

Aclimatación y endurecimiento de materiales de palma de aceite obtenidos mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales

Acclimatization and Hardening of Oil Palm Materials Obtained by Techniques of Plant Tissue Culture



Autores

Luz Ángela Sánchez Rodríguez

Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma, Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite - Cenipalma

Daniel Saavedra Hortúa

Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma, Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite - Cenipalma

Hernán Mauricio Romero

Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma, Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite - Cenipalma
Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia
hromero@cenipalma.org

Palabras clave

aclimatación, endurecimiento, clones, palma de aceite, *E. guineensis*, previvero.
acclimatization, hardening, clones, oil palm, *E. guineensis*, prenursery.

Recibido: noviembre 16 de 2012
Aprobado: diciembre 4 de 2012

Resumen

El acondicionamiento de plántulas, obtenidas por técnicas de cultivo de tejidos, es una fase transitoria entre el laboratorio y el campo, cuyo objetivo es llevar las plántulas desde un cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro*. Durante esta etapa se produce un retorno gradual al funcionamiento autotrófico, así como la recuperación de las características morfológicas y fisiológicas normales. Cenipalma ha estandarizado la metodología de propagación de la palma de aceite por tejidos vegetales *in vitro*, lo cual abre la posibilidad de entregar a la palmicultura nacional materiales clonales. Sin embargo, uno de los cuellos de botella de la clonación es esta fase de aclimatación y endurecimiento, que puede ser desarrollada por los palmicultores que vayan a sembrar plantas clonales en sus plantaciones. Por lo tanto, en el Campo Experimental Palmar de la Vizcaína - CEPV (Barrancabermeja), se adaptó la metodología para la aclimatación de clones como fase final del proceso de cultivo de tejidos *in vitro*, con el ánimo de, en el futuro, capacitar a los palmicultores interesados en sembrar clones para que puedan llevar a cabo esta aclimatación en sus plantaciones. Se logró obtener porcentajes de aclimatación por encima de 85% en plántulas clasificadas a la salida del laboratorio como tipo 3 (con buena apariencia, buen número de raíces y de hojas, y de tamaño mayor a 10 cm) y tipo 2 (plántulas de apariencia intermedia). De igual forma se obtuvieron valores similares para algunas plántulas que presentaban anomalías tipo AC, Curved Doble, Doble y Triple. Asimismo, el comportamiento en previvero demostró la importancia de la calidad de la raíz para lograr la supervivencia de la planta en esta fase.

Abstract

The conditioning of plantlets obtaining by plant tissue culture techniques is a transitional stage between the laboratory and the field, which objective is to keep the seedlings from an *in vitro* to *ex vitro* conditions. During this stage exists a gradual return to autotrophic functioning and a recovery of normal physiological and morphological characteristics. Cenipalma has standardized a methodology of propagation oil palm by plant tissues culture, which opens the possibility of delivering oil palm clonal materials to the Colombian palm cultivation. However, one of the bottlenecks of the cloning process might be the acclimatization and hardening stages that could be developed for palm growers to have clonal plants in their plantations. Therefore, in the Experimental Field Palmar de la Vizcaina - CEPV (Barrancabermeja) a methodology was adapted for acclimatization of clones as final stage of plant tissue culture propagation, with the future aim of training palm growers interested in planting clones, so they can carry out this acclimatization on their plantations. In this experiment we managed to obtain percentages of acclimatization over 85% in the seedlings classified as type 3 laboratory (good looking, good number of roots and leaves, and larger than 10 cm) and type 2 (intermediate appearance seedlings). Likewise, similar values were obtained for some type seedlings showed abnormalities AC, Curved Double, Double and Triple. Also, the behavior in pre-nursery demonstrated the importance of the quality of the root for the survival of the plant in this stage.

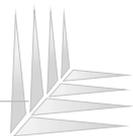


Introducción

El acondicionamiento de plántulas obtenidas por técnicas de cultivo de tejidos, es una fase transitoria entre el laboratorio y el campo, cuyo objetivo es llevar las plántulas desde un cultivo *in vitro* a condiciones ambientales. La aclimatación del material vegetal es una etapa fundamental en un sistema de micropropagación porque de esto depende la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro* (Agramonte, *et al.*, 1998). La aclimatación de estas plántulas depende fundamentalmente de las características fisiológicas, estructurales y anatómicas que presentan, producto del desarrollo *in vitro*, ya que han crecido en frascos bajo luces artificiales, un medio de cultivo nutritivo, elevada humedad relativa, bajo intercambio gaseoso y una pequeña variación de temperatura en un rango considerado óptimo para el cultivo (Preece & Sutter, 1991; Teixeira *et al.*, 1995), por tanto, su morfología y fisiología difiere de las plántulas provenientes de semilla, debido a que no

tienen almendra como reserva de nutrientes, producen menos cera en la superficie externa de las hojas, usualmente no cierran estomas, sus raíces no funcionan correctamente, lo que hace que sea un material muy frágil y de extrema sensibilidad a la deshidratación (Tan *et al.*, 1999). Es por esto que no se deben exponer directamente a los rayos de sol, temperaturas altas o, en su defecto, plantar directamente en campo, porque las plántulas pueden morir por pérdida excesiva de agua por transpiración.

La aclimatación permite que la planta alcance un crecimiento en ambientes de menor humedad relativa, con más luz y sustratos sépticos (Preece y Sutter, 1991). Durante esta etapa se produce un retorno gradual al funcionamiento autotrófico, así como la recuperación de las características morfológicas y fisiológicas normales. Asimismo, las plántulas sufren un estrés provocado por el cambio de las condiciones de humedad y temperatura, por lo que la transferencia debe realizarse de forma gradual (Sotolongo, 2000).



Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es estandarizar la metodología para el endurecimiento y aclimatación de plántulas obtenidas por técnicas *in vitro* bajo las condiciones del Campo Experimental Palmar de la Vizcaína.

Materiales y métodos

El trabajo se llevó a cabo en el municipio de Barrancabermeja (Santander), en el Campo Experimental Palmar de la Vizcaína (CEPV)

donde se encuentra el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de Cenipalma. Las condiciones ambientales de la zona son: temperatura máxima promedio de 32°C y mínima promedio de 22°C, con precipitación acumulada para el año de evaluación de 3.869 mm y humedad relativa de 80%. Para el desarrollo del proceso de aclimatación, se construyó una casa de mallas con una capacidad para 80.000 plántulas al año, como lo muestra la Figura 1.



Figura 1. Casa de mallas para aclimatación y endurecimiento de clones en el CEPV.

Para obtener agua de calidad aceptable, de una manera eficiente y económica, la casa de mallas cuenta con un sistema de recolección y almacenamiento de 6.000 l de agua lluvia la cual abasteció el riego por nebulización.

Las observaciones se realizaron sobre 1.461 plántulas de material *E. guineensis* distribuidas en seis grupos de siembra de acuerdo con el orden, cantidad y fecha de salida del Laboratorio de Cultivo de Tejidos (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de las plántulas evaluadas de acuerdo con el grupo de siembra.

Grupo	Fecha de siembra	Número de plántulas
1	05 mayo 2011	293
2	08 junio 2011	162
3	02 agosto 2011	239
4	23 agosto 2011	231
5	05 octubre 2011	240
6	17 noviembre 2011	296
Total		1.461

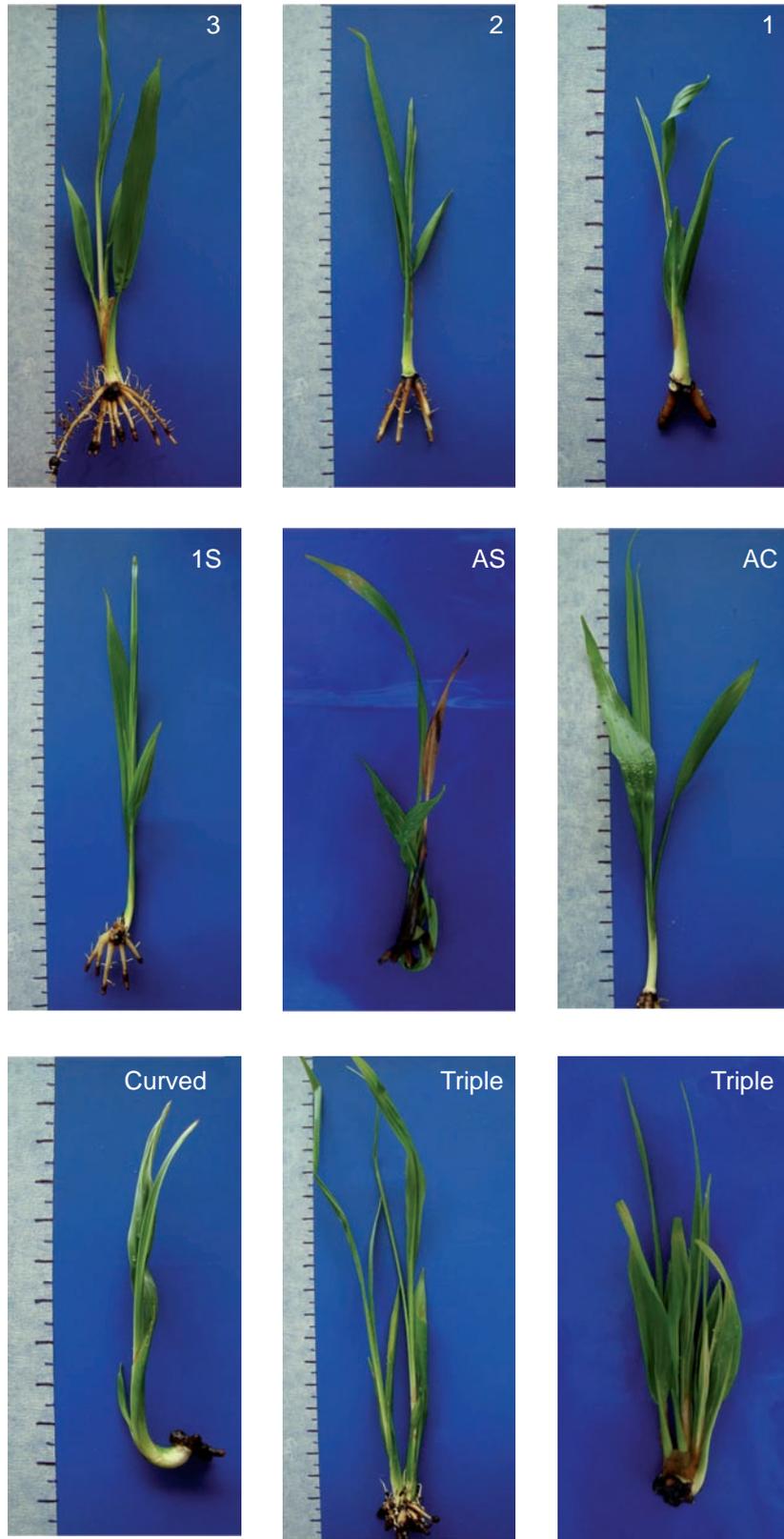
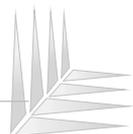


Figura 2. Clasificación de las plántulas provenientes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos.



El proceso de aclimatación se fue ajustando a lo largo de las observaciones, de acuerdo con los problemas detectados y su inmediata corrección, con el fin de estandarizar la metodología que se describe a continuación:

1. Clasificación de plántulas

Al sacar las plántulas del laboratorio se lavaron delicadamente removiendo los residuos del medio de cultivo, con tres enjuagues de agua destilada. Luego, se clasificaron de acuerdo con su estado foliar y radical (Tabla 2 y Figura 2).

Tabla 2. Clasificación de las plántulas provenientes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

Clasificación	Descripción
3	Plántulas con buena apariencia, buen número de raíces y de hojas, y de tamaño mayor a 10 cm.
2	Plántulas de apariencia intermedia.
1	Plántulas con un pobre desarrollo radicular, pocas hojas y de tamaño pequeño.
1s	Plántulas con raíces en forma de estrella.
AC	Plántulas con una o más hojas corrugadas.
AS	Plantas que comienzan a crecer por las heridas causadas en la base al momento de un subcultivo a medio de enraizamiento.
Curved	Plántulas con el tallo curvo.
Double	Dos plántulas unidas.
Triple	Tres plántulas unidas.

Además, las plantas se dividieron según parámetros de producción dentro del laboratorio (la línea embrionaria y número de subcultivo), para realizar un seguimiento y evaluar el desempeño de los clones a través del proceso.

2. Preparación del sustrato

Se utilizó un sustrato a base de la mezcla de fibra de coco y arena en proporción 1:1. Se garantizó el uso de arena fina y limpia, al igual que la fibra de coco tuviera pH de ± 7 . Antes de sembrar las plántulas, se aplicó una solución fungicida a base del ingrediente activo Benomyl o Mancozeb y se dejó reposar el sustrato uno o dos días. Además, para evitar la rápida diseminación de alguna enfermedad se utilizaron bandejas de plástico con espacios individuales, tipo germinador, de modo que cada plántula quedara en una cavidad (Figura 3).



Figura 3. Bandejas plásticas tipo semillero de 24 y 40 conos para la siembra de las plántulas.

3. Trasplante de plántulas a las cámaras de acondicionamiento

Los clones provenientes del laboratorio se transportaron hacia la casa de mallas empacados en bolsas plásticas con un poco de agua para impedir la deshidratación, de allí se sacaron cui-

dadosamente para evitar mezclas de material de los diferentes códigos. Para la siembra, se abrió un hoyo en el sustrato a una profundidad suficiente para cubrir las raíces y el ancho de cada plántula. Luego se compactó el sustrato alrededor de la base del brote para anclarla y evitar el

volcamiento. Finalmente, se regaron las plántulas con una solución fungicida a base del ingrediente activo Metalaxil, Mancozeb o Benomyl en dosis de 1g/L y se llevaron a las cámaras de plástico donde se cerraron las cortinas para crear un ambiente húmedo (Figura 4).



Figura 4. Cámara de alta humedad con las cortinas totalmente cerradas.

4. Condiciones ambientales de las cámaras

El periodo más crítico en el endurecimiento y aclimatación de las plántulas se presentó en los primeros quince días después de la siembra, cuando se determinó un gran porcentaje del éxito. Para esto se recomienda mantener una humedad relativa entre 90%-100% y temperatura menor a 30°C. Adicionalmente, el agua debe provenir de una fuente confiable, que no tenga sustancias tóxicas para las plantas. Para cumplir con estos requisitos se monitoreó la temperatura y la humedad relativa de las cámaras húmedas con un sensor marca WatchDog modelo 100, para establecer

el tiempo de riego adecuado. Con los datos obtenidos, se ajustó el riego por nebulización a 1 minuto cada hora dentro de las casas de plástico y 5 minutos en la parte externa, funcionando desde las 7 a.m. hasta las 7 p.m. para lograr bajar la temperatura a $\pm 31^{\circ}\text{C}$ y mantener una humedad relativa de 100%, en este periodo de tiempo. Sin embargo, luego de la calibración del riego, se continuó monitoreando dichas variables diariamente.

Después de dos semanas, las cortinas de plástico se enrollaron hasta la mitad para reducir la humedad en la cámara plástica y, progresivamente, lograr la adaptación de las plántulas a la humedad del ambiente, luego de dos semanas más, se enrollaron totalmente (Figura 5).

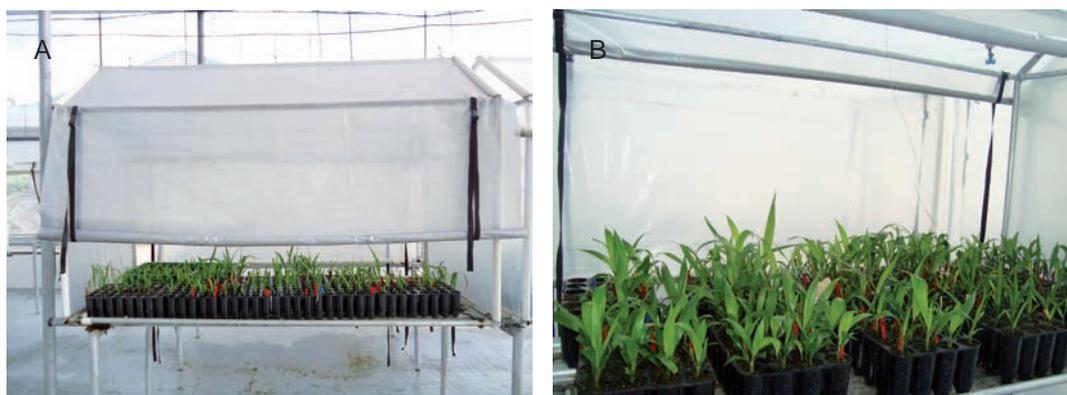
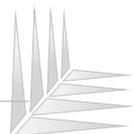


Figura 5. A) Cámara de alta humedad con las cortinas plásticas a la mitad, luego de dos semanas. B) Cámara de alta humedad con las cortinas plásticas totalmente abiertas, luego de cuatro semanas.

A la tercera semana se inició la fertilización foliar con productos de nutrición completa (elementos mayores y menores, pero sin hormonas) en presentaciones líquida o granulada, acompañados de un coadyuvante. En este

caso, se utilizaron los fertilizantes foliares Fertitec®, líquido, y AbocolPhormula 20-30-10®, granulado. A medida que avanzaron las semanas, fue aumentando la dosis de fertilizante como se describe en la Tabla 3.

Tabla 3. Dosificación de la fertilización durante el proceso de aclimatación.

Semanas después de siembra	Intensidad (veces por semana)	Dosis	
		Líquido	Granulado
3 y 4	2	2 mL/L	1 g/L
5 y 6	3	4mL/Lit	3 g/L
7 y 8	3	5mL/L	4 g/L
9 en adelante	3	6mL/L	5 g/L

Adicionalmente, cada semana se realizaron aplicaciones de fungicidas a base de los ingredientes activos Mancozeb, Metalaxil y Fosetil Aluminio, en dosis de 1 g/L en forma alternada, para prevenir la presencia de patógenos.

De seis o siete semanas después de la siembra, las plántulas se ubicaron en la parte externa de las cámaras de plástico, donde se regaron una vez al día (Figura 6).



Figura 6. Plántulas en la parte externa de las cámaras de plástico.

5. Trasplante a previvero

Transcurridos tres meses después de la siembra, las plántulas se trasplantaron a previvero, donde se realizó una nueva clasificación de acuerdo con el estado foliar y la cantidad de raíces, para seleccionar el material que continuaría a la próxima fase según las siguientes características:

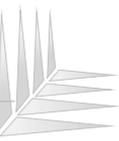
- **A:** plantas con 3-4 hojas nuevas y sin ninguna señal de enfermedad o daño por insectos y raíz abundante. Del total de raíces, más de 50% son raíces nuevas (es decir, emitidas después de la siembra inicial) y ha emitido al menos una raíz principal nuevamente (Figura 7).
- **B:** raíz en buen estado y de tamaño intermedio, entre 25% y 50% de raíces son nuevas (Figura 8).



Figura 7. Plántulas tipo A, listas para pasar a previvero.



Figura 8. Plántulas tipo B, listas para pasar a previvero.



- **C:** plántulas con pocas raíces y menos de 25% son raíces nuevas. Estas plantas se descartaron porque tenían un crecimiento deficiente (brotes dormantes que no elongaron

y no desarrollaron raíces), anormales (presencia de una inflorescencia terminal, hojas retorcidas y truncadas) o presencia severa de enfermedades (Figura 9).



Figura 9. Plántulas tipo C, descartadas para la siembra a vivero.

El trasplante se realizó en bolsas plásticas con una mezcla de suelo y arena en proporción 1:1. Se usó un suelo liviano, sin compactación y con bajos contenidos de materia orgánica. El trasplante se realizó cuidadosamente para no confundir los códigos, marcando con una

paletilla plástica y marcador indeleble el código correspondiente a cada una. Las palmas se cubrieron con una capa doble de polisombra, según las condiciones de viento, radiación solar o temperatura, para evitar quemaduras o estrés (Figura 10).



Figura 10. Plantas trasplantadas a la fase de vivero.

El riego se realizó una vez al día durante los siguientes tres meses. A su vez, se inició la fertilización quincenal con 1 g por plántula de un fertilizante compuesto o aplicaciones de un fertilizante foliar en dosis de 5 ml/l.

Transcurridos tres meses se realizó una nueva selección de plantas en estado óptimo para ser trasplantadas a la fase de vivero, y a partir de allí se siguió un manejo tradicional.

Finalmente, se evaluó el porcentaje de plántulas aclimatadas en las dos primeras fases (aclimatación y previvero) de acuerdo con el grupo de siembra y la clasificación inicial de las mismas.

Resultados y discusión

La clasificación inicial de las plántulas después de salir del laboratorio resultó ser un factor importante para el éxito del proceso. Esta clasificación determinó la calidad requerida de las plántulas, que luego iniciarían el proceso de aclimatación, y permitió seleccionar cuidadosamente las que fueron llevadas a la fase de previvero. En la Tabla 4 se muestra el número de plántulas obtenidas de acuerdo con la clasificación. Allí se observa que la mayor proporción corresponde a plantas clasificadas como tipos 3 y 2 que representan 54% del total de plántulas. Las de tipo 1 corresponden a 19% del total de plántulas y el 26% restante se distribuye entre los tipos 1s, AC, AS, Curved, CurvedDouble, Double y Triple, los cuales representan algunos tipos de anomalías que se pueden presentar en la etapa de laboratorio.

Tabla 4. Número de plántulas obtenido de acuerdo con la clasificación inicial de las mismas.

Clasificación	N. plántulas
3	412
2	382
1	282
1s	128
AC	119
AS	54

Clasificación	N. plántulas
Curved	36
CurvedDouble	10
Double	35
Triple	3
Total	1.461

Los resultados de las observaciones realizadas (Figura 11) muestran que las plántulas tipo 3 y 2 presentaron tasas de aclimatación en los seis grupos, por encima de 85%, a diferencia de las plántulas tipo 1 con un porcentaje de 56%. Por otro lado, en cuanto a los tipos de anomalías, se puede observar que las que alcanzan un mejor desarrollo son las de tipo AC, Curved Doble, Doble y Triple con valores por encima de 80%. En contraste, las plántulas tipo 1s, AS y Curved presentan valores bajos, tal vez, debido a los problemas morfológicos que manifiestan, los cuales no permitieron la supervivencia de la planta a lo largo del proceso. Las líneas de desviación estándar indican la alta variabilidad del comportamiento de las plántulas tipo 1, 1s AS y Curved, siendo estas las que presentaron los valores más bajos de aclimatación. En cuanto a las plantas tipo Curved-doble y triple, el comportamiento fue muy homogéneo y por ello la desviación estándar fue muy baja.

En un trabajo desarrollado por Martínez *et al.*, (2005), aclimataron plantas obtenidas *in vitro* de *Eucalyptusgrandis* y *Eucalyptusurophylla*, donde se alcanzaron porcentajes de supervivencia de 75% y 85%, respectivamente, luego de estandarizar la metodología para tales especies. Los resultados publicados en trabajos con palma de aceite reportan tasas de aclimatación en palma de aceite muy pobres inicialmente pero, a medida que han refinado la técnica, han logrado tasas con alrededor de 90% de supervivencia (Tan *et al.*, 1999). Lo que indica que la metodología aplicada y la clasificación adecuada del material, permitió obtener porcentajes de aclimatación aceptables.

En general, el proceso de endurecimiento y aclimatación tuvo una duración total de tres

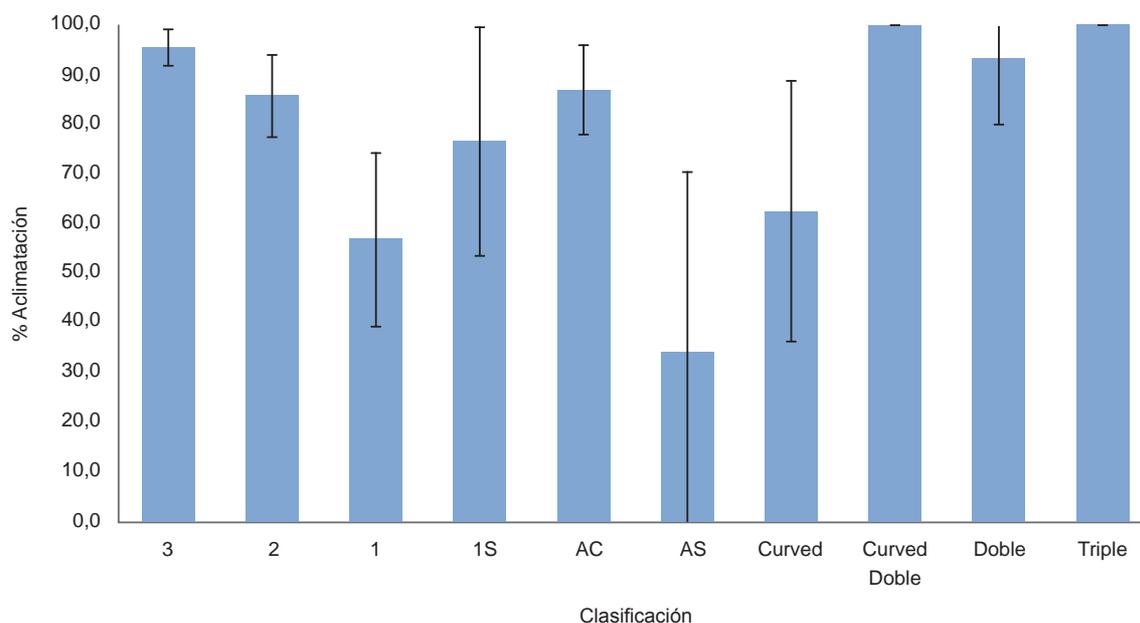
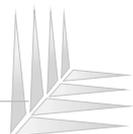


Figura 11. Porcentaje de supervivencia de plantas en periodo de aclimatación, según la clasificación inicial de las plántulas.

meses aproximadamente, hasta obtener material vegetal con un desarrollo adecuado para tolerar las condiciones de previvero. Después de esto, las plántulas se volvieron a clasificar de acuerdo con el estado foliar y radicular, para ser trasplantadas a la bolsa de previvero. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Cantidad de plántulas obtenidas para el trasplante a previvero y el porcentaje de supervivencia correspondiente.

Rank	N. plantas	% supervivencia
A	672	98,1
B	376	89,4
C	97	68,0
Total	1.145	85,1

De allí se puede deducir que las plantas tipos A y B manifiestan los mejores porcentajes de supervivencia en la etapa de previvero. Con lo que se concluye la importancia de la cantidad y calidad de la raíz para lograr una buena supervivencia de la planta en esta fase.

Conclusiones

En la etapa de aclimatación es fundamental que las plántulas sean de buena calidad, porque de ello depende el porcentaje de supervivencia. Para esto se deben seleccionar las plántulas salidas de laboratorio que presenten un buen desarrollo foliar y radicular.

La metodología utilizada fue adecuada para obtener valores aceptables, pero se puede seguir trabajando en ella para alcanzar valores de aclimatación por encima de 95%.

La selección de plantas resultó ser importante en la fase de previvero debido a que plántulas que tenían un buen desarrollo foliar y radicular, presentaron tasas de supervivencia más altas.

Agradecimientos

Este proyecto fue cofinanciado por el Fondo de Fomento Palmero (FFP) administrado por Fedepalma y por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias. Agradecemos la asesoría de la Dra. Girlie Wong para el desarrollo de todos los procedimientos.

Bibliografía

- Agramonte Peñalver, D; Jiménez Terry, F.; Dita Rodríguez, M.A. 1998. Aclimatización. En: Pérez Ponce, J. N.(Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Sta. Clara,Villa Clara. Cuba, pp.193-206.
- ABAD, M. 1989. Los sustratos en horticultura ornamental. Revista Agrícola Vergel 3:146-152.
- Martinez, R., Azpíroz, H., Rodriguez, J.L., Cetina, V. Y Gutierrez, M.A. 2005. Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* de *Eucalyptusurophylla* S.T. Blake y *Eucalyptusgrandis* Hill Ex Maiden. Revista Ra Ximhai, Vol. 1, Número 003. Universidad Autónoma Indígena de México. Pp. 591-597
- Preece, J.E. Y Sutter, E.G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field. In: Debergh, P.C.; Zimmerman, R.H.(Eds.). Micropropagation: Technology and Application. Kluwer Academic. Dordrecht,pp. 71-93.
- Sotolongo, R.S. 2000. Micropropagación de *Psidiumsalutare* (HBK) Berg. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en ciencias forestales. Universidad de Pinar del Río. Facultad de Agronomía y Forestal. Pinar del Río. p. 75.
- Tan, C.C., Wong, G. And Soh, A.C. 1999. Acclimatization and Handling of Oil Palm Tissue Cultured Plantlets for Large Scale Commercial Production. In: Proceedings of the 1999 PORIM International Palm Oil Congress (Agriculture). pp 559-565
- Teixeira, J.B., Lemos, J.I. Y Coelhe, M.C. 1995. Micropropagação de espécies leñosas da mata atlântica. In: Congreso brasileiro de Fisiologia Vegetal, 5. Editorial Lavras. Anais. 132 p.