

DESARROLLO DEL SACO EMBRIONARIO ASOCIADO A LA FORMACIÓN DEL
EMBRIÓN DE YUCA *IN VITRO*

GERALDINE RESTREPO ESPINOSA

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CALI
2013

DESARROLLO DEL SACO EMBRIONARIO ASOCIADO A LA FORMACIÓN DEL
EMBRIÓN DE YUCA *IN VITRO*

GERALDINE RESTREPO ESPINOSA

Proyecto de grado

Dirección: Zaida Lentini, Ph.D.

Decana Facultad de Ciencias Naturales

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CALI
2013

TABLA DE CONTENIDO

1	RESUMEN.....	5
2	ABSTRACT.....	6
3	INTRODUCCIÓN.....	7
4	DESCRIPCIÓN.....	9
4.1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
4.2	MARCO TEORICO.....	11
4.3	OBJETIVOS.....	16
4.3.1	Objetivo General.....	16
4.3.2	Objetivos Específicos.....	16
5	METODOLOGÍA.....	17
5.1	Material Vegetal y Lugar de Estudio.....	17
5.2	Colecta del Material Vegetal.....	17
5.3	Histología.....	19
5.4	Rescate de embriones cigóticos y cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	23
6	RESULTADOS.....	28
6.1	Análisis histológico de la formación del embrión de yuca.....	28
6.2	Formación de frutos a partir del material seleccionado en campo.....	33
6.3	Tipo de frutos formados.....	35
6.4	Rescate de embriones cigóticos y cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	37
7	DISCUSIÓN.....	48
8	CONCLUSIONES.....	56
9	RECOMENDACIONES.....	59
10	AGRADECIMIENTOS.....	60
11	BIBLIOGRAFÍA.....	61

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ciatio femenino de la yuca.....	13
Figura 2. Estructura del ovulo dentro del ovario del ciatio de yuca femenino.	13
Figura 3. Estructura del saco embrionario maduro	14
Figura 4. Ciatios masculinos y femeninos de la planta de yuca.....	18
Figura 5. Canastilla para portaobjetos.	22
Figura 6. Óvulos recién aislados de yuca.	25
Figura 7. Disposición de los óvulos y embriones en las cajas Petri	25
Figura 8. Cortes histológicos de ovarios el día de antesis y siguientes tres días sin polinización	28
Figura 9. Cortes histológicos de ovarios de 1 a 3 días después de polinización ..	29
Figura 10. Corte longitudinal de un ovulo a los 7 días de polinización.....	30
Figura 11. Corte longitudinal de un óvulo a los 14 días de polinización.....	31
Figura 12. Corte longitudinal de un óvulo con 21 días de polinización.....	31
Figura 13. Corte longitudinal de óvulo a los 24 días de polinización.....	32
Figura 14. Embrión aislado de una semilla con 30 días de polinización	32
Figura 15. Porcentaje de recuperación de los frutos.....	34
Figura 16. Tipos de frutos colectados en el campo.....	35
Figura 17. Tasa de recuperación de los cinco tipos de frutos	36
Figura 18. Semillas inmaduras cultivadas <i>in vitro</i> por 1 a 3 meses.....	38
Figura 19. Embriones emergiendo de los óvulos cultivados <i>in vitro</i>	39
Figura 20. Embriones extraídos después de un mes de cultivo <i>in vitro</i>	39
Figura 21. Plántulas desarrolladas <i>in vitro</i>	40
Figura 22. Planta desarrollada <i>in vitro</i>	40
Figura 23. Óvulos cultivados <i>in vitro</i> afectados por larvas	41
Figura 24. Óvulos con 7 días de polinización.....	43
Figura 25. Embriones aislados de frutos con 30 DDP.....	43
Figura 26. Gráficos sobre la cantidad de embriones, plántulas, y plantas desarrolladas obtenidos en los cuatro diferentes medios de cultivo MSREm, M6m, ½NLN y ½MS.....	44
Figura 27. Longitud de las semillas inmaduras con 7 días de polinización	45
Figura 28. Longitud de las semillas inmaduras con 14 días de polinización	45
Figura 29. Embriones prematuros aislados de semillas inmaduras con 14 días de polinización	46
Figura 30. Embriones formados aislados de semillas inmaduras con 14 días de polinización.	46
Figura 31. Porcentaje de embriones formados y de embriones prematuros que se aislaron del total de óvulos cultivados después de 14 días de polinización.....	47

TABLA DE CUADROS

Cuadro 1. Soluciones de deshidratación del material vegetal fijado	21
Cuadro 2. Soluciones de tinción del material vegetal.....	23
Cuadro 3. Composición de medios de cultivo para óvulos y/o embriones aislados de frutos con más de 21 días de polinización.	26
Cuadro 4. Composición de medios de cultivo para óvulos y/o embriones aislados de frutos con de 7 y 14 días de polinización.	27
Cuadro 5. Estados de desarrollo del embrión y del endospermo con respecto al número de días después de polinización de los frutos.	33
Cuadro 6. Formación de frutos a partir de ciatios seleccionados y polinizados por insectos en campo	34
Cuadro 7. Numero de frutos colectados para cada uno de los tipos determinados en los diferentes días después de polinización (DDP).....	36

1 RESUMEN

La yuca es un cultivo importante en la agricultura de subsistencia, ambientes marginales y altamente vulnerables. El mejoramiento genético de la yuca es ineficiente debido a su complejidad genética y falta de conocimiento básico sobre su biología reproductiva. La diferenciación de plantas a partir del cultivo *in vitro* de células cigotas es una alternativa eficiente para producir poblaciones homocigotas (doble haploides, DH) para el desarrollo de variedades con características deseadas que incrementarían la productividad del cultivo, o para la identificación de características recesivas, producción de stocks genéticos para la conservación e intercambio de diversidad genética. Para desarrollar esta técnica se necesitan datos acerca de la formación y los estados de desarrollo de los gametofitos femeninos y masculinos de la yuca. En el caso de inducir la formación de DH obtenidos a partir de los gametofitos femeninos (ginogénesis) sin fecundar, se requiere conocer la etapa de maduración del saco embrionario en la que se puede inducir la división de la ovocélula sin haber sido fecundada, y las condiciones adecuadas para permitir el desarrollo completo del embrión dentro del saco embrionario sin fecundación, permitiendo su posterior germinación y desarrollo de plantas. El objetivo de esta investigación fue identificar el estado óptimo del desarrollo del saco embrionario y la etapa más temprana en la cual se puede inducir *in vitro* el desarrollo de embriones cigóticos y su conversión en plantas, para usarlo como modelo en la inducción *in vitro* de embriones y plantas a partir de óvulos no fecundados en yuca. Para lograrlo, se documentaron los cambios estructurales y celulares en diferentes estados de desarrollo del saco embrionario de flores femeninas fecundadas y no fecundadas de una línea de yuca (SM1219-9). Se optimizó una metodología para permitir el desarrollo de embriones cigóticos en etapas tempranas de formación después de la fecundación, hasta la obtención de plantas completamente desarrolladas. Se logró obtener dichas plantas a partir de embriones con 21 días de polinización. Este trabajo es el primer reporte de recuperación de plantas a partir del cultivo *in vitro* de óvulos fecundados de yuca en estados anteriores a 35 días de polinización, edad del fruto maduro. Se adelantan estudios para identificar los medios de cultivo ideales para permitir el desarrollo embrionario desde etapas más tempranas a partir de 7 días de polinización. Esta información será utilizada como base y modelo para la optimización de la estrategia aplicable a los embriones DH obtenidos vía ginogénesis *in vitro*.

Palabras Clave: yuca, ginogénesis, doble haploides, desarrollo embrionario, rescate de embriones.

2 ABSTRACT

Cassava is an important crop in subsistence farming, marginal and highly vulnerable environments. Genetic improvement of cassava is inefficient due to its genetic complexity and lack of basic knowledge about its reproductive biology. The differentiation of plants from *in vitro* culture of haploid cells is an efficient alternative to produce homozygous populations (double haploids, DH) to develop varieties with desired characteristics that would increase crop productivity, or for the identification of recessive traits, production of genetic stocks for conservation and exchange of genetic diversity. To develop this technique, data on the formation and development stages of male and female gametophytes of cassava are needed. In the case of DH obtained by female unfertilized gametophytes (gynogenesis), knowledge about the maturation stage of the embryo sac in which the division of the unpollinated egg cell can be induced, and the optimal conditions to allow the complete embryo development in the unfertilized embryo sac, allowing its germination and plant development. The objective of this research was to identify the optimal development of the embryo sac and the earliest stage at which can be induced *in vitro* development of zygotic embryos and their conversion into plants, for use as a model for *in vitro* embryo and plants induction from unfertilized eggs in cassava. To achieve this, the structural and cellular changes were documented in various stages of development of the embryo sac of fertilized and unfertilized female flowers of a line of cassava (SM1219-9). A methodology was optimized to allow the development of zygotic embryos in early stages of formation after fertilization, to obtain fully developed plants. It was possible to obtain these plants from embryos with 21 days of pollination. This investigation is the first report of plant rescue from *in vitro* culture of fertilized cassava's ovules in early stages of development before 35 days of pollination, mature fruit age. There are studies in progress to identify ideal culture media to allow the embryo development from earlier stages, even 7 days from pollination. This information will be used as the basis and model for the optimization of the strategy applicable to DH embryos obtained via gynogenesis.

Key Words: *Cassava, gynogenesis, double haploids, embryo development, embryo rescue.*

3 INTRODUCCIÓN

El cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), así como el maíz, la caña de azúcar y el arroz, constituye una de las fuentes de energía más importantes en la dieta de la mayoría de los países tropicales del mundo (CCER, 2005). Los pequeños agricultores en los países en vía de desarrollo del África tropical, América del Sur y Asia cultivan la raíz almidonada de la yuca principalmente como alimento básico (Halsey, y otros, 2008). Dada la importancia de este cultivo, se han desarrollado variedades de yuca utilizando diferentes tecnologías que han permitido obtener características que aumentan la productividad del mismo (Kawano, 2003), tales como tolerancia a la sequía y a suelos empobrecidos nutricionalmente, entre los cuales se encuentran los suelos ácidos, resistencia a enfermedades y pestes, y mayor productividad en almidón y calidad nutricional. La yuca puede ser propagada vegetativamente a partir de estacas o por vía sexual mediante la producción de semillas. Sin embargo la reproducción sexual solo se utiliza en los programas de mejora genética y no para la propagación del material debido a la baja tasa de producción de semilla sexual que restringen de forma importante el progreso en dichos programas, y a la alta heterocigosidad del cultivo, la cual no permite asegurar que las características deseadas se expresarán en la siguiente generación (Jennings, 1963).

Se ha planteado la inducción de Doble Haploides para el mejoramiento de este cultivo, debido a que sirve como un método rápido para la producción de líneas homocigotas (puras), y también como una herramienta de selección para la eliminación de los genotipos que expresan una fuerte depresión por endogamia, como por ejemplo para los rasgos causados por genes recesivos deletéreos (Murovec & Bohanec, 2011). Estas líneas puras ofrecerían varias ventajas, tales como la explotación de los rasgos recesivos, la disminución de la heterocigosidad de la especie y la producción de híbridos a partir de estas con características deseadas (Ceballos y otros, 2010). La tecnología DH se refiere a la obtención de líneas puras de las variedades a partir de la inducción de la duplicación del genoma de gametos haploides, ya sean femeninos o masculinos. Se le conoce como androgénesis si se induce a partir de las microsporas, las anteras y/o estructuras reproductivas masculinas; o como ginogénesis si se induce a partir de la ovocélula, el óvulo y/o estructuras reproductivas femeninas (Murovec & Bohanec, 2011). Para desarrollar estas técnicas se necesitan datos precisos de la formación y estados de desarrollo de los gametofitos femeninos y masculinos. En el caso de los gametofitos femeninos, se requiere conocer la etapa de maduración del saco embrionario en la que se puede inducir DH, y la disposición de la ovocélula en el saco embrionario, entre otros, lo cual es un requisito previo para iniciar la investigación asociada al desarrollo de la tecnología de dobles haploides. Esta información permite identificar el estado de desarrollo de la ovocélula, y definir las condiciones del cultivo *in vitro*, como son la composición del medio de

cultivo, las condiciones de temperatura y luminosidad, entre otros tipos de tratamientos, necesarios en la inducción de la división de la ovocélula a partir de la cual se generarán los embriones por división partenogénica, y posteriormente los DH. Hasta ahora, hay poco conocimiento de la biología reproductiva de la yuca (Ogburia & Adachi, 1996).

Este proyecto tuvo como objetivo identificar el estado óptimo del desarrollo del saco embrionario y de embriones cigóticos en flores de yuca para la inducción *in vitro* de embriones y plantas a partir de óvulos no fecundados. Para lograrlo, se documentaron los cambios estructurales y celulares en diferentes estados de desarrollo del saco embrionario de flores femeninas fecundadas y no fecundadas de una línea de yuca (SM1219-9) que está siendo utilizada por el laboratorio de investigación de Biotecnología de la Universidad Icesi en colaboración con el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en su proyecto "*Inbreeding in cassava through the production of double haploids*", el cual está siendo financiado por la fundación Bill & Melinda Gates. Esto se hizo mediante el uso de técnicas de microscopía óptica y fluorescencia para visualizar los tejidos teñidos con Fast Green (FCF) que proporcionó un color verde azulado a las paredes celulósicas y un tono verde violáceo al citoplasma, y con Safranina-O que tiñó de rojo a la cutina, paredes lignificadas, nucléolo, y cromatina (Sandoval, 2005). Con lo anterior, se identificó el estado óptimo de desarrollo de la ovocélula para inducir su división celular mediante cultivo *in vitro*. Por otra parte, se optimizó la metodología para permitir el desarrollo de embriones cigóticos en etapas tempranas de formación después de la fecundación, hasta la obtención de plantas completamente desarrolladas. Esto se logró mediante el cultivo *in vitro* de embriones en formación a los 7, 14, 21, 24 y 30 días después de la polinización en seis medios de cultivo adaptados de acuerdo al estado de desarrollo en que se encontrarán los embriones. Para este estudio se tomaron como base los estudios de medios de cultivo reportados por Bonilla, 2011. El presente trabajo reporta cambios importantes respecto a la composición de los medios y condiciones de cultivo respecto a esos estudios preliminares.

4 DESCRIPCIÓN

4.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las variedades de yuca se desarrollan utilizando diferentes tecnologías que han permitido obtener características que aumentan la productividad del cultivo (Kawano, 2003), tales como tolerancia a la sequía y a suelos empobrecidos nutricionalmente, entre los cuales se encuentran los suelos ácidos, resistencia a enfermedades y pestes, y mayor productividad en almidón y calidad nutricional. La yuca puede ser propagada vegetativamente a partir de estacas o por vía sexual mediante la producción de semillas, sin embargo la reproducción sexual solo se utiliza en los programas de mejora genética y no para la propagación del material debido a la alta heterocigosidad del cultivo, lo cual no garantiza la herencia de los caracteres seleccionados en las siguientes generaciones, a problemas de fertilidad, y a las bajas tasas de producción y de germinación de las semillas (Jennings, 1963). Los altos niveles de heterocigosidad y la baja tasa de producción de semilla sexual restringen de forma importante el progreso en programas de mejoramiento genético, convirtiéndose ésta en unas de las barreras más importantes para la producción de nuevas variedades.

En las últimas dos décadas se ha visto la necesidad de aumentar la productividad del cultivo, en particular para incrementar la producción de hidratos de carbono (almidón) con mejoras en la calidad nutricional y con una amplia diversidad de aplicaciones industriales, lo que daría al cultivo un mayor precio para el pequeño agricultor del trópico, quien normalmente cultiva en condiciones subóptimas de crecimiento para las plantas como son la falta de suministro adecuado, de irrigación (depende principalmente del suministro de agua de lluvias), en suelos infértiles y con insumos limitados. Las condiciones a las que está adaptado este cultivo lo hace atractivo para su producción en condiciones extremas de frontera agrícola. Dado el potencial económico y nutritivo que tiene esta especie, se ha querido desarrollar programas de mejoramiento para incorporar nuevas características, pero el proceso es muy lento e ineficiente debido a la complejidad genética de la yuca causada por su alta heterocigosidad (Fregene, y otros, 1999). Otro factor que limita la efectividad de los híbridos obtenidos en el cruce de las variedades es la falta de sincronización en la floración, debido a que las variedades por lo general tienen ciclos de floración diferentes afectando la disponibilidad de flores necesarias para el programa de cruzamientos (Ellis, y otros, 1982). Una forma de hacer eficiente la mejora genética en esta especie es la implementación de la endogamia, que hace referencia a la autofecundación de los individuos híbridos o recíprocamente con los parentales que participaron en el cruce, hasta la obtención de individuos homocigotos (líneas puras). Esto ofrecería varias ventajas, tales como la explotación de los rasgos recesivos, la disminución

de la carga genética, es decir de la heterocigosidad de la especie y la producción de híbridos a partir de estas líneas puras con características deseadas (Ceballos y otros, 2010). Este proceso también tiene una limitación ya que puede causar la expresión de alelos deletéreos recesivos, provocando así la disminución de la viabilidad de los homocigotos (Fregene, y otros, 1999). Las líneas puras de cada variedad pueden ser obtenidas también, mediante la producción de doble haploides (DH), que se refiere a los embriones obtenidos por la duplicación del genoma de los gametofitos haploides (femeninos o masculinos). Los DH pueden ser inducidos vía androgénesis a partir de las microsporas, las anteras y/o estructuras reproductivas masculinas; o vía ginogénesis a partir de la ovocélula, el óvulo y/o estructuras reproductivas femeninas. A pesar de que los DH obtenidos por la vía ginogenética muestran mayor estabilidad genética en comparación con los obtenidos por la vía androgenética, la ginogénesis se utiliza principalmente en las plantas en las que otras técnicas de inducción, como androgénesis, han fallado. (Murovec & Bohanec, 2011). En el caso de la yuca, se está experimentando con ambas vías, el CIAT está evaluando la obtención de los DH por androgénesis, y la Universidad Icesi por ginogénesis. Para desarrollar estas técnicas se necesitan datos precisos de la formación y estados de desarrollo de los gametofitos femeninos y masculinos. En el caso de los gametofitos femeninos, se requiere conocer la etapa de maduración del saco embrionario en la que se puede inducir los DH, y la disposición de la ovocélula en el saco embrionario, entre otros. Esta información permite al investigador identificar el estado de desarrollo de la ovocélula, y definir las condiciones del cultivo *in vitro*, como son la composición del medio de cultivo, las condiciones de temperatura y luminosidad, diferentes tipos de tratamientos, entre otras, necesarias en la inducción de la división de la ovocélula a partir de la cual se generarán los embriones por división partenogénica, y posteriormente los DH.

Hasta ahora, hay poco conocimiento de la biología reproductiva de la yuca (Ogburia & Adachi, 1996). Este proyecto estudió el proceso de formación y maduración del saco embrionario en óvulos no fecundados, con el fin de identificar el estado óptimo para inducir divisiones de la ovocélula vía partenogénesis hasta obtener la formación del embrión DH (ginogénesis). Dicha identificación pudo lograrse a través de estudios histológicos que permitieron evidenciar los cambios correspondientes a nivel celular en cada etapa de maduración. Con el fin de establecer las mejores condiciones para inducir la diferenciación y desarrollo del embrión DH hasta obtener plantas aptas para ser transferidas al invernadero y posteriormente al campo, en este proyecto de grado se estableció el mejor procedimiento para obtener plántulas a partir de embriones cigóticos aislados a los pocos días después de la fecundación y cultivados *in vitro*. Esto permitió determinar cuál sería la etapa más temprana en el desarrollo del embrión en la que puede ser manipulado para obtener plántulas, lo cual será utilizado como base y modelo para la optimización de la estrategia aplicable a los embriones DH obtenidos vía ginogénesis.

4.2 MARCO TEORICO

El cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), así como el maíz, la caña de azúcar y el arroz, constituye una de las fuentes de energía más importantes en la dieta de la mayoría de los países tropicales del mundo (CCER, 2005). Los pequeños agricultores en los países en vía de desarrollo del África tropical, América del Sur y Asia cultivan la raíz almidonada de la yuca principalmente como fuente de alimento básico (Halsey, y otros, 2008). La yuca es una especie perenne de la familia *Euphorbiaceae*, es monoica por lo que sus estructuras reproductivas femeninas y masculinas se encuentran en el mismo individuo (Cuhna, 2002). El género *Manihot* se originó en Sur América, más exactamente en el Amazonas en Brasil, Colombia y Venezuela donde fue domesticada (Allem, 2002). El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Colombia, es una de las pocas instituciones en el mundo donde se han realizado proyectos de mejoramiento, modernización de prácticas culturales y desarrollo de nuevos métodos de procesamiento del material vegetal (Jennings & Iglesias, 2002).

El mejoramiento vegetal es una alternativa para incrementar la productividad de la mayoría de los cultivos económicamente importantes, debido a las ventajas que pueden obtenerse a través de éste, tales como la generación de nuevas variedades con características deseadas para el cultivo, ya sea resistencia a pestes o adaptaciones a los cambios ambientales que se enfrentan actualmente. La yuca ha sido beneficiada de implementaciones tecnológicas en el área de mejoramiento, como por ejemplo, la tolerancia a la sequía, a suelos ácidos, pobres en nutrientes y deteriorados, y resistencia a enfermedades y pestes (Kawano, 2003). La característica de esta especie para producir alimento bajo condiciones marginales y su capacidad para la propagación asexual (por estacas), han convertido este cultivo en uno de los principales económicamente para los agricultores de escasos recursos que no pueden invertir en fertilizantes y pesticidas para protegerlos (DeVries & Toenniessen, 2001). Se han desarrollado variedades de yuca a través de diferentes tecnologías que han permitido obtener características que aumentan la productividad del cultivo (Kawano, 2003). Sin embargo, el mejoramiento tradicional de la yuca se ve limitado por una serie de factores como los altos niveles de heterocigosidad genética, los ciclos de floración variables entre las variedades y la baja tasa de germinación de semillas (Jennings & Iglesias, 2002). Dado el potencial económico y nutritivo que tiene esta especie, se ha querido implementar nuevas tecnologías en el área de cultivo de tejidos, transformación genética y biología molecular para contribuir en el mejoramiento de la misma (Fregene, y otros, 1997). Se ha planteado el uso de la ingeniería genética para aumentar la calidad nutricional de las raíces (Welsch, y otros, 2010), y para generar resistencia a enfermedades y pestes, y el cultivo de tejidos para una multiplicación rápida del material seleccionado con características deseadas (Fregene & Puonti-Kaerlas, 2002). Dentro de las nuevas tecnologías que se han querido implementar se encuentra la inducción de DH para el mejoramiento de

este cultivo, debido a que sirve como un método rápido para la producción de líneas homocigotas, y también como una herramienta de selección para la eliminación de los genotipos que expresan una fuerte depresión por endogamia, como por ejemplo para los rasgos causados por genes recesivos deletéreos (Murovec & Bohanec, 2011). Esta tecnología se refiere a la obtención de líneas puras de variedades de plantas a partir de la inducción de la duplicación del genoma de gametos haploides, ya sean femeninos o masculinos. Los dobles haploides (DH) se han utilizado comúnmente en el mejoramiento de cultivos durante décadas, pero a pesar de su constante uso, la implementación de esta herramienta es aún limitada en algunas especies. Esto se debe a la biología de cada especie, es decir, a su forma de reproducción, su morfología y su fisiología, además de que influye también el ciclo de vida de la especie, ya sea anual, bienal, perenne, o si puede o no propagarse vegetativamente, y la eficiencia de la técnica que es utilizada para implementar esta tecnología. Los protocolos de inducción de DH pueden variar sustancialmente entre especies, y también entre los genotipos de la misma especie (Murovec & Bohanec, 2011), en cuanto a la composición de los medios de cultivo *in vitro*, al tipo de gametofito que será inducido, las condiciones ambientales en las que debe encontrarse el cultivo, entre otros.

La producción de líneas puras utilizando DH tiene varias ventajas sobre los métodos convencionales (endogamia), debido a que los sistemas de producción de DH permiten conseguir la homocigosis en una sola generación, lo que a su vez, elimina la necesidad de varias generaciones de autopolinización. El ahorro de tiempo en el mejoramiento del cultivo es considerable, sobre todo en los cultivos bienales o perennes como la yuca, y en cultivos con un período juvenil largo. Para las especies que son autocompatibles, dioicas o especies que sufren de depresión endogámica debido a la autopolinización, esta tecnología puede ser la única manera de desarrollar las líneas puras (Murovec & Bohanec, 2011). Los DH obtenidos son homocigotos en todos los loci y pueden representar una nueva variedad, o una línea pura de los parentales para la producción de variedades híbridas que expresen las características deseadas para el mejoramiento del cultivo.

La inducción *in vitro* de dobles haploides a partir de un gametofito femenino, también conocida como “ginogénesis”, es una vía para la producción de embriones homocigotos. Estos pueden ser obtenidos a partir de las megasporas o de la ovocélula en el saco embrionario maduro de las plantas sometidos a cultivo *in vitro* para inducir el desarrollo esporofítico (Chen, y otros, 2011). La producción de plantas DH mediante ginogénesis a través del cultivo de los ovarios no fecundados fue descrita por primera vez en la cebada (San Noeum, 1976). En la yuca, se tiene poco conocimiento acerca de las estructuras florales y de su biología reproductiva (Cuhna, 2002), sin embargo se ha identificado que las flores de yuca son apétalas, lo que significa que no tienen pétalos ni sépalos, las femeninas son individuales y han sido reducidas a un pistilo protegido por brácteas en forma de pétalos (Figura 1). Cada flor en realidad es una inflorescencia

compuesta por tres óvulos (Wedzony, 2010). Las inflorescencias son conocidas como ciatios, que son estructuras en forma de vaso con brácteas fusionadas y con glándulas nectáreas que encierran un solo gineceo u ovario (Prenner & Rudall, 2007), que a su vez están protegidos por brácteas y bractéolas. Lo que comúnmente son llamados tépalos (sépalos como pétalos) son en realidad brácteas. Las flores masculinas también se reducen a un solo estambre y forman inflorescencias de 10 estambres en cada flor (Perea, y otros, 2013). El óvulo de la yuca (Figura 2) se encuentra conectado al ovario a través de un pico nucelar, también presenta estructuras como eliosomas, que son los extremos terminales de los tegumentos (interno y externo), dentro de estos tegumentos se encuentra ubicado el saco embrionario (Wedzony, 2010). El saco embrionario (Figura 3) contiene ocho núcleos haploides: tres antípodas, dos sinérgidas, dos núcleos polares y la ovocélula, de los cuales solo tres son fecundados por los dos microgametocitos del grano de polen, la ovocélula fecundada da paso al embrión y los núcleos polares fecundados dan paso al endospermo que servirá como alimento del embrión en desarrollo (Reiser & Fischer, 1993).

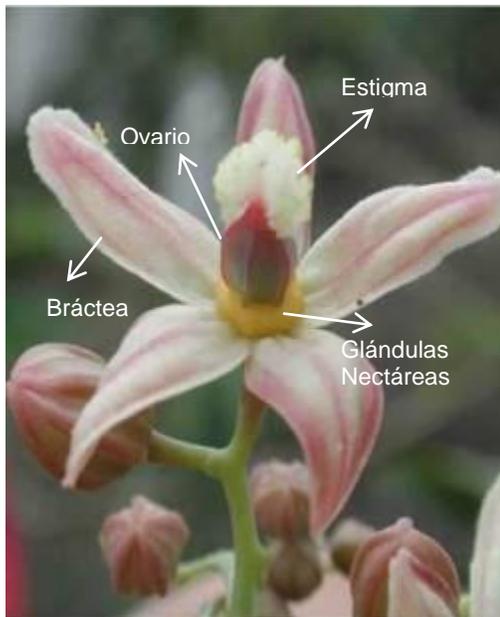


Figura 1. Estructura del ciatio femenino de la yuca. Se observan las glándulas nectáreas, las brácteas, el estigma y el ovario.

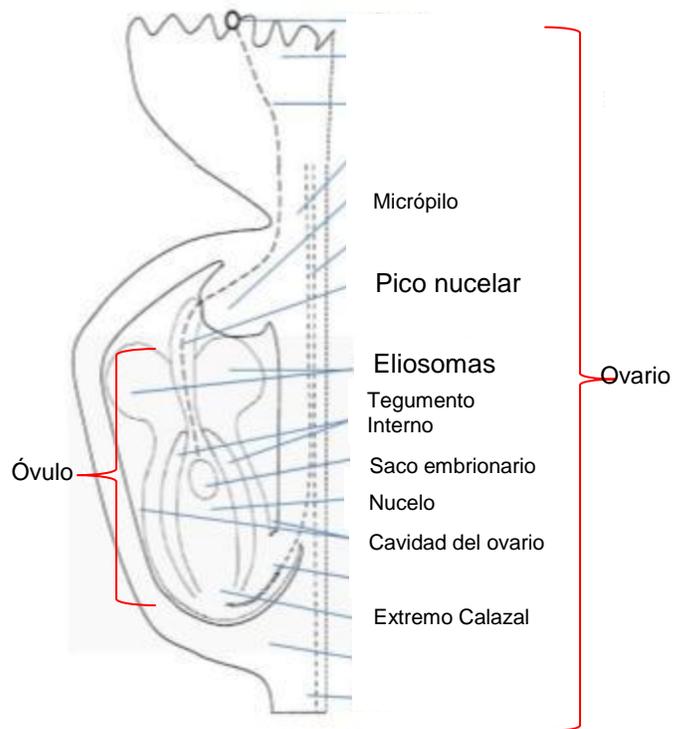
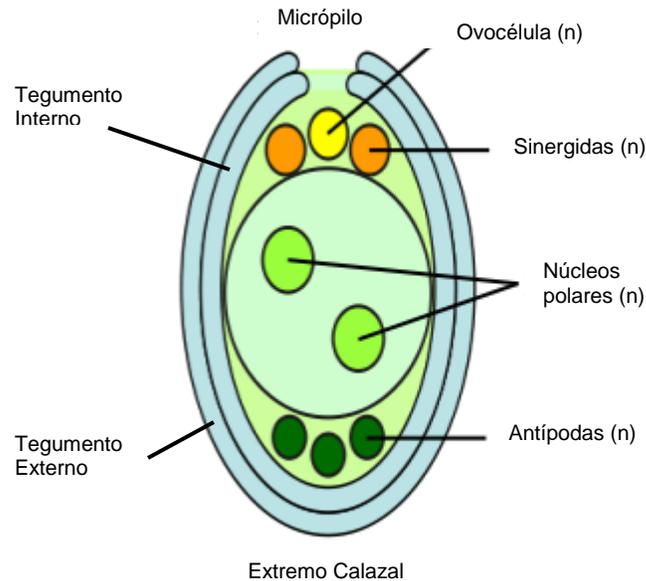


Figura 2. Estructura del óvulo dentro del ovario del ciatio de yuca femenina.

Figura 3. Estructura del saco embrionario maduro



La obtención de embriones DH se puede lograr con el cultivo *in vitro* de diversas partes del ciatio femenino de la yuca sin ser polinizados, ya sean estructuras como los óvulos u ovarios, o aislando el saco embrionario, ya que finalmente el objetivo es inducir la duplicación del genoma de la ovocélula. La ginogénesis se utiliza principalmente en las plantas en las que otras técnicas de inducción de la formación de embriones DH hayan fallado, tal como la androgénesis en la que se induce esta tecnología a partir de gametofitos masculinos como las microsporas (Murovec & Bohanec, 2011). La inducción ginogénica usando partes de las flores sin polinización ha tenido éxito en varias especies, como la cebolla, la remolacha azucarera (Hoseman & Bossoutrot, 1983), el pepino, la calabaza, el girasol, el trigo, la cebada, entre otros (Bohanec, 2009).

La inducción de la ginogénesis ha sido probada en un número significativo de plantas económicamente importantes. En general, este tipo de protocolos consisten en diferentes fases y se pueden dividir en los siguientes componentes principales: (a) la selección del genotipo, (b) la etapa de desarrollo del óvulo, (c) tratamiento previo, y (d) composición del medio de cultivo y fitohormonas. Estos son los principales factores que controlan la inducción y el desarrollo de las líneas puras de las variedades de la especie vegetal (Chen, y otros, 2011). En cuanto a la selección del genotipo, su importancia se debe a que las necesidades de cada variedad varían de acuerdo al ambiente en el que han sido desarrolladas lo cual influye en las características que se encuentran en el genotipo de cada una, y con respecto al medio de cultivo y las fitohormonas utilizadas, se debe a que cada etapa de desarrollo de la planta necesita unos nutrientes diferentes dependiendo de las necesidades que enfrente la planta en la formación de sus estructuras. La etapa de desarrollo de los óvulos tiene una profunda influencia en la ginogénesis

in vitro (San Noeum & Gelebart, 1986), debido a que se necesita que el óvulo ya haya desarrollado en su saco embrionario los núcleos producidos por la mitosis de las células haploides que a su vez se producen en la megasporogénesis, ya que solo estas pueden ser inducidas a duplicar su genoma para así obtener los embriones DHs homocigotos. La etapa de desarrollo del óvulo en el momento de la inducción *in vitro* no se ha estudiado ampliamente en yuca. En muchas especies de cultivos, tales como cebada, remolacha azucarera, maíz, y girasol, varios autores encontraron que la ginogénesis óptima se obtiene con sacos embrionarios casi maduros, lo que se refiere a que ya se haya formado la ovocélula a partir de la mitosis de las megasporas (Hoseman & Bossoutrot, 1983; Lux, Herrmann, & Wetzel, 1990; San Noeum & Gelebart, 1986). El estudio histológico del saco embrionario del pepino indicó que la posibilidad de que se dé la inducción de haploides a partir de megasporas, es decir las células haploides que luego de sus divisiones mitóticas dan lugar al saco embrionario, o en las primeras etapas del saco embrionario, es decir que aún no se ha producido la mitosis en todas las megasporas, puede ser excluida. Los ovarios más sensibles (u óvulos) tenían sacos embrionarios maduros o casi completamente maduros, en los que ya se observaba la formación de los 8 núcleos que los conforman (Gémes-Juhász, y otros, 2002). En el caso de la yuca, este proyecto propone el estudio histológico para la observación de estos cambios estructurales producidos a nivel celular en el saco embrionario para determinar las etapas de maduración del mismo y así decidir cuándo es el momento óptimo para inducir la generación de embriones homocigotos.

Las diferentes respuestas a la tecnología DH, vía ginogénesis, han sido observadas en numerosos cultivos, por ejemplo, en las uvas (Nakajima, y otros, 2000), en la remolacha azucarera (Gürel, y otros, 2000) y en el pepino (Gémes-Juhász, y otros, 2002). A excepción de dos artículos, uno sobre la relación entre las etapas de desarrollo de la antera y el tamaño del brote floral (Wang, y otros, 2010) y otro sobre el desarrollo del saco embrionario (Ogburia & Adachi, 1996), los estudios completos sobre la biología y el desarrollo estructural de los brotes florales en cultivos de yuca son escasos (Perea, y otros, 2013). Con este proyecto se buscó contribuir al conocimiento sobre la biología reproductiva de la yuca, especialmente en cuanto al estado óptimo de madurez del saco embrionario para la inducción de la generación de embriones DH; así como también en cuanto al procedimiento que se debe llevar a cabo para producir plántulas a partir de estos embriones, manipulando embriones en estados de desarrollo menores a 35 días después de polinización. Ya que hasta ahora solo se ha logrado obtener embriones después de este tiempo de maduración (Biggs, y otros, 1986).

4.3 OBJETIVOS

4.3.1 Objetivo General

Identificar el estado óptimo del desarrollo del saco embrionario y de embriones cigóticos en flores de yuca para la inducción *in vitro* de embriones y plantas a partir de óvulos no fecundados.

4.3.2 Objetivos Específicos

- Documentar los cambios estructurales y celulares en diferentes estados de desarrollo del saco embrionario de flores femeninas fecundadas y no fecundadas, utilizando técnicas de microscopía óptica y fluorescencia.
- Identificar el estado óptimo de desarrollo de la ovocélula para inducir su división celular mediante cultivo *in vitro*.
- Optimizar la metodología para permitir el desarrollo de embriones cigóticos en etapas tempranas de formación después de la fecundación, hasta la obtención de plantas.

5 METODOLOGÍA

5.1 Material Vegetal y Lugar de Estudio

Una variedad de yuca, SM1219-9, se seleccionó para el presente estudio. Este genotipo está siendo utilizada por el laboratorio de investigación de Biotecnología de la Universidad Icesi en colaboración con el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en su proyecto "*Inbreeding in cassava through the production of double haploids*". SM1219-9 es una variedad obtenida de una polinización abierta realizada en el CIAT, la cual tiene propiedades de resistencia a plagas (Cach, y otros, 2006). Esta variedad fue escogida debido a que es económicamente importante para los agricultores del país, además de tener características deseadas para el mejoramiento genético y una amplia adaptación a diferentes ambientes. Otros factores importantes son que produce una gran cantidad de flores y tiene un ciclo de floración corto. La línea es cultivada en el campo del CIAT ubicado en la vía Palmira, Valle del Cauca.

5.2 Colecta del Material Vegetal

Se seleccionaron las inflorescencias que se encontraban ubicadas en la tercera y cuarta ramificación de la planta para estandarizar y trabajar con material de estados de desarrollo fisiológico comparable. Se retiraron los ciatios masculinos y se dejaron los ciatios femeninos que tienen un color verdoso en las brácteas y color amarillo pálido en la punta de las mismas, debido a que estas características indican que el ciatio está en un estadio justo anterior a la antesis. Los ciatios femeninos son más grandes que los masculinos, se ubican en la parte basal de la inflorescencia y tienen forma redonda con la punta de las brácteas roma (Figura 4). Se realizaron dos tratamientos, ciatios con o sin polinización, para comparar los cambios estructurales del óvulo con o sin fecundación hasta que el embrión se ha formado completamente en aquellos que fueron polinizados. Luego de la selección se asignaron los ciatios a dos tratamientos, se procedió a embolsar los ciatios que se usarían para los análisis sin polinización, antes de las 9:30am para asegurar que estaban protegidos antes del proceso de antesis y evitar que fueran polinizados. Este proceso de antesis se caracteriza por la apertura de las brácteas que permite la fertilización de los óvulos. Para evitar la fertilización en campo, los ciatos se cubrieron con una bolsa o saco de tela sintética tul que impidió la entrada de polen y permitió el intercambio gaseoso evitando el deterioro fisiológico por el encerramiento. Con este tratamiento se determinó la evolución de los óvulos sin polinización identificando el momento en el cual el saco embrionario llega a su estado máximo de desarrollo seguido de su deterioro fisiológico debido a que la fecundación no fue efectuada. Para este estudio comparativo se seleccionaron 15

ciatios femeninos por tratamiento y día de observación después de antesis o polinización.



Figura 4. Ciatios masculinos y femeninos en la tercera ramificación de la planta de yuca.

Estudios preliminares indican que el estado de desarrollo de embrión globular se obtiene 21 días después de la polinización y los óvulos que no son fecundados probablemente han degenerado después de este tiempo. Al cabo de 35 días después de la polinización el embrión de yuca debe estar completamente formado, y puede ser manipulado sin afectar su viabilidad y cultivado *in vitro* sin mayor dificultad. Para evaluar la evolución en los estados de desarrollo del saco embrionario se evaluaron ciatios sin polinización a los 0, 1, 2, 3, y 7 días, después de antesis, con un total de 15 ciatios por día, para un total de 75 ciatios para análisis histológicos. Para evaluar la formación del embrión en los días subsiguientes después de la polinización se realizaron evaluaciones a los 1, 2, 3, 7, 14, 21, 24, y 30 días después de la polinización, con un total de 15 ciatios por día, para un total de 120 ciatios polinizados para análisis histológicos. Con el fin de determinar la mejor composición del medio de cultivo que permitiera el normal desarrollo de embriones cigóticos *in vitro*, se rescataron los embriones en formación a los 21, 24 y 30 días después de la polinización y se cultivaron en 4 medios de cultivo adecuados para permitir el completo desarrollo hasta obtener plantas. Además, se cultivaron óvulos fertilizados que se aislaron a los 7 y 14 días después de la polinización, en 4 medios acordes para los estadios tempranos de la ovocélula fecundada.

Para realizar las polinizaciones, se marcaron los ciatios que fueron seleccionados pero no embolsados y se permitió la polinización natural, debido a que estudios anteriores demostraron que es más eficiente y se obtienen mayor cantidad de frutos. Los ciatios femeninos solo pueden ser polinizados el mismo día de antesis, ya que luego de este cierra sus brácteas y el estigma se descompone evitando así la polinización posterior. Debido a lo anterior, se conocía con exactitud el número de días que llevaban los frutos después de ser polinizados, y así se logró determinar el tiempo requerido para la formación del embrión, sus estadios de maduración y el estado de desarrollo más temprano que puede ser extraído y cultivado *in vitro* permitiendo su germinación y conversión en planta. Los ciatios que fueron polinizados se reconocían porque el estigma quedaba completamente cubierto por los granos de polen y se observaba de color amarillo. Los granos de polen de yuca son generalmente amarillos o anaranjados, y miden entre 122 a 148 μm de longitud, son más grandes que los granos de polen de la mayoría de las plantas con flores (Gosh, y otros, 1988).

El material se colectó en el campo y fue llevado al laboratorio en el tiempo respectivo acorde a los diferentes tratamientos previamente descritos. Para coleccionar el material, el ciatio se cortó de 1 a 2 cm debajo de su base y se guardó en una bolsa plástica que se colocó dentro de un recipiente plástico, para ser guardado a 4°C en una nevera de icopor con hielo que evitaría los daños fisiológicos durante el transporte del campo hasta el laboratorio.

5.3 Histología

Se realizó un análisis histológico del desarrollo del gametofito femenino a través del tiempo (0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 24, 30 días después de antesis o polinización del ciatio femenino). Este análisis tenía el objetivo de comparar el proceso de maduración del saco embrionario en ciatios fecundados con aquellos no polinizados en la variedad de estudio. Esta evaluación dio la información acerca de los procesos de maduración del saco embrionario y ayudó a determinar si son afectados o no por la polinización en sí misma. Además, se pudo hacer un paralelo de los cambios estructurales y desarrollo del óvulo hasta la formación del embrión cigótico en ciatios fecundados con aquellos en el saco embrionario de ciatios no polinizados tratados *in vitro* para la inducción de DH. El protocolo utilizado se estableció por la experimentación y las recomendaciones de la Dra. María Wedzony, asesora internacional del proyecto DH CIAT-Icesi (Instituto de Fisiología Vegetal, Universidad de Cracovia, Polonia, comunicación personal), el cual se describe a continuación.

- 5.3.1 Fijación: Para garantizar la visualización de la etapa relacionada al día de colecta del material, los ciatios femeninos colectados acorde al tratamiento (sección 5.2) se incubaron en una solución fijadora AFA (Ácido acético glacial-Formaldehído-Alcohol al 75%, 5:7:88), lo cual detuvo todo proceso fisiológico y de descomposición. Este tratamiento se realizó justo después del muestreo en el campo. Las muestras se dejaron en la solución fijadora durante 8 semanas para asegurar la mayor penetración del fijador a los tejidos.
- 5.3.2 Eliminación del Fijador: Una vez finalizada la fijación, las muestras se colocaron en los casetes para histología. Estos casetes son recipientes diseñados que permiten manipular fácilmente el tejido y someterlo a los siguientes tratamientos sin dañarlo. Las muestras se dejaron en alcohol al 70% durante 24 horas para eliminar el fijador.
- 5.3.3 Deshidratación y Emparafinado: Una vez eliminado el fijador, el material se deshidrató pasándolo a través de un gradiente de diferentes soluciones, compuestas por alcohol etílico al 96%, alcohol etílico absoluto, ter-butanol y agua las cuales varían en la concentración de cada uno de estos compuestos (Cuadro 1). El objetivo de estas soluciones era retirar el agua del tejido que sería procesado para el análisis histológico, debido a que el material vegetal debe ser incluido en parafina y ésta no es soluble en agua (Sandoval, 2005). Las muestras se sumergieron en cada solución a diferente tiempo según lo indicado en Cuadro 1. Inmediatamente después de la deshidratación, las muestras se colocaron en parafina líquida a una temperatura de 60°C durante una hora. Se retiraron de allí y se colocaron en otro recipiente para un segundo baño de parafina durante una hora. Esto se realizó debido a que muy pocos tejidos vegetales son lo suficientemente rígidos por sí mismos como para poder ser cortados en secciones delgadas, del orden de unos 10 µm de espesor, sin ningún soporte o sostén adicional.

Cuadro 1. Soluciones de deshidratación del material vegetal fijado

Solución	OH etílico 96%	OH etílico absoluto	Ter-butanol	H ₂ O	Tiempo (horas)
1	0.5		0.1	0.4	1
2	0.5		0.2	0.3	1
3	0.5		0.35	0.15	1
4	0.5		0.5		1
5		0.25	0.75		1
6			1		1.5
7			1		1.5

5.3.4 Inclusión: Se introdujeron los casetes con las muestras en parafina líquida a 60°C durante 20 minutos aproximadamente. Las muestras compuestas por ciatios de los tratamientos de 0, 1, 2, 3, y 7, días se colocaron tres ciatios en cada molde con parafina. Las muestras compuestas por ciatios o embriones de los tratamientos de 14, 21, y 30 días, se pusieron de a 2 ciatios o embriones por molde. Posteriormente, a cada molde se le colocó el anillo, se les añadió parafina hasta llenar el anillo y se dejó solidificar la parafina a temperatura ambiente o en hielo.

5.3.5 Corte: Una vez la parafina estuvo totalmente solidificada se procedió a realizar los cortes. Las muestras incluidas en los bloques de parafina se cortaron en un micrótopo de rotación, y se cortaron secciones seriadas longitudinales de cada muestra con un grosor de 10µm (Sandoval, 2005). Estos cortes se realizaron en serie para poder observar y reconstruir en forma secuencial las estructuras internas de las muestras. Los cortes de cada muestra se realizaron en forma de tiras de acuerdo al tamaño del portaobjeto. Las tiras se colocaron a flotar en agua a una temperatura de 50°C, y luego se organizaron en los portaobjetos debidamente rotulados. Por último, las láminas fueron puestas en una canastilla (Figura 5) para ser llevadas a un horno a 60°C para retirar la parafina de la muestra durante mínimo una hora.

Figura 5. Canastilla para portaobjetos utilizada en la desparafinización de las muestras de tejido cortadas en secciones de 10 μ m.



5.3.6 Tinción: Las muestras fueron sometidas a diferentes tinciones para diferenciar los tejidos durante el análisis en el microscopio. Con tal fin, las láminas para ser teñidas se pasaron por diferentes soluciones y colorantes como se describe en el Cuadro 2. Estas soluciones tenían el fin de rehidratar el material vegetal para que fuera teñido. Las soluciones se colocaron en vasos Coplin ideales para hacer un tren de tinción que permitiera teñir gran cantidad de láminas a la vez. Los colorantes utilizados fueron Fast Green y Safranina-O, esta combinación es una coloración de contraste ampliamente utilizada para histología. En solución, estos colorantes actúan como iones positivos o negativos, los que tienen cargas positivas, como la safranina, tiñen sustancias ácidas y los que tienen cargas negativas, como el Fast Green, tiñen sustancias básicas. El Fast Green (FCF) proporcionó un color verde azulado a las paredes celulósicas y un tono verde violáceo al citoplasma, mientras que la Safranina-O tiñó de rojo a la cutina, paredes lignificadas, nucléolo, y cromatina (Sandoval, 2005). El número de enjuagues dependían del grado de residuos del tratamiento anterior. El tiempo en FCF dependía del tipo de tejido que se encontrara en las láminas. Todas las láminas teñidas fueron revisadas en microscopio óptico y de fluorescencia, y fotografiadas para dejar un registro de los cambios estructurales observados en ellas.

Cuadro 2. Soluciones de tinción del material vegetal.

Solución	Reactivo	Tiempo (min)	# Enjuagues
1	Xilol	5	
2	Xilol	2	
3	Alcohol absoluto	2	
4	Alcohol absoluto	2	
5	Alcohol 96 %	1	4 – 7
6	Alcohol 70 %	1	4 – 7
7	H2O	1	4 – 7
8	Safranina	30 – 45	
9	H2O	1	4 – 7
10	Alcohol 90 %	1	4 – 7
11	Fast Green	2 a 5 segundos	
12	Alcohol absoluto	1	4 – 7
13	Alcohol absoluto	1	4 – 7
14	Alcohol absoluto	1	4 – 7
15	Xilol	1	4 – 7
16	Xilol	1	4 – 7
17	Xilol	Se dejan aquí	

5.4 Rescate de embriones cigóticos y cultivo de tejidos *in vitro*

Con el fin de determinar la mejor composición del medio de cultivo que permitiría el normal desarrollo de embriones cigóticos *in vitro*, se rescataron los embriones en formación a los 21, 24 y 30 días después de la polinización y se cultivaron en 4 medios de cultivo para permitir el completo desarrollo hasta obtener plantas. También, se rescataron los óvulos fertilizados a los 7 y 14 días después de polinización y se cultivaron en 4 medios de cultivo diferentes que permitieran a la ovocélula recién fecundada alcanzar a desarrollarse completamente. Los ciatios

colectados en el campo se llevaron al laboratorio, se sometieron a un proceso de desinfección en el que se lavaron con abundante agua, se individualizaron y se seleccionaron los que habían sufrido menos daños en el transporte. Después, se pusieron en un recipiente. En una cabina de flujo laminar, se agregó alcohol al 70% en proporción de 1:2 (de acuerdo a la cantidad de ciatios o frutos en el recipiente se agregó el doble de alcohol), se agitó manualmente durante 1 minuto, se descartó y se agregó una solución de hipoclorito al 1.5% con 3 gotas de Tween 20 por cada 100 ml de hipoclorito (se agregó la misma proporción descrita para el alcohol), se agitó manualmente o con una plancha agitadora durante 17 minutos, se descartó el líquido y luego se realizaron 4 enjuagues con abundante agua destilada estéril y se dejó el material en agua estéril (Laboratorio de Biotecnología, Universidad Icesi).

Luego se procedió al aislamiento de óvulos, embriones y/o semillas con la ayuda de un estereoscopio, pinzas y escarpelo, sobre una caja Petri o sobre una servilleta de papel estéril. Otros estudios indican que es posible aislar y cultivar *in vitro* embriones en frutos de yuca de 32 a 38 días después de la polinización (DAP) sin afectar su viabilidad, aunque esto depende del clima y otros factores ambientales (Yan, 2012). En este proyecto se aislaron y cultivaron embriones más juveniles que podrían estar en el estadio de embrión globular a los 21 DAP, y en el estadio embrión forma de corazón a los 24 DAP, a partir de los 30 DAP se espera tener la semilla completamente formada. Para el aislamiento del óvulo, se retiraron las brácteas con el escarpelo y se procedió cuidadosamente a cortar la pared del ovario para que los óvulos o los embriones quedaran a la vista. Teniendo cuidado de no causar ningún daño al óvulo o al embrión, se procedió a retirarlo del ovario uno por uno. Luego del aislamiento cada uno se cultivó en el medio de cultivo *in vitro* respectivo.

Se evaluaron cuatro medios de cultivo para los óvulos y embriones que se aislaron de frutos con 21, 24 y 30 días de polinización, en los cuales se sembraron 400 óvulos y/o embriones por cada día de tratamiento dispuestos de a 15 óvulos por caja Petri, y aproximadamente 7 cajas por cada medio de cultivo. Y para los que fueron aislados de 7 y 14 días después de polinización se utilizaron dos de los medios de cultivo que se usaron en los otros frutos de mayor número de días, y dos medios diferentes. El medio M6m es una modificación del original utilizado por (Bonilla, 2011). El medio 1/2 NLN fue utilizado anteriormente en otra especie de la familia Euphorbiaceae (Doi y otros, 2011). Los siguientes medios tienen como base el medio (MS, Murashige y Skoog 1962): El MSREm, MSREm-V, MS2, y 1/2 MS son medios desarrollados por el grupo de investigación de la Universidad Icesi (Zaida Lentini, comunicación personal). La composición de cada uno de estos medios se presenta en los cuadros 3 y 4. Los óvulos se dispusieron en el medio de tal forma que el pico nucelar quedara hacia arriba y el otro lado del ovulo quedara en contacto con el medio de cultivo (Figura 6). En el caso de los embriones se tuvo cuidado de mantenerlos sin ningún daño, sobre todo en la parte radicular, esta zona debía quedar en contacto con el medio de cultivo (Figura 7)

para que los nutrientes fueran absorbidos (Yan, 2012). Se rotuló la caja Petri de tal forma que contuviera la información del nombre del medio de cultivo con la fecha y el número de días de polinización.

Figura 6. Óvulos recién aislados de yuca. (a) Lado dorsal del óvulo en el que se encuentra el pico nucelar, no debe ir en contacto con el medio, (b) Cara ventral del óvulo debe estar en contacto con el medio de cultivo.



Figura 7. Disposición de los óvulos y embriones en las cajas Petri que contenían los medios de cultivo. Los óvulos se posicionaban con el lado ventral en contacto con el medio, y los embriones con el primordio radicular en contacto con el medio.

Por último, los cultivos se incubaron en el cuarto de cultivo a 28-30°C, en oscuridad durante uno a 8 semanas dependiendo del número de días de polinización, donde se dejaron hasta dos meses los óvulos o embriones aislados de frutos con pocos días de polinización (7, 14, 21 y 24), y tan solo un mes para los que se aislaron de frutos con 30 días de polinización. Luego de este periodo en oscuridad, fueron subcultivados en frascos y se dejaron con un tratamiento de 12 horas de fotoperiodo suplementadas con lámparas Cool-White a una intensidad de 80-100 $\mu\text{moles.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Los cultivos se subcultivaron en el mismo medio hasta que se obtuvieron embriones germinados, plántulas y/o plantas. Luego de la transferencia a periodos de luz, se realizaron revisiones periódicas cada mes

durante 2 días para documentar los cambios estructurales y las respuestas del material, realizando un registro fotográfico de los mismos.

Cuadro 3. Composición de medios de cultivo para óvulos y/o embriones aislados de frutos con más de 21 días de polinización. M6m (Modificación del M6), MSREm (Murashige Skoog Rescate Embrión modificado).

	M6m	MSREm	½MS	½NLN
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Basado en	1/2 MS	1/2 MS con Vitaminas	1/2 MS con Vitaminas	
Macro-elementos				
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O				360
KH ₂ PO ₄	85	85	85	62,5
KNO ₃	950	950	950	62,5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	185	185	185	62,5
NH ₄ NO ₃	825	825	825	
Micro-elementos				
C ₁₀ H ₁₂ FeN ₂ NaO ₈	18,35			20
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	220	220	220	
CoCl ₂ x 6H ₂ O	9,00	0,0125	0,0125	0,0125
CuSO ₄ x 5H ₂ O	4,30	0,774	0,774	0,798976
FeSO ₄ x 7H ₂ O		13,9	13,9	
H ₃ BO ₃	0,774	3,1	3,1	5
KI	0,0125	0,415	0,415	
MnSO ₄ x H ₂ O	0,415	8,45	8,45	9,5
Na ₂ EDTA		18,65	18,65	
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	3,10	0,125	0,125	0,125
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,125	4,3	4,3	5
Vitaminas y Aminoácidos				
Nicotinic acid		0,25	0,25	2,5
Biotina				0,025
folic acid				0,25
Glicina		1	1	1
Glutati6n				15
L-Glutamina				400
L-Serine				50
Myo-inositol		50	50	50
Pyridoxine.HCl		0,25	0,25	
tiamina x HCl		0,05	0,05	0,25
Reguladores de Crecimiento				
NAA		0,01		
GA3	1	1		
Fuente de Carbono				
Sucrose	30000	30000	130000	130000
pH	5,7	5,8	5,8	6,1

Cuadro 4. Composición de medios de cultivo para óvulos y/o embriones aislados de frutos con de 7 y 14 días de polinización. MSREm-V (Murashige Skoog Rescate Embrión modificado con Vitaminas completas)

	M6m	MSREm	MS2	MSREm - V
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Basado en	1/2 MS	1/2 MS con Vitaminas	MS	1/2 MS
Macro-elementos				
KH ₂ PO ₄	85	85	170	85
KNO ₃	950	950	1900	950
MgSO ₄ x 7H ₂ O	185	185	370	185
NH ₄ NO ₃	825	825	1650	825
Micro-elementos				
C ₁₀ H ₁₂ FeN ₂ NaO ₈	18,35			
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	220	220	440	220
CoCl ₂ x 6H ₂ O	9	0,0125	0,025	0,0125
CuSO ₄ x 5H ₂ O	4,3	0,774	0,775	0,774
FeSO ₄ x 7H ₂ O		13,9	27,8	13,9
H ₃ BO ₃	0,774	3,1	6,2	3,1
KI	0,0125	0,415	0,83	0,415
MnSO ₄ x H ₂ O	0,415	8,45	16,9	8,45
Na ₂ EDTA		18,65	37,3	18,65
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	3,1	0,125	0,25	0,125
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,125	4,3	8,6	4,3
Vitaminas y Aminoácidos				completas
Nicotinic acid		0,25	0,5	0,5
Glicina		1	2	2
Myo-inositol		50	100	100
Pyridoxine.HCl		0,25	0,5	0,5
tiamina x HCl		0,05	0,1	0,1
Reguladores de Crecimiento				
2,4-D			2	
Kinetina			0,5	
NAA		0,01		0,01
GA3	1	1	1	1
Fuente de Carbono				
Sucrose	30000	30000	80000	30000
pH	5,7	5,8	5,8	5,8

6 RESULTADOS

6.1 Análisis histológico de la formación del embrión de yuca

Se realizaron análisis histológicos en ovarios sin polinizar o polinizados con el objetivo de tener un mejor entendimiento de la maduración del saco embrionario y proceso de formación del embrión de yuca desde los primeros estadios de desarrollo hasta la formación completa del embrión. Información necesaria para entender la respuesta en formación de plántulas a partir de embriones rescatados *in vitro* de acuerdo a los días después de la polinización.

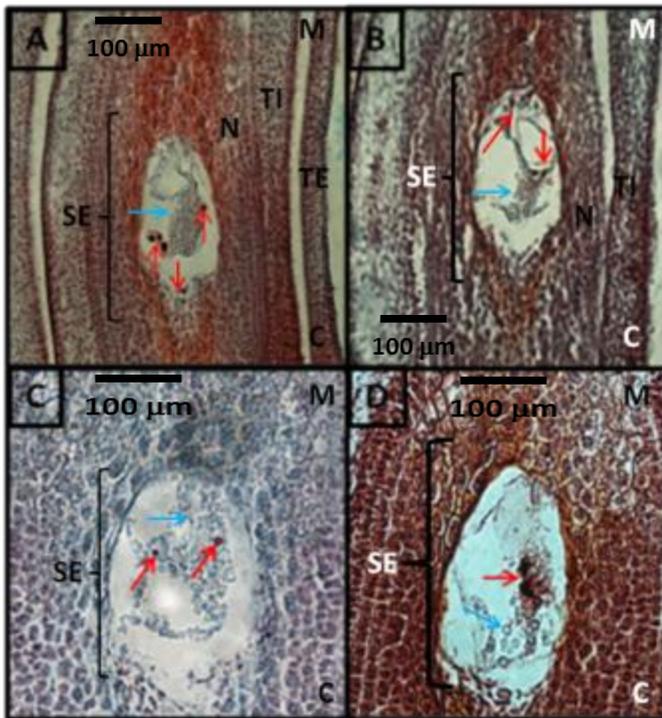


Figura 8. Cortes histológicos de ovarios colectados el día de antesis y los siguientes tres días sin haber sido polinizados (40x). **A)** Día de antesis. Núcleos (flechas rojas) y acumulación de almidón (flechas azules) en la zona del SE (Saco Embrionario). **B)** Día después de antesis se observa la acumulación de almidón y cinco núcleos. **C)** Segundo día después de antesis se evidencia el deterioro del SE, **D)** Tercer día después de la antesis ya no queda mucho almidón y se observa la degradación de núcleos. M: Extremo micropilar, C: Extremo calazal, N: Nucelo, TI: tegumento interno, TE: tegumento externo.

La figura 8A y 8B presenta el saco embrionario (SE) de un óvulo fijado el mismo día o un día después de antesis y sin polinización. En la figura 8A se observan 6 de los 8 núcleos característicos de un saco embrionario maduro. La presencia de seis núcleos (teñidos de color rojo) ubicados en los extremos micropilar y calazal del mismo y una acumulación de almidón (teñidos de color azul) en esta zona, indica que el aparato del SE se encontraba organizado y listo para ser fecundado. Se observa una diferencia en la organización de aparato del SE entre 8A y 8B, es posible que A sea inmaduro y B maduro aunque no es clara esta distinción. A medida que avanza el tiempo, los sacos embrionarios de los óvulos que no fueron

fertilizados empiezan a mostrar degradación de los núcleos que conforman el SE y reducción en el contenido de almidón. Esto se observa en la pérdida de la organización interna del saco embrionario a partir del segundo día después de antesis (DDA) (Figura 8C) donde se detectaron solo dos de los 8 núcleos del SE (Figura 8C). Al tercer día después de la antesis (Figura 8D), el óvulo que no fue fertilizado muestra una degradación casi completa del saco embrionario, se observa poca presencia de almidón y la cromatina dispersa, es decir, no hay una clara condensación en los núcleos.

En el caso de los cortes realizados a los óvulos que fueron polinizados, se encontró que a diferencia de los no polinizados, el saco embrionario al siguiente día de la polinización (Figura 9A) presentaba una mayor acumulación de almidón en la zona. Lo mismo sucedió a los dos días después de polinización (DDP) (Figura 9B) y a los tres días de polinización (Figura 9C), donde se logra observar una gran cantidad de almidón organizado en forma de saco en la zona en la que se formaría el embrión cuando la ovocélula sea polinizada.

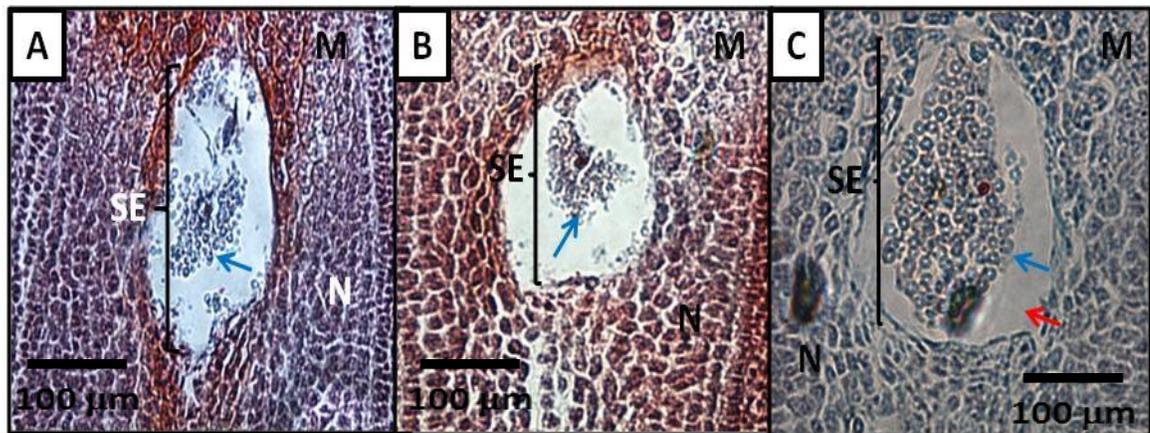


Figura 9. Cortes histológicos de ovarios colectados de uno a tres días después de polinización (40X). **A)** En el día siguiente a la polinización, se observa una mayor acumulación de almidón (flechas azules) en forma de saco. **B)** Al segundo y **C)** tercer día de polinización se evidenció una mayor acumulación de almidón en esta zona del saco embrionario. En el tercer día se logró ver la vacuola central (flecha roja) con almidón en su interior. SE: Saco embrionario, N: Nucelo, M: Extremo micropilar.

A los 7 DDP (Figura 10), se logra diferenciar entre las capas de tejido de ovulo polinizado como lo son el tegumento externo (T.E), el tegumento interno (T.I), y el nucelo que ya ha iniciado su proceso de degradación. Se observaron las primeras divisiones celulares que dan origen a la formación del endospermo (EN.), y las primeras divisiones celulares de la ovocélula (1ra – 2da división celular) para la formación del embrión (EM, 2 a 4 células) (Figura 10B). A los 14 DDP (Figura 11), se observó el embrión en los primeros estados de desarrollo, después de la 3ra o 4ta división celular (de 8 a 16 células) en el extremo micropilar del saco embrionario (Figura 11B), y el endospermo en formación. Se puede observar en la figura 11A que el tejido nucelar se ha reducido, al igual que el grosor del

tegumento externo, mientras que el tegumento interno presenta un engrosamiento compuesto principalmente de células con paredes altamente lignificadas.

A los 21 DDP (Figura 12), presentó un aumento visible en el tegumento interno, el cual aparentemente puede estar asociado al aumento del tamaño del óvulo a medida que avanza el desarrollo embrionario posterior a la polinización y fecundación de la ovocélula. El tejido nucelar se ha reducido notablemente, mientras que el tejido perteneciente al endospermo en formación ha incrementado significativamente (Figura 12A). Se encontró el embrión en estado globular temprano, sin suspensor visible, con división celular activa al igual que el endospermo (Figura 12B). A los 24 DDP (Figura 13), se encontró el endospermo completamente formado llenando el espacio central de lo que originalmente fue el saco embrionario, no hay presencia de tejido nucelar ni de la vacuola central, el embrión se encuentra en estado globular y es visible el suspensor. El embrión se encuentra rodeado completamente por el endospermo y está ubicado en el extremo micropilar, el tejido del tegumento interno se ha lignificado. Este óvulo de 24 DDP fue visualizado a través una técnica diferente de histología en la cual se utilizó un vibratomo y se observó la placa a través de un microscopio con contraste de fase, debido a que mediante la técnica utilizada con óvulos de menos días de polinización no se logró visualizar detalladamente las estructuras. A los 30 DDP se logró aislar el embrión completamente formado (Figura 14), éste presenta los cotiledones expandidos, cubriendo el extremo apical del embrión y al extremo opuesto se encuentra el primordio radicular.

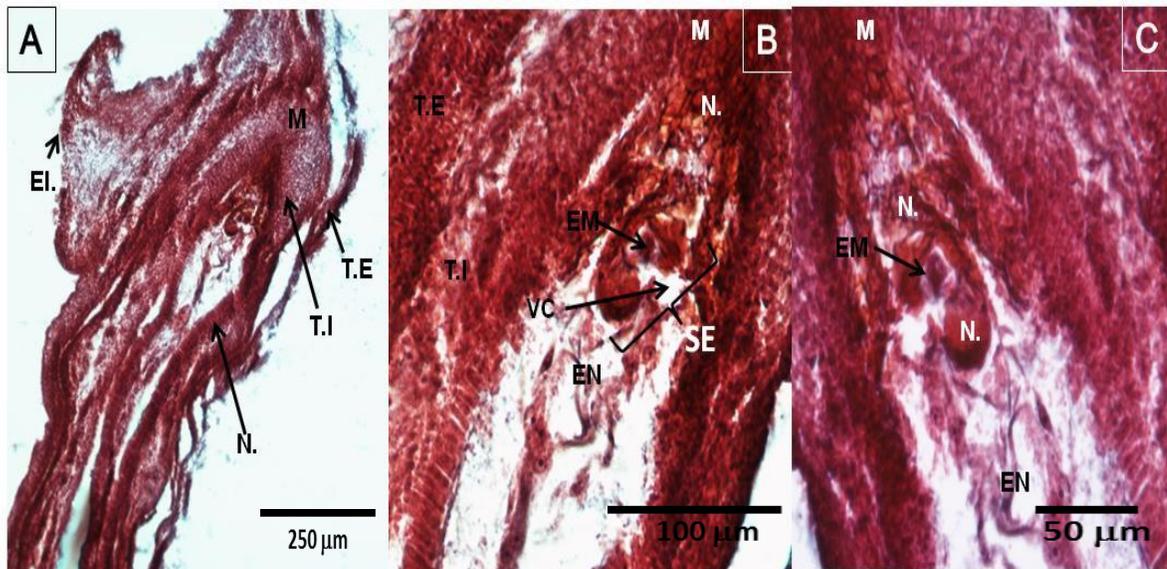


Figura 10. Corte longitudinal de un ovulo a los 7 días de polinización. **A)** Se observan (10X) los eliosomas (El.), el tegumento externo (T.E.), el tegumento interno (T.I) y el nucelo (N) que muestra los primeros indicios de degradación. **B)** A 20X, se observa el saco embrionario donde se encuentra el embrión en formación con pocas divisiones celulares (EM) en el extremo micropilar (M) y divisiones celulares activas que da origen al endospermo (EN.). SE: Saco embrionario, VC: Vacuola central. **C)** En 40X se observa mejor el embrión en formación (EM)

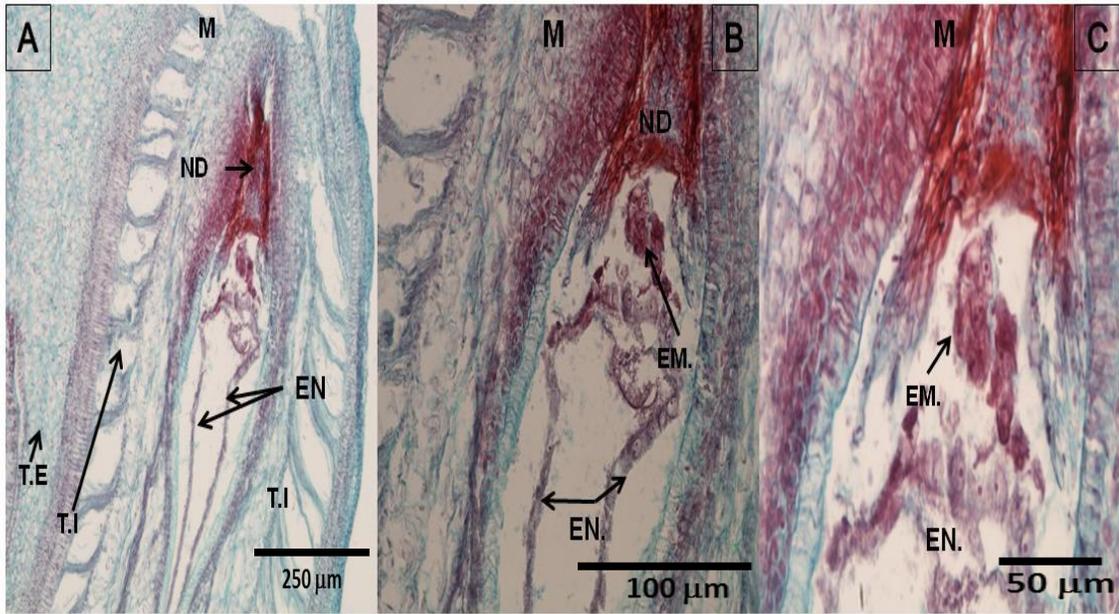


Figura 11. Corte longitudinal de un óvulo a los 14 días de polinización. **A)** Se observa un engrosamiento del tegumento interno (T.I.) (10X), en cambio el tegumento externo (T.E.) se ha vuelto más delgado. El nucelo presenta degradación avanzada (ND). El endospermo (EN) es claramente visible, está en formación. **B)** Se observa en el extremo micropilar (M), el embrión (EM) con pocas divisiones celulares (3ra – 4ta división celular, 8-16 células). **C)** 40X.

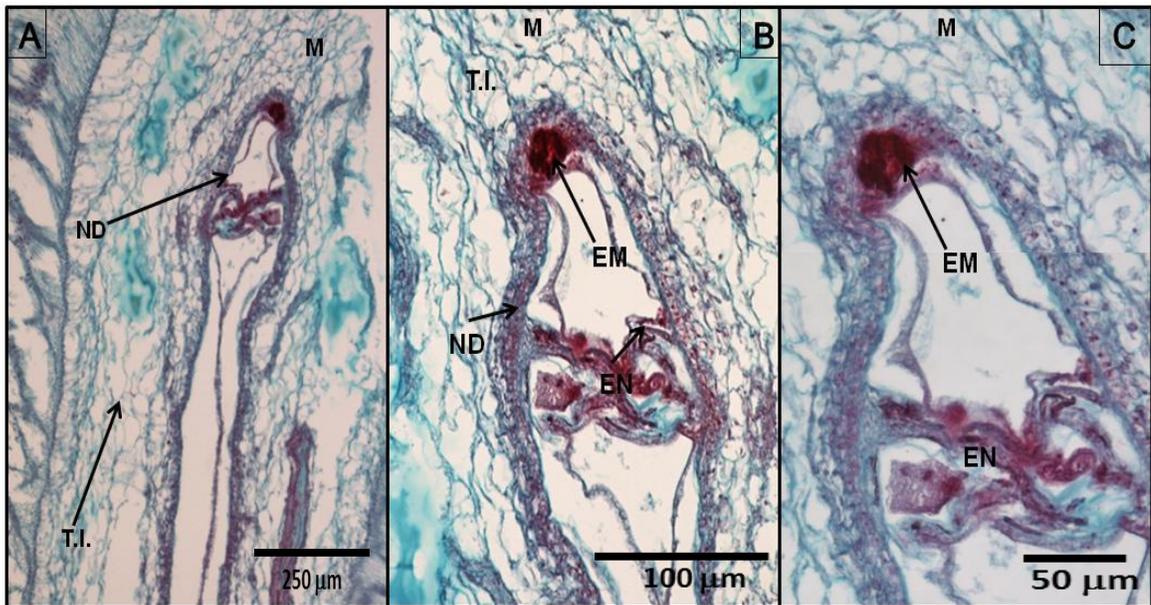


Figura 12. Corte longitudinal (10X) de un óvulo con 21 días de polinización. **A)** El nucelo está casi en su totalidad degradado (ND). Las células del tegumento interno (T.I.) en su mayoría tienen las paredes celulares engrosadas. **B)** Se observa el embrión (EM) (20X) en estado globular temprano ubicado en el extremo micropilar (M), aun no es visible el suspensor. Endospermo (EN) en estado de desarrollo temprano. **C)** 40X.

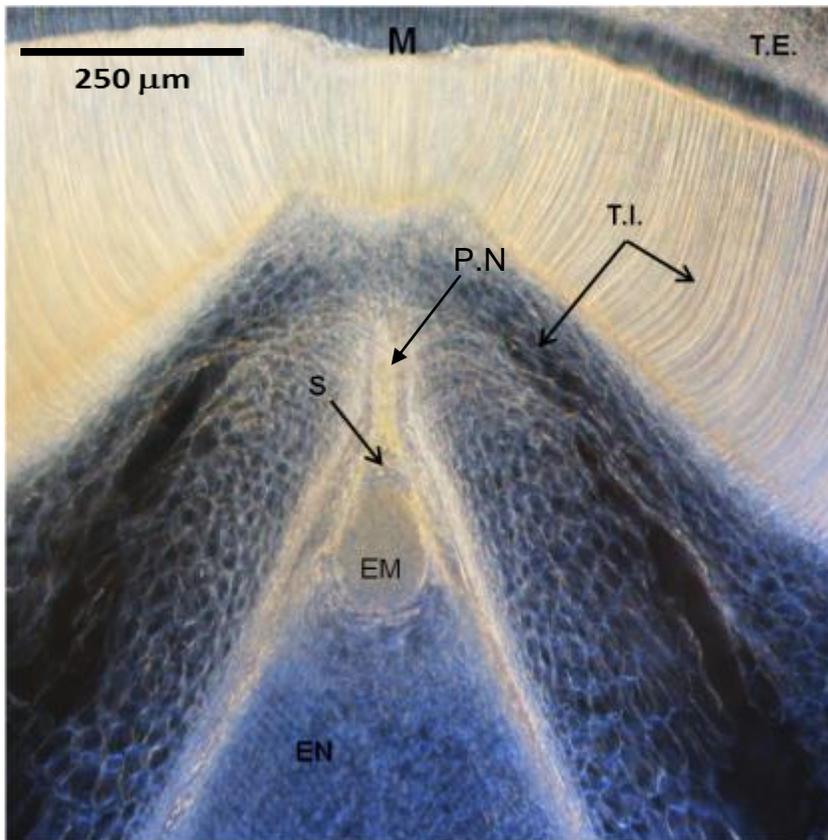


Figura 13. Corte longitudinal de óvulo a los 24 días de polinización (10X). Se observa la lignificación del tegumento interno (T.I.) El endospermo ya se ha formado completamente llenando el espacio interno, desaparece la vacuola central y no hay nucelo. El embrión (EM) se encuentra en estado completamente globular formado ubicado en el extremo micropilar (M). Se observa el suspensor (S) del embrión y el pico nucelar (P.N.). (Técnica con vibratomo realizada por Eddie Tabares y María Eugenia Buitrago, y visualizado en contraste de fases)

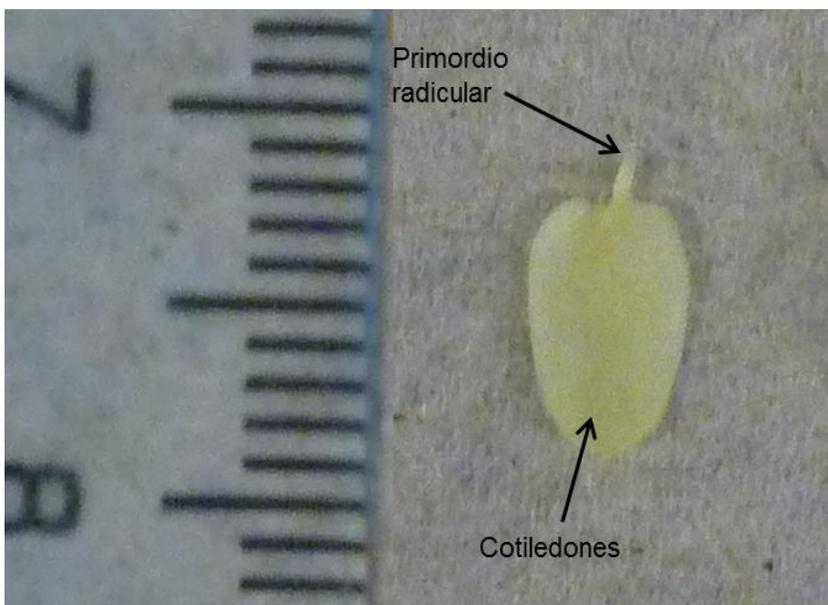


Figura 14. Embrión aislado de una semilla con 30 días de polinización. Ya se encuentra completamente formado y se pueden observar sus cotiledones y el primordio radicular. Estos cotiledones aún se encuentran unidos. (1,8X)

Cuadro 5. Estados de desarrollo del embrión y del endospermo con respecto al número de días después de polinización de los frutos.

DDP	Estado Desarrollo de Embrión	Estado Desarrollo de Endospermo
7	Embrión de dos células	Sin endospermo
14	Embrión de diez células	Endospermo en formación
21	Embrión globular temprano sin suspensor	Endospermo temprano
24	Embrión globular con suspensor	Endospermo desarrollado
30	Embrión cotiledonar	Endospermo completamente formado y rodeando al embrión.

6.2 Formación de frutos a partir del material seleccionado en campo

En el campo se seleccionaron un total de 2520 ciatios, de los cuales solo se lograron coleccionar 1977 frutos. Los 2520 ciatios seleccionados, fueron polinizados por agentes naturales (insectos) y coleccionados a los 7, 14, 21, 24 o 30 días después de polinización (DDP) (Cuadro 6). Se coleccionaron en estas fechas para: 1) determinar cuál era la etapa más temprana en la que se puede inducir el desarrollo completo del embrión cultivado *in vitro* y su respectiva conversión posteriormente en plántulas y plantas completamente desarrolladas, y 2) identificar el estado de desarrollo en el que se encuentra el saco embrionario y/o el embrión respecto a los días después de polinización. Los datos presentados en el Cuadro 6 y Figura 15 indican que el porcentaje de frutos presentes en la planta en el momento de la colecta en campo respecto al número de ciatos seleccionados se reduce progresivamente en la medida que aumenta el número de días después de la polinización. Es decir, que hay una pérdida de frutos en el tiempo respecto a los que potencialmente podrían llegar a estados avanzados de maduración. A los 7 DDP se observa que el 90% de los ciatios se convierten en frutos juveniles, mientras que solo un 65% de los frutos llegan a madurar hasta los 30 DDP. Hay una reducción del 25% de conversión de frutos juveniles a maduros, es decir, un 25% de los frutos abortan o se pierden por otros factores (i.e. daño por plagas) en este período de 3 semanas (Figura 15, Cuadro 7). Se puede observar una diferencia entre las muestras 14a y del 14b. Estos frutos se coleccionaron a los 14 días de polinización en diferentes épocas del año, 14a en época de sequía y 14b

en época de lluvia. Las muestras colectadas durante la época de lluvia (14b) muestran una menor formación de frutos probablemente sugiriendo que la polinización por insectos se ve afectada por estas condiciones ambientales, induciendo una caída mecánica de los frutos.

Cuadro 6. Formación de frutos a partir de ciatios seleccionados y polinizados por insectos en campo. Se colectaron los frutos a los 7, 14, 21, 24 y 30 DPP (Días Después de Polinización). Las muestras 14 a y 14 b fueron frutos colectados a los 14DDP en diferentes épocas del año (14a en época de sequía y 14b en época de lluvia).

Días después de Polinización (DDP)	# Ciatios seleccionados y polinizados	#Frutos Colectados	Ciatios convertidos en frutos (%)
7	310	281	90,65
14 a	376	349	92,82
14 b	323	220	68,11
21	322	258	80,12
24	429	371	86,48
30	760	498	65,53

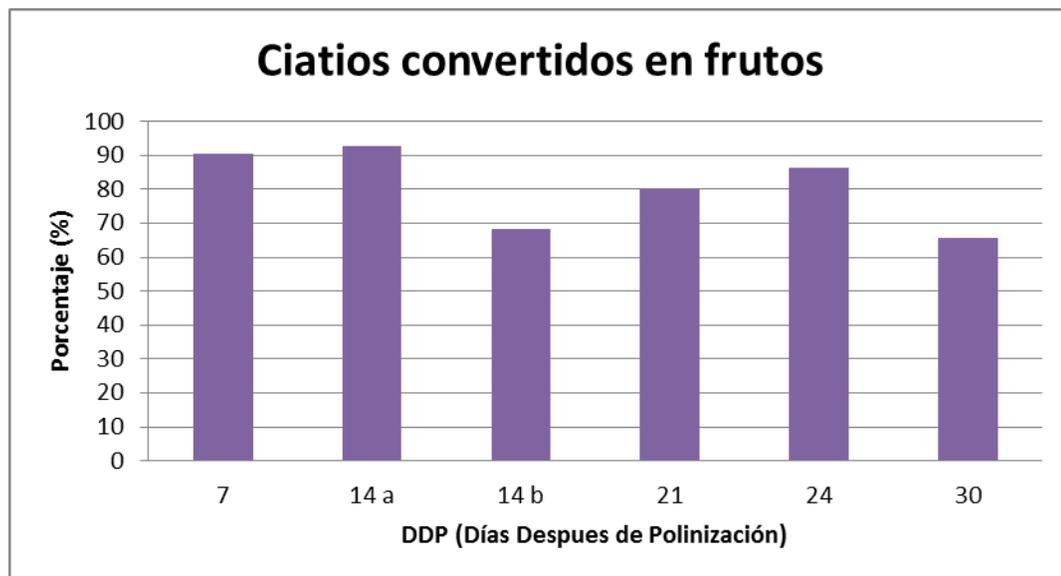


Figura 15. Porcentaje de recuperación de los frutos que se cosecharon en el campo de acuerdo al número de días después de la polinización. El porcentaje de ciatios que se convierten en frutos se reduce en la medida que aumenta los días después de la polinización (DDP).

6.3 Tipo de frutos formados

Dentro del material recuperado en campo, se identificaron cinco tipos de frutos. En relación con el tamaño y la apariencia del mismo, éstos fueron clasificados como tipo: A, B, C, D o E. El tipo A, incluye la clase de frutos más grande dentro de los colectados, éstos frutos tenían un diámetro entre 1,3 - 2 cm (Figura 16A). El tipo B (Figura 16B), son frutos que tenían un diámetro mayor de 1cm y menor de 1,3cm. El tipo C (Figura 16C), eran frutos que tenían un diámetro menor de 1cm y mayor de 0,5cm. El tipo D (Figura 16D) eran frutos con un diámetro menor a 0,5cm similares a los ciatios que no han sido polinizados. El tipo E (Figura 16E) eran frutos secos y abortivos que fueron afectados por plagas del cultivo.

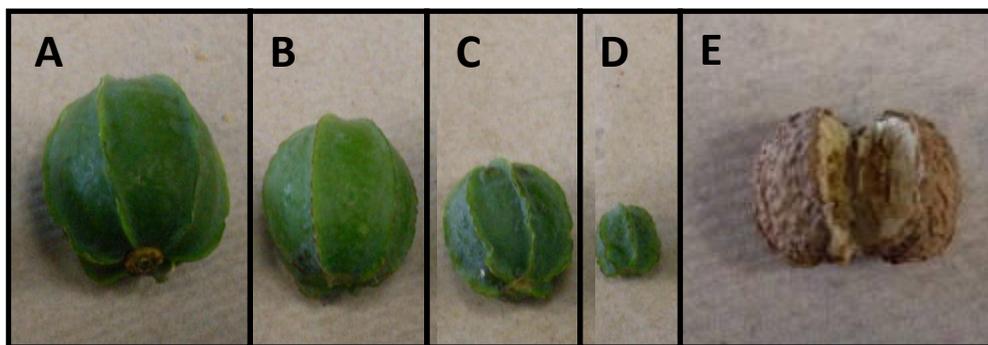


Figura 16. Tipos de frutos colectados en el campo. **A)** Fruto tipo A, entre 1,3 y 2cm de diámetro; **B)** Fruto tipo B, diámetro entre 1cm y 1,3cm; **C)** Fruto tipo C con un diámetro menor a 1cm y mayor a 0,5cm. **D)** Fruto tipo D con diámetro menor a 0,5cm, similar a ciatios sin polinizar. **E)** Fruto seco (abortivo), afectado por ataques de plagas del cultivo.

Se seleccionaron los frutos tipo A, B y C para cultivo *in vitro*, y se descartaron los tipos D, debido a que al no evidenciarse cambios físicos respecto al ciatio no polinizado, era probable que este tipo de fruto no estuviera polinizado y/o fecundado, sin embargo se debe realizar un estudio más a fondo con este tipo de frutos debido a que son de interés para la generación de DH ya que si permanecen en la planta puede ser por la estimulación de la polinización aun cuando este polen no haya fecundado los óvulos. En el Cuadro 6 y Figura 17 se presentan el número y porcentaje de frutos que se obtuvieron de cada tipo acorde a los DDP. Hay una clara distinción entre los tipos de frutos que se obtienen de acuerdo a los números de DDP. Como era de esperarse, la proporción de clases de frutos más grandes aumenta en la medida que incrementa los DDP. A los 7 DDP no se presentan frutos tipo A o B, los tipo C representan el 73% y el resto son ciatios no polinizados tipo D. Los frutos Tipo A aumentan (de 12% a 60%) y los Tipo B disminuyen (del 34% al 5%) en la medida que aumentan los DDP progresivamente de 14 DDP a 30 DDP (Cuadro 6 y Figura 17). Los Tipo C disminuyen desde 73% al 31%, a medida que los DDP aumentan. Solo se

observan frutos Tipo E después de 21 DDP, obteniéndose el mayor porcentaje 11% a los 30 DDP.

Cuadro 7. Numero de frutos colectados para cada uno de los tipos determinados en los diferentes días después de polinización (DDP).

DAP	Tipo A	% Tipo A	Tipo B	% Tipo B	Tipo C	% Tipo C	Tipo D	% Tipo D	Tipo E	% Tipo E
7	0	0,0	0	0,0	204	72,6	77	27,4	0	0,0
14 a	43	12,3	119	34,1	100	28,7	87	24,9	0	0,0
14 b	60	27,3	62	28,2	65	29,5	33	15,0	0	0,0
21	138	53,5	60	23,3	0	0,0	75	29,1	4	1,6
24	227	61,2	26	7,0	0	0,0	116	31,3	2	0,5
30	296	59,4	27	5,4	0	0,0	120	24,1	55	11,0

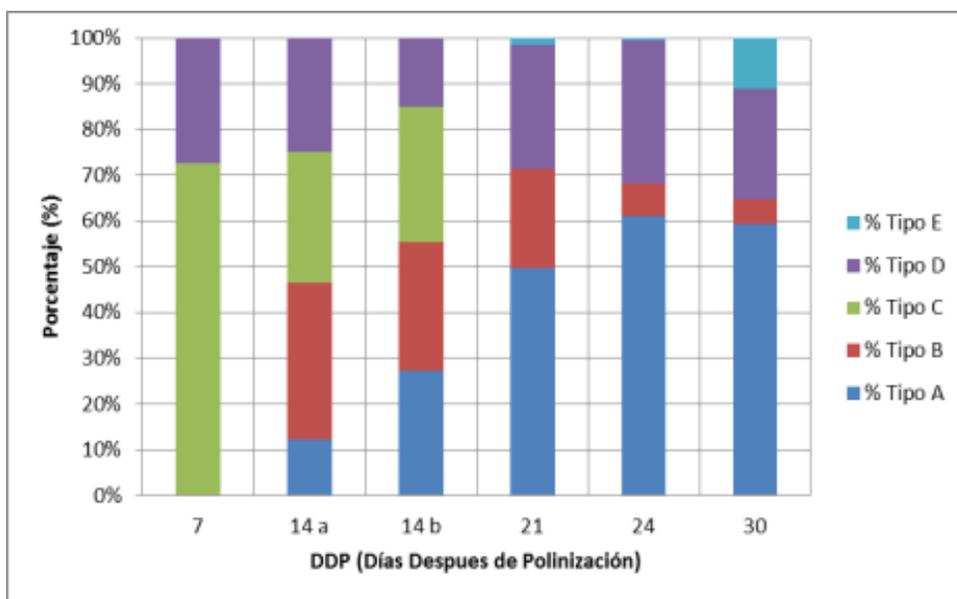


Figura 17. Tasa de recuperación de los cinco tipos de frutos encontrados en las diferentes fechas de colecta. A medida que se avanza en el número de DDP (Días después de Polinización), se evidencia un aumento en la obtención de frutos tipo A, mientras que se da una disminución del tipo B y C. Los frutos Tipo E solo aparecen después de 21 DDP.

6.4 Rescate de embriones cigóticos y cultivo de tejidos *in vitro*

Los óvulos colectados a los 7 o 14 DDP fueron cultivados en los medios $\frac{1}{2}$ MS y $\frac{1}{2}$ NLN por MS2 y MSREm-V, y los óvulos provenientes de frutos con más de 21 DDP se cultivaron en los medios MSREm, M6m, $\frac{1}{2}$ MS, y $\frac{1}{2}$ NLN. La diferencia en la composición de los medios se ajustó con respecto al posible estado de desarrollo del embrión acorde a los DDP del fruto.

Después del cultivo *in vitro* algunos óvulos mostraron crecimiento y cambios en la coloración del tegumento externo. Se observó que esos óvulos presentaron una coloración parda similar al de frutos de 30DDP que desarrollan semillas (Figura 18D y 18E). En la mayoría de los casos donde se observaron estos cambios morfológicos, posteriormente se constató que hubo desarrollo del embrión. Estos cambios morfológicos permitieron identificar a los óvulos que habían desarrollado un embrión en su interior. Este tipo de cambio de coloración se observó después de un mes de cultivo *in vitro* en los óvulos provenientes de frutos a los 30 DDP, después de dos meses *in vitro* en los de 24 DDP, y después de tres meses *in vitro* en los de 21 DDP (Figura 18). Los óvulos pardos (Figura 18A) contenían embriones con sus cotiledones completamente formados, incluso algunos de los embriones se encontraban emergiendo de los óvulos cultivados (Figura 19). Se encontró que algunos óvulos no tuvieron un cambio con respecto a su coloración (Figura 18B), ya que estos mostraban la misma coloración al momento de ser aislados del fruto (Figura 18F) para su cultivo *in vitro*. En su interior no se encontraron embriones, lo cual permitió asociar la coloración externa de los óvulos con la presencia de embriones dentro de ellos. Se presentó un caso particular en los medios de cultivo $\frac{1}{2}$ MS y $\frac{1}{2}$ NLN, donde los óvulos tomaron la coloración de la semilla pero al buscar en su interior no tenían ningún rastro de embrión (Figura 18C). La composición del medio de cultivo no solo tuvo un efecto en la inducción de embriones desarrollados a partir de los óvulos cultivados *in vitro*, sino también en la conversión de embriones a plántulas, y el desarrollo completo de plantas (Figuras 20, 21 y 22). Se denominan plántulas a los embriones que una vez extraídos del interior del óvulo previamente cultivado *in vitro* y posteriormente subcultivados en el mismo medio inicial, mostraron apertura de los cotiledones, acompañado del desarrollo del vástago con hojas verdaderas y la elongación del primordio radicular. Las plantas completamente desarrolladas se identificaron como aquellas que ya habían elongado sus tallos y raíces y presentaban hojas verdaderas expandidas y con clorofila (coloración verde).

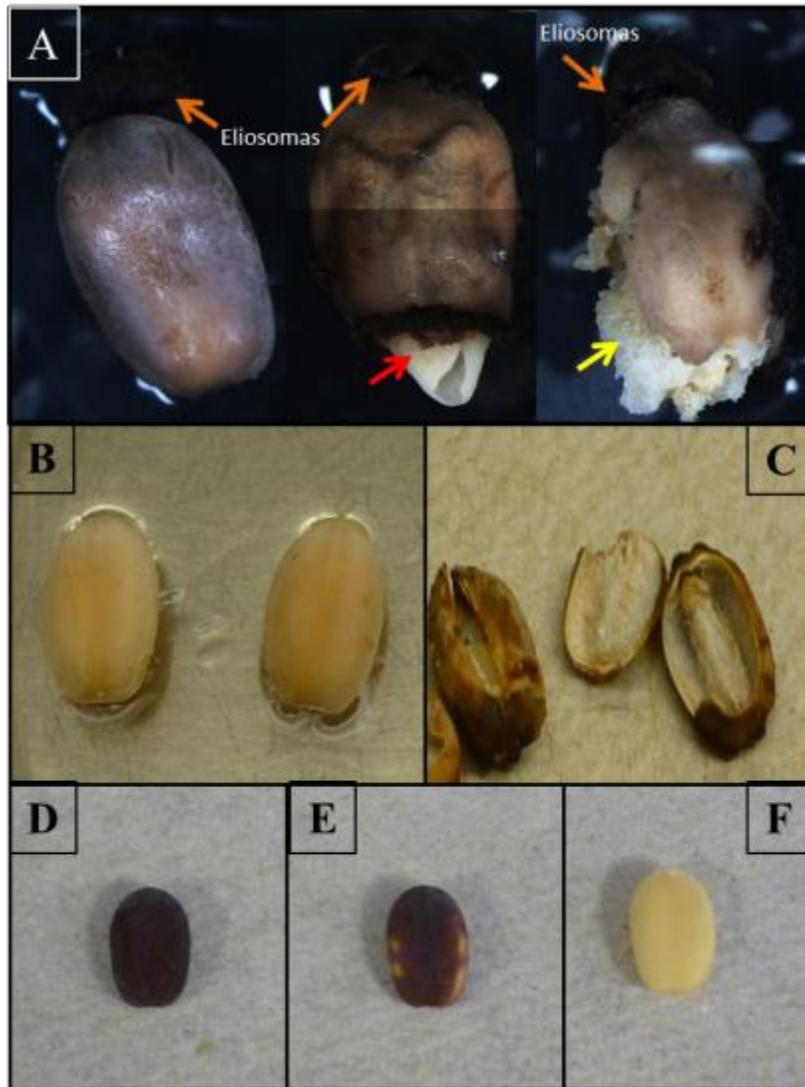


Figura 18. Semillas inmaduras cultivadas *in vitro* por 1 a 3 meses en la oscuridad dependiendo de los DDP (Días de Polinización). Se presentaron cambios en la coloración de los óvulos cultivados *in vitro*, al mes para los de 30 DDP, a los 2 meses para los de 24 DDP, y a los 3 meses de cultivo para los de 21 DDP embriones. **A)** Éstos óvulos muestran una coloración parda oscura similar a la de las semillas en frutos con 35 DDP, Se observa el embrión (flecha roja) emergiendo por el extremo calazal (opuesto a los eliosomas), y se puede observar el endospermo (flecha amarilla) emergiendo, esto fue provocado por el embrión en crecimiento presente en el interior. **B)** Óvulos en cultivo que provenían de frutos con 24 y 30 DDP y que no mostraron cambios después del cultivo *in vitro*, estos no desarrollaron embriones; **C)** Óvulos con coloración similar a la de semillas, provenían de frutos con 21, 24 y 30 DDP. Se desarrollaron en los medios $\frac{1}{2}$ MS y $\frac{1}{2}$ NLN, y no presentaron embriones en su interior. **D)** Semilla aislada de un fruto maduro con más de 30 DDP que contiene a un embrión completamente formado **E)** Semilla aislada a los 30 DDP y **F)** Ovulo fertilizado aislado a los 24 DDP.

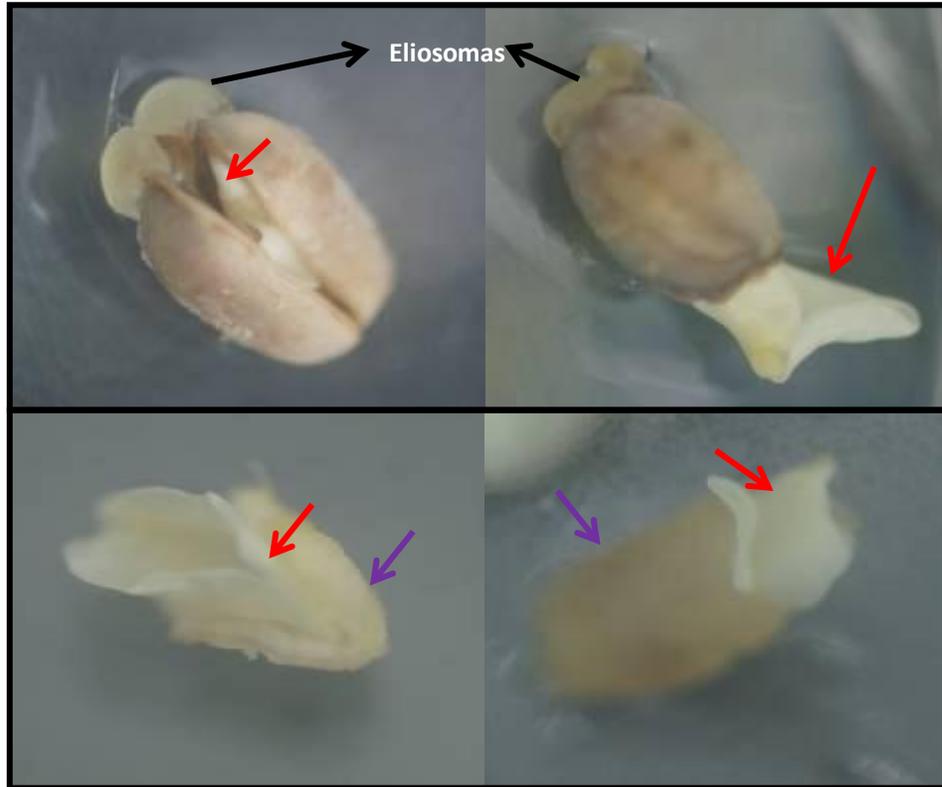


Figura 19. Embriones emergiendo de los óvulos cultivados *in vitro* en la oscuridad después de uno a tres meses de cultivo dependiendo del número de DDP (Días después de polinización) que tenían los frutos de los que fueron aislados. Se observan los cotiledones (flechas rojas) saliendo por el extremo calazal del óvulo o de los endospermos (flechas moradas) que se aislaron del óvulo con 24 y 30 DDP para que el embrión tuviera más contacto con el medio de cultivo. Algunos embriones emergieron por aberturas del tegumento externo del óvulo que fueron ocasionadas por daño físico o lesiones involuntarias con las herramientas durante su aislamiento y cultivo *in vitro*.

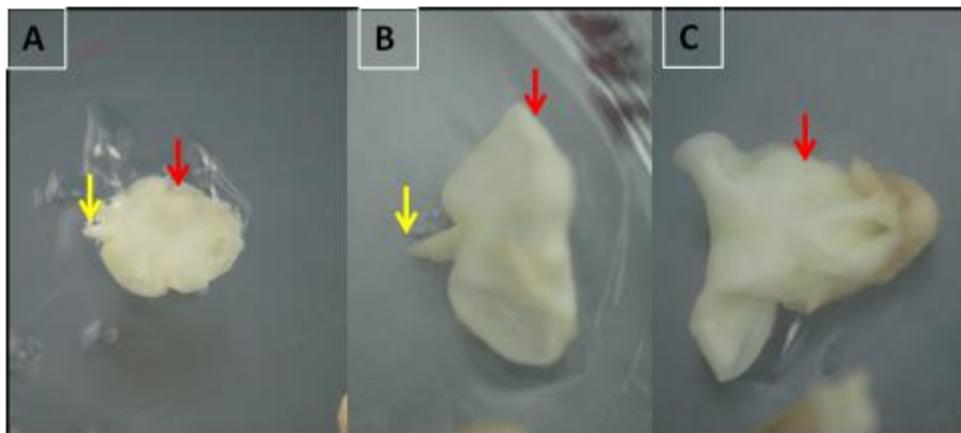


Figura 20. Embriones extraídos después de un mes de cultivo *in vitro* a partir de óvulos de 30 DDP (Días después de polinización), después de 2 meses de cultivo para los de 24 DDP y 3 meses de cultivo para los de 21DDP. Los embriones se extrajeron del interior de los óvulos después de 1, 2 o 3 meses de cultivo *in vitro* y se subcultivaron en el mismo medio. Observe los cotiledones (flechas rojas) que se encuentran cerrados y el primordio radicular (Flechas amarillas). **A)** Aislado a los 3 meses de cultivo de óvulos con 21 DDP. **B)** a los 2 meses de uno con 24 DDP **C)** y aislado al mes de un óvulo con 30 DDP.

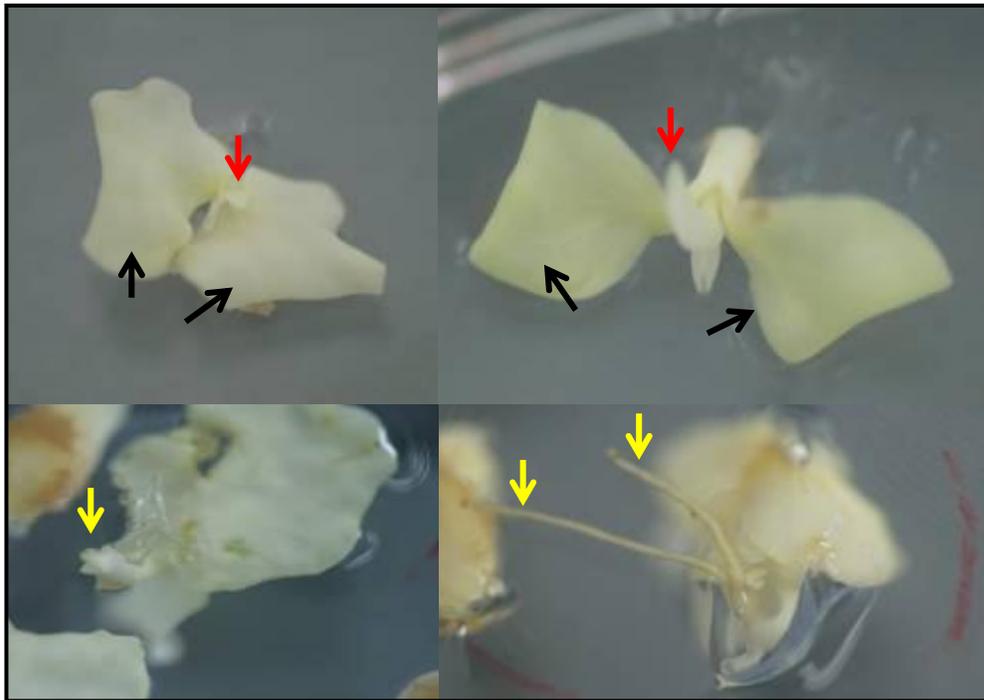


Figura 21. Plántulas desarrolladas *in vitro* después de un mes de haber aislado el embrión del óvulo y subcultivado en el mismo medio en la oscuridad. Se caracterizan por el desarrollo del vástago con las primeras hojas verdaderas (flechas rojas) y la apertura de los cotiledones (Flechas negras), además de la elongación del primordio radicular (flechas amarillas).



Figura 22. Planta desarrollada *in vitro* después de un mes de subcultivar las plántulas en el mismo medio de cultivo en frascos de mayor tamaño, y expuestas a la luz con un fotoperiodo de 12 hrs luz/oscuridad. Las plántulas muestran hojas y raíces completamente desarrolladas, además de la presencia de clorofila.

En el caso de los óvulos aislados a los 24 DDP, se observó en algunas repeticiones la proliferación de larvas durante su cultivo *in vitro*. Aparentemente, algunos de estos frutos fueron infectados con plagas de yuca en campo las cuales dejaron sus huevos dentro de los frutos. Estos huevos no fueron afectados por el tratamiento de esterilización superficial que se le realizó a los frutos antes del cultivo *in vitro*. Los huevos eclosionaron a las dos semanas y las larvas se alimentaron de los óvulos y del medio de cultivo (Figura 23), por lo tanto se perdió mucho material de esta fecha y sólo se obtuvieron datos de los pocos óvulos que se lograron rescatar. Esta infección con larvas *in vitro* posiblemente redujo de forma significativa la tasa de formación de embriones en frutos a los 24DDP (Figura 26).

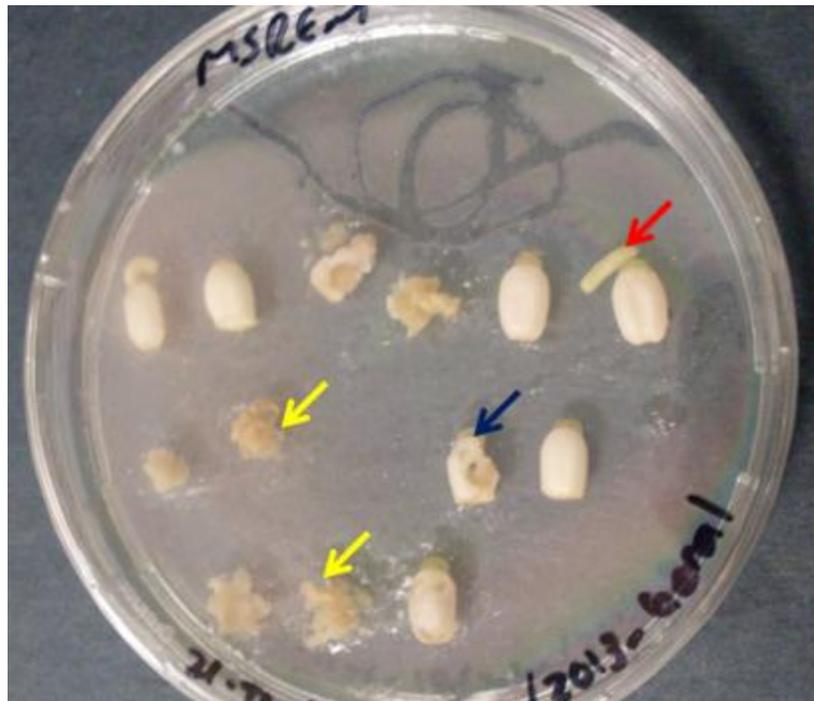


Figura 23. Óvulos cultivados *in vitro* con 24 días de polinización, que fueron afectados por las larvas (plaga de la yuca). Se observa una larva (flecha roja) alimentándose de un óvulo sano, se pueden observar los óvulos que ya se había comido (flecha amarilla) y los que ya había empezado a dañar (flecha azul).

En la figura 26 se muestra el porcentaje de embriones extraídos a partir de óvulos provenientes de los tratamientos de 21, 24 o 30 DDP después de un mes para los de 30DDP, dos meses para los de 24DDP y tres meses para los de 21DDP de cultivo *in vitro* en diferentes medios, debido a que se aislaban cuando las semillas inmaduras mostraban cambios morfológicos. Se obtuvieron embriones completamente formados en óvulos a partir de 21 DDP. La mayor tasa de obtención de embriones se obtuvo en óvulos de 30 DDP como era de esperarse (Figura 26). En general, la mayor tasa de formación de embriones se observó en

los MSREm y $\frac{1}{2}$ MS, y la menor tasa en el medio $\frac{1}{2}$ NLN. El porcentaje de óvulos que contienen embriones formados pasa del 5-30% a los 21 DDP al 40-60% a los 30 DDP (Figura 26).

No todos los embriones formados se convierten en plántulas y posteriormente se diferencian en plantas. Esta conversión fue altamente dependiente del medio de cultivo. A pesar que la mayor formación de embriones se obtuvo en los medios $\frac{1}{2}$ MS y MSREm, los embriones formados en el medio $\frac{1}{2}$ MS en contraste con los formados en el medio MSREm, no se diferenciaron en plántulas en ninguno de los tratamientos de 21, 24, o 30DDP (Figura 26). Lo mismo sucedió con los embriones aislados del medio $\frac{1}{2}$ NLN, donde no se obtuvo diferenciación de plántulas. En el caso del medio M6m, para los óvulos con 30 DDP se obtuvo un poco más del 50% de respuesta, es decir que más de la mitad de los óvulos cultivados en este medio desarrollaron embriones. Aproximadamente un 20-30% de estos embriones diferenciaron plántulas en el primer mes o segundo mes después de ser aislados. Esta conversión se observa al mes del cultivo *in vitro* de los embriones para los medios MSREm y M6 indistintamente del tratamiento 21 DDP, 24 DDP o 30 DDP. La mayor tasa de conversión de embriones en plántulas se obtuvo en el medio MSREm. Aproximadamente un 60% de los embriones se convirtieron en plántulas a partir del segundo mes del cultivo de los embriones a diferencia del medio M6m donde se observó una conversión del 50% de los embriones (Figura 26). Las plántulas posteriormente se convierten en plantas completamente desarrolladas (Figura 26).

Para estimular la diferenciación de plántulas a plantas, las primeras fueron subcultivadas en el mismo medio nutritivo pero en un recipiente de mayor tamaño, en este caso se utilizó frasco de mayonesa, y fueron transferidas de la oscuridad a la luz con un fotoperiodo de 12 horas luz y oscuridad. En los medios de cultivo MSREm y M6m se presentó la mayor tasa de conversión de plántulas en plantas completamente desarrolladas (aproximadamente un 20-25%) al mes o dos meses de subcultivar las plántulas, Las primeras plantas completamente desarrolladas se obtienen a los 2-3 meses del subcultivo de los embriones formados a partir de óvulos 30DDP (Figura 26). En contraste, en los medios $\frac{1}{2}$ MS y $\frac{1}{2}$ NLN no se desarrollaron plántulas o plantas para ninguno de los tratamientos (Figura 26).

Los embriones que se aislaron de frutos con 30 DDP y que se cultivaron *in vitro* en los medios $\frac{1}{2}$ NLN y $\frac{1}{2}$ MS durante tres meses, fueron luego transferidos a los medios de cultivo MSREm y M6m para determinar si aún podían obtenerse plántulas a partir de ellos (Figura 25). Luego de dos meses de estar en los nuevos medios, los embriones no evidenciaron ningún cambio morfológico respecto al momento de su aislamiento, tampoco presentaron apertura de sus cotiledones y no se documentó ninguna señal de desarrollo de los mismos.

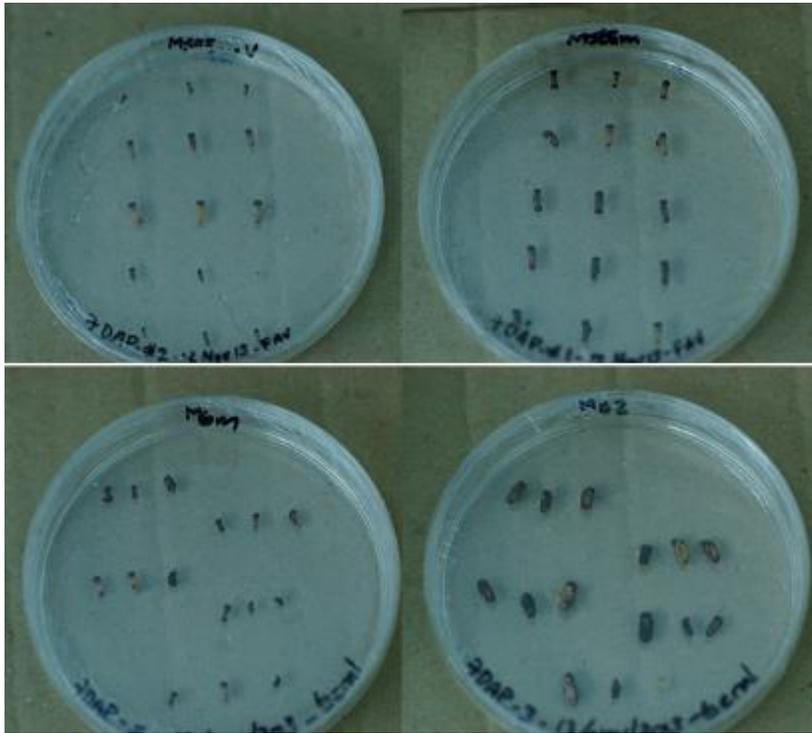


Figura 25. Óvulos con 7 días de polinización cultivados en medios MSREm-V, MSREm, M6m y MS2. Nótese el tamaño mayor encontrado en el medio MS2 a los dos meses de cultivo.

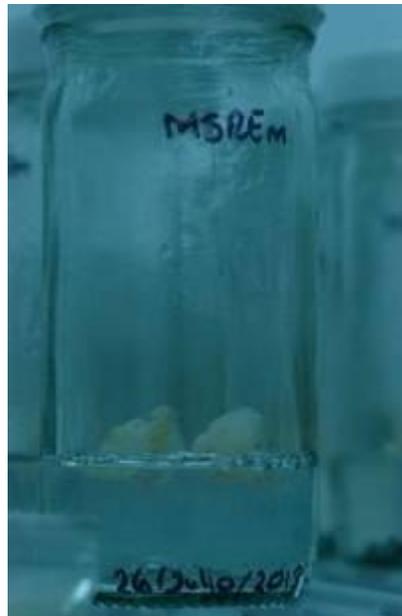


Figura 24. Embriones aislados de frutos con 30 DDP, cultivados *in vitro* en los medios $\frac{1}{2}$ NLN y $\frac{1}{2}$ MS durante tres meses y transferidos a los medios MSREm y M6m. Estos no presentan cambios desde su aislamiento.

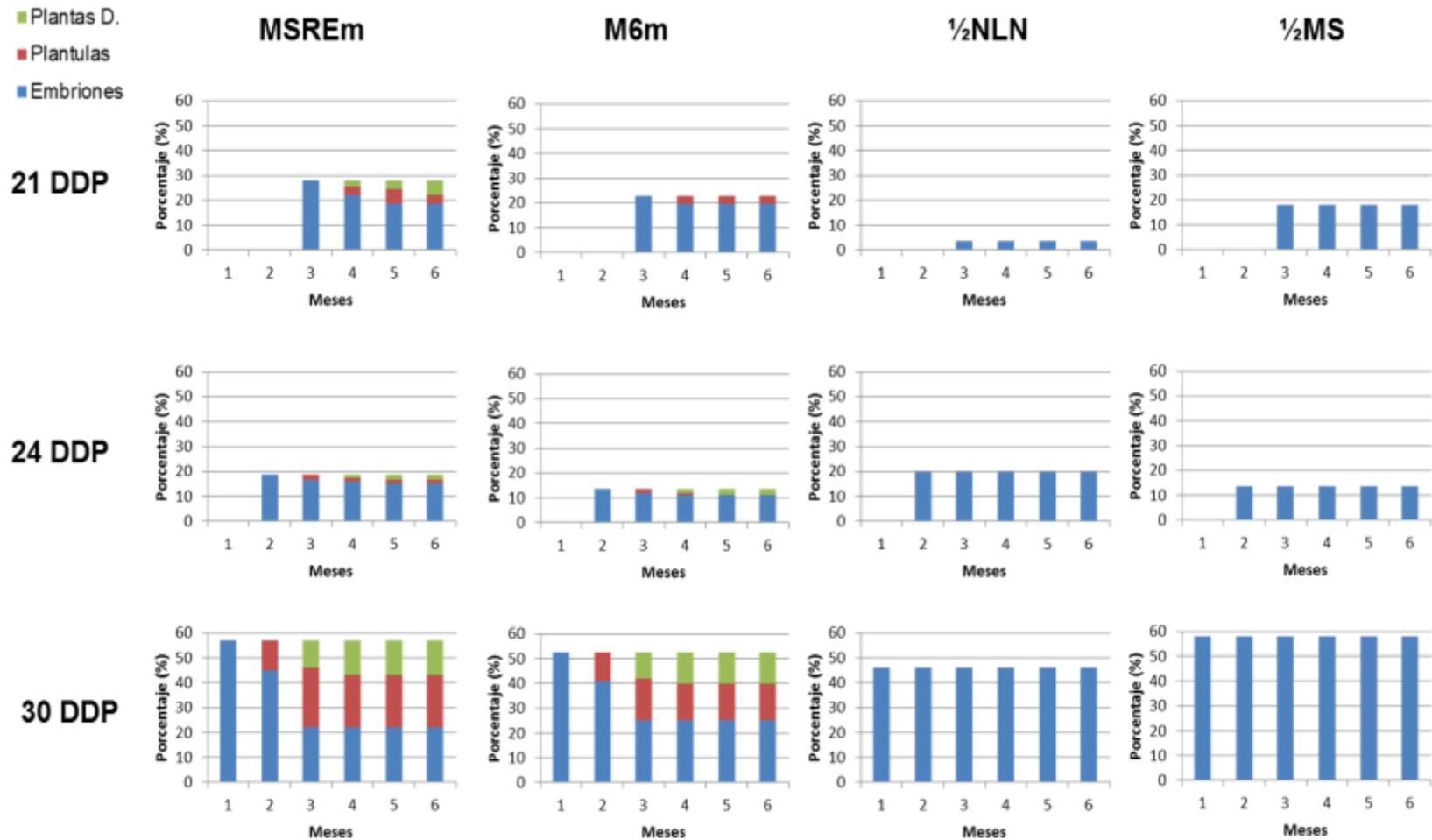


Figura 26. Gráficos sobre la cantidad de embriones (barras azules), plántulas (barras rojas), y plantas desarrolladas (barras verdes) que se obtuvieron en los cuatro diferentes medios de cultivo MSREm, M6m, 1/2NLN y 1/2MS (columnas) en cada uno de los tiempos de polinización (filas) de los óvulos cultivados *in vitro*, 21, 24 y 30 DDP (Días de polinización). Se observa una mejor respuesta para el medio MSREm en todos los casos.

Las figuras 27 y 28 presentan datos de la longitud de los óvulos con 7 y 14 DDP, después de 2 meses de cultivo *in vitro*. Se puede observar que en ambos casos los óvulos que fueron sembrados en el medio MS2 tienen un tamaño mayor con respecto a los óvulos sembrados en otros medios, aun cuando al momento de su aislamiento se encontraban todos en longitudes similares entre ellos. Esto sugiere que el medio MS2 permite el crecimiento de los tejidos del ovulo, presentado cambios en la coloración del tegumento externo y crecimiento con respecto a su tamaño inicial (Figura 24). Estos tratamientos no fueron sembrados antes debido a que se necesitaba determinar las condiciones óptimas para cultivo *in vitro* de embriones con un estado de desarrollo más avanzado, para así ir retrocediendo hasta el estado más temprano posible.

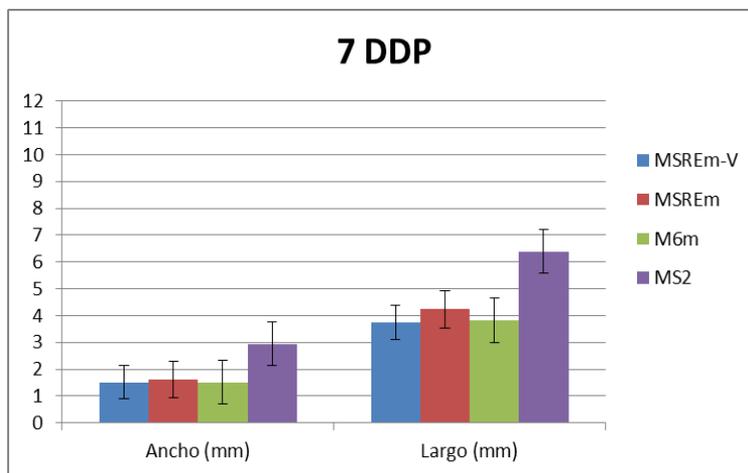
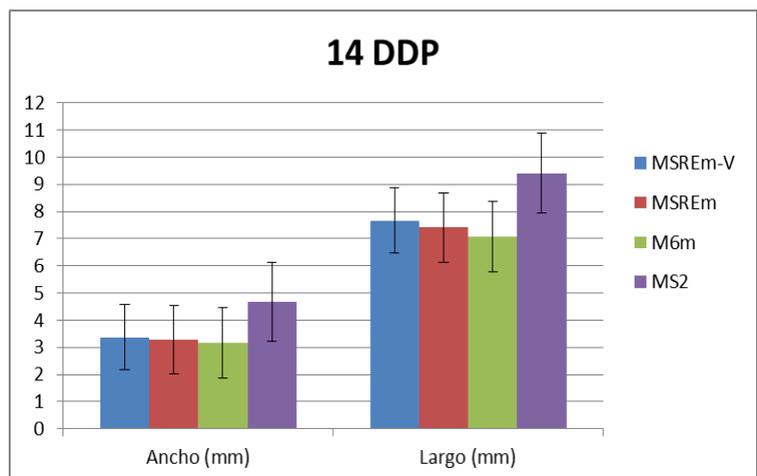


Figura 27. Longitud de las semillas inmaduras con 7 días de polinización (DDP) después de 8 semanas en cultivo *in vitro*. En los medios: MSREm-V (barras azules), MSREm (barras rojas), M6m (barras verdes) y MS2 (barras moradas). Las cultivadas en el medio MS2 presentan un mayor tamaño que las que fueron cultivadas en los otros medios.

Figura 28. Longitud de las semillas inmaduras con 14 días de polinización (DDP) después de 8 semanas en cultivo *in vitro*. En los medios: MSREm-V (barras azules), MSREm (barras rojas), M6m (barras verdes) y MS2 (barras moradas). Las cultivadas en el medio MS2 presentan un mayor tamaño que las que fueron cultivadas en los otros medios.



Se aislaron embriones en diferentes estados de desarrollo a partir de óvulos cultivados a los 14 DDP luego de dos meses de permanecer en medios de cultivo *in vitro*. Estos embriones fueron clasificados como embriones prematuros (Figura 29), todos aquellos que se encontraban en estado globular hasta torpedo sin una clara diferenciación de sus cotiledones, y como embriones formados (Figura 30) a todos los que presentaban cotiledones completamente formados o claramente diferenciables.

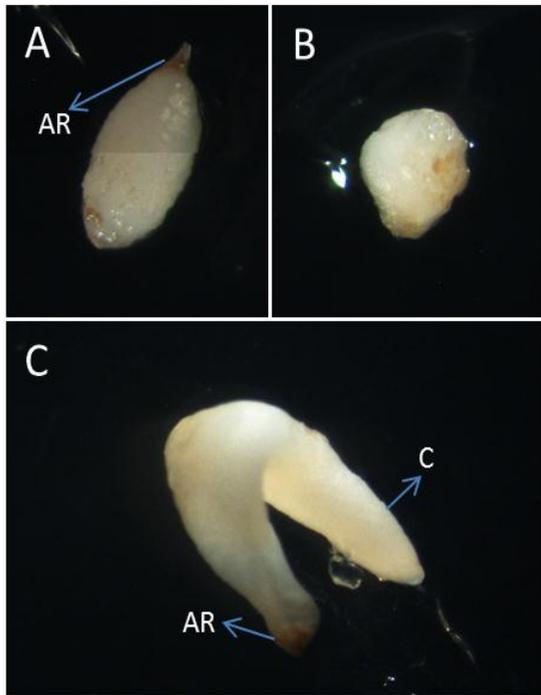


Figura 29. Embriones prematuros aislados de semillas inmaduras con 14 días de polinización (DDP) después de 8 semanas en cultivo *in vitro*. **A)** Embrión en estado torpedo, **B)** Embrión en estado globular y **C)** Embrión en estado cotiledonar temprano. Cotiledones (C) y Apice Radicular (AR).

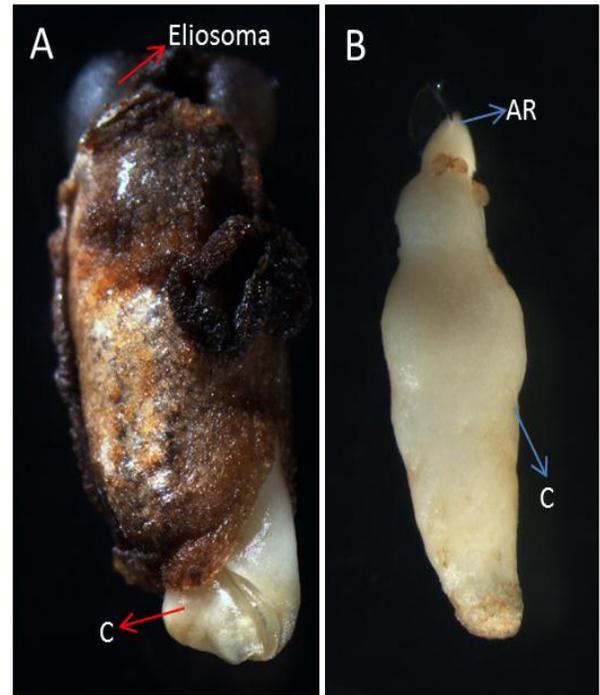


Figura 30. Embriones formados aislados de semillas inmaduras con 14 días de polinización (DDP) después de 8 semanas en cultivo *in vitro*. **A)** Semilla inmadura en la que se observan los cotiledones (C) del embrión emergiendo por el extremo calazal. **B)** Embrión en estado cotiledonar aislado donde se observa el ápice radicular (AR) y sus cotiledones sin expandir.

En la figura 31 se muestra el porcentaje de embriones extraídos a partir de óvulos provenientes del tratamiento de 14 DDP después de dos meses de cultivo *in vitro* en diferentes medios. Se obtuvieron embriones completamente formados en óvulos cultivados en los medios MSREm-V y MS2, mientras que para los otros medios solo se obtuvieron embriones prematuros. Se puede observar que la tasa de obtención de embriones fue mayor en los cultivados en el medio MS2. Sin embargo, se puede observar que la tasa de obtención de embriones a partir de óvulos cultivados a los 14 DDP es de aproximadamente menos del 20% del total de óvulos *in vitro*.

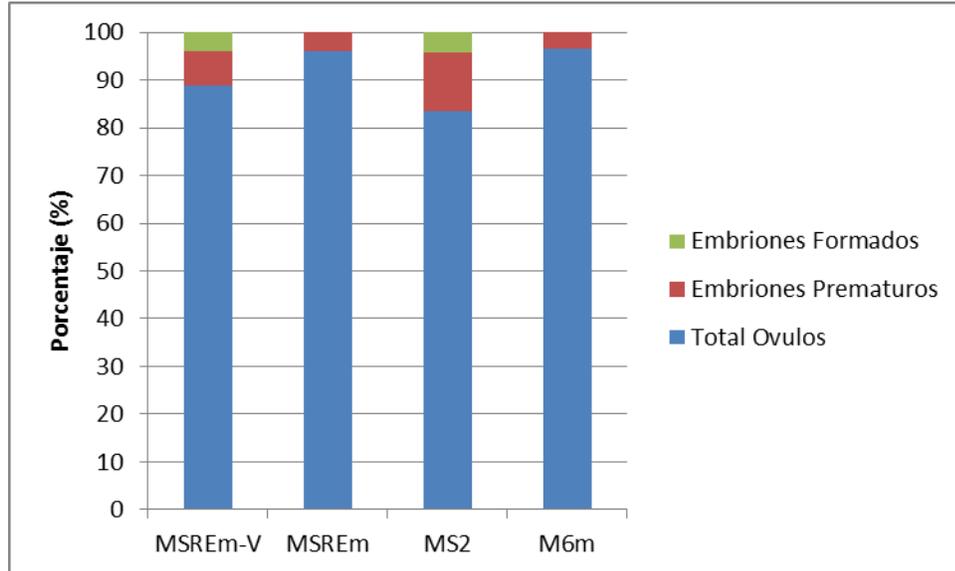


Figura 31. Porcentaje de embriones formados (verde) y de embriones prematuros (rojo) que se aislaron del total de óvulos (azul) cultivados después de 14 días de polinización (DDP). Estos fueron aislados luego de 8 semanas en cultivo *in vitro*. La mayor cantidad de embriones se encontraron en el medio MS2 con aproximadamente un 15% de embriones formados en el total de óvulos cultivados.

7 DISCUSIÓN

El presente trabajo documenta en forma secuencial los cambios anatómicos observados en la yuca una vez completada la meiosis del óvulo, dando origen a la formación del saco embrionario, la posterior maduración asociado a la receptividad para la fecundación, la formación del embrión cigótico y su germinación dando origen a plántulas y posterior desarrollo de plantas completas *in vitro*.

Los estudios histológicos comparativos de óvulos polinizados o no polinizados de yuca reportados en este trabajo, permiten tener un mejor entendimiento del estado de desarrollo y maduración del saco embrionario conducente a la formación del embrión cigótico en yuca. Se confirmó que el almidón se acumula en el saco embrionario una vez finalizada la meiosis y el aparato embrionario se organiza y avanza en maduración hasta el día de antesis. Se observó que a medida que pasan los días después de la antesis, si no hay polinización (fecundación), el saco embrionario degenera y la acumulación de almidón disminuye. En contraste si el óvulo es polinado, se observa un incremento en la acumulación de almidón a medida que avanza el tiempo después de la fecundación. Esta acumulación en almidón, acompaña los primeros ciclos de división de la ovocélula para la formación del embrión. Posteriormente el contenido de almidón decrece en la medida que se va formando el endospermo.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman los reportados por otros investigadores, quienes aseguran una acumulación masiva de amiloplastos durante el proceso de formación del saco embrionario, así como en las células nucleares en el extremo calazal (Perea, y otros, 2013). En las angiospermas, la acumulación de almidón indica su rol en la nutrición del saco embrionario como fuente de energía (Rodríguez-Riaño, y otros, 2006), por lo tanto su presencia luego del día de antesis depende de si se fecunda o no la ovocélula, ya que al formarse un embrión aumenta la demanda nutricional del saco embrionario y es necesario un aumento en la acumulación de amiloplastos en la zona.

Se ha reportado que en angiospermas el saco embrionario maduro está formado por 8 núcleos, 3 de los núcleos se ubican hacia el extremo calazal (las células antípodas), dos de los núcleos se ubican en la parte central constituyendo los núcleos polares, y los otros 3 núcleos se ubican en el extremo micropilar conformando el aparato de la ovocélula compuesto por dos células sinérgidas y al centro la ovocélula propiamente (Rodríguez-Riaño, y otros, 2006). En el caso de la yuca, en la medida que el saco embrionario obtiene esta reorganización y se inicia la acumulación de almidón, se considera que el saco embrionario está maduro y receptivo para ser fecundado (Perea, y otros, 2013).

Con base en estos reportes se sugiere que el saco embrionario de la yuca alcanza su madurez justo el día de antesis y permanece viable hasta un día después de la antesis. En este trabajo en los cortes histológicos analizados se pudieron observar 6 de los 8 núcleos que deben estar presente en el saco embrionario, se identificó claramente la vacuola central y la acumulación de almidón características de un saco embrionario maduro. A los dos días después de la antesis, si el ovulo no ha sido polinizado, aparecen señales de degradación del saco embrionario, como la disminución de la acumulación de almidón en la zona, tal como lo reportaron otros investigadores (Rao & Sarveswara, 1976). Tres días después de la antesis se evidenció el inicio del proceso de degradación de la ovocélula y de todo el saco embrionario en general, incluyendo la degradación de los núcleos dispersos del saco embrionario. La acumulación de almidón es mucho mayor en los dos primeros días después de la antesis y va disminuyendo a medida que pasa el tiempo, si el ovulo no fue fertilizado.

Algunos autores han reportado que antes de que el embrión sea visible, se empieza a desarrollar el endospermo (Thathachar, 1953). Esto se confirmó con los cortes histológicos de óvulos con 7 días de polinización. Se observaron células en división pertenecientes al endospermo, además se identificaron los diferentes tejidos del ovulo, entre ellos se determinó que el nucelo ya ha iniciado su proceso de degradación, debido a que el embrión esta en formación. El nucelo pasa a ser fuente de nutrientes para el embrión en formación, al igual que el almidón acumulado en los días previos a la fecundación (Perea, y otros, 2013). A los 14 días después de la polinización, fue posible encontrar en los cortes histológicos longitudinales, un estado globular temprano del embrión (entre 8 y 16 células) alojado en el extremo micropilar del saco embrionario y la formación del endospermo alrededor del embrión. Estos cambios estructurales concuerdan con lo reportado por otros autores para otras especies (Thathachar, 1953; Rodríguez-Riaño, y otros, 2006). El grosor del tegumento externo disminuye, mientras que la del tegumento interno presenta un engrosamiento compuesto principalmente por células con paredes altamente lignificadas. Este tegumento contribuye al endurecimiento de lo que será la semilla y se va expandiendo a medida que el embrión se desarrolla (Carmichael & Selbo, 1999).

El óvulo luego de 21 días después de su polinización, contiene un embrión globular sin suspensor evidente, un endospermo en desarrollo temprano, y muestra un aumento visible del tegumento interno, que como se dijo anteriormente, se encuentra asociado al aumento del tamaño del óvulo hasta convertirse en semilla, a medida que avanza el tiempo. El tejido nucelar se reduce, a diferencia del tejido perteneciente al endospermo en formación que se incrementa. Como en otras angiospermas, el endospermo poco a poco llena el espacio que va dejando la degradación del tejido nucelar (Weniger, 1917). En este estudio, al igual que en otros reportados en otras especies, se observó que el embrión en estado globular presenta una división celular activa caracterizada porque sus células no tienen vacuolas (avacuoladas) y son ricas en citoplasma,

características típicas de células en división. Las células del embrión globular presentan altas concentraciones de nutrientes hasta que el endospermo llene completamente el saco embrionario (Carmichael en 1999). A los 24 días después de polinización, se confirmó que el endospermo había llenado completamente el espacio del saco embrionario que dejó la degradación del tejido nucelar, y en el embrión globular ya avanzado, el suspensor fue visible en su base. No se muestran estudios histológicos de los óvulos a los 30 DDP debido a la dificultad para procesar estas muestras por el gran tamaño y la dureza del fruto. Los análisis indican que a esta edad, el embrión está totalmente formado, con cotiledones completamente extendidos ocupando toda la cavidad del fruto y protegiendo el eje apical de donde emergerán las primeras hojas verdaderas, y mostrando claramente el embrión visible a simple vista con el ápice radical al otro extremo listo para el desarrollo de la raíz durante la germinación del embrión. Con base a estos resultados se anticipa que en la yuca entre los 24 DDP y 35 DDP (semilla madura) el embrión pasa del estado globular, al de torpedo y posteriormente al cotiledonar característico de las angiospermas (West & Harada, 1993).

En este estudio se identificaron cuatro posibles causas que no permite que los óvulos de yuca lleguen a formar frutos maduros en condiciones de campo. La primera es porque no todas las flores son polinizadas el día de anthesis. Una pequeña parte de estas flores no llegan a ser fertilizadas debido a que no todos los ciatios femeninos son visitados por los agentes polinizadores, ya que depende de si el ciatio es o no accesible para las abejas, es decir, si se encuentran más expuestos que otros. El hecho de no ser polinizados hace que la planta deje de enviar nutrientes hacia estos óvulos y que sean desechados por abscisión. La segunda razón está asociada a las condiciones climáticas del momento. En las épocas de lluvia, el agua provoca la caída de algunos frutos por acción física. La tercera se debe a que los frutos son afectados por las larvas de algunos insectos que se alimentan de ellos. Otros autores han indicado que la mayoría de la pérdida de frutos en yuca se da por abortos en etapas tempranas del desarrollo del embrión (Nunekpeku, y otros, 2013). Estos abortos se deben generalmente a que existe la posibilidad de que el óvulo sea autopolinizado, ya que la yuca es monoica y aunque los ciatios femeninos abren antes que los masculinos, ciatios de otras ramificaciones pueden abrir simultáneamente y autofecundarse, dando como resultado semillas con una viabilidad muy baja (Jennings & Iglesias, 2002). Sin embargo estos frutos tipo D podrían representar frutos que fueron polinizados pero en los que el polen no llegó a fertilizar los óvulos.

En el presente estudio se encontró que a medida que avanzan los días después de la polinización, algunos frutos se caen antes de llegar a madurar y otros son afectados por plagas, llegando hasta la maduración solo aquellos que son viables, es decir, solo los frutos sanos de polinización cruzada se desarrollan completamente, por eso se reduce la tasa de ciatios que se convierten en frutos. En este trabajo se obtuvo una pérdida de aproximadamente un 40% de ciatios, es

decir, que el 60% de los seleccionados llegaron a estados avanzados de desarrollo. La plaga que afecta a estos frutos se presenta a partir de los 14 días después de la polinización. Las larvas se alimentan de los óvulos fértiles y destruyen el interior del fruto dejándolo seco, lo cual provoca una mayor pérdida del número de ciatios seleccionados, evitando que estos lleguen a convertirse en frutos maduros (CCER, 2005).

Se encontraron cinco tipos de frutos dentro del material colectado, estos fueron clasificados de acuerdo al diámetro en cinco categorías. Los frutos tipo A eran los más grandes dentro de los colectados, éstos tenían un diámetro entre 1,3 - 2cm. El tipo B eran frutos que tenían un diámetro mayor de 1cm y menor de 1,3cm. El tipo C eran los que tenían un diámetro menor de 1cm y mayor de 0,5cm. El tipo D eran frutos con un diámetro menor a 0,5cm, similares a los ciatios que no han sido polinizados. Y por último, el tipo E eran frutos secos y abortivos que fueron afectados por plagas del cultivo. De acuerdo a lo reportado en otros estudios, la madurez del fruto se alcanza cuando tiene entre 1 y 1,5cm de diámetro, en los cuales se encuentran semillas viables (Cuhna, 2002). Por lo tanto, de las categorías de los frutos colectados solo dos eran ideales para cultivo *in vitro* ya que estas alcanzaban los parámetros antes descritos. Los frutos tipo A que tenían 1,3cm – 2cm, y los frutos tipo B que tenían un diámetro mayor de 1cm, solo se presentaron en los colectados con más de 14 días de polinización, y su tasa de aparición fue aumentando a medida que avanzaban los días (Figura 17). La frecuencia de estos tipos de frutos A y B incrementó progresivamente en la medida que aumento los DDP. En conclusión, a pesar de que a mayor número de días de polinización hay mayor pérdida de ciatios seleccionados, a medida que aumentan estos días aumenta también los frutos maduros que contienen embriones viables, resultado que era de esperarse.

Sin embargo uno de los objetivos del presente estudio, es identificar el medio de cultivo *in vitro* que permita la formación de embriones con capacidad de germinación y formación de plantas, a partir de óvulos cultivados en condiciones *in vitro* en el estado más temprano posible después de la polinización. Esto con el objeto de utilizar luego estas condiciones para establecer un modelo que permita inducir la formación de embriones a partir de óvulos no fecundados (ginogénesis). Para estimular el desarrollo de los embriones *in vitro*, se simulo un ambiente similar al que tendrían estos si estuvieran en campo, como ha sido reportado por algunos autores (Haslam & Yeung, 2011). Dentro de las condiciones, la composición del medio es uno de los factores más determinantes. Se ha demostrado que altas concentraciones de sacarosa, cuando se utiliza como fuente principal de carbono, aumenta la tasa de desarrollo de los embriones cigóticos *in vitro* (Haslam & Yeung, 2011). Sin embargo en este trabajo los resultados encontrados no respaldan esa conclusión. Dos de los cuatro medios evaluados contenían altas concentraciones de sacarosa: Los medios $\frac{1}{2}$ MS, y $\frac{1}{2}$ NLN contenían un 13%, mientras que los medios MSREm y M6m contenían un 3%. La formación de embriones más baja se observó en el medio $\frac{1}{2}$ NLN. El medio $\frac{1}{2}$ NLN

tiene un nivel de macronutrientes menor al de los otros medios evaluados. En particular, los niveles de fuente de nitrógeno son muy bajos. El nitrógeno en este medio es principalmente suministrado a través de algunos aminoácidos (glutamina y serina) y es rico en vitaminas. Al comparar la composición del ½NLN con los otros medios evaluados, se puede inferir que probablemente en las etapas tempranas del desarrollo del embrión de yuca se requieren altos niveles de nitrógeno y otros micronutrientes como son el fósforo, el potasio y el magnesio, requerimientos no suplidos por los aminoácidos y vitaminas presentes en el ½NLN. Si bien en el medio ½MS se obtuvo la mayor formación de embriones, esta fue similar a la obtenida en el MSREm. Estos resultados sugieren que otros componentes del medio de cultivo diferente a la fuente y nivel de carbono pueden tener una influencia mayor en la formación de los embriones en etapas tempranas de desarrollo, como las fitohormonas.

Los óvulos mostraron diferencias en el tipo de cambios morfológicos después del cultivo *in vitro* según el medio de cultivo utilizado. En todos los casos que se formaron embriones, los óvulos cultivados *in vitro* mostraron un incremento en el volumen del ovulo y cambio en la coloración del tegumento externo de un color claro verdoso (ovulo recién extraído del fruto y cultivado *in vitro* observado en este estudio) al color pardo oscuro, similar al que muestran los óvulos aislados de semillas formadas *in planta* y en estado avanzado de desarrollo (Cuhna, 2002). Estas características fueron utilizadas para identificar los óvulos *in vitro* que probablemente habían desarrollado un embrión en su interior. Los óvulos que tomaron la coloración oscura similar a una semilla de 35 días de polinización se presentaron principalmente en los medios de cultivo que contenían giberilinas en su composición (MSREm y M6m). Estos resultados sugieren que la presencia de esta hormona en el medio de cultivo probablemente facilita la formación completa del embrión dentro de los óvulos *in vitro*, permitiendo su maduración, similar al que tendrían dentro de las semillas. Se ha demostrado que las giberilinas inducen la síntesis de enzimas hidrolíticas, como amilasas y proteasas, durante la germinación de las semillas que degradan las reservas de almidón que se acumulan en el endospermo (Taiz & Zeiger, 2010). Es posible que las giberilinas tengan la misma acción durante la maduración de la semilla. De ser este el caso, la adición de giberilinas en el medio de cultivo permite que los nutrientes estén disponibles para el embrión ayudando así su completa formación y la maduración *in vitro*.

Los resultados indicaron que los óvulos con coloración parda contenían embriones con cotiledones completamente formados. El desarrollo de los embriones fue completo y algunos emergieron espontáneamente a través de una apertura que se originó por el extremo calazal del óvulo, producto de la degradación del tegumento en ese lado. Algunos de los embriones aislados germinaron y desarrollaron plántulas que presentaban primordios radiculares, y elongación de las primeras hojas verdaderas y del hipocótilo. La mayoría de estos embriones provenían del medio de cultivo MSREm, el cual a diferencia del M6m contenía auxinas además

de giberilinas, en una concentración de 10^{-5} M. Adicionalmente, la mayor tasa de conversión de plántulas a plantas completamente desarrolladas también se obtuvo en el medio MSREm. Esto indica que la presencia de auxinas puede jugar un papel importante en la tasa de elongación de los órganos vegetales del material sometido a cultivo *in vitro*. Se ha reportado que las auxinas en concentraciones entre 10^{-6} a 10^{-5} M, son óptimas para el crecimiento y la elongación de tallos y del vástago (Taiz & Zeiger, 2010), lo cual apoya el rol importante que las auxinas pueden estar aportando en el medio de cultivo MSREm. Sin embargo, algunas plántulas no llegaron a convertirse en plantas completamente desarrolladas debido a la competencia espacial y nutricional que se generó en los frascos de cultivo, ya que se sembraron 5 plántulas por frasco y en la mayoría de los casos solo crecían 3. Con respecto a los embriones que no llegaron siquiera al estado de plántula, probablemente se deba a que aunque morfológicamente todos tenían el mismo aspecto de acuerdo al estado de desarrollo en el que se encontraban, fisiológicamente no eran iguales, ya que es posible que aquellos que no generaron plántulas no llegaron a salir de su estado de dormancia debido a que no se suplieron completamente las condiciones óptimas para su germinación (West & Harada, 1993). De acuerdo a estudios reportados en otras especies, la germinación de los embriones puede depender de factores como la temperatura, la luz, en la que es posible que se necesiten fotoperiodos mas cortos o mas largos de luz, o a la presencia de ácido absicico (ABA) y la ausencia de giberilinas (Taiz & Zeiger, 2010). Se ha demostrado que ABA regula el estado de dormancia de las semillas (Ochatt, 2011), por lo que se debe controlar la producción de esta hormona en el medio de cultivo aumentando la concentración de giberilinas que promueven la germinación.

Los óvulos que no mostraron un cambio morfológico con respecto a su coloración (i.e. mostraban la misma coloración al momento de ser aislados del fruto), no presentaron desarrollo de embriones a pesar que si contenían endospermos. El endospermo en las angiospermas se forma producto de la doble fecundación. Uno de los núcleos del grano de polen fecunda a la ovocélula para formar el cigoto (diploide), y el otro núcleo del polen fecunda a los 2 núcleos polares del saco embrionario formando el endospermo (triploide) (Kapusta, y otros, 2007). El hecho que estos óvulos mostraran formación de endospermo indica que si fueron fecundados, pero la ausencia del embrión indica que las condiciones no fueron óptimas para permitir un desarrollo completo del embrión desde las primeras divisiones de la ovocélula hasta la madurez completa.

Al analizar los resultados obtenidos con óvulos de 21 DDP, 24 DDP y 30 DDP, se concluye que mientras es más joven el estado de desarrollo del embrión en el momento que se cultivan los óvulos *in vitro*, es más difícil lograr un desarrollo completo y madurez del embrión que le permita germinar, formar plántulas y diferenciar plantas completas. De los medios evaluados, el medio MSREm fue el que dio un mejor resultado en todos los casos. La composición del medio de cultivo es crítica en este proceso de diferenciación. Esto sugiere que el medio de

cultivo que permite un mejor y más rápido desarrollo de embriones es el que contiene giberilinas y auxinas en su composición.

Al analizar estos resultados obtenidos con óvulos de 21, 24 o 30 DDP, se decidió descartar los medios de cultivo $\frac{1}{2}$ MS y $\frac{1}{2}$ NLN para los ensayos con óvulos de 7 o 14 DDP. Adicionalmente a los medios MSREm y M6m, se probaron dos medios más. Uno es una modificación del MSREm. El MSREm contiene la mitad de las concentraciones de las vitaminas del medio basal de MS (Murashige & Skoog, 1962). La modificación consistió en dejar las vitaminas y aminoácidos a la misma concentración del medio basal MS, es decir completas, a este medio se le llamo MSREm-V. Esta modificación se realizó debido a que se ha reportado que las vitaminas son compuestos esenciales para la creación de compuestos orgánicos necesarios en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Taiz & Zeiger, 2010). El otro medio, el MS2, es un MS completo, a diferencia del MSREm que contiene la mitad del medio basal MS, adicionalmente contiene una mayor concentración de auxinas y una fuente de citoquinina, además de giberilinas. El MS2 está complementado con 2 mg/L de 2,4-D (una concentración mayor de una auxina más potente respecto a 0.01 mg/L ANA del MSREm), contiene citoquinina (0.5 mg/L de cinetina) y 0.01 mg/l de giberilinas. De acuerdo a lo reportado en la literatura, la citosina promueve la diferenciación celular mientras las auxinas promueven la división celular (Taiz & Zeiger, 2010). El 2,4-D estimula además de la elongación celular, el incremento en volumen del tejido (O'Kennedy y otros, 2011). Los resultados obtenidos sugieren que el MS2 induce un incremento significativo en el crecimiento de los ovulos de 7 DDP y 14 DDP con respecto a su tamaño inicial al momento de ser aislados de los frutos con 7 y 14DDP. En ambos tratamientos se ha observado un incremento en el tamaño de los óvulos de aproximadamente el doble de su longitud con respecto a su estado inicial, en comparación con los medios MSREm-V, MSREm y M6m, donde los óvulos no han experimentado ningún tipo de incremento en su volumen. Además de este cambio morfológico externo, se encontró una mayor cantidad de embriones en diferentes estados de desarrollo al interior de los óvulos sembrados en el medio MS2, y el medio MSREm-V presentó también este tipo de embriones. Ambos medios tienen en común que contienen vitaminas y aminoácidos en la concentración completa del medio basal MS, lo que indica que este es un factor importante al momento de inducir el desarrollo embrionario *in vitro*. Probablemente el medio de cultivo MS2 sea el ideal para suplir los requerimientos nutricionales en el estado de desarrollo temprano en el que se encuentran los embriones en los días de polinización mencionados.

Los óvulos cultivados en el medio $\frac{1}{2}$ NLN, mostraron cambios de coloración similar al de formación de semillas, sin embargo en la mayoría de los casos no contenían embriones, los óvulos tenían un aspecto seco y deshidratado causado probablemente por la alta concentración de sacarosa en el medio. Esto indica que aunque en etapas tempranas de formación del embrión se requieren altas cantidades de carbono (Haslam & Yeung, 2011), si el embrión no se desarrolla por

falta de otros componentes importantes en el medio de cultivo, el incremento en el potencial osmótico del medio de cultivo producto del alto contenido de azúcares puede deshidratar el material vegetal, afectando su respuesta. Sin embargo, algunos embriones encontrados en este medio mostraron etapas más avanzadas de desarrollo al momento de ser aislados, con respecto al estado en el que se encontraban dentro de la semilla con 30 DDP cuando fueron cultivados *in vitro*. Esto se debe a que el embrión se alimenta de los tejidos internos de la semilla y/o del endospermo, lo cual le provee los nutrientes necesarios para completar su desarrollo (Westoby & Rice, 1982), pero cuando este fue aislado de la semilla, el medio de cultivo no suplió sus requerimientos nutricionales para inducir el rompimiento del estado de dormancia, por lo tanto estos embriones no germinaron y no continuaron su crecimiento.

Hasta el momento, no se ha reportado recuperación de plantas de yuca a partir de óvulos cultivados *in vitro* a una edad menor de 35 días de polinización, edad en la que los embriones de yuca ya están totalmente formados, se encuentran en estado cotiledonar avanzado, mostrando cotiledones totalmente expandidos a su máxima capacidad y están maduros para germinar (Bonilla, 2011). Por lo tanto este trabajo sería el primer reporte de recuperación de plantas completamente desarrolladas a partir de óvulos cultivados *in vitro* con 21 días de polinización, en los cuales se determinó en este trabajo, que contienen embriones en estado globular temprano con aproximadamente 30 células, aun no es visible el suspensor y el endospermo se encuentra en estado de desarrollo temprano.

8 CONCLUSIONES

- 8.1.1 La acumulación de almidón en el saco embrionario es un indicador del estado de maduración en el que se encuentra el mismo. La acumulación disminuye si el saco embrionario no ha sido polinizado, y aumenta si se fecunda.
- 8.1.2 El saco embrionario de la yuca alcanza su madurez justo el día de antesis y permanece maduro hasta un día después de la antesis.
- 8.1.3 A los 7 días después de polinización (DDP), el embrión se encuentra en su primera división celular. A los 14 DDP se encuentra entre su tercera o cuarta división con 10 células. A los 21 DDP se encuentra en un estado globular temprano. A los 24 DDP se encuentra el embrión en estado globular con suspensor y a los 30DDP ya se encuentra en estado cotiledonar.
- 8.1.4 Los óvulos mostraron diferencias en el tipo de cambios morfológicos después del cultivo *in vitro* de acuerdo a la composición del medio de cultivo en el que se mantuvieron.
- 8.1.5 La composición del medio es uno de los factores más determinantes al momento de desarrollar *in vitro* las condiciones ambientales ideales para el crecimiento de embriones de yuca.
- 8.1.6 No solo la fuente de carbono es determinante en la composición óptima del medio de cultivo para el desarrollo de los embriones, otros componentes, como las fitohormonas, también pueden tener una influencia mayor en la formación de estos.
- 8.1.7 El medio de cultivo que permite un mejor y más rápido desarrollo de embriones mayores de 14 días de polinización es el medio MSREm debido a que contiene giberilinas y auxinas en su composición que permiten la germinación de dichos embriones y la posterior elongación de sus órganos vegetales.
- 8.1.8 Los óvulos cultivados *in vitro* en los que se desarrollaron embriones, mostraron un incremento significativo en el volumen del ovulo y cambio en la coloración del tegumento externo de un color claro verdoso al color pardo oscuro, similar al que muestran los óvulos aislados de semillas formadas *in planta*.

- 8.1.9 Los cambios característicos a nivel morfológico de óvulos con formación de embriones cigóticos pueden ser utilizados como indicadores para identificar los óvulos no fecundados cultivados *in vitro* que probablemente están inducidos a formar embriones vía ginogénesis.
- 8.1.10 La presencia de giberilinas en el medio de cultivo facilita la formación completa del embrión dentro de los óvulos *in vitro*, permitiendo su maduración, similar al que tendrían dentro de las semillas.
- 8.1.11 Las auxinas presentes en los medios de cultivo permiten la elongación de los órganos vegetales, facilitando así el crecimiento *in vitro* de los embriones germinados.
- 8.1.12 En estados tempranos de desarrollo de los embriones menores a 14 días de polinización, el medio de cultivo que permite un aumento del volumen del tejido, y que probablemente permitirá un mejor desarrollo de estos embriones, es el MS2, que contiene en su composición citoquininas, además de auxinas y giberilinas.
- 8.1.13 Los óvulos con 7 y 14 días de polinización cultivados el medio MS2 presentan un aumento significativo en el volumen con respecto a su estado inicial, lo cual puede ser un indicio del crecimiento del embrión en su interior.

Durante esta investigación, se encontraron problemas frente a la disponibilidad de frutos en campo ya que como se describió anteriormente, son muchos los factores ambientales que afectan la permanencia de estos en la planta. Se sugiere seleccionar una mayor proporción de ciatios que permitan obtener al momento de la recuperación de los frutos, el número requerido para las futuras investigaciones. Otro problema que se presentó fue la contaminación de los óvulos con larvas de una peste de yuca, este puede ser corregido haciendo revisiones del material vegetal *in vitro* diariamente durante las dos primeras semanas del cultivo.

Se necesita conocer la concentración adecuada de giberilinas que permita la germinación de una tasa más alta de embriones, así como identificar las condiciones de humedad y de luz ideales para promover dicha germinación. Y por último, establecer las condiciones para la obtención de plantas a partir de embriones con menos de 14 días de polinización.

Se documentaron los cambios estructurales y celulares, como la acumulación de almidón y la degradación de los tejidos, en diferentes estados de desarrollo del saco embrionario de flores femeninas fecundadas y no fecundadas, utilizando técnicas de microscopía óptica y fluorescencia. Lo cual permite tener más claridad

acerca del aspecto morfológico del saco embrionario tanto el día de antesis como los días posteriores a la apertura de las brácteas.

Se logró identificar que el saco embrionario alcanza su madurez el mismo día de antesis y permanece maduro hasta el siguiente día, luego de esto, sus cambios morfológicos dependen de si es polinizado o no.

No se logró identificar con exactitud el estado óptimo de desarrollo de la ovocélula para inducir su división celular mediante cultivo *in vitro*, pero se contribuyó a este objetivo con el análisis histológico y la documentación de los cambios que presenta la ovocélula luego de ser fecundada, ya que se identificó el momento en el que el saco embrionario se encuentra completamente maduro, lo cual probablemente permitirá que en esta etapa la ovocélula sea sometida a cultivo para inducir la generación de embriones DH.

Se optimizó la metodología para permitir el desarrollo de embriones cigóticos en etapas tempranas de formación a partir de 21 días después de la fecundación, hasta la obtención de plantas, identificando las composiciones ideales del medio de cultivo para cada estado de desarrollo de los embriones. Aunque todavía la tasa de germinación es muy baja por lo que se sugiere investigar sobre los requerimientos embrionarios para el rompimiento de dormancia, como lo son el control de ABA y la concentración de giberilinas en el medio. Se deben evaluar otras características ambientales diferentes de la composición del medio, como los periodos de luz a los que se debe someter el cultivo y la disponibilidad de los nutrientes en el medio, ya sea líquido o semisólido.

9 RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar los estudios en cultivo *in vitro* para embriones con menos de 14 días después de polinización, con el fin de determinar la etapa más temprana posible en la cual se puedan generar plántulas a partir de los mismos sin ocasionar daños en su viabilidad. Ya que esto permitiría reducir la tasa de abortos que se producen en los primeros días posteriores a la fecundación y aumentaría el número de plantas desarrolladas *in vitro*. Se debe tener en cuenta el número de plántulas que se cultivan en cada frasco para evitar la competencia nutricional y espacial entre ellas, esto con el fin de permitir que todas lleguen a convertirse en plantas completamente desarrolladas.

Con respecto a la composición del medio, se debe tener en cuenta las fitohormonas que lo componen, en el caso de embriones con tan solo 2 días de polinización se recomendaría utilizar 2,4-D como auxina debido a que este permite el aumento del volumen del ovulo, promoviendo el crecimiento de los tejidos internos y logrando ser morfológicamente similar a una semilla en un fruto maduro en campo. Además se recomienda evaluar el tipo y la concentración de citoquininas en el medio para promover el aumento de volumen en el tejido.

Para incrementar la conversión de plántulas a partir de embriones, se recomienda evaluar el rompimiento de la dormancia de estos para provocar su germinación, se deben tener en cuenta las condiciones de temperatura y humedad que permitan una mayor disponibilidad de oxígeno, con medios de cultivo líquidos y semisólidos, así como la concentración de giberilinas en el medio de cultivo para inhibir la producción de hormonas como ABA que a su vez, inhiben la germinación de los embriones. Evaluar además, los periodos de luz a los que deben ser sometidos los embriones, ya que se ha visto que algunos necesitan de cortos periodos que les permita activar los procesos de germinación.

También se recomienda utilizar otras técnicas de histología, como la implementación de cortes con el vibratomo para los estados más avanzados de desarrollo del embrión, o técnicas que en lugar de usar parafina como soporte para los cortes utilice resina, lo cual daría una mejor resolución a las imágenes de los cortes histológicos además de reducir la complejidad del proceso. Esto para que se permita conocer con más detalle los cambios morfológicos y estructurales que se dan a nivel celular en el saco embrionario de los óvulos de yuca para poder identificar el estado óptimo de la ovocélula para ser fecundada. Esto permitirá conocer con precisión como luce la ovocélula de los óvulos de yuca y además se podrá identificar con precisión el día en que se debe someter a cultivo *in vitro* para inducir la generación de embriones DH a partir del gameto femenino (vía ginogénesis).

10 AGRADECIMIENTOS

Principalmente a la Dra. Zaida Lentini por todas sus enseñanzas no sólo en el ámbito profesional sino también en el personal, por su apoyo y su confianza para llevar a cabo este proyecto.

A los auxiliares de investigación Saúl Santos y Freddy Vanegas por su colaboración y sus enseñanzas en el área de técnicas y manejo del laboratorio, además de la colecta del material vegetal en campo.

A los asistentes de investigación Eddy Tabares y María Eugenia Buitrago por su ayuda en las técnicas de análisis histológico utilizando el vibratomo.

Al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) por facilitarme el material vegetal y su equipo humano para el desarrollo de este proyecto.

A los evaluadores Paul Chavarriaga y Thaura Ghneim por sus recomendaciones, comentarios y aportes a esta investigación.

Y a todas las personas que de forma directa o indirecta estuvieron involucradas en el proyecto de grado, brindando apoyo y ánimo para desarrollarlo.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Allem, A. (2002). The Origins and Taxonomy of Cassava. En R. J. Hillocks, J. M. Thresh, & A. C. Bellotti, *Cassava: Biology, Production and Utilization* (págs. 1-16). CAB International.
- Biggs, B., Smith, M., & Kenneth, J. (1986). The use of embryo culture for the recovery of plants from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*(6), 229-234.
- Bohanec, B. (2009). Doubled Haploids via Gynogenesis. En A. Touraev, B. P. Forster, & S. Jain, *Advances in Haploid Production in Higher Plants* (págs. 35-46). Springer Science + Business Media B.V.
- Bonilla, M. (2011). *Inmature embryo rescue in Manihot esculenta Crantz*. Cali, Colombia: CIAT.
- Cach, N., Lenis, J., Perez, J., Morante, N., Calle, F., & Ceballos, H. (2006). Inheritance of useful traits in cassava grown in subhumid conditions. *Plant Breeding*(125), 177-182.
- Carmichael, J. S., & Selbo, S. M. (1999). Ovule, embryo sac, embryo and endosperm development in leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *Canadian Journal of Botany*(77), 599-610.
- Cataño, M., Mornan, K., Plazas, J., & Roca, W. (s.f.). Development of methodologies for the isolation and culture of cassava immature pollen and zygotic embryos. *CIAT*, 185-189.
- CCER. (2005). *Description of cassava as a crop*. Project IP3: improving cassava for the developing world.
- Ceballos, H., Okogbenin, E., Pérez, J. C., Becerra, L. A., & Debouck, D. (2010). Cassava. *Bradshaw J, Root and tuber crops*, 53-96.
- Chen, J.-F., Cui, L., Malik, A. A., & Mbira, K. G. (2011). In vitro haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture*(104), 311-319.
- Cuhna, A. A. (2002). Cassava Botany and Physiology. En R. J. Hillocks, J. M. Thresh, & A. C. Bellotti, *Cassava: Biology, Production and Utilization* (págs. 67-89). Brasil: CAB International.

- DeVries, J., & Toenniessen, G. (2001). Cassava. En J. DeVries, & G. Toenniessen, *Securing The Harvest. Biotechnology, Breeding and Seed Systems for African Crops* (págs. 147-156). New York: CABI Publishing.
- Ellis, R. H., Hong, T. D., & Roberts, E. H. (1982). An investigation of the influence of constant and alternating temperature on the germination of cassava seed using a two-dimensional temperature gradient plate. *Annals of Botany*, 49, 241-246.
- Fregene, M., & Puonti-Kaerlas, J. (2002). Cassava Biotechnology. En R. J. Hillocks, J. M. Tresh, & A. C. Bellotti, *Cassava: Biology, Production and Utilization* (págs. 179-207). CAB International.
- Fregene, M., Angel, F., Gomez, R., Rodriguez, F., Chavarriaga, P., Roca, W., y otros. (1997). A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theoretical and Applied Genetics*(95), 431-441.
- Fregene, M., Ospina, J., & 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.
- Gémes-Juhász, A., Balogh, P., Ferenczy, A., & Kristóf, Z. (2002). Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on in vitro gynogenesis induction on cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Rep*(21), 105-111.
- Gosh, S., Ramanujam, T., Jos, J., Moorthy, S., & Nair, R. (1988). *Tuber Crops*. New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co.
- Gürel, S., Gürel, E., & Kaya, Z. (2000). Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Rep*(19), 1155-1159.
- Halsey, M. E., Olsen, K. M., Taylor, N. J., & Chavarriaga-Aguirre, P. (Enero - Febrero de 2008). Reproductive Biology of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and Isolation of Experimental Field Trials. *CROP SCIENCE*, 48, 49-58.
- Haslam, T., & Yeung, E. (2011). Zygotic embryo culture: an overview. En T. Thorpe, & E. Yeung, *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols* (págs. 3-10). Humana Press.
- Hoseman, D., & Bossoutrot, D. (1983). Induction of haploid plants from in vitro culture of unpollinated beet (*Beta vulgaris* L.). *Z Pflanzenzuchtg*(91), 74-77.
- Jennings, D. (1963). Variation in pollen and ovule fertility in varieties of cassava, and the effect of interspecific crossing on fertility. *Euphytica*(12), 69-76.

- Jennings, D., & Iglesias, C. (2002). Breeding for crop improvement. En R. Hillocks, J. Tresh, & A. Belloti, *Cassava: biology, production and utilization* (págs. 149-166). CABI Publishing.
- Kapusta, M., Rojek, J., & Bohdan, J. (2007). INDUCTION OF AUTONOMOUS ENDOSPERM DEVELOPMENT IN OVULES OF UNPOLLINATED PISTILS OF ARABIDOPSIS THALIANA VAR. LANDSBERG CULTURED IN VITRO. *ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA Series Botanica*, 49 (2), 53–59.
- Kawano, K. (2003). Thirty years of cassava breeding for productivity - biological and social factors for success. *Crop Sci*, 43, 1325-1335.
- Loomis, R., & Gerakis, P. (1975). Productivity of agricultural ecosystems. *Cooper J., Photosynthesis and Productivity in Different Enviroments*, 145-172.
- Lux, H., Herrmann, L., & Wetzell, C. (1990). Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules. *Plant Breed*(104), 177-183.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*(15), 473-497.
- Murovec, J., & Bohanec, B. (2011). Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding. *University of Ljubljana, Biotechnical Faculty*, 87-106.
- Nakajima, I., Kobayashi, S., & Nakamura, Y. (2000). Embryogenic callus induction and plant regeneration from unfertilized ovule of "Kyoho" Grape. *J Japan Soc Hort Sci*, 69(2), 186-188.
- Nunekpeku, W., Amoatey, H. M., Oduro, V., Klu, G., Asare, D., & Danso, K. (2013). Study of the reproductive characteristics of nine cassava accessions. *West African Journal of Applied Ecology*, 21(1), 135-146.
- Ochatt, S. (2011). Immature Seeds and Embryos of *Medicago truncatula* Cultured In Vitro. En T. Thorpe, & E. Yeung, *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols* (págs. 39-52). Humana Press.
- Ogburia, M., & Adachi, T. (1996). Histological analysis of embryo-sac formation and detection of meiotic diplospory in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica*(88), 9-16.
- O'Kennedy, M., Stark, H., & Dube, N. (2011). Biolistic-Mediated Transformation Protocols for Maize and Pearl Millet Using Pre-cultured Immature Zygotic Embryos and Embryogenic Tissue. En T. Thorpe, & E. Yeung, *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols* (págs. 343-354). Humana Press.

- Perea, P., Quintero, M., Dedicova, B., Kularatne, J., & Ceballos, H. (2013). Comparative morphology, biology and histology of reproductive development in three lines of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae: Crotonoideae). *AoB PLANTS*(5).
- Prenner, G., & Rudall, P. (Octubre de 2007). Comparative ontogeny of the cyathium in *Euphorbia* (Euphorbiaceae) and its allies: exploring the organ-flower-inflorescence boundary. *Am J Bot*, *94*(10), 1612-1629.
- Rao, P. N., & Sarveswara, D. (1976). Embriology of Cassava. *Proc. Indian natn. Sci. Acad.*(42), 111-116.
- Reiser, L., & Fischer, R. L. (Octubre de 1993). The Ovule and the Embryo Sac. *The Plant Cell*, *5*, 1291-1301.
- Rijven, A. (1952). In vitro studies on the embryo of *Capsella bursa-pastoris*. *Acta Bot Neerl*(1), 157-200.
- Rodriguez-Riaño, O., Francisco, J., Valtuen, A., & Ortega-Olivencia, A. (2006). Megasporogenesis, megagametogenesis and ontogeny of the aril in *Cytisus striatus* and *C. multiflorus* (Leguminosae: Papilionoideae). *Annals of Botany*(98), 777-791.
- San Noeum, L. H. (1976). Haploides d'*Hordeum vulgare* L. par culture in vitro d'ovaries non fecondes. *Ann Amelior Plant*(26), 751-754.
- San Noeum, L., & Gelebart, P. (1986). Production of gynogenic haploids. En I. Vasil, *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. III, págs. 305-322). New York: Academic.
- Sandoval, E. (2005). *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. México D.F.: Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). Abscisic acid: A seed maturation and stress-response hormone. En *Plant Physiology* (Quinta ed., págs. 673-698). Sinauer Associates Inc.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). Auxin: The First Discovered Plant Growth Hormone. En *Plant Physiology* (Quinta ed., págs. 546-582). Sinauer Associates Inc.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). Gibberellins: Regulators of plant height and seed germination. En *Plant Physiology* (Quinta ed., págs. 583-619). Sinauer Associates Inc.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). Mineral Nutrition. En *Plant Physiology* (Quinta ed., págs. 107-130). Sinauer Associates Inc.

- Thathachar, T. (1953). Morphological Studies in the Euphorbiaceae. *XIX*(4).
- Wang, C., Lentini, Z., Tabares, E., Quintero, M., Ceballos, H., Dedicova, B., y otros. (2010). Microsporogenesis and pollen formation in cassava. *Biología Plantarum*(55), 469-478.
- Wedzony, M. (2010). Embryogenesis in Cassava. Cali, Colombia.
- Welsch, R., Arango, J., Bär, C., Salazar, B., Al-Babili, S., Beltrán, J., y otros. (2010). Provitamin A Accumulation in Cassava (*Manihot esculenta*) Roots Driven by a Single Nucleotide Polymorphism in a Phytoene Synthase Gene. *The Plant Cell*, 1-9.
- Weniger, W. (1917). Development of Embryo Sac and Embryo in *Euphorbia preslii* and *E. splendens*. *Botanical Gazette*, 63(4), 266-281.
- West, M., & Harada, J. (1993). Embryogenesis in higher plants: An overview. *The Plant Cell*, 5, 1361-1369.
- Westoby, M., & Rice, B. (1982). Evolution of the seed plants and inclusive fitness of plant tissues. *Evolution*, 36(4), 713-724.
- Yan, H. (2012). *The protocol of cassava embryo rescue*. Cali, Colombia: CIAT.