

Notas del Director

La naturaleza de la investigación del laboratorio de cultivo de tejidos es apoyar, mediante investigación aplicada y el desarrollo de tecnologías de propagación clonal, el programa de mejoramiento y conservación del recurso genético de palma de aceite.

En la actualidad, Cenipalma cuenta con un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, que tiene como objetivo de la generación de clones homogéneos, derivados de materiales élite tipo dura, pisífera y ténera, así como accesiones estratégicas por sus características deseables para la agroindustria.

En este documento se dan a conocer resultados preliminares en la implementación de la metodología de embriogénesis somática en palma de aceite, la cual brindará apoyo al sector palmicultor de Colombia poniendo a disposición de sus agremiados clones de materiales élites de gran valor genético.

PEDRO LEÓN GÓMEZ CUERVO
Director Ejecutivo

Avances en la implementación de la metodología de embriogénesis somática en palma de aceite en el Campo Experimental el Palmar de La Vizcaína*



puras con características deseables, e híbridos interespecíficos entre la palma africana (*E. guineensis*) y la palma americana (*E. oleifera*) e híbridos retrocruzados hacia *guineensis* (O x G) x G en forma masiva y a corto plazo.

Las técnicas *in vitro* han sido desarrolladas, hace varios años en Malasia y Francia, para materiales específicos de palma de aceite. En Colombia, con el apoyo financiero de Colciencias y el fondo de fomento palmero se ha iniciado la transferencia, adaptación e implementación de dichas metodologías con el objeto de apoyar las actividades del programa de

mejoramiento genético de Cenipalma, cuyas actividades están encaminadas hacia la obtención masiva de materiales adaptados a las condiciones ambientales de las cuatro zonas palmeras, además de la búsqueda de resistencia a problemas fitosanitarios y al aumento en extracción de aceite de alta calidad (Rey *et al.*, 2004).

Introducción

La palma de aceite es una especie de importancia económica. Las especies *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera* y su híbrido interespecífico *oleifera x guineensis* son monocotiledóneas con un único punto de crecimiento apical, por lo cual no pueden ser multiplicadas por métodos convencionales de propagación vegetativa.

Además, por presentar un sistema reproductivo de polinización cruzada natural de tipo alógamo, las poblaciones y progenies son genéticamente heterogéneas y heterocigotas para las características de interés, haciendo nula la posibilidad de multiplicar materiales élite uniformes por medio de semillas. Así, la micropropagación se hace altamente necesaria para reproducir y preservar estos materiales genéticos.

La aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* para la propagación vegetativa de la palma de aceite representa un complemento al mejoramiento tradicional. La ventaja está en que se pueden clonar individuos élite independientemente de su origen genético, por ejemplo: variedades parentales (Duras y Pisíferas), materiales promisorios evaluados en pruebas de progenie Dura x Pisífera (Ténera), oleíferas

Material de selección

El comienzo del proceso de clonación solo tiene sentido cuando se emplea un material de partida adecuado. La constitución genética de la planta madre es el primer factor relacionado con la frecuencia de mutaciones resultantes del proceso de propagación (Evans y Bravo, 1985). Por tanto, uno de los cuidados especiales que se debe tener al iniciar el proceso de clonación es la selección del material de siembra, resultado de una correcta selección individual de palmas presentes en una población determinada. El material inicial para el cultivo *in vitro* en palma de aceite, es una planta élite (Palma Madre ortet) seleccionada por características morfoagronómicas de interés (Tabla 1). Para esto se establecen bancos donantes de donde se seleccionan las palmas de las cuales se extraen los explantes a multiplicar. Generalmente se utilizan plantas en estado de crecimiento activo, que muestren un desarrollo vigoroso y sano.

* Angélica Plata. Bacteriólogo y Microbióloga MSc. Director Laboratorio Cultivo de Tejidos
Leonardo Rey. I. A. Fitomejoramiento MSc. Director División de Variedades

Tabla 1. Criterios productivos de selección de palmas madre para clonación por embriogénesis somática.

Criterio de selección	Valor
Producción media de RFF por palma por año	≥ 250 kg
Aceite en racimo (potencial)	≥28%
Aceite por palma (potencial)	≥70 kg
Producción potencial de aceite/hectárea/año	≥ 10 toneladas
Índice de racimo (IR)	> 0,6

Embriogénesis Somática

La embriogénesis somática se caracteriza por la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979). Constituye un proceso de clonación a partir de cualquier tejido de la planta, por ejemplo, segmentos de raíces, secciones de hojas, flores, etc. (Rohani *et al.*, 2000). Las etapas de la clonación por embriogénesis somática inicia desde la inducción de embrioides somáticos, el desarrollo de los embrioides somáticos, proliferación de brotes hasta la conversión y adaptación de plantas Figura 1. Las cuales se describen a continuación como resultados preliminares obtenidos en palma de aceite.

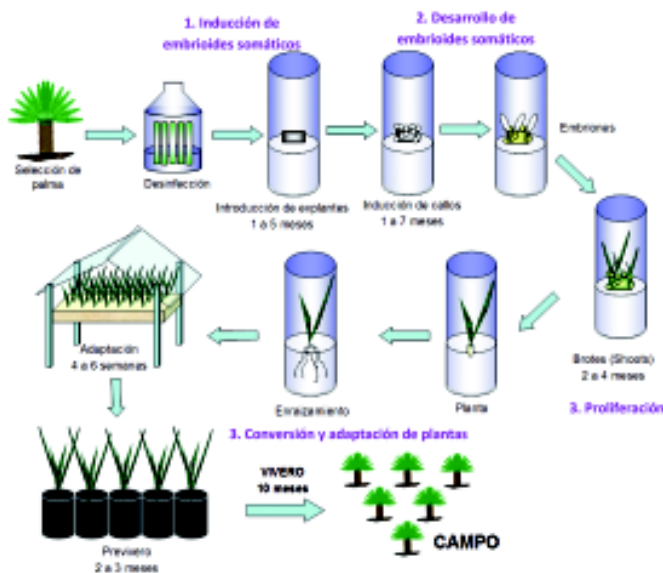


Figura 1.

Inducción de embriones somáticos

La inducción de embriones somáticos se realiza a partir de la selección de la palma madre, extracción del explante, desinfección e inoculación.

Selección de la palma

En palma de aceite, la selección individual de palmas madre (ortet) (Figura 3) dentro del lote elegido se debe realizar teniendo en cuenta: a) aspectos sanitarios

donde las palmas se encuentren libres de plagas y enfermedades b) caracteres vegetativos; lo cual implica que las palmas presenten una conformación homogénea del dosel y el estípite con un crecimiento del tallo de un máximo de 50 cm/año c) aspectos relacionados con la producción mediante un conteo de inflorescencias femeninas y racimos, luego cortes del fruto donde se mide el grosor de la pulpa.



Figura 3. Planta madre ortet.

Extracción del explante

Para la extracción del explante, se usa hojas jóvenes de flechas emergentes como material de iniciación para inducción de callo. Con el fin de evitar el daño a la palma madre, se debe quitar el mínimo posible de hojas; luego se realiza un corte del tallo por encima del meristemo, se desinfecta el material y se envuelve en una bolsa plástica, colocándola en un recipiente para su transporte hacia el laboratorio (Figura 4).

El material cortado es marcado, en la cabina de flujo laminar se separan las hojas inmaduras internas donde son ubicadas en recipientes de plástico para su posterior desinfección (Figura 5).



Figura 4. Material cortado de la palma madre ortet



Figura 5. Hojas inmaduras internas

Desinfección

El material vegetal separado con sus respectivas hojas internas identificadas, son desinfectadas con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tween. Para eliminar los residuos de hipoclorito, se realizan varios enjuagues con agua.

Inoculación

Luego de la desinfección, el tejido vegetal es cortado con escalpelo e introducido en un medio de cultivo semisólido. El explante en el medio de cultivo crece y produce un abultamiento, lo que indica que inicia su etapa de formación de callo (Figura 6).

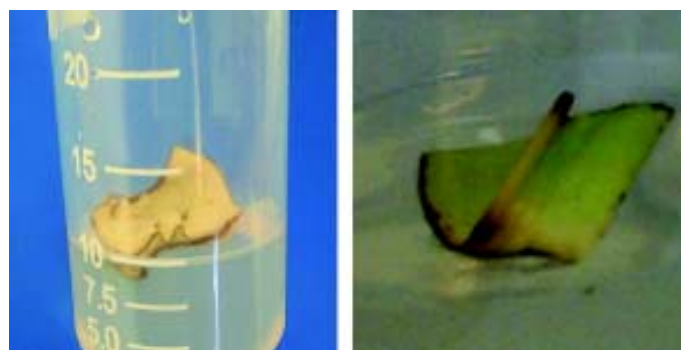


Figura 6. Explante de palma sembrado en medio de cultivo semisólido

Desarrollo de embrioides somáticos

Para el desarrollo de embrioides somáticos se realiza a partir de la inducción del callo y la formación de los embrioides.

Inducción de Callo

Después del primer mes de siembra de los explantes, el material forma estructuras con características embriogénicas de color crema, llamadas callos (Figura 7). Estos resultados confirman que la metodología realizada en el laboratorio de cultivo de tejidos del Campo Experimental Palmar de La Vizcaina ha sido exitosa, puesto que uno de las limitantes en cultivo in vitro es la obtención de callos.

Los callos de palma de aceite se obtuvieron mediante medios semisólidos. Los procedimientos de micropropagación en medio sólido son de alto costo, demoran mucho en obtener resultados y presentan dificultades en la automatización del

proceso lo cual implica que su escalamiento sea poco rentable. Dado lo anterior, el laboratorio de cultivo de tejidos de CENIPALMA va implementar el proceso de inmersión temporal en medio líquido, pues reduce el tiempo del proceso a nueve meses, once menos que el medio sólido (Tabla 2), disminuye los costos variables en un 29% y hace más rentable el proceso de clonación (Figura 2) (Wong, 2003).



Figura 7. Callos de palma de aceite.

Tabla 2. Eficiencia en producción y tiempo para cada estado en la producción de clones.

Estado	Actividad	Porcentaje de éxito	Tiempo (rango)
Inducción de Callos	Explante de hojas	100% palmas (2-58%)	3 a 12 meses de la inoculación
		19% explantes	
Diferenciación de Callos	Formación de callos	84% palmas (0-29%) 4% callos	5 a 15 meses de la inoculación
Proliferación y germinación de embrioides	Formación de embrioides	53% de proliferación de líneas de embrioides	5000 shoots por línea o 18 subcultivos
Inducción de raíces y desarrollo del brote (shoot)	Brote y plántulas	> 85% Brotes	2 - 4 meses



Tiempo total a partir de la diferenciación de callos: 20 meses a 9 meses

Figura 2. Duración de los diferentes estados de propagación en medio sólido y líquido o suspensión para producir 5.000 brotes. (Fuente Wong,G)

Formación de embrioides

Cuando los callos sembrados obtienen su estado de madurez forman los embrioides, estructuras necesarias para la formación de brotes. Los embrioides son de color blanco con estructuras globulares bien definidas lo que confirma el inicio de la diferenciación celular (Figura 8).

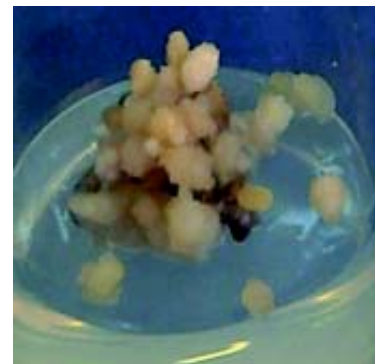


Figura 8. Embrioides de palma de aceite.

Proliferación

Los embrioides formados se subcultivan cada dos meses hasta tener un promedio de 5.000 brotes por cada línea embriogénica. Luego cada uno de los brotes son separados y forman sus propias raíces.

Conversión y adaptación de plantas

Al mismo tiempo que se desarrolla la plúmula, 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, condiciones óptimas para el endurecimiento o adaptación cuando tienen una longitud aproximada de ocho centímetros.

Las palmas son 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 sombrero, hasta adquirir condiciones óptimas para ser llevadas a previvero (Wong et al., 1995).

Anotaciones finales

El porcentaje de éxito de la estandarización de estos procedimientos se incrementa cuando se introducen un mayor número de explantes por palma (2500 explantes por palma) con un aumento en el número de palmas introducidas, para que con los subcultivos que se le realicen a los materiales y las nuevas introducciones se produzcan explantes en cada uno de los estadios antes mencionados. Además, para agilizar estos procedimientos el laboratorio inicia con los sistemas de inmersión temporal en medios líquidos para la producción a gran escala de los explantes con desarrollos uniformes y en las cantidades deseadas. Los resultados obtenidos hasta el momento son exitosos, lo cual genera una gran perspectiva a nivel de la agroindustria de la palma de aceite.

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 proyecto. Al personal técnico especialmente al tecnólogo de campo Juan Hipólito Ramírez por su invaluable colaboración y al comité de publicaciones de Cenipalma por la revisión de este documento.

Bibliografía

Evans, D.A. and Bravo, J.E. 1985. Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants. In: Zimmerman, R.H. et al. (Eds), Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops p. 73-91.

Gómez, R. 1998. Embriogénesis somática. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. P.57- 79

Rey L; Gómez PL; 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. 2007. Biotecnología en el cultivo de la palma de aceite: aspectos sobresalientes en PIPOC 2007. en el CIRAD. Mejoramiento y producción de semilla. Palmas Vol. 28 No. 3, p. 47- 55.

Rohani, O; Sharifah, SA; Mohd Rafii, Y; Ong, M; Tarmizi, I. 2000. Tissue culture of oil palm. Chapter 7. In: Yusof, B; Jalani, BS; Chan, KW. Advances in oil palm research, vol 1. Malaysian Oil Palm Board. Malaysia. 238 - 283.

Staritsky, G. 1970 Tissue culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for its vegetative propagation. Euphytica 19:288-292.

Tarmizi, AH; Norjihhan, MA; Samsul Kamal, R; Zaitun, R; Cheah, SC. 2003. Experiences and lessons from oil palm clonal evaluation trials and commercial test plantings. Proceedings of the PIPOC 2003 International Palm Oil Congress (Agriculture) A7, 1093-1119.

Tisserat, B.; Esan, E. y Murashige, T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. Hort. Rev. 1.p. 1-78.

Wong. G., TAN, C.C., SOH, A.C; Chong, S.P. 1999. Clonal propagation of oil palm through tissue culture. The Planter (Malaysia) 75 (878): 221 - 230.

Wong. G., TAN, C.C., SOH, A.C. 2003. Large scale propagation of oil palm clones - experiences to date. Applied Agricultural Research SDN. BHD. Selangor, Malaysia.

Wong. G., TAN, C.C., SOH, A.C. 2005. Clonación en palma de aceite. Técnicas y razones. Revista Palmas, Volumen 26 Número Especial 2005. p. 57 - 64



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