



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Desarrollo embrionario en yuca (*Manihot esculenta*
Crantz), receptividad de estigmas y potencial de
cruzamientos con higuera (*Ricinus communis* L.)
para la producción de plantas haploides**

Lisette Natalia Ramos Abril

Universidad Nacional de Colombia
Facultad De Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia

2018

**Desarrollo embrionario en yuca (*Manihot esculenta*
Crantz), receptividad de estigmas y potencial de
cruzamientos con higuera (*Ricinus communis* L.)
para la producción de plantas haploides**

Lisette Natalia Ramos Abril
Ing. Agrónomo

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título:
de:

Doctor en Ciencias Agrarias

Director:

(L.I.A., Ph.D.) Hernán Ceballos

Codirector:

(Ph.D.) Joel Túpac Otero

Línea de Investigación:

Mejoramiento Genético, Agronomía y Producción de Semillas de Cultivos Tropicales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad De Ciencias Agropecuarias (Escuela De Posgrados)

Palmira, Colombia

2018

A mis padres

*La vida no es fácil para ninguno de nosotros.
Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y,
sobre todo, tener la confianza en uno mismo.
Hay que sentirse dotado para realizar alguna
cosa y que esa cosa hay que alcanzarla,
cueste lo que cueste.*

Marie Curie

Agradecimientos

A Dios por su amor y presencia que me fortalecieron en el esfuerzo. A mis padres y hermanos por su apoyo continuo, principalmente a mi mamá Martha Abril quien me animó a continuar, perseverar, medir mis tiempos de trabajo, y comprender mi ausencia. A Mike Salazar, quien con paciencia me animo a salir de casa e ir a la biblioteca, además de su apoyo en leer esta tesis con minuciosidad y hacerme valiosas sugerencias para pulir y orientarme en el proceso de escritura.

A mis directores de tesis en la Universidad Nacional de Colombia en Palmira, Hernán Ceballos y Joel Tupac por su guía continua y su paciencia, y a mis jurados. Todos ellos han leído esta tesis, y con sus aportes está a mejorado en el proceso. A mi director de investigación en ciencia, en el CIAT, dentro del proyecto Dobles Haploides en Yuca, a la asesora externa del proyecto PhD. Maria Wędzony en embriología y a PhD. Luis Augusto Becerra experto en biología molecular. Quienes siempre me apoyaron, criticaron, enseñaron, esperaron y acogieron mi camino hacia la formación doctoral en investigación. Y a los profesionales del CIAT en sus áreas, que me compartieron sus espacios y conocimientos adquiridos en su vida. Especialmente en el campo a Eugenio Bolaños, Nelson Morante y Fernando Calle. En el laboratorio a Cristian Olaya, Adriana Alzate, y Félix Carreño. También a Ximena Moreno, y a todos aquellos que cooperaron con este proyecto.

A la **Universidad Nacional de Colombia sede Palmira**, a **COLCIENCIAS** por su beca Nacional de Doctorado, al **CIAT** como instituciones que apoyaron de manera directa este proyecto de investigación y la **Fundación Bill & Melinda Gates por su financiación del proyecto**.

Contenido

	Pág.
Lista de figuras.....	XII
Lista de tablas	XIII
Lista de abreviaturas.....	XIV
Resumen	15
Introducción	17
Objetivos.....	21
1. Marco teórico.....	23
1.1 Generalidades del cultivo de la yuca	23
1.1.1 Uso mundial.....	23
1.1.2 Forma de consumo	23
1.1.3 Distribución y centro de origen.....	24
1.1.4 Taxonomía del cultivo	24
1.1.5 Citogenética.....	25
1.2 Biología Floral	26
1.2.1 Floración.....	26
1.2.2 Microsporogénesis y Megasporogénesis	28
1.2.3 Fecundación y embriogénesis en plantas superiores.....	28
1.3 Mejoramiento Genético de la yuca	29
1.4 Dobles Haploide	33
1.4.1 Cultivos.....	34
1.4.2 Ventajas.....	34
1.4.3 Androgénesis.....	37
1.4.4 Ginogénesis.....	38
1.4.5 Cruzamientos Amplios	40
1.4.5.1 “Método <i>bulbosum</i> ”	40
1.4.5.2 Cruzamientos con Maíz	41
1.4.5.3 Líneas inductoras en Maíz.....	42
1.4.5.4 Cruzamientos con <i>Solanun pureja</i>	43
1.4.6 Breve historia e importancia mundial	44
Bibliografía	45

2. Observación de crecimiento de tubo polínico <i>in vivo</i> en el pistilo de la yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	57
2.1 Introducción	59
2.2 Materiales y métodos	60
2.2.1 Material vegetal	60
2.2.2 Polinizaciones manuales	60
2.2.3 Microscopía de fluorescencia de tubos polínicos	62
2.2.4 Parámetros de evaluación para el análisis de cruzamientos	63
2.2.5 Diseños de experimentos	63
2.2.5.1 Prueba piloto de compatibilidad	63
2.2.5.2 Prueba de compatibilidad	64
2.2.5.3 Evaluación del tiempo de desarrollo del tubo polínico.	64
2.3 Resultados	64
2.3.1 Prueba piloto	64
2.3.1 Prueba de compatibilidad	68
2.3.2 Desarrollo del alcance del tubo polínico en el pistilo	73
2.4 Discusión	74
2.4.1 Prueba piloto	74
2.4.2 Prueba de compatibilidad	75
2.4.3 Tiempo de alcance del tubo polínico al saco embrionario	76
2.4.4 Conclusiones	77
A. Anexo: Detección crecimiento TP en HDP	79
B. Anexo: Significancia de prueba piloto en pistilos de HMC 1.	80
C. Anexo: Significancia de prueba compatibilidad en pistilos de SM1219 9	81
D. Anexo: Observaciones individuales de la prueba de compatibilidad en pistilos de SM1219 9	82
Bibliografía	89
3. Estudio del desarrollo del óvulo, saco embrionario, embrión y endospermo de la yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).	93
3.1 Introducción	95
3.2 Materiales y métodos	96
3.2.1 Polinizaciones manuales	96
3.2.2 Histología	97
3.3 Resultados	99
3.3.1 Histología	99
3.3.2 El ovario de yuca	99
3.3.3 El saco embrionario después de la polinización.	99
3.3.4 Desarrollo del embrión	101
3.3.5 Desarrollo del endospermo	103
3.4 Discusión	103
3.4.1 Ovario y óvulo	103
3.4.2 Saco embrionario	105
3.4.3 Embriogénesis	107
3.4.4 Endospermo	109
3.5 Conclusiones y recomendaciones	109

E. Anexo: Proceso histológico para la observación del embrión en frutos yuca.....	110
Bibliografía	111
4. Potencial de polinizaciones distantes entre Yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz.) por Higuerilla (<i>Ricinus communis</i> L.) para la obtención de dobles haploides.....	115
4.1 Introducción.....	117
4.2 Materiales y métodos	118
4.2.1 Polinizaciones manuales	118
4.2.2 Germinación del polen de higuerilla sobre el estigma de yuca.....	118
4.2.2.1 Pruebas piloto de compatibilidad	119
4.2.2.2 Pruebas de compatibilidad.....	119
4.2.3 Cruzamientos distantes de yuca con higuerilla y el uso de tratamientos pos- polinización.	120
4.2.3.1 Control –2011. Sin polinizar.....	120
4.2.3.2 Tratamiento de 2-4 D – 2011	120
4.2.3.3 Protegidos por 24 HDP con bolsa – 2011	120
4.2.3.4 Protegidos por 24HDP con bolsa– 2012.....	120
4.2.3.5 Protegidos por 48 HDP con bolsa. – 2012.....	121
4.2.3.6 Protegidos por 48 HDP con bolsa con tratamiento de AG3– 2013.....	121
4.2.3.7 Determinación de haploidia	121
4.3 Resultados	122
4.3.1 Germinación del polen de Higuerilla en estigma de Yuca	122
4.3.1.1 Pruebas piloto de compatibilidad	122
4.3.1.2 Pruebas de compatibilidad.....	123
4.3.2 Cruzamientos distantes de yuca con higuerilla y el uso de tratamientos pos- polinización.	125
4.3.2.1 Control–2011. Sin polinizar.....	125
4.3.2.2 Tratamiento de 2,4- D –2011.....	125
4.3.2.3 Protegidos por 24 HDP con bolsa –2011.....	127
4.3.2.4 Protegidos por 24 HDP con bolsa. –2012.....	127
4.3.2.5 Protegidos por 48 HDP con bolsa –2012.....	128
4.3.2.6 Protegidos por 48 HDP con tratamiento de AG3 –2013.....	129
4.3.2.1 Determinación de nivel de ploidia	131
4.4 Discusión	133
4.5 Conclusiones y recomendaciones.....	135
Bibliografía	137
Conclusiones Generales.....	141

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Análisis de varianza prueba piloto en pistilo de HMC 1	65
Tabla 2. Medias por mínimos cuadrados para GPG y LTP en pistilos de HMC 1	65
Tabla 3. Análisis de Varianza compatibilidad pistilos SM1219 9	68
Tabla 4. Medias por mínimos cuadrados para GPG y LTP en pistilos SM1219 9.....	69
Tabla 5. Proceso de deshidratación con Terbutanol (TBA)	97
Tabla 6. Condiciones de extracción de DNA	122
Tabla 7: Prueba piloto de la interacción polen de higuera con ciato de HMC 1	123
Tabla 8 Resumen de cruzamientos realizados con ciatos de yuca por polen de higuera.	129
Tabla 9. Resumen de Pasos a seguir para realizar cruzamientos con higuera	129
Tabla 10. Resultados de 4 marcadores SSR polimórficos.....	131
Tabla 11. Resultados de 11 marcadores SSR polimórficos usados de las planta 4 y 11	132
Tabla 12. Resultados de citometría de flujo	132

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
(0) Ant	Día de antesis
(1) Ant	Primer día después de antesis
(-1) Ant	Día antes de antesis
(2) Ant	Segundo día después de antesis
2-4D	2,4-diclorofenoxiacético
AG ₃	Ácido Giberélico
DDP	Días Después de la polinización
DH	Dobles haploides
dH ₂ O	Agua destilada.
GP	Granos de polen
GPG	Granos de polen Germinados
HDP	Horas después de la polinización
LTP	Longitud del tubo polínico
PN	Pico nucelar
SE	Saco embrionario
TP	Tubo polínico
TT	Tejido de Transmisión

Resumen

La técnica de dobles haploides (DH) permite en un solo paso la obtención de plantas completamente homocigotas y homogéneas. Esta se ha convertido en una herramienta de rutina en muchas especies de cultivos importantes, como el maíz en donde se han empleado líneas haploides para obtener híbridos diseñados altamente productivos. Sin embargo, en el mejoramiento vegetal de la yuca, -un cultivo también con crecientes demandas agrícolas-, este modelo no puede aplicarse actualmente, debido a lo largo del ciclo reproductivo, la naturaleza heterocigótica del cultivo y su sensibilidad a la endogamia. No obstante, para poder aplicar esta técnica en yuca, se requiere de investigación en la biología reproductiva del cultivo. Esto incluye investigación básica en la biología floral que contribuya a un mejor entendimiento de los procesos de polinización y formación de la semilla. En esta tesis estos conocimientos permiten desarrollar una guía de conceptos para el mejoramiento conducido por cruzamientos amplios, los cuales son un camino para inducir plantas haploides. Los objetivos de investigación fueron tres, dos de estos sobre el estudio del comportamiento de la biología reproductiva de la yuca, en el capítulo 2, la compatibilidad de polen en el pistilo y en el capítulo 3, el desarrollo del embrión, y finalmente en el capítulo 4, la estimación de la eficiencia de cruzamientos amplios en campo entre yuca con higuierilla para inducir plantas haploides. Para ello, se observó la interacción *in vivo* del polen de yuca e higuierilla en el pistilo de la yuca con microscopía de fluorescencia. También, se realizaron observaciones histológicas con la técnica de parafina del embrión en diferentes etapas de desarrollo. Y finalmente se realizaron polinizaciones con polen de higuierilla en estilos de yuca con el uso de aplicación de hormonas de crecimiento 2,4D y AG3 y se evaluó el cuajamiento de los frutos obtenidos.

Palabras Claves: Yuca, biología floral, polen, embrión, dobles haploides, cruzamientos amplios.

Bibliografía

- Blakeslee, A. F. (1945). Removing some of the barriers to crossability in plants. *Proc Am Philos, Soc*, 89, 561-574.
- Ceballos, H., Fregene, M., & Pérez, J. C. (2007). The use of the double-haploids in cassava breeding. Arusha, Tanzania.
- CIAT. (1982). El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca. Guía de estudio. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Deng, Y. M., Teng, N. J., Chen, S. M., Chen, F. D., Guuan, Z. Y., Song, A. P., & Chang, Q. S. (2010). Reproductive barriers in the intergeneric hybridization between *Chrysanthemum grandiflorum* (Ramat.) Kitam. and *Ajania przewalskii* Poljak. (Asteraceae). *Euphytica*, 174, 41–50.
- Dunwell, J. M. (2010). Review article Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 377–424.
- Fregene, M., Ospina, J. A., & Roca, W. (1999). Recovery of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants from culture of immature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55, 39–43.
- Germanà, M. A. (2006). Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 131–146.
- Griffing, B. (1975). Efficiency change due to use of double-haploids in recurrent selection methods. *Theoretical and Applied Genetics*, 46, 367-386.
- Hodnett, G. L., Burson, B. L., Rooney, W. L., Dillon, S. L., & Price, H. J. (2005). Pollen–Pistil Interactions Result in Reproductive Isolation between *Sorghum bicolor* and Divergent *Sorghum* Species. *Crop Sci*, 45, 1403–1409. doi:10.2135/cropsci2004.0429
- Hougas, R. W., Peloquin, S. J., & Ross, R. W. (1958). The potential of haploid potatoes for research and breeding. *Amer. J. Potato Research*, 35, 442.

- Hurtado, P., Olsen, K. M., Buitrago, C., Ospina, C., Marin, J., Duque, M., . . . Fregene, M. (2008). Comparison of simple sequence repeat (SSR) and diversity array technology (DArT) markers for assessing genetic diversity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 6(3), 208-214. doi:10.1017/S1479262108994181
- Kasha, K. J., & Maluszynski, M. (2003). Production of doubled haploid in crop plants. An introduction. En K. J. M. Maluszynski (Ed.), *Double Haploid Production in Crops Plants* (pp. 1-4). The Netherland : Kluwer Academic .
- Khush, G. S., & Brar, D. S. (1992). Overcoming the barriers in hybridization. En G. Kalloo, & J. B. Chowdhury (Eds.), *Distant Hybridization of Crop Plants*. Monographs on Theoretical and Applied Genetics.
- Kielkowska, A., & Adamus, A. (2010). In vitro culture of unfertilized ovules in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 309-319.
- Lentini, Z., Martinez C., Roca W. 1997. Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Cali-Colombia
- Maine, D. (2003). Potato haploid technologies. En M. Maluszynski, J. C. Kasha, B. P. Forster, & I. Szarejko, *Doubled haploid production in crop plants: a manual* (pp. 241-248). Netherlands: Kluwer Academy.
- Neumann, K. H., Kumar, A., & Imani, J. (2009). Haploid Techniques. En *Plant Cell and Tissue Culture. A Tool in Biotechnology* (pp. 61-70). Berlin: Springer.
- Roca, W., Mornan, K., Chavez, R., & Marin, M. L. (1988). *Biotechnology Research Unit. Annual Repot* . Cali: Centro Internacional de Agricultura.
- Sun, C. Q., Chen, D. F., Teng, N. J., Liu, Z. L., Frang, W. M., & Hou, X. L. (2010a). Factors affecting seed set in the crosses between *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura and its. *Euphytica*, 171, 181-192.
- Sun, C. Q., Chen, F. D., Fang, W. M., Liu, Z. L., Hou, X. L., & Teng, N. J. (2009a). Investigation on the factors leading to infertility in the cross between *Dendranthema lavandulifolium* and *D. grandiflorum* 'Jinlinghuangyu'. *Acta Hortic*, 36, 1333-1338.
- Sun, C. Q., Chen, F. D., Fang, W. M., Liu, Z. L., Ma, J., Teng, N. J., & She, L. F. (2009b). Cellular mechanism of reproductive barrier during cross breeding between *Dendranthema grandiflorum* cv. Aoyuntianshi and *D. japonense*. *Sci Agric*, 42, 2085-2091.

- Sun, C. Q., Huang, Z. Z., Wang, Y. L., Chen, F. D., Teng, N. J., Fang, W. M., & Liu, Z. L. (2011). Overcoming pre-fertilization barriers in the wide cross between *Chrysanthemum grandiflorum* (Ramat.) Kitamura and *C. nankingense* (Nakai) Tzvel. by using special pollination techniques. *Euphytica*, 179, 195-202.
- Stebbins, G. L. (1958). The inviability, weakness and sterility of interspecific hybrids. *Adv Genet*, 9, 147-215.
- Ushiyama, T., Kuwabarab, T., & Yoshida, T. (2006). Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on the Efficiency of Wheat Haploid Production by the *Hordeum bulbosum* Method. *Plant Production Science*, 9(3), 206-211.
- Wędzony, M., Forster, B. P., Żur, I., Golemić, E., Szechyńska-Hebda, M., Dubas, E., & Gotębiowska, G. (2009). Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants. En A. Touraev, B. P. Forster, & S. Mohan Jain (Edits.), *Advances in Haploid Production in Higher Plants* (págs. 1-33). Switzerland: Springer International Publishing.
- Yan, H., Lu, L., Alzate, A., Ceballos, H., Hershey, C., Chen, S., & Li, K. (2014). Fruit, seed and embryo development of different cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes and embryo rescue. *African Journal of Biotechnology*, 13(14), 1524-1528.