



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FRUTICULTURA

POLIEMBRIONÍA EN MANDARINO ORTANIQUE (*Citrus reticulata* x *C. sinensis*) Y EL ORIGEN GENÉTICO DE LOS EMBRIONES

OSCAR ESAU QUEZADA FLORES

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2022



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

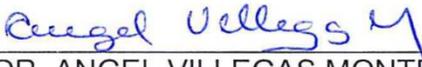
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis, titulada: **Poliembrionía en Mandarino Ortanique (*Citrus reticulata* × *C. sinensis*) y el Origen Genético de los Embriones**, realizada por el estudiante: **Oscar Esau Quezada Flores**, con la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

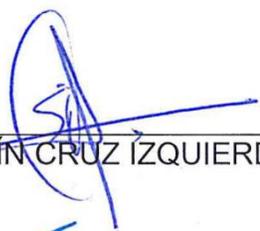
MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
Elija un postgrado.

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


DR. ANGEL VILLEGAS MONTER

ASESOR


DR. SERAFÍN CRUZ ÍZQUIERDO

ASESOR


DR. GUILLERMO CALDERON ZAVALA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, octubre de 2022

**POLIEMBRIONÍA EN MANDARINO ORTANIQUE (*Citrus reticulata* × *C. sinensis*) Y
EL ORIGEN GENÉTICO DE LOS EMBRIONES**

**Oscar Esau Quezada Flores, M.C.
Colegio de postgraduados, 2022**

RESUMEN

Se estudió la posición de los embriones en semillas (120 semillas) de Mandarino Ortanique (*Citrus reticulata* × *C. sinensis* L.) y el origen genético de estos. La evaluación se realizó bajo microscopio digital, donde se encontraron seis morfotipos (Dos Grupos, Entrelazados, Embriones Base, Micropildistante, Sencillo y Base-Entrelazados). Los embriones se sembraron *in vitro*, separando cada uno en un tubo de ensayo y manteniendo la trazabilidad. Las plántulas obtenidas se injertaron en plantas de limón volkameriano para desarrollo. Después, se analizó el origen genético de los embriones con base en los morfotipos poliembriónicos realizando extracciones de ADN de hojas (al menos 0.2 g) y PCR con los SSR: AG14, TAA3, TAA15, TAA41, GT03, CAC23. Se evaluaron los productos en PAGE y se encontró que los embriones cuentan con tendencias distintas del origen genético con base en los morfotipos, posición y tamaño; además, que puede existir más de un embrión distinto a la madre en una semilla y más de uno similar; a su vez, se pueden obtener embriones similares a la madre con al menos 72 % de probabilidad; en el morfotipo Micropildistante todos los embriones son distintos a la madre; los árboles se comportan distinto en la cantidad de semillas, embriones y morfotipos; y la cantidad de semillas por fruto varía dependiendo la época del año en que se producen.

Palabras clave: Morfotipos, Anatomía de Semillas, Apomixis, Origen genético.

POLYEMBRYONY IN ORTANIQUE MANDARIN (*CITRUS RETICULATA* × *C. SINENSIS*) AND THE GENETIC ORIGIN OF THE EMBRYOS

**Oscar Esau Quezada Flores, M.C.
Postgraduate college, 2022**

ABSTRACT

The position of embryos in seeds (120 seeds) of Mandarino Ortanique (*Citrus reticulata* × *C. sinensis* L.) and their genetic origin were studied. The evaluation was performed under digital microscopy, where six morphotypes were found (Two-group, Intertwined, Base Embryos, Micropildistant, Single and Base-Intertwined). The embryos were seeded in vitro, separating each one in a test tube and maintaining traceability. The seedlings obtained were grafted onto Volkamerian lemon plants for development. Then, the genetic origin of the embryos was analyzed based on polyembryonic morphotypes by performing DNA extractions from leaves (at least 0.2 g) and PCR with the SSRs: AG14, TAA3, TAA15, TAA41, GT03, CAC23. The products were evaluated in PAGE and it was found that the embryos have different tendencies of genetic origin based on morphotypes, position and size; in addition, there can be more than one embryo different from the mother in a seed and more than one similar embryo; in turn, embryos similar to the mother can be obtained with at least 72 % probability; in the Micropildistante morphotype all embryos are different from the mother; trees behave differently in the number of seeds, embryos and morphotypes; and the number of seeds per fruit varies depending on the time of the year in which they are produced.

Keywords: Morphotypes, Seed Anatomy, Apomixis, Genetic Origin.

AGRADECIMIENTOS

Dedico esta tesis a los millones de mexicanos (as) que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación;

Al área de Fruticultura del posgrado en recursos genéticos y productividad del Colegio de Postgraduados en el Campus Montecillo, por todas las facilidades brindadas durante el tiempo dedicado a mis estudios e investigación.

Las personas integrantes de mi Consejo Particular por el esfuerzo, la dedicación, el tiempo y el apoyo que me han brindado, pero sobre todo por la infinita paciencia para con mi persona.

Todos mis profesores (as) que me dieron bases para mejorar en mi vida profesional, compañeros (as) que me apoyaron de distintas formas en mi tiempo aquí, y a mi familia que siempre está en cada detalle.

A los trabajadores del Vivero Cazonas, por el gran apoyo durante todo el experimento, sin el cual no habría sido posible.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	4
Objetivos	4
Hipótesis	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA	5
Poliembrionía	5
Anatomía.....	8
Análisis genético a nivel molecular	11
Diversidad genética.....	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Descripción general	15
Obtención de frutos.....	15
Obtención y descripción de las semillas	16
Obtención y descripción de las series de embriones	16
Cultivo de las series de embriones	18
Injerto de vitroplántulas	19

Análisis genético molecular.....	19
Extracción de ADN	19
Reacción en cadena de la polimerasa.....	20
Electroforesis con productos de PCR	21
Análisis de datos.....	21
V. RESULTADOS	22
Número y anatomía de las semillas	22
Morfotipos	22
Morfotipo Dos grupos.....	23
Descripción morfológica	23
Origen genético	24
Morfotipo Embriones en la base	26
Descripción morfológica	26
Origen genético	27
Entrelazados.....	29
Descripción morfológica	29
Origen genético	30
Morfotipo Sencillo	32
Descripción morfológica	32
Morfotipo Micropildistante	33
Descripción morfológica	33
Origen genético	34
Morfotipo Base-Entrelazados.....	36

Descripción morfológica	36
Origen genético	37
Relación entre morfotipos	41
Variación e identidad genética	43
Árbol 1.....	44
Árbol 2.....	45
Árbol 3.....	46
Árbol 4.....	46
Árbol 5.....	47
Árbol 6.....	48
Árbol 7.....	49
Árbol 8.....	49
Plántulas distintas y sus madres.....	50
VI. DISCUSIÓN.....	52
Morfotipos propuestos.....	52
Discusión de resultados del análisis genético molecular con base en morfotipos	57
Discusión de la variación e identidad genética	58
VII. CONCLUSIONES.....	60
VIII. RECOMENDACIONES	61
IX. LITERATURA CITADA	62
ANEXOS	68
Anexo A1. Protocolos de extracción de ADN.....	68
Anexo A2. Características de los marcadores SSR.....	70

Anexo A3. Protocolos de gel de agarosa	71
Anexo A4. Programa de PCR	72
Anexo A5. Protocolo de elaboración de PAGE	72
Anexo A6 Variación e identidad genética.....	76
Anexo A7. Representaciones de los morfotipos	80
Anexo A8. Proceso del experimento	86

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Formas de las semillas por morfotipo,	23
Cuadro 2. Origen parental, tamaño y orientación de las plántulas derivadas de los embriones del morfotipo Dos Grupos.	25
Cuadro 3. Origen parental, tamaño y orientación de las plántulas derivadas de los embriones del morfotipo Embriones Base.	28
Cuadro 4. Origen parental, tamaño y orientación de las plántulas derivadas de los embriones del morfotipo Entrelazados.	31
Cuadro 5. Origen parental, tamaño y orientación de las plántulas derivadas de los embriones del morfotipo Micropildistante.	35
Cuadro 6. Origen parental, tamaño y orientación de las plántulas derivadas de los embriones del morfotipo Base -Entrelazados.	39
Cuadro 7. Protocolo de extracción de ADN de hojas de Mandarino Ortanique.	68
Cuadro 8. Protocolo de extracción de ADN proveniente de embriones y endospermo de Mandarino Ortanique.	69
Cuadro 9. Temperaturas de alineación de los marcadores SSR para PCR.	70
Cuadro 10. Características de los marcadores moleculares.	70
Cuadro 11. Amortiguador de carga para gel de electroforesis TBE 5X.	71
Cuadro 12. Preparación de SGB (amortiguador de carga con tinte).	71
Cuadro 13. Procedimiento para elaboración de gel de agarosa (2 % para gel de calidad y 3 % para ver productos de PCR).....	71
Cuadro 14. Programa de PCR.	72
Cuadro 15. Cantidades para la preparación de geles de poliacrilamida.....	72

Cuadro 16. Cantidades para la preparación de la solución fijadora (Fixer).	73
Cuadro 17. Construcción del molde.	73
Cuadro 18. Protocolo de preparación de gel de poliacrilamida.	74
Cuadro 19. Protocolo de electroforesis.	74
Cuadro 20. Embriones similares y diferentes a la madre y morfotipo de la semilla.....	76
Cuadro 21. Resumen estadístico de los alelos en los diferentes marcadores.	76
Cuadro 22. Frecuencia de alelos en los distintos marcadores.	77
Cuadro 23. Frecuencia de Genotipos por marcador.....	77
Cuadro 24. Matriz de frecuencia de alelos de los diferentes marcadores.	78
Cuadro 25. Frecuencia de alelos compartidos basada en distancias entre las ocho poblaciones.	78
Cuadro 26. Frecuencia de alelos por morfotipo.....	79
Cuadro 27. Similaridad entre los morfotipos.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de un óvulo anátropo (UNN, 2013).....	9
Figura 2. Micrografía de barrido de óvulo anátropo (Gonzalez, 2010).	9
Figura 3. Semilla con divisiones en el plano transversal y sagital.	17
Figura 4. Semilla con división en el plano coronal.....	17
Figura 5. Formas de las semillas de cítricos (IPGRI, 2000).	18
Figura 6. Imágenes de la misma semilla con tegumento externo (a), interno (b) y sin tegumento (c).....	18
Figura 7. Morfotipo dos Grupos. Se presentan los dos conjuntos de embriones, G1 y G2 y la orientación es en relación con la chalaza (C), micrópilo (M) y rafe (R).	24
Figura 8. Dendrograma de similitud genética de las plántulas de los embriones del morfotipo Dos Grupos.	26
Figura 9. Morfotipo embriones base. Tiene un embrión grande y varios embriones cercaos al micropilo; la orientación es en relación con la chalaza (C), micrópilo (M) y rafe (R).....	27
Figura 10. Dendrograma de similitud genética de las plántulas provenientes de los embriones con morfotipo Embriones base.	29
Figura 11. Morfotipo entrelazados. Se presentan varios embriones con los cotiledones entrelazados; la orientación es en relación con la chalaza (C), micrópilo (M) y rafe (R).....	30
Figura 12. Dendrograma de similitud genética de las plántulas de los embriones del morfotipo Entrelazados.....	32

Figura 13. Morfotipo Sencillo. Se presenta un embrión grande en todo el volumen de la semila y rudimentos (ru) en la zona del micropilo; la orientación es en relación con la chalaza (C), micrópilo (M) y rafe (R).	33
Figura 14. Morfotipo micropildistante. Se presentan los embriones entrelazados con al menos una radícula alejada del micropilo y unida al rafe; la orientación es en relación con la chalaza (C), micrópilo (M) y rafe (R).	34
Figura 15. Dendrograma de similitud genética de las plántulas de los embriones del morfotipo Micropildistante.....	36
Figura 16. Morfotipo Base- Entrelazados. Morfotipo Dos Grupos. Se presentan los dos conjuntos de embriones; uno con embriones entrelazados y otro con embriones en la base; la orientación es en relación con la chalaza (C), micrópilo (M) y rafe (R).....	37
Figura 17. Dendrograma de similitud genética de las plántulas de los embriones del morfotipo Base- Entrelazados.	41
Figura 18. Frecuencia de alelos compartidos entre los morfotipos.	42
Figura 19. Ejemplo de patrones de bandeo con el marcador GT03; Alelo 1 (A1); Alelo 2 (A2); Alelo 3 (A3).....	43
Figura 20. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 1 y la descendencia.	45
Figura 21. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 2 y la descendencia.	45
Figura 22. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 3 y la descendencia.	46

Figura 23. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 4 y la descendencia.....	47
Figura 24. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 5 y la descendencia.....	48
Figura 25. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 6 y la descendencia.....	48
Figura 26. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 7 y la descendencia.....	49
Figura 27. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 8 y la descendencia.....	50
Figura 28. Frecuencia de alelos compartidos entre las plantas con recombinación genética y las plantas madre.....	51
Figura 29. Ilustración de la posición de los embriones en el morfotipo Dos grupos.....	80
Figura 30. Ilustración de la posición de los embriones en el morfotipo Embriones base.....	81
Figura 31. Ilustración de la posición de los embriones en el morfotipo Entrelazados.....	82
Figura 32. Ilustración de la posición de los embriones en el morfotipo Base-Entrelazados.....	83
Figura 33. Ilustración de la posición de los embriones en el morfotipo Micropildistante.....	84
Figura 34. Ilustración de la posición de los embriones en el morfotipo Sencillo.....	85
Figura 35. Proceso del experimento.....	86

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Dos Grupos (DG)

Embriones en la Base (EB)

Entrelazados (En)

Sencillo (Se)

Micropildistante (M)

Base-Entrelazados (BE)

Distinto (D)

Similar (S)

Muerto (:::)

C1 y C2 (Chalaza 1 y 2)

M1 y M2 (Micropilo 1 y 2)

v.g. (por ejemplo)

I. INTRODUCCIÓN

La producción y consumo mundial de cítricos ha aumentado desde 1980, en especial de naranjas, mandarinas, limones y limas, esto a causa de las mejoras en el transporte y empaquetado que reducen costos y mejoran la calidad (Maya, 2017). Para cubrir esta producción, el crecimiento en la demanda de zonas de cultivo también ha aumentado con el paso de los años, y con ello la aplicación de tecnologías emergentes de producción, entre las que la propagación clonal tiene un impacto importante (en cítricos se utiliza la apomixis) (Asker S. E., 1992) .

La apomixis o reproducción asexual mediante semillas es un fenómeno con potencial en la agricultura ya que ayuda a fijar la heterocigosidad y vigor híbrido (Sailer *et al.*, 2016). En plantas como los cítricos, la apomixis es un suceso común que causa poliembrionía (Koltunow *et al.*, 1996), que es la formación de más de un embrión por óvulo (embrión sinérgico y antipodal, poliembrionía de separación, embrión adventicio) (Carman, 1997). Los embriones apomícticos se originan de la nucela, capa que rodea al saco embrionario. En los cítricos, los embriones apomícticos son del tipo esporofítico nucelar porque implican el desarrollo de embriones extranumerales a partir de células de la nucela del óvulo sin que lleguen a formar un saco embrionario extra. Dado al origen maternal, los embriones nucleares se consideran esenciales para la propagación de plantas con prueba negativa a patógenos, por lo que ayudan a perpetuar variedades de interés y sirven como método de selección clonal en la producción de plantas de cítricos de calidad (Xiang y Roose, 1988).

A pesar de este beneficio, la poliembrionía tiene limitantes entre las que destacan la competencia fisiológica que limita la viabilidad de los embriones. Se ha visto que, a medida que aumenta la cantidad de embriones en la semilla, disminuye la masa media de los embriones, se reduce el vigor y también el de las plántulas que generan, además de que se aumentan las anomalías morfológicas de los embriones. Sin embargo, se presenta mayor supervivencia de la semilla como conjunto, es decir, la alta frecuencia de semillas poliembriónicas aumenta la supervivencia (Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012).

A nivel de mejoramiento genético, la poliembrionía puede ser considerada un problema, debido a que la cantidad de embriones apomícticos, fundamentales para la propagación clonal de genotipos ya conocidos, obstruyen la identificación de los pocos embriones híbridos, esenciales para continuar los programas de selección e hibridación (Trapero *et al.*, 2014).

Se ha reportado que la cantidad de embriones desarrollados a partir de la nucela define el tamaño del embrión. En la naturaleza, la expresión de los distintos morfotipos tiene componentes genéticos y ambientales cuya interacción induce la aparición en diferentes frecuencias (Uma Shaanker, 1997) y se asume que podría ser un carácter distintivo de la forma de la semilla, aunque esto aún necesita ser definido. Los informes indican que la mayoría de los embriones se ubican en la región micropilar del óvulo, pero también pueden localizarse en las partes laterales y cercanas a la chalaza (Batygina *et al.*, 2007).

La poliembrionía también se ha caracterizado en cuanto al tamaño, peso y desarrollo de los embriones. En algunas investigaciones, se ha argumentado que el tamaño de los

embriones da indicio de la procedencia (Uma Shaanker, 1997), otras señalan que la distribución de la biomasa en los embriones depende del número de embriones y otras han revelado que el desarrollo de los embriones nucelares se caracteriza por ser asíncrono (Kishore et al., 2012).

A la fecha, no existe alguna clasificación o patrón reportado de los morfotipos de los embriones en cítricos con relación a la posición dentro del saco embrionario; tampoco algún trabajo señala la relación entre esta posición y tamaño de los embriones en conjunto, y más importante, no se conoce si el origen genético de los embriones podría tener relación con la disposición topológica (morfotipos), con la forma o tamaño. Tener esta información facilitaría la propagación clonal y el mejoramiento genético. Considerando lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron: 1) Caracterizar los morfotipos anatómicos de embriones de semillas de Mandarino Ortanique y generar nomenclatura con base en ello; 2) Determinar si el morfotipo anatómico de los embriones en las semillas de Mandarino Ortanique tiene relación con su origen genético.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos

- 1) Caracterizar los morfotipos anatómicos de embriones de semillas de Mandarino Ortanique y generar nomenclatura con base en ello;
- 2) Determinar si el morfotipo anatómico de los embriones en las semillas de Mandarino Ortanique tiene relación con su origen genético.

Hipótesis

1. Existen características determinantes que correlacionan los morfotipos y el origen genético de los embriones.
2. En cada semilla hay al menos un embrión igual a la madre y pueden presentarse más de un embrión distinto a la madre en una semilla.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

Poliembrionía

Desde que en 1719 Van-Leeuwenhoek observó la presencia de más de un embrión en semillas de naranja, en otras plantas se detectó fenómeno de la poliembrionía (Kozlowski, 1972). La poliembrionía es la formación de más de un embrión por óvulo (embrión sinérgico y antipodal, poliembrionía de separación, embrión adventicio) (Carman, 1997). Autores como Maheshwari y Sachar (1963), clasificaron a la poliembrionía en dos tipos: la verdadera (con un saco embrionario) y la falsa (con más de un saco embrionario).

En angiospermas, la poliembrionía verdadera puede tener como punto de origen el tegumento interno y la nucela, por lo que de acuerdo con Haberlandt (1925), las células del tegumento interno tienen capacidad de producir embriones, lo que indica que los embriones apomícticos no únicamente se pueden formar a partir de células de la nucela; de igual forma Fagerlnd (1944), menciona que más de un saco embrionario en el mismo óvulo podría dar como resultado la poliembrionía, estas variantes pueden dar origen a distintos morfotipos de los embriones en la semilla.

La poliembrionía, es frecuente en gimnospermas, se presenta por la división del proembrión cigótico, sin embargo, en angiospermas suele presentarse de otra manera. Las proliferaciones en las gimnospermas surgen del extremo inferior de la masa proembrionaria de células que después se convierten en embriones independientes (Kozlowski, 1972).

A lo largo del tiempo se han presentado diferentes clasificaciones de poliembrionía en angiospermas, como lo hace Koltunow (1993), quien plantea cuatro tipos de apomixis: la diplosporia meiótica, diplosporia mitótica, aposporia y embrionía adventicia; a su vez coloca a los cítricos dentro de la última categoría, lo que señala que los embriones apomícticos formados en los cítricos son de origen nucelar o fuera del saco embrionario.

La poliembrionía en cítricos se presenta por apomixis facultativa donde hay desarrollo simultáneo de embriones de origen nucelar y cigótico. Los tejidos nucleares promueven la embriogénesis después de diferenciarse, el desarrollo depende del endospermo y las plántulas resultantes cuentan con el genotipo de la madre (Kepiro y Roose, 2007).

Durante el desarrollo del saco embrionario las células nucleares embriogénicas tienen acceso al endospermo y desarrollan embriones asexuales además del embrión cigótico (Koltunow *et al.*, 1996), particularmente en la región micropilar. Las semillas poliembrionicas permiten conservar los genotipos mejor adaptados y mantener el vigor de los clones viejos que debido a la continua propagación vegetativa se van deteriorando (Sedgley y Griffin, 1989).

Las plantas, a diferencia de los animales, cuentan con mayor variedad de formas en las cuales los poliembriones pueden ser formados. El desarrollo de la poliembrionía puede involucrar diversos procesos (v.g. partición, gemación, partenogénesis, fecundación múltiple); dos estrategias reproductivas (sexual o asexual); diferentes células originales (nucleares, integumentales, huevo, sinérgidas, antípodas, endospermo), además de la participación de dos fases del ciclo de vida (esporofito y

gametofito); a su vez la formación de dos sacos embrionarios es posible (Koltunow, 1993). Esta variedad de eventos puede llevar a la formación de diferentes tipos de embriones que presentan distintos niveles de ploidía. En las semillas poliembriónicas, los procesos sexuales y asexuales pueden ser desarrollados simultáneamente (Batygina *et al.*, 2003; Koltunow, 1993).

Existen dos tipos de apomixis, con base en el origen del embrión: apomixis gametofítica y embrionía adventicia. La embrionía adventicia es la formación de embriones a partir de células somáticas, usualmente de la nucela. En la apomixis gametofítica se produce a partir de un saco embrionario diploide y el embrión es desarrollado por partenogénesis del megagametofito no reducido. Los embriones que surgen a partir de la ovocélula son formados por partenogénesis diploide y los originados a partir de las sinérgidas o antípodas son formados por apogametía diploide (CIMMYT, IRD y The European Commission, 2001).

Desde el punto de vista del mejoramiento, la poliembrionía puede restringir la recombinación genética, pero también proporciona un mecanismo para el desarrollo de cultivares superiores preservando estos genotipos de manera indefinida. Las plantas apomícticas, al igual que las de origen sexual, desarrollan semillas a partir del óvulo de la flor, pero la ovocélula y el núcleo espermático no se unen para formar un embrión. Por lo tanto, los embriones de una planta apomíctica solamente reciben la información genética de la planta madre (CIMMYT, IRD y The European Commission, 2001).

La poliembrionía puede ser dividida como esporofítica y gametofítica basada en las células que originan al embrión, si es formado a partir de las células somáticas del cigoto,

nucela, o del integumento, la poliembrionía sería esporofítica. Los embriones formados por células provenientes del gametofito (huevo, sinérgidas, antípodas) son llamados gametofíticos (Batygina y Vinogradova, 2007).

Existen distintas propuestas acerca del estudio de la poliembrionía en cítricos, la primera es seleccionar genotipos con mayor porcentaje de semillas poliembriónicas para asegurar la posibilidad de generar plántulas nucelares, favoreciendo la propagación clonal (Duarte *et al.*, 2013). La segunda, es utilizar genotipos con mayor cantidad de embriones por semilla, ya que la competencia entre embriones impide el desarrollo de los cigóticos, por el crecimiento vigoroso de los embriones nucelares (Koltunow *et al.*, 1996).

Para utilizar la poliembrionía se requiere detectar el origen cigótico o nucelar de los embriones en etapas tempranas. Una de las ventajas es la capacidad de elegir al híbrido resultante de cruzas dirigidas al mejoramiento genético; de igual forma, diferenciar cuáles embriones son nucelares permitirá propagar portainjertos que mantengan la uniformidad del huerto (Villegas-Monter y Andrade-Rodriguez, 2008).

Anatomía

En cítricos se cuenta con un óvulo anátropo. El cuerpo del óvulo se incurva 180°, de modo que el funículo se alarga, se adhiere a un lado de la nucela constituyendo la rafe, y la chalaza se posiciona opuesta al hilio y micrópilo (Figuras 1 y 2) (UNN, 2013).

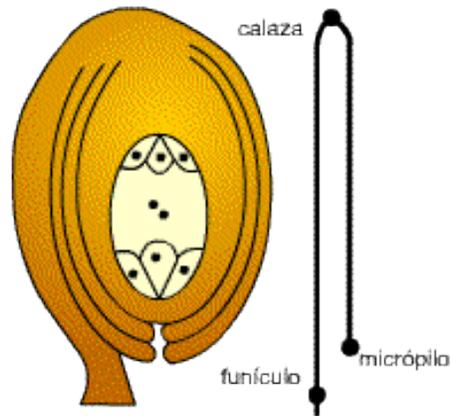


Figura 1. Representación de un óvulo anátropo (UNN, 2013).

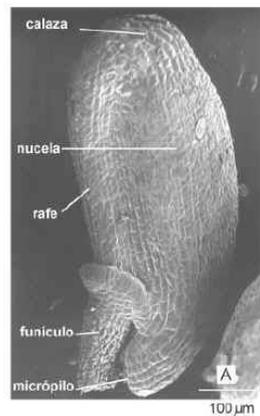


Figura 2. Micrografía de barrido de óvulo anátropo (Gonzalez, 2010).

La documentación de los detalles anatómicos de los embriones, ha dejado de lado la descripción y acomodo de los mismos, por lo que no se han llegado a describir los morfotipos predominantes. Un morfotipo puede ser definido como un arreglo topológico de los embriones en la semilla configurado por la posición, tamaño, forma y origen. Hasta ahora, no se han analizado los morfotipos de los embriones en las semillas maduras y no han sido contrastados con el origen genético, solamente se han analizado anatómicamente a semillas en desarrollo y el origen genético de los embriones por tamaño, como se puede observar en los trabajos de Andrade *et al.*, (2005), Martínez-Ochoa *et al.*, (2022) y además los que han llegado a realizar estudios de los arreglos de

embriones, también llamados morfotipos, han evaluado la cantidad de embriones que se encuentran en cada una de las semillas, pero no consideran la posición y “arreglo” (Kishore *et al.*, 2012).

La caracterización morfológica de recursos fitogenéticos es la determinación del conjunto de caracteres mediante el uso de descriptores definidos que permiten diferenciar taxonómicamente a las plantas. Algunas características pueden tener alta heredabilidad, y fácil detección, con la posibilidad de expresar la misma forma en diferentes ambientes. Las características morfológicas son utilizadas en el estudio de la variabilidad genética, para la identificación de plantas y conservación de los recursos fitogenéticos. Por lo tanto, la caracterización es el primer paso en el mejoramiento de plantas y programas de conservación (Hernández-Villarreal, 2013)

A lo largo del estudio de la poliembrionía en cítricos se ha buscado explicar el origen de los distintos embriones en la semilla, como lo realizado por Andrade y Villegas (2003), señalando que los cítricos presentan más de un embrión dentro de una semilla, donde un embrión cuenta con recombinación genética y el resto de embriones de la semilla no. Los embriones sin recombinación genética dan origen a plantas uniformes, por lo que puede ayudar a propagar variedades tolerantes a patógenos de manera clonal; además de obtener plantas uniformes, con prueba negativa de virus como lo señaló Perissé (2002). Esto ayudaría a obtener plantas de mejor calidad para la producción de cítricos, por lo que es importante conocer el origen genético de los embriones dentro de la semilla, sin embargo, para involucrar análisis genéticos se requiere la descripción morfológica de los morfotipos de los embriones en las semillas y aún no existen trabajos donde se

describan tales “morfotipos” y los relacionen con el origen genético de las plantas de las que provienen.

Existen pocos precedentes con relación a la descripción anatómica de semillas de cítricos, como el trabajo de Sánchez *et al.* (2006), donde analizan el saco embrionario y el desarrollo de los embriones de semillas de tres portainjertos (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.; *C. volkameriana* Pasq. y *C. amblycarpa* Ochse), por medio de cortes de óvulos, en diferentes etapas del desarrollo, sin embargo, no llegan a describir el desarrollo del óvulo hasta la formación de la semilla madura, ni involucran análisis genéticos de los embriones producidos. Estos mismos autores señalan que no es posible identificar el origen de los embriones por medio de la anatomía, debido a que encontraron embriones tanto en el extremo nucelar micropilar del saco embrionario, como en las áreas laterales del micrópilo los cuales cambiaron de posición durante el desarrollo, además de que no analizaron la presencia de un patrón en la manera de moverse de los embriones al desarrollarse hasta la posición final.

La mayoría de los cítricos presentan reproducción apomíctica esporofítica adventicia y generan semillas poliembriónicas. Los embriones múltiples de las semillas se originan porque en los óvulos se lleva a cabo el desarrollo de embriones cigóticos producto de la cruce de los progenitores, de manera simultánea a la formación de embriones somáticos (clones) a partir de células de la nucela (Hand y Koltunow, 2014).

Análisis genético a nivel molecular

El origen genético de los embriones en semillas poliembriónicas puede ser determinado mediante marcadores moleculares. Un marcador es un punto de referencia

en el genoma que se define como un segmento específico de ADN que se utiliza para rastrear la herencia de un gen cercano o una región genómica involucrados en la expresión de un rasgo o respuesta (Nadeem et al., 2018). En la discriminación de plántulas nucelares y cigóticas de varias especies de *Citrus* se han empleado RAPD (Rao et al., 2007), AFLP (Kepiro y Roose, 2007), SSR (Yildiz et al., 2013), EST-SSR (Chunxian et al., 2008).

Los microsatélites o SSRs (Simple-Sequence Repeat, por sus siglas en inglés) son repeticiones consecutivas o en tándem (una tras otra) de secuencias de ADN de pocos pares de bases (pb) (1-6 pb) en longitud, denominadas unidades de repetición. Son marcadores codominantes y son de fácil aplicación en relación con otros tipos de marcadores debido a que presentan mayor simplicidad tecnológica con relación a los RFLP y AFLP, y no requieren alta concentración y calidad de ADN. Los SSRs al contrario de los marcadores RAPD, presentan alta reproducibilidad entre laboratorios y generalmente permiten detectar todos los alelos posibles de un locus (Ortiz et al., 2000). Kijas *et al.* (1997), utilizaron un híbrido entre lima rangpur (*Citrus limonia* Osbeck) y naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) del programa de reproducción de vástagos de cítricos de CSIRO para aislar el ADN y desarrollar los SSRs para cítricos. Mediante estas aportaciones diferentes estudios se han llevado a cabo en *Citrus* relacionados con la identidad paternal (Martínez-Ochoa *et al.*, 2022), la diversidad (Samarina, 2021), el mapeo genético (Biswas *et al.* 2011), entre otros.

Diversidad genética

La diversidad es el conjunto de variaciones a nivel de secuencia de ADN que presentan en conjunto los individuos de una población. Estas variaciones son posibles de cuantificar y visualizar mediante la evaluación de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares. Sin embargo, dado que el efecto ambiental es un componente importante de la expresión de los caracteres fenotípicos, los marcadores de ADN son de preferencia utilizados debido a que son neutros al efecto del ambiente, por lo que la precisión en la lectura es útil para estudios de diversidad y similitud genética. La manera más viable de proteger variedades o especies en peligro de extinción es conociendo la diversidad genética, la investigación por medio del germoplasma es también la base para la mejora de variedades y la innovación de recursos genéticos (Bin *et al.*, 2022).

Los marcadores moleculares SSR fueron propuestos por Moore *et al.* (1991), en los últimos años para los análisis de diversidad, los SSR se han utilizado ampliamente en la investigación sobre identificación de germoplasma, análisis de diversidad genética, mapeo de genes e identificación de relaciones genéticas con efectividad (Amar *et al.*, 2011). Existen pocos estudios con relación a la diversidad en Citrus o sobre la comparación de la capacidad de discriminación, la eficiencia y capacidad de mapeo de los sistemas de marcadores SSR (Biswas *et al.*, 2011). La extensión de la diversidad que presentan las especies, las poblaciones dentro de una misma especie o los individuos dentro de una misma población puede ser medida mediante indicadores de diversidad, donde la frecuencia de los alelos, número de alelos y de genotipos que pueden formar la base de un primer acercamiento para llegar a otros estimadores como la heterocigosidad.

Con base en este último indicador es posible estimar las distancias genéticas entre y dentro de poblaciones e individuos para luego visualizarlas mediante dendrogramas de similitud genética. Estos análisis son de utilidad en la biología de la conservación (Faith, 1992), y dan bases para el mejoramiento de variedades y la innovación de recursos (Bin *et al.*, 2022), y son esenciales en estudios filogenéticos para discriminar o asociar individuos entre sí y que tan cercanos genéticamente se encuentran (Samarina, 2021).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción general

El experimento comenzó con la cosecha de frutos y hojas de las plantas madre, después, los frutos fueron procesados (Lavados, desinfectados y empaquetados) para transporte de campo al Colegio de Postgraduados para la extracción de semillas, luego se continuó con el análisis de los morfotipos de los embriones, después con la siembra de los embriones, enseguida con la injertación de las plántulas obtenidas de los embriones, para obtener al menos 0.2 g de material foliar para la extracción de ADN; que condujo a extraer, evaluar y cuantificar el ADN para determinar si era apto para la elaboración de las PCR's, se continuó con la estandarización de los protocolos de PCR para examinar varias posiciones sobre el genoma de las muestras finales, y luego migrar los productos de PCR en geles de poliacrilamida para posterior lectura y análisis. Toda esta serie de pasos del proceso de investigación se esquematiza en el anexo A8.

Obtención de frutos

Este estudio se llevó a cabo en semillas de Mandarino Ortanique (*C. reticulata* × *C. sinensis*) provenientes de una huerta de polinización libre del Vivero Cazones localizado en Cazones de Herrera, Veracruz, México, en las coordenadas 20° 42' latitud norte y 97° 18' longitud oeste, y entre 80-120 m de altitud (INEGI, 2010); con precipitación pluvial media anual de 2000 mm; temperatura media anual de 25 °C (INAFED, 2021).

Se cosecharon frutos en dos épocas, marzo y septiembre de 2021. Para la selección de frutos, se recolectaron todos los frutos de ocho árboles escogidos, y se eligieron cinco

frutos al azar del conjunto obtenido de cada árbol. Se obtuvieron 40 frutos en total; los frutos seleccionados de cada árbol se lavaron en agua con cloro al 5 % durante tres minutos y se secaron con un trapo esterilizado para almacenaje en bolsas plásticas nuevas a 4-7°C como lo indica la FAO e INTA (2003) para mandarinas.

Obtención y descripción de las semillas

Las semillas de cada fruto se obtuvieron con base en la descripción de Andrade y Villegas (2005). Brevemente, se hizo un corte tipo “anillado” poco profundo por los costados de los frutos, con el propósito de no dañar las semillas, para luego girar las dos mitades hasta la separación. Las semillas se extrajeron manualmente y se contaron para obtener el número total y promedio de semillas por fruto, así como el análisis de distribución normal. Enseguida, a las semillas se le retiró el mucílago lavándolas y agitándolas suavemente en agua desionizada tratada con óxido de calcio (2 g L⁻¹ de agua) durante 10 minutos y luego se lavaron tres veces con agua desionizada esterilizada. Una vez limpias, las semillas se almacenaron en frascos de vidrio y se dejaron en inmersión con agua desionizada y esterilizada a temperatura ambiente durante 24 h. Los frascos que contenían las semillas se identificaron para mantener la trazabilidad del árbol y fruto del que provenían; cada embrión fue identificado con un número de cuatro dígitos, v.g. 8351 (árbol ocho, fruto tres, semilla cinco y embrión uno).

Obtención y descripción de las series de embriones

El arreglo topológico, tamaño y forma de 120 semillas y sus embriones se examinaron con la finalidad de obtener la descripción de los morfotipos existentes. Los

embriones se obtuvieron mediante disección de las semillas con bisturí del número 11 y pinzas de disección. Se utilizó un microscopio digital (LCD Digital Microscope 1000x Portatil G7000) con aumento de 10X para retirar el tegumento externo e interno y separar los embriones. Una vez separados, se procuró mantener la disposición de los embriones en varios planos para asegurar el registro preciso de la orientación con relación al micrópilo, chalaza y rafe (Figuras 3 y 4). Los planos de orientación fueron transversal, sagital y coronal. El tamaño de la semilla se registró empleando la escala de hojas milimétricas y la forma se definió con base en los lineamientos del IPGRI (2000) (Figura 5). Se analizaron los colores del tegumento externo de la semilla, el del tegumento interno en la zona de la chalaza (Figura 6).

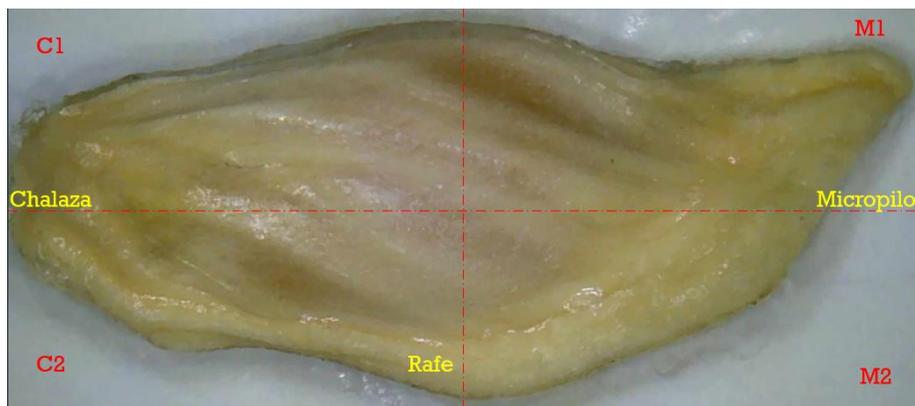


Figura 3. Semilla de naranja (*C. sinensis*) con divisiones en el plano transversal y sagital.



Figura 4. Semilla de naranja (*C. sinensis*) con división en el plano coronal.

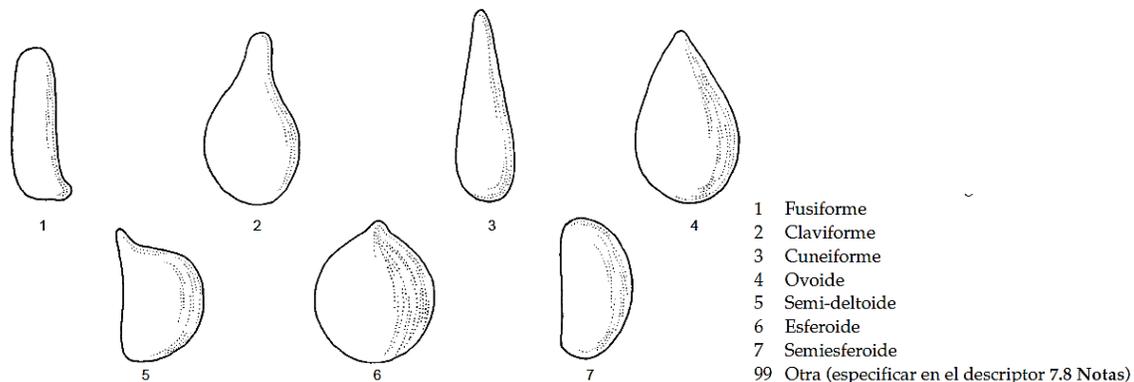


Figura 5. Formas de las semillas de cítricos (IPGRI, 2000).



Figura 6. Imágenes de la misma semilla de Mandarino Ortanique con tegumento externo (a), interno (b) y sin tegumento (c).

Cultivo de las series de embriones

Con la finalidad de obtener tejido suficiente para el análisis molecular, los embriones de cada semilla se sembraron en condiciones *in vitro* y más tarde se injertaron sobre patrones de limón volkameriano de cuatro meses (provenientes de semilla). El cultivo *in vitro* se hizo en tubos con medio de cultivo base en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (20 mL L^{-1}), KPO (20 mL L^{-1}), MgSO_4 (10 mL L^{-1}), quelatos (10 mL L^{-1}), NH_4NO_3 (3 mL L^{-1}), KNO_3 (3 mL L^{-1}), myo-inositol (6 mL L^{-1}), tiamina (1 mL L^{-1}), vitaminas (1 mL L^{-1}), agar (6 g L^{-1}), azúcar (20 g L^{-1}). La siembra se realizó en campana de flujo laminar esterilizada con Timsen® (sales cuaternarias de amonio) 2 g L^{-1} en agua deionizada. Se utilizaron bisturí del número 11 y pinzas de disección esterilizados con Germinator 500 TM. Los embriones se colocaron sobre el medio de cultivo con la radícula dirigida hacia abajo con la ayuda

de pinzas de disección, únicamente en el caso de los embriones más pequeños la transferencia al medio de cultivo se hizo con bisturí para no maltratarlos con las pinzas. Una vez colocados los embriones, los tubos se taparon y sellaron herméticamente con película elástica y se dejaron entre tres semanas a tres meses para el crecimiento y posterior trasplante sobre portainjertos en condiciones de invernadero. Las semillas utilizadas para la descripción de las series de embriones fueron diferentes a las utilizadas para el cultivo *in vitro* de las series de embriones.

Injerto de vitroplántulas

Una vez germinadas las vitroplántulas y con tamaño de 2 a 12 mm, se retiraron del tubo de cultivo y se injertaron en portainjertos de limón volkameriano de 4 mm de diámetro. Estos portainjertos se establecieron en condiciones de espacio protegido y certificada en el “Vivero Cazonos” ubicado en Cazonos de Herrera, Veracruz. El método de injerto utilizado fue el de púa a 40-50 cm de altura en el portainjerto. Después de realizado el injerto, se utilizó Parafilm® para amarrarlo y se mantuvo dentro de una cápsula climática transitoria preparada mediante bolsas plásticas translúcidas.

Análisis genético molecular

Extracción de ADN

El ADN se extrajo de dos maneras: de hojas de las vitroplántulas injertadas sobrevivientes (91.6 %) y del endospermo de algunos de los embriones (8.4 %). Para ello, se utilizaron dos protocolos de extracción. Para las hojas, el método de extracción se basó en el protocolo para “Aislamiento del ADN genómico” (CIMMYT, 2006) con

pequeñas modificaciones (Anexo A1) mientras que, para la extracción del ADN de endospermo, el protocolo aplicado fue aquél descrito por (Gao *et al.*, 2008). Después de haber realizado las extracciones de ADN, se cuantificó por absorbancia utilizando un espectrofotómetro de ultra bajo volumen (NanoDrop 1000c, ThermoScientific, Waltham, MA, EUA) y la integridad se verificó en geles de agarosa 1 % con bromuro de etidio (10 mL mL⁻¹). La verificación de los valores de concentración y la señal obtenida en gel de cada ADN se hizo mediante el programa ImageJ. Una vez verificada la concentración, se hicieron diluciones de trabajo a 10 ng µL⁻¹ con TE pH 8.0.

Reacción en cadena de la polimerasa

Se trabajó con 21 marcadores SSR reportados por Martínez-Ochoa *et al* (2022), donde seis de ellos se utilizaron para los análisis finales por su valor informativo para Mandarino Ortanique (AG14, TAA3, TAA15, TAA41, GT03, CAC23). Las secuencias flanqueantes de estos marcadores se encuentran en el cuadro 10 (Anexo A2). Los marcadores seleccionados se optimizaron mediante PCR de gradiente en reacciones de 15 µL. Cada reacción consistió en 3.2 µL de agua grado HPLC, 3.0 µL de solución amortiguadora 5x, 1.2 µL de dNTPs a 2.5 mM cada uno (Thermo Scientific, USA), 0.9 µL de cloruro de Magnesio 25 mM, 2.3 µL de iniciadores a 2 µM, 0.2 µL de Taq-ADN polimerasa (5 U µL⁻¹) (Promega) y 2.0 µL (10 ng µL⁻¹) de ADN molde. El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos compuestos por un min para desnaturalización, seguido un min a Y °C (Y = gradiente de temperatura de alineamiento de 48 a 60 °C) para alineación de iniciadores y un min a 72 °C para extensión, y un ciclo de extensión final durante cuatro min a 72 °C

utilizando un termociclador BioRad C1000 (California, USA). Cada marcador optimizado (Cuadro 9 -Anexo A2-) se amplificó en placas de 96 pozos utilizando un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Singapur). Los programas de PCR utilizados fueron basados en los señalamientos de Kijas et al. (1997).

Electroforesis con productos de PCR

El producto de PCR se mezcló con 5 µL de SGB 5X (50 mM Tris, 5 mM EDTA pH 8, 25 % de sacarosa, 0.2 % p/v de azul de bromofenol y agua HPLC como solvente). La señal de amplificación de cada reacción se verificó en geles de agarosa al 1 % (Sigma®, St. Louis MO, EE.UU.) antes de la electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante al 8 % con tinción en nitrato de plata (Sigma®, St. Louis, MO, EE.UU.) siguiendo el protocolo descrito por el CIMMYT (2006). Los geles se fotografiaron en un transiluminador (MiniBis Pro 16 mm, DNR Bio-Imaging Systems®, Jerusalem, Israel) y el peso en pares de bases (pb) se calculó con el programa GelAnalyzer (Lazar, Hungría) para construir la matriz de datos moleculares.

Análisis de datos

Los datos moleculares se evaluaron por medio de análisis de diversidad utilizando PowerMarker (Liu y Muse, 2005, EE.UU.) y la interfaz MEGA 7 (Kumar et al., 2016) para construir dendrogramas con base en matriz de distancias genéticas de alelos compartidos. Se realizó primero el resumen estadístico, después el análisis de frecuencia de alelos, de genotipos y frecuencia basada en distancias; para contrastar el origen genético de cada embrión, con la posición dentro de la semilla y definir las tendencias con las que cuenta cada morfotipo.

V. RESULTADOS

Número y anatomía de las semillas

La distribución de semillas por fruto no fue normal debido a que se registraron de 0 a 30 semillas con 4.25 semillas en promedio. De 120 semillas para el análisis de los morfotipos, se detectaron cuatro de las siete formas de semilla reportados en los lineamientos descritos por IPGRI (2000). Estas fueron esferoide, ovoide, cuneiforme y semi-deltaide. La forma predominante (**50 %**) fue ovoide con presencia en casi todos los morfotipos y la menos frecuente (**11 %**) fue la semi-deltaide. Las semillas se dividieron en tres tamaños, chicas ($X < 0.89$ cm), medianas ($0.89 \text{ cm} > X < 1.16$ cm) y grandes ($1.16 \text{ cm} > X < 1.44$ cm).

Morfotipos

Los análisis morfoanatómicos fueron realizados en 120 semillas divididas en tres planos (Figuras 3 y 4), para determinar la orientación de los embriones y describir el morfotipo para cada una de ellas. Se encontraron seis morfotipos o arreglos de embriones en diferentes porcentajes, los cuales son: Dos Grupos (**10 %**), Embriones Base (**30 %**), Entrelazados (**13.33 %**), Sencillo (**10 %**), Micropildistante (**3.33 %**) y Base-Entrelazados (**33.33 %**). Estos arreglos de embriones se proponen como “Morfotipos” y se esquematizan en el Anexo A7, cada uno cuenta con características que lo definen, basadas en: forma de la semilla, estructura del tegumento externo (TE) de la semilla, tonalidad de la chalaza una vez expuesto el tegumento interno, ubicación, tamaño y forma del embrión. Por ejemplo, se observó que la mayoría de los morfotipos se

encontraron en semillas de forma ovoide (con excepción del morfotipo Dos Grupos) y que en el morfotipo Sencillo, la forma de la semilla fue semi-deltoide, que de hecho fue la forma menos frecuente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Formas de las semillas por morfotipo,

Morfotipo	Forma de semilla	Color de la chalaza	Semillas por fruto
Dos grupos	Esferoides	Café	5-12
Embriones base	Ovoides y cuneiformes	Café o rojiza (ocasional)	4
Entrelazados	Ovoide y Esferoide	Café o rojiza (ocasional)	7
Sencillo	Semi-deltoide y ovoide	Café	5
Micropildistante	Ovoides	Café	5
Base-Entrelazados	Ovoides	Rojiza o café (ocasional)	6

Morfotipo Dos grupos

Descripción morfológica

Este morfotipo se encontró en 12 semillas (**10 %**). Consistió en dos grupos de embriones: el primer grupo (G1) cercano al micropilo y el segundo (G2) próximo a la chalaza. En los dos grupos, los embriones tuvieron las radículas orientadas hacia el micropilo. En el primer grupo (G1), los embriones presentaron todas las radículas unidas al área micropilar (Figura 7). Por su parte, los embriones del segundo grupo (G2), tenían radículas unidas al rafe orientadas hacia el micropilo. Las semillas que tienen este morfotipo son de medianas a grandes con forma esferoide (IPGRI, 2000), los frutos de los que provienen contienen entre 5-12 semillas, con cuatro embriones en promedio,

cotiledones son mayormente de color crema o blanco con verde, y la chalaza es café (Cuadro 1).

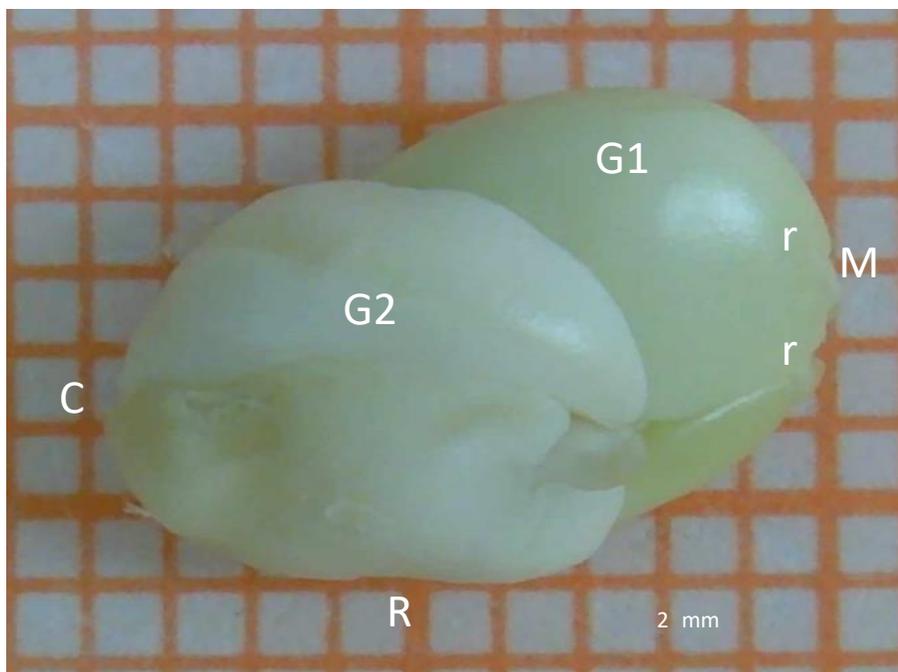


Figura 7. Morfotipo dos Grupos. Se presentan los dos conjuntos de embriones, G1 y G2 y la orientación es en relación con la chalaza (C), micrópilo (M) y rafe (R).

Origen genético

Para discriminar el origen parental, se evaluaron a nivel molecular cuatro series de embriones con este morfotipo (Cuadro 2). En total se analizaron las plántulas provenientes de 27 embriones. Se encontraron siete genotipos que indicaron que hubo **23 %** de embriones distintos a la madre y **77 %** similares. En este caso, las plántulas del grupo G1 derivadas de los embriones más pequeños y próximos al micropilo son distintas a la madre; pero en el grupo G2, el embrión de mayor tamaño y más cercano al tegumento interno dio lugar a plantas distintas a la madre; presentaron seis subgrupos que cuentan con diferencias ligeras entre sí, donde dos individuos distintos a la madre tienen el mismo genotipo (622-10 y 3511); el individuo 7112 resulto ser el que muestra

mayores diferencias con base en los alelos detectados en las seis posiciones del genoma (Figura 8).

Cuadro 2. Origen parental, tamaño y orientación de las plántulas derivadas de los embriones del morfotipo Dos Grupos.

Individuo	Ubicación	Tamaño (mm)	Origen	Individuo	Ubicación	Tamaño (mm)	Origen
3511	M2 anterior	1.5	D	6224	M2 Anterior	4.5	S
3512	M2 anterior	2.2	S	6225	M2 posterior	3.0	S
3513	M2 anterior	2.5	S	6226	M1 Anterior	2.0	S
3514	M1 Anterior y posterior	6.0	S	6227	M1 Anterior	2.0
3515	C2 anterior	2.0	6228	C1 y M1 Anterior y posterior	9.0	D
3516	C2 Anterior y posterior	2.0	6229	C1 Anterior y posterior	8.0	S
3517	C1 Anterior y posterior	6.0	S	62210	C1 Anterior y posterior	9.0	D
3518	C2 Anterior y posterior	7.0	S	7111	M2 Anterior	1.1	D
4221	M2 Anterior y posterior	4.0	S	7112	M1 Anterior y posterior	3.0	D
4222	M1 Anterior y posterior	7.0	S	7113	M1 Anterior	5.0	S
4223	C1 Y C2	8.0	D	7114	C1 y M1 Anterior y posterior	9.0	S
6221	M1 Anterior	1.5		7115	M2 posterior	3.0	S
6222	M2 Anterior	1.0	S	7116	C2 y M2	10.0	D

cuatro semillas en promedio con tres embriones; los cotiledones son de color blanco verdoso (IPGRI, 2000); la chalaza, en la mayoría de los casos, es de color café y en pocos casos rojiza (Cuadro 1).

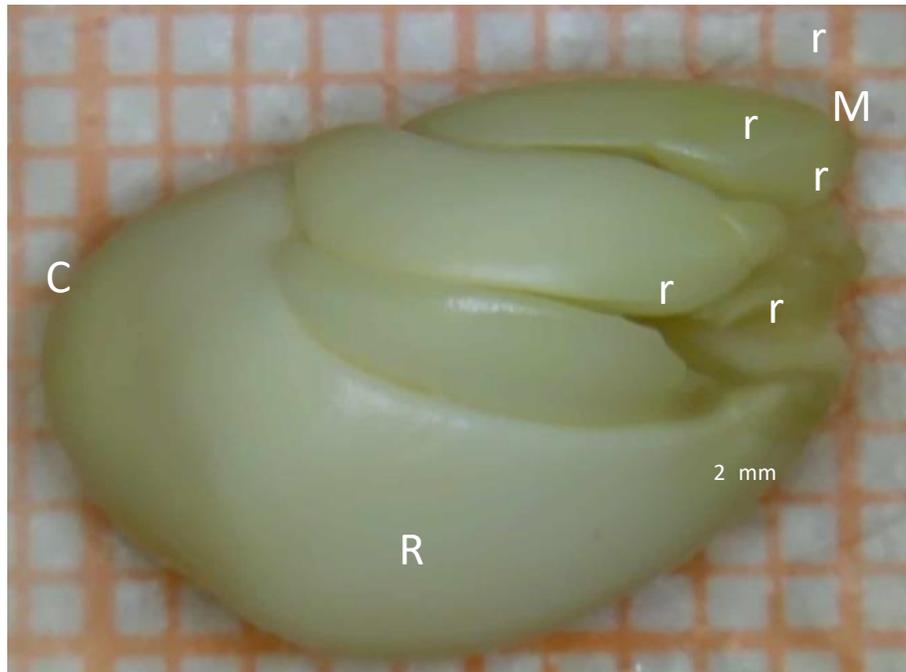


Figura 9. Morfotipo embriones base. Tiene un embrión grande y varios embriones cercanos al micropilo; la orientación es en relación con la chalaza (C), micropilo (M) y rafe (R).

Origen genético

Se examinaron a nivel molecular tres series de embriones con este morfotipo (Cuadro 3). En total fueron 18 plántulas provenientes de 18 embriones. Se encontraron cinco genotipos que indicaron que hubo **22.2 %** de embriones distintos a la madre y **77.8 %** similares. En este caso, la mayoría de las veces los embriones más pequeños, localizados en los cuadrantes M1 y M2 (zona del micropilo), son distintos a la madre; y en algunos casos cuando el embrión de mayor tamaño rodea al de menor tamaño, ambos embriones son distintos a la madre; presentaron cuatro subgrupos que cuentan con diferencias de más de dos posiciones en el genoma entre sí; donde los individuos 6115

y 5213 son más cercanos entre sí (diferencias en sólo dos posiciones en el genoma), pero sin ser idénticos, con base en los alelos detectados en las seis posiciones del genoma (Figura 10).

Cuadro 3. Origen parental, tamaño y orientación de las plántulas derivadas de los embriones del morfotipo Embriones Base.

Individuo	Ubicación	Tamaño (mm)	Origen	Individuo	Ubicación	Tamaño (mm)	Origen
5211	M1 Anterior y posterior	5.0	S	6114	M1 Anterior	1.5	::::
5212	M2 Anterior y posterior	5.5	S	6115	M1 Anterior	2.0	D
5213	M2 Anterior y posterior	2.0	D	6116	C2 Posterior	3.0	S
5214	M1 Anterior y posterior	4.0	S	6117	C1, C2, M1 Y M2 Posteriores	6.5	S
5215	C1 Anterior y posterior	6.0	S	6118	C1, C2, M1 Y M2 Anteriores	9.5	::::
5216	C2 Y M2 Anterior y posterior	9.0	S	7411	C1 y C2 Anteriores	2.5	S
6111	M1 Y M2 Anterior	2.5	S	7412	C1 y C2 Posteriores	3.5	S
6112	M1 Y M2 Anterior	4.0	::::	7413	C1 y C2 Anteriores y posteriores	3.0	D
6113	M1 Anterior	4.5	S	7414	C1, C2, M1 Y M2 Anteriores y posteriores	9.0	D

Chalaza 1 (C1); Chalaza 2 (C2); Micropilo 1 (M1); Micropilo 2 (M2); Distinto (D); Similar (S); Muerto (::::)

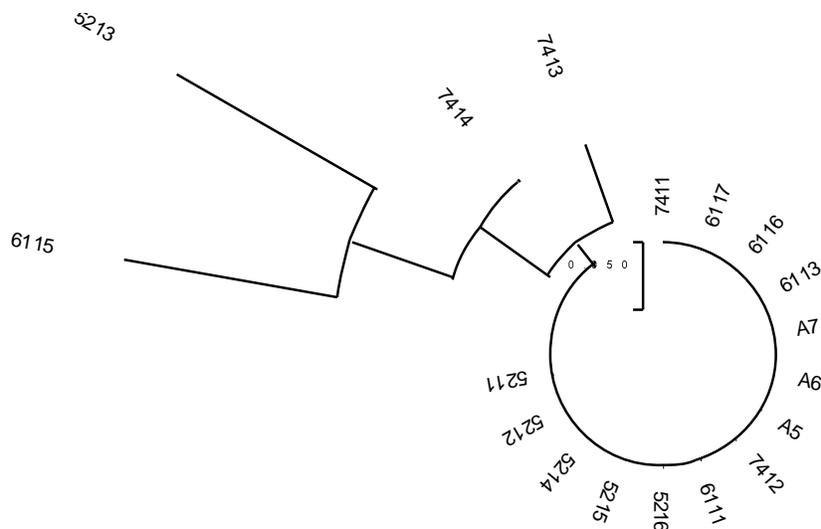


Figura 10. Dendrograma de similitud genética de las plántulas provenientes de los embriones con morfotipo Embriones base.

Entrelazados

Descripción morfológica

Este morfotipo se encontró en 16 semillas (**13.33 %**). La principal característica son los cotiledones entrelazados, de tal forma que se muestra una disposición similar al arreglo de las hojas “opuesto dístico”. Éste morfotipo llega a tener hasta ocho embriones viables.

Las semillas que tienen este morfotipo son principalmente medianas con forma ovoide y en pocos casos esferoides (IPGRI, 2000). Los frutos de los que provienen contienen en promedio siete semillas, cada una con cinco embriones como media; sus cotiledones son de color blanco verdoso; la chalaza, en la mitad de los casos es de color café y en la otra mitad rojiza (Cuadro 1).

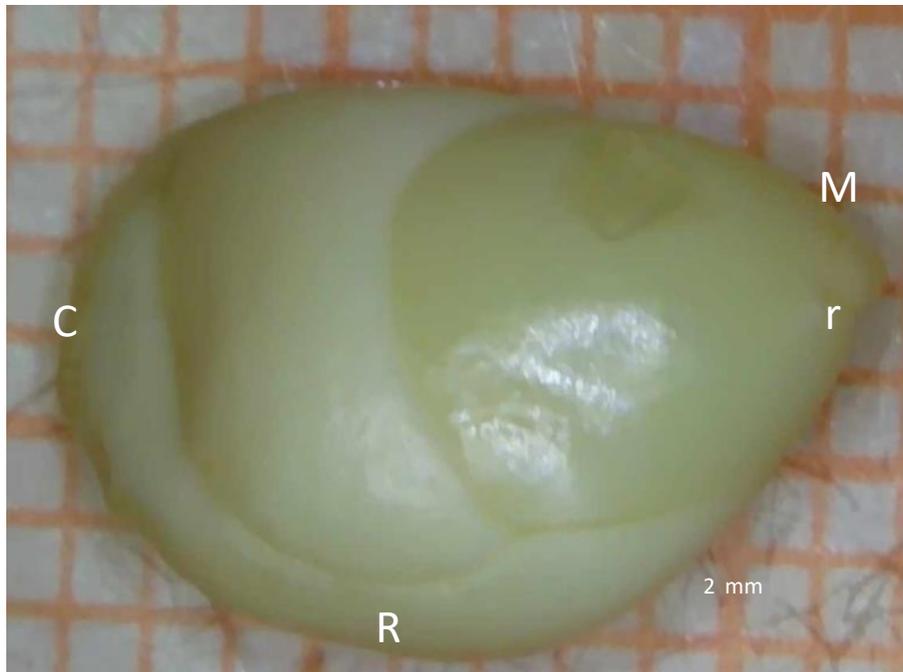


Figura 11. Morfotipo entrelazados. Se presentan varios embriones con los cotiledones entrelazados; la orientación es en relación con la chalaza (C), micrópilo (M) y rafe (R).

Origen genético

Para discriminar el origen parental, se evaluaron a nivel molecular cuatro series de embriones con este morfotipo (Cuadro 4). En total se analizaron las plántulas provenientes de 18 embriones. Se encontraron seis genotipos, el **27.7 %** de los embriones fueron distintos y **72.3 %** similares a la madre. En este caso, los individuos mostraron que los embriones más internos (en la zona donde se cruzan los tres planos de la semilla) y con tamaño mediano (con relación a los demás en la semilla) son distintos a la madre; presentaron cinco subgrupos que cuentan con diferencias ligeras entre sí; el individuo 7316 es el más alejado de la planta madre; el individuo 4323 es un genotipo con diferencias en otra zona del genoma en la que los demás individuos no difieren; los individuos 7314 y 7313 son más cercanos entre sí sin llegar a ser idénticos, con base en los alelos detectados en las seis posiciones del genoma (Figura 12).

Cuadro 4. Origen parental, tamaño y orientación de las plántulas derivadas de los embriones del morfotipo Entrelazados.

Individuo	Ubicación	Tamaño (mm)	Origen	Individuo	Ubicación	Tamaño (mm)	Origen
2231	C1 y M1 Anterior y posterior	9.0	S	4321	C1, C2, M1 Y M2 Posteriores	8.0	S
2232	M2 Anterior	3.0	S	4322	C1 Y M1 Anteriores	5.5	S
2233	C2 y M2 Anterior y posterior	10.0	S	4323	C2 Y M2 Anteriores	5.5	D
				7311	M1 Posterior	1.5	S
3541	M1 Anterior	1.5	::::	7312	M2 Posterior C1 y M1	2.0	S
3542	M2 Anterior	5.0	D	7313	Anteriores y Posteriores	6.0	D
3543	C1, C2, M1 Y M2 Posteriores	9.5	S	7314	M2 Anterior	2.0	D
3544	M2 Anterior	3.5	S	7315	C2 y M2 Anteriores y Posteriores	9.0	S
3545	C1, C2, M1 Y M2 Anteriores	9.0	D	7316	C1 Anterior	5.5	D

Chalaza 1 (C1); Chalaza 2 (C2); Micropilo 1 (M1); Micropilo 2 (M2); Distinto (D); Similar (S); Muerto (::::)

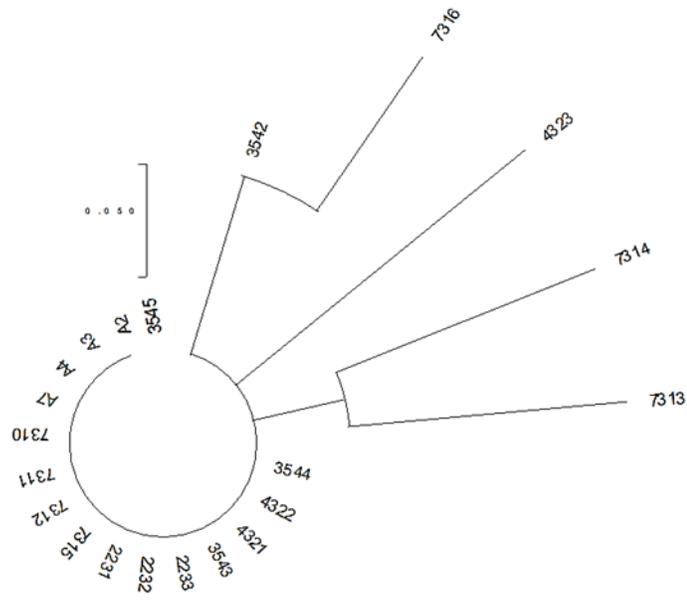


Figura 12. Dendrograma de similitud genética de las plántulas de los embriones del morfotipo Entrelazados.

Morfotipo Sencillo

Descripción morfológica

Este morfotipo se encontró en 12 semillas (**10 %**). La característica principal es que tiene un embrión que abarca alrededor del **98 %** del volumen de la semilla, éste cuenta con dos cotiledones opuestos, como regularmente se percibe en las semillas de las dicotiledóneas que no son poliembriónicas y en ocasiones se pueden observar uno o dos embriones viables, o en su defecto, rudimentos de embrión, estos se encuentran en los cuadrantes M1 y M2 muy cercanos a la zona del micrópilo; los rudimentos son menores a 1 mm de largo.

Las semillas que tienen este morfotipo son principalmente de medianas a grandes, en su mayoría con forma semi-deltaide y en algunos casos ovoide (IPGRI, 2000), los

frutos de los que provienen tienen cinco semillas en promedio y cada una con dos embriones como media, los cotiledones son blancos y chalaza café (Cuadro 1).

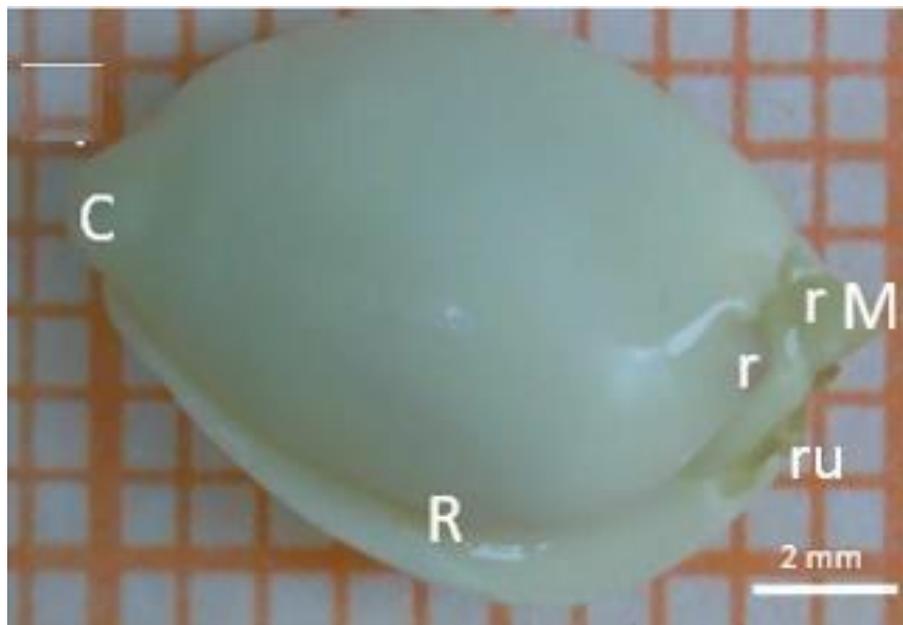


Figura 13. Morfotipo Sencillo. Se presenta un embrión grande en todo el volumen de la semilla y rudimentos (ru) en la zona del micrópilo; la orientación es en relación con la chalaza (C), micrópilo (M) y rafe (R).

Morfotipo Micropildistante

Descripción morfológica

Este morfotipo se encontró en cuatro semillas (**3.33 %**). La principal característica son los embriones entrelazados y de tamaños similares, la mayoría con la radícula cercana al micrópilo (cuadrantes M1 y M2), sin embargo, uno o dos embriones tienen la radícula alejada del micrópilo (cuadrante C2), todas las radículas se encuentran conectadas al rafe; este morfotipo llega a tener hasta seis embriones viables.

Las semillas con este morfotipo son grandes y con forma ovoide (IPGRI, 2000). Los frutos de los que provienen tienen cinco semillas en promedio y cada una con cinco

embriones como media. Los embriones son de color blanco verdoso o blanco amarillento; la chalaza es de color café (Cuadro 1).

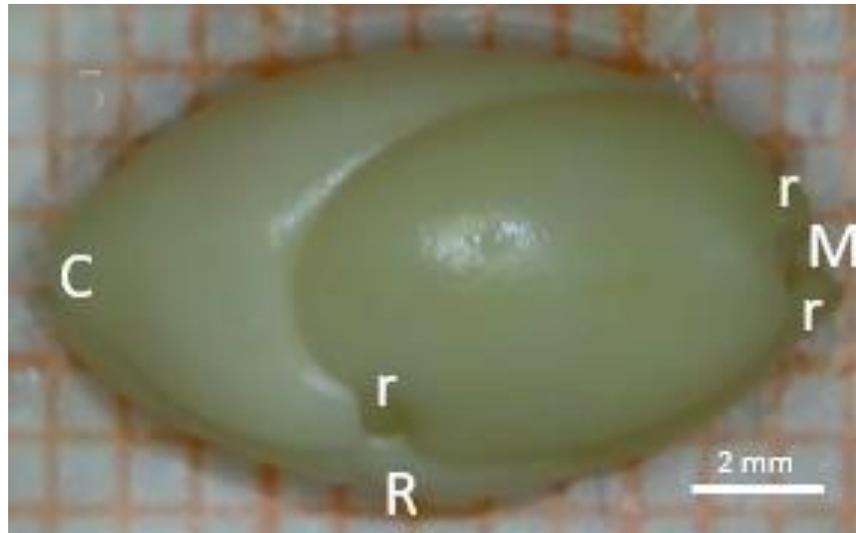


Figura 14. Morfotipo micropildistante. Se presentan los embriones entrelazados con al menos una radícula alejada del micrópilo y unida al rafe; la orientación es en relación con la chalaza (C), micrópilo (M) y rafe (R).

Origen genético

Para discriminar el origen parental, se evaluaron a nivel molecular tres series de embriones con este morfotipo (Cuadro 5). En total se analizaron 12 plántulas. Se encontraron ocho genotipos, es el único caso donde el **100 %** de embriones fueron distintos a la madre. Dos genotipos resaltan por contar con varios integrantes con distinta procedencia; uno de estos genotipos contiene a cinco individuos, donde tres individuos provenientes de la misma semilla son similares entre sí (1321, 1322 y 1323), sin embargo, son distintos a la planta madre; en otro genotipo a dos individuos procedentes de la misma semilla (8423 y 8425) son distintos a la planta madre y similares entre sí (Figura 15).

Cuadro 5. Origen parental, tamaño y orientación de las plántulas derivadas de los embriones del morfotipo Micropildistante.

Individuo	Ubicación	Tamaño (mm)	Origen	Individuo	Ubicación	Tamaño (mm)	Origen
1321	M1 Anterior y Posterior	5.5	D	8421	M1 Anterior	1.0	D
1322	M2 Anterior y Posterior	5.5	D	8422	M1 Anterior	1.5	D
1323	C1, C2 y M2 Anteriores y Posteriores	7.0	D	8423	C1 y M1 Anteriores	8.5	D
2141	M2 Anterior	4.0	D	8424	C1, C2, M1 y M2 Posteriores	10.0	D
2142	C1 Y M1 Anteriores y Posteriores	9.5	D	8425	C2 Anterior	4.0	D
2143	C1 Y M1 Anteriores	9.5	:::				D

Chalaza 1 (C1); Chalaza 2 (C2); Micropilo 1 (M1); Micropilo 2 (M2); Distinto (D); Similar (S); Muerto (:::)

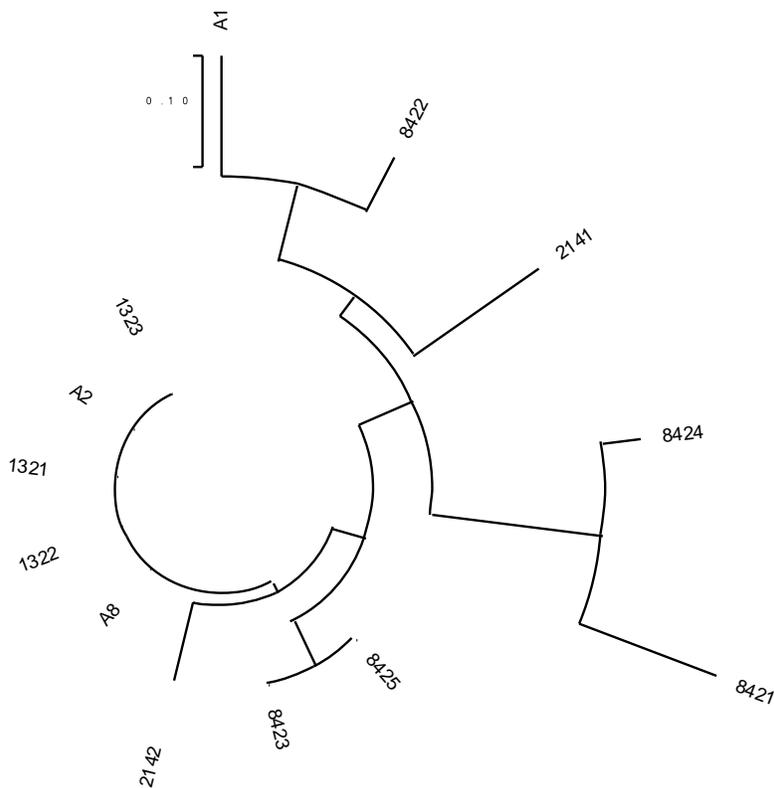


Figura 15. Dendrograma de **similitud genética** de las plántulas de los embriones del morfotipo Micropildistante.

Morfotipo Base-Entrelazados

Descripción morfológica

Este morfotipo se encontró en 36 semillas (**33.33 %**), es el morfotipo más frecuente, seguido del morfotipo embriones base; sus rasgos principales son que cuenta con características del morfotipo embriones base y del morfotipo entrelazados. Como en el morfotipo **Embriones base** presenta varios embriones en la base (cuadrantes M1 y M2) y como en morfotipo **Entrelazados**, cuenta con embriones entrelazados en todos los cuadrantes, los embriones de la base siempre se encuentran más cercanos al micrópilo

que los embriones entrelazados; este morfotipo es el que cuenta con mayor cantidad de embriones viables, hasta 12 embriones.

Las semillas con este morfotipo son principalmente medianas, de forma ovoide (IPGRI, 2000); los frutos de donde se originan tienen seis semillas en promedio y ocho embriones como media; los cotiledones son color blanco verdoso o de color crema; la chalaza es normalmente rojiza y en algunos casos es café (Cuadro 1).

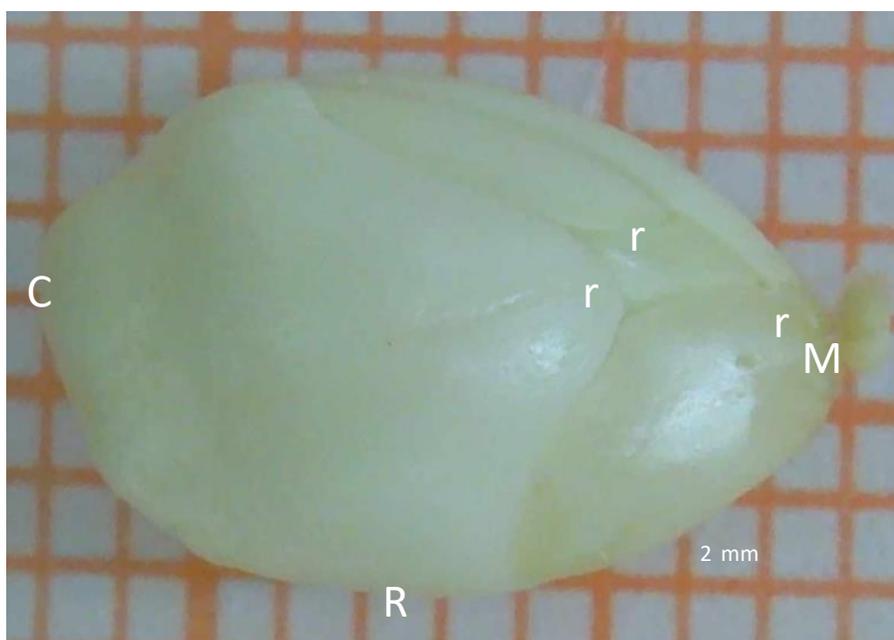


Figura 16. Morfotipo Base- Entrelazados. Morfotipo Dos Grupos. Se presentan los dos conjuntos de embriones; uno con embriones entrelazados y otro con embriones en la base; la orientación es en relación con la chalaza (C), micrópilo (M) y rafe (R).

Origen genético

Para discriminar el origen parental, se evaluaron a nivel molecular ocho series de embriones con este morfotipo (Cuadro 6). En total se analizaron 52 plántulas. Se encontraron 10 genotipos, el **20.6 %** de embriones fueron distintos a la madre y **79.4 %** similares. Las plantas obtenidas de los embriones más pequeños en la zona de la base

son distintos a la madre; además, en la zona de los embriones entrelazados, los más grandes y próximos al tegumento interno también son distintos a la madre. Cuatro de los genotipos distintos a la planta madre mostraron más de un individuo, como lo es en el caso de 8516 con 8223, en 8326 con 8313, en 8314 con 8312 y en 8511 con 4211; el individuo más alejado de la planta madre es el 5411, con base en los alelos detectados en las seis posiciones del genoma (Figura 17).

Cuadro 6. Origen parental, tamaño y orientación de las plántulas derivadas de los embriones del morfotipo Base -Entrelazados.

Individuo	Ubicación	Tamaño (mm)	Origen	Individuo	Ubicación	Tamaño (mm)	Origen
2121	M2 Anterior	2.0	::::	8313	M1 Anterior	2.5	D
2122	M2 Anterior	2.0	::::	8314	M1 Anterior	3.0	D
2123	M2 Posterior	2.5	::::	8315	M1 Anterior	4.5	S
2124	M2 Posterior	3.0	S	8316	M1 Anterior	1	::::
2125	M1 Anterior y Posterior	3.5	S	8317	C1, C2, M1 y M2 Anteriores	8.0	S
2126	M1 y M2 Anterior y Posterior	7.5	S	8318	C1, C2, M1 y M2 Anteriores	9.0	S
2127	C1, C2, M1 y M2 Anterior y Posterior	9.0	S	8319	C1, C2, M1 y M2 Posteriores	9.0	S
4211	M1 Anterior	2.0	D	831-10	C1, C2, M1 y M2 Posteriores	6.5	S
4212	M2 Posterior	4.0	::::	8511	M2 Anterior	3.0	D
4213	M1 Anterior	2.5	S	8512	M2 Anterior	3.0	S
4214	C1, C2, M1 y M2 Anterior	8.0	S	8513	M2 Posterior	1.5	::::
4215	M2 Posterior	5.5	S	8514	M2 Anterior	2.5	S
4216	C1, C2, M1 y M2 Posterior	9.0	S	8515	C1 y M1 Anterior	5.0	D
5111	M1 Posterior	3.5	::::	8516	C1 y M1 Posterior	5.0	D
5112	C1 y M1 Anteriores y Posteriores	6.5	S	8517	C2 y M2 Anteriores Posteriores	8.0	::::
5113	C1, C2, M1 y M2 Anteriores	8.5	S	8221	M1 Y M2 Anteriores	3.0	S

Individuo	Ubicación	Tamaño (mm)	Origen	Individuo	Ubicación	Tamaño (mm)	Origen
5411	y Posterior M1 Anterior y Posterior	2.0	D	8222	M1 Posterior	1.0	::::
5412	M2 Anterior	2.5	D	8223	C1, C2, M1 Y M2	7.5	D
5413	M 2 Anterior	4.0	S	8224	Anteriores C1, C2, M1 Y M2	8.5	S
5414	M2 Anterior y Posterior	5.5	S	8321	Posterior M2	1.0	S
5415	M1 Posterior	3.0	S	8322	M2 Posterior	1.0	S
5416	C2 y M2 Anterior y Posterior	7.5	S	8323	M2 Posterior	1.0	S
5417	C1 y M1 Anterior y Posterior	7.5	S	8324	M1 Anterior	2.0	S
8310	M1 Anterior	1.0	::::	8325	M1 y M2 Anteriores	2.5	S
8311	M2 Posterior	3.0	D	8326	C1, C2, M1 Y M2	8.0	D
8312	M2 Posterior	2.0	D	8327	Posterior C1, C2, M1 Y M2	8.5	D
					Anteriores		

Chalaza 1 (C1); Chalaza 2 (C2); Micropilo 1 (M1); Micropilo 2 (M2); Distinto (D); Similar (S); Muerto (::::)

puede ser debido a que los tipos de apomixis presentados en los distintos morfotipos muestran tendencias en el comportamiento, como lo es en el caso de En y BE, donde sus embriones entrelazan los cotiledones, con la diferencia de que Base-Entrelazados muestra embriones pequeños en la base y Entrelazados no, por lo que muestran similitud pero no son idénticos en el comportamiento; en el caso del morfotipo DG, cada grupo puede estar presentando un tipo de apomixis, lo que hace que pueda tener embriones entrelazados en un grupo y uno sencillo en otro, o también Embriones en la Base o Base-Entrelazados, por lo que se puede dar explicación a que en el dendrograma se posicione en el centro; los morfotipos EB y M muestran cercanía en el comportamiento, esto puede ser debido a que cuentan con individuos que son similares entre sí pero distintos a la madre, sin embargo, Micropildistante se separa de los demás por tener la totalidad de sus embriones distintos a la planta madre.

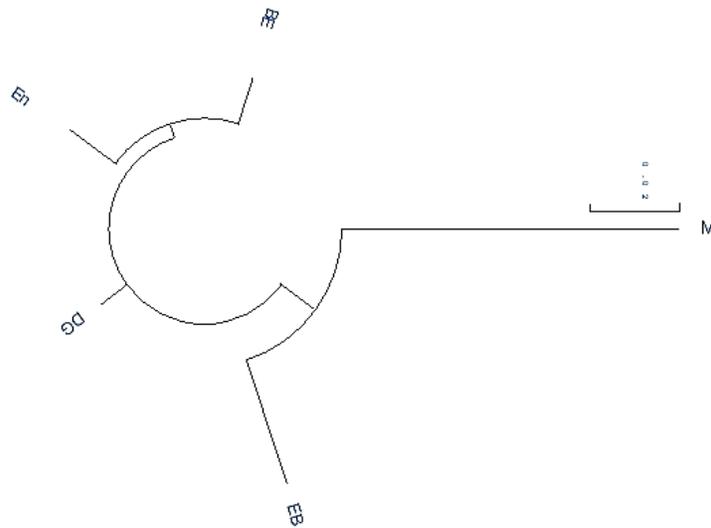


Figura 18. Frecuencia de alelos compartidos entre los morfotipos.

Variación e identidad genética

Los productos de PCR fueron examinados por medio de PAGE, como se muestra en la Figura 19. Los resultados obtenidos de los diferentes primers en todos los individuos se muestran en el cuadro 20 (Anexo A6), de color verde los individuos similares a la planta madre y en naranja los individuos diferentes, éstos se separan por el tipo de morfotipo.

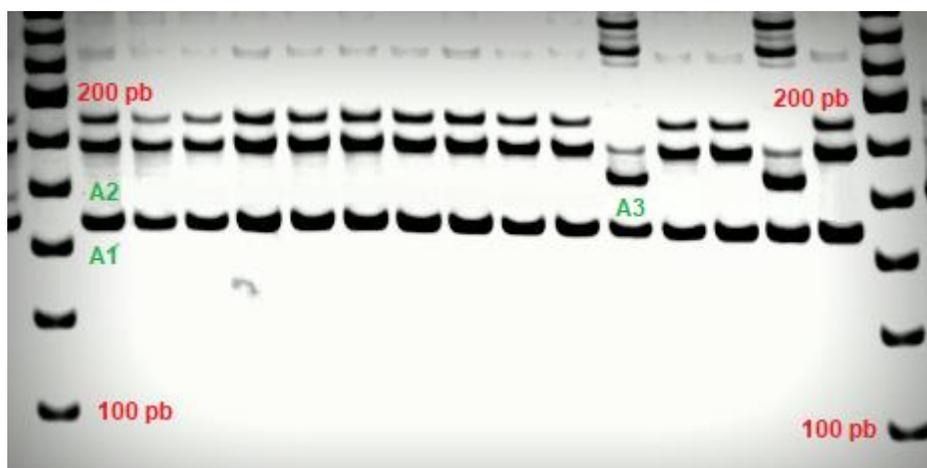


Figura 19. Ejemplo de patrones de bandeo con el marcador GT03; Alelo 1 (A1); Alelo 2 (A2); Alelo 3 (A3).

Se encontró polimorfismo en seis de los 21 marcadores examinados. Estos marcadores tuvieron un PIC que osciló de 0.138 a 0.434, con promedio de 0.364, lo que indica un valor informativo. Derivado de ello, fue posible determinar que el intervalo de la frecuencia del alelo más común fue de 0.508 a 0.9211 con promedio de 0.593, lo que derivó en encontrar de tres a cuatro alelos por marcador y de tres a cinco genotipos entre los seis marcadores (Anexo A6).

La variación a nivel de las seis posiciones del genoma evaluadas, condujo a encontrar valores de heterocigosidad de 0.1579 a 0.9298 con promedio de 0.7822 y

diversidad genética de 0.1467 a 0.5397 con promedio de 0.4587. Esta diversidad se denotó entre los árboles madre, semillas y embriones y trascendió en la identidad genética como se describe a continuación.

En las distintas posiciones evaluadas con los seis marcadores se obtuvieron entre tres y cuatro alelos, en el caso de AG 14 se presentaron tres alelos y solamente tres genotipos de los nueve posibles; en TAA3 se presentaron tres alelos y solamente tres genotipos de los nueve posibles; para TAA 15 se presentaron cuatro alelos y solamente cinco genotipos de los 16 posibles; en TAA41 se presentaron cuatro alelos y solamente cinco genotipos de los 16 posibles; para GT03 se presentaron cuatro alelos y solamente cinco genotipos de los 16 posibles; y en el caso de CAC23 se presentaron tres alelos y solamente tres genotipos de los nueve posibles. La posición en el genoma con mayor valor de 0.4349 de PIC fue el TAA41 con un valor de heterocigosidad de 0.9298.

Árbol 1

Con tres plántulas descendientes de una semilla de un fruto, se encontró que todas las plántulas fueron diferentes entre sí con base en los alelos detectados en las seis posiciones del genoma, por lo que las plántulas no son genéticamente idénticas a la madre (Figura 20).

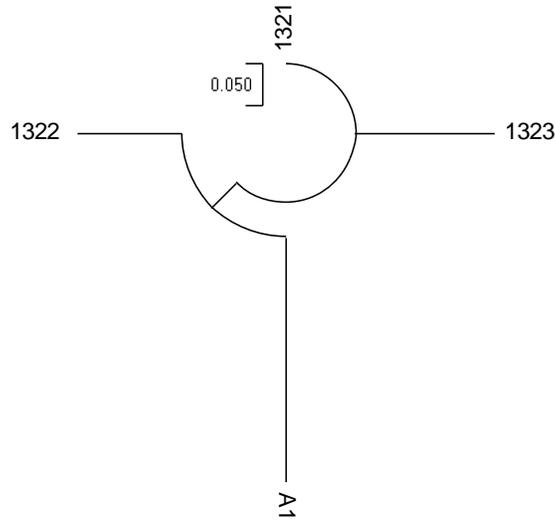


Figura 20. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 1 y la descendencia.

Árbol 2

Con ocho plántulas descendientes de tres semillas de dos frutos, se encontró que la mayoría de población fue similar a la madre, solamente dos individuos de la misma semilla presentaron diferencias a la madre y entre sí, con base en los alelos detectados en las seis posiciones del genoma (Figura 21).

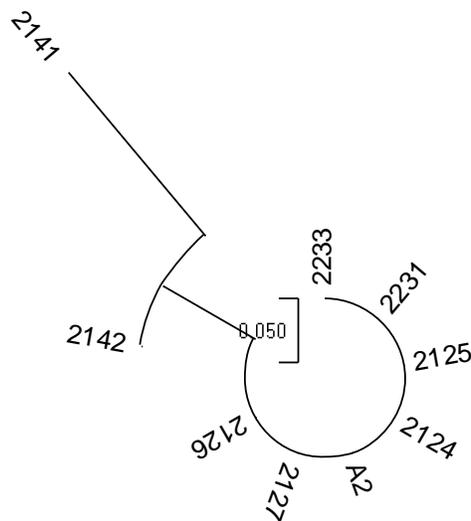


Figura 21. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 2 y la descendencia.

Árbol 3

Con 11 plántulas descendientes de dos semillas de un fruto, se encontró que la mayoría de población fue similar a la madre, y tres individuos de dos semillas presentaron diferencias a la madre con base en los alelos detectados en las seis posiciones del genoma, dos de ellos similares entre sí, pero de diferente semilla (3511 y 3542), el 3545 fue diferente al 3542 que provienen de la misma (Figura 22).

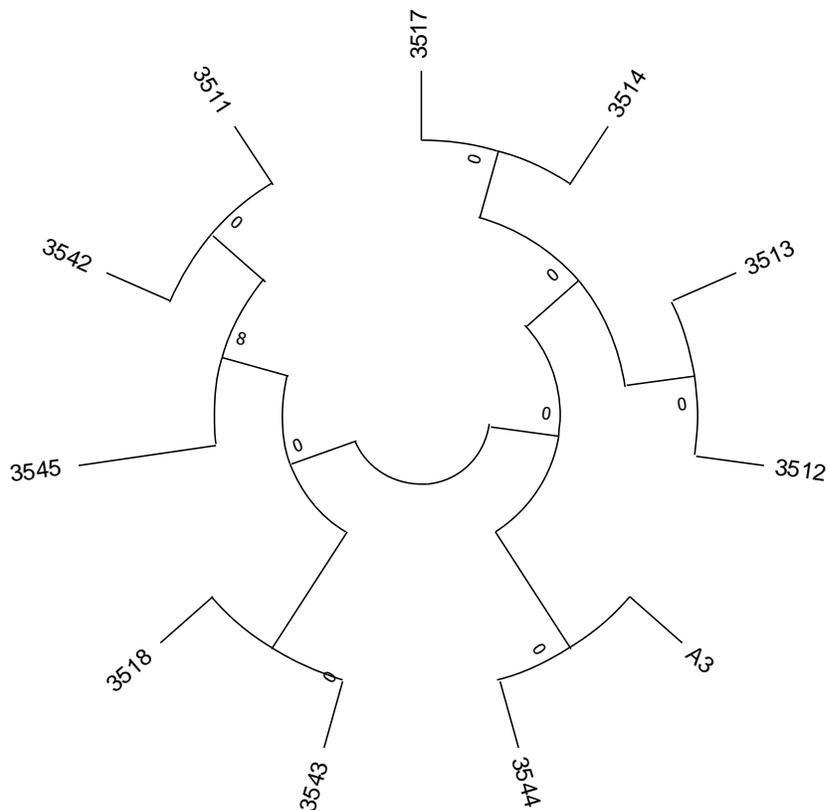


Figura 22. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 3 y la descendencia.

Árbol 4

Con 11 plántulas descendientes de tres semillas de dos frutos, se encontró que la mayoría de la población fue similar a la madre, y tres individuos de tres semillas presentaron diferencias a la madre y entre sí, con base en los alelos detectados en las

seis posiciones del genoma, por lo que las tres plántulas no son genéticamente idénticas a la madre y el origen difiere del de la madre (Figura 23).

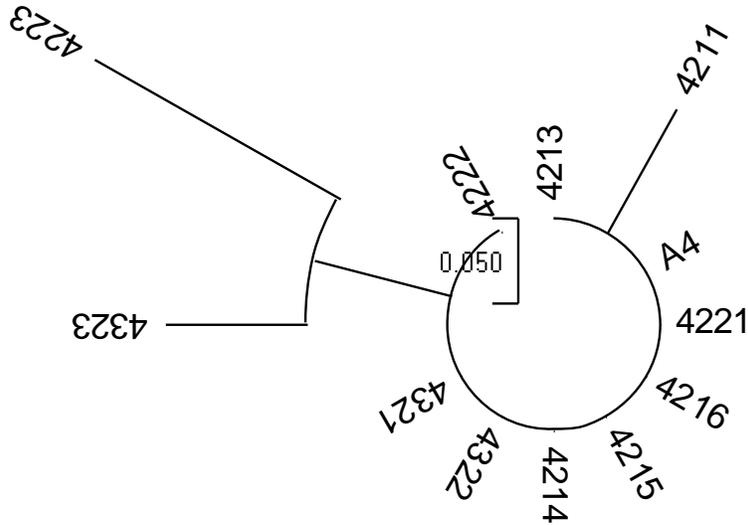


Figura 23. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 4 y la descendencia.

Árbol 5

Con 15 plántulas descendientes de tres semillas de tres frutos, se encontró que la mayoría de población fue similar a la madre, y tres individuos de tres semillas presentaron diferencias a la madre y entre sí, pero dos más cercanos de diferente semilla (5411 y 5212) con base en los alelos detectados en las seis posiciones del genoma (Figura 24).

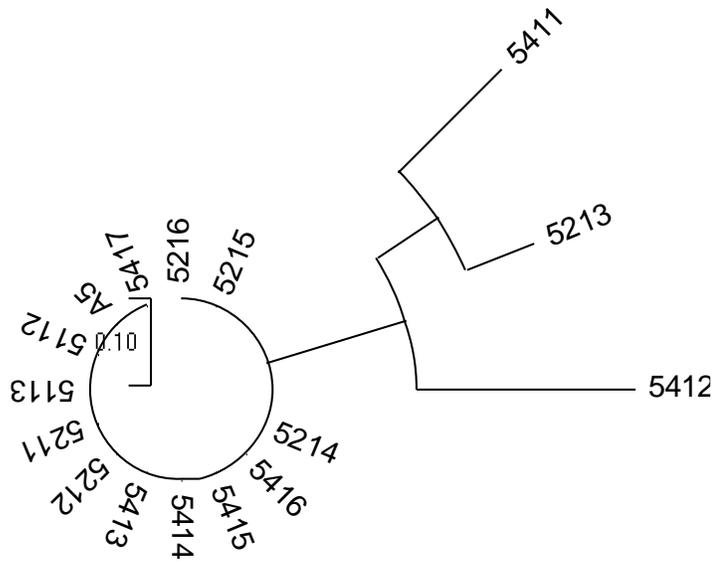


Figura 24. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 5 y la descendencia.

Árbol 6

Con 13 plántulas descendientes de dos semillas de dos frutos, se encontró que la mayoría de población fue similar a la madre, y tres individuos de dos semillas presentaron diferencias a la madre y entre sí, pero dos más cercanos de diferente semilla (6228 y 6115) con base en los alelos detectados en las seis posiciones del genoma, por lo que las tres plántulas no son genéticamente idénticas a la madre (Figura 25).

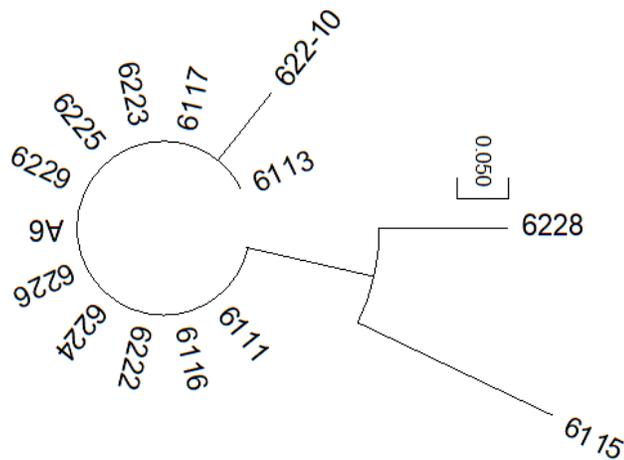


Figura 25. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 6 y la descendencia.

Árbol 7

Con 17 plántulas descendientes de tres semillas de tres frutos, se encontró que la mayoría de la población fue similar a la madre, ocho individuos de tres semillas (48 %) presentaron cuatro subgrupos que cuentan con diferencias ligeras entre sí, donde un genotipo resalta por sus diferencias con los demás (7316); con base en los alelos detectados en las seis posiciones del genoma, por lo que las ocho plántulas no son genéticamente idénticas a la madre (Figura 26).

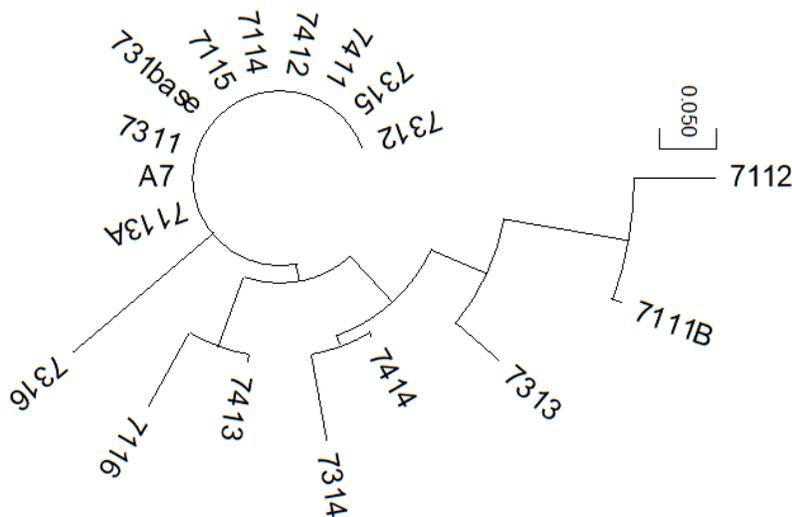


Figura 26. Frecuencia de alelos compartidos entre la planta madre 7 y la descendencia.

Árbol 8

Con 29 plántulas descendientes de cinco semillas de cuatro frutos, se encontró que el 51 % de la población fue similar a la madre, y el resto distinto (provenientes de cuatro semillas) estos individuos presentaron cinco subgrupos con diferencias entre sí, uno de los subgrupos presentó genotipos idénticos (8423 y 8424); a diferencia de los demás árboles, en este se presentaban más cercanos los individuos de una misma semilla que eran distintos a la madre; con base en los alelos detectados en las seis posiciones del

en 20 genotipos. Todo con base en los alelos detectados en las seis posiciones del genoma, por lo que las 35 plántulas no son genéticamente idénticas a la madre; se deduce que el origen difiere del de la madre (Figura 28).

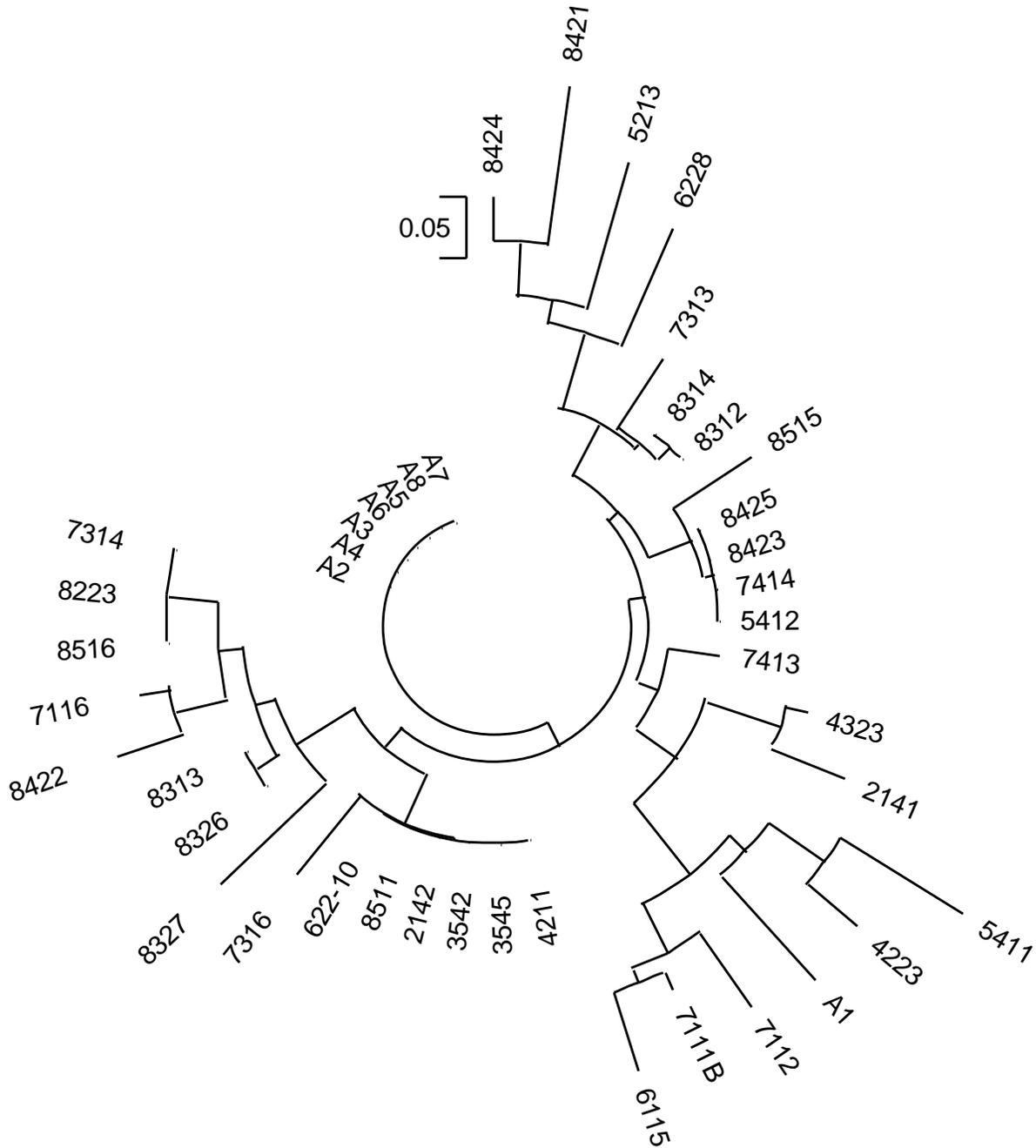


Figura 28. Frecuencia de alelos compartidos entre las plantas con recombinación genética y las plantas madre.

VI. DISCUSIÓN

En la actualidad se han realizado algunos trabajos de poliembrionía en cítricos donde se menciona que los distintos embriones producidos de manera cigótica o nucelar se pueden diferenciar de acuerdo con la posición en la semilla (Andrade *et al.* 2005), sin embargo, no se cuenta con la descripción específica del origen de los embriones en una semilla contrastando tanto análisis moleculares como caracterización morfológica, lo cual ayudaría a la propagación de variedades de interés provenientes de embriones nucleares capaces de generar plantas idénticas a la madre (USAID, 2007). Al identificar a los embriones nucleares se permite reproducir portainjertos que den homogeneidad del huerto, mantener las características deseadas por medio de clones que por la constante propagación vegetativa han perdido vigor, y obtener plantas con prueba negativa a virus, viroides, fitoplasmas y bacterias en programas de saneamiento y certificación (Villegas-Monter y Andrade-Rodriguez, 2008), esta información ayudaría a mejorar la calidad de planta que ofrecen los viveristas, y a su vez prosperar en el rendimiento y calidad de fruto.

Morfotipos propuestos

De acuerdo con los morfotipos detectados y nomenclatura propuesta en esta investigación, es posible que dependiendo del tipo de arreglo embrionario se presenten distintos tipos de poliembrionía. Por ejemplo, la embrionía adventicia podría generar un morfotipo como Embriones Base; en tanto que, la formación de varios sacos embrionarios podría dar origen al morfotipo Dos Grupos, como lo señala Kultonow (1993), que para cítricos se presenta la embrionía adventicia. Sin embargo, Koltunow y

Grossniklaus (2003), en un trabajo posterior mencionan que los cítricos pueden presentar dos tipos de poliembrionía: aposporia y embrionía adventicia; la caracterización de los morfotipos y del origen, contribuye a entender por qué se presentan distintos embriones en diferentes posiciones, tamaños y la relación existente con el genotipo.

El origen del morfotipo Dos Grupos podría tener relación con la formación de dos sacos embrionarios y por consecuencia presentar varios embriones en cada saco, sin embargo, no se tienen estudios aún sobre el tema. Como Bacchi (1943) menciona, los embriones gemelos se pueden formar en diferentes sacos embrionarios dentro de la misma semilla en *Citrus*. Por otro lado, Crane (2001) menciona que en algunos casos, los sacos embrionarios reducidos y no reducidos pueden coexistir en el mismo núcelo, y que la capacidad de formar múltiples sacos embrionarios en el mismo óvulo aumenta la frecuencia de la poliembrionía. Este hecho también es planteado por Koltunow y Grossniklaus (2003), quienes señalan que el inicio exitoso de la embriogénesis en sacos embrionarios derivados de ambas vías puede dar lugar a una semilla poliembrionaria; en consecuencia, se debe realizar un análisis de seguimiento de distintas semillas en distintas etapas del desarrollo dentro del fruto, sin embargo, esto se ve difícil, ya que los métodos utilizados actualmente son destructivos, se requeriría de algún equipo que permita el análisis de las semillas en desarrollo dentro del fruto sin dañarlo.

El morfotipo de Embriones Base, podría tener relación con la embrionía adventicia en la formación del embrión de mayor tamaño (Koltunow y Grossniklaus, 2003) y también por lo mencionado por Tisserat y Murashige (1979), quienes describen que la poliembrionía puede ser dada por la formación de embriones a partir de células de otros embriones (también llamada bipartición), de las sinérgidas y antípodas, células de la

nucela, de los tegumentos e incluso de las hojas; además Koltunow y Grossniklaus (2003), mencionan que la embrionía adventicia ocurre en una fase tardía del desarrollo del óvulo a partir de células del tegumento o de la nucela y que, por lo general, la supervivencia del embrión depende del éxito de la fecundación del saco embrionario adyacente derivado de la meiosis, y de la capacidad del embrión adventicio de crecer lo suficiente como para acceder al endospermo nutritivo.

Los embriones en el morfotipo entrelazado puede ser explicado por embrionía adventicia en la formación de embriones a partir de los tegumentos internos y externos, a partir de la nucela, sinérgidas, antípodas y ovocélula (Koltunow y Grossniklaus, 2003), lo que podría dar origen a varias capas de embriones, además, muestran disposición similar a la de las hojas en el tallo (opuestas dísticas), esto puede deberse a que se formen a partir de células de las hojas, como mencionan Tisserat y Murashige (1979); Johri *et al.* (1992) resaltan que en ambos casos podrían ser distintos a la madre en el embrión más próximo al micropilo y a su vez alejado del tegumento interno, y de origen apomíctico los más cercanos al tegumento interno; lo que se puede resaltar con los análisis moleculares contrastados con los morfotipos (descripción del morfotipo entrelazados).

Dentro del morfotipo Sencillo se pueden encontrar rudimentos de embriones que no alcanzan a formarse completamente, puede ser debido a falta de nutrientes al momento de la formación, como lo mencionan Johri *et al.* (1992), quienes indican que embriones cigóticos pueden o no sobrevivir, y que, si no se produce la fecundación, el embrión adventicio crece obteniendo nutrientes de las células nucelares y tegumentarias en degradación.

La formación del morfotipo Micropildistante puede deberse a la fecundación y desarrollo de embriones por células de las antípodas, y a la formación de una conexión con el rafe para la nutrición, ya que los óvulos antrópicos cuentan con rafe dorsal, micropilo y chalaza (Saxton y Péringuey, 2010); el rafe funge como vía de administración principal de nutrientes dentro de la semilla, y tiene la posibilidad de formar embriones tanto de las sinérgidas como de las antípodas (Johri *et al.*, 1992). Además, se presentan embriones similares entre sí, pero distintos a la madre, que también se presenta en embriones base, que puede ser explicado por la bipartición (Tisserat y Murashige, 1979). Este comportamiento ayuda a explicar cómo es posible que se presenten varios embriones distintos a la planta madre con tamaños similares, y la apomixis facultativa (Kepiro y Roose, 2007), podría explicar porque no se generan embriones de origen nucelar en el caso de este morfotipo, que tiene frecuencia de 3.33 % de los casos, lo que nos dice que Mandarino Ortanique tiene mayor tendencia a mantener el genotipo en la propagación por semilla.

La formación del morfotipo Base-Entrelazados puede tener relación con por embrionía adventicia en la formación de embriones a partir de los tegumentos internos y externos o a partir de la nucela (Koltunow y Grossniklaus, 2003), lo que puede formar embriones en la zona más cercana a la chalaza o en la zona más cercana al micropilo; esto también puede ser explicado por la fecundación o apomixis en las sinérgidas y antípodas (Batygina y Vinogradova, 2007)..

Es mencionado que múltiples embriones adventicios pueden desarrollarse de forma asincrónica dentro del mismo óvulo (Gustafsson, 1946), por lo que la competencia y empaquetamiento afectan la morfología al desarrollarse en el espacio reducido de la

semilla. Los embriones adventicios pueden dividirse en embriones nucelares y embriones tegumentarios, en función del lugar en donde se originen los embriones. Naumova (1993) menciona que la organización temprana de los embriones adventicios difiere en algunas características de los embriones cigóticos, es posible que la causa sea el espacio limitado y que el campo de tensión mecánica en la nucela difiere del saco embrionario, todo esto apoya la idea de que existan distintos morfotipos con tendencias en el origen genético de cada uno de sus embriones.

Se requiere del estudio de las distintas especies de cítricos para definir los morfotipos presentes e intentar detectar como se presenta la apomixis en cada caso, de igual forma se deben analizar en distintos ciclos de producción ya que las condiciones son diferentes, como sugieren Moreira *et al.* (1947), las muestras de estudio deben incluir semillas extraídas de frutos de diferentes árboles, dado que existe variación anual en el grado de poliembrionía lo que coincide con lo que reportan Andrade *et al.* (2003), considerando esto, se vuelve necesario estudiar muestras de los diferentes cultivos en distintas épocas de cosecha. La poliembrionía muestra variaciones entre épocas por lo que señalan Koltunow y Grossniklaus (2003), que los eventos apomícticos pueden ser facultativos, y que, dependiendo del tipo de apomixis, los eventos de reproducción sexual pueden ocurrir en el mismo óvulo o en diferentes óvulos de la misma planta apomíctica.

De los seis morfotipos evaluados, en el Micropildistante todas las plantas obtenidas de los embriones fueron diferentes a la madre y en los otros cinco el 72 % fueron iguales. Otro aspecto importante, exceptuando al morfotipo micropildistante, es que en los otros cinco morfotipos la mayoría de las plantas diferentes a la madre provenían de embriones

pequeños próximos al micrópilo (16.7 %) y en algunos de los embriones de mayor tamaño ubicados próximos a la chalaza (11.2 %).

Discusión de resultados del análisis genético molecular con base en morfotipos

Para el morfotipo Dos Grupos se presentan embriones distintos a la madre en ambos grupos, por lo que es posible que se muestre lo que mencionan Bacchi (1943), Crane (2001), Koltunow y Grossniklaus (2003), que se pueden presentar más de un saco embrionario y en cada uno existe la posibilidad de obtener embriones cigóticos o nucelares.

En el morfotipo Embriones Base, los embriones diferentes a la planta madre, se observaron en plantas generadas de los embriones más pequeños y próximos al micrópilo como distintos a la madre, lo que nos dice que se presenta lo mencionado por Koltunow y Grossniklaus (2003), que algunos embriones comienzan a desarrollarse previamente a la fecundación, por lo que cuentan con mayor tamaño y al momento de presentarse la demanda de nutrientes de los demás embriones (similares o distintos a la madre) no logran crecer como el ya existente. Al solo presentarse algunos embriones de la base distintos a la madre pero con orígenes diferentes entre sí, nos dice que es posible que exista heterofertilización (Maruyama *et al.*, 2013).

En el morfotipo Entrelazados las plantas diferentes a la madre se obtuvieron del embrión más alejado del tegumento interno, dejando al embrión fecundado rodeado por embriones nucelares, lo que se asemeja a lo mencionado por Tisserat y Murashige (1979), que los embriones pueden tener origen de células de hojas.

En el morfotipo micropildistante es posible que exista heterofertilización sin embriones nucleares. Se presentan embriones de tamaños similares, lo que nos dice que las fertilizaciones que se presentaron fueron en momentos no distantes, este tipo de morfotipo se puede utilizar para propagar plantas de cruza dirigidas.

En el morfotipo Base-Entrelazados, los embriones pequeños en la base son distintos a la planta madre, al igual que en el arreglo Embriones Base, además de los embriones más grandes y próximos al tegumento interno de los que se encuentran entrelazados a diferencia de los embriones en la base, los entrelazados se comportaron parecido al segundo grupo del morfotipo DG.

Discusión de la variación e identidad genética

Como se observó en este estudio, hubo variación en las seis posiciones del genoma de Mandarino Ortanique entre los árboles madre y los embriones examinados. Con este escenario, hubo casos donde se muestran individuos distintos a la madre, pero idénticos entre sí y que son de la misma semilla, donde es posible que se esté presentando bipartición, tal como indican Koltunow y Grossniklaus (2003).

Además, se llegaron a presentar diferencias con las demás plantas madre, a pesar de ser todos propagados de manera vegetativa, esto nos da indicios de la presencia de una posible mutación, como se muestra en el caso del Árbol 1 comparado con los otros siete.

En promedio, las plantas obtenidas de embriones con diferente morfotipo mostraron 39.9 % de embriones distintos a la madre, sin embargo, el rango de porcentajes fluctúa desde 20 % hasta 100 % de embriones distintos a la madre por árbol, lo que se puede

deber a lo mencionado por Uma-Shaanker (1997), que la poliembrionía puede variar a causa de la nutrición con la que la planta se desarrolla.

VII. CONCLUSIONES

- Se encontraron seis morfotipos en semillas de Mandarino Ortanique.
- Los embriones dentro de las semillas cuentan con tendencias distintas en el origen genético con base en el morfotipo, posición y tamaño.
- Puede existir más de un embrión distinto a la madre en una semilla.
- Se pueden obtener embriones similares a la madre con al menos 72 % de probabilidades.

VIII. RECOMENDACIONES

- Separar los embriones para la siembra, ya que es una práctica que beneficia la velocidad de germinación, además de mejorar la forma de la raíz y el vástago.
- Evaluar en otras especies.
- Para el análisis molecular se pueden realizar las extracciones de ADN directamente de cada embrión.
- Para la producción de semillas se deben tener plantas con manejo específico.

IX. LITERATURA CITADA

- Amar, M. H., Biswas, M. K., Zhang, Z., y Guo, W. (2011). Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of Citrus germplasm collection. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 220–227. doi:10.1016/j.scienta.2011.01.021
- Andrade-Rodriguez, M., y Villegas-Monter, A. (2003). Polyembryony and identification of zygotic seedlings in mandarin “Cleopatra” by PAPDs. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 255-263.
- Andrade-Rodriguez, M., Villegas-Monter, A., Guitierrez-Espinoza, M., Carrillo-Castañeda, G., y García-Velázquez, A. (2005). Polyembryony an RAPD markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in Citrus. *Agrociencia*, 39(4), 371-383. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30239402>
- Asker S. E., J. L. (1992). Apomixis in Plants. . *Routledge*.
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *AGRONOMÍA MESOAMERICANA*, 17(2), 221-242. doi:<https://doi.org/10.15517/am.v17i2.5163>
- Bacchi, O. (1943). Cytological observations in Citrus. III. Megasporogenesis fertilization an polyembryony. *Botanical Gazzete*, 105(2), 221-225. doi:10.1086/335210
- Batygina, T. B., y Vinogradova, G. Y. (2007). Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. *Russian Journal of Developmental Biology*, 38(3), 126-151. doi:DOI: 10.1134/S1062360407030022
- Batygina, T. B., Bragina, E. A., y Vasilyeva, V. E. (2003). The Reproductive System and Germination in Orchids. *Acta Biologica Cracoviensia: Series Botánica*, 45(2), 21-34.
- Bin, L., Cheng, L., Junrong, T., Yaxuan, X., Zhanghong, D., Bin, B., y Peiyao, X. (2022). Genetic diversity analysis of *Camellia fascicularis* H. T. Chang based on SSR markers. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 31, 1-7. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2022.100404>
- Biswas, M. K., Chai, L., Amar, M. H., Zhang, X., y Deng, X. (27 de July de 2011). Comparative analysis of genetic diversity in Citrus germplasm collection using AFLP, SSAP, SAMPL and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 129, 798-803. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.015>
- Carman, J. (1997). Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61(1), 51-94. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1997.tb01778.x>
- Chunxian, C., Bowman, K. D., Choi, Y. A., Dang, P. M., Rao, M. N., Huang, S., . . . Gmitter Jr., F. G. (2008). EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*.

Tree genetics y genomes, 4(1), 1-10. doi:<https://doi.org/10.1007/s11295-007-0083-3>

- CIMMYT. (2006). *Protocolos de Laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT*. CDMX: CIMMYT. Obtenido de <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/593/91224.PDF?sequence=4&isAllowed=y>
- CIMMYT, IRD, The European Commission. (2001). *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*. CDMX: CIMMYT. Obtenido de <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/588/74447.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Crane, C. F. (2001). *Classification of Apomictic Mechanisms* (Vol. 3). CDMX: CIMMYT.
- Fagerlnd, F. (1944). De Samenbildung und die Zytologie bei agamospermischen und sexuellen Arten von *Elatostema* und einigen nahestehenden Gattungen nebst Beleuchtung einiger damit zusammenhangender Probleme. *K Sweb vetenskapsakad Handl.*
- Faith, D. P. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, 61(1), 1-10. doi:10.1016/0006-3207(92)91201-3
- FAO y INTA. (2003). *Manual Para la Preparación y Venta de Frutas y Hortalizas*. (FAO, Ed.) Roma, Italia. Obtenido de <https://www.fao.org/3/y4893s/y4893s06.htm>
- FAO. (2004). *Perspectivas a Plazo Medio de los Productos Básicos Agrícolas*. Rome: FAO. Obtenido de <https://www.fao.org/3/y5143s/y5143s00.htm#Contents>
- FAO. (2010). Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. En FAO, *La Situación de los Recursos Zoogenéticos Mundiales Para La Alimentación y la Agricultura* (págs. 393-416). Roma: ONUAA. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a1250s/a1250s17.pdf>
- Duarte, FEV de O., Barros, D. dos R., Girardi, EA, Soares Filho, W. dos S., y Passos, OS (2013). Poliembrionía y atributos morfológicos de semillas de portainjertos de cítricos. *Revista Brasileña de Fruticultura*, 35(1), 246–254. doi:10.1590/s0100-29452013000100028
- Gao, S., Martinez, C., Skinner, D. J., F., K. A., Crouch, J. H., y Xu, Y. (2008). Development of a seed DNA-based genotyping system for marker-assisted selection in maize. 22(1), 477-494. doi:10.1007/s11032-008-9192-4
- Gonzalez, A. M. (2010). Estudios anatómicos en los generos *Priquetia* y *turnera* (Turneraceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 45(3-4).
- Gustafsson, A. (1946). Apomixis in Higher Plants. *Lunds. Univ. Arsskr.*
- Haberlandt, G. (1925). Embryologie and Cytologie von *Allium ordum*. *Ber. Deui. Boi. Ges*, 559-564.

- Hand, M. L., y Koltunow, A. M. (2014). The genetic control of apomixis: asexual seed formation. *Genetics*, 197(2), 441-450. doi:10.1534/genetics.114.163105
- Hernández-Villarreal, A. E. (2013). Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. *Revista Bio Ciencias*, 2(3), 113-118. Obtenido de <http://revistabiociencias.uan.edu.mx/index.php/BIOCIENCIAS/article/view/41/133>
- INAFED. (25 de noviembre de 2021). *INAFED*. Obtenido de Cazonas de Herrera: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM30veracruz/municipios/30033a.html4>
- INEGI. (2010). *Compendio de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Veracruz de Ignacio de la Llave*. Veracruz de Ignacio de la Llave: INEGI.
- IPGRI. (2000). *Descriptores para los cítricos. Citrus spp.* Roma: Internacional de Recursos Fitogenéticos. Obtenido de https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user_upload/Descriptores_para_los_citricos__Citrus_539.pdf
- Johri, B., Ambegookar, K., y Srivostra, P. (1992). *Comparative Embryology of Angiosperms*. Berlin: Springer. doi:<https://doi.org/10.1007/978-3-642-76395-3>
- Kepiro, J., y Roose, M. (2007). Nucellar embryony. *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*, 141-149.
- Kijas, J. M., Thomas, M. R., Fowler, J. C., y Roose, M. L. (1997). Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *Theor Appl Genet*, 94(1), 701-706.
- Kishore, K., Monika, N., Rinchen, D., Boniface, L., y Brijesh, P. (2012). Polyembryony and seedling emergence traits in apomictic citrus. *Scientia Horticulturae*, 138, 101-107. doi:10.1016/j.scienta.2012.01.035
- Koltunow, A. M. (octubre de 1993). Embryo Sacs and Embryos Formed Without Meiosis or Fertilization in Ovules. *The Plant Cell*, 5(10), 1425-1437. doi:10.1105/tpc.5.10.1425
- Koltunow, A. M., Hidaka, T., y Robinson, S. P. (1996). Polyembryony in Citrus (Accumulation of Seed Storage Proteins in Seeds and in Embryos Cultured in Vitro). *Plant Physiol*, 110(2), 599-609. doi:10.1104/pp.110.2.599
- Koltunow, A., y Grossniklaus, U. (2003). APOMIXIS: A Developmental Perspective. *Plant Biology*, 54(1), 547-574. doi:doi:10.1146/annurev.arplant.54.110901.160842
- Kozlowski, T. T. (1972). *Seed Biology*. Madison, Wisconsin: Academic Press. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-124-24301-9.X5001-3>
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics

- analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Maheshwari, P., y R.C., S. (1963). Polyembryony in recent advances in the Embryology of Angiosperms. *International Society of Plant Morphology*, 265-296.
- Martínez-Ochoa, E. d., Villegas-Monter A., V.-V. I., Alarcón-Zúñiga, B., y González-Hernández, V. A. (2022). Polyembryony in citrus: does the largest embryo in the seed develop a nucellar seedling? *Scientia Agricola*, 79(6), 1-7. doi:<http://doi.org/10.1590/1678-992X-2020-0060>
- Maruyama, D., Hamamura, Y., Takeuchi, H., Susaki, D., Nishimaki, M., Kurihara, D., y Higashiyama, T. (2013). Independent Control by Each Female Gamete Prevents the Attraction of Multiple Pollen Tubes. *Developmental Cell*, 25(3), 317-323. doi:<doi.org/10.1016/j.devcel.2013.03.013>
- Maya, C. J. 2017. “Cítricos mexicanos en el mercado japonés: experiencias y oportunidades para Sinaloa”. México y la cuenca del pacífico. Vol. 6, no. 16, enero-abril, pp. 107-142. <https://doi.org/10.32870/mycp.v6i16.523>
- Mendes-Rodrigues, C., Sampaio, D. S., Costa, M. E., de Souza Caetano, A. P., Ranal, M. A., Júnior, N. S., y Oliveira, P. E. (2012). Polyembryony increases embryo and seedling mortality but also enhances seed individual survival in *Handroanthus* species (Bignoniaceae). *Flora - Morphology, distribution, Functional Ecology of Plants*, 207(4), 264-274. doi:10.1016/j.flora.2011.10.008
- Moore, S., L.L., S., y King, T. (1991). The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10, 654-660. doi:[https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90448-N](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90448-N)
- Moreira, S., Gurgel, J. T., y F., d. A.-L. (1947). Poliembrionia em citrus. *Bragantia*, 7(3).
- Nadeem, Muhammad Azhar, Nawaz, Muhammad Amjad, Muhammad Qasim Shahid, Yıldız Doğan, Gonul Comertpay, Mehtap Yıldız, Rüştü Hatipoğlu, Fiaz Ahmad, Ahmad Alsaleh, Nitin Labhane, Hakan Özkan, Gyuhwa Chung y Faheem Shehzad Baloch (2018) DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing, *Biotechnology y Biotechnological Equipment*, 32:2, 261-285, DOI: 10.1080/13102818.2017.1400401
- Naumova, T. (1993). Apomixis in Angiosperms: Nucelar and Integumenrary Embryony. *CRC Press*.
- Ortiz, J., Aguinagalde, I., y Martín., J. (2000.). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. *UVP*, 515-560.

- Perissé, P. (Septiembre de 2002). SEMILLAS Un Punto de Vista Agronómico. (CyTA, Ed.) Córdoba, Argentina. Obtenido de <http://www.cyta.com.ar/semilla/tabladecontenido.htm>
- Rao, Nageswara, M., Soneji, J., Chen, C., Huang, S., y Gmitter, F. (Enero de 2007). Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange like citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. *Tree Genetics y Genomes*, 4(1), 113-124. doi:<https://doi.org/10.1007/s11295-007-0092-2>
- Sailer, C., Schmid, B., y Grossniklaus, U. (2016). Apomixis allows the transgenerational fixation of phenotypes in hybrid plants. *Curr. Biol*, 26 , 331–337. doi: 10.1016/j.cub.2015.12.045
- Samarina, L. S.-V. (2021). Genetic diversity and phylogenetic relationships among citrus germplasm in the Western Caucasus assessed with SSR and organelle DNA markers. *Scientia Horticulturae*, 288, 1-12. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110355>
- Sánchez-Damas, J. J., Avitia-García, E., Castillo-González, A., Villegas-Monter, A., y Corona-Torres, T. (2006). Estudio Anatómico de la Poliembriónía en Tres Portainjertos de Cítricos. (UACH, Ed.) *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2), 145-152. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/609/60912203.pdf>
- Saxton, W., y Péringuey, L. (Marzo de 1910). THE OVULE OF THE BRUNIACEÆ. *Transactions of the Royal Society of South Africa*, 27-32. Obtenido de <https://archive.org/details/biostor-167235/mode/2up?view=theater>
- Sedgley, M., y Griffin, A. (1989). Sexual Reproduction of Tree Crops. *Academic Press Inc.* , 378.
- Tisserat, B., Esan, E. B., y Murashige, T. (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. *Horticultural Reviews*, 1-78. doi:10.1002/9781118060742.ch1
- Trapero, C., Barranco, D., Martín, A., y Díez, C. M. (2014). Occurrence and variability of sexual polyembryony in olive cultivars. *Scientia Horticulturae*, 177, 43–46. doi:10.1016/j.scienta.2014.07.015
- Uma Shaanker, R. G. (1997). Conflict between parent and offspring in plants: predictions, processes and evolutionary consequences. *Current Science*, 72(1), 932–939. <https://www.jstor.org/stable/24099995>. Obtenido de <https://www.jstor.org/stable/24099995>
- UNN. (2013). *Morfología de Plantas Vasculares*. Obtenido de Flor: http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema4/4_12ovulo.htm
- USAID. (2007). *MANUAL PARA LA PRODUCCIÓN DE MANGO*. La Lima: USAID-RED. Obtenido de http://www.agrolalibertad.gob.pe/sites/default/files/Manual_Producc_Mango.pdf

- van-Leeuwenhoek, A. (1719). *Epistolae Physiologicae (Physiological Letters)*, Letters I - XLVI.
- Villegas-Monter, A., y Andrade-Rodríguez, M. (2005). Secado y almacenamiento de semillas de mandarina 'Cleopatra'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(1), 79-85. Obtenido de [https://www.scielo.br/j/pab/a/3bfFkd4GLKPQtw7SKHxKbbC/?format=pdfylang=es#:~:text=\(2002\) %20señalan %20que %20mandarino %20,23 %25 %20a %20los %2060 %20días](https://www.scielo.br/j/pab/a/3bfFkd4GLKPQtw7SKHxKbbC/?format=pdfylang=es#:~:text=(2002)%20señalan%20que%20mandarino%20,23%25%20a%20los%2060%20días).
- Villegas-Monter, A., y Andrade-Rodríguez, M. (2008). Poliembrionia, ventajas y oportunidades para la propagación vegetativa. *Enfoques Tecnológicos en la Fruticultura*, 149-167.
- Xiang, C., y Roose, M. L. (1988). Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in 12 citrus rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 37(1-2), 47-59. doi:10.1016/0304-4238(88)90150-1
- Yildiz, E., Klaplankiran, M., Demirköser, T. H., y Uzun, A. a. (2013). Identification of zygotic and nucellar individuals produced from several Citrus crosses using SSRs markers. *Notulae Bot. Hort. Agrobot.*, 41(2), 478-484.

ANEXOS

Anexo A1. Protocolos de extracción de ADN

Cuadro 7. Protocolo de extracción de ADN de hojas de Mandarino Ortanique.

Paso	Descripción
1	Preparación de CTAB 1. Pre-CTAB12mL 2. CTAB240 mg 3. Betamercaptoetanol 2 %...240 µL
2	Calentar a 70°C el pre-CTAB
3	Agregar el CTAB. Disolver en vortex. Una vez disuelto el CTAB, adicionar el Betamercaptoetanol, mezclar hasta disolver
4	Agregar un mL de esta solución a la muestra previamente molida
5	Incubar a 65 °C durante 90 min
6	Centrifugar a 11,500 rpm por 10 min
7	Transferir el sobrenadante a microtubos nuevos
8	Agregar la misma cantidad de cloroformo isoamílico (24:1) que el sobrenadante transferido
9	Centrifugar a 11,500 rpm por 10 min
10	Transferir el sobrenadante a microtubos nuevos
11	Precipitar con ½ del volumen del sobrenadante transferido con isopropanol absoluto frío.
12	Centrifugar a 11,500 rpm por 10 min
13	Incubar a -75°C (ultracongelador) durante 5 min
14	Incubar a -20°C (ultracongelador) durante 1 hrs
15	Centrifugar a 11,500 rpm por 5 min
16	Desechar isopropanol
17	Lavar pastilla con 1 mL etanol al 70 % (2 lavados)
18	Centrifugar a 8,500 rpm por 5 min
19	Lavar pastilla con 1 mL etanol al 70 %
20	Centrifugar a 8,500 rpm por 5 min
21	Dejar secar a 30°C durante 12-15 minutos, hasta secar la pastilla
22	Resuspender muestra en 70 µL TE de pH 8.0

Cuadro 8. Protocolo de extracción de ADN proveniente de embriones y endospermo de Mandarino Ortanique.

Paso	Descripción																																										
1	Separación de los embriones, registrando el origen anatómico																																										
2	Registrar el peso de cada uno de los embriones para definir las proporciones (20 mg = 100 %)																																										
3	Moler a temperatura ambiente dentro de un tubo de 1.5 ml hasta obtener un polvo fino con un pistilo plástico esterilizado.																																										
CTAB-lauril sarcosyl buffer¹ to isolate DNA of seeds using microtubes of 1.1 ml																																											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>SOL. CONC.</th> <th>[FINAL]</th> <th>25 rxn 10 ml</th> <th>250 rxn 100 ml</th> <th>500 rxn 200 ml</th> <th>750 rxn 300 ml</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>dH2O</td> <td></td> <td>5.6 ml</td> <td>56.0 ml</td> <td>112.0 ml</td> <td>168.0 ml</td> </tr> <tr> <td>1 M Tris-7.5</td> <td>100 mM</td> <td>1.0 ml</td> <td>10.0 ml</td> <td>20.0 ml</td> <td>30.0 ml</td> </tr> <tr> <td>5 M NaCl</td> <td>700 mM</td> <td>1.4 ml</td> <td>14.0 ml</td> <td>28.0 ml</td> <td>42.0 ml</td> </tr> <tr> <td>0.5 M EDTA-8.0</td> <td>50 mM</td> <td>1.0 ml</td> <td>10.0 ml</td> <td>20.0 ml</td> <td>30.0 ml</td> </tr> <tr> <td>CTAB</td> <td>1 %</td> <td>0.1 gr</td> <td>1.0 gr</td> <td>2.0 gr</td> <td>3.0 gr</td> </tr> <tr> <td>10% Sarcosyl²</td> <td>1 %</td> <td>1.0 ml</td> <td>10.0 ml</td> <td>20.0 ml</td> <td>30.0 ml</td> </tr> </tbody> </table>		SOL. CONC.	[FINAL]	25 rxn 10 ml	250 rxn 100 ml	500 rxn 200 ml	750 rxn 300 ml	dH2O		5.6 ml	56.0 ml	112.0 ml	168.0 ml	1 M Tris-7.5	100 mM	1.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	30.0 ml	5 M NaCl	700 mM	1.4 ml	14.0 ml	28.0 ml	42.0 ml	0.5 M EDTA-8.0	50 mM	1.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	30.0 ml	CTAB	1 %	0.1 gr	1.0 gr	2.0 gr	3.0 gr	10% Sarcosyl ²	1 %	1.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	30.0 ml
SOL. CONC.	[FINAL]	25 rxn 10 ml	250 rxn 100 ml	500 rxn 200 ml	750 rxn 300 ml																																						
dH2O		5.6 ml	56.0 ml	112.0 ml	168.0 ml																																						
1 M Tris-7.5	100 mM	1.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	30.0 ml																																						
5 M NaCl	700 mM	1.4 ml	14.0 ml	28.0 ml	42.0 ml																																						
0.5 M EDTA-8.0	50 mM	1.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	30.0 ml																																						
CTAB	1 %	0.1 gr	1.0 gr	2.0 gr	3.0 gr																																						
10% Sarcosyl ²	1 %	1.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	30.0 ml																																						
<p>¹ Use a fresh buffer every time. Before adding CTAB (Sigma M-7635) and lauril sarcosyl (Sigma L5125), heat the buffer until 65 °C. You can prepare the buffer one day before to DNA isolation, but do add neither CTAB nor sarcosyl.</p> <p>² Take the phenol (Sigma P4557) without touching the Tris layer. Mix it vigorously with the chloroform (Baker 9180) before add to the samples. Do not use the phenol if it has a rose color.</p> <p>³ Sterilize by filtration the 10% lauril sarcosyl solution before adding.</p>																																											
4																																											
5	Agregar inmediatamente después de la molienda el CTAB-lauril sarcosyl buffer a 65°C y mezclar por inversión.																																										
6	Incubar las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente con una agitación suave y continua.																																										
7	Dar un breve pulso en centrifuga. Añadir 400 ul de fenol:cloroformo (1:1) y mezclar bien.																																										
8	Incubar las muestras bajo agitación durante 10 minutos a RT.																																										
9	Centrifugar las muestras a 11,500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.																																										
10	Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y estéril (aproximadamente 200 ul) nuevos tubos.																																										
11	Precipitar con un volumen de isopropanol frío. Mezclar suavemente por inversión. Incubar a -20°C durante al menos 60 minutos.																																										
12	Centrifugar a 11,500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y vierta el isopropanol.																																										
13	Lavar con un volumen de etanol al 70 % (aproximadamente 400 ml). Centrifugar a 11,500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Decantar el etanol.																																										
14	Evaporar el etanol restante dejando las muestras en una campana laminar durante la noche.																																										
15	Diluir el ADN con 100 ul de TE pH 8.0																																										

Anexo A2. Características de los marcadores SSR

Cuadro 9. Temperaturas de alineación de los marcadores SSR para PCR.

Primer	X
TAA 52	45.4
CCSM 147	49.35
CCSM 13	50.7
CCSM 18	51.45
TAA 41	50
ATC09	52.45
CCSM 4	52.5
TAA27	53.1
GT 03	50.3
CT 02	54.5
CAT 01	54.55
TAA 45	54.55
CAC 23	49
AG 14	48.5
F6	55.05
CAGG 9	55.2
TAA 15	49
F4	56.5
TAA 3	56.7
F7	56.75
TAA 1	56.95

Cuadro 10. Características de los marcadores moleculares.

Marcador	Forward	Reverse
TAA1	GACAACATCAACAACAGCAAGAGC	AAGAAGAAGAGCCCCCATTAGC
TAA15	GAAAGGGTACTTGACCAGGC	CTTCCCAGCTGCACAAGC
TAA27	GGATGAAAAATGCTCAAAATG	TAGTACCCACAGGGAAGAGAGC
TAA41	AGGTCTACATTGGCATTGTC	ACATGCAGTGCTATAATGAATG
TAA45	GCACCTTTTATACCTGACTCGG	TTCAGCATTTGAGTTGGTTACG
TAA52	GATCTTGACTGAACTTAAAG	ATGTATTGTGTTGATAACG
CAC23	ATCACAATTACTAGCAGCGCC	TTGCCATTGTAGCATGTTGG
CAGG9	AATGCTGAAGATAATCCGCG	TGCCTTGCTCTCCACTCC
TAA3	AGAGAAGAAACATTTGCGGAGC	GAGATGGGACTTGTTTCATCACG

CCSM 4	TTCTCCTCATCTTCGACTCC	CCGATCTTACGACGTATCAA
CCSM147	AGACTCACGTAACCTACTTC	GCTATGTTATGATACGTCTG
CCSM13	CTAGAGCCGAATTCACC	AACAGCTACCAAGACACC
CCSM18	AACAGTTGAAGAGGAAG	GTGATTGCTGGTGTCTGTT
ATC09	TTCCTTATGTAATTGCTCTTTG	TGTGAGTGTGTTGTGCGTGTG
GT03	GCCTTCTTGATTTACCGGAC	TGCTCCGAACTTCATCATTG
CAT01	GCTTTCGATCCCTCCACATA	GATCCCTACAATCCTTGGTCC
CT02	ACGGTGC GTTTTGAGGTAAG	TGACTGTTGGATTTGGGATG
AG14	AAAGGGAAAGCCCTAATCTCA	CTTCTCTTGCGGAGTGTTCT
F6	TTCATTTGGAACAAAACCCAATTC	GCTGCTAATCACAGCATCAAGAGA
F4	AGTGAAGTGTCCATTGGATTTTCG	GTGTTGAATCCCGACCTTCTACC
F7	CTGTTACCGTTGAGGAAACCAAAG	CTCTTCAGCTGGTTTCTCTTCTG

Anexo A3. Protocolos de gel de agarosa

Cuadro 11. Amortiguador de carga para gel de electroforesis TBE 5X.

Componente	Peso molecular	1 L	2 L	3 L
Trizma Base	121.0	54.0 g	108.0 g	162.0 g
Ácido Bórico	61.83	27.5	55.0 g	82.5 g
EDTA 0.5 M, pH 8.0	-----	20.0 ml	40.0 ml	60.0 ml

Cuadro 12. Preparación de SGB (amortiguador de carga con tinte).

Componente	[final]	50 ml
Tris 1.0 M, pH 8.0	50 mM	2.5 ml
EDTA 0.5 M, pH 8.0	5 mM	0.5 ml
Sacarosa	25%	12.5 g
Azul de bromofenol	2 mg ml ⁻¹	100 mg
dH ₂ O	---	hasta 50 ml

Cuadro 13. Procedimiento para elaboración de gel de agarosa (2 % para gel de calidad y 3 % para ver productos de PCR).

1. Pese 1 g de agarosa y colocarla en un matraz de 250 ml para un gel 1 % de 100 ml. Ajuste concentración y volumen según se requiera.
2. Agregue 100 ml de TBE 1X. Mezcle agitando suavemente hasta disolver los grumos.
3. Caliente la mezcla en horno de microondas de 1-2 minutos dando pulsos de 20 seg y mezclando suavemente hasta que la agarosa se disuelva completamente.

4. Deje enfriar hasta que no se observe evaporación. Inmediatamente después añada 10 ul de bromuro de etidio (10 mg/ml). Mezcle suavemente y evite la formación de burbujas.

NOTA: Para añadir el bromuro de etidio a la solución de agarosa, utilizar la micropipeta exclusiva para la manipulación de BrEt.

5. Vierta la mezcla en el molde para el gel. No olvide colocar los peines y verificar que queden correctamente posicionados. Dejar enfriar por aproximadamente 20 min.

6. Colocar el molde con el gel dentro de la celda de electroforesis. Asegurar que el gel quede completamente cubierto con el amortiguador de corrida.

7. Quitar el peine y checar que no queden burbujas dentro de los pozos del peine. Si es el caso, quitarlas con la punta de una pipeta.

8. Cargar las muestras según el mapa de cargado y migrarlas según se requiera. Por ejemplo, para un gel de calidad de ADN, mezclar 2 ul de ADN más 3 ul de buffer de carga, colocar los 5 ul resultantes en el pozo evitando introducir burbujas. En un pozo aparte, colocar como referencia de peso e integridad, 25 ng de marcador Lambda sin digerir. Migrar a 80 V durante 30 min.

Anexo A4. Programa de PCR

Cuadro 14. Programa de PCR.

1 Hold	3 Temp 30 cycles			2 Holds	
94	94	48	72	72	10
5:00	1:00	1:00	1:00	4:00	∞

Anexo A5. Protocolo de elaboración de PAGE

Cuadro 15. Cantidades para la preparación de geles de poliacrilamida.

Componente/concentración	6%	8%	10%	12%
ddH ₂ O	39 ml	36 ml	33 ml	30 ml
Poliacrilamida 29:1 al 40% ¹	9 ml	12 ml	15 ml	18 ml
TBE 5X	12 ml	12 ml	12 ml	12 ml
APS al 25%	210 ul	210 ul	210 ul	210 ul
TEMED	60 ul	60 ul	60 ul	60 ul
Rango de separación en pb	60-400			40-200

¹ también se puede emplear la mezcla 19:1. Si no se conoce cuál es la relación conveniente para separar los fragmentos, se debe hacer una prueba de migración. Las mezclas de acrilamida se preparan pesando por separado los componentes y disolviéndolos en agua, o bien, se pueden adquirir en Sigma-Aldrich con las referencias: 29:1 al 40% Cat. No. A2792 ó 19:1 al 40% Cat. No. A-2917.

Cuadro 16. Cantidades para la preparación de la solución fijadora (Fixer).

Componente	Peso molecular	1 L
dH ₂ O	-----	900 ml
Alcohol etílico absoluto	46.97	100 ml
Ácido acético glacial	60.05	5 ml

Cuadro 17. Construcción del molde.

1. Seleccione las placas de vidrio que usará para construir el molde. Las placas son de dos tipos diferentes, una con bordes redondeados y otra con pestañas. Un molde se construye con una de cada tipo.

2. Limpie las placas, primero con EtOH al 70 % y luego con dH₂O. Utilice toallas Kimwipes® para limpiarlos. Ambas placas deben estar libres de partículas y grasa para prevenir la formación de burbujas que distorsionen la migración.

3. Inserte la liga de plástico con borde de 1 mm para rodear tres lados de la placa con bordes redondeados. Si lo requiere, jale suavemente la liga para amoldarla. El lado bordeado de la liga debe quedar orientado hacia la parte limpia de manera que las muescas de la liga queden hacia abajo y en las esquinas redondeadas. Identifique esta liga por el color naranja y no la confunda con las ligas amarilla y azul. Estas ligas son para preparar geles de diferente espesor.

4. Una vez colocada la liga, ponga la placa sobre una superficie limpia y plana.

5. Coloque los separadores de color negro de 1 mm de espesor sobre esta placa, póngalos paralelos a los lados cortos y coincida los bordes redondeados de los separadores y la placa. No deje espacios grandes entre el separador y la liga.

6. Encime la placa de vidrio que tiene pestañas sobre la placa con liga y separadores. Oriente las pestañas de esta placa hacia el lado que no tiene liga de la otra placa, de manera que quede el espacio para colocar el peine. Las caras limpias de ambas placas deben coincidir también. Ajuste todos los bordes y verifique que los separadores no estén enterrados a la liga para evitar fugas de la solución de acrilamida.

7. Con ayuda de una espátula, levante ambas placas y sujételas con los clips azules. Los clips deberán presionar los lados que tienen liga. Ponga un clip en los lados pequeños y dos clips en el lado grande inferior. Revise nuevamente la posición de los separadores. Si se movieron de lugar, vuelva a empezar.

8. Inserte el peine de plástico de 1mm entre las placas. Empiece insertando el peine por los “dientes” de uno de sus extremos. Una vez que hayan entrado, inserte la mitad del peine de manera que quede levantado. Este será el molde que formará el gel.

Cuadro 18. Protocolo de preparación de gel de poliacrilamida.

1. Prepare la solución de acrilamida en un matraz de 200 ml. Agregue primero el agua (36 ml), la acrilamida (12 ml) y luego el TBE 5X(12 ml). Utilice una probeta diferente para cada componente. Mezcle bien. Incorpore los activadores APS (210 μ L) y TEMED (60 μ L) en ese orden; utilizando una micropipeta de 1 ml y 200 μ L para todo el proceso. Mezcle bien con movimiento circular y evite formar burbujas tanto como pueda.
2. Vacíe inmediatamente la mezcla del gel hasta que llegue al borde de la placa con pestañas, hágalo por una de las esquinas del molde, de modo que la mezcla quede entre ambas placa.
3. Empuje el peine e insértelo completamente. Ajuste la posición y rellene el molde inmediatamente hasta cubrir por completo los dientes del peine. Utilice una pipeta de 1 ml para rellenar el gel por las esquinas del molde.
4. Deje polimerizar el gel 60 min.

Cuadro 19. Protocolo de electroforesis.

1. Prepare la celda de electroforesis. Verifique que esté alineada con una burbuja de alineación, luego agregue amortiguador de corrida al contenedor inferior de la celda hasta que alcance 1.5 cm de altura. Necesitará 400 ml de amortiguador TBE 1X para el sistema completo.
2. Quite con cuidado las pinzas azules y la liga. Enseguida, coloque el molde en el contenedor al que se le puso el amortiguador. El gel debe quedar hacia el interior de la celda, de tal modo que la migración de las muestras sea vertical. Las pinzas y ligas póngalas en una charola con agua destilada y lávelas tan pronto sea posible. No deje secar la acrilamida que conlleven.
3. Sujete el molde con clips blancos, uno de cada lado. Haga lo mismo con el otro gel. Si solo tiene un gel, coloque dos placas de vidrio de esquinas redondeadas en el lado sin gel de la celda y también sujételas con clips blancos.
4. Agregue el amortiguador de corrida en el contenedor superior de la celda hasta cubrir completamente el gel. Siempre utilice amortiguador nuevo en este reservorio. Examine que no haya fugas de amortiguador del contenedor superior al inferior. Si las hay, apriete más el molde utilizando dos clips blancos en cada lado en lugar de uno.
5. Compruebe que no haya burbujas en la parte inferior del gel. Si las hay, empújelas hacia afuera con amortiguador de corrida utilizando la aguja de una jeringa hipodérmica. La presencia de burbujas deforma la migración de las bandas.
6. Antes de cargar, incorpore amortiguador de carga a las muestras y centrifugue brevemente. Cinco microlitros de amortiguador por muestra serán suficientes para empezar.
7. Haga un mapa de carga. Anote el orden de las muestras y la ubicación de la escalerilla molecular. Si el objetivo del estudio es para huella genética, considere iniciar en el pozo 11 del peine y colocar la escalerilla cada 10-15 muestras. Si el

objetivo es para selección, ubique la primera muestra en el pozo 5 y posicione la escalerilla de peso al principio y final del gel.

8. Para cargar, retire lentamente el peine jalándolo hacia arriba. No lo mueva hacia los lados para prevenir rotura y desarreglos de los “dientes”. Retire los restos de acrilamida polimerizada sin jalarlos. Revise los pozos y saque las burbujas atrapadas con la aguja de la jeringa inyectando suavemente amortiguador. Curve la aguja para facilitar la manipulación. Si es necesario, también rectifique los dientes desalineados.

9. Cargue 1.5- 3.0 ul de muestra por pozo y 25 ng de la escalerilla de peso molecular. Utilice una punta de 10 ul. Para cargar la muestra, apoye la punta sobre la placa exterior del molde. Puede reutilizar la punta lavándola en el amortiguador de corrida con pipeteo suave y repetido.

10. Una vez cargadas las muestras, coloque la tapa de la celda de electroforesis. Conecte correctamente los electrodos a la fuente de poder. Migre las muestras a 250 V durante 1.5 a 3 h dependiendo del tamaño del fragmento y de la concentración de acrilamida.

11. Rellene inmediatamente con agua fría el contenedor interno de la celda. Utilice mangueras de látex de 1 cm de diámetro conectadas a la celda de electroforesis y a una bomba de agua sumergida en 4 L de agua. Recircule esta agua durante toda la corrida. Evite el calentamiento del sistema colocando botellas de agua congelada dentro del contenedor que tiene el agua recirculante. Verifique ocasionalmente el nivel del amortiguador de corrida. Rellene si se requiere.

12. Terminada la corrida, apague la fuente de poder y la bomba de agua sumergible. Desarme el sistema y coloque las placas sobre una superficie plana y limpia.

13. Despegue las placas de vidrio con ayuda de una espátula, para ello, introduzca esta espátula entre las dos placas y empuje hacia arriba hasta que entre aire entre la placa superior y el gel. Sujete con ambas manos y poco a poco levante la placa para no romper el gel.

14. Una vez expuesto el gel, elimine el exceso de acrilamida, cortando con una regla metálica humedecida las partes del gel no deseadas o aquellas filamentosas.

15. Despegue el gel con una espátula delgada de bordes redondeados. Humedézcala e insértela por debajo del gel, empezando por una esquina. Despegue el gel con cuidado. Enseguida, humedezca sus guantes y con ambas manos, levante el gel poco a poco. Transfíralo a solución fijadora. Manténgalo a 4°C hasta la tinción y revelado.

Anexo A6 Variación e identidad genética

Cuadro 20. Embriones similares y diferentes a la madre y morfotipo de la semilla.

m	Embriones										Embriones por serie	Muertos	Morfotipo
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10			
521	1	1	1	1	1	1					6	0	Base
611	1	-	1	-	1	1	1	-			8	1	base
741	1	1	1	1							4	0	base
351	1	1	1	1	-	-	1	1			8	2	Dos grupos
422	1	1	1								3	0	Dos grupos
622	-	1	1	1	1	1	-	1	1	1	10	0	dos grupos
711	1	1	1	1	1	1					6	0	dos grupos
223	1	1	1								3	1	Entrelazados
354	-	1	1	1	1						5	1	Entrelazados
432	1	1	1								3	0	Entrelazados
731	1	1	1	1	1	1					6	0	entrelazados
212	-	-	-	1	1	1	1				7	3	Base- Entrelazados
421	1	-	1	1	1	1					6	1	Base- Entrelazados
511	-	1	1								3	0	Base- Entrelazados
541	1	1	1	1	1	1	1				7	0	Base- Entrelazados
831	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	10	0	Base- Entrelazados
851	1	1	-	1	1	1					6	0	Base- Entrelazados
822	1	-	1	1							4	0	Base- Entrelazados
832	1	1	1	1	1	1	1				7	0	Base- Entrelazados
132	1	1	1								3	0	Micropildistante
214	1	1	-								3	1	Micropildistante
842	1	1	1	1	1	1					6	-1	Micropildistante

Cuadro 21. Resumen estadístico de los alelos en los diferentes marcadores.

Marcador	Fre.ale.may	Genotipos	Alelos	Diversidad		
				genética	Heterocigosidad	PIC
AG 14	0.9211	3	3.00	0.1467	0.1579	0.1382
TAA 3	0.5351	3	3.00	0.5132	0.8947	0.3983
TAA 15	0.5219	5	4.00	0.5381	0.8947	0.4344
TAA 41	0.5088	5	4.00	0.5397	0.9298	0.4349
GT 03	0.5263	5	3.00	0.5107	0.9211	0.3931
CAC 23	0.5439	3	3.00	0.5040	0.8947	0.3855
Promedio	0.5928	4	3.33	0.4587	0.7822	0.3641

Cuadro 22. Frecuencia de alelos en los distintos marcadores.

Marcador	Alelo	Cantidad	Frec	Varianza	SD
AG 14	125	16	0.0702	0.00026459	0.0163
AG 14	146	2	0.0088	0.00003780	0.0061
AG 14	152	105	0.9211	0.00029159	0.0171
TAA 3	139	122	0.5351	0.00022004	0.0148
TAA 3	157	102	0.4474	0.00020654	0.0144
TAA 15	162	119	0.5219	0.00024586	0.0157
TAA 15	183	4	0.0175	0.00007425	0.0086
TAA 15	201	99	0.4342	0.00025058	0.0158
TAA 41	137	116	0.5088	0.00023017	0.0152
TAA 41	149	8	0.0351	0.00014309	0.0120
TAA 41	158	102	0.4474	0.00020654	0.0144
GT 03	146	120	0.5263	0.00018629	0.0136
GT 03	167	3	0.0132	0.00005619	0.0075
GT 03	176	105	0.4605	0.00019794	0.0141
CAC 23	240	124	0.5439	0.00021397	0.0146
CAC 23	249	102	0.4474	0.00020654	0.0144

Cuadro 23. Frecuencia de Genotipos por marcador.

Marcador	Alelo1	Alelo2	Covarianza	Cantidad	Frec
AG 14	125	152	0.0003	16	0.1404
AG 14	146	152	0.0000	2	0.0175
AG 14	152		0.0003	96	0.8421
TAA 3	139		0.0002	10	0.0877
TAA 3	139	157	0.0001	102	0.8947
TAA 15	162	162	0.0002	9	0.0789
TAA 15	162	183	0.0000	3	0.0263
TAA 15	162	201	0.0001	98	0.8596
TAA 15	183	201	0.0000	1	0.0088
TAA 41	137		0.0002	7	0.0614
TAA 41	137	149	0.0001	4	0.0351
TAA 41	137	158	0.0001	98	0.8596
TAA 41	149	158	0.0001	4	0.0351
GT 03	146		0.0002	8	0.0702
GT 03	146	167	0.0000	2	0.0175
GT 03	146	176	0.0002	102	0.8947
GT 03	167	176	0.0000	1	0.0088
GT 03	176		0.0002	1	0.0088
CAC 23	240		0.0002	11	0.0965
CAC 23	240	249	0.0002	102	0.8947

Cuadro 24. Matriz de frecuencia de alelos de los diferentes marcadores.

Marcador	Alelo	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
AG 14	125	0.1250	0.0000	0.0000	0.0000	0.0938	0.0357	0.1111	0.1167
AG 14	146	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0278	0.0167
AG 14	152	0.8750	1.0000	1.0000	1.0000	0.9063	0.9643	0.8611	0.8667
CAC 23	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0625	0.0000	0.0000	0.0000
CAC 23	240	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5313	0.5714	0.5833	0.5667
CAC 23	249	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.4063	0.4286	0.4167	0.4333
GT 03	146	0.6250	0.5556	0.5000	0.5833	0.5000	0.5000	0.5556	0.5000
GT 03	167	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0313	0.0000	0.0000	0.0333
GT 03	176	0.3750	0.4444	0.5000	0.4167	0.4688	0.5000	0.4444	0.4667
TAA 15	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1000
TAA 15	162	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5833	0.5333
TAA 15	183	0.1250	0.0000	0.0000	0.0417	0.0313	0.0000	0.0000	0.0167
TAA 15	201	0.3750	0.5000	0.5000	0.4583	0.4688	0.5000	0.4167	0.3500
TAA 3	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0667
TAA 3	139	0.5000	0.6111	0.6364	0.5417	0.5000	0.5357	0.5278	0.5000
TAA 3	157	0.5000	0.3889	0.3636	0.4583	0.5000	0.4643	0.4722	0.4333
TAA 41	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0625	0.0000	0.0000	0.0000
TAA 41	137	0.6250	0.5556	0.5000	0.5000	0.4063	0.5357	0.5278	0.5167
TAA 41	149	0.0000	0.0000	0.0000	0.0417	0.0625	0.0357	0.0278	0.0500
TAA 41	158	0.3750	0.4444	0.5000	0.4583	0.4688	0.4286	0.4444	0.4333

Cuadro 25. Frecuencia de alelos compartidos basada en distancias entre las ocho poblaciones.

Progenitor	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
A1	0.0000	0.0833	0.1061	0.0694	0.0938	0.0893	0.0718	0.0861
A2	0.0833	0.0000	0.0227	0.0324	0.0891	0.0456	0.0694	0.0944
A3	0.1061	0.0227	0.0000	0.0436	0.0852	0.0465	0.0875	0.0977
A4	0.0694	0.0324	0.0436	0.0000	0.0694	0.0456	0.0625	0.0847
A5	0.0938	0.0891	0.0852	0.0694	0.0000	0.0580	0.0660	0.0691
A6	0.0893	0.0456	0.0465	0.0456	0.0580	0.0000	0.0463	0.0619
A7	0.0718	0.0694	0.0875	0.0625	0.0660	0.0463	0.0000	0.0481
A8	0.0861	0.0944	0.0977	0.0847	0.0691	0.0619	0.0481	0.0000

Cuadro 26. Frecuencia de alelos por morfotipo.

Marker	Allele	BE	DG	EB	En	M
AG 14	125	0.05434783	0.03703704	0.08333333	0.02380952	0.19230769
AG 14	146	0.01086957	0	0	0.02380952	0
AG 14	152	0.93478261	0.96296296	0.91666667	0.95238095	0.80769231
CAC 23	240	0.5326087	0.55555556	0.55555556	0.52380952	0.57692308
CAC 23	249	0.4673913	0.44444444	0.44444444	0.47619048	0.42307692
GT 03	146	0.51086957	0.53703704	0.41666667	0.52380952	0.57692308
GT 03	147	0	0	0.08333333	0	0
GT 03	167	0	0	0.02777778	0	0.07692308
GT 03	176	0.48913043	0.46296296	0.47222222	0.47619048	0.34615385
TAA 15	162	0.55434783	0.53703704	0.5	0.52380952	0.5
TAA 15	183	0.01086957	0.01851852	0	0	0.07692308
TAA 15	201	0.43478261	0.44444444	0.5	0.47619048	0.42307692
TAA 3	139	0.5326087	0.53703704	0.5	0.57142857	0.57692308
TAA 3	157	0.4673913	0.46296296	0.5	0.42857143	0.42307692
TAA 41	137	0.48913043	0.5	0.52777778	0.5	0.61538462
TAA 41	149	0.02173913	0.03703704	0.02777778	0.02380952	0.07692308
TAA 41	158	0.48913043	0.46296296	0.44444444	0.47619048	0.30769231

Cuadro 27. Similitud entre los morfotipos.

	BE	DG	EB	En	M
BE	1	0.97913312	0.94907407	0.97575914	0.89715719
DG	0.97913312	1	0.95216049	0.97530864	0.90883191
EB	0.94907407	0.95216049	1	0.94510582	0.89494302
En	0.97575914	0.97530864	0.94510582	1	0.89957265
M	0.89715719	0.90883191	0.89494302	0.89957265	1

Anexo A7. Representaciones de los morfotipos

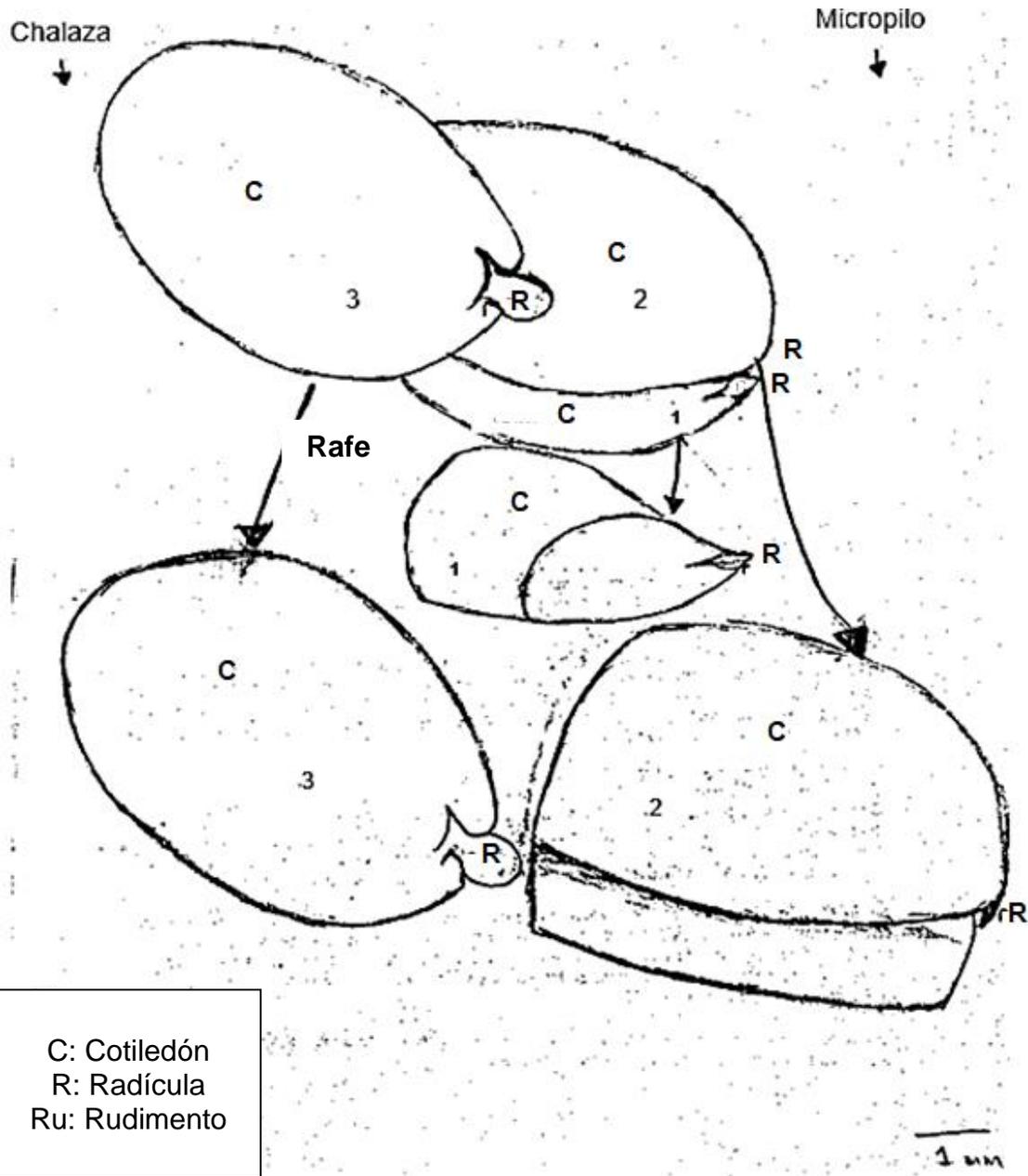


Figura 29. Ilustración de la posición de los embriones en el morfotipo Dos grupos.

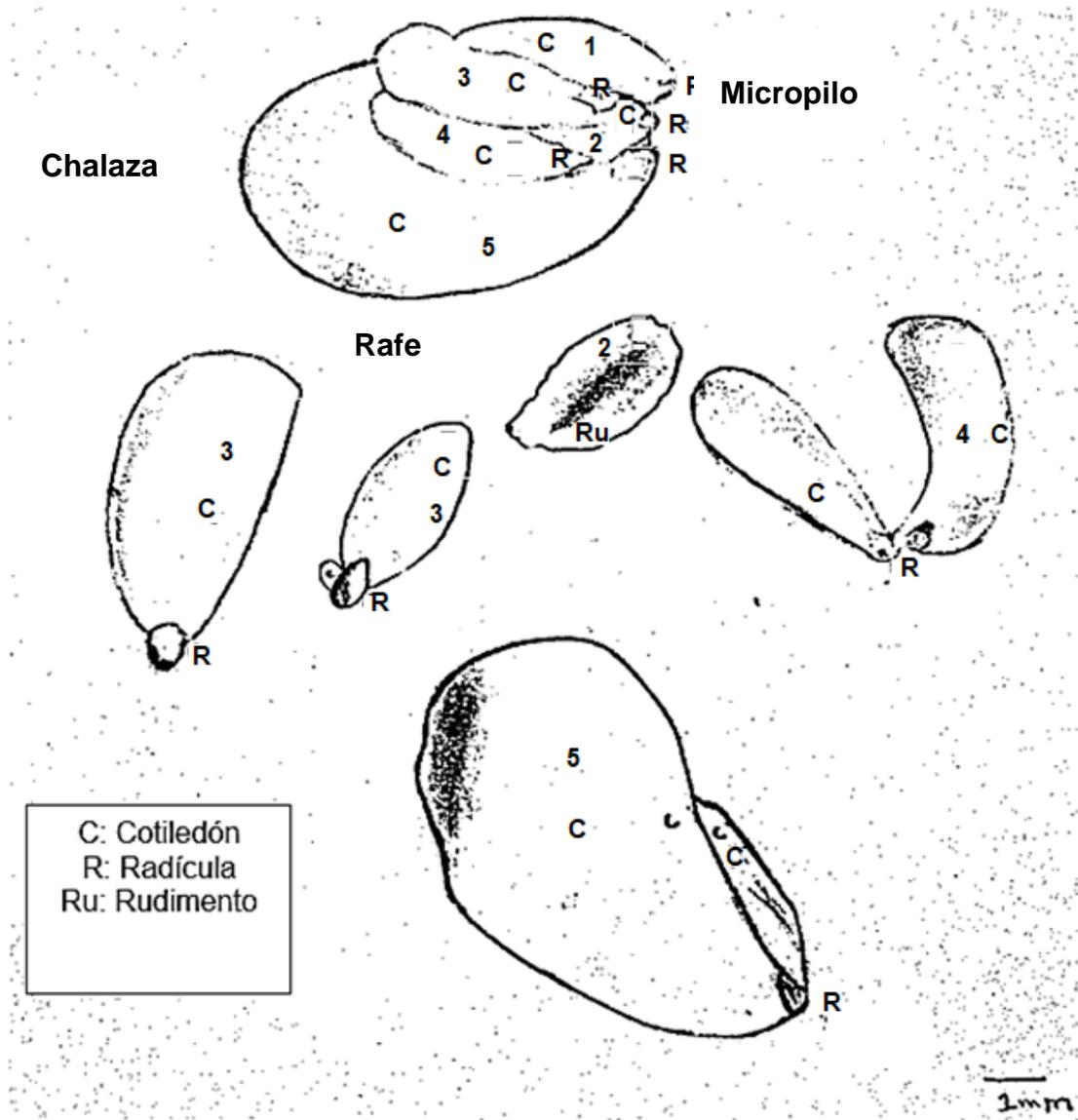


Figura 30. Ilustración de la posición de los embriones en el morfotipo Embriones base.

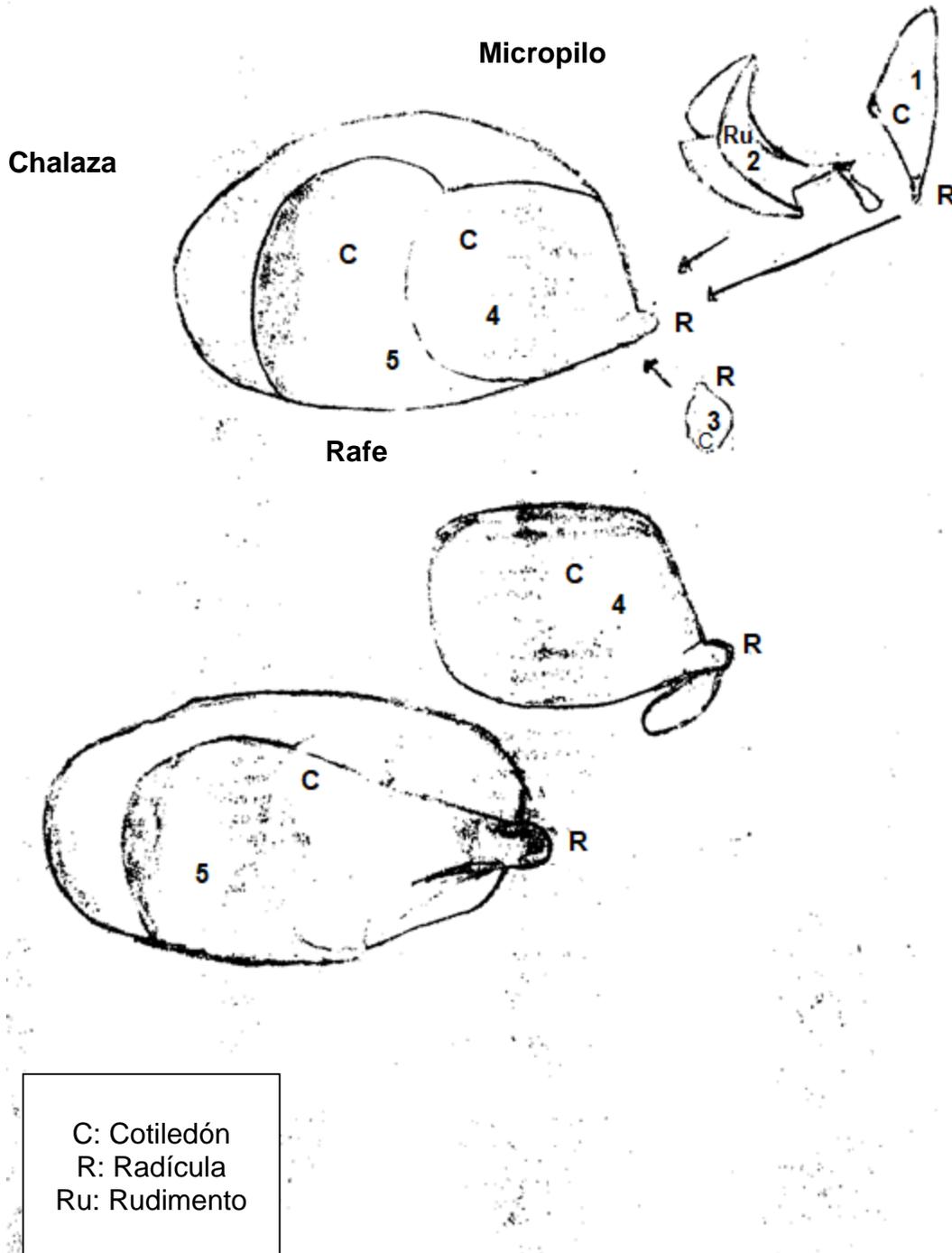


Figura 31. Ilustración de la posición de los embriones en el morfotipo Entrelazados.

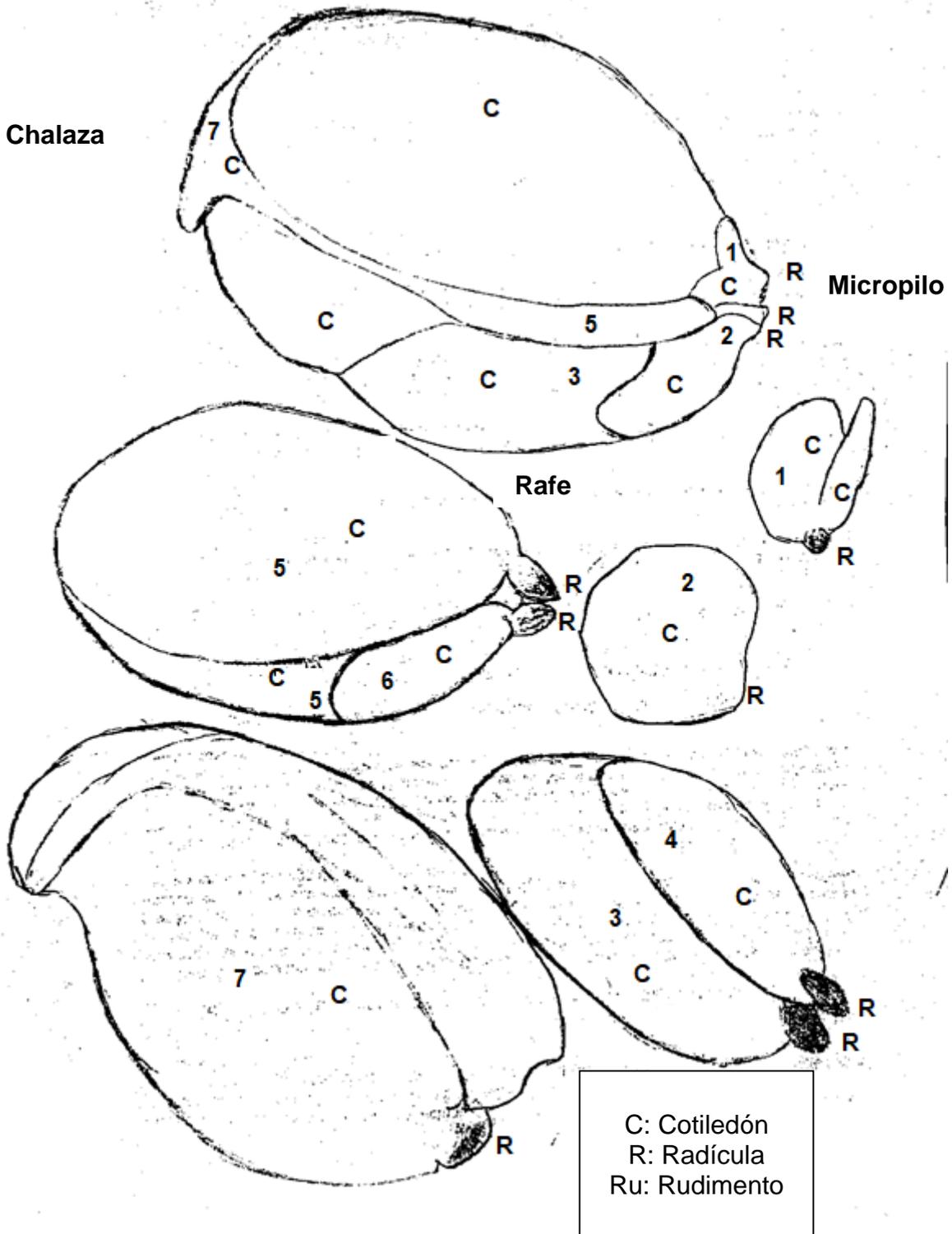


Figura 32. Ilustración de la posición de los embriones en el morfotipo Base-Entrelazados.

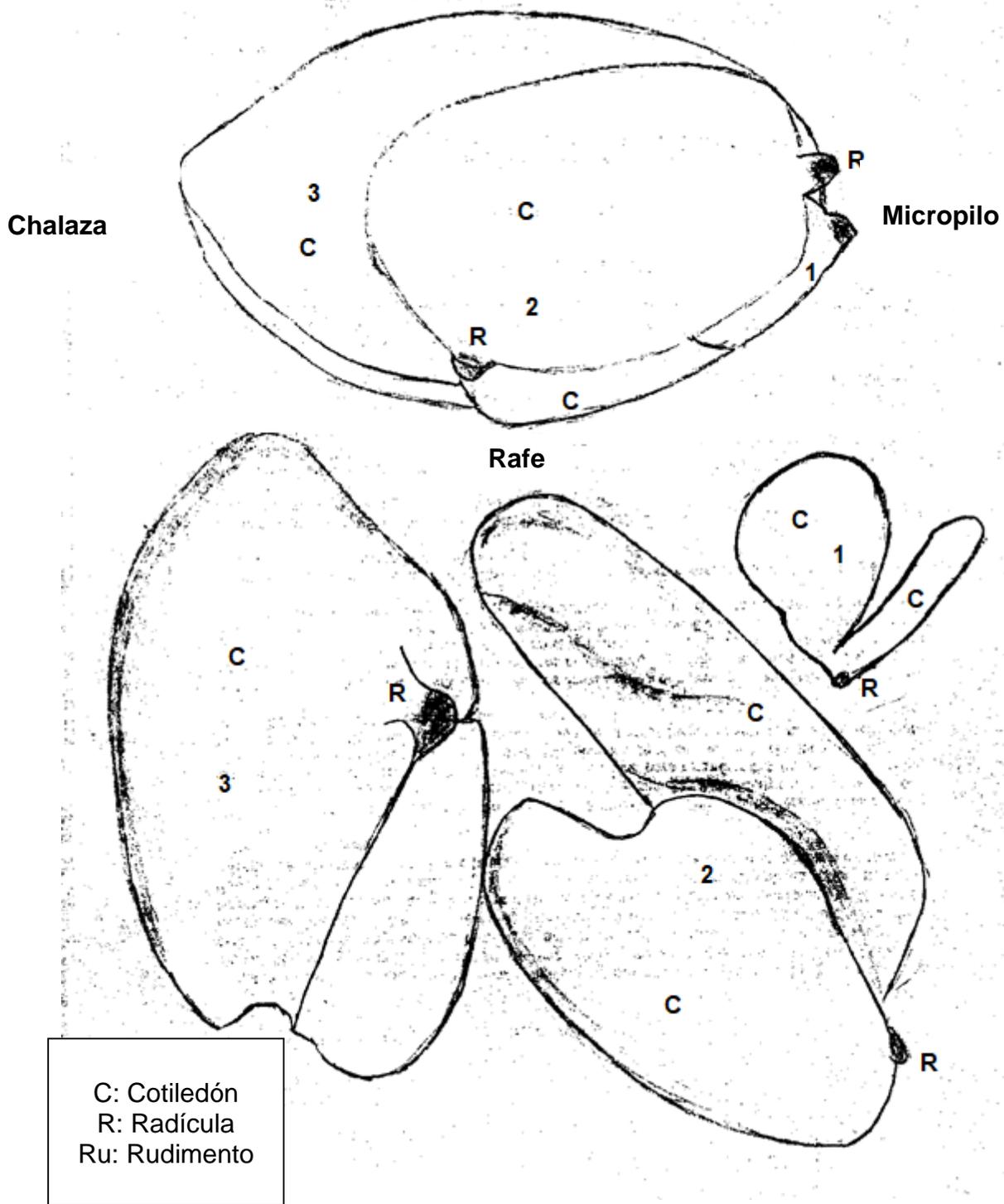


Figura 33. Ilustración de la posición de los embriones en el morfotipo Micropildistante.

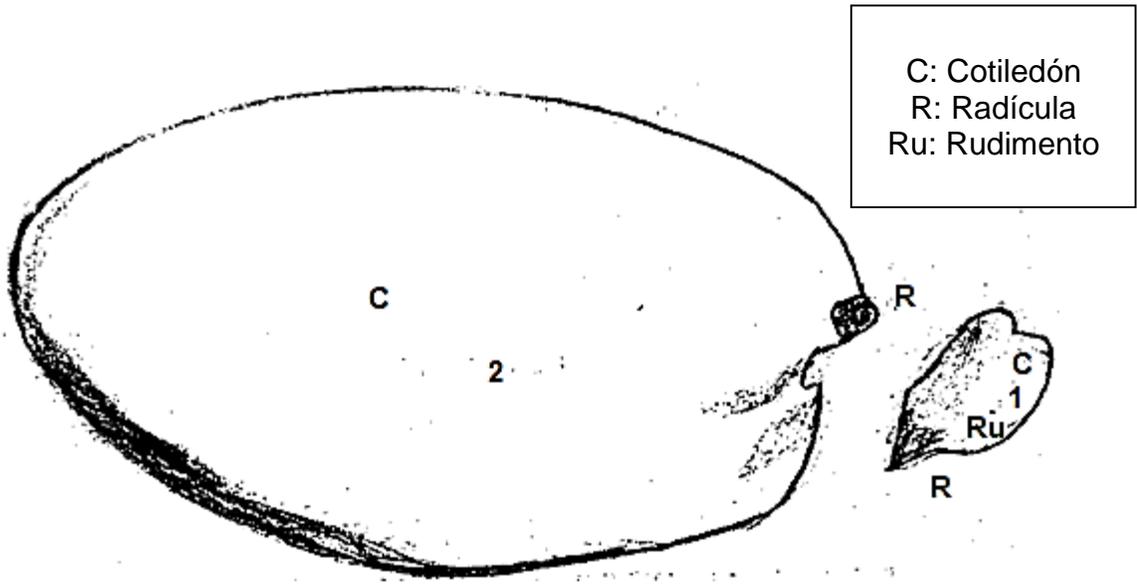


Figura 34. Ilustración de la posición de los embriones en el morfotipo Sencillo.

Anexo A8. Proceso del experimento

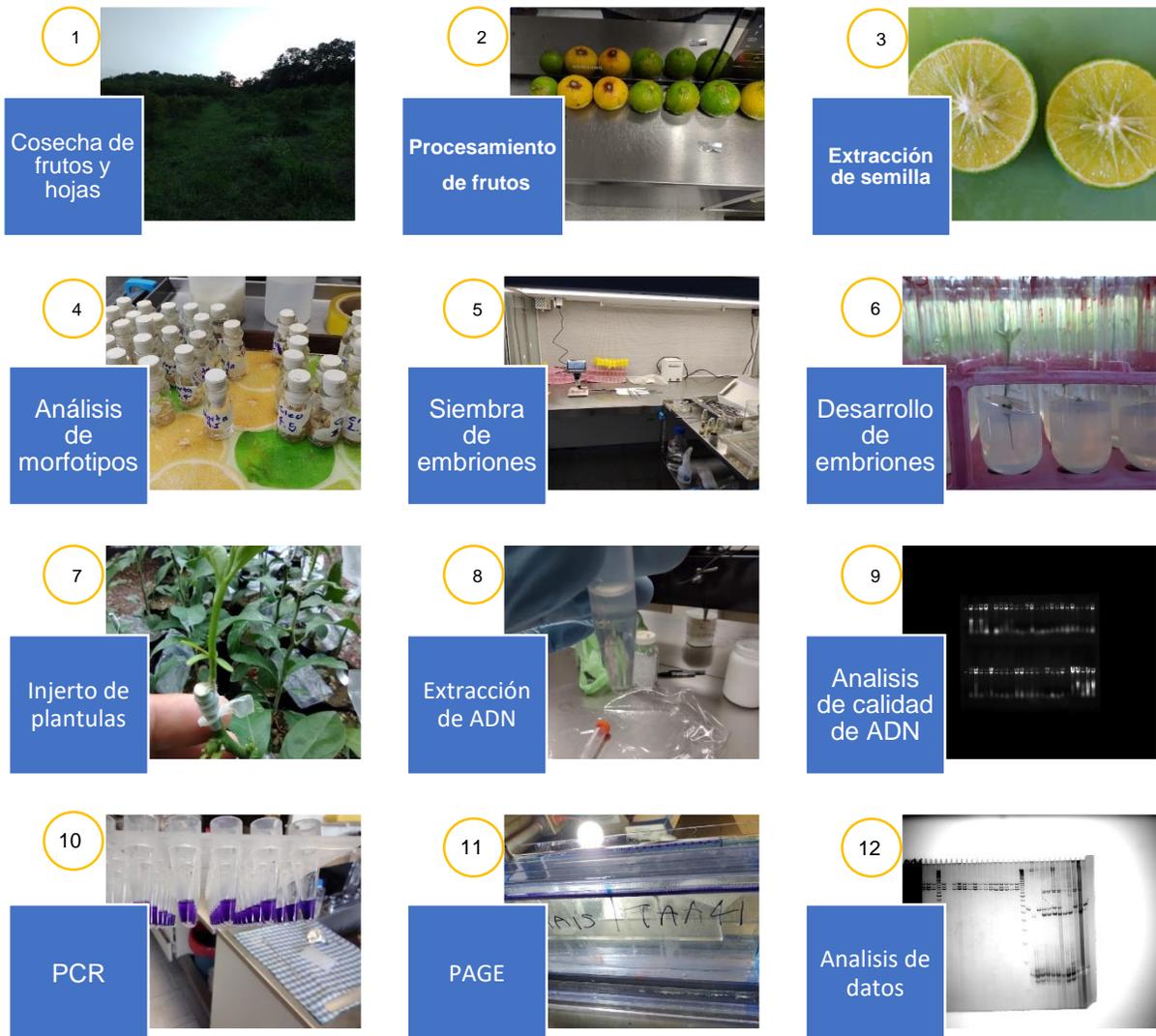


Figura 35. Proceso del experimento.