

Desarrollo de una metodología para la selección temprana de cultivares de *Elaeis guineensis* Jacq., según su respuesta al estrés por déficit hídrico

Arley Caicedo¹, Stephany Guataquirá¹, Cristhian Bayona¹, Alonso Pardo¹, Iván Ayala¹, Rodrigo Ruiz¹, y Hernán Mauricio Romero^{1,2} *¹ Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma, Cenipalma

² Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia

* Autor para correspondencia. E-mail: hromero@cenipalma.org

Notas del Director

Los programas de mejoramiento en palma de aceite se caracterizan por requerir de periodos prolongados de evaluación, los cuales pueden superar los diez años. Es importante considerar que resultados de evaluación en campo de unos pocos años no son suficientes para determinar el comportamiento de un genotipo, debido a las fluctuaciones climáticas entre los años. A esto se suma el tiempo requerido para lograr los cruzamientos a partir de materiales parentales. Siendo así, la obtención de nuevos cultivares y su caracterización es una inversión muy importante, debido en gran parte al ciclo mismo del cultivo.

Cenipalma cuenta actualmente con diversas colecciones biológicas provenientes de diferentes lugares del mundo, entre las cuales se encuentran las de origen africano Camerún y Angola, las cuales se caracterizan por presentar una alta variabilidad genética. Sin embargo, estas deben ser estudiadas y evaluadas por sus características de interés. El centro de investigación, desde hace años, viene trabajando en la evaluación de los genotipos por su respuesta frente a varios tipos de estrés, se está trabajando, entre otros, en la identificación de manera temprana de genotipos con mejor adaptación al estrés hídrico. Así, se puede avanzar en la selección y producción de cultivares genéticos adaptados frente a una condición que cada vez toma más relevancia por las variaciones que se presentan con el clima y que viene afectando la productividad del cultivo.

Este Ceniavances presenta la metodología que constituye una de las herramientas que utiliza Cenipalma para la búsqueda de genotipos promisorios, los cuales serán la línea base para la producción de cultivares con tolerancia al déficit hídrico, que también pueda ser utilizada por los palmicultores cuando lo requieran.

Alexandre Patrick Cooman, PhD.

Director General Cenipalma

Introducción

La disponibilidad hídrica para la agricultura colombiana varía dependiendo de la zona agroecológica del país. Existen zonas con épocas secas marcadas, que ocasionan un fuerte déficit hídrico, por periodos de hasta ocho meses, como es el caso en la Zona Norte (Romero *et al.*, 2007). El déficit hídrico es un factor limitante de la productividad de la palma de aceite (Corley, 1976) y tiene como consecuencia el cierre de estomas (Smith, 1989; Corley y Tinker, 2003), el incremento de la temperatura foliar (Corley, 1976), la reducción de la tasa fotosintética y de transpiración (Smith, 1989), así como la variación en la proporción de inflorescencias masculinas y femeninas (Corley, 1976), entre otras. Todas estas respuestas afectan directamente la fisiología de la palma y perjudican la productividad del cultivo (Mejía, 2000; Romero *et al.*, 2007).

Las alternativas para mitigar el efecto de la baja disponibilidad del recurso hídrico son limitadas, debido a la falta o escasa disponibilidad de agua que se deriva del progresivo deterioro de cuencas hídricas, así como

de un elevado costo para la implementación de sistemas de riego eficientes, en las grandes extensiones del cultivo (Leyva, 2001).

Bajo los escenarios actuales de cambio climático que provocan alteraciones en el régimen pluviométrico, altas temperaturas, mayor brillo solar y baja disponibilidad hídrica del suelo, el mejoramiento genético de la palma de aceite se convierte en una alternativa de manejo duradera, que se encamina a encontrar cultivares con características de tolerancia al estrés hídrico, para mantener u optimizar el rendimiento productivo, en condiciones menos favorables que las óptimas para el cultivo (Rey *et al.*, 2003).

Las metodologías tradicionales de mejoramiento en palma de aceite requieren grandes esfuerzos económicos y de tiempo (años), para la evaluación y producción de materiales que responden adecuadamente a las necesidades locales y regionales de los productores, debido al prolongado ciclo de vida y productivo del cultivo (Corley y Tinker, 2003). Sin embargo, en el presente documento se presenta y describe una metodología desarrollada por Cenipalma que permite reducir los tiempos y costos de evaluación, a través del tamizaje y la selección temprana (etapa de vivero) de cruzamientos promisorios, por su respuesta al déficit hídrico.

Materiales y Métodos

Trabajos realizados por Cenipalma sobre la respuesta ecofisiológica de la palma de aceite al déficit hídrico han mostrado una serie de variables de respuesta, a nivel fisiológico y bioquímico, que permiten discriminar cultivares con diferentes grados de tolerancia a la baja disponibilidad de agua en el suelo (Bayona *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2012). Así, se ha generado una metodología que permite realizar un screening para clasificar cultivares con un alto potencial de tolerancia al déficit hídrico al igual que aquellos que presentan susceptibilidad al mismo estrés. A continuación se describe la metodología que se desarrolló en el Campo Experimental Palmar de La Vizcaína (Santander), y que se utiliza actualmente para evaluar sus colecciones biológicas de palma de aceite por tolerancia al déficit hídrico.

Material vegetal

Semillas sanas y germinadas, en el estado fenológico BBCH 004, (Hormaza *et al.*, 2011) (Figura 1) son puestas en germinadores de arena cubiertos con polisombra



Figura 1. Semillas en estado BBCH 004, plúmula y radícula diferenciadas

(80 %), en los cuales se realiza riego y manejo fitosanitario, para asegurar el crecimiento uniforme de las plántulas, hasta el estado fenológico BBCH 102 (Figura 2), (Forero *et al.*, 2011).

Infraestructura

Se usa una casa de mallas de 4 m de altura, con techo de policarbonato alveolar, filtro UV y pared de mallas de 5 mm de luz. Con estas condiciones se evita que la lluvia afecte la evaluación de los periodos de estrés en



Figura 2. Plántulas en estadio fenológico BBCH 102 establecidas en sustrato de arena, listas para ser usadas en la evaluación de su comportamiento frente a déficit hídrico.

los diferentes materiales y se protejan las plántulas de insectos plaga. Dentro de la casa de mallas se ubican mesas metálicas tubulares, sobre las cuales se disponen contenedores plásticos con capacidad de 20 kg de suelo, en los que se siembra una palma por recipiente.

Adicionalmente, se instala un sistema de riego automatizado con cuatro válvulas solenoides y un controlador para garantizar el suministro de agua por goteo, según el tratamiento aplicado a las plántulas en el screening.

De igual manera se instalan sensores de humedad del suelo SM150 marca Delta-T asociados a un datalogger HH2 de la misma marca, con el fin de controlar y registrar la humedad del suelo en los diferentes tratamientos y así definir los tiempos de riego.

Relación sustrato-suelo y propiedades físicas y químicas de este para el crecimiento de las plántulas

Se utiliza suelo de la región como sustrato para las palmas y se realiza una mezcla 3:1 con arena. Posteriormente se envía una muestra de suelo al Instituto Geográfico Agustín Codazzi para determinar la curva de retención de humedad, textura y densidad aparente, con el fin de reconocer la capacidad de agua en el suelo y definir los niveles de agotamiento de agua, a los cuales serán sometidas las plantas. De la misma manera, se toman muestras de suelos que son enviadas al Laboratorio de Análisis Foliares y de Suelos de Cenipalma para determinar el estado de nutrimentos y corregir los desbalances nutricionales.

Siembra y aplicación de tratamientos en casa de mallas

Se seleccionan plántulas sanas y uniformes en estadio fenológico BBCH 102 provenientes del germinador de arena. Estas se siembran individualmente en contenedores plásticos. Por cada recipiente se coloca un gotero con estacas, para controlar el suministro de agua (Figura 3).

En la primera fase del trabajo se mantienen todas las plántulas a capacidad de campo, con una duración de 30 días, permitiendo una buena adaptación de las palmas a su nueva condición. Posteriormente, las plántulas se someten a dos tratamientos por 30 días más: i) capacidad de campo y ii) -1MPa (déficit hídrico severo).



Figura 3. Superior: Plántulas en evaluación por su respuesta al déficit hídrico en casa de mallas. Inferior: Suministro de agua por goteo, sensor y medidor manual HH2. Los sensores de humedad deben permanecer enterrados.

Con el fin de controlar una tensión hídrica homogénea en el suelo, y basado en los registros de los sensores de humedad y las características del suelo, se calcula la lámina de agua mediante las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1. Lámina de riego a aplicar en cada tratamiento.

$$m = 100 * H * Da (\delta T_r - \delta T_{Lec}) * DPM$$

Dónde:

m Lámina de riego ($m^3 \text{ ha}^{-1}$)

H Profundidad efectiva de raíces (m)

● δT_r Humedad equivalente al potencial hídrico deseado (% vol)

● δT_{Lec} Humedad actual del suelo (% vol)

DPM Porcentaje de agotamiento del agua entre episodios de riego (0,5)

Ecuación 2. Lámina de riego en litros.

$$m_{Litros} = \frac{m_{(m^2\ ha^{-1})} * \phi_{Riego}}{10}$$

Dónde:

m Lámina de agua (L.m-2)

ϕ_{Riego} Área de humedecimiento (m2)

El tiempo de riego se determina a través de la Ecuación 3. Es importante conocer el caudal de los goteros.

Ecuación 3. Tiempo de riego (Tr)

$$Tr_{(min)} = \frac{m_{(l)}}{Q_{Gotos}} * 60$$

Donde:

Tr Tiempo de riego (minutos)

m Lámina de agua (L.m⁻²)

Q_{Gotos} Caudal de los goteros (L h⁻¹)

Medición de variables de respuesta al estrés por déficit hídrico

De acuerdo con los resultados de investigación que ha generado Cenipalma (Bayona *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2012), se determinó que las variables con mejor información, para discriminar cultivares con potencial de tolerancia al déficit hídrico, son: i) Variables asociadas al intercambio de gases, ii) Potencial hídrico de la hoja, iii) Variables bioquímicas (azúcares totales y reductores, actividad enzimática catalasa, actividad enzimática superóxido dismutasa, actividad enzimática glutatión reductasa). En la siguiente sección se describen las variables y la forma de medirlas.

Intercambio de gases

Cuando las plantas se encuentran sometidas a déficit hídrico, responden fisiológicamente con el cierre de estomas, lo que conlleva a una reducción en la transpiración, y por ende a una disminución en la tasa fotosintética (Smith, 1989; Romero *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2012). Para medir los parámetros asociados al intercambio de gases, es decir, cuantificar la tasa de fotosíntesis (A), conductancia estomática (G_s), transpiración (E) y el uso eficiente del agua para la fotosíntesis (UEA_f) se utiliza un medidor de fotosíntesis portátil LI-6400XT (Figura 4) (LICOR Inc. USA), que tiene como fundamento el análisis de gases por infrarrojo. Este equipo permite establecer algunas variables que redundan en información estable y confiable. Por lo tanto, para las mediciones se fijan las siguientes condiciones: i) Concentración de CO_2 de referencia en 400 ppm; ii) Flujo de aire en 170 $\mu\text{mol s}^{-1}$; iii) Radiación fotosintéticamente activa saturante, de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las mediciones de intercambio de gases se realizan a los 30 días de aplicación de los tratamientos y se llevan a cabo entre las 8:00 y las 11:00 a.m., sobre la hoja número +3 de cada plántula.

La relación entre la fotosíntesis y la transpiración puede convertirse en una herramienta útil en la selección de materiales, a través de la determinación del Uso Eficiente del Agua para la fotosíntesis (UEA_f), por cuanto la fijación de gas carbónico se relaciona con el consumo de agua de la planta (Ecuación 4). Este índice es una herramienta de gran utilidad en el manejo de cultivos y en programas de selección de materiales de alta productividad y reducido consumo de agua (Romero *et al.*, 2007).



Figura 4. Medidor de fotosíntesis portátil LI-6400XT en hoja +3.

Ecuación 4. Forma de calcular el Uso Eficiente del Agua (UEA) asociado a fotosíntesis

$$UEA = \frac{\text{Fotosíntesis (mmCO}_2 * m^{-2}s^{-1})}{\text{Transpiración (mmH}_2\text{O} * m^{-2}s^{-1})}$$

Potencial hídrico de la hoja

El potencial hídrico es una característica física que permite explicar la circulación del agua en las plantas y su medición proporciona información del estado hídrico de las mismas. El agua, generalmente se mueve desde la región con mayor potencial a la región con menor potencial hídrico, y tal flujo ocurre hasta que los potenciales hídricos se igualen o alcancen valores de cero (Sánchez y Aguirreolea, 2000). En el interior de la planta el potencial es más elevado en las raíces, disminuyendo en el tallo y observando los valores más bajos en las hojas. Normalmente en las horas de la madrugada o prealba el potencial hídrico de una planta tiende a equilibrarse con el potencial hídrico del suelo (homeostasis hídrica), por tal motivo, si el suelo tiene buena disponibilidad de agua, la planta se estabilizará en un potencial hídrico cercano a cero, y por otro lado, si el suelo tiene bajo contenido de agua, su potencial será más negativo y por lo tanto, la planta se equilibrará en potenciales menores. En consecuencia, conocer el potencial hídrico foliar, tanto en condiciones de sequía como en condiciones de riego adecuado, es una herramienta para determinar la capacidad que pueden tener los cultivares para ajustar dichos valores en condiciones limitantes. Las plantas tienen la capacidad de realizar ajustes en

las variables hídricas para evitar la deshidratación y la pérdida de turgencia (Castro-Diez y Navarro, 2007).

La determinación del potencial hídrico foliar se realiza en la hoja número +3 de las plántulas. Es una medida destructiva, por lo que se debe cortar la hoja de la palma. Las mediciones ocurren en el horario de las 4:00 a las 6:00 a.m., (Rivera *et al.*, 2012). Para su determinación se utiliza el método de la cámara de presión o cámara de Schölander (Soilmoisture Equipment Corp, USA), cuyo fundamento se basa en la aplicación de una presión mediante la inyección de nitrógeno gaseoso a la hoja, la cual se encuentra ubicada en el interior de una recámara que tiene el equipo (Figura 5) y de la cual se expone la punta del peciolo, en donde a medida que se aumenta la presión dentro de la recámara, se observa la aparición de una gota en la superficie del peciolo (Bayona *et al.*, 2007), registrando el valor de presión en el manómetro del equipo con valor negativo.

Variables bioquímicas

El efecto físico más evidente del estrés hídrico en las plantas es la reducción del crecimiento, debido a la disminución de la expansión y presión de turgencia en las células (Sánchez y Aguirreolea, 2000). El metabolismo y la estructura fina celular se alteran al estar sometidos a un déficit hídrico, teniendo un efecto negativo en la síntesis de proteínas, encendido de cadenas de señalización metabólica y un incremento en el contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), que son moléculas con una moderada o eleva-

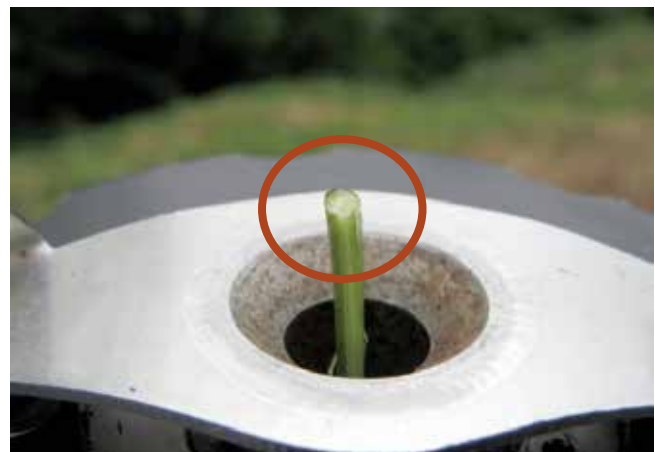


Figura 5. Izquierda: Cámara de Schölander usada para determinar el potencial hídrico foliar. Derecha: Detalle de la parte del peciolo que sobresale de la cámara hermética, en donde se observa la gota de agua, y que indica a través de la lectura en el manómetro, la presión a la cual el agua se mueve al interior de los tejidos.

da reactividad química, que tienen en algunos casos, la capacidad de dañar biomoléculas celulares de la célula (Sweetlove y Moller 2009). Los dos mecanismos de defensa para el control de estas especies reactivas de oxígeno son el sistema no enzimático antioxidante (ácido ascórbico, polifenoles, carotenoides, glutatión, entre otras) y el sistema enzimático antioxidante (catalasa, peroxidasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, entre otras). Estos mecanismos producen especies de oxígeno no reactivas o menos reactivas, regulando la cadena incontrolada de oxidación (Moreno *et al*, 2010). Adicionalmente, las plantas pueden generar un incremento en la concentración de osmolitos compatibles, como prolina y azúcares, logrando generar osmoprotección y disminuyendo el potencial osmótico de la célula (Gómez *et al*, 2010).

Para la cuantificación de las variables bioquímicas en las plántulas bajo tratamiento, se realiza la colecta de la hoja +3 de las plántulas, la cual se envuelve en papel aluminio y se sumerge en nitrógeno líquido para ser preservada y llevada al laboratorio hasta su análisis, en donde son maceradas con nitrógeno líquido para liberar todos los analitos de interés. Del macerado se toman submuestras para los diferentes protocolos de determinación:

1. Azúcares totales y reductores, determinados por los métodos de Dubois *et al*, 1956 y Nelson, 1944 y Somogyi, 1952.
2. Actividad enzimática catalasa determinada mediante el método permanganométrico (Ulrich, 1974).
3. Actividad enzimática superóxidodismutasa se realizó mediante el método de formación de azul de nitrotetrazolio (Eauchamp y Fridovich, 1971).
4. Actividad enzimática glutatión reductasa, mediante Yannarelli *et al*, 2007.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las variables de respuesta, se establece que las características que debe tener un material con tolerancia al déficit hídrico son aquellas que mantienen un buen Uso Eficiente del Agua para la fotosíntesis (UEA_f) tanto en condiciones de estrés hídrico como en capacidad de campo, lo que implica mantener altas tasas fotosintéticas junto con bajas tasas de transpiración. De igual manera, se definen que los materiales tolerantes son aquellos que mantie-

nen potenciales hídricos más cercanos a los del suelo en el momento de la evaluación. Así mismo, un aumento en osmolitos protectantes y mayor actividad enzimática son también indicadores de materiales con capacidad de tolerar el déficit hídrico.

CONCLUSIONES

El mejoramiento genético es una alternativa de manejo frente al déficit hídrico que a través de herramientas de selección temprana, como la metodología presentada en este documento, permite avanzar en menor tiempo que el requerido en los modelos y alternativas tradicionales en la selección y producción de materiales genéticos adaptados

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bayona, C., Ayala, I. y H. Romero. 2007. Relaciones hídricas en ocho materiales de palma de aceite durante época de lluvias, en el Campo Experimental Palmar de La Vizcaína. Ceniavances No 153. 4 p.
- Castro-Diez, P. Navarro, J. 2007. Water relations of seedlings of three *Quercus* species: variations across and within species grown in contrasting light and water regimes. *Tree Physiol* 27. 1011-1018.
- Cenipalma. 2003. Manejo de viveros de palma de aceite. Manual Técnico Primera edición. Bogotá. 74 p.
- Corley R. H. V. 1976. Inflorescence abortion and sex differentiation. En R. H. V. Corley, J. J. Hardon, and B. J. Wood [eds.], *Developments in crop science*, vol. 1, *Oil palm research*, 37–54. Elsevier, Amsterdam, Netherlands
- Corley R, Tinker P. 2003. *The oil palm*. 4th Ed. World Agricultural Series Blackwell Publishers Ltd, Oxford UK.
- Dubois M, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith, 1956 "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". *Anal Chem*. 28:350-356.
- Eauchamp C., Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem*, 44: 276-286.

- Forero, D; Hormanza, P; Romero, H.M. 2011. Phenological growth stages of African oil palm (*Elaeis guineensis*). Annals of Applied Biology, 160: 56 – 65.
- Gómes, F. P., Oliva, M. A., Mielke, M. S., Almeida, A. F., & Aquino, L. A. 2010. Scientia Horticulturae Osmotic adjustment, proline accumulation and cell membrane stability in leaves of *Cocos nucifera* submitted to drought stress. Scientia Horticulturae, 126(3), 379–384.
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi. 2006. Métodos Analíticos del Laboratorio de Suelos. Subdirección de Agrología, Bogotá, Colombia. p. 487-538
- Leyva P. 2001. El medio ambiente en Colombia. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, IDEAM. 2a Edición. Bogotá, pp: 530
- Mejía, J.O. 2000. Consumo de agua por la palma de aceite y efectos del riego sobre la producción de racimos, una revisión de literatura. Revista Palmas, 21 (1): 51-58
- Moreno, L; Crespo, S; Pérez, W; Melgarejo, L. Pruebas bioquímicas como herramientas para estudios en fisiología. Capítulo 10, p. 187248. En: Melgarejo LM, Editor. Experimentos en fisiología vegetal. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia 2010. p. 187205.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. J.Biol. Chem. 153:257-262.
- Rey L., Delgado W., Rocha P. 2003. Colecta y Caracterización del Banco de Germoplasma de *Elaeis oleifera* Cortez. De Cenipalma. Ceniavances 1001. Enero 2003. Cenipalma
- Rivera, Y., Moreno-Chacón, A.L., Bayona, C.J. Romero. H. M., 2012. Physiological response of oil palm interspecific hybrids (*Elaeis oleifera* H.B.K. Cortes versus *Elaeis guineensis* Jacq.) to water deficit. Braz. J. Plant Physiol. 24, 273 – 280.
- Romero, H., Ayala, I. y R. Ruiz. 2007. Ecofisiología de la palma de aceite. Palmas 28(Especial, Tomo I), 176 - 184.
- Sánchez M, Aguirreolea J. 2000. Capítulo 3: Movimientos estomáticos y transpiración. pp. 31-42. En: Azcón-Bieto J. y M. Talon (eds.). Fisiología y bioquímica vegetal. Primera edición. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, 581 p.
- Somogyi M. 1952. Notes of sugar determination, Journal of Biological Chemistry 19-23.
- Smith B. 1989. The Effects of Soil Water and Atmospheric Vapor Pressure Deficit on Stomatal Behavior and Photosynthesis in the Oil Palm. J. Exp. Bot. 40 (215): 647-651.
- Sweetlove, L.J. Moller, I.M. 2009. Chapter 1 Oxidation of Proteins in Plants - Mechanisms and Consequences. En: Advances in Botanical Research. 52. 1-23.
- Ulrich BH. 1974. Method Enzimology. New York. Academic Press pp 109-115.
- Yannarelli G.G., Fernández A., Santa-Cruz D, Tomaro M. 2007. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. Phytochemistry 68, 505-512.

Esta publicación es propiedad del Centro de Investigación en Palma de Aceite, Cenipalma, por tanto, ninguna parte del material ni su contenido, ni ninguna copia del mismo puede ser alterada en forma alguna, transmitida, copiada o distribuida a terceros sin el consentimiento expreso de Cenipalma. Al realizar la presente publicación, Cenipalma ha confiado en la información proveniente de fuentes públicas o fuentes debidamente publicadas. Contiene recomendaciones o sugerencias que profesionalmente resultan adecuadas e idóneas con base en el estado actual de la técnica, los estudios científicos, así como las investigaciones propias adelantadas. A menos que esté expresamente indicado, no se ha utilizado en esta publicación información sujeta a confidencialidad ni información privilegiada o aquella que pueda significar incumplimiento a la legislación sobre derechos de autor. La información contenida en esta publicación es de carácter estrictamente referencial y así debe ser tomada y está ajustada a las normas nacionales de competencia, Código de Ética y Buen Gobierno de la Federación, respetando en todo momento la libre participación de las empresas en el mercado, el bienestar de los consumidores y la eficiencia económica.



Director general: Alexandre Patrick Cooman, Ph.D.
Revisión de textos: Comité de Publicaciones de Cenipalma
Coordinación editorial: Yolanda Moreno Muñoz - Esteban Mantilla
Diagramación: Jenny Angélica Ramírez Jácome
Impresión: Javegraf

Esta publicación contó con el apoyo de Fedepalma y el
Fondo de Fomento Palmero