

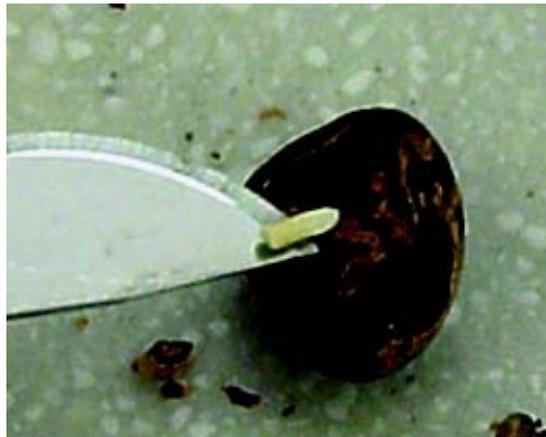
Notas del Director

El programa de Variedades de Cenipalma ha venido desarrollando trabajos en rescate de embriones de materiales de *Elaeis guineensis* tipo Pisífera, Dura y Ténera (seleccionados) como también de *Elaeis oleífera* procedentes del germoplasma, con el objetivo de conservarlos y obtener materiales sanos altamente productivos.

En el presente Ceniavance se da a conocer progresos en la metodología de rescate de embriones, la cual se presenta como una alternativa en la germinación de semillas, minimizando problemas patológicos (bacterias y hongos) en el procedimiento tradicional y favorecer la obtención de materiales promisorios.

PEDRO LEÓN GÓMEZ CUERVO
Director Ejecutivo

Avances en el rescate de embriones en palma de aceite: una herramienta eficiente en material genético de difícil germinación



saría la exploración de nuevas técnicas para facilitar la propagación de materiales útiles en el mejoramiento genético del cultivo.

Por esta razón, el programa de Variedades de Cenipalma ha venido desarrollando trabajos en rescate de embriones de materiales de *Elaeis guineensis* tipo Pisífera, Dura y Ténera (seleccionados) como también de *Elaeis oleífera* procedentes del germoplasma, con el objetivo de conservarlos y sortear algunas de las barreras de autoincompatibilidad, además de rescatar embriones abortivos (embri-

ones con cigotos maduros que no desarrollan normalmente el proceso de germinación y no culminan exitosamente con una nueva plántula) derivados de la hibridación interespecífica de *Elaeis oleífera* con *Elaeis guineensis* para obtener materiales sanos y altamente productivos.

Introducción

El fruto de la palma de aceite está constituido principalmente por el mesocarpio y la nuez. La nuez posee de una a tres almendras, sin embargo la gran mayoría presentan una sola debido al aborto de los otros dos óvulos en el ovario tricarpelar (Hartley, 1983). En la almendra se encuentra el embrión, contenido en el endospermo, del cual se genera la planta.

Dentro de los materiales de palma de aceite se distinguen tres tipos: palmas Dura, Ténera y Pisífera. En los programas de producción de semilla comercial las palmas Dura y Pisífera son usadas como parentales para la producción de híbridos Ténera. La palmas tipo Pisífera, normalmente son infértiles y no producen fruto con semilla, pero las hay fértiles, carecen de cuesco y poseen un embrión desnudo dentro del endospermo con una baja probabilidad de germinación. Existen algunos genotipos de interés Dura y Ténera con baja germinación. Estas limitaciones han hecho nece-

Cultivo de embriones

El desarrollo de técnicas de cultivo de tejidos in vitro ha posibilitado la producción de un mayor porcentaje de progenies con semillas de baja germinabilidad. La técnica consiste en extraer los embriones y sembrarlos en un medio de cultivo bajo condiciones artificiales controladas para favorecer su normal desarrollo. El rescate de embriones está influenciado por varios factores, siendo uno de los más importantes el genotipo de la variedad usada como madre (García et al., 2003; Notsuka et al., 2001).

Hanning (1940) citado por Litz (1991), demostró que es posible remover los embriones de

*Angélica Plata. Bacteriólogo y Microbióloga MSc. Director Laboratorio Cultivo de Tejidos
Leonardo Rey. I. A. Fitomejoramiento MSc. Director División de Variedades GENIPALMA
Iván Ayala Díaz. I. A. Investigador Auxiliar, División de Variedades

cigotos maduros y cultivarlos en un medio estéril que contiene los nutrientes esenciales. En este medio los embriones se pueden desarrollar normalmente. El cultivo de embriones ha sido utilizado en el mejoramiento de diversos cultivos como la cebada, frutales caducifolios de hoja y especies arbóreas, en las cuales se han visto beneficios por el acortamiento de siembra a floración, al obviar la fase de latencia anterior a la germinación.

En el cultivo de la palma de aceite se presentan dificultades en la germinación de algunas semillas, debido bien a una fuerte latencia (reposo que se presenta después de la cosecha) o la baja viabilidad de las semillas dependiendo del material. La latencia en semillas es el estado en el cual una semilla viable no germina aunque se le coloque en condiciones de humedad, temperatura y concentración de oxígeno. (García, 2003). Según Hartley (1983) la fase de latencia es afectado por varios factores como la humedad, la luz, la concentración de gases y de otras sustancias, que en ocasiones pueden ser manipulados para alterar este estado. El cultivo de embriones se presenta como una alternativa para el método de calor seco en el rompimiento de la latencia de las semilla (*guineensis* y *oleiferas*) permitiendo un acortamiento en la fase de germinación y minimizando los problemas patológicos (hongos y bacterias) durante el proceso tradicional, a su vez favorecer la obtención de parentales pisífera promisorios.

Metodología

1. Obtención del material vegetal

Para la palma de aceite *guineensis*, tipo Pisífera, Duras y Téneras los embriones son extraídos de frutos de racimos de cinco meses y medio después de antésis cuando el racimo se encuentra en su madurez fisiológica es decir cuando el desarrollo de la semilla es adecuado para permitir su germinación (Cayón, 1996) (Figura1). De la misma manera, para *oleifera* los embriones son extraídos de semillas promisorias útiles en fitomejoramiento.

La semilla recolectada se identifica por códigos y se limpia retirándole el mesocarpio. Posteriormente se rompe el cuesco (para Ténera y Dura) del cual se extrae la almendra.



Figura 1. Semillas de palma de aceite *Elaeis guineensis* para extracción de embriones.

2. Desinfección

En esta etapa la semilla (almendra) es desinfectada en soluciones de hipoclorito de sodio y alcohol para evitar proliferaciones de hongos y bacterias en la etapa de introducción. Posteriormente, se efectúan

enjuagues sucesivos con agua destilada para eliminar los excesos de estas soluciones (Figura 2).



Figura 2. Semillas de palma desinfectadas

3. Imbibición y extracción de embriones

Se llama imbibición al humedecimiento, absorción de agua de la semilla y ensanchamiento de las estructuras embrionarias, dando inicio a actividades metabólicas como la respiración y la síntesis de proteínas a fin de activar la germinación. Para esta etapa, bajo condiciones asépticas, en la cabina de flujo laminar y con ayuda de un estereoscopio, se procede a disectar las semillas en forma longitudinal para aislar los embriones sin dañarlos.

Los embriones extraídos son clasificados en incompletos, deformes, muertos y sanos. En algunas ocasiones no hay embriones en las semillas. Los embriones sanos se reconocen por una diferenciación clara de plúmula y radícula, siendo la primera de color blanco y la segunda de color crema (Figura 3). Los embriones incompletos son aquellos que alcanzan solo un desarrollo parcial de sus estructuras, debido a endospermos pequeños, o bien incompatibilidades de especie en el caso de los híbridos, entre otros. Los embriones deformes presentan únicamente formación de radícula con ennegrecimiento del tejido de la plúmula. Los embriones muertos se caracterizan por ennegrecimiento total de las estructuras. Estas anomalías pueden llegar a niveles altos dependiendo de la naturaleza genética de la semilla, representando en pisíferas fértiles entre 80 - 90% de los embriones rescatados y en oleíferas puras entre 50 - 90%.



Figura 3. Tipos de embriones extraídos. A) Sano. B) Incompleto. C) Muerto.

4. Prueba de viabilidad

Del total de semilla dispuesta para la extracción de embriones, el 5% es destinado para la prueba de viabilidad con sales de tetrazolio, usando la técnica expuesta por Aguirre (1988). Esta es una prueba bioquímica que consiste en una tinción de los tejidos viables cuando entran en contacto con el tetrazolio, debido a que las enzimas de la deshidrogenasa presentes en las células vivas reducen dicha sustancia a un compuesto rojo insoluble en el agua. Cuando las estructuras de la semilla o el embrión se tiñen de rojo, los materiales se consideran viables y aptos para su introducción en los medios de cultivo. Por el contrario, si no hay reacción al tetrazolio, los tejidos están muertos y se deben descartar.

5. Introducción de embriones

En esta fase el embrión desinfectado es sembrado en tubos de ensayo con medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962), suplementado con vitaminas, una fuente de carbono y un gelificante (Figura 4). Los embriones sembrados son llevados a cuartos de crecimiento con condiciones controladas de humedad relativa, luz y temperatura. Después de 10 días del establecimiento *in vitro*, se evalúa el porcentaje de embriones contaminados.

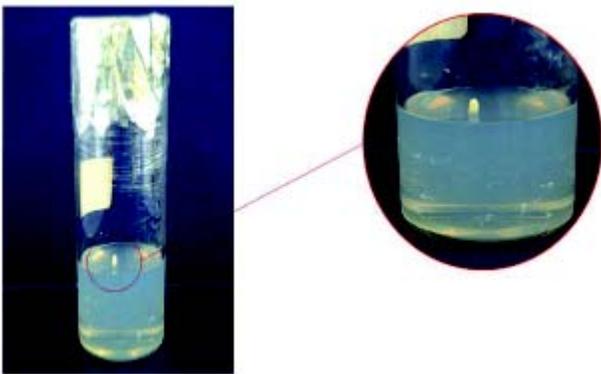


Figura 4. Embrión sembrado en medio de cultivo para rescate de embriones

6. Formación del brote

Aproximadamente a los 30 días después de sembrados los embriones, se presenta un ensanchamiento del embrión, conocido como brote de primer estadio (Figura 5a), del cual se forma una capa verde que evidencia el desarrollo de la plúmula como rudimento inicial de las hojas verdaderas de la palma (Figura 5b).

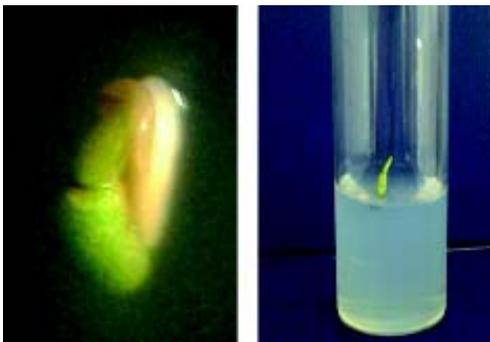


Figura A

Figura B

Figura 5. Formación de brote a. Primer estadio. b. Desarrollo de la plúmula.

7. Formación de la raíz

Al mismo tiempo que se desarrolla la plúmula, en la parte basal del embrión se presenta un engrosamiento y un crecimiento extensivo de la radícula por todo el medio de cultivo, a fin de permitir el anclaje de la planta, las cuales se consideran óptimas para el endurecimiento o adaptación cuando tienen una longitud aproximada de ocho centímetros (Figura 6).



Figura 6. Plántula adecuada para aclimatización.

8. Aclimatización

La aclimatización es la fase más importante del proceso de rescate de embriones y en general de cualquier sistema de micropropagación, dado que en ella se busca que el material cultivado adquiera condiciones fisiológicas y morfológicas adecuadas para su adaptación a campo abierto. Denng y Donnelly (1993), citados por Agramonte, et al., 1998, afirman que cuando las plantas se desarrollan en condiciones controladas *in vitro* presentan tallos delgados, menor cantidad de ceras cuticulares y epicuticulares, reducción de los tejidos mecánicos de soporte, incremento del contenido de agua en las células, baja capacidad fotosintética, estomas de baja funcionalidad y crecimiento heterótrofo o mixótrofo. Estas respuestas fenotípicas son debidas a la influencia del ambiente donde se desarrollan, totalmente aislado de las condiciones adversas presentes a campo abierto. Por tal razón, el éxito de las técnicas de micropropagación dependerá de la eficiencia del proceso de aclimatización *in vitro* a *ex vitro*, donde se garantice un retorno gradual a las características normales propias de cada especie.

En el caso de la palma de aceite se deben tener en cuenta varios aspectos a fin de determinar la forma más eficiente de aclimatar las plantas. Dentro de estos factores se encuentran las condiciones variables de temperatura y humedad relativa de las zonas palmeras, la intensidad lumínica, el tipo de sustrato a utilizar, la aplicación de riegos en esta etapa y las condiciones de las palmas al momento del transplante. En este aspecto, Wong *et al.*, 1995, afirman que las plantas deben iniciar su aclimatación cuando alcancen más de ocho centímetros de altura. Además, recomienda que las palmas sean transplantadas primero a camas de arena con cobertura plástica, para mantener alta la humedad relativa, y dispuestas en una infraestructura adecuada que permita un control inicial de las condiciones de luz. En este ambiente, las plantas se van adaptando mediante la remoción

gradual de las coberturas plásticas y el sombrío, hasta adquirir condiciones óptimas para ser llevadas a previvero (Figura 7).

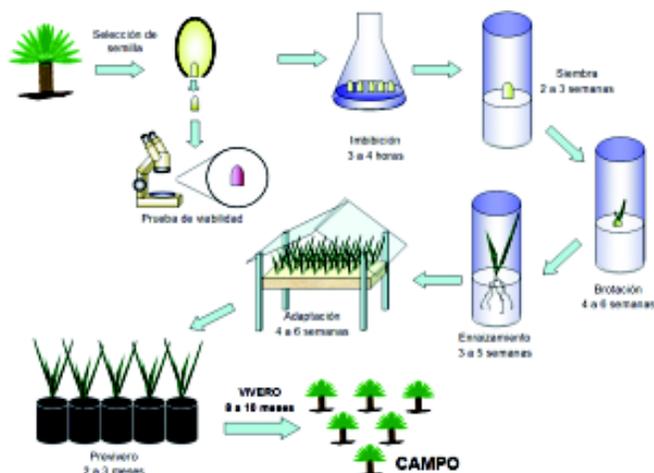


Figura 7. Metodología para el Rescate de Embriones en Palma de Aceite.

Anotaciones finales

El desarrollo de la metodología de rescate de embriones permitirá el fortalecimiento del Programa de Mejoramiento Genético de Cenipalma mediante la obtención de materiales promisorios, de difícil germinación o en peligro de erosión genética. Además se podrán apoyar programas de producción de semilla híbrida de casas comerciales, presentando esta metodología como posible incremento en la cantidad de plántulas generadas debido a la alta demanda que se tienen actualmente estos materiales.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a Colciencias Contrato No. 117 - 2005 y al Fondo de Fomento Palmero administrado por Fedepalma, entidades financiadoras del proyecto. Igualmente, al Dr. Pedro León Gómez y al Dr. José Ignacio Sanz por su voto de confianza para el desarrollo de este trabajo. Al personal técnico especialmente al tecnólogo de campo Juan Hipólito Ramírez por su invaluable colaboración y sugerencias. Al grupo de investigadores del Campo Experimental Palmar de La Vizcaína por su colaboración en el desarrollo de las actividades y al Comité de Publicaciones de Cenipalma por la revisión de este documento.

Bibliografía

Aguirre, Roberto. 1988. Manual para el Beneficio de semillas. CIAT. Anexo 4 p. XI -6,7.

Agramonte et al. 1998. Aclimatización. En: Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Volumen 1. p. 193-205.

Cayón, Daniel. 1996. Aspectos fisiológicos y Bioquímicos de la maduración de los frutos de la palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq. En: Memorias primer curso internacional de palma de aceite. Cenipalma. Bogotá. p. 294 - 300.

Escobar, R; Alvarado, A. 2004. Strategies in production of oil palm compact seeds and clones. ASD Oil Palm Papers (Costa Rica) 27: 1-12

García, E., A. Martínez, E. García de la Calera, L.J. Pérez, J.L. Cenis, and J. Carreño. 2003. In vitro culture of ovules and embryos of grape for the obtention of new seedless table grape cultivars. Acta Hort. 528:663-666.

Hartley, C.W.S. 1983. La palma de aceite. C.E.C.S.A., México, pp: 63 - 109.

Herrera, et al., 1998. Inducción de la germinación en semillas de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) utilizando tratamientos químicos. ASD Oil Palm Papers. N° 18, 1-16.

Krikorian, AD. 2001. Cultivo de Tejidos y células con propósitos prácticos: Una perspectiva de la biología celular y del desarrollo. En: Perea, M. 2001. Biotecnología Agrícola. Un enfoque hacia el mejoramiento de plantas. Asociación colombiana de estudios vegetales in vitro ACEVIV. P. 17 - 27.

Litz, R. E. 1991. Cultivo de embriones y óvulos. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Publicación N° 151 p. 300-338.

Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum. 15:473-497.

Notsuka, K., T. Tsuru, and M. Shiraishi. 2001. Seedless-seedless grape hybridization via in-ovule embryo culture. J. Soc. Hortic. Sci. 70:7-15.

Rey L; Gómez P.L; Ayala I; Delgado W; Rocha, P. 2004. Colecciones genéticas de palma de aceite *Elaeis guineensis* (Jacq.) y *Elaeis oleifera* (H.B.K) de Cenipalma: Características de importancia para el sector palmicultor. Palmas (Colombia) 25 (especial): 39 - 48.

Rocha P.J. 2005. Aportes de la biotecnología al cultivo de la palma de aceite en Pipoc 2005. Palmas (Colombia), 25 (4): 53-59.

Rocha P.J. 2004. Conceptos básicos en biotecnología de la palma de aceite. Palmas (Colombia), 25 (especial): 11-17.

Wong, et al., 1995. Clonación en palma de aceite, técnicas y razones. Revista Palmas. Volumen 26. No. Especial 2005.



Director: **Pedro León Gómez Cuervo**

Revisión de textos: **Comité de Publicaciones de Cenipalma**

Coordinación editorial: **Oficina de Comunicaciones**

Diseño y diagramación: **Briceño Gráfico**

Impresión: **Molher Ltda. Impresores**

Esta publicación contó con el apoyo del Fondo de Fomento Palmero