



REVISTA CHAPINGO SERIE  
HORTICULTURA  
ISSN: 1027-152X  
[revistahorticultura29@gmail.com](mailto:revistahorticultura29@gmail.com)  
Universidad Autónoma Chapingo  
México

Sánchez-Damas, J. J.; Avitia-García, E.; Castillo-González, A. M.; Villegas-Monter, A.; Corona-Torres, T.

Estudio anatómico de la poliembrionía en tres portainjertos de cítricos

REVISTA CHAPINGO SERIE HORTICULTURA, vol. 12, núm. 2, julio-diciembre, 2006, pp. 145-152

Universidad Autónoma Chapingo  
Chapingo, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60912203>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

# ESTUDIO ANATÓMICO DE LA POLIEMBRIONÍA EN TRES PORTAINJERTOS DE CÍTRICOS

J. J. Sánchez-Damas<sup>1</sup>; E. Avitia-García<sup>1\*</sup>; A. M. Castillo-González<sup>1</sup>;  
A. Villegas-Monter<sup>2</sup>; T. Corona-Torres<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.  
Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

Correo-e: [anasofiacasg@hotmail.com](mailto:anasofiacasg@hotmail.com) (\*Autor responsable).

<sup>2</sup>Especialidad de Fruticultura. IREGEP, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco,  
Montecillo, Estado de México. C. P. 98000. MÉXICO.

<sup>3</sup>Especialidad de Genética. IREGEP, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco,  
Montecillo, Estado de México. C. P. 98000. MÉXICO.

## RESUMEN

Se realizó un estudio anatómico de poliembrionía en los portainjertos de cítricos: *Citrus reshni* Hort. ex Tan. (Mandarino Cleopatra); *C. volkameriana* Pasq. (Limón Volkameriana) y *C. amblycarpa* Ochse (Mandarino Amblicarpa). Se encontró que en las tres especies los óvulos son anátropes, crasinucleados y bitégmicos. En los tres portainjertos los embriones nucelares iniciaron su desarrollo aún cuando los óvulos no habían sido fecundados. Los embriocitos (embriones nucelares pequeños) se observaron inmersos en la nucela después de la iniciación de la megagametogénesis. Probablemente, la iniciación de embriones asexuales es independiente del desarrollo del embrión de origen sexual, puesto que en algunos casos se observaron embriocitos sin la presencia de un endospermo y un embrión zigótico o sexual. Los embriones nucelares difirieron en sus etapas de desarrollo, ya que dentro de una misma semilla se encontraron las etapas globular temprana, globular tardía y de corazón. Los embriones se ubicaron en el extremo micropilar del saco embrionario en las áreas laterales cercanas al micrópilo, por lo que fue difícil identificar el origen de los mismos. Los embriones nucelares a partir de la etapa globular presentaron suspensor.

**PALABRAS CLAVE ADICIONALES:** *Citrus reshni*, *C. volkameriana*, *C. amblycarpa*, embriones asexuales.

## ANATOMICAL STUDY OF POLYEMBRYONY IN THREE CITRUS ROOTSTOCKS

## ABSTRACT

An anatomic polyembryony study was carried out in the citrus rootstocks: *Citrus reshni* Hort. ex Tan. (Chleopatra Tangerine); *C. volkameriana* Pasq. (Volkameriana Lemon) and *C. amblycarpa* Ochse (Amblicarpa Tangerine). We found that, for the three species, the embryos are anatropous, crassinucleated and bitgemic. Nucellar embryos from the three rootstocks began developing even though their ovules had not been fecundated. Embryocytes (nucellar small embryos) were seen immersed in the nucella after the initiation of the megagametogenesis. Probably, the initiation of asexual embryos is independent from the development of an embryo of sexual origin; because, in some cases, we observed embryocytes without the presence of an endosperm or a zygotic or sexual embryo. Nucellar embryos differed in their developmental stages, because, within the same seed we found the stages early globular, late globular, and heart-shaped. Embryos were located in the micropilar extreme of the embryo sac in the lateral areas next to the micropile; this made it difficult to identify the origin of such embryos. Beginning at the globular stage, nucellar embryos presented the suspensor.

**ADDITIONAL KEY WORDS:** *Citrus reshni*, *C. volkameriana*, *C. amblycarpa*, asexual embryos.

## INTRODUCCIÓN

La poliembrionía es la formación de más de un embrión dentro de un óvulo. Es relativamente inusual entre las angiospermas, pero muy frecuente entre las gimnospermas (Sedgley y Griffin, 1989). De acuerdo con Lakshmanan y Ambegaokar (1984), la poliembrionía en angiospermas puede

ser clasificada como “simple” o “múltiple”, dependiendo de la presencia de uno o más sacos embrionarios dentro del mismo óvulo, y por su naturaleza la poliembrionía simple puede ser sexual o asexual (apomixis).

Anteriormente el término apomixis incluía tanto a la

propagación vegetativa como a la producción de embriones asexuales; sin embargo, ahora su uso se ha restringido sólo para los procesos de reproducción asexual (agámica) que ocurren dentro del óvulo (Nogler, 1984). Por lo tanto, la apomixis *sensu stricto* (=agamospermia) puede ser definida como la producción de embriones en ausencia de fusión sexual entre gametos.

Dentro de las plantas con semilla, la apomixis es exclusiva de las angiospermas y se ha observado por lo menos en 400 especies, ubicadas dentro de 35 familias, siendo las más comunes Poaceae, Asteraceae, Rosaceae, Rutaceae, Urticaceae y Liliaceae (Richards, 1986). Este fenómeno es muy raro en las especies cultivadas, siendo los casos más conocidos los de *Citrus* y *Mangifera*, aunque también se ha reportado en otras especies como nopal (*Opuntia* spp.), mangostán (*Garcinia mangostana* L.), zarzas (*Rubus* spp.) y en algunas especies de manzano (*Malus pumila* Mill.) y pastos (Richards, 1986; Grimanelli *et al.*, 2001).

Desde el punto de vista del mejoramiento, la apomixis puede restringir la recombinación genética, pero también proporciona un mecanismo único para el desarrollo de cultívares superiores preservando estos genotipos de manera indefinida. Las plantas apomicticas, al igual que las plantas sexuales, desarrollan semilla a partir del óvulo de la flor, pero la ovocélula y el núcleo espermático no se unen para formar un embrión. Por lo tanto, el embrión de una planta apomictica recibe todos sus cromosomas de la planta madre (Borges Do Valle y Miles, 2001).

Hay dos tipos principales de apomixis, basados en el origen del embrión: embrionía adventicia y apomixis gametofítica. La embrionía adventicia es la formación de embriones a partir de células somáticas ovulares, usualmente de la nucela. La apomixis gametofítica involucra la producción de un saco embrionario diploide (megagametofito) y el embrión desarrolla por partenogénesis a partir del megagametofito no reducido. Si el embrión surge a partir de la ovocélula se le conoce como partenogénesis diploide, pero si se origina a partir de las sinérgidas o antípodas se le conoce como apogametía diploide (Koltunow, 1993; Crane, 2001).

Algunas veces el embrión puede desarrollar a partir de un saco embrionario haploide a partir de la ovocélula y se le conoce como partenogénesis haploide. Esta forma de apomixis es rara, pero se ha encontrado en maíz (*Zea mays* L.) y algunas otras especies de importancia económica. La apogametía haploide es rara (Naumova, 1993).

La embrionía adventicia es uno de los tipos de apomixis más ampliamente distribuidos en la naturaleza y se clasifica en embrionía nucelar y embrionía integumentaria, dependiendo del origen de los embriones asexuales (Lakshmanan y Ambegaokar, 1984).

En las especies de *Citrus*, la embrionía nucelar parece ocurrir sólo en presencia de la reproducción sexual normal, ya que el estímulo del embrión cigótico en desarrollo conduce al crecimiento posterior de los embriones apomicticos en la nucela. Así, los procesos sexual y apomítico coexisten dentro del mismo óvulo y por lo tanto se dice que la apomixis es del tipo facultativo (Richards, 1986).

La primera evidencia morfológica de la diferenciación del embriocito (grupo de células iniciales) generalmente es observada después de la iniciación de la megagametogénesis. Los embriocitos usualmente se caracterizan por núcleos grandes, de forma irregular, con un citoplasma denso y células más grandes que las del resto de la nucela (Bruck y Walker, 1985; Koltunow, 1993). Conforme se diferencian las iniciales se forma una pared de calosa dentro de la pared primaria original (Koltunow, 1993). La abundancia de polisomas, ribosomas libres, mitocondrias y plastidios sugiere alta actividad de los embriocitos, además, sus paredes celulares están significativamente engrosadas y carecen de plasmodesmos (Naumova y Vielle-Calzada, 2001).

Wakana y Uemoto (1987, 1988), observaron que las células iniciales de los embriones nucelares aparecen primero en las capas de las células nucelares que rodean a la parte calazal del saco embrionario sexual, inmediatamente después de antesis. Posteriormente aparecen más iniciales en la región micropilar y alrededor del saco embrionario.

La primera división de las células iniciales nucelares en *Citrus* ocurre aproximadamente cuando se da la primera división del cigoto. Sólo las iniciales celulares localizadas en la región micropilar se dividen y forman embriones, y durante todo el desarrollo de la semilla se pueden seguir diferenciando embriocitos en la región micropilar del óvulo (Koltunow, 1993). Durante las etapas tempranas del desarrollo los embriones nucelares carecen de suspensor, pero cuando alcanzan su estado globular aparece dicha estructura (Wakana y Uemoto, 1988).

El desarrollo del embrión nucelar es morfológicamente similar, si no es que idéntico, al desarrollo del embrión sexual en *Citrus* (Bruck y Walker, 1985). Con frecuencia el crecimiento del embrión cigótico es más lento, comparado con el crecimiento más vigoroso de los embriones nucelares, y el embrión cigótico puede o no completar su desarrollo en semillas que contienen embriones nucelares múltiples (Frost y Soost, 1968).

Se ha observado que tanto en los óvulos fecundados como en los no fecundados del naranjo 'Valencia' ocurre la iniciación de embriones nucelares, lo cual indica que su iniciación es independiente de la fecundación; sin embargo, se sugiere que el desarrollo completo de los embriones nucelares en *Citrus* depende de la reproducción sexual para formar el endospermo, que es necesario para su nutrición

(Richards, 1986; Koltunow, 1993). Wakana y Uemoto (1987), encontraron que todos los embriones nucleares en óvulos no fecundados detuvieron su crecimiento en la etapa globular.

El número de embriones nucleares en una semilla varía con: (i) la edad de la planta; (ii) el estado nutrimental y fisiológico de la misma; (iii) el polen progenitor; (iv) la posición de las ramas en el árbol; (v) la carga de frutos, y (vi) los factores ambientales (Frost y Soost, 1968). También el número de plántulas por semilla varía de una especie a otra; así, *Citrus macrocarpa* produce alrededor de 21, mientras que *C. unshiu* produce cerca de 40 (Lakshmanan y Ambegaokar, 1984).

Es difícil identificar los embriones cigóticos de los nucleares, siendo este el principal obstáculo para los mejoradores y propagadores de cítricos. En *Poncirus trifoliata* se ha usado el carácter dominante de hojas trifoliadas como un marcador para la identificación de las plántulas cigóticas; sin embargo, no es completamente confiable debido a que dicha característica está determinada por un gene simple y cuando el progenitor es heterocigótico la mitad de las plántulas no muestran dicho carácter (Lakshmanan y Ambegaokar, 1984). Otra técnica que se ha usado en los últimos años es el análisis isoenzimático. Iglesias *et al.* (1974), pudieron identificar plántulas cigóticas en varias cruzas a través del análisis de los patrones isoenzimáticos de peroxidasa y esterasa en plántulas de 20 días de edad. Las plántulas de *Poncirus trifoliata* mostraron dos bandas de la isoenzima peroxidasa, mientras que las de *Citrus limon* y *C. sinensis* mostraron sólo una banda. Cuando *P. trifoliata* se usó como progenitor masculino y *Citrus* spp. como progenitor femenino, todas las plántulas resultantes que mostraron dos bandas de peroxidasa fueron identificadas como cigóticas y las que presentaron una sola banda como de origen nuclear.

En los cítricos la mayoría de las plantaciones están injertadas sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), el cual es susceptible a la tristeza de los cítricos; por lo que la sustitución de dicha especie por portainjertos tolerantes a la mencionada enfermedad, en combinación con la utilización de material vegetal libre de virus, es una estrategia para asegurar la producción. Sin embargo, actualmente no se dispone de suficiente material certificado y semillas de portainjertos tolerantes. *Citrus reshni* Hort. ex Tan.; *C. volkameriana* Pasq. y *C. amblycarpa* Ochse son especies tolerantes al ataque del virus que produce dicha enfermedad, por lo que pueden ser considerados como alternativa de cambio. Estas tres especies presentan poliembrionía; es decir, presentan más de un embrión dentro de una semilla, de los cuales generalmente uno es de origen sexual y el resto de origen asexual. Los embriones asexuales dan origen a plantas genéticamente uniformes e iguales a la planta madre, por lo que el cultivo de estos embriones podría clonar los portainjertos tolerantes a la tristeza y de esta forma dis-

poner en menos tiempo de la cantidad de portainjertos requerida para la producción de cítricos (Andrade, 2002).

Con base en lo anterior, en este trabajo se plantearon como objetivos: estudiar el desarrollo de los embriones sexual y asexuales en tres portainjertos de cítricos que en los últimos años han estado sustituyendo al naranjo agrio, así como tratar de diferenciar a través de estudios anatómicos el origen de los embriones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en frutos de *Citrus reshni* Hort. ex Tan. (Mandarino Cleopatra); *C. volkameriana* Pasq. (Límón Volkameriana) y *C. amblycarpa* Ochse (Mandarino Amblicarpa), provenientes de una huerta de polinización libre establecida en Cazones de Herrera, Veracruz, México. Localizado en los 20° 40' N y 97° 28' O; con precipitación anual de 1 200 mm; temperatura media anual de 25 °C y con temperatura del mes más frío de 18 °C (García, 1973).

Se seleccionaron flores y frutos durante los meses de abril, junio y septiembre de cada una de las especies. Se trajeron los óvulos y semillas, respectivamente, los cuales se fijaron en una solución FAA (50 % etanol al 96 % + 5 % ácido acético glacial + 10 % formaldehído al 37 % + 35 % agua destilada). Posteriormente los tejidos se lavaron en etanol al 50 y 70 % (4 horas en cada caso); a continuación se colocaron en una solución GAA (25 % glicerol + 50 % etanol absoluto + 25 % agua destilada) hasta continuar con el proceso de deshidratación. Los especímenes se deshidrataron con etanol, se transparentaron con xileno y se incluyeron en parafina usando para ello un procesador automático (Histokinette American Optical). Se realizaron cortes anatómicos de 10 mm de espesor en un microtomo rotatorio.

Los cortes anatómicos se montaron sobre portaobjetos usando adhesivo Haupt (Johansen, 1940). La parafina se removió con xileno y posteriormente los tejidos se hidrataron en etanol. Para la tinción se usó fast green al 0.12 % (en etanol al 96 %) y safranina al 0.5 % (en etanol al 50 %). Finalmente los tejidos se montaron de manera permanente con bálsamo de Canadá.

Una vez obtenidos los cortes anatómicos, éstos fueron observados al microscopio y se registró la información pertinente.

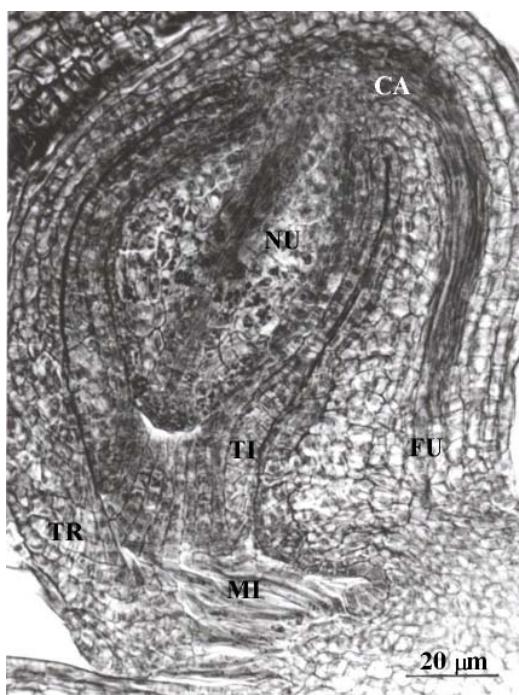
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estructura y desarrollo de óvulos

En los tres portainjertos los óvulos son anátropes, crasinucleados y bitérmicos. El tegumento externo presenta una protuberancia semejante a un obturador y cubre

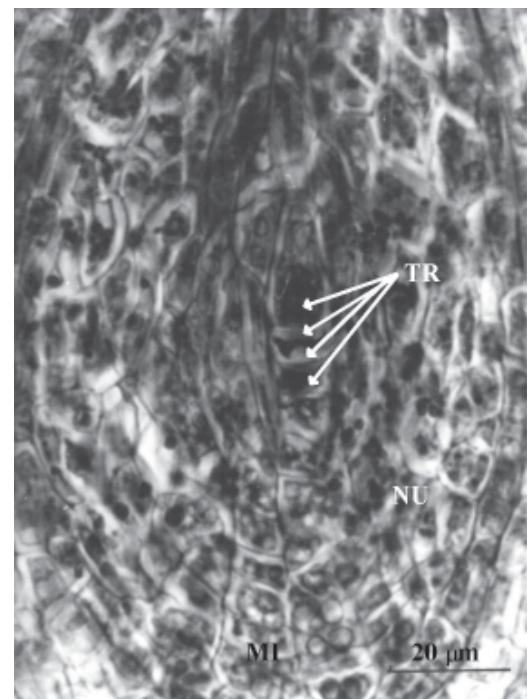
totalmente al tegumento interno. El tegumento externo, en el extremo calazal presenta de seis a ocho estratos celulares, mientras que en el extremo micropilar tiene alrededor de diez. El tegumento interno es delgado, presentando aproximadamente cinco estratos celulares. El micrópilo es poco notorio, pues apenas se percibe una ligera separación en donde convergen los tegumentos. Cerca del área micropilar se hacen patentes pelos epidermales. En la región calazal es notoria la terminación de un haz vascular ovular. En el extremo micropilar de la nucela hay un pequeño espacio entre ésta y el tegumento interno. El tamaño de los óvulos es de aproximadamente 0.5 mm (Figura 1). En la pared interna de los carpelos se observaron pequeñas protuberancias o primordios, originados por divisiones periclinales, las cuales dan origen a las células vesiculares de jugo.

La nucela presenta alrededor de 14 estratos celulares y las células son alargadas en sentido calazal-micropilar. En el extremo micropilar de la nucela se observan al menos dos hileras celulares semejantes a columnas, lo que indica un desarrollo del saco embrionario tipo crasinucleado, tal y como lo definen Foster y Gifford (1974). En la Figura 2 se pueden apreciar las cuatro tétradas, producto de la meiosis en el megasporocito, antes de que aborten tres de ellas



N: U- Nucela  
TE: Tegumento externo  
TI: Tegumento interno  
FU: Funículo  
MI: Micrópilo  
CA: Calasa

FIGURA 1. Corte longitudinal de un óvulo de *Citrus amblycarpa*.



NU: Nucela  
TR: Tétrada  
MI: Micrópilo

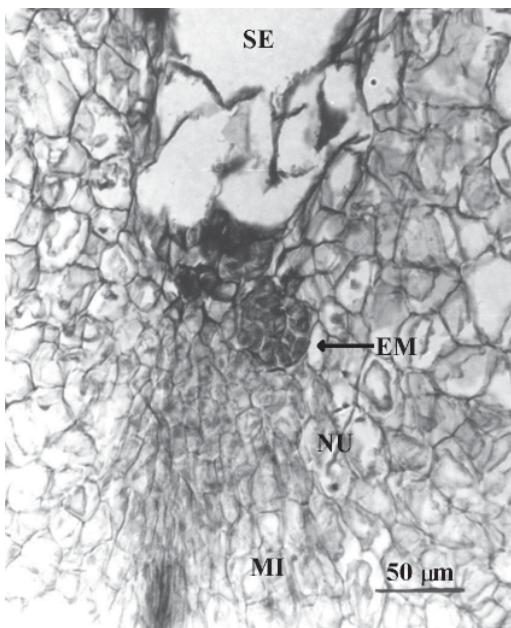
FIGURA 2. Corte longitudinal de la nucela en *Citrus volkameriana*.

para dar origen al saco embrionario. En la Figura 3 se observa el saco embrionario tipo *Polygonum*, que al momento de la apertura floral presenta ocho núcleos, los cuales corresponden a la ovocélula, dos sinérgidas, dos núcleos polares y tres antípodas.

Aparentemente los óvulos en los tres portainjertos estudiados desarrollan aún cuando no hayan sido fecundados, pues en muchos casos se encontró desarrollo de la nucela y los tegumentos sin que se localizara el cigoto, lo cual quiere decir que los óvulos no fecundados abortan algún tiempo después de la floración. En la separación entre la nucela y los tegumentos se localizó una capa de células con alto contenido de taninos, que corresponde a la epidermis interna del tegumento interno (Figura 4).

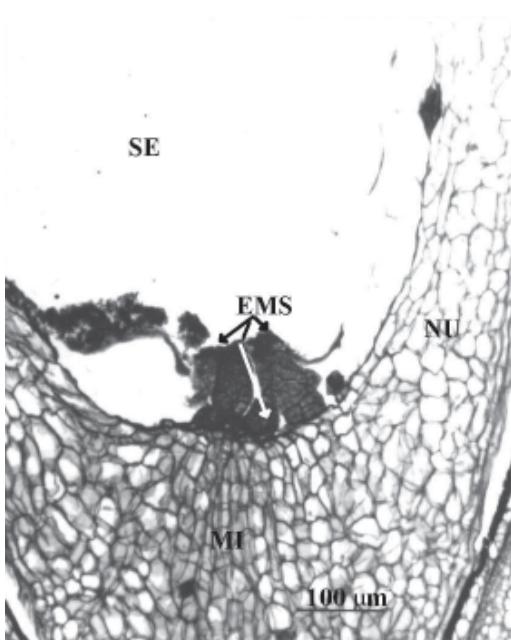
#### Desarrollo de Embriones y Semilla

Las células que producen los embriones nucleares, conocidos como "embriocitos" por Naumova (1993), fueron observadas después de la iniciación de la megagametogénesis, distinguiéndose del resto de las células de la nucela, debido a que presentaban núcleos grandes de forma irregular, con citoplasma denso y paredes engrosadas, tal y como lo reportaron Bruck y Walker (1985) y Koltunow (1993). Como puede observarse en la Figura 3, el embriocito



NU: Nucela  
MI: Micrópilo  
SE: Saco embrionario  
EM: Embriocito (embrión nuclear)

FIGURA 3. Formación de un embriocito en *Citrus reshni*.



EMS: Embiones  
NU: Nucela  
SE: Saco embrionario

FIGURA 4. Formación de embriones en *Citrus reshni*.

es una masa celular redonda, la cual está inmersa entre las células de la nucela, lo que confirma que se trata de un

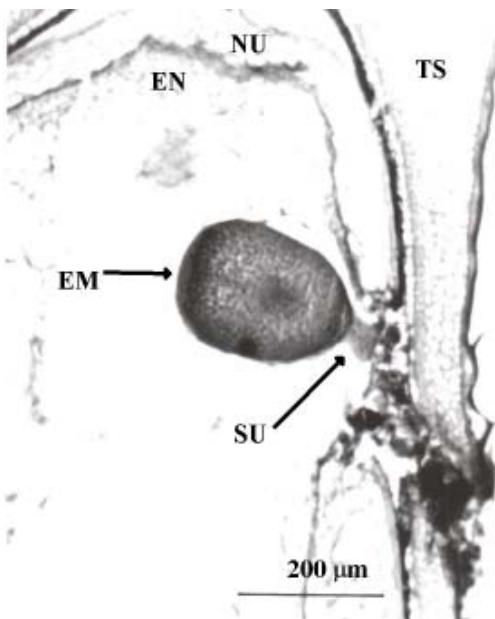
embrión de origen nuclear. Las células nucleares del extremo micropilar son alargadas; en tanto que las células del resto de la nucela son isodiamétricas. Aparentemente la iniciación de embriones nucleares, contrario a lo expresado por Richards (1986), es independiente del desarrollo del embrión cigótico, puesto que en algunos casos se observaron embriocitos sin la presencia de un endospermo y un embrión de origen sexual. Sin embargo, en el desarrollo posterior los embriones nucleares y cigótico coexisten dentro del mismo óvulo y por lo tanto se dice que se trata de una apomixis del tipo facultativo (Richards, 1986). El desarrollo depende de la nutrición proporcionada por el endospermo y para esto debe haber ocurrido la doble fecundación, tal y como lo señalan Wakana y Uemoto (1987), pues de lo contrario los embriones nucleares abortarán. Los embriocitos se originan después de la megagametogénesis, ya sea antes o después de que inicie el desarrollo del embrión de origen sexual, lo cual coincide con lo reportado por Bruck y Walker (1985). Cabe indicar que los embriocitos se encontraron en óvulos de frutos de *C. reshni*, cuyo diámetro ecuatorial fue de 1.5 a 1.7 cm; los óvulos en este momento median 3.5 mm de largo y durante el desarrollo de los embriocitos no se observó la presencia de endospermo.

Prácticamente todos los embriones observados se ubicaron en áreas cercanas al micrópilo, tal y como lo reportó Koltunow (1993), ya sea en las áreas laterales cercanas al micrópilo (Figura 5) o en el extremo micropilar del saco embrionario (Figuras 6 y 7).

En la Figura 4 se muestra la presencia de al menos tres embriones, de los cuales se puede asumir que uno de ellos es de origen sexual y los otros dos de origen nuclear; sin embargo, debido a que todos se ubican cerca del micrópilo es difícil diferenciar entre el embrión sexual y los nucleares. Puede observarse que los tres embriones difieren en su estado de desarrollo, lo cual indica que no todos se iniciaron al mismo tiempo. En este momento las semillas median 3.5 mm de largo y los frutos de 1.5 a 2.3 cm de diámetro ecuatorial en *C. reshni*.

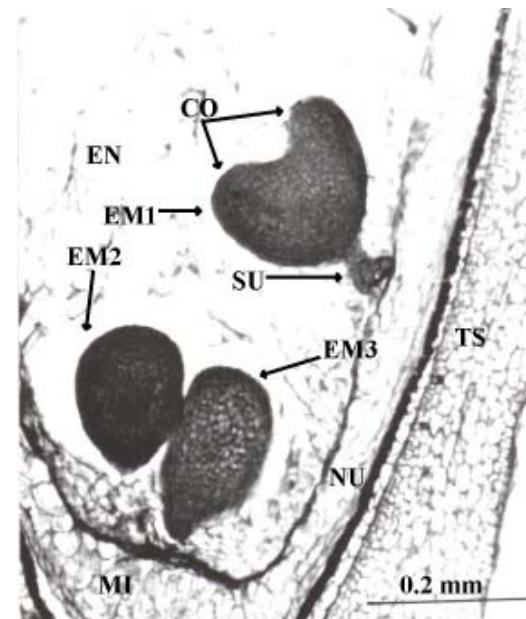
Contrariamente a lo reportado por Esen y Soost (1974), en algunos casos se localizó un embrión hacia un lado del micrópilo, el cual puede asumirse que es de origen cigótico por el hecho de ser único, lo que indica que la posición de los embriones dentro del saco no es una garantía para diferenciar entre embriones nucleares y cigóticos. En la Figura 5 se muestra un embrión lateral único en su etapa de desarrollo globular avanzada en *C. volkameriana*, cuando las semillas median 4 mm de largo y los frutos 5 a 6 cm de diámetro ecuatorial; en este momento la mayor parte del saco embrionario estaba ocupada por el endospermo, ya que de la nucela sólo permanecían de tres a cuatro estratos celulares.

Al desarrollarse dos embriones es posible que se inicien al mismo tiempo, aunque también puede ser que no



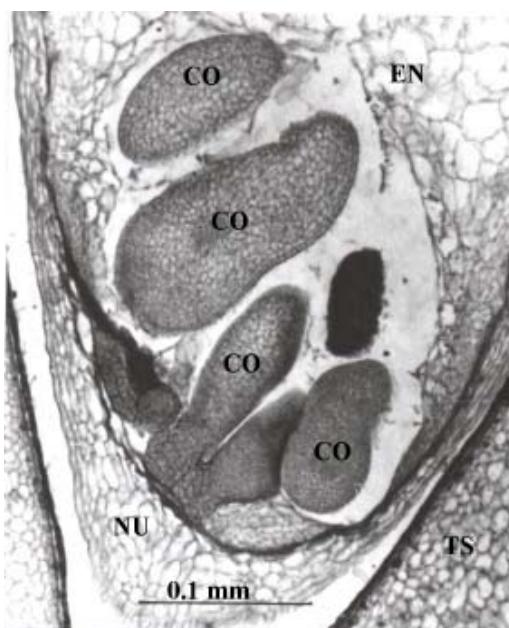
TS: Testa  
EN: Endospermo  
NU: Nucela  
EM: Embrión  
SU: Suspensor

FIGURA 5. Embrión lateral en etapa globular en *Citrus volkameriana*.



EM1: Embrión 1 (etapa de corazón)  
EM2: Embrión 2 (etapa globular)  
EM3: Embrión 3 (etapa globular)  
EN: Endospermo  
NU: Nucela  
CO: Cotiledones  
TS: Testa  
SU: Suspensor  
MI: Micrópilo.

FIGURA 6. Embiones en etapas globular y de corazón en *Citrus volkameriana*.



TS: Testa  
EN: Endospermo  
NU: Nucela  
CO: Cotiledones

FIGURA 7. Producción de embriones múltiples en *Citrus reshni*.

lo hagan, por lo cual tampoco sería un parámetro confiable para diferenciar embriones cigóticos de nucleares. Aunque se ubique un embrión en el micrópilo y el otro lateralmente, ambos se alimentan del endospermo, lo cual puede apreciarse en los embriones de *C. volkameriana*, encontrados en semillas de 4 mm de longitud. En este momento en la región calazal de las semillas se hizo notoria la presencia de seis a ocho estratos celulares que contenían abundantes taninos, y en general las células ubicadas en el extremo calazal eran más alargadas y mucho más pequeñas que las ubicadas en la región micropilar. Al parecer la mayor contribución para la cubierta de la semilla es aportada por el tegumento externo del óvulo, ya que en este momento el tegumento interno estaba compuesto por uno a dos estratos celulares, mientras que el externo estaba conformado por 10 a 20 estratos, encontrándose el mayor número de estratos en la región funicular.

Durante el desarrollo de los embriones es posible que en la etapa de corazón ambos cotiledones desarrollen a la par o que uno tenga un desarrollo más acelerado que el otro, como lo indican Lakshmanan y Ambegaokar (1984). A medida que el embrión desarrolla se va desintegrando el endospermo y adelgazando la nucela; cuando el embrión

tiene una etapa de corazón la semilla tiene aproximadamente 6 mm.

En la Figura 6 se puede apreciar la presencia de tres embriones en *C. volkameriana*, de los cuales dos tienen ubicación micropilar y se encuentran en su etapa globular, mientras que el otro se ubica lateralmente y se encuentra en la etapa de corazón. Por la ubicación de este tercer embrión y su etapa de desarrollo podría asumirse que se inició primero y que probablemente sea de origen nuclear; pero no se puede asegurar, debido a que al iniciarse más embriones dentro de un mismo saco o nucela pueden desplazar a los ya existentes o sufrir ciertos movimientos. Aunque los embriones asexuales inicialmente se encuentran inmersos en la nucela, conforme van creciendo se introducen hacia adentro del saco embrionario, quedando finalmente sólo el suspensor en contacto con la nucela y el embrión en contacto con el endospermo, al cual van digiriendo. Según Wakana y Uemoto (1988), durante las etapas tempranas del desarrollo los embriones nucleares carecen de suspensor; sin embargo, en este estudio desde la etapa globular todos los embriones lo presentaron, y en la etapa de corazón estaba conformado por seis a ocho estratos celulares en sentido longitudinal. En este momento las semillas tenían una longitud de 4.5 mm de largo y los frutos 6.5 cm de diámetro ecuatorial.

Es probable que el número de embriones dentro de una semilla tenga relación con el tamaño de ésta; sin embargo, sería necesario hacer mayor número de muestreos y seguir el estudio hasta el desarrollo completo de la semilla. En la Figura 7 puede apreciarse que al menos existen tres embriones en etapas de desarrollo de corazón o torpedo, y al encontrarse mayor número de embriones en contacto con el endospermo éste se digiere mucho más rápido, lo cual indica que al iniciarse muchos embriones es probable que algunos de ellos aborten en una etapa temprana de su desarrollo por falta de reservas. En este momento las semillas tenían una longitud de 5 mm y los frutos 2.3 a 3 cm de diámetro ecuatorial en *C. reshni*.

Cuando se forma un solo embrión dentro de una semilla es más probable que los dos cotiledones desarrollen más uniformemente; sin embargo, cuando se forman más de un embrión, tanto éstos como los cotiledones presentan tamaños diferentes, tratando de acomodarse en el espacio determinado por el tamaño de las cubiertas de las semillas. En los cítricos normalmente no ocurre la etapa de flexión del embrión cuando se trata de uno solo, pero cuando existen más de uno pueden flexionarse para acomodarse dentro de la semilla. Si los cotiledones crecen de manera vertical, después de la etapa de torpedo se desarrolla el meristemo apical que dará origen al vástago, se inicia la radícula que dará origen a la raíz embrionaria y se inicia la formación del sistema vascular (Figura 8). Conforme crecen los cotiledones, se acumula almidón, el cual servirá para alimentar la nueva plántula cuando la semilla germine. En

este momento las células de los cotiledones tienen paredes gruesas y citoplasma denso; los embriones tenían por lo menos 6 mm de largo y los frutos 4 a 6 cm de diámetro ecuatorial. La cubierta seminal esta compuesta por una capa de mucílago, la testa y la pared interna de la cubierta.

### Anteras

En *C. amblycarpa* y *C. volkameriana* las anteras desarrollaron polen de manera normal; presentando dos tecas, cuatro sacos polínicos y una pared compuesta por la epidermis, las capas medias y el endotecio; sin embargo, en *C. reshni* las anteras iniciaron su desarrollo, pero en alguna etapa de la microsporogénesis las células madre de los granos de polen abortaron, ya que las anteras estaban vacías y colapsadas en flores completamente desarrolladas. En este caso las paredes de las anteras estaban anormalmente engrosadas.

### CONCLUSIONES

En los tres portainjertos estudiados se observó que los embriones apomicticos se desarrollaron dentro de la nucela. A partir de su etapa globular presentaron suspensor.

No fue posible identificar anatómicamente el origen de los embriones basándose únicamente en su morfología y posición dentro del saco embrionario, debido a que éstos



CO: Cotiledones  
RA: Radícula  
MA: Meristemo apical

FIGURA 8. Embrión en etapa de torpedo en *Citrus volkameriana*.

desarrollaron tanto en el extremo nucelar micropilar del saco embrionario, como en las áreas laterales del micrópilo y cambiaron de posición durante su desarrollo.

#### LITERATURA CITADA

- ANDRADE R., M. 2002. Poliembrión e identificación de plántulas cigóticas y nucleares de tres portainjertos y un cultivar de cítricos mediante RAPD's. Tesis de Doctor en Ciencias. Programa en Genética. IRGEP-Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 122 p.
- BORGES DO VALLE, C.; MILES, J. W. 2001. Breeding of apomictic species, pp. 137-152. In: The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering. SAVIDAN Y.; GARMAN, J. G.; DRESSELHAUS, T. (eds.). CIMMYT, IRD, The European Commission DG VI (FAIR). D. F., México.
- BRUCK, D. K.; WALKER, D. B. 1985. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jarmhiri*. I. Ontogeny of the epidermis. *Botanical Gazete* 146: 188-195.
- CRANE, CH. F. 2001. Classification of apomictic mechanisms, pp. 24-43 In: The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering. SAVIDAN Y.; GARMAN; J. G. DRESSELHAUS, T. (eds.). CIMMYT, IRD, The European Commission DG VI (FAIR). D. F., México.
- ESEN, A.; SOOST, R. K. 1974. Inherence of browning of young-shoot extracts of *Citrus*. *Journal of Heredity* 65: 97-100.
- FROST, H. B.; SOOST R. K. 1968. Seed reproduction: development of gamets and embryos, pp. 290-324. In: The Citrus Industry, Vol. 2. REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEBBER H. J. (eds.). Division of Agriculture and Science, University of California Press. Berkeley, Cal., USA.
- FOSTER, A. S; GIFFORD, E.M. Jr. 1974. Comparative Morphology of Vascular Plants. W. H. Freeman and Co. San Francisco, Cal., USA. 751 p.
- GARCÍA, E. 1973. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Segunda Edición. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. D. F., México. F. 246 p.
- GRIMANELLI, D.; TOHME, J.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D. 2001. Applications of molecular genetics in apomixis research, pp. 83-94. In: The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering. SAVIDAN Y.; GARMAN; J. G. DRESSELHAUS, T. (eds.). CIMMYT, IRD, The European Commission DG VI (FAIR). D. F., México.
- IGLESIAS, L.; LIMA, H.; SIMON J. P. 1974. Isoenzyme identification of zygotic and nucellar seedling in *Citrus*. *Journal of Heredity* 65: 81-84.
- JOHANSEN, D. A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill. New York, USA. 503 p.
- KOLTUNOW, A. M. 1993. Apomixis: Embryos sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell* 5: 1425-1437.
- LAKSHMANAN, K. K.; AMBEGAOKAR K. B. 1984. Poliembryony, pp. 445-474. In: Embriology of Angiosperms. JOHRI, B. M. (ed.). Berlin: Springer-Verlag. New York, USA.
- NAUMOVA, T. N. 1993. Apomixis in Angiosperms: Nucellar and Integumentary Embryony. CRC Press. Boca Raton, Fl., USA. 144 p.
- NAUMOVA, T. N. VIELLE-CALZADA, JEAN-PHILIPPE. 2001. Ultrastructural analysis of apomictic development, pp. 44-63. In: The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering. SAVIDAN Y.; GARMAN; J. G. DRESSELHAUS, T. (eds.). CIMMYT, IRD, The European Commission DG VI (FAIR). D. F., México.
- NOGLER, G. A. 1984. Gametophytic apomixis, pp. 475-518. In: Embriology of Angiosperms. JOHRI, B. M. (ed.). Berlin: Springer-Verlag. New York, USA.
- RICHARDS, A. J. 1986. Plant Breeding Systems. George Allen and Unwin. London, UK. 529 p.
- SEDGLEY, M.; GRIFFIN, A. R. 1989. Sexual Reproduction of Tree Crops. Academic Press Inc. London, UK. 378 p.
- WAKANA, A.; UEMOTO S. 1987. Adventive embryogenesis in *Citrus*. I. The occurrence of adventive embryos without pollination or fertilization. *American Journal of Botany* 74(4): 517-530.
- WAKANA, A.; UEMOTO, S. 1988. Adventive embryogenesis in *Citrus*. II. Postfertilization development. *American Journal of Botany* 75(7): 1031-1047.