

Methods for estimating the level of polyembryony in Mexican lime and Italian lemon seeds

Métodos para estimar el nivel de poliembrionía en semillas de lima mexicana y limón italiano

Marciano Manuel Robles-González^{1*}; Silvia Heréndira Carrillo-Medrano¹; Miguel Ángel Manzanilla-Ramírez¹; Víctor Manuel Medina-Urrutia^{1,2}

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias - Campo Experimental Tecmán. Carretera Colima-Manzanillo km 35, Tecmán, Colima, C. P. 28100, MÉXICO.

²Universidad de Guadalajara. Carretera Guadalajara-Nogales km 15.5, Zapopan, Jalisco, C. P. 44150, MÉXICO.

*Corresponding author: mmroble55@hotmail.com

Abstract

Polyembryony is a common trait in most citrus varieties. The level of polyembryony has the potential to be used as a descriptor in the characterization of varieties or to select parents in conventional hybridization work. The aim of this research was to find an efficient methodology to detect, count and estimate the potential number of embryos per seed, the percentage of polyembryonic seeds and the level of polyembryony in the varieties 'Colimex' and 'Lise' of Mexican lime, and the variety 'Rosenberger' of true lemon. Four methodologies were evaluated: 1) direct counting of embryos in mature seeds (DCEMS), 2) direct counting of embryos in immature seeds (DCEIS), 3) counting of seedlings derived from mature seeds germinated *in vitro* (CSMSGV) and 4) counting of seedlings derived from mature seeds germinated in substrate (CSMSGS). The highest averages of embryos per seed and percentage of polyembryonic seeds were recorded with the DCEMS and CSMSGV methods ($P \leq 0.01$), so it was concluded that they are adequate to estimate these variables in the genotypes studied. The varieties 'Colimex' and 'Lise' had 80.65 and 78.27 %, respectively, of seeds with two or more embryos, resulting in a high level of polyembryony, while 'Rosenberger', with 18.37 %, was slightly polyembryonic ($P \leq 0.01$).

Keywords: *Citrus aurantifolia*, seeds, sporophytic apomixis, multiple embryony, nucellar embryos.

Resumen

La poliembrionía es un rasgo común en la mayoría de las variedades de cítricos. El nivel de poliembrionía tiene potencial para usarse como un descriptor en la caracterización de variedades o para seleccionar progenitores en trabajos de hibridación convencional. El objetivo de este trabajo fue encontrar una metodología eficiente para detectar, contabilizar y estimar el número potencial de embriones por semilla, el porcentaje de semillas poliembriónicas y el nivel de poliembrionía en las variedades 'Colimex' y 'Lise' de lima mexicana, y la variedad 'Rosenberger' de limón verdadero. Se evaluaron cuatro metodologías: 1) conteo directo de embriones en semillas maduras (CDESM), 2) conteo directo de embriones en semillas inmaduras (DCEIS), 3) conteo de plántulas originadas de semillas maduras germinadas *in vitro* (CPSMGV) y 4) conteo de plántulas originadas de semillas maduras germinadas en sustrato (CPSMGS). Los mayores promedios de embriones por semilla y porcentaje de semillas poliembriónicas se registraron con los métodos CDESM y CPSMGV ($P \leq 0.01$), por lo cual se concluyó que son adecuados para estimar estas variables en los genotipos estudiados. Las variedades 'Colimex' y 'Lise' presentaron 80.65 y 78.27 %, respectivamente, de semillas con dos o más embriones, lo cual resultó en un alto nivel de poliembrionía, mientras que 'Rosenberger', con 18.37 %, fue ligeramente poliembriónico ($P \leq 0.01$).

Palabras clave: *Citrus aurantifolia*, semillas, apomixis esporofítica, embrión múltiple, embriones nucelares.



Introduction

Polyembryony results from a biological process known as sporophytic apomixis, which involves the autonomous development of multiple embryos of nucellar origin (in addition to the zygotic or sexual embryo) in the same seed (Nakano et al., 2012; Kishore, 2014). This mechanism is a form of asexual reproduction through seeds resulting in offspring that are genetically identical to the mother plant (Conner et al., 2015; Zhang et al., 2018; Xu et al., 2021); moreover, it is a heritable trait found in many citrus varieties (Kepiro & Roose, 2010; Woo et al., 2019).

Polyembryony is important in citrus breeding because it is exploited for several purposes, such as rejuvenating old clones that have lost their vigor because of continuous vegetative propagation (Mondal et al., 2015), fixing valuable traits, and preserving the hybrid vigor of highly productive genotypes (Hand & Koltunov, 2014; Conner et al., 2015; Sailer et al., 2016; Fiaz et al., 2021). As it is a vegetative propagation generated through seed, recombination and segregation associated with sexual reproduction of hybrid plants are avoided (Wang et al., 2017). Furthermore, this mechanism is important because it represents a low-cost, disease-free, genetically identical rootstock propagation method (Kepiro & Roose, 2007; Shimada et al., 2018), which reduces the possibility of generating segregating zygotic plants, which may lose the quality attributes of that rootstock (Kepiro & Roose, 2007).

Polyembryony is a heritable trait, although the genetic mechanism governing it is not fully determined. García et al. (1999), when studying a progeny population from a cross between *C. volkameriana* × *P. trifoliata*, deduced that apomixis in citrus is controlled by six loci. In turn, Hong et al. (2001), based on the results of crossing monoembryonic mandarins (*C. clementina*) and polyembryonic oranges (*C. sinensis*), proposed a possible control mechanism of apomixis in the genera *Citrus* and *Poncirus*, which involves two complementary dominant genes (called A1 and A2).

Somatic embryogenesis processes in citrus have been reported to depend on one or a few genes (García et al., 1999; Hong et al., 2001; Kepiro & Roose, 2010). Furthermore, most polyembryony is most likely controlled by a dominant gene in the heterozygous state (Kishore, 2014), although modifier genes and minor genes are also present, which influence the proportions of polyembryonic seeds and the level of polyembryony, respectively (Kepiro & Roose, 2010; Simsek et al., 2018). Major and minor genes generate a diversity of genotypes that produce seeds with more than one embryo, a stable trait among commercial citrus varieties (Kepiro & Roose, 2010) and specific to each genotype with respect to a given region (Kashyap et al., 2018).

Introducción

La poliembrionía es resultado de un proceso biológico conocido como apomixis esporofítica, el cual conlleva el desarrollo autónomo de múltiples embriones de origen nucelar (además del embrión cigótico o sexual) en una misma semilla (Nakano et al., 2012; Kishore, 2014). Este mecanismo es una forma de reproducción asexual a través de semillas, que resulta en réplicas genéticas de la planta madre (Conner et al., 2015; Zhang et al., 2018; Xu et al., 2021); además, es un rasgo hereditario que se encuentra en muchas variedades de cítricos (Kepiro & Roose, 2010; Woo et al., 2019).

La poliembrionía es importante en el cultivo de cítricos debido a que se aprovecha para varios fines, como rejuvenecer clones viejos que han perdido su vigor a consecuencia de la continua propagación vegetativa (Mondal et al., 2015), fijar rasgos valiosos y preservar el vigor híbrido de genotipos altamente productivos (Hand & Koltunov, 2014; Conner et al., 2015; Sailer et al., 2016; Fiaz et al., 2021). Al ser una propagación vegetativa generada a través de semilla, se evita la recombinación y la segregación asociada con la reproducción sexual de plantas híbridas (Wang et al., 2017). Además, dicho mecanismo es importante porque representa un método de reproducción de portainjertos genéticamente idénticos, libres de enfermedades y de bajo costo (Kepiro & Roose, 2007; Shimada et al., 2018), lo cual reduce la posibilidad de generar plantas cigóticas segregantes, que pueden perder los atributos de calidad de ese portainjerto (Kepiro & Roose, 2007).

La poliembrionía es una característica heredable, aunque el mecanismo genético que lo gobierna no está totalmente determinado. García et al. (1999), al estudiar una población progenie de la cruce entre *C. volkameriana* × *P. trifoliata*, dedujeron que en cítricos la apomixis está controlada por seis loci. Por su parte, Hong et al. (2001), con base en los resultados de la cruce de mandarinas (*C. clementina*) monoembriónicas y naranjas (*C. sinensis*) poliembriónicas, propusieron un posible mecanismo de control de la apomixis en los géneros *Citrus* y *Poncirus*, el cual involucra dos genes dominantes complementarios (denominados A1 y A2).

Se ha reportado que los procesos de embriogénesis somática en los cítricos dependen de uno o pocos genes (García et al., 1999; Hong et al., 2001; Kepiro & Roose, 2010). Además, es muy probable que la mayor parte de la poliembrionía esté controlada por un gen dominante en estado heterocigoto (Kishore, 2014), aunque también están presentes genes modificadores y genes menores, los cuales influyen en las proporciones de semillas poliembriónicas y en el nivel de poliembrionía, respectivamente (Kepiro & Roose, 2010; Simsek et al., 2018). Los genes mayores y menores generan una diversidad de genotipos que producen semillas con

The percentage of polyembryonic seeds and the average number of embryos per seed can be used to identify monoembryonic genotypes or those with a low percentage of polyembryonic seeds, desirable attributes in breeding programs by conventional hybridization (Pérez-Tornero & Porras, 2008). This is because these genotypes facilitate obtaining hybrid plants; in addition, they can be used as varietal descriptors for the morphological characterization of accessions in germplasm banks (International Plant Genetic Resources Institute [IPGRI], 2000; Woo et al., 2019) and the identification of genotypes with potential for use as rootstock. In this case, genotypes with a high percentage of polyembryonic seeds (with nucellar embryos that generally give rise to uniform plants) are desirable, since, by maintaining their genetic uniformity, they retain their characteristics of tolerance/resistance to biotic and abiotic factors, compatibility with the variety and their level of polyembryony (Arruda et al., 2018).

Polyembryony also has undesirable aspects for citrus breeding, especially in conventional hybridization (Wang et al., 2017; Simsek et al., 2018; Xu et al., 2021). In polyembryonic seeds, embryos of nucellar origin are more vigorous and compete with the zygotic or sexual embryo for both space and nutrients within the seed, and generally eliminate it from early stages of their development (Moore et al., 1993). For this reason, monoembryonic parents, which produce only zygotic seedlings, are preferred by citrus breeders (Singh et al., 2018).

Different strategies or methodologies have been used to estimate polyembryony in citrus. Andrade-Rodríguez et al. (2004), Pérez-Tornero and Porras (2008) and Kashyap et al. (2018) used the direct embryo counting method on seeds obtained from mature fruit, while Shinde et al. (2007) and Kepiro and Roose (2010) estimated polyembryony indirectly by counting seedlings derived from mature polyembryonic seeds germinated in soil or substrates. Bowman et al. (1995) and Guerra et al. (2012) used both methods simultaneously.

Methods using germination of mature seeds (in substrate or soil) have the drawback that small embryos, contained in polyembryonic seeds, lack the energy to germinate and develop a seedling under these conditions (Andrade-Rodríguez et al., 2004); consequently, these ungerminated embryos are not detected and counted, resulting in an inadequate estimation of the number of embryos per seed and percentage of polyembryony. Woo et al. (2019) analyzed mature seeds from different citrus trees to determine whether they were monoembryonic or polyembryonic, but did not determine their level of polyembryony. Other studies have used ovules and microscopy

más de un embrión, característica estable entre las variedades de cítricos comerciales (Kepiro & Roose, 2010) y específica para cada genotipo con respecto a una región determinada (Kashyap et al., 2018).

El porcentaje de semillas poliembriónicas y el promedio de embriones por semilla se pueden utilizar para identificar genotipos monoembriónicos o con bajo porcentaje de semillas poliembriónicas, atributos deseables en programas de mejoramiento genético por hibridación convencional (Pérez-Tornero & Porras, 2008). Lo anterior debido a que estos genotipos facilitan la obtención de plantas híbridas; además, se pueden utilizar como descriptores varietales para la caracterización morfológica de las accesiones en bancos de germoplasma (International Plant Genetic Resources Institute [IPGRI], 2000; Woo et al., 2019) y la identificación de genotipos con potencial de uso como portainjerto. En este caso, son deseables los genotipos con alto porcentaje de semillas poliembriónicas (con embriones nucleares que generalmente originan plantas uniformes), ya que, al mantener su uniformidad genética, conservan sus características de tolerancia/resistencia a factores bióticos y abióticos, la compatibilidad con la variedad y su nivel de poliembriónia (Arruda et al., 2018).

La poliembriónia también tiene aspectos no deseados para el mejoramiento genético de los cítricos, especialmente en la hibridación convencional (Wang et al., 2017; Simsek et al., 2018; Xu et al., 2021). En las semillas poliembriónicas, los embriones de origen nucelar son más vigorosos y compiten con el embrión cigótico o sexual, tanto por espacio como por nutrientes dentro de la semilla, y generalmente lo eliminan desde etapas tempranas de su desarrollo (Moore et al., 1993). Por esta razón, los progenitores monoembriónicos, que producen solo plántulas cigóticas, son preferidos por los mejoradores de cítricos (Singh et al., 2018).

Distintas estrategias o metodologías se han utilizado para estimar la poliembriónia en cítricos. Andrade-Rodríguez et al. (2004), Pérez-Tornero y Porras (2008) y Kashyap et al. (2018) utilizaron el método de conteo directo de embriones en las semillas obtenidas de fruta madura, mientras que Shinde et al. (2007) y Kepiro y Roose (2010) estimaron la poliembriónia de manera indirecta mediante el conteo de plántulas originadas de semillas poliembriónicas maduras germinadas en suelo o sustratos. Por su parte, Bowman et al. (1995) y Guerra et al. (2012) emplearon simultáneamente ambos métodos.

En particular, los métodos que utilizan la germinación de semillas maduras (en sustrato o suelo) tienen el inconveniente de que los embriones pequeños, contenidos en las semillas poliembriónicas, carecen de energía para germinar y desarrollar una plántula en esas condiciones (Andrade-Rodríguez et al., 2004); en consecuencia, esos embriones no germinados no

techniques to elucidate the origin of nucellar embryos (Sánchez-Damas et al., 2006).

A good method for estimating the level of seed polyembryony should not underestimate the average number of embryos per seed or the percentage of polyembryonic seeds. To do this, it is necessary to determine the appropriate time for seed development and a methodology to sample and count the embryos that polyembryonic seeds have the capacity to produce. This is to minimize the number of embryos that cannot be detected and, therefore, are not counted.

Regarding the sample size to study polyembryony, Santos et al. (2015) used direct embryo counting in 15 rootstock species, and with the maximum curvature equations method determined that it was advisable to use a minimum of 23 seeds for the purposes of estimating the level of polyembryony and the average number of embryos.

To date, there have been no studies on the aforementioned variables of polyembryony in Mexican lime, nor a reliable method for their estimation. Therefore, the aim of this research was to find an efficient methodology to detect, count and estimate the potential number of embryos per seed, the percentage of polyembryonic seeds and the level of polyembryony in the 'Colimex' and 'Lise' varieties of Mexican lime, and the 'Rosenberger' variety of true lemon.

Materials and methods

The study was carried out between 2019 and 2021 at the facilities of the Tecomán experimental field of the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research (INIFAP), located in Colima, Mexico (18° 53' 7 NL and 103° 50' 30 WL). The study used four-year-old trees of the 'Colimex' and 'Lise' varieties of Mexican lime, and four trees of the 'Rosenberger' variety of true lemon, grafted on *C. macrophylla* Wester, all from the citrus germplasm bank and an experimental lot.

Four strategies for embryo counting were evaluated, which included two stages of seed development and two ways of making observations to estimate the number of embryos per seed and the percentage of polyembryonic seeds: 1) direct counting of embryos in mature seeds (DCEMS), 2) direct counting of embryos in immature seeds (DCEIS), 3) counting of seedlings derived from mature seeds germinated *in vitro* (CSMSGV) and 4) counting of seedlings derived from mature seeds germinated in substrate (CSMSGS).

Direct counting of embryos in mature seeds

On November 08, 2020 and April 21, 2021, well-developed, open-pollinated fruit with green skin

son detectados ni contabilizados, lo cual provoca una estimación inadecuada del número de embriones por semilla y porcentaje de poliembriónia. Woo et al. (2019) analizaron semillas maduras de distintos cítricos para determinar si eran monoembriónicas o poliembriónicas, pero no determinaron su nivel de poliembriónia. En otros trabajos se han utilizado óvulos y técnicas de microscopía para dilucidar el origen de los embriones nucleares (Sánchez-Damas et al., 2006).

Un buen método para estimar el nivel de poliembriónia de las semillas no debe subestimar el promedio de embriones por semilla ni el porcentaje de semillas poliembriónicas. Para ello, es necesario determinar el momento adecuado del desarrollo de las semillas y una metodología para muestrear y contar los embriones que las semillas poliembriónicas tienen capacidad de producir. Esto para reducir al mínimo el número de embriones que no puedan ser detectados y, por lo tanto, no son contabilizados.

En cuanto al tamaño de la muestra para estudiar la poliembriónia, Santos et al. (2015) usaron el conteo directo de embriones en 15 especies de portainjertos, y con el método de ecuaciones de máxima curvatura determinaron que era recomendable utilizar un mínimo de 23 semillas para efectos de estimar el nivel de poliembriónia y el número promedio de embriones.

Hasta el momento, no se cuenta con información de estudios sobre las variables mencionadas de poliembriónia en lima mexicana, ni de un método confiable para su estimación. Por ello, el objetivo de este trabajo fue encontrar una metodología eficiente para detectar, contabilizar y estimar el número potencial de embriones por semilla, el porcentaje de semillas poliembriónicas y el nivel de poliembriónia en las variedades 'Colimex' y 'Lise' de lima mexicana, y la variedad 'Rosenberger' de limón verdadero.

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo entre 2019 y 2021 en las instalaciones del campo experimental Tecomán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Colima, México (18° 53' 7 LN y 103° 50' 30 LO). Se utilizaron 10 árboles de cuatro años de las variedades 'Colimex' y 'Lise' de lima mexicana, y cuatro árboles de la variedad 'Rosenberger' de limón verdadero, injertados sobre *C. macrophylla* Wester; todos procedentes del banco de germoplasma de cítricos y un lote de experimentación.

Se evaluaron cuatro estrategias para el conteo de embriones, las cuales incluyeron dos etapas del desarrollo de las semillas y dos formas de realizar las observaciones para estimar el número de embriones por semilla y el porcentaje de semillas poliembriónicas:

were collected. For the 'Colimex' and 'Lise' varieties, the fruit had between 90 to 100 days of development from anthesis, and 120 to 130 days in the case of the 'Rosenberger' variety trees. All fruit were cut between 5 and 8 mm deep in the equatorial zone, and by turning the halves in opposite directions they were split in two and the seeds extracted. Under the lens of a stereo microscope (BA200, Motic®, China), and with the aid of dissecting forceps and scalpel, a longitudinal cut was made in the seed coats and the embryogenic masses were removed. Embryos were separated and arbitrarily classified into three categories: large (more than 5.0 mm), medium (3.0 to 5.0 mm) and small (less than 3.0 mm). For each seed, the number and size of embryos were recorded individually. A total of 346 seeds of 'Colimex', 276 of 'Lise' and 168 of 'Rosenberger' were analyzed.

Direct counting of embryos in immature seeds

On July 9 and 19, 2019 and April 6, 2021, tender, open-pollinated fruit, approximately 60 days from anthesis and with 1.6 to 2.4 cm in equatorial diameter, were collected for the 'Colimex' and 'Lise' varieties, and on May 20, 2019 and May 12, 2021, with 70 to 75 days from anthesis and 2.9 to 3.7 cm in equatorial diameter, fruit of the 'Rosenberger' variety were collected. The fruit were split in two, as mentioned above, and the immature seeds were extracted. Under the lens of a stereo microscope (BA200, Motic®, China), and with the aid of dissecting forceps and a scalpel, a longitudinal cut was made in the seed coats and the embryos were extracted. The number of embryos per seed was recorded, as well as their morphological development stage, which varied from globular, heart, torpedo to cotyledonary (Andrade-Rodríguez et al., 2004). A total of 273 seeds of 'Colimex', 190 of 'Lise' and 229 of 'Rosenberger' were analyzed.

Counting of seedlings derived from mature seeds germinated *in vitro*

On August 27, 2019 and September 23, 2020, fully-developed, open-pollinated fruit with green skin color and 90 to 110 days old from anthesis of the 'Colimex' and 'Lise' varieties, and 120 to 130 days old in the case of the 'Rosenberger' variety were collected. The fruit were superficially disinfected in the laboratory by immersion for 15 min in a solution of 2.0 % sodium hypochlorite plus 0.5 % Tween 20. Subsequently, under aseptic conditions, they were rinsed three times with sterile water, then split in two (as mentioned above) and the seeds extracted. Under the lens of a stereo microscope (BA200, Motic®, China), and with the aid of dissecting forceps and a scalpel, a longitudinal cut was made in the seed coats and the embryos or embryogenic masses were extracted. Immediately, two seeds were sown per 25 × 150 mm test tube.

1) conteo directo de embriones en semillas maduras (CDESM), 2) conteo directo de embriones en semillas inmaduras (CDESI), 3) conteo de plántulas originadas de semillas maduras germinadas *in vitro* (CPSMGV) y 4) conteo de plántulas originadas de semillas maduras germinadas en sustrato (CPSMGS).

Conteo directo de embriones en semillas maduras

Los días 08 de noviembre de 2020 y 21 de abril de 2021 se colectaron frutos de polinización libre, bien desarrollados y con cáscara de color verde. En el caso de las variedades 'Colimex' y 'Lise', los frutos tuvieron entre 90 a 100 días de desarrollo a partir de la antesis, mientras que los frutos de la variedad 'Rosenberger' tuvieron entre 120 y 130 días. Todas las frutas se cortaron entre 5 y 8 mm de profundidad en la zona ecuatorial, y mediante un giro en sentido opuesto de las mitades se partieron en dos y se extrajeron las semillas. Bajo el lente de un microscopio estereoscópico (BA200, Motic®, China), y con ayuda de pinzas de disección y bisturí, se hizo un corte longitudinal en las cubiertas de las semillas y se extrajeron las masas embriogénicas. Los embriones se separaron y se clasificaron arbitrariamente en tres categorías: grandes (más de 5.0 mm), medianos (3.0 a 5.0 mm) y pequeños (menos de 3.0 mm). Para cada semilla, se registró el número y tamaño de los embriones de manera individual. Se analizaron 346 semillas de 'Colimex', 276 de 'Lise' y 168 de 'Rosenberger'.

Conteo directo de embriones en semillas inmaduras

Los días 09 y 19 de julio de 2019 y 06 de abril de 2021 se colectaron frutos tiernos, de polinización libre, de aproximadamente 60 días desde la antesis y con 1.6 a 2.4 cm de diámetro ecuatorial para las variedades 'Colimex' y 'Lise', y el 20 mayo de 2019 y 12 de mayo de 2021, con 70 a 75 días desde la antesis y 2.9 a 3.7 cm de diámetro ecuatorial se colectaron los frutos de la variedad 'Rosenberger'. Las frutas se partieron en dos, como se mencionó anteriormente, y se extrajeron las semillas inmaduras. Bajo el lente de un microscopio estereoscópico (BA200, Motic®, China), y con ayuda de pinzas de disección y bisturí, se hizo un corte longitudinal en las cubiertas de las semillas y se extrajeron los embriones. Se registró el número de embriones por semilla, así como su estadio de desarrollo morfológico, el cual varió desde globular, corazón, torpedo hasta cotiledonar (Andrade-Rodríguez et al., 2004). Se analizaron de 273 semillas de 'Colimex', 190 de 'Lise' y 229 de 'Rosenberger'.

Conteo de plántulas originadas de semillas maduras germinadas *in vitro*

Los días 27 de agosto de 2019 y 23 de septiembre de 2020 se colectaron frutos de polinización libre, totalmente desarrollados, con color de cáscara verde y de 90 a 110 días de edad contados a partir de la

Murashige and Skoog (1962) culture medium, with 75 g·L⁻¹ sucrose added, pH 5.7, solidified with 8.0 g·L⁻¹ agar and autoclaved at 120 °C and 1.05 kg·cm⁻², was used. Cultures were brought to a dark environment at 27 ± 2 °C for the first 12 days and subsequently exposed to natural light (1,000 Lux, measured with a luxmeter 840006, Sper Scientific, Taiwan). After 24 days, the number of seedlings emerged from each seed was recorded. A total of 172 seeds of 'Colimex', 172 of 'Lise' and 148 of 'Rosenberger' were analyzed.

Counting of seedlings derived from mature seeds germinated in substrate

For this methodology, some of the fruit collected in the previous experiment were used. A mixture prepared with silt-textured soil and coconut dust was placed in plastic seed start containers measuring 60 × 30 cm at the base and 40 cm high. Small furrows 0.5 cm deep and 4.0 cm apart were created. The seeds extracted the previous day were placed horizontally 3.0 cm apart inside the furrows and covered with a layer of sand. Sufficient irrigation was applied to moisten the substrate, and a shade structure, constructed with coconut palapas, was placed at a height of 20 cm. Irrigation was applied three times a week. After 35 days, the seeds were removed from the substrate and the total number of emerged seedlings, including malformed seedlings, was counted. A total of 220 seeds of 'Colimex', 184 of 'Lise' and 224 of 'Rosenberger' were analyzed.

Statistical analysis

From the data recorded for each variety and each method, four groups or replicates were made. To calculate the average number of embryos per seed, the total number of embryos detected was divided by the total number of seeds observed or, where appropriate, the number of seedlings emerged from germinated seeds was divided by the total number of seeds sown *in vitro* or in substrate. To calculate the percentages of polyembryonic seeds, the number of seeds with two or more embryos, or two or more seedlings, was divided by the total number of seeds observed and multiplied by 100. Percentage values were transformed into arc sine values using the equation: $y = (\text{arc sine } (\sqrt{x/100}) \times 57.3)$. The frequencies of seeds that presented the different numbers of embryos detected were determined. Statistical analysis was done using a 4 × 3 factorial arrangement with four replications and a minimum of 43 seeds as the experimental unit. Means were compared using Tukey's test ($P \leq 0.05$). The Statistix ver. 9 (2008) statistical software package was used.

antes de las variedades 'Colimex' y 'Lise', y de 120 a 130 días en el caso de la variedad 'Rosenberger'. Los frutos se desinfectaron superficialmente en laboratorio mediante inmersión durante 15 min en una solución de hipoclorito de sodio al 2.0 %, más 0.5 % de Tween 20. Posteriormente, y en condiciones asépticas, se realizaron tres enjuagues con agua estéril, luego se partieron en dos (como se mencionó anteriormente) y se extrajeron las semillas. Bajo el lente de un microscopio estereoscópico (BA200, Motic®, China), y con ayuda de pinzas de disección y bisturí, se hizo un corte longitudinal en las cubiertas de la semilla y se extrajeron los embriones o masas embriogénicas. Inmediatamente, se sembraron dos semillas por cada tubo de ensaye de 25 × 150 mm. Se usó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), adicionado con 75 g·L⁻¹ de sacarosa, pH de 5.7, solidificado con 8.0 g·L⁻¹ de agar y esterilizado en autoclave a 120 °C y 1.05 kg·cm⁻². Los cultivos se llevaron a un ambiente oscuro a 27 ± 2 °C durante los primeros 12 días y, posteriormente, se expusieron a luz natural (1,000 Lux, medida con un luxómetro 840006, Sper Scientific, Taiwán). A los 24 días se registró el número de plántulas emergidas de cada semilla. Se analizaron 172 semillas de 'Colimex', 172 de 'Lise' y 148 de 'Rosenberger'.

Conteo de plántulas originadas de semillas maduras germinadas en sustrato

Para esta metodología, se utilizó parte de las frutas colectadas en el experimento anterior. En rejas de plástico de 60 × 30 cm en la base y 40 cm de altura, se colocó una mezcla preparada con suelo de textura limosa y polvillo de coco. Se trazaron pequeños surcos de 0.5 cm de profundidad y 4.0 cm de separación. Las semillas extraídas el día anterior, se colocaron horizontalmente a 3.0 cm de distancia dentro de los surcos y se cubrieron con una capa de arena. Se aplicó riego suficiente para humedecer el sustrato y se colocó una sombra, construida con palapas de cocotero a 20 cm de altura. Se aplicaron riegos tres veces por semana. A los 35 días, las semillas se extrajeron del sustrato y se les contabilizó el número total de plántulas emergidas, incluidas las plántulas malformadas. Se analizaron 220 semillas de 'Colimex', 184 de 'Lise' y 224 de 'Rosenberger'.

Análisis estadístico

De los datos registrados para cada variedad y cada método, se hicieron cuatro grupos o repeticiones. Para calcular los promedios de embriones por semilla se dividió el total de embriones detectados entre el total de semillas observadas o, en su caso, se dividió el número de plántulas emergidas de semillas germinadas entre el total de semillas sembradas *in vitro* o en sustrato. Para

Results and discussion

Each strategy designed for embryo counting required a different protocol, either by the stage of development of the seeds (mature or immature), by directly counting the embryos, by counting seedlings from germinated seeds or by the two conditions of seed germination (*in vitro* or in substrate).

Direct counting of embryos in mature seeds

In the three genotypes studied, monoembryonic and polyembryonic seeds were detected in the same fruit. Inside the polyembryonic seeds, masses of compacted and sometimes intertwined embryos were found (Figure 1a), although their separation was relatively simple, which facilitated their counting.

In polyembryonic seeds of the 'Colimex' and 'Lise' varieties, embryos of different sizes were found in the same seed. Generally, the smallest embryos were

calcular los porcentajes de semillas poliembriónicas se dividió el número de semillas que presentaron dos o más embriones, o dos o más plántulas, entre el total de semillas observadas y se multiplicó por 100. Los valores en porcentaje se transformaron a valores de arco seno mediante la ecuación: $y = (\arcsin(\sqrt{x/100}) \times 57.3)$. Se determinaron las frecuencias de semillas que presentaron los distintos números de embriones detectados. El análisis estadístico se hizo mediante un arreglo factorial 4×3 con cuatro repeticiones y un mínimo de 43 semillas como unidad experimental. Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Se usó el paquete estadístico Statistix ver. 9 (2008).

Resultados y discusión

Cada estrategia diseñada para el conteo de embriones requirió de un protocolo diferente, ya sea por el estado de desarrollo de las semillas (maduras o inmaduras), por contar de manera directa los embriones, por contar plántulas de semillas germinadas o por las dos

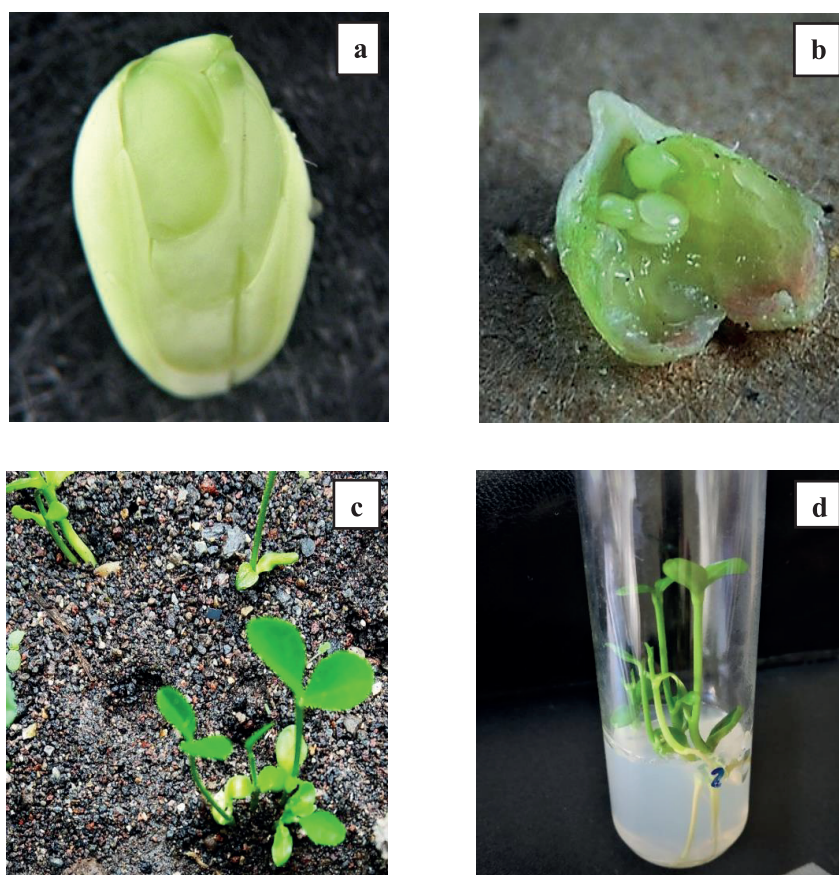


Figure 1. a) Embryogenic mass extracted from mature seed, b) embryos in cotyledon stage observed in immature seed, c) seedlings derived from mature seeds germinated in substrate and d) seedlings derived from mature seeds germinated *in vitro*.

Figura 1. a) Masa embriogénica extraída de semilla madura, b) embriones en estado cotiledonar observados en semilla inmadura, c) plántulas originadas de semillas maduras germinadas en sustrato y d) plántulas originadas de semillas maduras germinadas *in vitro*.

observed at the micropylar tip, although small embryos were also detected enclosed between the cotyledons of a larger embryo, or between other larger embryos. Polyembryonic seeds of 'Lise' and 'Colimex' had one or two large embryos, in proportions of 44.12 and 45.16 %, respectively, with respect to the total number of embryos recorded; of these seeds, 26.17 and 25.53 %, respectively, were of medium size, and 29.70 and 29.30 %, respectively, were of small size. The above indicates that nucellar embryos have asynchronous development within the seeds, which agrees with what was reported by Sanchez-Damas et al. (2006), who observed the same in three citrus rootstocks, and Kashyap et al. (2018) detected it in 'Khasi' mandarin (*C. reticulata*).

The number of embryos was variable even among seeds of the same fruit. Ranges of 1 to 10 embryos per seed were obtained in 'Lise', and from 1 to 13 in 'Colimex', which is somewhat consistent with what was reported by Kashyap et al. (2018) in 'Khasi' mandarin. In the 'Rosenberger' lemon, most seeds had only one embryo, although some seeds with two or even three embryos were detected. In the polyembryonic seeds of this variety, large embryos corresponded to 60.46 %, medium-sized embryos to 11.63 % and small embryos to 27.90 % of the total embryos observed.

Direct counting of embryos in immature seeds

Immature seeds in the three varieties had a soft consistency, a greenish-white color and a slightly translucent seed coat without lignification. Inside, the seeds presented a tissue of variable consistency depending on their stage of development, where the small embryos were found (Figure 1b). In the same fruit, seeds with different stages of maturity could be identified, suggesting that the seeds also have asynchrony in their development.

Embryos at globular, heart, torpedo and cotyledonary stages could be observed in the same seed. This confirms the asynchronous development of embryos, mentioned above in mature seeds, and agrees with what was reported by Kashyap et al. (2018) in 'Khasi' mandarin. With this method, from one to six embryos per seed could be detected in 'Colimex', from one to seven in 'Lise' and from one to four in 'Rosenberger'.

Counting of seedlings derived from seeds germinated *in vitro*

In all three varieties, 100 % germination was achieved, as the seeds were favored by the *in vitro* environment. During germination, the embryogenic masses deplumped, the embryos separated and the seedlings developed independently (Figure 1d), which

condiciones de germinación de las semillas (*in vitro* o en sustrato).

Conteo directo de embriones en semillas maduras

En los tres genotipos estudiados, se detectaron semillas monoembrionicas y poliembrionicas en un mismo fruto. En el interior de las semillas poliembrionicas se encontraron masas de embriones compactados y, en ocasiones, entrelazados (Figura 1a), aunque su separación fue relativamente sencilla, lo cual facilitó su conteo.

En las semillas poliembrionicas de las variedades 'Colimex' y 'Lise' se encontraron embriones de distinto tamaño en la misma semilla. Generalmente, los embriones más pequeños se observaron en la punta micropilar, aunque también se detectaron embriones pequeños encerrados entre los cotiledones de un embrión de mayor tamaño, o entre otros embriones más grandes. Las semillas poliembrionicas de 'Lise' y 'Colimex' tuvieron uno o dos embriones grandes, en proporciones de 44.12 y 45.16 %, respectivamente, con respecto al total de embriones registrados; de estas semillas, 26.17 y 25.53 %, respectivamente, fueron de tamaño medio, y 29.70 y 29.30 %, respectivamente, de tamaño pequeño. Lo anterior indica que los embriones nucleares tienen desarrollo asincrónico dentro de las semillas, lo cual coincide con lo reportado por Sánchez-Damas et al. (2006), quienes observaron lo mismo en tres portainjertos de cítricos, y Kashyap et al. (2018) lo detectaron en mandarina 'Khasi' (*C. reticulata*).

El número de embriones fue variable aun entre las semillas del mismo fruto. Se obtuvieron rangos de 1 a 10 embriones por semilla en 'Lise', y de 1 a 13 en 'Colimex', lo cual guarda cierta coincidencia con lo señalado por Kashyap et al. (2018) en mandarina 'Khasi'. En el limón 'Rosenberger', la mayoría de las semillas tuvieron solo un embrión, aunque se detectaron algunas semillas con dos o hasta tres embriones. En las semillas poliembrionicas de esta variedad, los embriones grandes correspondieron al 60.46 %, los medianos al 11.63 % y los pequeños al 27.90 % del total de embriones observados.

Conteo directo de embriones en semillas inmaduras

Las semillas inmaduras en las tres variedades presentaron consistencia blanda, color blanco verdoso y testa ligeramente translúcida sin lignificar. En su interior, las semillas presentaron un tejido de consistencia variable según su estado de desarrollo, donde se encontraban los pequeños embriones (Figura 1b). En un mismo fruto, se pudieron identificar semillas con distintos estados de madurez, lo cual sugiere que las semillas también tienen asincronía en su desarrollo.

facilitated their counting. Most embryos germinated and developed complete seedlings. Visually, seedling size varied with embryo size. Some very small embryos generated small and, in some cases, aberrant seedlings. The number of seedlings per seed varied from one to ten in 'Colimex', from one to eight in 'Lise' and from one to three in 'Rosenberger'.

Counting of seedlings derived from mature seeds germinated in substrate

With this method, germination percentages of 90 and 93 % for 'Colimex' and 'Lise', respectively, and 75 % for 'Rosenberger' were recorded. Most of the seeds that germinated generated complete seedlings, with root, hypocotyl, epicotyl and two embryonic or cotyledonal leaves (Figure 1c). The number of seedlings per seed ranged from one to three in 'Colimex' and 'Lise', and from one to two in 'Rosenberger'. These values are very low compared to those obtained with the DCEMS method.

Average number of embryos per seed

Table 1 shows the data on the average number of embryos per seed for the three varieties and the four sampling methods. Statistical analysis detected significant effects ($P \leq 0.01$) for sampling methods, varieties and the interaction between both factors. The DCEMS and CSMSGV methods yielded the highest average number of embryos per seed, while CSMSGS

Se pudieron observar embriones en estado globular, corazón, torpedo y cotiledonar en una misma semilla. Esto confirma el desarrollo asincrónico de los embriones, mencionado arriba en semillas maduras, y coincide con lo señalado por Kashyap et al. (2018) en mandarina 'Khasi'. Con este método se pudieron detectar desde uno hasta seis embriones por semilla en 'Colimex', de uno a siete en 'Lise' y de uno a cuatro en 'Rosenberger'.

Conteo de plántulas originadas de semillas germinadas *in vitro*

En las tres variedades se alcanzó el 100 % de germinación, ya que las semillas fueron favorecidas por el ambiente *in vitro*. Durante la germinación, las masas embriogénicas se desgranaron, se separaron los embriones y se desarrollaron las plántulas de manera independiente (Figura 1d), lo cual facilitó su conteo. La mayoría de los embriones germinaron y desarrollaron plántulas completas. Visualmente, el tamaño de las plántulas varió en función del tamaño del embrión. Algunos embriones muy pequeños generaron plántulas pequeñas y, en algunos casos, aberrantes. El número de plántulas por semilla varió de uno a diez en 'Colimex', de uno a ocho en 'Lise' y de uno a tres en 'Rosenberger'.

Conteo de plántulas originadas de semillas maduras germinadas en sustrato

Con este método se registraron porcentajes de germinación de 90 y 93 % para 'Colimex' y 'Lise',

Table 1. Average number of embryos per seed and percentage of polyembryonic seeds in the varieties 'Colimex' and 'Lise' of Mexican lime, and 'Rosenberger' of true lemon, and four sampling methods.

Cuadro 1. Promedio de embriones por semilla y porcentaje de semillas poliembriónicas en las variedades 'Colimex' y 'Lise' de lima mexicana, y 'Rosenberger' de limón verdadero, y cuatro métodos muestreo.

Factors/ Factores	Embryos/seed (average)/ Embriones/semilla (promedio)	Polyembryonic seeds (%)/ Semillas poliembriónicas (%)
Sampling methods/Métodos de muestreo		
DCEMS/CDESM	2.41 a ²	59.09 a
DCEIS/CDESI	1.89 b	47.58 b
CSMSGV/CPSMGV	2.33 a	56.28 a
CSMSGS/CPSMGS	1.42 c	40.10 c
CV (%)	7.33	9.84
Varieties/Variedades		
'Colimex'	2.35 b	68.43 a
'Lise'	2.53 a	71.56 a
'Rosenberger'	1.16 c	12.31 b
CV (%)	7.33	9.84

DCEMS = direct counting of embryos in mature seeds; DCEIS = direct counting of embryos in immature seeds; CSMSGV = counting of seedlings derived from mature seeds germinated *in vitro*; CSMSGS = counting of seedlings derived from mature seeds germinated in substrate; CV = coefficient of variation. ²Means with the same letters within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

CDESM = conteo directo de embriones en semillas maduras; CDESI = conteo directo de embriones en semillas inmaduras; CPSMGV = conteo de plántulas originadas de semillas maduras germinadas *in vitro*; CPSMGS = conteo de plántulas originadas de semillas maduras germinadas en sustrato; CV = coeficiente de variación. ²Medias con letras iguales dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

had the lowest average. The differences observed between CSMSGV and CSMSGs may be due to the fact that many small embryos were unable to germinate under the conditions provided by the substrate and the environment, while the *in vitro* culture, with an aseptic medium rich in nutrients, favored the germination of more embryos. Therefore, the CSMSGs method may underestimate the average number of embryos per seed, mainly in Mexican lime varieties; consequently, it is the least recommended for estimating the value of this variable.

Another interesting aspect is that with the DCEMS method more embryos per seed were obtained than with DCEIS. This is because with DCEIS the samples were taken from seeds at an early stage of development, where the potential number of embryos in the seeds has not yet been reached and, consequently, only those with a size visible with the stereoscope were detected. Therefore, the DCEMS and CSMSGV methods proved to be the most suitable for estimating the average number of embryos per seed in the varieties studied.

The varieties were also found to be different from each other. 'Lise' achieved the statistically highest values for average number of embryos per seed. This is one more of the differences between 'Lise' and 'Colimex', in addition to others reported by Robles-González et al. (2014) and Robles-González and Manzanilla-Ramírez (2012). On the other hand, 'Rosenberger' statistically presented the lowest average.

Interaction of sampling methods with varieties was detected (Figure 2a). Although the Mexican lime varieties behaved similarly in the three methods studied, different statistical averages for the number of embryos per seed were recorded with CSMSGV. In addition, it was observed that the highest average number of embryos per seed in 'Colimex' was achieved with DCEMS, followed by CSMSGV, while 'Lise' had an inverted relationship between these same methods, although statistically the two varieties were not different. In both varieties, the lowest averages were obtained with the CSMSGs method. The 'Rosenberger' variety showed similar behavior with the four sampling methods evaluated.

Percentage of polyembryonic seeds

The statistical analysis detected significant effects ($P \leq 0.01$) of the sampling methods, varieties and the interaction between both factors for the percentage of polyembryonic seeds. The DCEMS and CSMSGV methods reached the highest values in this variable and were statistically different from DCEIS and CSMSGs (Table 1). The last method presented the lowest percentages of polyembryonic seeds. As already

respectivamente, y de 75 % para 'Rosenberger'. La mayoría de las semillas que germinaron generaron plántulas completas, con raíz, hipocótilo, epicótilo y dos hojas embrionales o cotiledonales (Figura 1c). El número de plántulas por semilla varió de uno a tres en 'Colimex' y 'Lise', y de uno a dos en 'Rosenberger'. Estos valores resultan ser muy bajos si se comparan con los obtenidos con el método CDESM.

Promedio de embriones por semilla

En el Cuadro 1 se presentan los datos del promedio de embriones por semilla de las tres variedades y los cuatro métodos de muestreo. El análisis estadístico detectó efectos significativos ($P \leq 0.01$) para métodos de muestreo, variedades y la interacción entre ambos factores. Los métodos CDESM y CPSMGV permitieron obtener los mayores promedios de embriones por semilla, mientras que CPSMGS presentó el promedio más bajo. Las diferencias observadas entre CPSMGV y CPSMGS se pueden deber a que muchos embriones pequeños no pudieron germinar en las condiciones que les proporcionó el sustrato y el ambiente, mientras que en el cultivo *in vitro*, con medio aséptico y rico en nutrientes, se propició la germinación de más embriones. Por lo tanto, el método CPSMGS puede subestimar el promedio de embriones por semillas, principalmente en las variedades de lima mexicana; por ello, es el menos recomendable para estimar el valor de esta variable.

Otro aspecto interesante es que con el método CDESM se obtuvieron más embriones por semilla que con CDESI. Esto debido a que con CDESI los muestreos se hicieron en semillas en estado temprano de desarrollo, donde el número potencial de embriones en las semillas aún no se ha alcanzado y, en consecuencia, solo se detectaron los que tenían un tamaño visible con el estereoscopio. Por lo tanto, los métodos CDESM y CPSMGV resultaron ser los más adecuados para estimar el promedio de embriones por semilla en las variedades estudiadas.

Las variedades también resultaron diferentes entre sí. 'Lise' alcanzó los valores estadísticamente más altos para promedio de embriones por semilla. Esta es una más de las diferencias entre 'Lise' y 'Colimex', además de otras reportadas por Robles-González et al. (2014) y Robles-González y Manzanilla-Ramírez (2012). Por su parte, 'Rosenberger' presentó estadísticamente el menor promedio.

Se detectó interacción de los métodos de muestreo con las variedades (Figura 2a). Aunque las variedades de lima mexicana tuvieron un comportamiento similar en tres métodos estudiados, con CPSMGV se registraron promedios de embriones por semilla estadísticos diferentes. Además, se observó que el promedio de embriones por semilla más alto en 'Colimex' se alcanzó

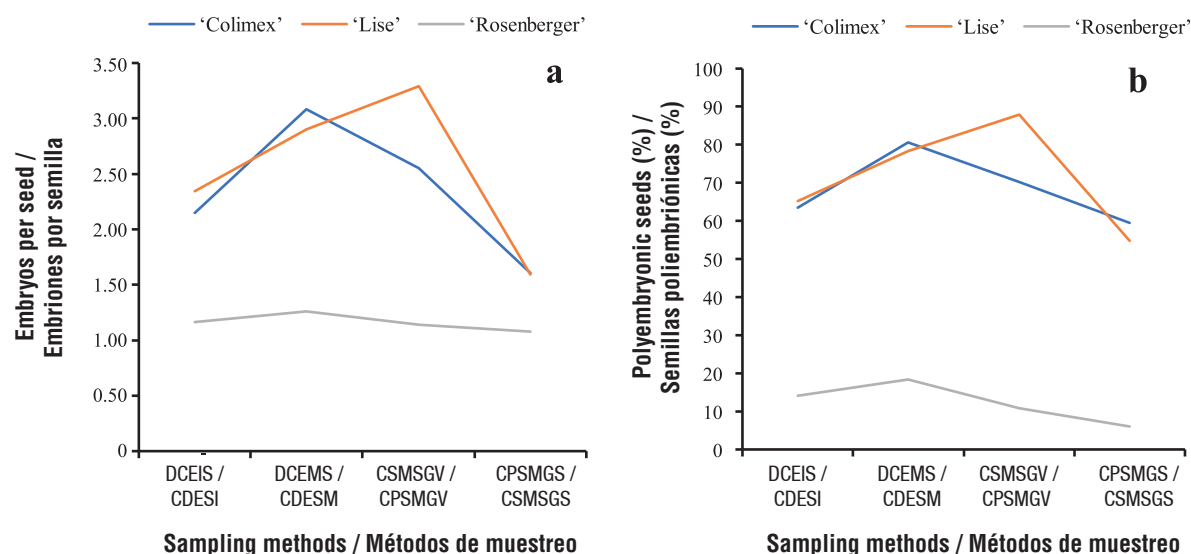


Figure 2. Interaction plots between varieties and sampling methods: a) average number of embryos per seed and b) percentage of polyembryonic seeds. DCEIS = direct counting of embryos in immature seeds; DCEMS = direct counting of embryos in mature seeds; CSMSGV = counting of seedlings derived from mature seeds germinated *in vitro*; CPSMGS = counting of seedlings derived from mature seeds germinated in substrate.

Figura 2. Gráficas de interacción entre variedades y métodos de muestreo: a) promedio de embriones por semilla y b) porcentaje de semillas poliembriónicas. CDESI = conteo directo de embriones en semillas inmaduras; CDESM = conteo directo de embriones en semillas maduras; CPSMGV = conteo de plántulas originadas de semillas maduras germinadas *in vitro*; CPSMGS = conteo de plántulas originadas de semillas maduras germinadas en sustrato

mentioned, the difference between CSMSGV and CPSMGS may be due to the fact that the very small embryos did not have the ability to germinate in the natural environment provided by the CPSMGS method, while with CSMSGV, the seeds managed to germinate and develop seedlings due to the optimal temperature, moisture and nutrient medium conditions. In the case of the DCEIS method, the lower percentage of polyembryonic seeds, compared to DCEMS and CSMSGV, could be due to the fact that in the immature seeds the process of formation and development of nucellar embryos had not finished.

It is important to note that a method for determining the level of polyembryony should not underestimate the average number of embryos per seed or the percentage of polyembryonic seeds. According to the results, DCEMS and CSMSGV recorded the highest averages for these variables, and, therefore, they can be considered adequate to determine the levels of polyembryony in the varieties studied.

The 'Lise' and 'Colimex' varieties showed high percentages of polyembryonic seeds and were statistically similar to each other. This suggests that, although morphological and physiological differences have been noted in the trees of these varieties (Robles-González et al., 2014; Robles-González & Manzanilla-Ramírez, 2012), they maintain the

con CDESM, seguido de CPSMGV, mientras que 'Lise' tuvo una relación invertida entre estos mismos métodos, aunque estadísticamente las dos variedades no fueron diferentes. En ambas variedades, los promedios más bajos se obtuvieron con el método CPSMGS. La variedad 'Rosenberger' presentó un comportamiento similar con los cuatro métodos de muestreo evaluados.

Porcentaje de semillas poliembriónicas

El análisis estadístico detectó efectos significativos ($P \leq 0.01$) en los métodos de muestreo, las variedades y la interacción entre ambos factores para el porcentaje de semillas poliembriónicas. Los métodos CDESM y CPSMGV alcanzaron los valores más altos en esta variable y fueron estadísticamente diferentes a CDESI y CPSMGS (Cuadro 1). Este último método presentó los porcentajes de semillas poliembriónicas más bajos. Como ya se mencionó, la diferencia entre CPSMGV y CPSMGS se puede deber a que los embriones muy pequeños no tuvieron la capacidad de germinar en el ambiente natural que le proporcionó el método CPSMGS, mientras que con CPSMGV, las semillas lograron germinar y desarrollar plántulas debido a las condiciones óptimas de temperaturas, humedad y medio nutritivo. En el caso del método CDESI, el menor porcentaje de semillas poliembriónicas, comparado con CDESM y CPSMGV, se pudo deber a que en las semillas inmaduras el proceso de formación y desarrollo de embriones nucleares no había terminado.

same level of polyembryony. On the other hand, the ‘Rosenberger’ variety averaged the lowest percentage of polyembryonic seeds. Likewise, interaction between the factors sampling methods and varieties was detected in this variable (Figure 2b). Mexican lime varieties behaved similarly in three methods, although they were statistically different with CSMSGV. In ‘Lise’, the highest percentage of polyembryonic seeds was achieved with CSMSGV, while in ‘Colimex’ the highest value was obtained with DCEMS. The ‘Rosenberger’ variety had similar behavior in the four sampling methods studied.

Level of polyembryony

To analyze the level of polyembryony, only the data obtained with the DCEMS method were used, since it was the one that best estimated the number of embryos per seed. As can be seen in Table 2, ‘Colimex’ and ‘Lise’, which belong to the species *C. aurantifolia*, achieved similar and relatively high averages of embryos per seed. On the other hand, ‘Rosenberger’, of the species *C. limon*, averaged low values and was statistically different ($P \leq 0.01$) from the Mexican lime varieties. For the variable percentage of polyembryonic seeds, ‘Colimex’ and ‘Lise’ presented high values and were statistically similar to each other, while ‘Rosenberger’ had the lowest average and was statistically different ($P \leq 0.01$) from the Mexican limes. The percentage recorded for ‘Rosenberger’ coincides with what was observed by Pérez-Tornero and Porras (2008) in Italian-type lemons.

According to Kishore (2014), and considering the level of polyembryony, species and varieties can be grouped into three categories: 1) slightly polyembryonic ($\leq 25\%$), 2) moderately polyembryonic (25-50 %) and 3) highly polyembryonic ($> 50\%$). Therefore, considering

Es importante señalar que un método para determinar el nivel de poliembrionía no debe subestimar el promedio de embriones por semilla ni el porcentaje de semillas poliembriónicas. De acuerdo con los resultados, CDESM y CPSMGV registraron los mayores promedios para estas variables, y, por lo tanto, se pueden considerar adecuados para determinar los niveles de poliembrionía en las variedades estudiadas.

Las variedades ‘Lise’ y ‘Colimex’ presentaron altos porcentajes de semillas poliembriónicas y resultaron estadísticamente semejantes entre sí. Esto sugiere que, aunque se han señalado diferencias morfológicas y fisiológicas en los árboles de estas variedades (Robles-González et al.,2014; Robles-González & Manzanilla-Ramírez, 2012), mantienen un mismo nivel de poliembrionía. Por su parte, la variedad ‘Rosenberger’ promedió el porcentaje más bajo de semillas poliembriónicas. Asimismo, en esta variable se detectó interacción entre los factores métodos de muestreo y variedades (Figura 2b). Las variedades de lima mexicana tuvieron comportamiento similar en tres métodos, aunque fueron estadísticamente diferentes con CPSMGV. En ‘Lise’, el porcentaje más alto de semillas poliembriónicas se alcanzó con CPSMGV, mientras que en ‘Colimex’ el valor más alto se obtuvo con CDESM. La variedad ‘Rosenberger’ tuvo un comportamiento similar en los cuatro métodos de muestreo estudiados.

Nivel de poliembrionía

Para analizar el nivel de poliembrionía, se utilizaron solo los datos obtenidos con el método CDESM, ya que fue el que mejor estimó el número de embriones por semilla. Como se puede apreciar en el Cuadro 2, ‘Colimex’ y ‘Lise’, que pertenecen a la especie *C. aurantifolia*, alcanzaron promedios de embriones por semilla semejantes y relativamente altos. Por su

Table 2. Embryos per seed and percentage of polyembryonic seeds in the varieties ‘Colimex’ and ‘Lise’ of Mexican lime, and ‘Rosenberger’ of true lemon, estimated by direct counting in mature seeds.

Cuadro 2. Embriones por semilla y porcentaje de semillas poliembriónicas en las variedades ‘Colimex’ y ‘Lise’ de lima mexicana, y ‘Rosenberger’ de limón verdadero, estimadas mediante conteo directo en semillas maduras.

Factors /Factores	Embryos/seed (average)/ Embriones/semilla (promedio)	Polyembryonic seeds (%) / Semillas poliembriónicas (%)
‘Colimex’	3.21 a ²	80.63 a
‘Lise’	2.90 a	78.27 a
‘Rosenberger’	1.33 b	18.37 b
CV (%)	7.64	11.07

CV = coefficient of variation. ²Means with the same letters within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).
CV = coeficiente de variación. ²Medias con letras iguales dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

Table 3. Frequency distribution of the number of embryos per seed in the varieties 'Colimex' and 'Lise' of Mexican lime, and 'Rosenberger' of true lemon.

Cuadro 3. Distribución de frecuencias del número de embriones por semilla en las variedades 'Colimex' y 'Lise' de lima mexicana, y 'Rosenberger' de limón verdadero.

Variety/ Variedad	Frequency of seeds with different numbers of embryos (%) / Frecuencias de semillas con distinto números de embriones (%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
'Colimex'	19.37 b ²	26.89 a	18.50 a	12.13 a	10.11 a	6.63 a	2.31 a	1.44 a
'Lise'	21.72 b	25.01 a	19.60 a	18.85 a	7.94 a	5.43 a	0.37 a	0.72 a
'Rosenberger'	81.63 a	14.89 b	3.00b	-	0.49 b	-	-	-
CV (%)	7.88	11.98	17.11	21.77	39.08	28.29	122.13	89.12

CV = coefficient of variation. ²Means with the same letters within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

CV = coeficiente de variación. ²Medias con letras iguales dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

the results of this study, 'Colimex' and 'Lise' are highly polyembryonic (with values of 80.65 and 78.27 %, respectively), while 'Rosenberger' is slightly polyembryonic (18.37 %).

Variation in the number of embryos per seed

For this variable, the data obtained with the CDESM method were also used. It was found that the number of embryos was highly variable between 'Colimex' and 'Lise' seeds. This agrees with Kishore (2014), who points out that the number of nucellar embryos varies between seeds and between species.

Seeds were grouped according to their number of embryos (Table 3), and the following morphotypes were generated as described by Kishore (2014): one (single), two (twins), three (triplets), four (quadruplets), five (quintuplets), six (sextuplets), seven (septuplets), and eight (octuplets) embryos per seed. Sporadically, seeds with 13 embryos were observed in 'Colimex' and 10 embryos in 'Lise'. Seeds with two and three embryos reached the highest frequencies, but as the number of embryos per seed increased the frequencies decreased. Andrade-Rodríguez et al. (2004) found a similar trend in *C. volcameriana*, whereas Kishore et al. (2012) note that seeds with four and three embryos are the most frequent in apomictic citrus, regardless of the genotypes they studied. In 'Rosenberger' lemon, diversity was minimal, as most seeds (81.63 %) had only one embryo, a low proportion of seeds contained two embryos and, sporadically, seeds with three or five embryos were found.

Conclusions

The DCESM and CSMSGV methods allowed detecting and recording the highest averages for number of embryos per seed, as well as the highest percentages of polyembryonic

parte, 'Rosenberger', de la especie *C. limon*, promedio valores bajos y resultó estadísticamente diferente ($P \leq 0.01$) a las variedades de lima mexicana. Para la variable porcentaje de semillas poliembriónicas, 'Colimex' y 'Lise' presentaron valores altos y resultaron estadísticamente semejantes entre sí, mientras que 'Rosenberger' tuvo el promedio más bajo y resultó estadísticamente diferente ($P \leq 0.01$) a las limas mexicanas. El porcentaje registrado para 'Rosenberger' coincide con lo observado por Pérez-Tornero y Porras (2008) en limones tipo italiano.

De acuerdo con Kishore (2014), y considerando el nivel de poliembriónia, las especies y variedades se pueden agrupar en tres categorías: 1) ligeramente poliembriónico (≤ 25 %), 2) moderadamente poliembriónico (25-50 %) y 3) altamente poliembriónico (> 50 %). Por lo tanto, si se toman en cuenta los resultados de este estudio, 'Colimex' y 'Lise' resultaron altamente poliembriónicas (con valores de 80.65 y 78.27 %, respectivamente), mientras que 'Rosenberger' fue ligeramente poliembriónica (18.37 %).

Variación en el número de embriones por semilla

Para esta variable, también se utilizaron los datos obtenidos con el método CDESM. Se encontró que el número de embriones fue muy variable entre las semillas de 'Colimex' y 'Lise'. Esto coincide con Kishore (2014), quien señala que el número de embriones nucleares varía entre semillas y entre especies.

Las semillas se agruparon en función de su número de embriones (Cuadro 3), y se generaron los siguientes morfotipos como lo describe Kishore (2014): uno (simple), dos (mellizos), tres (trillizos), cuatro (cuatrillizos), cinco (quintillizos), seis (sextillizos), siete (septillizos) y ocho (octillizos) embriones por semilla. Esporádicamente, se observaron semillas

seeds in the Mexican lime varieties 'Colimex' and 'Lise' and the true lemon variety 'Rosenberger'.

The 'Colimex' and 'Lise' varieties are considered highly polyembryonic, presenting 80.65 and 78.27 %, respectively, of seeds with two or more embryos, while the 'Rosenberger' variety is slightly polyembryonic with only 18.37 %.

Acknowledgments

The authors thank INIFAP for the support given to carry out this research work through the Mexican lime germplasm bank conservation project.

End of English version

References / Referencias

- Andrade-Rodríguez, M., Villegas-Monter, A., Carrillo-Castañeda, G., & García-Velázquez, A. (2004). Polyembryony and identification of Volkamerian lemon zygotic and nucellar seedlings using RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(6), 551-559. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004000600006>
- Arruda, N., Cicero, S. M., & Guilhien-Gomes, F. (2018). Radiographic analysis for the evaluation of polyembryony in Swingle citrumelo seeds. *Journal of Seed Science*, 40(2), 118-126. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n2175172>
- Bowman, K. D., Gmitter, F. G., & Hu, X. (1995). Relationships of seed size and shape with polyembryony and the zygotic or nucellar origin of *Citrus* spp. seedlings. *HortScience*, 30(6), 1279-1282. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.30.6.1279>
- Conner, J. A., Mookkan, M., Huo, H., Chae, K., & Ozias-Akins, P. (2015). A parthenogenesis gene of apomict origin elicits embryo formation from unfertilized eggs in a sexual plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11205-11210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505856112>
- Fiaz, S., Wang, X., Younas, A., Alharthi, B., Riaz, A., & Ali, H. (2021). Apomixis and strategies to induce apomixis to preserve hybrid vigor for multiple generations. *GM Crops & Food*, 12(1), 57-70. <https://doi.org/10.1080/21645698.2020.1808423>
- García, R., Asíns, M. J., Forner, J. & Carbonell, E. A. (1999). Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(3-4), 511-518. <https://doi.org/10.1007/s001220051264>
- Guerra, D., Schifino-Wittmann, M. T., Schwarz, S. F., Souza, P. V., & Weiler, R. L. (2012). Caracterização morfológica, determinação do número de embriões e taxa de poliembrião em três porta-enxertos híbridos de citros. *Bragantia Campinas*, 71(2), 196-201. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052012000200007>
- con 13 embriones en 'Colimex' y 10 embriones en 'Lise'. Las semillas con dos y tres embriones alcanzaron las frecuencias más altas, pero conforme aumentó el número de embriones por semilla las frecuencias decrecieron. Andrade-Rodríguez et al. (2004) encontraron una tendencia similar en *C. volkameriana*. Por su parte, Kishore et al. (2012) señalan que las semillas con cuatro y tres embriones son las más frecuentes en cítricos apomícticos, independientemente de los genotipos que ellos estudiaron. En el limón 'Rosenberger', la diversidad fue mínima, ya que la mayoría de las semillas (81.63 %) tuvieron un solo embrión, una proporción baja de semillas contenía dos embriones y, esporádicamente, se encontraron semillas con tres o cinco embriones.

Conclusiones

Los métodos CDESM y CPSMGV permitieron detectar y registrar los mayores promedios de embriones por semilla, así como los mayores porcentajes de semillas poliembriónicas en las variedades 'Colimex' y 'Lise' de lima mexicana y el limón verdadero variedad 'Rosenberger'.

Las variedades 'Colimex' y 'Lise' se consideran altamente poliembriónicas, al presentar 80.65 y 78.27 %, respectivamente, de semillas con dos o más embriones, mientras que 'Rosenberger' es ligeramente poliembriónica con solo 18.37 %.

Agradecimientos

Los autores agradecen al INIFAP por el apoyo otorgado para realizar este trabajo de investigación a través del proyecto de conservación del banco de germoplasma de lima mexicana.

Fin de la versión en español

- Hand, M. L., & Koltunow, A. M. (2014). The genetic control of apomixis: asexual seed formation. *Genetics*, 197(2), 441-450. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163105>
- Hong, Q. B., Xiang, S. Q., Chen, K. L., & Chen, L. G. (2001). Two complementary dominant genes controlling apomixis in genus *Citrus* and *Poncirus*. *Acta Genetica Sinica*, 28(11), 1062-1067.
- International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). (2000). *Descriptores para los cítricos Citrus spp.* IPGRI. <https://core.ac.uk/download/pdf/132682818.pdf>
- Kashyap, K., Banu, S., Shrivastava, M. N., & Ramchiary, N. (2018). Study of polyembryony and development of molecular markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in Khasi mandarin (*Citrus reticulata*

- Blanco). *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 3(2), 363-372. <http://dx.doi.org/10.22161/ijeb/3.2.8>
- Kepiro, J. L., & Roose, M. L. (2007). Nucellar embryony, In: Khan, I. A. (ed.), *Citrus genetics, breeding and biotechnology* (pp. 141-150). CAB International. <https://cabdigitallibrary.org/doi/book/10.1079/9780851990194.0000>
- Kepiro, J. L., & Roose, M. L. (2010). AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* × *Poncirus trifoliata*. *Tree Genetics & Genomes*, 6(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0223-z>
- Kishore, K., Monika, N., Rinchen, D., Lepcha, B., & Pandey, B. (2012). Polyembryony and seedling emergence traits in apomictic citrus. *Scientia Horticulturae*, 138, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.01.035>
- Kishore, K. (2014). Polyembryony. In: Ramawat, K.G., Merillon, J. M., & Shivanna, K. R. (eds.), *Reproductive biology of plants* (pp. 355-370). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b16535>
- Mondal, B., Pramanick, S., Saha, R., & Karmakar, M. (2015). Application of simple sequence repeats markers for demarcation of *Citrus reticulata* nucellar and hybrid seedlings. *International Journal of Biosciences*, 6(2), 128-133. <https://doi.org/10.12692/ijb/6.2.128-133>
- Moore, G. A., Jacomo, J., Neidigh, L., Laurence, S. D., & Cline, K. (1993). Transformation in *Citrus*. In: Bajaj Y. P. (eds), *Plant protoplast and genetic engineering. Biotechnology in Agriculture and Forestry* (pp. 194-208). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78037-0_15
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-479. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nakano, M., Shimada, T., Endo, T., Fujii, H., Nesumi, H., Kita, M., Ebina, M., Shimizu, T., & Omura, M. (2012). Characterization of genomic sequence showing strong association with polyembryony among diverse *Citrus* species and cultivars, and its synteny with *Vitis* and *Populus*. *Plant Science*, 183, 131-142. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.08.002>
- Pérez-Tornero, O., & Porras, I. (2008). Assessment of polyembryony in lemon: rescue and *in vitro* culture of immature embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93, 173-180. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9358-0>
- Robles-González, M. M., Carrillo-Medrano, S. H., Manzanilla-Ramírez, M. Á., & Medina-Urrutia, V. M. (2014). Mejoramiento genético de limón mexicano. In: Orozco-Santos, M., Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J. & Manzanilla-Ramírez, M. Á. (eds.), *El limón mexicano (Citrus aurantifolia)* (pp. 34-84). SAGARPA, INIFAP, CIRPAC.
- Robles-González, M. M., & Manzanilla-Ramírez, M. Á. (2012). 'LISE': Limón mexicano sin espinas y de alto rendimiento. Centro de Investigación Pacífico Centro.
- Sailer, C., Schmid, B., & Grossniklaus, U. (2016). Apomixis allows the transgenerational fixation of phenotypes in hybrid plants. *Current Biology*, 26(3), 331-337. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.045>
- Sánchez-Damas, J. J., Avitia-García, E., Castillo-González, A. M., Villegas-Monter, A., & Corona-Torres, T. (2006). Estudio anatómico de la poliembriónia en tres portainjertos de cítricos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2), 145-152. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60912203>
- Santos, C. Q., Girardi, E. A., Vieira, E. L., Ledo, C. A., & Filho, W. (2015). Tamanho ótimo de amostras de frutos e de sementes para determinação da poliembriónia em citros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37(1), 172-178. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-063/14>
- Shimada, T., Endo, T., Fujii, H., Nakano, M., Sugiyama, A., Daido, G., Ohta, S., Yoshioka, T., & Omura, M. (2018). MITE insertion-dependent expression of CitRKD1 with a RWP-RK domain regulates somatic embryogenesis in citrus nucellar tissues. *BMC Plant Biology*, 18, 166. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1369-3>
- Shinde, B. N., Patil, V. K., Kalabandi, B. M., Pawar, B. R., & Shinde, S. J. (2007). Studies on germination and polyembryony of different citrus rootstocks seedling at nursery stage. *The Asian Journal of Horticulture*, 2(1), 180-183.
- Simsek, O., Donmez, D., Eti, S., Yesiloglu, T., & Aka-Kacar, Y. (2018). Comparative transcriptome sequencing to determine genes related to the nucellar embryony mechanism in citrus. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 43(1), 58-68. <https://doi.org/10.3906/tar-1806-10>
- Singh, G., Aulakh, P. S., Sarao, N. K., Rattanpal, H. S., & Sidhu, G. S. (2018). Molecular verification of putative zygotic seedlings in different intra-specific crosses in mandarins (*Citrus reticulata*) by SSR. Markers. *Agricultural Research*, 8(1), 21-26. <https://doi.org/10.1007/s40003-018-0355-1>
- Statistix (2008). Statistix (ver. 9) [software]. Borland International. <https://www.statistix.com/>
- Wang, X., Xu, Y., Zhang, S., Cao, L., Huang, Y., Cheng, J., Wu, G., Tian, S., Chen, C., Liu, Y., Yu, H., Yang, X., Lan, H., Wang, N., Wang, L., Xu, J., Jiang, X., Xie, Z., Tan, M., Larkin, R. M., Chen, L.L., Ma, B.G., Ruan, Y., Deng, X. & Xu, Q. (2017). Genomic analyses of primitive, wild and cultivated citrus provide insights into asexual reproduction. *Nature Genetics*, 49(5), 765-774. <https://doi.org/10.1038/ng.3839>
- Woo, J. k., Park, Y. C., Lee, J. W., Yun, S. H., Sukman, M. K., Lee, P. Y., Song, K. J., & Kim, H. B. (2019). Evaluation of polyembryony for genetic resources and efficacy of simple sequence repeat markers for the identification of nucellar and zygotic embryo-derived individuals in citrus. *Applied Biological Chemistry*, 62, 30. <https://doi.org/10.1186/s13765-019-0437-1>
- Xu, Y., Jia, H., Wu, X., Koltunow, A. M., Deng, X., & Xu, Q. (2021). Regulation of nucellar embryony, a mode of sporophytic apomixis in *Citrus* resembling somatic embryogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 59, 101984. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.101984>
- Zhang, S., Liang, M., Wang, N., Xu, Q., Deng, X., & Chai, L. (2018). Reproduction in woody perennial *Citrus*: an update on nucellar embryony and self-incompatibility. *Plant Reproduction*, 31, 43-57. <https://doi.org/10.1007/s00497-018-0327-4>