastianel *et al.*, 1998; Viruel *et al.*, 2005; Cordeiro *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2008; Martínez - Ochoa *et al.*, 2012; Yildiz *et al.*, 2013). Donde han logrado identificar algunos marcadores que aportan información relevante y específica para cultivares o cruces, sin embargo, se requieren estudios porque hasta el momento no se tiene suficiente información para evaluar distintos cultivares, así como lugares de procedencia del material vegetal (Andrade *et al.*, 2004).

Los marcadores moleculares que han sido útil para discriminar entre especies y variedades muy relacionadas son los Microsatélites (SSR) (Valadez y Kahl, 2000) los cuales son secuencias de ADN compuestos de unidades de mono-di-tri, tetra o penta nucleótidos organizados en tándem, se distribuyen tanto en regiones codificantes como no codificantes y son altamente polimórficos (Powell *et al.*, 1996 (a)). Se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tienen la ventaja de ser específicos en comparación con otros marcadores de ADN, además son altamente reproducibles, de naturaleza multi-alélica, herencia codominante (que permite diferenciar entre homocigotos y heterocigotos), abundantes y de amplia cobertura en el genoma (Duval, *et al.*, 2005; Varshney *et al.*, 2005).

En la actualidad se han desarrollado microsatélites específicos para mango, que se han utilizado en la evaluación de la diversidad genética de materiales de diferente origen geográfico (Florida, México, Filipinas, Hawaii, Israel, California, India) incluyendo variedades y materiales usados como portainjertos, así como genotipos con semillas monoembriónicas y poliembriónicas (Duval *et al.*, 2005; Hosho *et al.*, 2005; Schnell *et al.*, 2005; Viruel *et al.*, 2005). El tener información de SSR para esta especie hace más fácil aplicar esta tecnología en la identificación del origen genético de embriones de mango.

En base a lo anterior se planteó como **objetivo general**: Ampliar el conocimiento de la poliembrionía en mango cvs. Manila y Ataulfo.

Objetivos particulares.

1. Definir el tamaño de muestra óptimo en mango cvs. Manila y Ataulfo para estudios de poliembrionía.
2. Describir y relacionar las características morfológicas de los frutos con la poliembrionía en los cvs. Manila y Ataulfo.
3. Identificar los marcadores microsatélites capaces de distinguir entre embriones cigóticos y nucelares de mango cvs. Manila y Ataulfo.

4. Determinar si el embrión de mayor tamaño en mango de los cvs. Ataulfo y Manila es nucelar.

Las **hipótesis** fueron:

1. El tamaño de muestra óptimo para evaluar poliembrionía en mango no difiere entre los cvs. Manila y Ataulfo.
2. Las características morfológicas de frutos y semillas aportan información del nivel de poliembrionía en mango cvs. Manila y Ataulfo.
3. Los marcadores microsatélites serán capaces de distinguir plántulas de origen nucelar y cigótico en ambos cvs. Manila y Ataulfo.
4. Para definir el origen genético de los embriones existen marcadores microsatélites específicos para el cv. Manila y Ataulfo.

1.1 LITERATURA CITADA

- Agarwal, M., N. Shrivastava, and H. Padh. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 27:617-631.
- Andrade-Rodríguez., M.; A. Villegas-Monter., G. Carrillo-Castañeda., and A. García-Velázquez. 2004. Polyembryony and identification of Volkamerian lemon zygotic and nucellar seedlings using RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39:551-559.
- Azofeifa A., D. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas: aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17:221-242.
- Bastianel, M.; S. F. Schwarz, H. D. Coletta Filho., L.L. Lin, M. Machado, and O. C. Koller. 1998. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. *Genetics and Molecular Biology* 21:123-127.
- Batygina, T. B. and G. Yu. Vinogradova. 2007. Phenomenon of Polyembryony. Genetic Heterogeneity of Seeds. *Russian Journal of Developmental Biology* 38(3):166-191.
- 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.
- Degani, C. M., M. Cohen, O. Reuveni, R. El-Batsri, and S. Gazit. 1993. Frequency and characterization of zygotic seedlings from polyembryonic mango cultivars, determined using isoenzymes as genetic markers. *Acta Horticulturae* 341:78-81.
- Duval, M. F., A J. Bunel, C. Sitbon, and M. Risterucci. 2005. Development of microsatellite markers for mango (*Mangifera indica*). *Mol. Ecol. Notes* 5:824-826.
- FAOSTAT. 2014. FAO Statistics Database on the World Wide Web. (<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>) (revisado April 2014).
- Hand, M.L. and A. M. G. Koltunow. 2014. The Genetic Control of Apomixis: Asexual Seed Formation. *Genetics.* 197(2):441-450.

- Honsho, C., K. Nishiyama, W. Eiadthong and K. Yonemori. 2005. Isolation and characterization of new microsatellite markers in mango (*Mangifera indica* L.). *Mol. Ecol. Notes* 5:152-154
- Khan, A.S., S. Ali, and I.A. Khan. 2015. Morphological and molecular characterization and evaluation of mango germplasm: An overview. *Scientia Horticulturae* 194:353-366.
- Kishore, K. 2014. Polyembryony. In: Ramawat K.G., J.M. Mérillon, K.R. Shivanna (Eds). *Reproductive Biology of Plants*. CRC Press. pp:355-370.
- Martínez-Ochoa, E. del C., M. Andrade-Rodríguez., M. Rocandio Rodríguez and A. Villegas Monter. 2012. Identification of zygotic and nucellar seedlings in polyembryonic mango cultivars. *Pesq. Agropec. Bras.* 47(11): 1629-1636.
- Masuelli, W.R. 1999. Uso de los marcadores moleculares en el mejoramiento genético de las especies hortícolas. *Avances en Horticultura* 4:54-66.
- Mukherjee, S. K. and R. E. Litz. 1997. Introduction: Botany and Importance. *In*: Litz R.E. (ed.), *The Mango, Botany, Production and Uses*. CAB International, Wallingford, UK.
- Nakano, M., K. Kogoshi, T. Shimizu, T. Endo, T. Shimada, H. Fujii and M. Omura. 2013. Characterization of genes associated with polyembryony and *in vitro* somatic embryogenesis in *Citrus*. *Tree genetics and Genome* 9: 795–803.
- Parrota, J. 2000. *Mangifera indica* L. Anacardiaceae In: Francis, J.K., y C. A. Lowe. (Eds.) *Bioecología de árboles nativos y exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales*. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Servicio Forestal. Instituto Internacional de Dasonomía Tropical Río Piedras, Puerto Rico. pp 338-344.
- Powell, W., G.C. Machray, and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant sci.* 1(7):215-222.
- 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.

- Schnell, R.J., R. J. King, and D.H. Harkins. 1994. Eliminating zygotic seedlings in 'Turpentine' mango rootstock population by visual rouging. HortScience 29(4):319-320.
- Schnell, R. J., C. T. Olano, W. E. Quintanilla and A. W. Meerow. 2005. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci from mango (*Mangifera indica* L.) and cross-species amplification in closely related taxa. Mol. Ecol. Notes 5:625-627.
- Singh, N.K., A.K. Mahato, P.K. Jayaswal, A. Singh, S. Singh, N. Singh, V. Rai, A. Mithra S.V., K. Gaikwad, N. Sharma, S. Lal, M. Srivastava, J. Prakash, U. Kalidindi, S. K. Singh, A. K. Singh, K. Khan, R. K. Mishra, S. Rajan, A. Bajpai, B. S. Sandhya, P. Nischita, K. V. Ravishankar, M. R. Dinesh, N. Kumar, S. Jaiswal, M. A. Iquebal, D. Kumar, A. Rai and T. R. Sharma. 2016. Origin, Diversity and Genome Sequence of mango (*Mangifera indica* L.). Indian Journal of History of science 51(2):355-368.
- Valadez, M.E. y G. Khal. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Teoría y Protocolos de Laboratorio. Mundi-Prensa México S.A. de C.V. 147p.
- Varshney R.K, A. Graner, and M.E. Sorrells. 2005 Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends Biotech 23:48–55.
- 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. Breeding 15:383–393.
- Yildiz, E., M. Kaplankiran, T. H. Demirkeseer, A. Uzun, and C. Toplu. 2013. Identification of Zygotic and Nucellar Individuals Produced from Several Citrus Crosses Using SSRs Markers. Not Bot. Horti. Agrobi. 41(2):478-484.

CAPÍTULO II. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA ÓPTIMO EN MANGO PARA ESTUDIO DE POLIEMBRIONÍA

RESUMEN

Determinar el tamaño de muestra óptimo en una investigación científica es importante ya que da confiabilidad en los resultados aunado a la eficiencia en el uso de los recursos y optimización de tiempo. La poliembrionía permite obtener plantas clonales y cigóticas de la misma semilla. Las semillas de mango presentan dicha característica, sin embargo, no existe información que mencione cual es el tamaño de muestra para evaluarla. El objetivo del presente trabajo fue determinar mediante el método de curvatura máxima el tamaño de muestra óptimo para características de la semilla relacionadas con poliembrionía. Se colectaron mangos de los cvs. Manila y Ataulfo de los estados de Guerrero y Nayarit, México. En cada estado se eligieron dos huertas de cada cultivar, en cada una se seleccionaron tres árboles. En el laboratorio de Biotecnología de Frutales, Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, se evaluaron cinco variables: peso de fruto, semillas, embriones, peso del embrión más grande y número de embriones. En todas las variables el punto de inflexión de la curva fue en seis frutos para ambos cultivares y lugares de procedencia. Por otra parte, los cvs. Manila y Ataulfo de Guerrero tuvieron los coeficientes de variación (CV) más bajos en peso de semilla y peso del embrión de mayor tamaño, mientras que Manila de Nayarit presentó los CV más altos en todas las variables estudiadas. Se concluye que para los cvs. Manila y Ataulfo seis frutos es el tamaño de muestra óptimo para evaluar: número de embriones, y peso de fruto, semilla, embriones, embrión de mayor tamaño.

Palabras clave: *Mangifera indica*, método de curvatura máxima, coeficiente de variación

DETERMINATION OF OPTIMAL SAMPLE SIZE IN MANGO FOR POLYEMBRYONY STUDY

ABSTRACT

Determining the optimal sample size in a scientific research is important as it gives reliability in the results together with the efficiency in the use of the resources and optimization of time. Polyembryony allows clonal and zygotic plants to be obtained from the same seed. Mango seeds have this characteristic, however, there is no information that mentions the size of the sample to evaluate it. The objective of the present work was to determine by the maximum curvature method the optimal sample size for seed characteristics related to polyembryony. Mangoes were collected from the cvs. Manila and Ataulfo from the states of Guerrero and Nayarit, Mexico. In each state, two orchards were chosen from each cultivar, in each one three trees were selected. Five variables were evaluated: fruit weight, seeds, embryos, weight of the largest embryo and number of embryos in the laboratory of Fruit Biotechnology, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. In all variables, the inflection point of the curve was in six fruits for both cultivars and places of origin. On the other hand, cvs. Manila and Ataulfo de Guerrero had the lowest coefficients of variation (CV) in seed weight and weight of the largest embryo, while Manila of Nayarit presented the highest CVs in all variables studied. It is concluded that for the cvs. Manila and Ataulfo six fruits is the optimal sample size to evaluate: number of embryos, and fruit weight, seed, embryos, embryo of larger size.

Keywords: *Mangifera indica* L., maximum curvature method, coefficient of variation

2.1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de mango es importante en México y el mundo tanto por sus cualidades nutricionales como por sus características organolépticas (Galán, 2009, SIAP, 2016). En 2016 la producción fue de 1.9 ton., destacando Guerrero, Sinaloa, Nayarit y Chiapas (SIAP, 2016). Los frutos de mango se pueden clasificar de acuerdo al tipo de semillas en monoembriónicos, donde la semilla tiene un embrión y poliembrionicos, donde las semillas presentan dos o más embriones. La poliembrionía es un tipo de apomixis (apo=sin mixis= mezcla) (Quero-Carrillo *et al.*, 2010) facultativa en la que se desarrollan de manera simultánea varios embriones de origen nucelar y un embrión sexual por semilla (Koltunow, 1993; Kundan *et al.*, 2012). Su importancia radica en que puede ser considerada como una forma de propagación clonal (Koltunow, 1993; Agustí, 2003). Plantas obtenidas de semillas poliembrionicas suelen usarse en plantaciones comerciales como portainjertos para garantizar la uniformidad de las huertas (Cordeiro *et al.*, 2006). Así mismo es importante porque al germinar el embrión sexual se genera diversidad genética (Gálvez-López *et al.*, 2010).

Los estudios de poliembrionía se han realizado principalmente en gramíneas forrajeras tropicales y cítricos (Santos *et al.*, 2015; Quero Carrillo *et al.*, 2010; Villegas y Andrade, 2008), pero solo se cuenta con una investigación de tamaño de muestra para estudiar poliembrionía en cítricos, sin embargo, es necesario definir el tamaño de muestra óptimo para mango con la finalidad de tener resultados confiables.

Bussab y Morettin (2011) citado por Bandeira *et al.* (2016) mencionan que el tamaño de muestra es proporcional a la variabilidad de los datos y a la fiabilidad deseada, siendo inversamente proporcional al error a priori permitido por el investigador. Así mismo un tamaño óptimo de parcela depende de la naturaleza del material experimental, diseño del experimento, número de repeticiones y los recursos disponibles (Vallejo y Mendoza 1992). Por otra parte, el mayor problema cuando se

trabaja con frutales es obtener muestras verdaderamente aleatorias cuando se colectan frutos (Miranda *et al.*, 2007).

Al definir el tamaño de muestra óptimo es posible reducir los costos tanto en recursos humanos como financieros, aunado a la optimización del tiempo (Lorentz, 2004; Santos *et al.*, 2015), así mismo se vuelve imprescindible hacer buen uso del espacio disponible, en muchas ocasiones suele ser reducido (Vallejo y Mendoza, 1992). Otra cuestión importante es optimizar el material vegetal valioso porque generalmente es poco ya que un mal uso provocaría pérdidas irreparables (Santos *et al.*, 2015).

Varios trabajos se han enfocado en obtener el tamaño de muestra óptimo en distintas especies para evaluar aspectos de tipo fisiológicos, anatómicos, agronómicos entre otros a continuación se mencionan algunos de ellos.

En maíz, especie de amplio uso en México, Márquez-Sánchez *et al.* (1970) observaron la influencia del tamaño de muestra en la estimación de la varianza genética en variedades sintéticas. El objetivo de dicho trabajo fue determinar si un tamaño de muestra limitado afectaba en la frecuencia de estimadores negativos de la varianza de dominancia, el tamaño de muestra de 6 plantas fue suficiente para determinar los parámetros de interés.

En papayo y camote el mejor tamaño de muestra para establecer parcelas en condiciones de invernadero fue de 8 y 6 plantas con 4 repeticiones respectivamente (Lima *et al.*, 2007; Vallejo y Mendoza, 1992).

En pasiflora silvestre (*Pasiflora caerulea*), para estudios de caracterización de frutos, determinaron que el tamaño de muestra era diferente dependiendo de la característica evaluada desde 12 frutos para luminosidad, color de piel y pulpa hasta 319 frutos para peso de fruto (Bandeira *et al.*, 2016).

En maracuyá y melocotón evaluaron características postcosecha: en maracuyá 20 frutos fueron suficientes para representar características de contenido de sólidos solubles totales, vitamina C, pH, acidez titulable y azúcares solubles totales; mientras que, para rendimiento de jugo y grosor de cáscara necesitaron tamaños de muestra mayores (Coelho *et al.*, 2011). En melocotón, el tamaño de muestra óptimo también varió dependiendo de la característica, desde 11 frutos para contenido de jugo, 34 para peso y acidez y 169 para firmeza de pulpa (Toebe *et al.*, 2012).

En manzana evaluaron tamaño y coloración de fruta de 5 a 30 muestras por árbol, en estos árboles el muestreo se basó en los modelos de distribución espacial de ramas y brotes dentro del árbol; sin embargo, en la práctica las fuentes de variación de peso, coloración de frutos, la interacción con los demás árboles y la edad de la madera o posición de la fruta debería considerarse y no ha sido integrada con éxito en los métodos de muestreo (Miranda *et al.*, 2007).

De manera similar en aguacate determinaron el tamaño de muestra con el propósito de evaluar características del xilema, directamente relacionadas con la eficiencia en el transporte del agua, flujo de savia y conductividad hidráulica con el propósito específico de seleccionar aquellos genotipos más eficientes (Meza-Castillo *et al.*, 2010).

En cítricos se definió el tamaño de muestra óptimo para 15 portainjertos incluyendo mandarinas limones e híbridos, se observó que de acuerdo al portainjerto varió el número óptimo de 9 para frutos y de 10 a 23 semillas para poliembrionía (Santo *et al.*, 2015).

Existen diversos procedimientos para definir el tamaño de muestra, donde se puede citar el Método de Curvatura Máxima (Muñoz, 1973 citado por Sánchez *et al.*, 2006; Vargas y Navarro, 2014) el cual consiste en definir un tamaño de parcela básica, sumando de 2 en 2, 3 en 3, etc., e ir formando varias agrupaciones para incrementar progresivamente el tamaño de muestra. El comportamiento asintótico del coeficiente

de variación (CV) indica la estabilización del tamaño de muestra y el óptimo se considera el punto de inflexión de la curva, sin embargo; la mayoría de los investigadores han optado por elegir un tamaño donde empieza a manifestarse una tendencia asintótica para tener mayor confiabilidad.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar mediante el método de curvatura máxima el tamaño de muestra óptimo para características de la semilla relacionadas con poliembrionía.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron frutos de mango de los cvs. Manila y Ataulfo en dos huertas de Guerrero y dos de Nayarit, México. De cada huerta se eligieron 3 árboles de cada cultivar y de cada árbol se cosecharon 35 frutos. Los frutos fueron llevados al laboratorio de Biotecnología de Frutales, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Texcoco, Edo de México, México, donde se realizó la toma de datos de cinco variables: peso de fruto, peso de semillas, peso de embriones, peso del embrión de mayor tamaño y número de embriones.

Para determinar el tamaño de muestra óptimo de cada variable se tomó como muestra unitaria un fruto (unidad básica), luego se formaron tamaños de muestra 2, sumando de 2 en 2 los datos de los frutos, de igual manera para 4 (sumando datos de frutos de 4 en 4), y así para 6, 8, 10 y 20 frutos. A cada serie de datos de tamaño de muestra se le determinó el Coeficiente de Variación ($CV = \sigma/\mu \times 100$). Los datos se graficaron colocando en el eje de las abscisas (X) el tamaño de muestra en número de unidades básicas consideradas y en el eje de las ordenadas (Y) el CV dado en porcentaje. Visualmente se determinó el punto de inflexión de la curva para cada variable y se definió el tamaño de muestra óptimo (Vargas y Navarro, 2014; Sánchez *et al.*, 2006).

Se evaluó el porcentaje de poliembrionía para cada cultivar y lugar de procedencia para lo cual se usó el máximo de 20 frutos con la finalidad de aprovechar toda la

información obtenida en un inicio. Así mismo, se realizó análisis de varianza con el paquete estadístico SAS 9.3 (SAS Institute, 2003) y la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) para las características: peso de fruto, semilla, embriones, embrión de mayor tamaño y número de embriones de cada cultivar.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Peso de fruto fue la variable que mostró los menores CV respecto a las demás variables. La tendencia fue similar en los cvs. Manila de ambas zonas y Ataulfo de Guerrero, mientras que Ataulfo de Nayarit, presentó los CV más bajos, sin embargo, todos presentaron el punto de inflexión en seis frutos con CV de 14.2 a 19.1 % (Figura 1).

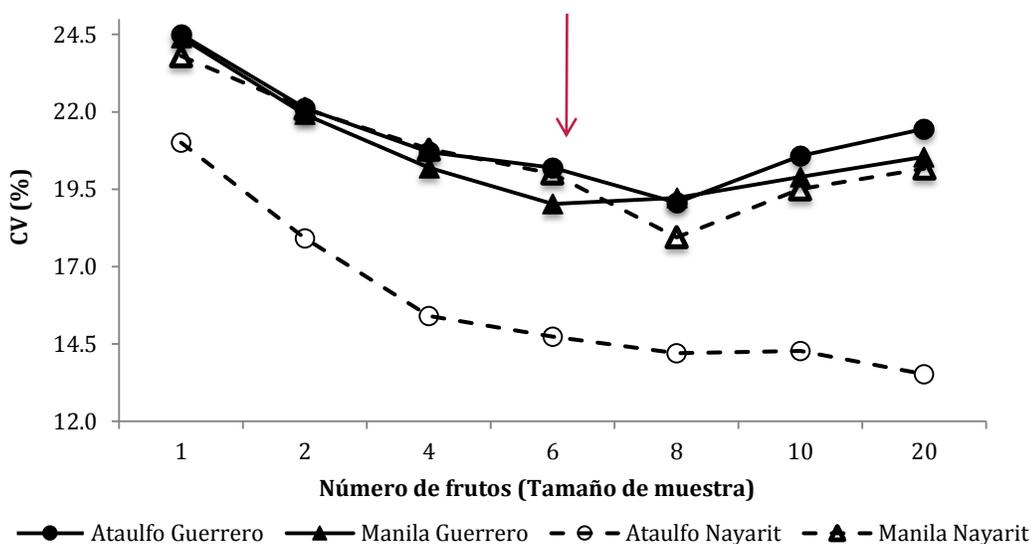


Figura 1. Coeficiente de variación en relación al número de frutos (tamaño de muestra) para la variable Peso de Fruto en mango Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit.

En peso de la semilla se observa que los cultivares Manila y Ataulfo de Nayarit tuvieron valores parecidos con CV mayores en comparación a los de Guerrero los cuales mostraron los menores CV a partir de un tamaño de muestra de dos frutos (Figura 2). Así mismo, en los cultivares de Guerrero y Nayarit el punto de inflexión de

la curva se presentó en seis frutos con CV de 19 a 21 % y 12.7 a 19.3 %, respectivamente.

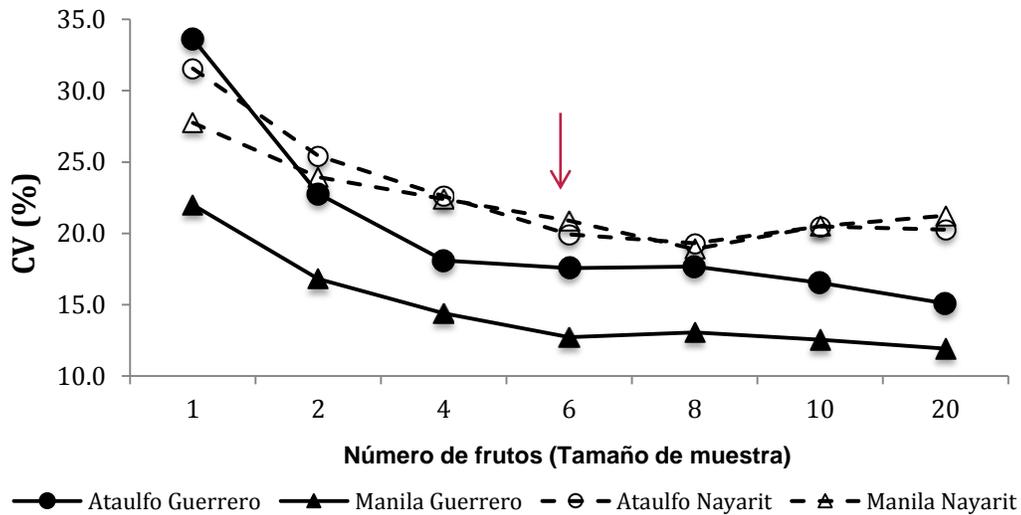


Figura 2. Coeficiente de variación en relación al número de frutos (tamaño de muestra) para la variable Peso de Semilla en mango Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit.

En la variable peso de embriones, Manila de Guerrero presentó los valores más bajos de CV y Ataulfo del mismo lugar los valores mayores. El punto de inflexión de la curva de ambos cultivares y procedencia fue en seis frutos, volviéndose asintótica en ocho frutos con CV de 12.3 a 17.1 % (Figura 3).

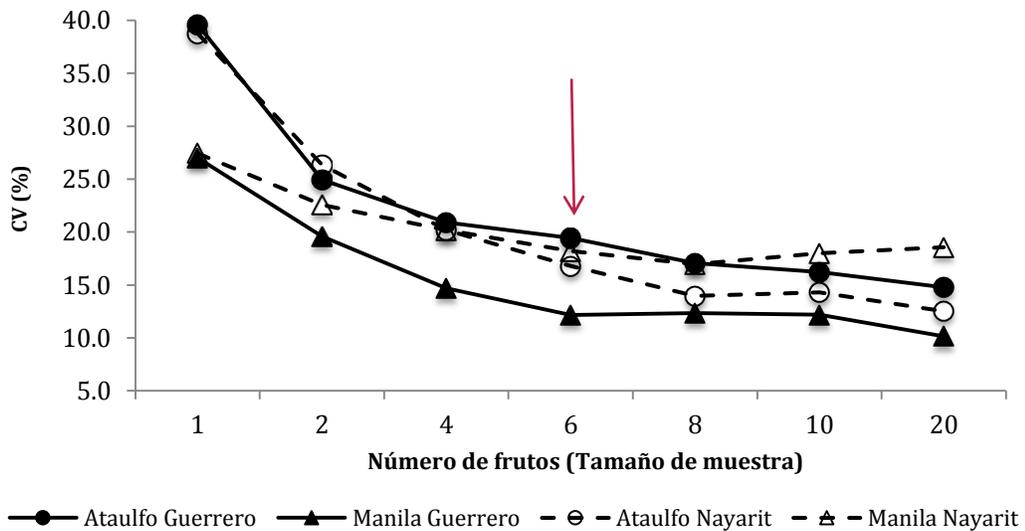


Figura 3. Coeficiente de variación en relación al número de frutos (tamaño de muestra) para la variable Peso de Embriones en mango Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit.

Para la característica número de embriones el punto de inflexión de la curva se observa en seis frutos. El cv. Manila de Nayarit presentó los mayores coeficientes de variación, los cultivares de Guerrero y Ataulfo de Nayarit tuvieron valores muy cercanos de CV en todos los tamaños de muestra al observarse las curvas casi empalmadas. De acuerdo a los valores donde la curva se vuelve asintótica podemos definir el mejor tamaño de muestra en seis frutos con CV de 10.9 a 24.2 % (Figura 4).

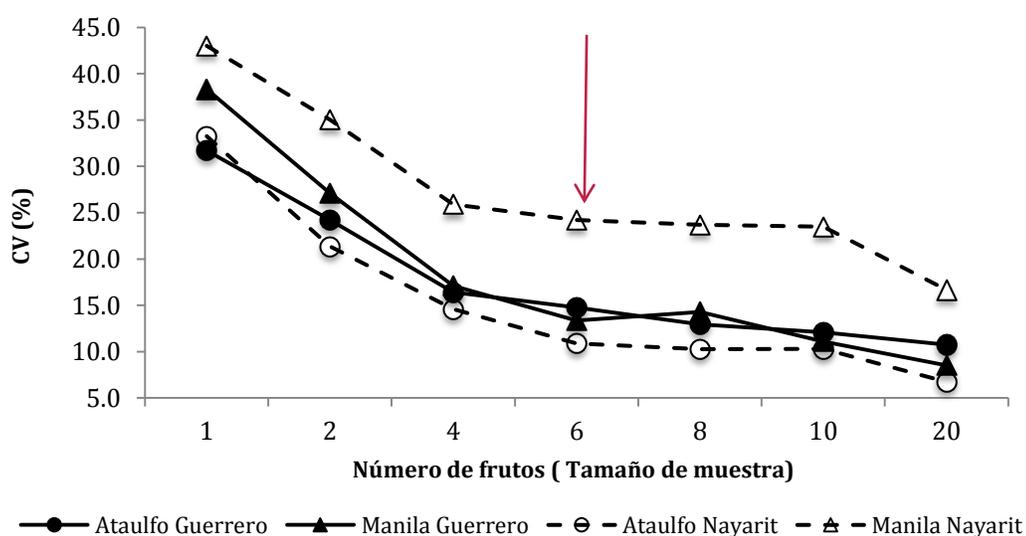


Figura 4. Coeficiente de variación en relación al número de frutos (tamaño de muestra) para la variable Número de Embriones en mango Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit.

En la variable peso del embrión de mayor tamaño el punto de inflexión se encuentra en tamaño de muestra seis, diferente al resto de variables evaluadas, y se vuelve asintótica en ocho frutos. Los cultivares de Guerrero (Manila y Ataulfo) presentaron CV menores en todos los tamaños de muestra en comparación a los cultivares de Nayarit. (Figura 5).

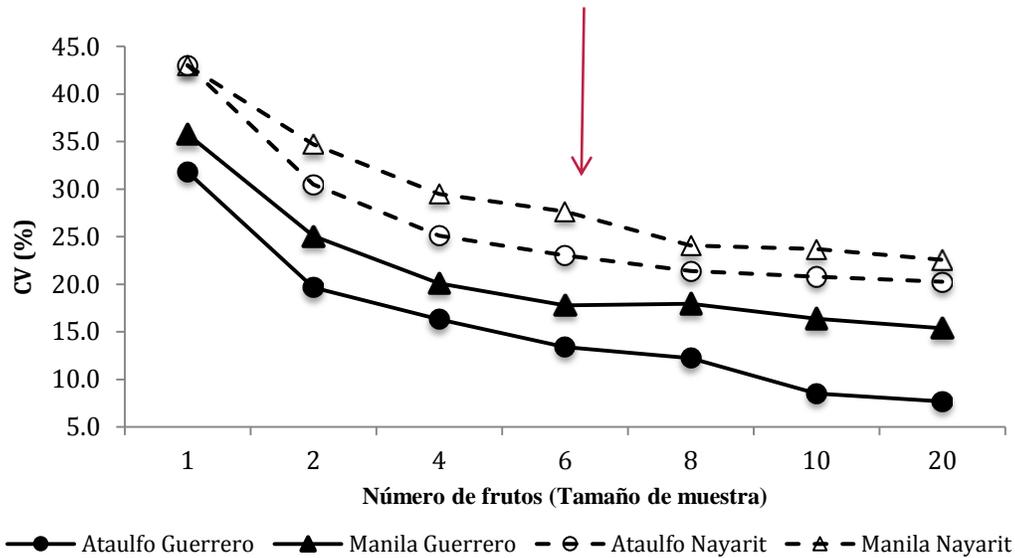


Figura 5. Coeficiente de variación en relación al número de frutos (tamaño de muestra) para la variable Peso de embrión de mayor tamaño en mango Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit.

Se puede resumir que en las variables evaluadas el punto de inflexión de la curva es consistente en seis frutos, y después la curva se vuelve asintótica en ocho frutos en ambos cultivares y procedencias.

De acuerdo a los resultados de porcentaje de poliembrionía, Ataulfo presentó mayores valores en comparación con Manila, así mismo fue mayor en Nayarit, mientras que en el caso de Manila no hubo variación entre lugares (Cuadro 1). Esto difiere de lo encontrado por Martínez-Ochoa *et al.* (2012) quienes reportan porcentaje de poliembrionía de 97 % para Manila y 95 % para Ataulfo, esto puede deberse a la zona de recolecta la cual fue diferente, es decir que las condiciones del ambiente, así como factores nutricionales y genéticos pueden estar influyendo directamente en la tasa de poliembrionía (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005; Bastianel *et al.*, 1998).

Cuadro 1. Porcentaje de poliembrionía evaluado a partir de tamaño de muestra de 20 frutos de mango cv. Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit.

% de Poliembrionía			
Ataulfo		Manila	
Guerrero	Nayarit	Guerrero	Nayarit
91.6	98.3	83.3	83.9

En las características peso de fruto, de embriones, de embrión de mayor tamaño y número de embriones hay diferencias significativas entre cultivares, solamente peso de semilla mostró ser igual (Cuadro 2). Ataulfo presentó frutos de mayor tamaño y mayor número de embriones por semilla, Manila presentó mayor peso de embriones así como peso de embrión de mayor tamaño. En este caso el número promedio de embriones encontrados en esta investigación es similar de los reportados por Martínez-Ochoa *et al.* (2012) donde Manila presenta en promedio 3.4 y Ataulfo 3.2.

Cuadro 2. Características morfológicas de semillas de mango cv. Manila y Ataulfo evaluados con tamaño de muestra de 20 frutos.

Cultivar	Peso de fruto	Peso de semilla	Peso de embriones	Peso de embrión de mayor tamaño	No. de embriones
Ataulfo	246.6 a ^z	16.23 a	9.1 b	6.1 b	3.1 a
Manila	229.1 b	16.21 a	9.9 a	6.7 a	2.6 b

^zMedias con la misma letra en cada columna no difieren estadísticamente Tukey ($P \leq 0.05$)

En general se observó que peso de fruto y semilla al tener los CV menores son características menos variables en comparación con peso y número de embriones así como peso del embrión de mayor tamaño.

El número de embriones tuvo los coeficientes de variación más altos, lo cual tiene sentido ya que el número de embriones entre cultivares es diferente (Manila y Ataulfo) y dentro de los mismos frutos lo cual puede ser atribuible al estado nutricional de la planta así como a las condiciones edafo-climáticas (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005). Por otra parte las aquellas variables de conteo no se ajustan

del todo a la normal por lo tanto suelen presentar CV elevados. Toebe *et al.* (2012) consideran que valores de CV entre 10 y 15 % son considerados intermedios o aceptables para fines de experimentación agrícola.

En lo que respecta al comportamiento de cada cultivar y lugar de procedencia Manila de Nayarit para todos los casos fue el material con los más altos CV es decir presentó mayor variabilidad, mientras que Manila de Guerrero solo presentó altos CV en peso de fruto, en el resto de las variables se mantuvo con CV bajos similares a el resto de los materiales evaluados. En el caso del cultivar Ataulfo de Nayarit tuvo los CV menores en las variables peso de fruto y número de embriones, y Ataulfo de Guerrero los menores CV para peso del embrión de mayor tamaño.

En trabajos similares para determinar tamaño de muestra se reportan CV de 22.3 a 32 % en el caso de melocotón para firmeza de pulpa, lo que califican como alta variabilidad y de 12.16 a 14.71 % para la característica acidez considerada intermedia (Toebe *et al.*, 2012). Los valores obtenidos en mango con seis muestras son similares a los reportados en otros trabajos. Así mismo, en relación a los CVs mayores se puede argumentar que para caso de mango si se incrementara demasiado la muestra puede propiciar la aparición de frutos atípicos que podrían reflejarse también en mayores CVs. Se debe considerar al momento de realizar la evaluación que la muestra sea aleatoria y representativa del cultivar en estudio.

Trabajos previos enfocados a poliembrionía principalmente en frutales (cítricos y mango) han utilizado distinto tamaño de muestra para su estudio. En cítricos, específicamente *Citrus resnhi* usaron 25 semillas para evaluar poliembrionía mediante marcadores moleculares RAPDS (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005a) caso similar en *C. volkameriana* con el mismo número de semillas (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004). Martínez-Ochoa *et al.* (2012) evaluaron 100 frutos de Manila y 100 de Ataulfo para obtener la tasa de poliembrionía y 20 semillas para detectar si en un esquema de cultivo *in vitro* los embriones de las plántulas obtenidas eran de origen cigótico o núcelar. Mientras que Cordeiro *et al.* (2006) usaron 9 semillas del cultivar

Rosinha y 36 plántulas obtenidas de estas para análisis molecular mediante el uso de RAPDS en la detección de procedencia cigótica o nucelar.

Por otra parte, algo similar a nuestros resultados se ha reportado en cultivos básicos, tal es el caso de maíz que a pesar de ser uno de los cultivos que muestra mayor variación genotípica e interacción genotipo ambiente han determinado que con un tamaño de muestra de 6 plantas es suficiente (Márquez-Sánchez *et al.*, 1970); al igual que en papayo y camote con un tamaño de muestra de seis y ocho plantas por parcela con cuatro repeticiones para estudios en condiciones de invernadero (Lima *et al.*, 2007; Vallejo y Mendoza, 1992).

2.4 CONCLUSIONES

1. Para las características número de embriones, peso de fruto, peso de semillas, peso de embriones y peso de embrión más grande, el tamaño de muestra óptimo de muestra fue seis frutos.
2. El mango Ataulfo presentó mayor porcentaje de poliembrionía que Manila, en ambos estados.

2.5 LITERATURA CITADA

- Agustí, M. 2003. Citricultura. 2nd. ed. Madrid, España: Mundi-Prensa. 244 p.
- Andrade-Rodríguez., M., A. Villegas M., G. Carrillo C. and A. García V. 2004. Polyembryony and identification of Volkamerian lemon zygotic and nucellar seedlings using RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39:551-559.
- Andrade-Rodríguez., M., A. Villegas M., A. Gutiérrez E., G. Carrillo C. and A. García V. 2005. Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. *Agrociencia* 39:371-383.
- Bandeira, C.T., S. K. G. Fortes, M. Toebe, L. Saifert, C. L. Giacobbo and L. J. Welter. 2016. Sample size for estimate the averange of *Passiflora caerulea* fruits traits. *Ciência Rural* 46 (10):1729-1736.
- Bastianel, M., S. F. Schwarz, H. D. Coletta-Filho, L. L. Lin, M. Machado and O. C. Koller. 1998. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. *Genetics and Molecular Biology* 21:123-127.
- Coelho, A. A., E. M. S. De Oliveira, E. D. De Resende and J. L. Thiébaud. 2011. Dimensionamento amostral para a caracterização da qualidade póscolheita do maracujá-amarelo. *Revista Ceres* 58(1):23-28.
- Cordeiro, M.C.R., A. C. Q. Pinto, V. H. V Ramos, F. G. Faleiro and 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. *Revista Brasileira de Fruticultura* 28:454-457.
- Galán, S. V. 2009. El Cultivo del Mango. 2nd. ed. España: Mundi-Prensa, 340 p.
- Gálvez-López., D., M. Salvador-Figueroa., E. N. Becerra-Leor., M. González-Paz., S. Hernández-Delgado and N. Mayek-Pérez. 2010. Molecular diversity and genetic relationships of mango germplasm from Chiapas, México. *Agrociencia* 44:907-915.
- Koltunow, A.M. 1993. Apomixis:Embryo sacs and embryos formed without meiosos or fertilization in ovules. *The plant cell* 5:1425-1437.

- Kundan, K., N. Monika, D. Rinchen, L. Boniface and B. Pandey. 2012. Polyembryony and seedling emergence traits in apomictic citrus. *Scientia Horticulturae* 138:101-107.
- Lima, J. F. De., C. P. Peixoto, C. A. Da S. Ledo and G. A. Faria. 2007. Tamanho ótimo de parcela para experimentos com plantas de mamoeiro em casa de vegetação. *Ciência e agrotecnologia* 31(5):1411-1415.
- Lorentz, L. H. L., A. D. Lúcio, L. Storck, S. J. Lopes, A. A. Boligon and R. H. Carpes. 2004. Variação temporal do tamanho de amostra para experimentos em estufa plástica. *Ciencia Rural* 34(4):1043-1049.
- Márquez-Sánchez., F. and A. R. Hallauer. 1970. Influence of sample size on the estimation of genetic variance in a synthetic variety of maize. II Plant and ear characters. *State Journal of Science* 44(4):423-436.
- Martínez Ochoa., E. Del. C.; M. Andrade-Rodríguez., R. M. Rocandio and A. Villegas-Monter. 2012. Identification of zygotic and nucellar seedlings in polyembryonic mango cultivars. *Pesquisa Agropecuaria brasileira* 47(11):1629-1636.
- Meza-Castillo, E., A. F. Barrientos-Priego., J. E. Rodríguez-Pérez y M. I. Reyes-Santamaria. 2010. Determinación del tamaño de muestra de características del xilema de brote de aguacate mediante remuestreo. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 45(12):1531-1535.
- Miranda, C., T. Girard and P.E. Lauri. 2007. Random simple estimates of tree mean for fruit size and color in Apple. *Scientia Horticulturae* 11(2):33-41.
- Quero-Carrillo, A.R., J. F. Enríquez-Quiroz., C. R. Morales-Nieto y L. Miranda-Jiménez. 2010. Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 1(1):25-42.
- Sánchez, H. M. A., A. Mejía C., C. Villanueva V., J. Sahagún C., C. Sánchez H. y Ma. C. Jiménez R. 2006. Determinación del tamaño adecuado de parcela experimental en calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *Stenosperma*). *Revista Fitotecnia Mexicana* 29(4):339 -348.
- Santos, C. Q. De J., E. A. Girardi, E. L. Vieira, C. A. da S. Ledo and W. dos S. Soares-Filho. 2015. Tamanho ótimo de amostras de frutos e de sementes

- para determinacao da poliembrionía em citros. Revista Brasileira de Fruticultura 37(1): 172-178.
- SIAP. 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [http://www. siap](http://www.siap) (Abril 2017).
- Toebe, M., V. Both, A. Brackmann, A. C. Filho and F.R. Thewes. 2012. Tamanho de amostra para a estimação da média de caracteres de pêsego na colheita e após o armazenamento refrigerado. *Ciência Rural* 42(2):209-212.
- Vallejo, R.L. and H. A. Mendoza. 1992. Plot Technique Studies on Sweetpotato Yield Trials. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117(3):508-511.
- 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* 149-167 p.
- Vargas R., J.C. y J.R. Navarro F. 2014. Determinación de un tamaño adecuado de unidad experimental, utilizando el método de curvatura máxima, para ensayos de arroz (*Oryza sativa*), en Bagaces, Guanacaste. *InterSedes: Revista de las Sedes Regionales*. 15(31):128-144.

CAPÍTULO III. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE FRUTOS, SEMILLAS Y EMBRIONES DE MANGO CV. MANILA Y ATAULFO

RESUMEN

La poliembrionía es una característica importante debido a que el embrión sexual da origen a una planta producto de recombinación genética, al mismo tiempo se pueden tener plantas de origen nucelar. Con la finalidad de observar algunas características morfológicas de frutos que puedan ser correlacionadas con aspectos de poliembrionía se realizó la caracterización morfológica en frutos, semillas y embriones de mango cvs. Manila y Ataulfo. Se colectaron frutos de dos localidades de Chiapas, Guerrero y Nayarit en 2013 y 2014. Se evaluaron de cada localidad, peso, largo y ancho de 20 frutos y semillas. Así mismo se obtuvo el peso de los embriones y del embrión de mayor tamaño. Se observó la forma, arreglo y facilidad de separación de los embriones de cada cultivar y color de la radícula. También se determinó el porcentaje de poliembrionía y el número de embriones por semilla. El peso de la semilla es una característica que sirve para inferir del tamaño de los embriones, y el tamaño del embrión más grande. El cv. Manila presentó hasta siete embriones por semilla, mientras que Ataulfo ocho, sin embargo en ambos cultivares fue frecuente encontrar tres embriones. Ambos cultivares presentaron semillas monoembrionicas el cv. Manila presentó 20 % y el cv. Ataulfo 10 %. El color de la radícula fue un rasgo distintivo entre cultivares, en el cv. Ataulfo es de rosa a rojo y en el cv. Manila crema. Otra característica importante es que el cv. Ataulfo presentó mayor facilidad de separación de embriones.

Palabras clave: *Mangifera indica* L., semillas poliembriónicas, número de embriones

MORPHOLOGICAL DESCRIPTION OF MANGO FRUIT, SEEDS AND EMBRYOS CV. MANILA AND ATAULFO

ABSTRACT

Polyembryony is an important characteristic because the sexual embryo gives rise to a plant product of genetic recombination, at the same time can have plants of nucelar origin. In order to observe some morphological characteristics of fruits that can be correlated with aspects of polyembryony, the morphological characterization in fruits, seeds and embryos of Mango cvs Manila and Ataulfo was performed. Fruits from two localities of Chiapas, Guerrero and Nayarit were collected in 2013 and 2014. Twenty fruits and seeds were evaluated from each locality, weight, length and width. Also the weight of the embryos and of the embryo of greater size was obtained. The shape, arrangement and ease of separation of the embryos of each cultivar and color of the radicle were observed. The percentage of polyembryony and the number of embryos per seed were also determined. The weight of the seed is a feature that is inferred from the size of the embryos, and the size of the largest embryo. Manila cv presented up to seven embryos per seed, while Ataulfo eight, however in both cultivars it was common to find three embryos. Both cultivars presented seeds monoembryonic cv Manila presented 20% and cv Ataulfo 10%. The color of the radicle was a distinctive feature among cultivars, in the cv Ataulfo is from pink to red and in the cv Manila cream. Another important characteristic is that the cv Ataulfo presented greater ease of separation of embryos.

Key words: *Mangifera indica* L., polyembryonic seeds, number of embryos

3.1. INTRODUCCIÓN

El género *Mangifera* consta aproximadamente de 72 especies, las cuales son nativas de la península de Malaya y Sumatra y otras regiones del sudeste de Asia (Parrota, 2000; Singh *et al.*, 2016). *Mangifera indica* L. (mango), es sin duda la especie de mayor importancia de la familia de las Anacardiaceas, tanto por su distribución mundial como por su importancia económica (Galán, 2009). México es el quinto país de mayor producción de mango con 1,724,609 t durante el 2014 (FAO-STAT, 2014).

Los mangos se pueden clasificar en cultivares monoembrionicos y poliembrionicos ya que las semillas presentan la características de poliembrionía (Mukherjee y Litz, 1997; Quero-Carrillo *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2015). Entre los monoembrionicos se encuentran los cultivares de origen de la India y entre los poliembrionicos están los de Filipinas e Indochina (Parrota, 2000).

En mango se reporta polinización cruzada, la cual se lleva a cabo por viento y polinizadores, principalmente murciélagos (Morton, 1987). Sin embargo, otros autores mencionan que la polinización ocurre naturalmente por insectos de los órdenes Díptera, Coleóptera, Lepidóptera e Himenóptera (Sousa *et al.*, 2010; Corredor y García, 2011). Se considera que las abejas, los abejorros y la mosca doméstica son los principales polinizadores (Bhatia *et al.*, 1995).

Los frutos de mango son una drupa grande, sencilla, carnosa y resinosa. El fruto tiene una sola semilla, que puede contener uno o más embriones. Se presentan en solitario o en racimos (Coello *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2015). El tamaño del fruto varia, dependiendo del cultivar, pudiendo tener hasta 30 cm. de longitud. Así mismo, su forma es generalmente de riñón, redondo u ovado y el peso de la fruta varia de 200 hasta 2 000 g, el sabor depende el cultivar (Khan *et al.*, 2015).

El fruto está conformado por epicarpio, mesocarpio y endocarpio, y la semilla por tegumentos cotiledón y radícula. El epicarpio tiene células isodiamétricas con

paredes duras y canales oleoresinosos en la parte inferior que le confieren el típico sabor y olor a trementina (Sergent, 1999). Así mismo puede ser coriáceo o ceroso, liso y en ocasiones áspero. El color cuando el fruto está maduro puede ser verde pálido, amarillo con diferentes tonalidades, o amarillo con rubor rojo o púrpura, lo cual también depende del genotipo (Khan *et al.*, 2015).

El mesocarpio es un tejido de parénquima suave, con abundantes cromatóforos o plastidios que contienen los pigmentos que le dan el color a la pulpa. La pulpa es rica en sólidos solubles totales, lo que le confiere un sabor dulce, y además contiene proteína, y vitaminas B, C y A. En menor cantidad contiene taninos y grasas. Su sabor se asocia al contenido de azúcares, ácidos y sustancias aromáticas (Sergent, 1999). Puede, incluso tener un sabor a trementina (Khan *et al.*, 2015). El endocarpio es duro y por la parte externa presenta fibras que penetran al mesocarpio, lo cual varía de acuerdo al cultivar (Sergent, 1999).

La semilla de mango es conocida técnicamente como “piedra” (Khan *et al.*, 2015). Es oblonga, ovoide, alargada y delgada (aplastada) (Parrota, 2000). El endocarpio es una cubierta dura, gruesa y coriácea que tiene la función de proteger la semilla (embriones). La semilla presenta una testa y tegumento fino similar a un papel (Mukherjee y Litz, 1997; Khan *et al.*, 2015).

La poliembrionía se da por un proceso llamado apomixis, en este caso de tipo facultativo. En este proceso se lleva a cabo el desarrollo de varios embriones de origen nucelar así como el embrión sexual de manera simultánea en una sola semilla (Kishore *et al.*, 2012; Koltunow, 1993). Algunos autores mencionan que el carácter de poliembrionía es un rasgo poligénico, mientras que otros dicen que es una característica regida por un gen dominante (Arón *et al.*, 1998).

En mango esta característica es importante debido a que en los programas de mejoramiento el embrión sexual da origen a una planta producto de recombinación genética. A la vez, de la semilla se desarrollan plántulas nucleares que son clones de

la planta madre, las cuales tienen el beneficio de promover uniformidad en los huertos si son utilizadas como portainjertos, además de poder presentar resistencia a ciertas enfermedades etc. (Cordeiro *et al.*, 2006).

Entre los cultivares poliembríonicos encontramos Ataulfo y Manila. El cultivar Ataulfo es originario de Tapachula, Chiapas, México. Es un árbol vigoroso, con capacidad de producción de hasta 20 t/ha. Se menciona que es moderadamente resistente a antracnosis. Los frutos pesan de 200 a 300 g, son elongados, amarillos, dulces con ligera acidez, firmes y de buena calidad postcosecha (Kinght *et al.*, 2009).

El cultivar Manila es de origen mexicano. El árbol es grande, vigoroso, de copa abierta. Los frutos son color amarillo brillante, en ocasiones presentan cierto rubor rosa claro y algunos puntos rojizos, largos y esbeltos con base redondeada, ápice sin punta en ocasiones con pico pequeño. La longitud de 12.5 a 14 cm y 5.5 a 6 cm de ancho, y grosor de 5 a 5.5 cm. El peso varía de 180 – 260 g. La piel es delgada de fácil separación. El mesocarpio es de consistencia media a jugosa, con poca fibra, color amarillo intenso, sabor dulce, aroma intenso de buena calidad. Presenta semillas poliembríonicas. Durante mucho tiempo ha sido considerado el mango más popular de México y tiene aceptación en el mercado nacional, pero es susceptible a antracnosis (Kinght *et al.*, 2009).

La evaluación y descripción morfológica de frutos es importante ya que se pueden determinar características para inferir parámetros relacionados con la poliembrionía (% de poliembrionía, número de embriones por semilla, peso de embrión de mayor tamaño), por lo cual en el presente estudio se planteó como objetivo realizar la caracterización morfológica de frutos, semillas y embriones de mango cvs. Manila y Ataulfo, procedentes de Chiapas, Guerrero y Nayarit, durante dos ciclos.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron frutos de los cvs. Manila y Ataulfo procedentes de Chiapas, Guerrero y Nayarit, México durante dos años 2013 y 2014. En Chiapas solo se recolectó el cv. Ataulfo en 2014. En cada estado se seleccionaron dos huertas y se cosecharon todos los frutos de 3 árboles por huerta (Cuadro 3).

Los frutos fueron cosechados en madurez fisiológica y llevados al laboratorio de Cultivo *In vitro* y Biotecnología de Frutales, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, donde se lavaron y marcaron de acuerdo a su procedencia y cultivar, para después continuar con la evaluación.

Se seleccionaron 20 frutos de cada genotipo y semillas de cada material se registraron los datos de las variables, peso (g), largo y ancho (cm) (Figura 6), así como peso y número de embriones por semilla además de peso del embrión de mayor tamaño y se determinó la relación largo/ancho (RLA) de frutos y semillas.

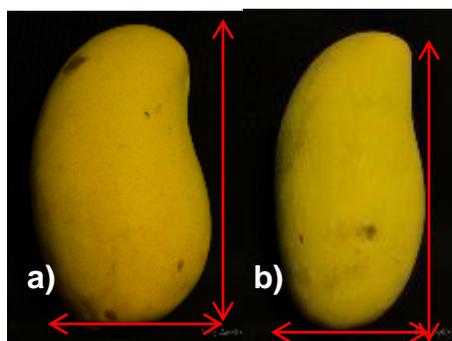


Figura 6. Frutos de mango cultivar a) Ataulfo y b) Manila.

De los frutos previamente seleccionados se extrajeron las semillas del fruto y fueron lavadas hasta eliminar por completo la pulpa (mesocarpio). Después se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 h y transcurrido el tiempo, con tijera de podar se cortó el endocarpio por la base, teniendo cuidado de no dañar los embriones.

Cuadro 3. Relación de huertos, localidades, estados, ubicación geográfica y clave de los cultivares de mango Manila y Ataulfo caracterizados morfológicamente.

Cultivar	Estado	Localidad	Huerta	Clave	Ubicación Geográfica	
					Latitud	Longitud
Ataulfo	Chiapas	Tonalá	“La Libertad”	A1Ch1	16° 08' 14.6''	93°52' 22.0''
	Chiapas	Tonalá	“La Libertad”	A2Ch1	16° 08' 16.2''	93°52' 24.2''
	Chiapas	Tonalá	“La Libertad”	A3Ch1	16° 08' 18.2''	93°52' 56.2''
	Chiapas	Tonalá	“Jaqueline”	A1Ch2	16°02' 35.9''	93°46' 56.1''
	Chiapas	Tonalá	“Jaqueline”	A2Ch2	16°02' 26.9''	93°46' 55.1''
	Chiapas	Tonalá	“Jaqueline”	A3Ch2	16°02' 33.9''	93°46' 52.3''
	Guerrero	Cuajuinicuilapa	“La Balsa”	A1G1	16°27' 35.7''	98°34' 51.9''
	Guerrero	Cuajuinicuilapa	“La Balsa”	A2G1	16°27' 35.7''	98°34' 55.1''
	Guerrero	Cuajuinicuilapa	“La Balsa”	A3G1	16°27' 36.9''	98°34' 55.1''
	Guerrero	Tecpan	“Huerta A”	A1G2	17°16' 12.4''	100° 33' 24''
	Guerrero	Tecpan	“Huerta A”	A2G2	17°16' 36.1''	100° 33' 12''
	Guerrero	Tecpan	“Huerta A”	A3G2	17°16' 25.1''	100° 33' 56''
	Nayarit	Tepic	“5 de Mayo”	A1N1	21°41' 11.9''	105°05' 3.84''
	Nayarit	Tepic	“5 de Mayo”	A2N1	21°41' 11.2''	105°05' 2.51''
	Nayarit	Tepic	“5 de Mayo”	A3N1	21°40' 50.1''	105°05' 5.87''
	Nayarit	Tepic	“Atonalisco”	A1N2	21°39' 40.1''	104°50' 28.8''
	Nayarit	Tepic	“Atonalisco”	A2N2	21°39' 38.7''	104°50' 29.6''
	Nayarit	Tepic	“Atonalisco”	A3N2	21°39' 39.5''	104°50' 27.5''
Manila	Guerrero	Cuajuinicuilapa	“La Balsa”	M1G1	16°27' 35.3''	98°34' 56.7''
	Guerrero	Cuajuinicuilapa	“La Balsa”	M2G1	16°27' 34.8''	98°34' 55.1''
	Guerrero	Cuajuinicuilapa	“La Balsa”	M3G1	16°27' 34.1''	98°34' 52.7''
	Guerrero	Tecpan	“Huerta M”	M1G2	17°18' 43.2''	100° 34' 43''
	Guerrero	Tecpan	“Huerta M”	M2G2	17°18' 34.1''	100° 34' 56''
	Guerrero	Tecpan	“Huerta M”	M3G2	17°18' 27.8''	100° 34' 51''
	Nayarit	Tepic	“La Libertad”	M1N1	21°30' 34.2''	104°56' 16.7''
	Nayarit	Tepic	“La Libertad”	M2N1	21°30' 33.9''	104°56' 15.1''
	Nayarit	Tepic	“La Libertad”	M3N1	21°30' 35.1''	104°56' 16.9''
	Nayarit	Tepic	“Las Palmas”	M1N2	21°30' 28''	104°52' 2.78''
	Nayarit	Tepic	“Las Palmas”	M2N2	21°30' 29.6''	104°52' 4.7''
	Nayarit	Tepic	“Las Palmas”	M3N2	21°30' 29.1''	104°52' 2.6''

Posteriormente se extrajo el conjunto de embriones envueltos en una cubierta papirácea, la cual se retiró y dejó solamente con la testa. Nuevamente se dejaron secar durante 24 h, a temperatura ambiente con la finalidad de poder retirar la testa y separar los embriones. En las figuras 7 (a, b, c, y d) y 8, se muestran las etapas descritas.

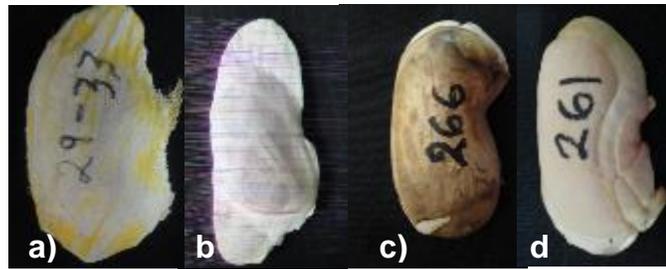


Figura 7. Semilla de mango poliembriónico Ataulfo, a)endocarpo, b)cubierta papirácea c) testa, d) conjunto de embrión



Figura 8.Disección de semillas y separación de embriones

Una vez que se retiró la testa, se procedió a observar el acomodo de los embriones para hacer la separación de los mismos teniendo cuidado de no dañar la radícula. Durante esta fase se observaron características cualitativas como: color, forma, acomodo y dificultad en la separación. En cada semilla se registró longitud, ancho, peso, número de embriones, peso de embrión de mayor tamaño y relación largo ancho (RLA). En las variables cuantitativas se calculó la media, mínimo, máximo, varianza, desviación estándar y coeficiente de variación.

Así mismo se obtuvo el porcentaje de poliembriónía y la frecuencia del número de embriones por semilla. Con la finalidad de conocer las relaciones entre características de fruto y semilla para inferir relaciones con poliembriónía, se realizaron correlaciones entre peso de fruto, y semilla con peso de los embriones,

peso del embrión de mayor tamaño y número de embriones, para lo cual se usó el paquete estadístico SAS (versión 9.3) (SAS, 2003).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Tamaño de fruto

Los frutos del cv. Ataulfo pesaron en promedio de 235.7 a 284 g, siendo los de Chiapas los de menor tamaño en comparación con los de Nayarit y Guerrero, que pesaron en promedio más de 280 g (Cuadro 4). Con respecto a la longitud, todos los frutos presentaron media de 11 cm, y de ancho entre 6 y 7cm a excepción de los frutos de Nayarit de la Huerta de Atonalisco que midieron 7.5 cm.

El peso de los frutos del cv. Manila osciló entre 230 y 264.6 g., la longitud fue de 11.5 a 12.2 cm y el ancho de 6.4 a 6.9 cm (Cuadro 5). En general los mangos de la Huerta las Palmas, en Nayarit fueron los más grandes por peso y longitud. Entre cultivares, los frutos de Ataulfo tuvieron mayor peso, pero los de Manila mayor relación largo ancho (RLA), lo cual indica que los frutos de Manila son más alargados (Cuadro 6). Los coeficientes de variación son mayores en peso de frutos en comparación con largo y ancho en ambos cultivares (Cuadros 4 y 5).

La variación existente en el tamaño de los frutos en los diferentes lugares de colecta podría deberse a la respuesta producto del efecto del ambiente o interacción genotipo ambiente (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005); por otra Gálvez-López *et al.* (2010) menciona que existe amplia diversidad morfológica y genética en frutos de mango debido a la recombinación sexual libre.

3.3.2. Tamaño de semillas

El peso de la semilla de Ataulfo varió de 13.3 a 18.6 g, siendo los materiales de Chiapas los que tuvieron semillas de mayor peso, estos pueden ser utilizados en producción de planta para portainjertos, al igual que los de Atonalisco, Nay., tomando en cuenta que a mayor tamaño del semilla y embrión, mayor vigor de

planta, tal como ha sido observado en cítricos (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004) sin embargo, el tamaño de semilla no es una característica deseable si requerimos frutos para exportación porque tienen menos pulpa.

En el caso de Manila, el peso de las semillas osciló entre 14.9 y 18 g, siendo los frutos con mayor tamaño de semilla los de Tecpan, Gro. lo cual fue similar a Ataulfo. El largo varió de 9 a 10 cm, mientras que el ancho, alrededor de 3cm.

La importancia en la evaluación de características como peso de la semilla, radica en que puede ser un indicativo de poliembrionía en este caso para determinar la cantidad de embriones por semilla. Andrade-Rodríguez *et al.* (2004) mencionan que un mayor número de embriones en la semilla aumenta la competitividad y por tanto la posibilidad de que el embrión de origen sexual se degenera.

La RLA de la semillas tuvo un comportamiento similar al de frutos en ambos cultivares, siendo mayor en Manila. De manera similar que en peso del fruto, el peso de la semilla tuvo mayor variación que el largo y el ancho.

3.3.3. Peso de embriones y peso de embrión de mayor tamaño

El peso del conjunto de embriones de Ataulfo varió en función de lugar de colecta. Los materiales de Chiapas y Nayarit tuvieron embriones con peso promedio de 8 y 9 g., respectivamente; mientras que los de Nayarit fueron los de mayor fluctuación entre 6.8 y 12.5 g. En Manila no hubo diferencia en cuanto al lugar de procedencia, tanto los de Guerrero como de Nayarit fluctuaron de 8.7 a 11.3 g.

El peso de los embriones fue muy variable como lo indican los altos coeficientes de variación en ambos cultivares. La mayor variación se encontró en el cv. Ataulfo proveniente de Chiapas (41.39 - 49.8 %).

De manera similar a peso de los embriones por semilla, se observó que el peso del embrión de mayor tamaño fue muy variable, siendo la característica que presentó los mayores CV.

El peso del embrión de mayor tamaño en el cultivar Ataulfo fluctuó de 5.52 a 8.59 g en promedio, siendo los de Tecpan, Gro. los de mayor peso. Mientras que en Manila, fluctuó entre 5.12 y 7.24 g y los materiales de Cuajinicuilapa, Gro., fueron los más grandes.

A pesar que en todos los materiales hubo alta variabilidad en el tamaño de embrión más grande, los de Ataulfo, de la Huerta Jaqueline, Tonalá, Chiapas, fueron los de mayor fluctuación, así como de los cvs. Manila de Cuajinicuilapa, Gro., con CV de 58.74 y 51.98 %, respectivamente.

Cabe señalar que con anterioridad solo se ha encontrado un trabajo donde evalúan los embriones por separado a pesar de su importancia que principalmente radica en su capacidad germinativa. Andrade-Rodríguez *et al.* (2005) menciona que el tamaño del embrión es una característica importante ya que los más pequeños carecen de suficientes reservas o se deshidratan por lo que son los menos viables. Por otra parte se cree que los embriones más grandes son los que dan origen a plantas idénticas a la planta madre y al germinar las semillas completas, se asume que el embrión de mayor tamaño es el que emerge (Cordeiro *et al.*, 2006) y por tanto se obtendrán plantas idénticas a la progenitora femenina.

Martínez-Ochoa *et al.* (2012), evaluaron peso y tamaño de embriones de mango encontrando que aquellos que se etiquetaron como 3 y 4, según su acomodo en la semilla, pesaron más y fueron mas largos, mientras que los embriones 1 y 2 fueron los más pequeños. A la vez reportan que solo el peso, la longitud y el tamaño del embrión 3 fue afectado significativamente por el número de embriones en la semilla, diferente a lo que sucede en cítricos, donde a mayor número de embriones por semilla menor tamaño de todos los embriones (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004).

De acuerdo a las correlaciones realizadas para estimar variables de poliembrionía, se observó que la correlación del peso de fruto es significativa con peso de los embriones, peso de embrión de mayor tamaño y número de embriones en algunos materiales solamente, lo cual demuestra la variabilidad entre los materiales, por lo que no se pudo definir como una variable asociada al tamaño de embriones. Sin embargo, el peso de la semilla presenta correlaciones significativas, tanto en 2013 como 2014 con las variables peso de embriones y peso de embrión de mayor tamaño, en todos los materiales evaluados, solo para número de embriones no hubo significancia (Cuadro 7). Lo anterior difiere con lo reportado por Martínez-Ochoa *et al.* (2012), quienes encontraron correlación positiva entre el peso de la semilla con el número de los embriones por semilla; quienes reportaron que en el cv. Manila cuando el peso de la semilla era entre 13 y 18 g tenían mayor número de embriones, y en el cv. Ataulfo cuando pesaban más de 19 g. Cabe indicar que Andrade - Rodríguez *et al.* (2004), al correlacionar características en frutos de cítricos (peso, diámetro ecuatorial, y número de carpelos) con el número de embriones y la longitud de estos, no encontraron correlación significativa, por lo que este aspecto se tiene que estudiar en todas las especies.

Cuadro 4. Valores promedio por huerto, mínimos, máximos, varianza, desviación estándar y coeficiente de variación para fruto, semilla y embriones de mango cv. Ataulfo de Chipas, Guerrero y Nayarit.

Clave	Estadísticos de dispersión	FRUTO			SEMILLA			EMBRIONES		
		Peso (PF)	Largo (LF)	Ancho (AF)	Peso (PS)	Largo (LS)	Ancho (AS)	Peso (PE)	Peso embrión mayor (PEM)	Número (NE)
		g	cm	cm	g	cm	cm	g	g	
ACh1	Media	247	10.6	6.8	17.6	8.4	3.5	8.1	6.8	2.3
Chipas 1	Min	173	8.9	6.0	7.8	7	3	1.3	1.0	1
	Max	338	12.4	7.9	28.1	10.6	4	18.5	15.4	5
	Varianza	1117.2	0.47	0.13	14.2	0.5	0.09	11.4	10.4	0.7
	Desviación estándar	33.4	0.69	0.36	3.7	0.7	0.29	3.3	3.2	0.8
	Coficiente de Variación	13.5	6.4	5.2	21.4	8.9	8.2	41.3	47.4	36.4
ACh2	Media	263	11.1	6.9	18.6	9.1	3.7	8.8	6.5	2.8
Chiapas 2	Min	146	9.6	5.9	7.3	8	3.2	1.4	0.7	1
	Max	405	13.1	7.9	29.7	11	4.7	18.7	18.0	5
	Varianza	2743.6	0.66	0.16	23.2	0.5	0.1	16	14.8	0.9
	Desviación estándar	52.3	0.81	0.40	4.8	0.7	0.3	4	3.8	0.9
	Coficiente de Variación	19.8	7.3	5.6	25.8	7.9	8.4	45.5	58.7	33.4
AG1	Media	257	11.2	6.9	13.3	9.1	3.5	6.8	5.5	2.3
Gro.1	Min	155	9.9	5.8	7.3	8.1	3.1	2.3	1.2	1
	Max	445	12.9	8.1	28.8	10.8	4.1	18.8	16.9	4
	Varianza	3726	0.4	0.25	17.5	0.4	0.05	11.5	9.3	0.6
	Desviación estándar	61	0.6	0.50	4.1	0.6	0.2	3.4	3.1	0.79
	Coficiente de Variación	23.7	6.1	7.13	31.3	6.8	6.3	49.8	57.3	34.2
AG2	Media	280	11.3	6.8	16.2	8.4	3.8	12.5	8.5	3.4
Gro.2	Min	210	10.1	6.1	5.4	1	3	6.8	4.1	2
	Max	392	13	7.5	33.3	11.4	4.7	20.9	18.1	8
	Varianza	1668.6	0.3	0.11	44.9	1.6	0.12	10.8	11.2	1.3
	Desviación estándar	40.8	0.6	0.33	6.7	1.2	0.3	3.2	3.3	1.1
	Coficiente de Variación	14.5	5.4	4.82	41.1	15.1	8.8	26.2	39.0	33.7

AN1	Media	235	11.	6.8	14.86	9.22	3.37	9.2	6.7	3.09
Nay. 1	Min	165	9.3	5.5	8.19	7.8	2.9	3.2	2.7	2
	Max	467	13.5	9.1	20.91	11	4.1	14.4	12.6	7
	Varianza	2868	0.85	0.41	7.20	0.69	0.07	5.9	6.5	1.08
	Desviación estándar	53.5	0.92	0.64	2.68	0.83	0.27	2.4	2.5	1.04
	Coefficiente de Variación	22.7	8.3	9.3	18	8.9	8.1	26.4	37.8	33.7
AN2	Media	283	11.1	7.5	18.53	9.10	3.65	9.5	7.0	2.89
Nay. 2	Min	199	9.8	6.4	7.38	7.7	3.2	0.8	0.6	1
	Max	386	12.8	9.5	31.05	10.6	8.7	21.9	18.2	5
	Varianza	1820	0.54	0.21	20.27	0.49	0.49	15.9	11.6	0.9
	Desviación estándar	42.6	0.73	0.46	4.50	0.70	0.70	4.0	3.4	0.9
	Coefficiente de Variación	15	6.60	6.07	24.29	7.70	19.13	41.7	48.2	33.4

n=20 frutos por árbol

Cuadro 5. Valores promedio por huerto, mínimos, máximos, varianza desviación estándar y coeficiente de variación para fruto, semilla y embriones de mango cv. Manila de Guerrero y Nayarit.

Clave	Estadísticos de dispersión	FRUTO			SEMILLA			EMBRIONES		
		Peso (PF) g	Largo (LF) cm	Ancho (AF) cm	Peso (PS) g	Largo (LS) cm	Ancho (AS) cm	Peso (PE) g	Peso embrión mayor(PEM) g	Número (NE)
MG1	Media	250.6	11.8	6.9	14.9	9.5	3.5	8.9	7.2	1.6
Gro.1	Min	173.4	9.6	6.0	8.0	7.5	3.1	3.2	3	1
	Max	402.7	14.3	9.6	28	11	5.1	18.1	18	5
	Varianza	2145.2	0.7	0.4	18.7	0.6	0.1	13.6	13.1	0.9
	Desviación estándar	46.3	0.8	0.6	4.3	0.8	0.3	3.6	3.7	1
	Coeficiente de Variación	18.4	7.3	9.6	28.9	8.4	8.9	41.2	51.9	63
MG2	Media	229.9	12.0	6.7	18	9.5	3.7	10.1	6.8	2.1
Gro.2	Min	25.9	10.6	6.2	10.7	8.2	3.3	4.8	3.5	1
	Max	416.2	14.4	7.6	27.2	11	4.3	18.4	14.7	5
	Varianza	3022	0.6	0.02	18.2	0.8	0.1	10.1	8.8	1
	Desviación estándar	55	0.7	0.2	4.2	0.9	0.3	3.1	2.9	1
	Coeficiente de Variación	23.9	6.5	4.3	23.7	9.8	9.8	31.2	43.4	46.5
MN1	Media	230.1	11.5	6.3	15	9.5	3.3	8.6	5.1	2.8
Nay.1	Min	158.6	9.5	5.5	8.4	8.2	3.1	4.6	2.6	2
	Max	344.1	14.1	9.4	29.5	11.7	4.1	14.7	10.6	5
	Varianza	2021.1	0.9	0.4	10.9	0.6	0.05	5.3	3.4	0.5
	Desviación estándar	45	0.9	0.6	3.3	0.7	0.2	2.5	1.8	0.7
	Coeficiente de Variación	19.5	8.3	10.8	22	8.2	6.7	29.9	36.3	26.6
MN2	Media	264.5	12.2	6.4	17.4	10.2	3.5	11.3	6.2	2.7
Nay. 2	Min	209.3	10.6	5.8	12.9	8.5	3	7.5	2.8	1
	Max	379.9	13.8	7.3	22.3	11.9	4.1	15.2	11.6	6
	Varianza	1118.5	0.5	0.1	5.7	0.5	0.04	3.9	5	1
	Desviación estándar	33.4	0.7	0.3	2.4	0.7	0.2	2.4	2.2	1
	Coeficiente de Variación	12.6	5.8	5.	13.7	7.2	5.6	21.9	35.6	37.7

n= 20 frutos por árbol

Cuadro 6. Relación largo/ancho de frutos y semillas de mango cvs. Manila y Ataulfo de Chiapas, Guerrero y Nayarit.

Estado	Cultivar	Clave	RLA	
			Fruto	Semilla
Chiapas		ACh1	1.6	2.4
		ACh2	1.6	2.4
Guerrero	Ataulfo	AG1	1.6	2.6
		AG2	1.6	2.2
Nayarit		AN1	1.6	2.7
		AN2	1.5	2.5
Guerrero	Manila	MG1	1.7	2.7
Nayarit		MG2	1.8	2.9
		MN1	1.8	2.8
		MN2	1.9	2.9

Cuadro 7. Correlación entre peso de fruto (PF), peso de semilla (PS), peso de embriones (PE), peso del embrión de mayor tamaño (PEM) y número de embriones (NE) en los cvs. Manila y Ataulfo de Chiapas Guerrero y Nayarit. 2013 y 2014..

Estado	Cultivar	Clave	Año	Correlaciones			
				PS-PE	PS-PEM	PS-NE	
Chiapas		ACH1	2013	-	-	-	
			2014	0.95**	0.83**	-0.19 ^{ns}	
		ACH2	2013	-	-	-	
			2014	0.92**	0.77**	0.21 ^{ns}	
Guerrero	Ataulfo	AG1	2013	0.91**	0.78**	0.09 ^{ns}	
			2014	0.94**	0.91**	0.36**	
		AG2	2013	0.72**	0.65**	0.37 ^{ns}	
			2014	0.48**	0.42**	0.13 ^{ns}	
		Nayarit	AN1	2013	0.95**	0.90**	-0.09 ^{ns}
				2014	0.91**	0.75**	0.04 ^{ns}
	AN2	2013	0.82**	0.37**	0.36**		
		2014	0.96**	0.85**	0.42**		
Guerrero	Manila	MG1	2013	0.78**	0.54**	0.12 ^{ns}	
			2014	0.96**	0.83**	-0.12 ^{ns}	
MG2		2013	0.90**	0.66**	-0.04 ^{ns}		
		2014	0.85**	0.71**	0.01 ^{ns}		
Nayarit		MN1	2013	0.95**	0.52**	0.23 ^{ns}	
			2014	0.78**	0.50**	0.13 ^{ns}	
	MN2	2013	0.90**	0.62**	-0.13 ^{ns}		
		2014	0.83**	0.39**	-0.06 ^{ns}		

n= 20 frutos por árbol; ^{ns} No significativo, *Significativo (P≤0.05), **Significativo(P≤0.01)

3.3.4. Forma, arreglo, y facilidad de separación de embriones

La forma y arreglo de los embriones, fue muy variable entre cultivares y dentro de ellos. Sin embargo; en Ataulfo el embrión de mayor tamaño estuvo ubicado de la base hacia la mitad del otro extremo y ahí podíamos encontrar la radícula en conjunto con las radículas de los demás embriones (Figura 9), aunque como se mencionó existieron diferentes formas de acomodo. En Manila, no existió un patrón predominante, fueron múltiples formas de acomodo y forma de embriones.

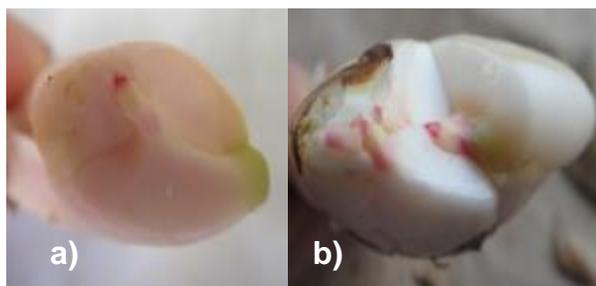


Figura 9. a) Embrión de mayor tamaño cv. Ataulfo b) se aprecia la radícula de embrión de mayor tamaño y radículas de los embriones.

También, la facilidad de separación de los embriones fue distinta entre cultivares. El cv. Manila presenta embriones fuertemente unidos, los cuales deben ser separados de forma lenta y cuidadosa para no romper los cotiledones ya que son más rígidos y están fuertemente unidos. Mientras que en Ataulfo son más flexibles y se despegan un poco más fácil, además de tener la ventaja de identificarse claramente la radícula por el color y reconocer los cotiledones de cada uno.

Algo similar reportan Martínez-Ochoa *et al.* (2012) quienes mencionan que a diferencia de los embriones de semillas maduras de cítricos, que son de muy fácil separación, en mango no pueden ser separados sin causar lesiones. Lo cual también evidencia que puede ser distinto proceso de formación de embriones para cítricos y mango. Por otra parte con los resultados observados podemos complementar que también existen diferencias para la facilidad de separación de los embriones entre cultivares de mango.

3.3.5. Color de radícula

Otra característica que se observó durante la evaluación de embriones fue el color de la radícula. En el cv. Manila fue color crema, del mismo tono que los cotiledones; mientras que en el cv. Ataulfo era color de rosado a rojo (Figura 10), lo que permitía fácilmente identificar los embriones para su separación. Esto es interesante ya que no había sido documentado, y con fines de descripción de embriones es una característica sobresaliente y distintiva para ambos cultivares.



Figura 10. Color de radícula de embriones de mango cvs. a) Manila y b) Ataulfo

3.3.6. Porcentaje de poliembrionía

Ataulfo presentó mayor porcentaje de semillas poliembriónicas en los dos años de evaluación. Existen fluctuaciones entre años, tal es el caso de los materiales de Tecpan, Guerrero que durante 2013 presentaron 80 % de semillas poliembriónicas y en 2014 el 100 % (Cuadro 8), caso contrario a lo que sucedió en los frutos de Ataulfo de Atonalisco, Nayarit, que durante 2013, presentaron 98.3 % y en 2014, 96.6 %. Cabe indicar que los cultivares de mango presentaron diferentes porcentajes de poliembrionía, en distintas localidades.

En el cv. Manila, los porcentajes de semillas poliembriónicas fueron menores en ambos años, en comparación con Ataulfo. En los frutos del cv. Manila de Cuajuinicuilapa, Guerrero, los porcentajes de semillas poliembriónicas disminuyeron de 80 % en 2013 a 63.3 % en 2014. Mientras que en los huertos MG2, MN1 y MN2 el porcentaje de semillas poliembriónicas aumentó del 2013 al 2014 (Cuadro 8). Las diferencias observadas entre años y localidades demuestra que la poliembrionía es afectada por el ambiente, tal como ha sido observado por Martínez-Ochoa *et al.* (2012) quienes reportaron 97 % de poliembrionía en el cv. Manila, y 95 % en

Ataulfo, lo que puede deberse a que fueron materiales de otra localidad (Ixcuincla, Nayarit). También se observó que entre localidades existieron diferencias (Cuadro 8). Para cítricos cuando la poliembrionía es mayor a 80 % la posibilidad de encontrar plantas de origen nucelar es mayor (Soares Filho *et al.*, 2000, 2003; Santos *et al.*, 2010), lo cual tiene relación con el hecho de que el embrión cigótico es de menor tamaño o puede degenerarse en el transcurso del proceso de su formación, quedando solo embriones nucleares idénticos a la planta madre.

Cuadro 8. Porcentaje de poliembrionía de mango cvs. Manila y Ataulfo de Chiapas, Guerrero y Nayarit, durante 2013 y 2014.

Estado	Cultivar	Clave Huerto	Poliembrionía (%)	
			Año	
			2013	2014
Chiapas	Ataulfo	ACh1	-	93.3
		ACh2	-	96.6
Guerrero		AG1	93.3	93.3
		AG2	80.0	100
Nayarit		AN1	98.3	100
		AN2	98.3	96.6
Guerrero	Manila	MG1	80.0	63.3
		MG2	68.3	85.0
Nayarit		MN1	86.7	100
		MN2	71.6	98.3

3.3.7. Número de embriones

El número de embriones por semilla, fue variable con relación al cultivar, la localidad y año de evaluación. Tanto el cv. Ataulfo como Manila de Nayarit presentaron mayor número de embriones por semilla (ocho y siete, respectivamente) durante 2013 (Figura 11). Algo similar se reporta en semillas del cv. Rosinha con siete embriones por semilla (Cordeiro *et al.*, 2006).

En el año 2013 y 2014 también se observaron diferencias en el número de embriones. A pesar que se encontraron semillas con hasta ocho embriones en ambos años, en 2014 el número máximo de embriones fue cinco (Figura 11 y 12).

Sin embargo, durante los dos años evaluados en todos los materiales la mayoría de semillas presentaron en promedio tres embriones (36.67 a 43.33 % y 37.82 a 48.74 %, año 2013 y 2014, respectivamente). Esto es similar a lo encontrado por Martínez-Ochoa *et al.* (2012) en los mismos cultivares con promedios de 3.4 embriones en Manila y 3.2 en Ataulfo. Sin embargo, contrario a lo que se observó en este trabajo ellos reportan hasta siete embriones en el cv. Manila y en Ataulfo cinco. Cabe mencionar que el cv. Manila presentó los mayores porcentajes de semillas monoembrionicas en ambos años.

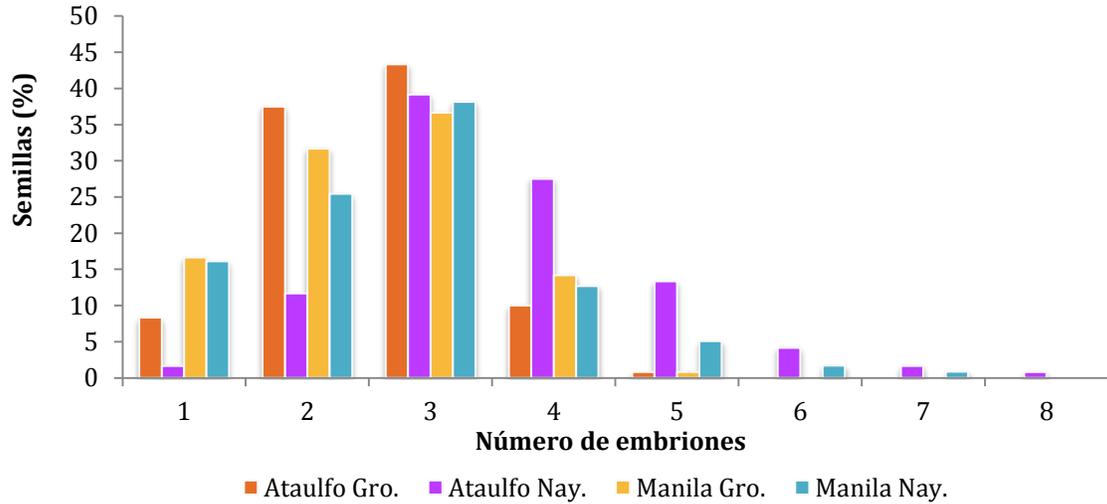


Figura 11. Frecuencia absoluta en el número de embriones por semilla de los cvs. Manila y Ataulfo procedentes de Guerrero y Nayarit durante 2013.

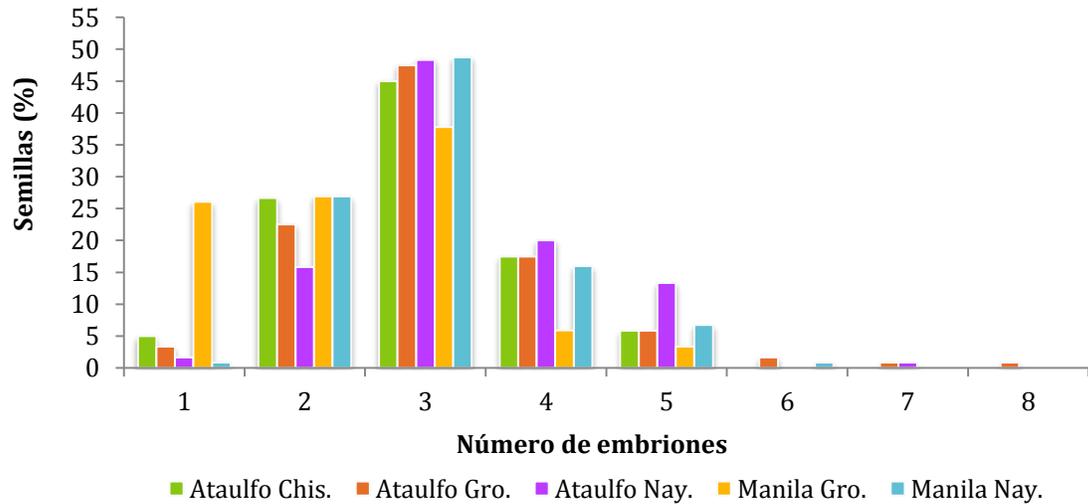


Figura 12. Frecuencia absoluta en el número de embriones por semilla de los cvs. Manila y Ataulfo procedentes de Chiapas, Guerrero y Nayarit durante 2014.

3.4. CONCLUSIONES

1. El porcentaje de poliembrionía en semillas varía en función del cultivar, localidad y año de evaluación.
2. El peso de semilla puede ser utilizado para inferir el tamaño de los embriones, y el tamaño del embrión más grande.
3. El color de la radícula permite diferenciar al cv. Ataulfo (rosado a rojo) del cv Manila (color crema).
4. El número de embriones varió entre cultivares y ciclos de evaluación.

3.5. LITERATURA CITADA

- Andrade-Rodríguez., M., A. Villegas-Monter., G. Carrillo-Castañeda. and A. García-Velázquez. 2004. Polyembryony and identification of Volkamerian lemon zygotic and nucellar seedlings using RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39:551-559.
- Andrade-Rodríguez., M., A. Villegas-Monter., Ma. A. Gutiérrez-Espinosa., G. Carrillo-Castañeda and A. García-Velázquez. 2005. Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in *citrus*. *Agrociencia*. 39:371-383.
- Aron, Y., H. Czosnek, S. Gazit and C. Degani. 1998. Polyembryony in mango (*Mangifera indica* L.) is controlled by a single dominant gene. *HortScience* 33: 1241–1242.
- Bhatia, R., D. Gupta, J. S. Chandel and N. K. Sharma. 1995. Relative abundance of insect visitors on flowers of major subtropical fruits in Himachal Pradesh and their effect on fruit set. *Indian Journal of Agric. Sci.* 65: 907–912.
- Coello, T. A., G. D. Fernández y S. Galán. 1997. Guía descriptiva de cultivares de mango. Departamento de Fruticultura Tropical. Instituto de Canarias de Investigaciones Agrarias. 43 p.
- Cordeiro, M. C. R., A. C. Q. Pinto, V. H. V. Ramos, F.G. Faleiro, and 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.
- Corredor, J. P. y J. García. 2011. Fenología reproductiva, biología floral y visitantes florales en los cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) Hilacha y Tommy Atkins en el Valle del Alto Magdalena (Colombia). *Rev. Corpoica* 12: 21–32.
- FAOSTAT. 2014. FAO Statistics Database on the World Wide Web. (<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>) (April 2014).
- Galán, S. V. 2009. El Cultivo del Mango. 2nd. ed. España: Mundi-Prensap. 340p.
- Khan, A. S., S. Ali, and I. A. Khan. 2015. Morphological and molecular characterization and evaluation of mango germplasm: an overview. *Scientia Horticulturae* 194:353-366.

- Kishore, K., N. Monika, D. Rinchen, B. Lepcha, and B. Pandey. 2012. Polyembryony and seedling emergence traits in apomictic citrus. *Scientia Horticulturae*. 138:101-107.
- Koltunow A.M. 1993. Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The plant cell*. 5:1425-1437.
- Kinght R.J., Jr. R.J. Campbell and I. Maguire. 2009. Important mango cultivars and their descriptors. In: Litz. E.R. (eds). *The mango: botany, production and uses* second ed. CAB International Homestead, FL, USA. 680 p.
- Martínez-Ochoa., E del C., M. Andrade-Rodríguez, M. Rocandio R. and A. Villegas M. 2012. Identification of zygotic and nucellar seedlings in polyembryonic mango cultivars. *Pesq. Agropec. Bras.* 47(11):1629-1636.
- Morton, J. F. 1987. Mango. *In: Morton, J. F. (Ed.), Fruits of Warm Climates*. Florida Flair Books, Miami, FL, pp: 221–239. Available on line at: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/mango_ars.html.
- Mukherjee, S.K. and R. E. Litz. 2009. Introduction: botany and importance. *In: Litz, R.E. (Ed.). The Mango: Botany, Production and Uses., 2nd ed.* CAB International, Wallingford, UK, pp: 1–18.
- Parrota, J. 2000. *Mangifera indica* L. Anacardiaceae *In: Francis, J.K., y Lowe, C.A. (Eds.) Bioecología de árboles nativos y exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales*. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Servicio Forestal. Instituto Internacional de Dasonomía Tropical Río Piedras, Puerto Rico. pp: 338-344.
- Quero-Carrillo, A. R., J. F. Enríquez-Quiroz., C. R. Morales-Nieto. y L. Miranda-Jiménez. 2010. Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 1(1):25:42.
- Sergent, E. 1999. *El cultivo del mango (Mangifera indica L.): botánica, manejo y comercialización*. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela. 315 pp.
- Singh, N. K., A. K. Mahato, P. K. Jayaswal, A. Singh, S. Singh, N. Singh, V. Rai, S. V. Mithra, K. Gaikwad, N. Sharma, S. Lal, M. Srivastava, J. Prakash, U. Kalidindi,

- S. K. Singh, A. K. Singh, K. Khan, R. K. Mishra, S. Rajan, A. Bajpai, B. S. Sandhya, P. Nischita, K. V. Ravishankar, M. R. Dinesh, N. Kumar, S. Jaiswal, M. A. Iquebal, D. Kumar, A. Rai and T. R. Sharma. 2016. Origin, diversity and genome sequence of mango (*Mangifera indica* L.). *Indian Journal of History of Science* 51(2):355-368.
- Santos, C. A. F., J. M. P. Lima Filho., and F. P. Lima Neto. 2010. Estratégias para o desenvolvimento de novas cultivares de mangueira para o Semiárido brasileiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32:493-997.
- SAS Institute. 2003. The SAS System for Windows. Release 9.3. SAS Institute. Cary, NC.
- Soares-Filho, W. Dos S., A. P. Da Cunha-Sobrinho., O. Sampaio-Passos., and E. D. Barreto-Moitinho. 2003. 'Maravilha': Uma nova seleção de tangerina 'Sunki'. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25 (2): 268-271.
- Soares-Filho, W. Dos S., Moreira, C. Dos S., Da Cunha, M.A.P., Da Cunha-Sobrinho, A.P., and Passos, O.S. 2000. Poliembrionia e frequência de híbridos em citrus spp. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35 (4): 857-864.
- Sousa, J. H., C. M. Pigozzo, and B. F. Viana. 2010. Polinização de manga (*Mangifera indica* L.—Anacardiaceae) variedade Tommy Atkins no Vale do São Francisco. *Bahia Oecol. Aust.* 14:165–17.

CAPÍTULO IV. IDENTIFICACIÓN DEL ORIGEN GENÉTICO DE EMBRIONES DE MAYOR TAMAÑO DE MANGO CVS MANILA Y ATAULFO MEDIANTE MARCADORES SSR's

RESUMEN

Mango (*Mangifera indica* L.) presenta poliembrionía al igual que cítricos y el modelo utilizado para explicarla se generó en Citrus, donde se determinó que el embrión de mayor tamaño es de origen asexual por lo cual el objetivo del presente trabajo fue determinar si el embrión de mayor tamaño en los cvs Manila y Ataulfo de mango son de origen nucelar, mediante el uso de marcadores microsátélites (SSRs). Durante 2013 y 2014 se colectaron frutos de Chiapas, Guerrero y Nayarit. Se separaron los embriones de mayor tamaño de 10 semillas por árbol de cada huerto estableciendo un total 30 embriones por localidad y 60 por estado para cada cultivar. De las plantas obtenidas se colectaron hojas jóvenes para extracción de ADN. Los SSRs fueron desarrollados a partir de 35 iniciadores específicos para mango de los cuales sólo amplificaron 16. Se logró definir marcadores SSRs que mostraron polimorfismos específicos en cv Ataulfo (MIAC-5, MIAC-4, mMiCIR003), cv Manila (MiSHRS-1+) para ambos cultivares (LMMA1, LMMA9, y mMiCIR030). Se utilizaron de tres parámetros para definir el origen genético de las plantas obtenidas del embrión de mayor tamaño. Primero cuando al menos tres iniciadores mostraron polimorfismos para la misma planta se considero diferente de la progenitora femenina, segundo índice de similitud genética (ISG) y tercero índice de parentesco (W) ambos con 95% de similitud. Con el primero y el segundo parámetro se determinó que al menos 10% de las plantas originadas del embrión de mayor tamaño en los cvs Manila y Ataulfo son diferentes a la planta madre mientras que el índice de parentesco (W) no las detectó. El porcentaje de semillas monoembriónicas fue 20 % en el cv Manila y 10% en el cv Ataulfo, porcentajes que en campo incrementan el número de plantas diferentes a la madre debido a que no siembran embriones separados.

Palabras clave: *Mangifera indica* L., poliembrionía, marcadores moleculares, contenido de información de polimorfismo (PIC), índice de similitud genética (ISG), probabilidad de parentesco (W).

IDENTIFICATION OF THE GENETIC ORIGIN OF MANGO LARGEST EMBRYO CVS. MANILA AND ATAULFO USING SSR MARKERS

ABSTRACT

Mango (*Mangifera indica* L.) presents polyembryony as well as citrus and the model used to explain it was generated in Citrus, where it was determined that the largest embryo is of asexual origin, so the objective of the present study was to determine if the embryo larger in mango Manila and Ataulfo are of nucelar origin, by using microsatellite markers (SSRs). During 2013 and 2014 fruits were collected from Chiapas, Guerrero and Nayarit. The largest embryos were separated from 10 seeds per tree of each orchard, establishing a total of 30 embryos per location and 60 per state for each cultivar. From the plants obtained young leaves were collected for DNA extraction. The SSRs were developed from 35 specific mango primers from which only amplified 16. SSRs that showed specific polymorphisms in Ataulfo (MIAC-5, MIAC-4, mMiCIR003), cv Manila (MiSHRS-1+) for both cultivars (LMMA1, LMMA9, and mMiCIR030). Three parameters were used to define the genetic origin of otenid plants of the larger embryo. First, when at least three primers showed polymorphisms for the same plant, it was considered different from the female parent, second genetic similarity index (ISG) and third relationships index (W), both with 95% similarity. With the first and second parameters, it was determined that at least 10% of the plants originated from the larger embryo in the cvs Manila and Ataulfo are different from the mother plant whereas the relationships index (W) did not detect them. The percentage of monoembryonic seeds was 20% in Manila and 10% in Ataulfo, percentages that in the field increase the number of different plants to the mother because they do not sow separate embryos.

Key words: *Mangifera indica* L., polyembryony, molecular markers, polymorphic information content (PIC), genetic similarity index (ISG), probability of relationship (W)

4.1 INTRODUCCIÓN

En las plantas con flor, se lleva a cabo de manera natural la reproducción sexual donde el desarrollo del gameto femenino ocurre en dos pasos: la megasporogénesis, donde a partir de la célula arquesporrial diploide ($2n$) se realiza la meiosis, que tiene como resultado la formación de la célula madre de la megáspora o también conocida como célula huevo haploide, es decir con n cromosomas. Después la megagametogénesis que da origen al saco embrionario (con dos sinérgidas y la ovocélula, dos núcleos polares y tres antípodas), donde se lleva a cabo la doble fecundación dando origen al embrión diploide y al endospermo triploide. Sin embargo existen otras formas de reproducción por semilla (Batygina y Vinogradova, 2007; Quero-Carrillo *et al.*, 2010).

Apomixis es una forma de reproducción asexual a través de semillas, que significa apo=sin y mixis=mezcla (Quero-Carrillo *et al.*, 2010). La apomixis se ha observado en 300 especies de plantas de 35 familias siendo las más comunes: gramíneas, rosáceas y rutáceas. En cultivos agrícolas se presentan en cítricos, manzana y mango (Koltunow, 1993; Aron *et al.*, 1998).

La apomixis puede llevarse a cabo por varios mecanismos que tienen en común tres componentes: 1) falta de meiosis durante la formación del saco embrionario, lo cual es llamado apomeiosis, 2) el desarrollo de un embrión independiente de la fertilización, conocida como partenogénesis y 3) la formación de endospermos viables a través de medios independientes a la fertilización o después de la fertilización con una célula espermática (Hand y Koltunow, 2014).

Los mecanismos de apomixis se clasifican en gametofíticos y esporofíticos, dependiendo donde se origine el embrión. Si el embrión se desarrolla a través de un saco embrionario es gametofítico y si se desarrolla a partir de células somáticas diploides dentro del óvulo es esporofítico (Hand y Koltunow, 2014).

Árboles frutales como el mango tienen genotipos poliembriónicos, de los cuales uno es sexual y el resto son de origen nucelar. Estas plantas son clones de la planta madre y se utilizan como portainjerto (Aron *et al.*, 1998; Cordeiro *et al.*, 2006).

La apomixis es importante como estrategia en la clonación de plantas, su resultado son plantas idénticas a la progenitora femenina (Quero-Carrillo *et al.*, 2010). La poliembriónía es un tipo de apomixis facultativa, donde una semilla desarrolla de manera simultánea embriones de origen nucelar y solo un embrión sexual (Kishore *et al.*, 2012).

En cítricos se han realizado numerosos estudios de poliembriónía, utilizando metodologías como: análisis por cromatografía de gases, patrones de isoenzimas etc.; sin embargo, los resultados pueden ser afectados por el ambiente, optando ahora por herramientas moleculares mediante el uso de ADN nuclear (Bastianel *et al.*, 1998; Cordeiro *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2008; Kishore *et al.*, 2012).

Andrade-Rodríguez *et al.* (2004) evaluaron poliembriónía en *Citrus volkameriana* de tres años de producción, mediante el uso de marcadores moleculares RAPDs, con la finalidad de identificar plántulas cigóticas y nucleares. En mejoramiento genético se han utilizado marcadores RAPDs, EST-SSR, y SSRs para identificar individuos cigóticos productos de la F1 en cruces de mandarinas de Montenegro (*Citrus deliciosa* Tenore) con King (*C. nobilis* Loureiro.); mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) con pomelo (*C. maxima* Merr.) así como mandarinas Robinson y Fremont, utilizados como progenitores femeninos y las variedades Midnight Valencia, Rhode Red Valencia, Valencia Late y Rio Red como progenitores masculinos, (Bastianel *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 2008; Yildiz *et al.*, 2013).

En mango para estudios de poliembriónía se ha intentado usar marcadores morfológicos, siendo poco confiables porque pueden ser afectados por condiciones ambientales (Khan *et al.*, 2015), también se han utilizado isoenzimas; pero estas pueden ser afectadas por la etapa de desarrollo y el tejido utilizado para la extracción

de ADN (Degani *et al.*, 1992; Aron *et al.*, 1998). Así mismo, se ha hecho uso de marcadores RAPD y SSR en la identificación del origen genético en embriones de mangos principalmente de los cvs. Manila, Ataulfo y Roshinia (Viruel *et al.*, 2005; Cordeiro *et al.*, 2006; Martínez - Ochoa *et al.*, 2012).

Los marcadores de ADN se agrupan en los que no utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por ejemplo los Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) que se sustentan en el corte con enzimas de restricción y la visualización de los fragmentos generados y los basados en PCR donde se sitúan los que utilizan iniciadores arbitrarios o semi-arbitrarios (RAPD) y aquellos que tienen iniciadores para sitios específicos. En estos últimos se encuentran los Microsatélites o simples secuencias específicas (SSR) (Azofeifa, 2006).

Los microsatélites son secuencias de ADN que consisten en unidades de mono-di-tri, tetra o penta nucleótidos que se organizan en tándem y localizan en la mayoría de las especies eucariotas (Powell *et al.*, 1996), se distribuyen tanto en regiones codificantes como no codificantes y son altamente polimórficos por lo que son eficientes para determinar diferencias entre especies o variedades muy relacionadas (Valadez y Kahl, 2000).

Los SSR tienen ventajas, en comparación a otros marcadores de ADN, por ser específicos, altamente reproducibles, de naturaleza multi-alélica, herencia co-dominante, abundantes y de amplia cobertura en el genoma (Duval *et al.*, 2005; Varshney *et al.*, 2005), por lo que son adecuados para estudios de diversidad o bien relaciones intraespecíficas (Duval *et al.*, 2005).

La tecnología de SSR suele ser relativamente fácil y barata si es una especie conocida, con ayuda de algunos programas computacionales se descarga información del GenBank para realizar el diseño de cebadores específicos del locus que flanquean (bordes de los microsatélites) (Powell *et al.*, 1996; Varshney *et al.*, 2005).

En mango se han diseñado microsátelites específicos usados en la evaluación de diversidad genética, donde incluyeron cultivares de diferente origen geográfico y tipo de semilla (poliembriónicos y monoembriónicos) (Duval *et al.*, 2005; Hosho *et al.*, 2005; Schnell *et al.*, 2005; Viruel *et al.*, 2005).

El objetivo del presente trabajo fue determinar si las plantas obtenidas del embrión de mayor tamaño en mango, cvs. Manila y Ataulfo, es de origen nucelar, mediante el uso de marcadores microsateletes (SSRs).

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Material Vegetal

Durante 2013 y 2014 se recolectaron mangos de los cvs. Ataulfo y Manila en tres zonas productoras: Chiapas (sólo cv. Ataulfo cosecha 2014) Guerrero y Nayarit (Cuadro 9). Dichas zonas fueron elegidas para tener como referencia la zona sur, centro y norte de la producción de mango en México. La recolecta se hizo de acuerdo a la época de producción; primero en Chiapas (Febrero-Marzo) seguido de Guerrero (Mayo) y finalmente Nayarit (Junio).

Cuadro 9. Relación de cultivares poliembriónicos evaluados, Ataulfo y Manila, año de colecta, clave, localización y ubicación geográfica

Colecta		Clave	Cultivar	Huerta	Localidad	Estado	Ubicación geográfica
2013	2014						
	✓	A1Ch1	1Ataulfo	"La Libertad"	Tonalá,	Chiapas	LN 16°08'14.6'' LW 93°52'22''
	✓	A2Ch1	2Ataulfo	"La Libertad"	Tonalá,	Chiapas	LN 16°08'16.2'' LW 93°52'24.2''
	✓	A3Ch1	3Ataulfo	"La Libertad"	Tonalá,	Chiapas	LN 16°08'8.2'' LW 93°52'56.2''
	✓	A1Ch2	4Ataulfo	Huerta Jaqueline	Tonalá,	Chiapas	LN 16°02'35.9'' LW 93°46'56.1''
	✓	A2Ch2	5Ataulfo	Huerta Jaqueline	Tonalá,	Chiapas	LN 16°02'26.9'' LW 93°46'55.1''
	✓	A3Ch2	6Ataulfo	Huerta Jaqueline	Tonalá,	Chiapas	LN 16°02'33.9'' LW 93°46'52.3''
✓	✓	A1G	13Ataulfo	"La Balsa"	Cuajuinicuilapa,	Guerrero	LN 16°27'35.7'' LW 98°34'51.9''
✓	✓	A2G	14Ataulfo	"La Balsa"	Cuajuinicuilapa,	Guerrero	LN 16°27'35.7'' LW 98°34'55.1''

✓	✓	A3G	15Ataulfo	“La Balsa” Cuajuinicuilapa, Guerrero	LN 16°27'36.9'' LW 98°34'55.1''
✓	✓	A1G	7Ataulfo	Tecpan, Guerrero	LN 17°16'12.4'' LW 100° 33'24''
✓	✓	A2G	8Ataulfo	Tecpan, Guerrero	LN 17°16'36.1'' LW 100° 33'12''
✓	✓	A3G	9Ataulfo	Tecpan, Guerrero	LN 17°16'25.1'' LW 100° 33'56''
✓	✓	A1N	19Ataulfo	Huerta 5 de Mayo Tepic, Nayarit	LN 21°41'11.9'' LW105°05'3.84''
✓	✓	A2N	20Ataulfo	Huerta 5 de Mayo Tepic, Nayarit	LN 21°41'11.2'' LW105°05'2.51''
✓	✓	A3N	21Ataulfo	Huerta 5 de Mayo Tepic, Nayarit	LN 21°40'50.1'' LW105°05'5.87''
✓	✓	A1N	22Ataulfo	Atonalisco Tepic, Nayarit	LN 21°39'40.1'' LW104°50'28.8''
✓	✓	A2N	23Ataulfo	Atonalisco Tepic, Nayarit	LN 21°39'38.7'' LW104°50'29.6''
✓	✓	A3N	24Ataulfo	Atonalisco Tepic, Nayarit	LN 21°39'39.5'' LW104°50'27.5''
✓	✓	M1G	16Manila	“La Balsa” Cuajuinicuilapan, Guerrero	LN 16°27'35.3'' LW 98°34'56.7''
✓	✓	M2G	17Manila	“La Balsa” Cuajuinicuilapan, Guerrero	LN 16°27'34.8'' LW 98°34'55.1''
✓	✓	M3G	18Manila	“La Balsa” Cuajuinicuilapan, Guerrero	LN 16°27'34.1'' LW 98°34'52.7''
✓	✓	M1G	10Manila	Tecpan, Guerrero	LN 17°18'43.2'' LW 100° 34'43''
✓	✓	M2G	11Manila	Tecpan, Guerrero	LN 17°18'34.1'' LW 100° 34'56''
✓	✓	M3G	12Manila	Tecpan, Guerrero	LN 17°18'27.8'' LW 100° 34'51''
✓	✓	M1N	25Manila	“La Libertad” Tepic, Nayarit	LN 21°30'34.2'' LW104°56'16.7''
✓	✓	M2N	26Manila	“La Libertad” Tepic, Nayarit	LN 21°30'33.9'' LW104°56'15.1''
✓	✓	M3N	27Manila	“La Libertad” Tepic, Nayarit	LN 21°30'35.1'' LW104°56'16.9''
✓	✓	M1N	28Manila	“Las Palmas” Tepic, Nayarit	LN 21°30'28'' LW 104°52'2.78''
✓	✓	M2N	29Manila	“Las Palmas” Tepic, Nayarit	LN 21°30'29.6'' LW 104°52'4.7''
✓	✓	M3N	30Manila	“Las Palmas” Tepic, Nayarit	LN 21°30'29.1'' LW 104°52'2.6''

4.2.2. Disección de semillas para evaluación de poliembrionía

Con el propósito de corroborar si las plantas del embrión más grande es nucelar, como se menciona para cítricos, (Passos *et al.*, 2006). Se separaron los embriones de mayor tamaño de 10 semillas por árbol de cada huerto estableciendo un total 30 embriones por localidad y 60 por estado para cada cultivar.

Una vez extraídas las semillas se dejaron secar durante 24 h, después se abrieron con tijera para podar, haciendo un corte cuidadoso en la orilla de la base para eliminar el endocarpo y la cubierta “papiracea” color crema. Posteriormente se dejaron “orear” por 24 h mas para poder retirar con facilidad la cubierta seminal con un bisturí, teniendo cuidado de no dañar los embriones cuando la cubierta estaba muy adherida. Después se procedió a separar los embriones de forma manual identificando previamente la zona de radícula para no dañarla durante la manipulación. En el caso de Ataulfo se distinguió fácilmente por presentar tonalidad de rosa a rojo.

4.2.3. Colecta de material vegetal para extracción de ácidos nucleicos

Con la finalidad de obtener material vegetativo de las plantas del embrión de mayor tamaño, se trasladaron al “Vivero Cazonos” localizado en Cazonos, Veracruz, México (LN 20°42'; LW 97°18'; altitud 23 m), se sembraron en sustrato compuesto por vermiculita, tepojal y lombricomposta (1:1:1 v/v/v). Cada planta fue identificada, para seguimiento de la procedencia, tanto de las plantas madre como de su progenie (10 plantas hijas por genotipo). Para la extracción de ADN se recolectaron hojas jóvenes (color rojizo-violáceo) de las plantas hijas, colocándolas en bolsas de glassine con perforaciones y transportadas en frío al laboratorio de Biotecnología de árboles frutales, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo de Méx. Las hojas se congelaron a -80 °C, para después liofilizarlas por un periodo de 24 a 48 h (Liofilizador LABCONCO, Freezone®), finalmente se molieron, en triturador Tissuelyzer (Retsch MM400, Alemania) a 35 hertz por 3 min y se almacenaron a -20°C.

4.2.4. Extracción de ADN nuclear

Para la extracción de ADN se usaron como referencia los métodos de Saghai-Marouf *et al.* (1984) para especies con alto contenido de metabolitos secundarios y Doyle y Doyle (1987) basado en el uso de CTAB.

El protocolo consistió en pesar 15 mg de tejido liofilizado en tubos de 1.6 mL, tipo eppendorf, se agregaron 600µL de buffer salino (1M Tris-HCL, 0.5 EDTA pH 8, 2M NaCl y albumina sérica 0.05%), se agitó en vortex, y dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 5000 crf por 4 minutos se decantó el sobrenadante, enseguida se agregaron 600 µL de buffer CETAB 2 % y 3 µL de β-mercaptoethanol agitando en vortex hasta homogeneizar completamente, se incubó a 55° C durante 1 h. Se agregaron 400 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) se dió vortex, se centrifugó a 12000 crf por 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregó 600 µL de isopropanol (frío), se homogeneizó por inversión y dejó reposar durante 20 minutos a -20 °C. Posteriormente se centrifugó a 5000 crf por 4 minutos y se desechó el sobrenadante. A la pastilla formada se le agregó 600 µL de etanol al 75 % (frío), se centrifugó a 5000 crf por 4 minutos. Se decantó el sobrenadante y se dejó el tubo a temperatura ambiente hasta que se evaporó el etanol en su totalidad. Finalmente se resuspendió la pastilla en 100 µL de agua destilada estéril y se agregó 5 µL de RNAsa (10 mM/mL) se dejó incubar a 35 °C por 30 minutos y después a 65 °C por 5 minutos para inactivar la RNAsa.

Para observar la integridad del ADN se corrió un gel de agarosa al 1 % (p/v) a 100 V durante 90 minutos, se tiñó con bromuro de etidio (10 mg·mL⁻¹) por 5 minutos, las bandas se observaron con luz UV; así mismo se evaluó calidad en el NanoDrop 1000c (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) en un rango de absorbancia de 260/280.

4.2.5. Marcadores Microsatélites

A partir de 35 iniciadores SSRs específicos para mango diseñados para evaluar diversidad genética por Duval *et al.* (2005), Hoscho *et al.* (2005), Schnell *et al.* (2005) y Viruel *et al.* (2005) se seleccionaron 16, ya que los demás no amplificaron aún con las temperaturas de alineamiento recomendadas (Cuadro 10.). La mezcla de PCR consistió en 50 ng de ADN, amortiguador de PCR con Mg 1x (ROCHE®), 2.5 mM de DNTPs (ROCHE®), 0.5 U de ADN polimerasa (Taq DNA Polimerasa Invitrogen®) y 0.2 µM de cada iniciador para un volumen final de 20 µL.

El programa de PCR fue: 94 °C por 4 minutos para desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 45 s, temperatura de alineación definida para cada iniciador por 1 min (Cuadro 10), de acuerdo al rango mencionado en los artículos de donde se obtuvieron dichos iniciadores, 72 °C por 1 min y finalmente un ciclo de 72 °C durante 8 min.

Al producto de PCR se le agrego 5 µL de amortiguador de carga (50 mM Tris, 5 mM EDTA pH 8, 25 % de sacarosa y 0.2 % p/v de azul de bromofenol) y se cargó en un gel de poliacrilamida de dos fases: “running acrilamide” y “staking acrilamide”, el amortiguador de corrida fue TG 1X usando un sistema de electroforesis vertical MGV-216-33 Dual Triple Wide Minivertical Electrophoresis System (C.B.S. Scientific, USA). La tinción se realizó con el protocolo utilizado en STS y SSR con AgNO₃ (0.2 %) (CIMMYT, 2006).

4.2.6. Análisis estadístico

Con la finalidad de determinar la capacidad de cada marcador para diferenciar el origen de las plantas (nucelar o cigótico) se calculó el contenido de información de polimorfismo (**PIC**) para cada iniciador de acuerdo a Novelli *et al.* (2006). Así mismo se calculó el índice que similitud genética de acuerdo a Mannen *et al.* (1993) para detectar diferencias entre individuos de la misma población. En este caso de las plantas hijas con el progenitor femenino. La fórmula utilizada fue:

$$ISG = \frac{(2p+q)}{2N}$$

donde **p** es el número de alelos iguales entre dos genotipos, **q** es el número de alelos diferentes entre dos individuos (heterocigotos) y **N** es el número total de alelos analizados.

Cuadro 10. Iniciadores microsátélites para mango (*Mangifera indica* L.), lugar de ubicación, secuencia, tamaño de alelo (pb) y temperatura de alineación (T_a).

Locus	Secuencia de iniciadores (5' – 3')	Tamaño de alelo (pb)	T_a (°C)
MiSHRS-4 ^a	F: CCACGAATATCAACTGCTGCC R: TCTGACACTGCTCTTCCACC	121-131	56.6
MiSHRS-1 ^{*a}	F: TAACAGCTTTGCTTGCCTCC R: TCCGCCGATAAACATCAGAC	191-207	56.6
MIAC-5 ^b	F: AATTATCCTATCCCTCGTATC R: AGAAACATGATGTGAACC	139	57.8
MIAC-4 ^b	F: CGTCATCCTTTACAGCGAACT R: CATCTTTGATCATCCGAAAC	101	57.8
LMMA1 ^c	F:ATGGAGACTAGAATGTACAGAG R:ATTAAATCTCGTCCACAAGT	202	51
LMMA11 ^{b c}	F:ATTATTTACCCTACAGAGTGC R:GTATTATCGGTAATGTCTTCAT	244	51
LMMA9 ^c	F:TTGCAACTGATAACAAATATAG R:TTCACATGACAGATATACACTT	185	51
LMMA15 ^c	F:AACTACTGTGGCTGACATAT R:CTGATTAACATAATGACCATCT	215	51
mMiCIR022 ^d	F:TGTCTACCATCAAGTTCG R:GCTGTTGTTGCTTTACTG	168	51
mMiCIR032 ^d	F:TCATTGCTGTCCCTTTTC R:ATCGCTCAAACAATCC	189	51
mMiCIR030 ^d	F:GCTCTTTCCCTTGACCTT R:TCAAATCGTGTCAATTC	193	51
mMiCIR004 ^d	F:CTTGAAAGAGATTGAGATTG R:AGAAGGCAGAAGGTTTAG	210	51
mMiCIR010 ^d	F:TAGGGATATAGCTGGAGG R:ACGCAGTAGAACCTGTG	284	51
mMiCIR036 ^d	F:ACCACGAAAAGACAACCTC R:TCATCTTTGTAAATAGGTTAAT	264	51
mMiCIR001 ^d	F:TGAGTTGTTGTCTGCT R:GGTGCTTGTCTCTCGT	191	51
mMiCIR003 ^d	F:GATGAAACCAAAGAAGTCA R:CCAATAAGAACTCCAACC	319	51

^aSchnell *et al.* (2005); ^bHonsho *et al.* (2005); ^cViruel *et al.* (2005) y ^dDuval *et al.* (2005).

Complementariamente al **ISG** se incluyó el índice de paternidad (**IP**), para el cual se calcularon previamente las frecuencias de los alelos con el paquete estadístico NTSYS versión 2.2 (Rohlf, 2000). La fórmula utilizada para dicho índice fue:

$$IP=X/Y$$

siendo X la probabilidad de que el progenitor femenino supuesto sea el progenitor e Y la probabilidad de que otro individuo de la población sea el progenitor. Igualmente se calculó el índice de parentesco combinado (IP_N) con la fórmula:

$$IP_N = \prod_{i=1}^N IP_i$$

donde $i = 1, \dots, N$ índice de parentesco de los sistema genéticos individuales (Gjertson *et al.*, 2007). En base a lo anterior se calculó la probabilidad de parentesco W con la fórmula:

$$W = \frac{IP(\pi_1/\pi_0)}{[1+IP(\pi_1/\pi_0)]}$$

donde: (π_1/π_0) representa la probabilidad de que el progenitor femenino sea el progenitor de las plantas hijas (Gjertson *et al.*, 2007).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Porcentaje de semillas poliembrónicas

El porcentaje de semillas poliembrónicas fue mayor en el cultivar Ataulfo (> 91 %) y varió entre años y lugares, sólo en el estado de Nayarit fue constante. Mientras que el cv Manila presentó menor porcentaje de poliembrionía (73.95 %), al igual que Ataulfo, esta fue variable entre años y localidades, observándose mayor número de semillas monoembrónicas en Guerrero durante el segundo año de evaluación (Cuadro 11). Los resultados obtenidos, son inferiores a los encontrados por Martínez-Ochoa *et al.* (2012) en Manila y Ataulfo (97 y 95% respectivamente) de la localidad de Ixcuintla, Nayarit. Con esto se corrobora que la procedencia y el año de cosecha afecta el número de embriones. Dicho resultado ha sido observado por otros autores en cítricos (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004) donde mencionan que las condiciones ambientales por ejemplo temperatura y humedad afecta dichas variables (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005).

Cuando el porcentaje de la poliembriónía es mayor a 80 %, la probabilidad de encontrar plantas de origen nucelar en cítricos es mayor (Soares Filho *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2010), quizá esto tenga que ver con lo que reporta Martínez-Ochoa *et al.* (2012) quienes determinaron que los embriones de origen cigótico son los más pequeños ubicados en el funículo, debido a que existe poca probabilidad de que estos germinen por su tamaño sólo desarrollan los más grandes, de origen nucelar. Contrario a esto, Cordeiro *et al* (2006) mencionan que plántulas vigorosas en mango cv Roshinia podrían ser cigóticas, al encontrar un patrón de bandas diferente al del progenitor femenino mediante la técnica de RAPD, y dicho vigor tendría su explicación en el efecto heterocigótico de la crucea.

De esta manera si las semillas monoembriónicas pueden tener embriones de origen sexual implica que en el cv. Manila quién presentó 20 % de semillas monoembriónicas tendríamos alto porcentaje de plantas con variación genética.

Cuadro 11. Porcentaje de semillas poliembriónicas en mango cvs. Manila y Ataulfo procedentes de Chiapas, Guerrero y Nayarit durante 2013 y 2014.

Lugar de Procedencia	% de Poliembriónía			
	Ataulfo		Manila	
	2013	2014	2013	2014
Chiapas	-	95.00	-	-
Guerrero	91.67	96.67	83.33	73.95
Nayarit	98.33	98.33	83.90	99.16

4.3.2. Alelos y marcadores polimórficos

El número de alelos encontrados con 16 indicadores varió de dos a cuatro y el tamaño de 125 a 300 pb, cabe mencionar que la temperatura de alineamiento de todos fue diferente a la reportada en la literatura (Cuadro 12). Lo anterior, permite sugerir que se deben estandarizar los protocolos ya que a pesar de utilizar los mismos reactivos la marca puede ser diferente al igual que la termociclador.

El tamaño de los alelos encontrados fue consistente con lo reportado en la literatura al utilizar estos SSRs en distintos cultivares de mango tanto monoembrionicos como poliembrionicos de distinta procedencia (Florida, Tailandia, Australia, y Taiwán) (Duval *et al.*, 2005; Honscho *et al.*, 2005; Schhell *et al.*, 2005; Viruel *et al.*, 2005). Sin embargo, el número de alelos fue diferente, esto se puede explicar a que solamente se evaluaron dos cultivares, mientras en otras investigaciones existe mayor variabilidad de material genético.

Tanto el cv. Manila como Ataulfo mostraron cercanía genética al encontrar la mayoría de los alelos en ambos cultivares. Esto es consistente con lo que reportan Martínez-Ochoa *et al.* (2012) al agrupar dichos materiales de acuerdo a la distancia genética y el agrupamiento de ligamiento promedio UPGMA, en dos grupos principales en el dendrograma donde uno abarca las plántulas de Manila y otro las de Ataulfo, lo cual dejó de manifiesto sus diferencias como cultivares, pero que al mismo tiempo se pudo ver están estrechamente relacionados, al igual que reportan Gálvez-López *et al.* (2010).

Cuadro 12. Número de alelos detectados a partir de 16 iniciadores SSRs en mango cv. Manila y Ataulfo

Iniciador (SSR)	No. de alelos encontrados	Tamaño de alelo (pb)	T_a (°C)
MiSHRS-4+ ^a	2	125-130	56.6
MiSHRS-1* ^a	4	185-210	56.6
MIAC-5 ^b	3	135-145	57.8
MIAC-4 ^b	3	100-110	57.8
LMMA1 ^c	4	195-210	51
LMMA11 ^{b,c}	3	230-250	51
LMMA9 ^c	4	190-205	51
LMMA15 ^c	2	220-230	51
mMiCIR022 ^d	2	150-160	51
mMiCIR032 ^d	2	200-210	51
mMiCIR030 ^d	4	180-210	51
mMiCIR004 ^d	2	205-210	51
mMiCIR010 ^d	2	250-270	51
mMiCIR036 ^d	2	240-250	51
mMiCIR001 ^d	2	170-180	51
mMiCIR003 ^d	3	280-300	51

T_a: Temperatura de alineamiento

4.3.3. Contenido de información de polimorfismo (PIC)

De los 16 iniciadores utilizados sólo siete (MIAC-5, MIAC-4, LMMA1, LMMA9, mMiCIR003, MiSHRS-1+, mMiCIR030) tuvieron un Contenido de Información de Polimorfismo (PIC) mayor a 0.51 (Anexo 1 y 2). Esto fue confirmado para 2013 y 2014 ya que ambos mostraron valores superiores.

En cada cultivar se identificó el iniciador de mayor PIC; en el caso de Ataulfo los SSRs muestran alta información polimórfica son MIAC-5, MIAC-4, y mMiCIR003, mientras que en Manila fue:, MiSHRS-1+, para ambos cultivares los iniciadores

LMMA1, LMMA9 y mMiCIR030. De acuerdo a lo anterior, en futuras investigaciones se podrán utilizar sólo los SSRs que mostraron tener PIC superiores, para detectar diferencias tanto en mango Manila como Ataulfo y su descendencia.

El iniciador MIAC-5 también ha sido eficiente para identificar cultivares de Tailandia, Australia, EE.UU. y Taiwán (Honscho *et al.* 2005). Así mismo, Schnell *et al.* (2005) reportaron un PIC de 0.598 para MiSHRS-1+ y la eficiencia de este en la diferenciación de cultivares de Florida. Mientras que Viruel *et al.* (2005) mencionan que con tres SSRs donde se incluye LMMA1 pudieron agrupar cultivares de diferente origen geográfico y tipo de semilla (monoembriónicos y poliembriónicos). Con esto se confirma la capacidad de dichos SSRs en la identificación, diferenciación de genotipos y su progenie. Por lo cual pueden ser utilizados en estudios posteriores.

Por otra parte, ningún iniciador sólo fue capaz de detectar diferencias de la planta hija con respecto a la madre. Las plantas que mostraron diferencias fueron detectadas por diversos grupo de iniciadores. En los materiales de Ataulfo, procedentes de Guerrero se observaron variantes en cuatro SSRs (MIAC-5, MIAC-4, LMMA1, LMMA9) al igual que en Manila de Nayarit (LMMA1, LMMA9, MiSHRS-1+, mMiCIR030). Esto es similar a lo reportado por Bastianel *et al.* (1998) y Andrade-Rodríguez *et al.* (2004) en *Citrus* con marcadores RAPDs, lo mismo mencionan Martínez-Ochoa *et al.* (2012) en mango donde ningún cebador único fue capaz de identificar todas las plantas cigóticas, tanto en embriones de Manila como de Ataulfo, sólo un grupo de ocho cebadores aportaron dicha información. Lo anterior se puede asociar a que al utilizar un número amplio de primers (iniciadores) ayuda en la diferenciación de individuos según su origen (sexual o clonal) ya que es posible estar explorando diferentes regiones del genoma.

Hasta el momento no se tiene definido cuantos iniciadores deben ser polimórficos para determinar si un individuo es diferente a la planta madre, sin embargo, Cordeiro *et al.* (2006) mencionaron que con tres cebadores que muestren diferente patrón de

bandeo es suficiente para determinar si un individuo es diferente a la planta madre. Por otra parte Viruel *et al.* (2005) mencionan que en mango con tres microsatélites fueron capaces de hacer la discriminación e identificación inequívoca de materiales de distinto origen geográfico así como tipo de semilla.

En los resultados obtenidos, el número de iniciadores que detectaron diferencias en las plantas hijas fue de uno a tres. Los genotipos que mostraron progenie diferente con tres SSRs fueron A2G2, A1G1 y M1G2, sólo fueron tres plantas como máximo de 10 de la progenie. Por otra parte, en los dos años de evaluación las plantas que mostraron ser diferentes con al menos dos iniciadores evaluados no fueron consistentes, sólo para el genotipo A1G1.

Lo anterior puede estar relacionado a que al ser plantas provenientes de semilla, no en todos los casos son nucelares y confirma el efecto de que las condiciones ambientales afecta el porcentaje de poliembrionía tal como fue observado en este trabajo y por otros autores (Andrade *et al.*, 2004; Bastianel *et al.*, 1998). También en los materiales colectados en 2013 se detectaron polimorfismos con hasta tres iniciadores mientras que en 2014 el máximo fue con dos (Cuadro 13). Similar a lo reportado por Cordeiro *et al.* (2006) en mango al encontrar el 50 % de polimorfismo durante el primer año de evaluación y 70 % en el segundo usando 5 cebadores RAPDS, lo cual puede deberse a variaciones por la sustitución de nucleótidos, lo cual da origen a mutaciones génicas, que específicamente son inserciones o deleciones de uno o más nucleótidos (Cardone *et al.*, 2010).

Cabe mencionar que así como se identificaron materiales diferentes con al menos un iniciador también se identificaron genotipos, principalmente del cv. Ataulfo, (A3G1, M1N1, M1N2, A1Ch1, A3Ch1, A1Ch2, A1N2, A2N2 y A3N2) que mostraron uniformidad en toda su progenie al mostrar patrones de bandeo iguales a la planta madre con los 16 iniciadores.

El porcentaje de plantas que demostraron polimorfismos con respecto a la planta madre varió durante el 2013 y 2014, sin embargo; en ambos fue consistente encontrar diferencias en la mayoría de los genotipos con un iniciador. Se resalta el caso de A1G2 y A2G2 con alto porcentaje (50 %) durante 2013 así como M3G1, M2G2 y M2N2 con 80 %, 50 % y 50 % respectivamente durante el 2014, cabe señalar que un iniciador no es suficiente para decir que son diferentes (Bastianel *et al.*, 1998; Andrade *et al.*, 2004). En cambio 30 % de las plantas del genotipo A2G2 mostraron diferencias con 3 iniciadores durante el año 1 y ninguno durante el año 2, sólo en A1G2, el 40 % de plantas fueron diferentes con dos iniciadores (Cuadro 14).

Cuadro 13. Genotipos de mango cv. Manila y Ataulfo detectados con diferencias a la planta madre e iniciadores SSRs

Clave	Plántulas diferentes	2013		Clave	Plántulas diferentes	2014	
		Iniciadores que muestran diferencias	Iniciador tamaño de alelo (pb)			Iniciadores que muestran diferencias	Iniciador tamaño de alelo (pb)
A1G1	1	3	MiSHRS-4+ (125-130) MiSHRS-1+ (185-210) LMMA9 (190-205)	A3CH2	2	2	LMMA9 8190-205)
A2G1	1	2	MIAC-5 (135-145) LMMA9 (190-205)	A1G1	1	2	LMMA9 (190-205); mMiCIR032 (200-210) LMMA1 (195-210)
A2G2	4	2	MiSHRS-1+(185-210) MIAC-4 (100-110)	A1G2	4	2	LMMA15(220-230) MiSHRS-4+ (125-130) mMiCIR003 (280-300)
		3	MiSHRS-1+(185-210) MIAC-5(135-145) LMMA1 (195-210)			2	LMMA11b (230-250) mMiCIR030 (180-210)
		3	MIAC-5 (135-145) MIAC-4 (100-110) LMMA1 (195-210)			2	MiSHRS-4+ (125-130) mMiCIR003 (280-300)
		3	MIAC-5 (135-145) MIAC-4 (100-110) LMMA1 (195-210)	M3G1	3	2	LMMA11b (230-250) mMiCIR030 (180-210) MIAC-4 (100-105) mMiCIR003 (280-300)
M1G2	1	3	MiSHRS-4+ (125-130) MiSHRS-1+(185-210) MIAC-4(100-110)			2	MIAC-5 (135-145) mMiCIR003 (280-300)
M2G2	1	2	LMMA9 (190-205) mMiCIR036 (240-250)	M1G2	2	2	MIAC-4 (100-105) mMiCIR003 (280-300) mMiCIR010 (250-270)
M2N2	3	2	LMMA11b (230-250) LMMA15 (220-230)			2	mMiCIR036 (240-250) mMiCIR010 (250-270)
		2	MiSHRS-1+(185-210) LMMA11b (230-250)				mMiCIR036 (240-250)
		2	LMMA1 (195-210) LMMA15(220-230)				

Cuadro 14. Porcentaje de plántulas de mango cvs. Manila y Ataulfo, con polimorfismo con 1, 2 y 3 marcadores SSRs procedentes de Chiapas Guerrero y Nayarit durante 2013 y 2014

Clave	Plantas polimórficas (%)					
	2013			2014		
	No. de SSRs			No. de SSRs		
	1	2	3	1	2	3
M1G1	10	0	0	20	0	0
M2G1	10	0	0	20	0	0
M3G1	50	0	0	80	20	0
M1G2	40	0	10	40	20	0
M2G2	20	10	0	60	0	0
M3G2	20	0	0	0	0	0
M1N1	0	0	0	20	0	0
M2N1	20	0	0	20	0	0
M3N1	50	0	0	20	0	0
M1N2	0	0	0	0	0	0
M2N2	40	30	0	60	0	0
M3N2	30	0	0	20	0	0
M1G1	10	0	0	20	0	0
M2G1	10	0	0	20	0	0
M3G1	50	0	0	80	20	0
M1G2	40	0	10	40	20	0
A2N2	40	0	0	0	0	0
A3N2	40	0	0	0	0	0
M1G1	10	0	0	20	0	0
M2G1	10	0	0	20	0	0
M3G1	50	0	0	80	20	0
M1G2	40	0	10	40	20	0
M2G2	20	10	0	60	0	0
M3G2	20	0	0	0	0	0
M1N1	0	0	0	20	0	0
M2N1	20	0	0	20	0	0
M3N1	50	0	0	20	0	0
M1N2	0	0	0	0	0	0
M2N2	40	30	0	60	0	0
M3N2	30	0	0	20	0	0

4.3.4. Índice de similitud Genética (ISG)

Otro parámetro considerado para definir si las plantas obtenidas de los embriones más grandes eran clonales, fue el índice de similitud genética (ISG) de esta manera la decisión fue si los valores eran superiores a 95% las plantas se considerarían idénticas a la planta madre.

Durante la evaluación de 2013, sólo los genotipos M2N2 y A2G2 mostraron 6 y 8 plantas de 10 idénticas a la madre, fueron los materiales que presentaron mayor variación en comparación con el resto que tuvieron de 9 a 10 plantas consideradas idénticas de ambos cultivares y procedencias (Cuadro 15). En 2014, sólo A1G1 dos plantas fueron diferentes a la madre, en el resto de los individuos evaluados, toda la progenie fue clonal (Cuadro 16).

Se observó que entre años de colecta, si hubo diferencias en 2013 en ocho genotipos (A1G1, A2G1, A1N1, A2N2, M3G1, M1G2, M2G2, M3N2) al menos una planta fue diferente, en 2014 fue la excepción A1G1 con dos plantas, los demás genotipos mostraron tener toda la progenie idéntica a la planta madre (Cuadro 16).

De manera general se observó que la mayoría de los genotipos tanto del cv. Manila como Ataulfo mostraron alto porcentaje de plantas nucelares de acuerdo al ISG. Diferente a lo reportado por Martínez-Ochoa (2016) al evaluar también sólo el embrión de mayor tamaño en seis genotipos de cítricos; menciona que de acuerdo al ISG Tangelo minneola tiene 55% de plantas nucelares, mientras que Naranja Parson Brow el 100% de la progenie fue idéntica a la planta madre. Esto evidencia las diferencias entre variedades. Con lo cual se corrobora la importancia de realizar estudios para cada especie y variedades.

Por otra parte Rao *et al.* (2008) con la finalidad de detectar plantas nucelares y cigóticas en cruces de mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) y pomelo (*C. máxima* Merr) usaron la técnica de RAPD y EST-SSR con ambas técnicas determinaron que entre el 73 % y 77.8 % de la progenie era nucelar respaldado con el ISG (valores

superiores a 0.97). Lo anterior, permite señalar que no se puede generalizar el modelo establecido para cítricos que señala que el embrión de mayor tamaño es nucelar, dado que esto depende de la especie y genotipo que se estudie.

4.3.5. Probabilidad de parentesco (W)

Un tercer parámetro que se evaluó para identificar si las plantas hijas eran idénticas a la planta madre fue la probabilidad de parentesco (W) (Gjertson *et al.*, 2007). Al igual que en el ISG, valores superiores o iguales a 0.95 fueron consideradas como plantas nucleares (Cuadro 17). Con este método se compara la frecuencia alélica del individuo con la frecuencia de dicho alelo en toda la población.

De acuerdo a esta prueba se obtuvo que la progenie de todos los genotipos son de origen nucelar ya que sus valores oscilaron de 0.96 a 1 (Cuadro 17 y 18). Solamente sobresale el caso de A1N2 que presentó los valores más bajos de W (0.96 a 0.98) en toda su progenie durante 2013, no por eso presentó plantas diferentes de acuerdo a este esquema de análisis.

Al comparar los valores de W que presentan los genotipos (A1G1, A2G1, A2G2, A1N1, A2N2, M3G1, M1G2, M2G2, M2N2 y M3N2) que tuvieron de 1 a 4 plantas diferente de acuerdo al ISG, se observa que son consistentes con valores de 0.96 y 0.98, con lo se puede decir que una prueba más rigurosa sería la probabilidad de parentesco (W). Sin embargo, si existe complementariedad y se recomienda usar ambas.

Por otra parte, al igual que con el ISG en el año 2014 pareciera que hubo mayor uniformidad en la probabilidad de parentesco ya que los valores obtenidos mostraron ser superiores a 0.98 en todos los genotipos.

Otro aspecto a considerar en este índice (W) es que sólo se tuvo la información de la progenitora femenina, lo cual limita los resultados obtenidos, para tener mayor exactitud sería conveniente tener la información del árbol padre.

Cuadro 15 Índice de Similitud Genética (ISG) en mango cv. Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit del año 2013 de evaluación con 16 iniciadores SSRs.

Individuo	Clave												
	A1G1	A2G1	A3G1	A1G2	A2G2	A3G2	A1N1	A2N1	A3N1	A1N2	A2 N2	A3N2	
1	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	0.91	0.98	
2	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	
4	0.93	1.00	1.00	1.00	0.91	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
5	1.00	1.00	1.00	0.98	0.97	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
6	1.00	1.00	1.00	0.97	0.98	1.00	0.94	1.00	1.00	0.98	1.00	0.98	
7	1.00	1.00	1.00	1.00	0.90	1.00	1.00	0.98	1.00	0.97	1.00	0.98	
8	0.98	0.97	1.00	0.97	1.00	0.98	0.97	1.00	1.00	1.00	0.97	1.00	
9	0.97	0.93	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	0.98	1.00	0.98	0.98	
10	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	0.97	0.98	
Porcentaje de plantas idénticas a la planta madre (ISG ≥ 0.95)													
%	90	90	100	100	80	100	90	100	100	100	90	100	
Individuo	Clave												
	M1G1	M2G1	M3G1	M1G2	M2G2	M3G2	M1N1	M2N1	M3N1	M1N2	M2N2	M3N2	
1	1.00	1.00	0.98	0.98	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.94	1.00	
2	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	0.97	1.00	
3	0.98	0.97	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	0.93	0.97	
4	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	0.98	1.00	
5	1.00	0.97	1.00	1.00	0.98	0.98	1.00	1.00	0.98	1.00	0.95	0.98	
6	1.00	1.00	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	
7	0.97	1.00	0.98	0.93	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	0.98	1.00	
8	0.97	1.00	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	0.92	1.00	
9	1.00	1.00	0.94	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.94	1.00	
10	1.00	1.00	1.00	1.00	0.94	1.00	1.00	0.97	0.98	1.00	1.00	0.94	
Porcentaje de plantas idénticas a la planta madre (ISG ≥ 0.95)													
%	100	100	90	90	90	100	100	100	100	100	60	90	

Cuadro 16. Índice de Similaridad Genética (ISG) en mango cv. Manila y Ataulfo de Chiapas, Guerrero y Nayarit del 2014 de evaluación con 16 iniciadores SSRs.

Individuo	Clave																	
	A1 Ch1	A2 Ch1	A3 Ch1	A1 Ch2	A2 Ch2	A3 Ch2	A1 G1	A2 G1	A3 G1	A1 G2	A2 G2	A3 G2	A1 N1	A2 N1	A3 N1	A1 N2	A2 N2	A3 N2
1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.94	1.00	1.00	0.98	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	0.95	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
3	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
4	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00
5	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.95	1.00	1.00	0.98	0.95	1.00	1.00	0.98	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00
6	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.94	1.00	1.00	0.98	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
7	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	0.95	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
9	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00
10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.95	1.00	1.00	0.98	0.95	1.00	1.00	0.98	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00
Porcentaje de plantas idénticas a la planta madre (ISG ≥ 0.95)																		
%	100	100	100	100	100	100	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Individuo	Genotipo																	
	M1 G1	M2 G1	M3 G1	M1 G2	M2 G2	M3 G2	M1 N1	M2 N1	M3 N1	M1 N2	M2 N2	M3N 2						
1	1.00	0.98	0.95	1.00	0.98	1.00	1.00	0.98	1.00	0.98	0.98	1.00						
2	0.98	1.00	0.98	0.98	0.98	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98						
3	1.00	1.00	0.98	0.95	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00						
4	1.00	1.00	0.95	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00						
5	1.00	1.00	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00						
6	1.00	0.98	0.95	1.00	0.98	1.00	1.00	0.98	1.00	0.98	0.98	1.00						
7	0.98	1.00	0.98	0.98	0.98	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	0.98	0.98						
8	1.00	1.00	0.98	0.95	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00						
9	1.00	1.00	0.95	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00						
10	1.00	1.00	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00						
Porcentaje de plantas idénticas a la planta madre (ISG ≥ 0.95)																		
%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100						

Cuadro 17. Probabilidad de parentesco (W) en mango cv. Manila y Ataulfo de Guerrero y Nayarit del año 2013 de evaluación con 16 iniciadores SSRs.

Genotipo												
Individuo	A1G1	A2G1	A3G1	A1G2	A2G2	A3G2	A1N1	A2N1	A3N1	A1N2	A2N2	A3N2
1	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.98	0.97	0.98
2	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99
3	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99
4	0.98	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99
5	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99
6	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.96	0.99	0.98
7	0.99	0.99	0.99	0.99	0.96	0.99	0.99	0.98	0.99	0.96	0.99	0.98
8	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99
9	0.99	0.97	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.98
10	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.98
Porcentaje de plantas idénticas a la planta madre (W ≥ 0.95)												
%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Genotipo												
Individuo	M1G1	M2G1	M3G1	M1G2	M2G2	M3G2	M1N1	M2N1	M3N1	M1N2	M2N2	M3N2
1	0.99	0.99	0.99	0.98	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99
2	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99
3	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.98
4	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99
5	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
6	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	1.00	0.99
7	0.98	0.99	0.99	0.97	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99
8	0.98	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.98	0.99
9	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99
10	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	1.00	0.98
Porcentaje de plantas idénticas a la planta madre (W ≥ 0.95)												
%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Cuadro 18. Probabilidad de parentesco (W) en mango cv. Manila y Ataulfo de Chiapas Guerrero y Nayarit del año 2014 de evaluación con 16 iniciadores SSRs.

Individuo	Genotipo																	
	A1 Ch 1	A2 Ch1	A3 Ch1	A1 Ch2	A2 Ch2	A3 Ch2	A1G1	A2G1	A3G1	A1G2	A2G2	A3G2	A1N1	A2N1	A3N1	A1N2	N2A2	A3N2
1	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
2	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
3	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
4	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99
5	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99
6	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
7	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
8	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
9	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99
10	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99
Porcentaje de plantas idénticas a la planta madre (W ≥ 0.95)																		
%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Individuo	Genotipo																	
	M1G1	M2G1	M3G1	M1G2	M2G2	M3G2	M1N1	M2N1	M3N1	M1N2	M2N2	M3N2						
1	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99						
2	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99						
3	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99						
4	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99						
5	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99						

6							0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
7							0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
8							0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
9							0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
10							0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
Porcentaje de plantas idénticas a la planta madre ($W \geq 0.95$)																			
%	10	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0																		

En general podemos decir que las plantas del cv. Ataulfo (A1G1 y A2G2) mostraron progenie diferente a la planta madre (3 de 10) de acuerdo a dos de los criterios establecidos: polimorfismos detectados con más de tres SSRs, e índice de similitud genética (ISG). Sin embargo con el índice de parentesco fueron iguales, por lo que no podemos concluir que todas las plantas obtenidas del embrión de mayor tamaño sean no son de origen nucelar.

Estos resultados tienen relevancia ya que difieren de lo reportado para mango, en el caso del cv. Rosinha donde el 90% de las plántulas evaluadas fueron de origen cigótico y el 10 % se consideraron ambiguas, lo cual sustentaron con 5 cebadores RAPDS, dicho estudio se repitió por dos años y en ambos encontraron alto polimorfismo (50 % y 70 %) con dichos iniciadores (Cordeiro *et al.*, 2006), es importante mencionar que en este caso germinaron todos los embriones de la semilla y sólo escogieron las plántulas más vigorosas para el análisis molecular, por lo cual encontrar alto nivel de polimorfismo en aquellas plantas hace suponer que embriones cigóticos podrían ser también vigorosos lo que le atribuyen al efecto de heterosis, resultado de la cruce de la planta madre con otro mango en este no identificado (por el tipo de polinización cruzada).

Por otra parte, lo obtenido en este estudio es consistente con lo mencionado por Martínez-Ochoa *et al.* (2012) quienes encontraron que en Manila y Ataulfo se producen con mayor frecuencia plantas nucleares debido a que los embriones más pequeños suelen ser cigóticos y es difícil su germinación en vivero o de manera natural. Mientras que los embriones grandes darán origen a plantas nucleares.

Otra característica a considerar para definir el origen de los embriones es la posición de estos en la semilla, Cordeiro *et al.* (2006) refieren al embrión cigótico comúnmente situado en la parte basal del lado del pedúnculo, está posición favorece la fecundación en el saco embrionario, sin embargo; también se puede encontrar en la posición que definen como segunda, tercera y cuarta (partiendo que la uno es la más cercana a la base, de ahí se enumera según su alejamiento a la

zona del pedúnculo). Pero como se puede ver no es un parámetro certero que permita la clara identificación en etapas tempranas del desarrollo. Martínez-Ochoa *et al.* (2012) mencionan que los embriones situados cerca del funículo son cigóticos, y comúnmente son los más pequeños (tienen pocas reservas) de ahí que sea difícil su germinación. En el caso de cítricos se consideraba que los embriones sexuales también estaban situados preferentemente del lado del micrópilo sin embargo, se observó que podían localizarse alejados de este (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004).

El modelo donde se menciona que el embrión de mayor tamaño es nucelar y dará origen a una planta clonal surgió a partir del género *Citrus*, sin embargo, justamente en este género no se cumple, ya que es donde se ha observado existe mayor fluctuación según la variedad o la cruce en estudio. Como lo reporta Andrade-Rodríguez *et al.* (2004) en *Citrus volkameriana* con el uso de marcadores RAPDS, donde el 44% de las plántulas obtenidas de semillas poliembriónicas fueron de origen cigótico, provenientes de embriones grandes.

Bastianel *et al.* (1998) por ejemplo mencionan que en la cruce de mandarinas Montenegro (*Citrus deliciosa* Tenore) y King (*C. nobilis* Loureiro), donde King funcionó como donador de polen, obtuvieron 54 híbridos a partir de 202 plantas es decir apenas 26.7 %, en este caso hubo mayor frecuencia de plantas nucleares, las cuales fueron detectadas con marcadores RAPDS. Los autores mencionan que esto puede atribuirse tanto al polinizador como a la progenitora madre ya que en otros estudios donde se ha utilizado polen de *Poncirus trifoliata* en mandarina King y Willowleaf han obtenido frecuencia de cigotos de 78.7 % y 14.02 % respectivamente, de manera similar cuando cruzaron King con polen de tangerina Parson Special obtuvieron 85 % de cigóticos lo que evidencia claramente el papel de los progenitores. Sin embargo, esto también puede deberse a factores como: temperatura y humedad del ambiente, velocidad del aire (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005) tipo de polinizador, cantidad de polen (Solares-Filho *et al.*, 2003), así como a factores genéticos y nutricionales, e inclusive a la respuesta de los árboles, los años y los lugares de evaluación (Rao *et al.*, 2008).

Con esto se puede sintetizar la existencia de diferencias entre especies, variedades y cruza, por lo anterior es importante se evalué también la poliembrionía en otros cultivares de mango para no dar por hecho los prototipos establecidos.

4.4. CONCLUSIONES

1. Se detectaron marcadores SSRs específicos para evaluar poliembrionía en Ataulfo (MIAC-5, MIAC-4, mMiCIR003), Manila (MiSHRS-1+) y para ambos cultivares (LMMA1, LMMA9, y mMiCIR030).
2. El índice de similitud genética (ISG) y el esquema propuestos por Cordeiro *et al.* (2006) y Martínez-Ochoa *et al.* (2012), que señala que cuando más de tres marcadores discriminan una planta ésta es considera genéticamente diferente a la planta madre, determinaron que existen plantas diferentes a la progenitora femenina en los cvs. Manila y Ataulfo.
3. Manila tuvo mayor porcentaje de semillas monoembriónicas.
4. El porcentaje de semillas monoembriónicas puede modificar el porcentaje de plantas diferentes a la progenitora femenina.

4.5 LITERATURA CITADA

- Andrade-Rodríguez., M.; A. Villegas-Monter., G. Carrillo-Castañeda., and A. García-Velázquez. 2004. Polyembryony and identification of Volkamerian lemon zygotic and nucellar seedlings using RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39:551-559.
- Andrade-Rodríguez., M., A. Villegas-Monter., M. A. Gutiérrez-Espinosa., G. Carrillo-Castañeda. and A. García-Velázquez. 2005. Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in Citrus. *Agrociencia*. 39: 371-383.
- Aron, Y., Czosnek, H., Gazit, S. and Degani, C. 1998. Polyembryony in mango (*Mangifera indica* L.) is controlled by a single dominant gene. *Hortscience* 33(7):1241-1242.
- Azofeifa A., D. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas: aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17:221-242.
- Bastianel, M.; Schwarz, S.F., Coletta Filho, H.D., Lin, L.L., Machado, M., and Koller, O.C. 1998. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. *Genetics and Molecular Biology* 21:123-127.
- Batygina T. B. and G. Yu. Vinogradova. 2007. Phenomenon of Polyembryony. *Genetic Heterogeneity of Seeds. Russian Journal of Developmental Biology* 38(3):166-191.
- Cardone, S., S. Olmos y V. Enchenique. 2010. Métodos para generar variabilidad. Variación somaclonal. *In: Enchenique, V., Rubistein, C. y L. Mroginski (eds.) Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Consejo Argentino para la Información y el desarrollo de la Biotecnología. Argentina. 81-96 p.*
- CIMMYT. 2006. The applied biotechnology center manual of laboratory protocols. Third Edition. CIMMYT, D.F., México.
- Cordeiro, M. C .R., A. C. Q. Pinto, V. H .V.Ramos, F.G. Faleiro, L. M. and 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.

- Degani, C., R. EL-Batsri, and S Gazit. 1990. Enzyme polymorphism in mango. *Journal of American Society of Horticultural Science* 115 (5):844-847.
- Doyle, J.J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Duval, M. F., A J. Bunel, C. Sitbon, and M. Risterucci. 2005. Development of microsatellite markers for mango (*Mangifera indica*). *Mol. Ecol. Notes* 5:824-826.
- Gálvez-López D., M. Salvador-Figueroa., E.N. Becerra-Leo., M. González-Paz., S. Hernández-Delgado and N. Mayek-Pérez. 2010. Molecular diversity genetic relationships of mango germplasm from Chiapas, México. *Agrociencia* 44:907-915.
- Gjertson, D.W., C. H. Brenner, M. P. Baur, A. Carracedo, F. Guidet, J. A. Luque, R. Lessing, W. R. Mayr, V. L. Pascali, M. Prinz, P. M. Schneider, and N. Morling. 2007. ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing. *Forensic Science International. Genetics* 1 (3-4): 223-231.
- Hand M.L. and Koltunow A.M.G. 2014. The Genetic Control of Apomixis: Asexual Seed Formation. *Genetics* 197(2):441-450.
- Honsho, C., K. Nishiyama, W. Eiadthong and K. Yonemori. 2005. Isolation and characterization of new microsatellite markers in mango (*Mangifera indica* L.). *Mol. Ecol. Notes* 5:152-154.
- Khan, A.S., S. Ali, I.A.Khan. 2015. Morphological and molecular characterization and evaluation of mango germplasm: An overview. *Scientia Horticulturae* 194:353-366.
- Kishore, K., N. Monika, D. Rinchen, B. Lepcha, B. Pandey. 2012. Polyembryony and seedling emergence traits in apomictic citrus. *Scientia Horticulturae* 138:101-107.
- Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: Embryo Sacs and Embryos Formed without meiosis or fertilization in ovules. *The plant cell* 5:1425-1437.
- Martínez-Ochoa, E. del C. 2016. Poliembrionía en cítricos: identificación de las plantas obtenidas del embrión más grande con marcadores SSR. Tesis para

- obtener grado de Doctora en Ciencias. Colegio de Postgraduados Campus montecillo. Montecillo México. 61p.
- Martínez-Ochoa., E. del C., M. Andrade-Rodríguez., M. Rocandio Rodríguez and A. Villegas Monter. 2012. Identification of zygotic and nucellar seedlings in polyembryonic mango cultivars. *Pesq. Agropec. Bras.* 47(11): 1629-1636.
- Mannen, H., S. Tsuji, F. Mukai, N. Goto, and S. Ohtagaki. 1993. Genetic similarity using DNA fingerprinting in cattle to determine relationship coefficient. *Journal of Heredity* 84 (3): 166-169.
- Novelli, V.M., M. Cristofani, A. A. Souza, and M. A. Machado. 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Genetics and Molecular Biology* 29 (1): 90-96.
- Passos, O.S., Peixoto, L.S., Dos Santos, L.C., Caldas, R.C., Soares-Filho, W.D.S. 2006. Caracterização de híbridos de *Poncirus trifoliata* e de outros porta-enxertos de citros no Estado da Bahia. *Revista Brasileira de Fruticultura* 28 (3): 410-413.
- Powell, W., G.C. Machray, J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant sci.* 1(7):215-222.
- Quero-Carrillo., A.R., J.F. Enríquez-Quiroz., C.R. Morales-Nieto., L. Miranda-Jiménez. 2010. Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales Revisión. *Revista Mexicana de ciencias pecuarias* 1(1):25:42.
- 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.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.2 Excenter Software, New York, USA.
- Saghai-Maroofo., M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgesen and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 8014-8018.

- Santos, C.A.F., J.M.P. Lima Filho. and F.P. Lima Neto. 2010. Estratégias para o desenvolvimento de novas cultivares de mangueira para o Semiárido brasileiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32:493-997.
- Schnell, R. J., C. T. Olano, W. E. Quintanilla and A. W. Meerow. 2005. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci from mango (*Mangifera indica* L.) and cross-species amplification in closely related taxa. *Mol. Ecol. Notes* 5:625-627.
- Soares-Filho., W. Dos S., A.P. Da Cunha-Sobrinho., O. Sampaio-Passos and E. D. Barreto-Moitinho. 2003. 'Maravilha': Uma nova seleção de tangerina 'Sunki'. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25 (2): 268-271.
- Valadez, M.E. y Khal, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Teoría y Protocolos de Laboratorio. Mundi-Prensa México S.A. de C.V. 147p.
- Varshney, R.K, A. Graner and M.E. Sorrells. 2005 Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotech* 23:48–55.
- 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. Breeding* 15:383–393.
- Yildiz, E., M. Kaplankiran, T.H. Demirkaser, A. Uzun and C. Toplu. 2013. Identification of Zygotic and Nucellar Individuals Produced from Several Citrus Crosses Using SSRs Markers. *Not Bot. Horti. Agrobi.* 41(2):478-484.

CAPITULO V. DISCUSIÓN GENERAL

El método de curvatura máxima permitió definir el tamaño de muestra óptimo, a pesar de que en algunos casos los CV fueron muy diferentes tanto para los cultivares como para las localidades, lo cual puede deberse a la interacción genotipo ambiente que hace que el comportamiento del mismo cultivar pueda ser diferente en dos regiones productoras. Sin embargo, se pudo definir que el tamaño de muestra óptimo fue 6 frutos para realizar las evaluaciones de características relacionadas con la poliembrionía. Lo cual difirió con lo reportado tanto en cítricos como en mango donde se usaron hasta 100 semillas (Andrade-Rodríguez, *et al.*, 2005 ;Martínez-Ochoa *et al.*, 2012)

Respecto a las características que pueden correlacionarse con poliembrionía, el peso de semilla mostró ser determinante en el número y tamaño de los embriones, lo cual coincide con lo reportado por Martínez-Ochoa *et al.*, (2012), por lo cual puede ser un indicador práctico en campo para la selección de semillas.

Un aspecto que se evalúa constantemente es el porcentaje de poliembrionía, el cual se ha relacionado con la cantidad de plantas clonales obtenidas. Varios autores mencionan que cuando la poliembrionía es mayor a 80% (Soares-Filho *et al.*, 2000, 2003; Santos *et al.*, 2010) la cantidad de plantas nucelares es alta por lo cual la propagación es vegetativa por semilla, en este caso se tuvieron porcentajes superiores a 80% tanto para Manila como para Ataulfo y la mayoría de las plantas obtenidas del embrión de mayor tamaño mostro alto grado de similitud a la planta madre, con lo cual se cumple lo establecido.

Por otra parte se corroboró que el grado de dureza con que están unidos los embriones difiere entre cultivares de mango, aun cuando tengan similitud genética, lo cual difiere con lo observado en cítricos (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004, 2005), esto indica que posiblemente también el proceso de formación sea diferente.

A pesar de que el uso de marcadores moleculares son útiles por la información que aportan, es necesario utilizar más de un índice para determinar si existen diferencias obtenidas en embriones de semillas poliembriónicas tal como se observó en este estudio para determinar si las plantas obtenidas del embrión de mayor tamaño eran de origen asexual.

El índice de Similitud Genética (ISG) y el esquema propuestos por Cordeiro *et al.* (2006) y Martínez-Ochoa *et al.* (2012), quienes señalan que cuando más de tres marcadores discriminan una planta ésta es considerada genéticamente diferente a la planta madre mostraron que existen plantas diferentes a la progenitora femenina mientras que con el índice de parentesco (W) no se encontraron diferencias, por lo que es importante utilizar más de un parámetro para determinar tener mayor certeza con los análisis realizados cabe aclarar que en la mayoría de los estudios solo utilizan un método (Cordeiro *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2008) lo que podría llevar a conclusiones erróneas.

No obstante quedaron bien definidos aquellos SSRs útiles en la detección de polimorfismos para este estudio específicos para mango Manila como para Ataulfo, y para ambos.

Queda claro que a pesar de hablar de una misma especie pero diferente cultivar los resultados tanto a nivel de morfología como porcentajes de poliembriónia y número de embriones difiere por lo cual es necesario realizar estudios específicos a nivel género especie y cultivar, al igual que evaluaciones de distintas zonas de producción ya que el ambiente tiene una fuerte interacción con los materiales y los resultados varían.

Finalmente algo importante que debemos destacar es que en el estudio realizado por (Cordeiro *et al.*, 2006) germinaron semilla completa y posteriormente seleccionaron las plantas de mayor tamaño sin embargo, no se puede tener la certeza de que provenga del embrión de mayor tamaño porque no se separó

previamente tal como se hizo en este estudio y al no tomar en cuenta el porcentaje de semillas monoembriónicas el número de plantas diferentes a la progenitora femenina puede ser mayor.

ANEXOS

Anexo 1: Contenido de información polimórfica (PIC) de 16 marcadores SSRs del año 2013.

Iniciador	Genotipo											
	A1G1	A2G1	A3G1	A1G2	A2G2	A3G2	A1N1	A2N1	A3N1	A1N2	A2N2	A3N2
MiSHRS-4+	0.087	0	0	0.087	0	0	0	0	0	0	0	0
MiSHRS-1+	0.5	0.5	0.5	0.483	0.496	0.496	0.5	0.5	0.483	0.5	0.5	0.5
MIAC-5	0.5	0.533	0.5	0.5	0.515	0.541	0.5	0.5	0.5	0.541	0.5	0.5
MIAC-4	0.5	0.496	0.5	0.5	0.522	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
LMMA1	0.579	0	0	0	0.541	0	0.5	0	0	0	0.297	0
LMMA9	0.496	0.541	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.541	0.5
LMMA15	0.087	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0
mMiCIR022	0.5	0.5	0.5	0.5	0.044	0.165	0.5	0.5	0.5	0.095	0.5	0.5
mMiCIR032	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
mMiCIR030	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.351
mMiCIR004	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.496	0.165	0	0.5	0.5	0.5
mMiCIR010	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.087	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0
mMiCIR036	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0.5	0.5	0.5
mMiCIR001	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
mMiCIR003	0.5	0	0.5	0.574	0.5	0.5	0.574	0	0.5	0.5	0.5	0.5

Iniciador	Genotipo											
	M1G1	M2G1	M3G1	M1G2	M2G2	M3G2	M1N1	M2N1	M3N1	M1N2	M2N2	M3N2
MiSHRS-4+	0	0	0	0.236	0	0	0	0	0	0	0	0
MiSHRS-1+	0.165	0.087	0.5	0.087	0	0.18	0.5	0.541	0.5	0.5	0.541	0.5
MIAC-5	0.5	0.5	0.5	0.496	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5
MIAC-4	0.496	0	0.483	0.496	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
LMMA1	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0	0.574	0.5
LMMA9	0.5	0.5	0.5	0.496	0.574	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.599	0.5
LMMA15	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0.5	0.5	0.496	0	0.351	0.5
mMiCIR022	0.5	0.5	0.165	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.087	0	0.5	0
mMiCIR032	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.5
mMiCIR030	0.5	0.5	0.541	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.574

mMiCIR004	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
mMiCIR010	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
mMiCIR036	0.5	0.5	0.5	0	0.483	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5
mMiCIR001	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0
mMiCIR003	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0

Anexo 2. Contenido de información polimórfica (PIC) de 16 marcadores SSRs del año 2014

Iniciador	Genotipo																	
	A1 Ch1	A2 Ch1	A3 Ch1	A1 Ch2	A2 Ch2	A3 Ch2	A1 G1	A2 G1	A3 G1	A1 G2	A2 G2	A3 G2	A1 N1	A2 N1	A3 N1	A1 N2	N2 A2	A3 N2
MiSHRS-4+	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0	0	0	0.16	0	0	0	0	0	0	1	0
MiSHRS-1+	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.48	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
MIAC-5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.57	0.5	0.5	0.5	0.57	0.48	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
MIAC-4	0.5	0.48	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.57	0.5	0.5	0.5	0.5	0.48	0.5	0.5	0.5	0.5
LMMA1	0	0	0	0	0	0	0.63	0	0	0	0.5	0	0.5	0	0	0	0	0
LMMA11b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.16	0	0	0	0	0.29	0.5	0	0
LMMA9	0.5	0.5		0.5	0.5	0.48	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
LMMA15	0	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0.16	0	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
mMiCIR022	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5
mMiCIR032	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.48	0.5	0.5	0.5	0.48	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5		0.5	0.5
mMiCIR030	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	1	0.75	0.75	0.75	0.83	0.83	0.75	0.65	0.75	0.75	0.75	0.75	0
mMiCIR004	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0.5
mMiCIR010	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.48	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0
mMiCIR036	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0.5	0.5	0.5
mMiCIR001	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
mMiCIR003	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.57	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0.5

Iniciador	Genotipo											
	M1 G1	M2 G1	M3 G1	M1 G2	M2 G2	M3 G2	N1 M1	N1 M2	M3 N1	M1 N2	N2 M2	M3 N2
MiSHRS-4+	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
MiSHRS-1+	0.16	0	0.5	0	0	0	0.5	0.48	0.5	0.48	0.57	0
MIAC-5	0.5	0.5	0.48	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5		0.5	0	0.48
MIAC-4	0.5	0	0.48	0.48	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
LMMA1	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0	0.57	0.5
LMMA11b	0	0	0	0	0.5	0	0.48	0	0	0	0.5	0
LMMA9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.57	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.57	0.5
LMMA15	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
mMiCIR022	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0	0	0.5	0
mMiCIR032	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.5
mMiCIR030	0.75	0.75	0.83	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
mMiCIR004	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

mMiCIR010	0.5	0.5	0.43	0.43	0.43	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
mMiCIR036	0.5	0.5	0.5	0.16	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0	0.5
mMiCIR001	0.5	0.48	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0
mMiCIR003	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0
