



Nº 187 Agosto de 2018

Ceniavances



Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite - Cenipalma ISSN 0123-8353

Método para selección temprana de palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq., según su tolerancia a una alta concentración de aluminio

Stephany Guataquira¹, Arley Caicedo¹, Alonso Pardo¹, Iván Ayala¹, Rodrigo Ruiz¹, y Hernán Mauricio Romero^{1,2*}

¹ Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma, Corporación

Centro de Investigación en Palma de Aceite - Cenipalma

² Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia

* Autor para correspondencia. Email: hromero@cenipalma.org

Notas del Director

En Colombia existen diferentes condiciones edafoclimáticas que imponen limitaciones al cultivo de la palma de aceite, tales como el déficit hídrico y la alta saturación de aluminio en el suelo; sumado a enfermedades como la Pudrición del cogollo y la Marchitez letal constituyen los factores que tienen el mayor impacto en el rendimiento y productividad de la palma. Algunos de estos no son de fácil manejo agronómico, por lo cual se hace importante desarrollar nuevos cultivares que tengan mecanismos de resistencia a las enfermedades y que toleren de manera adecuada las limitaciones. Así, Cenipalma desde hace más de 15 años inició investigaciones en el mejoramiento genético de la palma con el objetivo de que en Colombia se puedan producir los materiales genéticos adaptados a las condiciones de las diferentes zonas palmeras del país. Estos trabajos, que iniciaron con colectas de materiales silvestres de África (Angola, Camerún) y diferentes zonas de América, han estado madurando y están en el punto de iniciar activamente la búsqueda de fuentes de resistencia a las condiciones limitantes mencionadas. En este Ceniavances se muestra el desarrollo del método de selección para encontrar genes de tolerancia a la toxicidad de aluminio, en las colecciones de Cenipalma. Este es el primer paso de cara a generar los cultivares que el país necesita para incrementar la productividad y poder desarrollar una palmicultura sostenible. El trabajo ha involucrado

la generación de tecnologías nuevas para la palma de aceite, como la capacidad de crecer las palmas en cultivos en solución, lo cual no solo es fundamental para la selección de los genotipos tolerantes a la toxicidad por aluminio, sino que abre la puerta a otras áreas como la nutrición de las plantas y el uso eficiente de nutrientes.

Alexandre Patrick Cooman, PhD.

Director General Cenipalma

Introducción

La toxicidad por aluminio restringe el crecimiento y productividad de cultivos como el de palma de aceite, esto es particularmente preocupante en Colombia, porque el 85 % de su territorio está afectado por acidez en el suelo con valores de pH inferiores a 5,5 (Arcos y Narro, 2009), incluyendo parte de la tierra apta para el cultivo de palma de aceite, la cual además posee bajos contenidos de fósforo (P), cationes intercambiables (Ca, Mg y K), ciertos micronutrientes y saturación de aluminio mayor o igual al 60 % de la CIC (Casierra et al., 2008; Casierra y Cárdenas, 2009; Corley y Tinker, 2003; Cristancho et al., 2011).

Los genotipos resistentes o altamente tolerantes a las concentraciones elevadas o tóxicas de aluminio en el suelo, producen raíces largas y numerosas en compa-

- ración con aquellos materiales susceptibles al aluminio. De igual manera, los genotipos con alta tolerancia o resistencia, producen ácidos orgánicos capaces de quelar o retener el metal (Cristancho *et al.*, 2001) y los ápices de sus raíces no presentan tinción con hematoxilina o es muy escasa.

Las altas concentraciones de aluminio en el suelo tradicionalmente se han manejado con enmiendas y estrategias agronómicas exigentes en logística, tiempo y dinero (Casierra *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha planteado que el mejoramiento genético es una alternativa de manejo durable frente a este tipo de estrés abiótico en el cultivo de palma de aceite, porque permitiría el uso de cultivares cuyo rendimiento y productividad se mantengan estables, en condiciones menos favorables que las óptimas (Rey *et al.*, 2003), entre ellas, una alta concentración de aluminio en el suelo.

Los métodos tradicionales para el mejoramiento genético en palma de aceite requieren una inversión considerable de tiempo (años) y recursos, Cenipalma ha desarrollado técnicas de evaluación temprana, que se implementan en etapa de previvero y vivero para acortar el proceso de mejoramiento genético y seleccionar cultivares promisorios, según su respuesta a estrés biótico y abiótico. En este documento se describe la metodología desarrollada para la selección temprana de material vegetal de palma de aceite, con desempe-

ño favorable en cultivo hidropónico con solución Hoagland modificada y una alta concentración de aluminio.

Metodología

La selección de materiales genéticos de palma tolerantes a la alta concentración de aluminio se realiza en medio hidropónico, con solución nutritiva Hoagland reducida a la mitad de la concentración original de su fórmula (Rivera *et al.*, 2011) y $150\mu\text{M}$ de Al^{+3} aplicados durante un mes con pH constante de 4.5 en plántulas en etapa de previvero.

La respuesta al estrés causado por altas concentraciones de aluminio se evalúa en las raíces de las plántulas, en las que se determina el contenido de azúcares totales, reductores y ácidos orgánicos, así como la longitud de la raíz primaria más larga y la tinción con hematoxilina en las puntas de las raíces secundarias, con lo cual se determina cualitativamente la presencia o no de aluminio en el tejido. El proceso de evaluación detallado se describe a continuación:

Siembra de material a evaluar

La siembra de semillas germinadas se lleva a cabo en camas de arena, cubiertas con polisombra 60 %, teniendo la precaución de no partir las radículas y orientar la plúmula hacia la superficie correctamente.



Figura 1. Semillas en estado BBCH 005 a 009, con plúmula y radícula diferenciadas.

Infraestructura requerida para la evaluación

Para aplicar la metodología se utilizó una casa de mallas con techo de policarbonato alveolar con filtro UV, paredes de malla 5 mm de luz y suelo de grava fina (Figura 2). En el interior y sobre mesas metálicas,

se disponen contenedores de icopor (capacidad 8 L) cubiertos en el interior con una bolsa plástica negra, que lo mantiene oscuro para las raíces de las plántulas, evita filtración del agua y el crecimiento de algas. Las tapas de cada uno de los contenedores de icopor se adaptan con agujeros para las plántulas del tratamiento (Figura 3).



Figura 2. Vista general exterior e interior de casa de malla usada para evaluación de la respuesta de cultivares de palma de aceite en cultivo hidropónico, a una alta concentración de aluminio.



Figura 3. Adecuación de contenedores de icopor con el interior cubierto con bolsa plástica negra para mantenerlo oscuro y agujeros en la tapa para disponer las plántulas del ensayo.

Medio hidropónico

Es indispensable que el agua para el cultivo hidropónico sea lo más pura posible, por tal motivo usa un filtro desarenador conectado a un sistema de osmosis inversa por el cual circula el agua previo llenado de los contenedores de icopor, en los cuales también

se deben instalar oxigenadores tipo acuario, para garantizar el suministro de oxígeno en cada uno de los contenedores con las plántulas (Figura 4). De usar agua corriente sin tratar, las condiciones para el adecuado desarrollo del método no se podrán mantener y la evaluación para la selección de material no podrá efectuarse.



Figura 4. Plantas en medio hidropónico con suministro continuo de oxígeno, para selección de material por su respuesta al estrés debido a una concentración alta de aluminio en el medio.

Trasplante a medio hidropónico

Una vez las plántulas han alcanzado el estadio fenológico BBCH 102 (Figura 5), caracterizado por el desarrollo de dos hojas lanceoladas simples extendidas (Forero *et al*, 2011), se retiran del semillero de arena, manteniendo su identificación (marca, nombre o código del material) y cuatro de ellas se ubican en cada

contenedor de icopor, en la casa de mallas (Rivera *et al*, 2011).

Las siguientes dos semanas al trasplante, las plántulas se mantienen con el bulbo sumergido en el agua previamente tratada, para facilitar su adaptación. Debe garantizarse que haya cambio semanal del agua tratada y el suministro constante de oxígeno (Figura 4).



Figura 5. Plántulas en estadio fenológico BBCH 102 en semillero de arena, listas para ser usadas en la evaluación de su respuesta al estrés por una concentración alta de aluminio.

Solución Hoagland

A partir de la tercera semana, se aplica solución nutritiva Hoagland número 2 reducida en la mitad de su concentración original, con el fin de simular condiciones de baja disponibilidad de nutrientes.

Esta solución se prepara en tanques externos con capacidad para llenar todos los contenedores de icopor al interior de la casa de mallas, siguiendo la Tabla 1, con la precaución de aplicar separadamente los micronutrientes a partir de una solución madre, a excepción del hierro. Entre tanto, los macronutrientes se aplican individualmente para evitar que precipiten (Rivera *et al.*, 2011). También deben mantenerse las condiciones de pH 4.5 y concentración de nutrientes en el medio de solución, sin alteraciones.

Tabla 1. Composición de solución Hoagland empleada (1/2), comparada con la originalmente propuesta por Hoagland y Arnon.

Fuente	Hoagland (mM)	1/2 Hoagland, (mM)
KNO_3	6	3
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	4	2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2	1
$NH_4H_2(PO_4)$	1	0,5
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,00915	0,00457
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,03500	0,01750
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,00077	0,00038
H_3BO_3	0,00032	0,00016
$H_2MoO_4 \cdot H_2O$	0,04628	0,02314

Exposición de las plántulas a alta concentración de aluminio

Cada material, código o cultivar a evaluar será sometido a los tratamientos 0 y 150 μM de Al^{+3} . Dependiendo de la adaptación y crecimiento de las plántulas, después de una semana de haber puesto las plantas en solución Hoagland (tercera de haber establecido las plantas en cultivo hidropónico), se agrega cloruro de aluminio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en el medio de los contenedores de las plantas, del tratamiento con aluminio, para llevar la solución a una concentración final de 150 μM de Al^{+3} . Posteriormente, a todas las plántulas del ensayo se les ajusta el pH en 4,1 con hidróxido de sodio NaOH 1 % y de ácido clorhídrico HCl 0,05 M y 0,1 M.

El monitoreo y regulación del pH y el suministro de oxígeno debe ser constante durante las cuatro semanas en las que, luego del cambio de agua, se aplica el estímulo del estrés por alta concentración de aluminio a las plantas de este tratamiento, con el objetivo de evitar precipitación de algún elemento de la solución Hoagland, especialmente del hierro.

Variables evaluadas

Las variables de respuesta del material vegetal establecido en medio hidropónico y sometido a las concentraciones: 0 y 150 μM de Al^{+3} durante un mes, son evaluadas en las raíces de las plántulas, en las cuales se cuantifica la liberación de ácidos orgánicos (oxálico, málico y acético), el ajuste osmótico (azúcares reductores), y el crecimiento de la raíz principal más larga, a través de su longitud, así como la acumulación de aluminio en las raíces (tinción con hematoxilina).

Determinaciones bioquímicas

Ácidos orgánicos y azúcares reductores

La producción de ácidos orgánicos es una respuesta de las plantas a través de la cual se pueden quelar metales como el aluminio, para impedir su entrada a la planta o bien, para acumularlo en un solo punto en su interior (Cristancho *et al.*, 2001). Por tanto, altas canti-

dades de estas moléculas en el tejido evaluado indican una respuesta positiva de tolerancia o resistencia al estrés causado por altas concentraciones de aluminio, y es un indicador de fácil medición y cuantificación.

Para las mediciones en laboratorio, se obtienen raíces de las plantas en evaluación, las cuales se maceran con nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C . El macerado se usa para hacer lecturas en el espectrofotómetro con lector de microplacas Synergy Mx BioTek y cromatógrafo LaChrom Merck Hitachi Autosampler L-7200, según el caso.

Azúcares totales

Se determinan sobre 15 mg de tejido macerado con base en la metodología Dubois *et al.* (1956), y el contenido se expresa como mg azúcar/g tejido fresco ($n=3$).

Azúcares reductores

Se toman 15 mg de tejido macerado y se determina por la metodología Nelson (1944)- Somogyi (1952) para azúcares reductores (Moreno *et al.*, 2010). El contenido también se expresa en mg azúcar/g tejido fresco ($n=3$; por triplicado).

Tinción con hematoxilina

La tinción de raíces con hematoxilina permite ubicar componentes ácidos tales como los depósitos de iones metálicos tipo hierro y aluminio, de manera que funciona como un indicador de la presencia del aluminio. La longitud de la tinción es inversamente proporcional a la habilidad del genotipo de excluir el aluminio de la raíz (Tang *et al.*, 2002). Cuando no se excluye (genotipos susceptibles), el aluminio provoca toxicidad, alterando el estado redox y el crecimiento celular en las raíces. Por tanto, cuando se presentan mecanismos de tolerancia frente a las concentraciones tóxicas de aluminio (como la exudación de ácidos orgánicos o el ajuste osmótico por azúcares reductores y totales), el aluminio es excluido o quelado y no hay tinción de las raíces, ello implica que el crecimiento se mantiene y se pueden establecer diferencias en comparación con los genotipos susceptibles sometidos por igual, al tratamiento con aluminio.

Referencias bibliográficas

- Arcos, A., & Narro, L. (2009). Calosa como herramienta de selección para tolerancia del maíz al aluminio. Manual de Laboratorio. CIMMYT. México, D.F. p. 30
- Casierra, F., J. Cárdenas y Roa, H. (2008). Efecto del aluminio sobre la germinación de semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y de maíz (*Zea mays* L.). *Orinoquía* 12(1), 45-56.
- Casierra, F. y J. Cárdenas. (2009). Growth of maize seedlings (*Zea mays* L. var. Porva) in nutrient solution with low (Ca + Mg + K)/Al ratio. *Rev. Udca actual Divulg. Cient.* 12(2), 91-100.
- Corley R. y Tinker, P. (2003). The oil palm. 4th Ed. World Agricultural Series Blackwell Publishers Ltd, Oxford UK.
- Cristancho, J., Mohamed, M., Hanafi, R., Omar, M., Martínez, F., and Campos, C. (2011). Allevation of aluminum in acidic soils and its effect on grow of hybrid and clonal oil palm seedlings. *J. Plant Nut.*, 34, 387-401.
- Forero, D., Hormanza, P., Romero, H.M. (2011). Phenological growth stages of African oil palm (*Elaeis guineensis*). En: Inglaterra Annals Of Applied Biology. Ed: Association of Applied Biologists v.160, 56 – 65.
- Moreno, L., Crespo, S., Pérez, W., Melgarejo, L. (2010). 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.
- Rey L., Delgado W., Rocha P. (2003). Colecta y Caracterización del Banco de Germoplasma de *Elaeis oleifera* Cortes. De Cenipalma. Ceniavances 1001. Enero 2003. Cenipalma
- Rivera Y.D., Camperos J., Moreno L. y Romero H.M. (2011). Implementación de cultivos en solución para la investigación en palma de aceite: Caso de la toxicidad por aluminio. Ceniavances. Cenipalma.
- Tang, Y., D., Garvin, M., Sorrells y Carver, B. (2002). Physiological genetics of aluminum tolerance in the wheat cultivar Atlas 66. *Crop Science*, 42(5): 1541 – 1555.

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: Ximena Díaz Ortiz

Impresión: Javegraf

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