

# Avances en la producción de clones de palma de aceite mediante proliferación de callo embriogénico en suspensiones líquidas

Developments in Oil Palm Clones Production through Embryogenic Callus Proliferation in Liquid Suspensions

## Autores

### Daniel Saavedra Hortúa

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

### Luz Ángela Sánchez Rodríguez

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

Micropropagación in vitro, palma  
de aceite, callo embriogénico,  
suspensiones líquidas  
Micropropagation, in vitro, oil palm,  
embryogenic callus, liquid suspensions

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

## Resumen

La producción de clones en palma de aceite mediante técnicas de cultivo *in vitro* es una herramienta importante para la palmicultura debido a que, en la actualidad, es la única manera de obtener individuos genéticamente uniformes. Métodos para propagar palma de aceite *in vitro* y obtener clones utilizando únicamente un sistema de propagación con medio semisólido demandan una labor extensiva y la producción de clones de un mismo *ortets* asincrónica. En el laboratorio de cultivo de tejidos de Cenipalma se está trabajando en el desarrollo de una técnica que permita obtener un mayor número de clones de un mismo *ortet*, en menor tiempo y de manera sincrónica. Se han evaluado 12 *ortets* de diferentes orígenes (Dura, Pisífera, Tenera e Híbrido interespecífico OxG). Se observó la conversión del callo embriogénico en embriones somáticos los cuales germinaron y desarrollaron plántulas. La obtención de clones mediante proliferación de callo embriogénico en suspensiones líquidas es una técnica que permite producir clones de manera sincronizada y demanda menos labor.



## Abstract

Oil palm clones production by plant culture techniques is an important tool for oil palm cultivation, since nowadays it is the only way to obtain uniform genetic individuals. Methods for propagating oil palm and producing clones with only a semisolid medium *in vitro* system demands extensive work, furthermore the clones production from the same *ortet* is asynchronous. Cenipalma plant tissue culture lab is working on developing a technique to obtain a larger number of clones from a single *ortet* in less time and in a synchronous way. It has been evaluated 12 *ortets* of different origins (Dura, Pisifera, Tenera and interspecific hybrid OxG). Conversion from embryogenic callus to somatic embryos, germination of the somatic embryos and their development to plantlets was observed. Obtaining clones by embryogenic callus proliferation in liquid suspensions is a technique that enables synchronized clones production and less labor demand.



## Introducción

Los métodos convencionales de mejoramiento y producción de semillas de palma de aceite demandan mucho tiempo y las plantas producidas son muy heterogéneas. La clonación por cultivo de tejidos se convierte en una herramienta importante para lograr la propagación de material genéticamente uniforme. Mediante la propagación clonal se puede obtener un gran número de palmas con características superiores de interés agronómico, que se refleja en posibles aumentos del rendimiento; además, la uniformidad resultante puede simplificar el manejo de la cosecha y de otros aspectos (Rohani *et al.*, 2002).

La palma de aceite al ser monocotiledónea y un cultivo perenne fue considerada una especie recalcitrante para la propagación *in vitro*. Las técnicas *in vitro* en palma de aceite fueron desarrolladas entre los años sesenta y setenta por grupos ingleses, franceses y sus aliados malasios; sin embargo, muchos laboratorios tuvieron que suspender la producción cuando un número excesivo de plantas presentaron anomalías tipo *mantled fruit* (frutos partenocárpico con más de tres carpelos estériles).

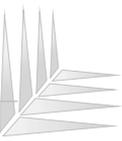
Algunos laboratorios persistieron y a finales de los noventa se pudo establecer un procedimiento de propagación en palma de aceite por métodos de cultivo en medios gelificado y líquido (Soh *et al.*, 2011). La producción de clones de palma de

aceite a nivel mundial en 2010 alcanzó 3.5 millones de *ramets* (plantas producidas por el proceso de clonación) por año, el principal productor es Malasia; sin embargo, esta cifra tiende a aumentar debido a la alta demanda que tiene el material clonal en la palmicultura (Kushairi *et al.*, 2010). Aunque se pueden presentar variaciones dependiendo de la metodología, el proceso de propagación en medio semisólido de palma de aceite comprende las siguientes fases:

1. Inoculación de explantes
2. Inducción y desarrollo de callo
3. Embriogénesis
4. Proliferación de embrioides
5. Desarrollo de brotes caulinares
6. Enraizamiento
7. Endurecimiento de explantes (Corley & Thinker 2009)

La proliferación de embrioides demanda una labor extensiva durante el subcultivo, especialmente debido a que la germinación de algunos embriones ocurre al mismo tiempo que otros van proliferando, siendo necesario separarlos para continuar con la proliferación, además, requiere de un mayor número de subcultivos, frascos y la producción de las plántulas es asincrónica (Wong *et al.*, 1999).

Diferentes grupos de investigación han desarrollado metodologías alternas para la producción de clones a través de la propagación de callo em-



biogénico usando cultivos en suspensión líquida. Touchet *et al.*, en 1991 reportaron los primeros cultivos en suspensión líquida derivados de callo provenientes de tejidos de foliolos sin embargo, la producción de clones fue baja. Duval *et al.*, en 1995 y Wong, en 1999, usando un protocolo diferente cada uno, reportaron una producción de *ramets* que puede ser llevada a escala comercial, adicionalmente, se conocen trabajos por inmersión periódica de medio líquido (Tahardi 1998, Sumaryono *et al.*, 2008) y otros usando biorreactores para la producción masiva de callo embriogénico (Gorret *et al.*, 2004, Tarmizi *et al.*, 2003). Soh *et al.*, 2011, reportaron que la producción de clones, mediante suspensiones líquidas, es más eficiente con menor porcentaje de *mantled fruit* que el sistema tradicional en medio semisólido.

En el laboratorio de cultivo de tejidos de Cenipalma se ha implementado una metodología para la obtención de plántulas hasta la fase de vivero, a partir de hojas inmaduras en cultivo *in vitro* mediante la propagación en sistema semisólido, pero, al igual que en otros laboratorios, la producción de clones de un mismo *ortet* (planta de donde se toma tejido para iniciar el proceso de clonación) es asincrónica.

El objetivo del presente trabajo es mostrar los resultados iniciales obtenidos al implementar una técnica de producción de *ramets* mediante la proliferación de Callo Embriogénico

(CE) y la conversión de diferentes tipos de callo a embriodes somáticos. La implementación de esta técnica será útil para la producción de clones de manera sincronizada, dicho material es importante debido a que es genéticamente uniforme y además podrá ser usado en experimentos de diferentes áreas de investigación como biología molecular y fitopatología. Estos resultados hacen parte del proyecto Multiplicación clonal de materiales elite de palma de aceite *Elaeis guineensis* para los nuevos desarrollos palmeros en Colombia, financiado por Colciencias y el Fondo de Fomento Palmero (FFP), administrado por Fedepalma.

## Metodología

Desde enero de 2011 se comenzó a desarrollar el protocolo de producción de clones mediante la proliferación de CE. Han sido evaluados en la producción de CE 12 *ortets* embriogénicos (que habían producido líneas embriogénicas) de los cuales ocho son de material *E. guineensis* (seis tipo Tenera, una tipo Dura, una tipo Pisífera, y cuatro son híbridos interespecíficos OxG). La metodología implementada se resume en la Figura 1.

Todos los medios de cultivo descritos en el presente artículo fueron esterilizados a 121°C y 15psi durante 15 minutos. La temperatura a la cual se colocaron los cultivos fue 28°C ± 2°C.

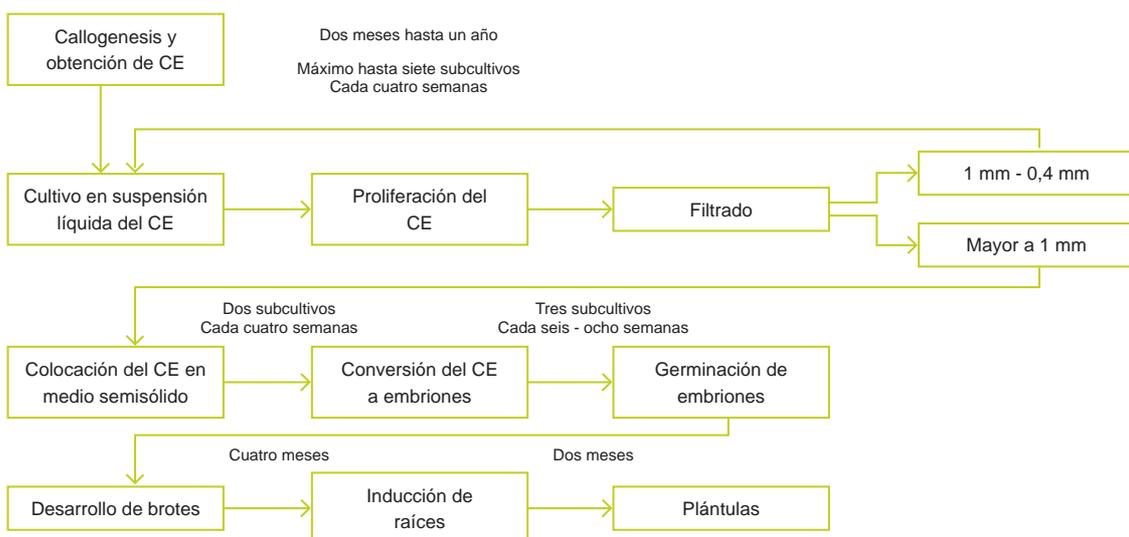


Figura 1. Proceso de producción de clones mediante suspensiones líquidas.

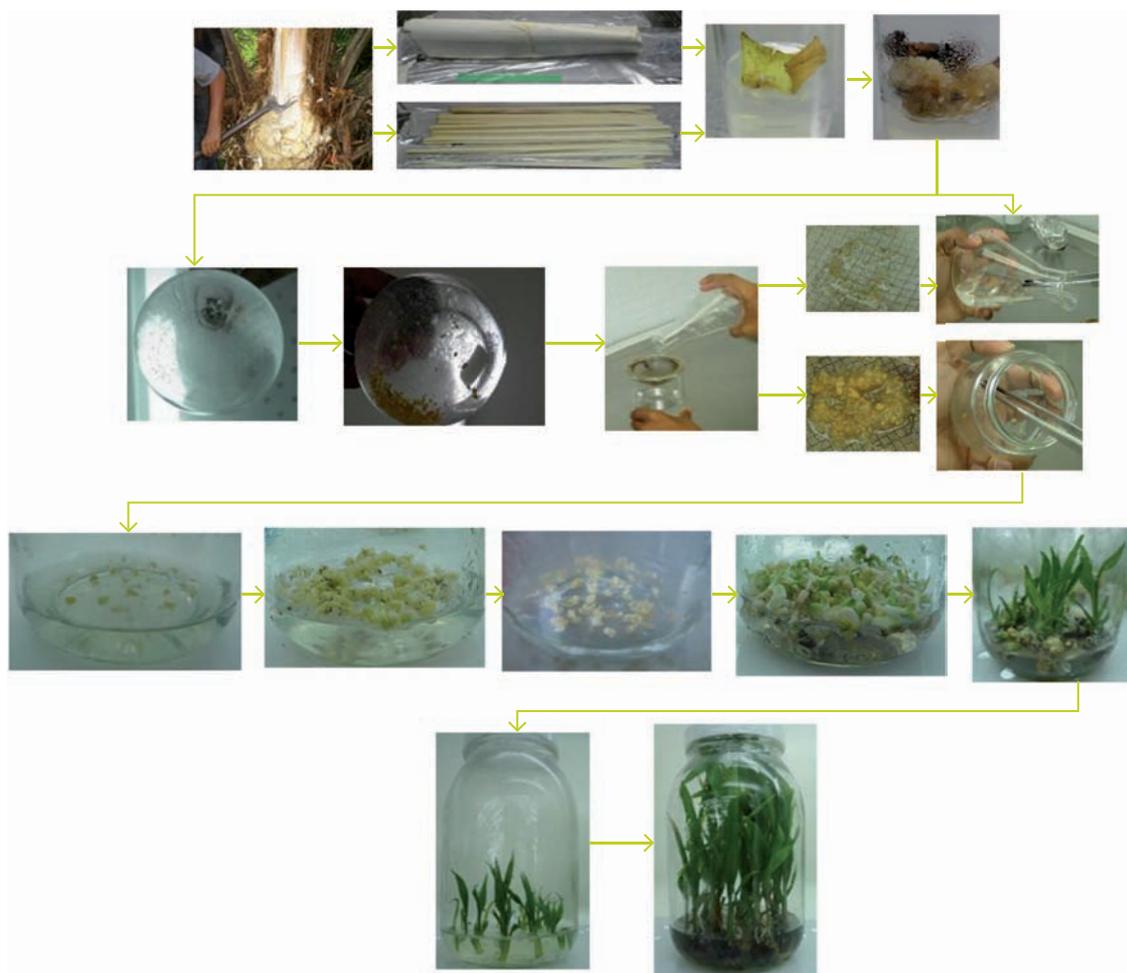


Figura 1. Proceso de producción de clones mediante suspensiones líquidas.

### Obtención, inoculación de explantes e inducción de callo

El cogollo de los *ortets* se cortó 10 cm encima de la inflorescencia de la hoja 4; se trasladó al laboratorio y en cabina de flujo laminar se identificaron y numeraron las hojas siguiendo la filotaxia, se tomaron las hojas que presentaban tejidos más blandos, usualmente de la -4 a la -9. Posteriormente, se separaron los folíolos del raquis, cortándolos en segmentos de 20 cm. Se desinfectaron agregando una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% con cinco gotas de Tween-20, durante 20 minutos. Después, se enjuagaron con agua destilada estéril, tres veces, durante tres minutos cada enjuague.

Los segmentos de 20 cm se dividieron en fragmentos de 1 cm de largo, se introdujeron en tubos de ensayo de 50 mL con 10 mL de medio basal (Murashigue & Skoog, 1962) M&S, sacarosa, reguladores de crecimiento y agar. Por cada *ortet* se inocularon alrededor de 2.000 explantes (segmentos de 1cm). Los explantes se guardaron en oscuridad durante un año y se subcultivaron cada tres meses. La presencia de callo embriogénico fue registrada cada 15 días.

### Cultivo de CE en medio líquido

Todos los callos seleccionados que presentaban características de CE (Granulosos, húmedos, friables y nodulares) se separaron del explante y se subcultivaron en erlenmeyers de



150 mL, con aproximadamente 35 mL de medio líquido que contenía M&S, sacarosa y reguladores de crecimiento; el CE no ocupó más de 15% de la superficie total del erlenmeyer, permitiendo agitarse y dispersarse suavemente. Los erlenmeyers se colocaron en un *shaker* orbital aproximadamente a 90 RPM con 14 horas luz y 10 horas de oscuridad.

Para subcultivar el callo embriogénico en nuevo medio líquido, se filtró el CE utilizando mallas de acero inoxidable con poros de 0,4 mm y 1 mm. El CE mayor de 1 mm, con ayuda de pinzas estériles, se colocó en medio semisólido que contenía M&S, sacarosa y gelrite, en frascos de vidrio redondos de 150 mL sellados con tapas Magenta®; y el callo embriogénico que quedaba sobre la superficie del tamiz de poro de 0,4 mm se colocó nuevamente en medio líquido, en erlenmeyers de 100 mL o 250 mL, dependiendo de la cantidad de CE (Figura 1).

Los erlenmeyers con CE en medio líquido se colocaron en ciclos de 14 horas luz y 10 de oscuridad. Se realizaron siete subcultivos cada cuatro semanas; en el último subcultivo todo el CE, incluyendo el que quedaba sobre la superficie del tamiz de 0,4 mm, se colocó en medio semisólido.

### Conversión de CE a embriones somáticos y germinación de embrioides somáticos

Se realizaron subcultivos de los embrioides generados a partir del CE. Los primeros sub-

cultivos se realizaron cada cuatro semanas, para promover el desarrollo de nuevos embrioides. A partir del subcultivo número tres los subcultivos se realizaron cada ocho o nueve semanas para permitir que los embrioides germinaran.

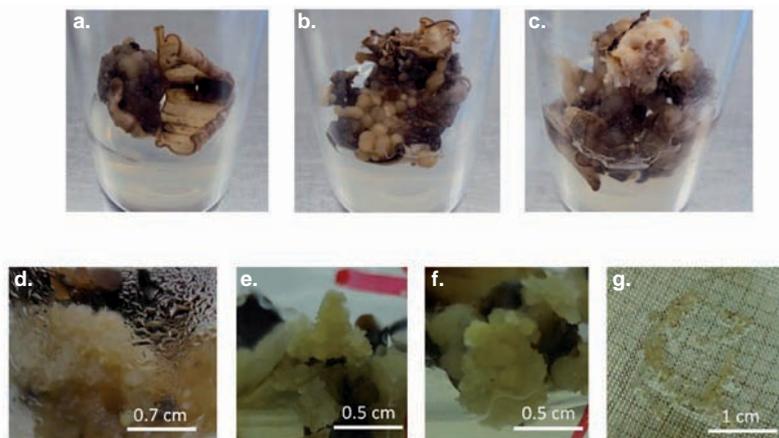
### Desarrollo y enraizamiento de brotes

Los brotes que tenían más de 4 cm se colocaron en medio con M&S, sacarosa y gelificante, en frascos de 750 mL, para permitir su desarrollo y se mantuvieron durante tres meses. Los brotes que alcanzaban más de 8 cm se subcultivaban durante dos meses, después se colocaban en medio para enraizamiento con agente gelificante.

## Resultados y discusión

### Producción de callo embriogénico

Todos los *ortets* produjeron callos entre dos meses y un año después de la inoculación con diferentes características como: callos húmedos, compactos, rizogénicos, nodulares y friables (Figuras 2A-2C); aunque estos tipos de callos pueden producir embrioides, no son considerados embriogénicos por su baja tasa de producción. Los callos embriogénicos normalmente lucen granulosos, húmedos, friables y nodulares, su color puede ser blanquizco o amarillento (Figura 2D).



**Figura 2.** Diferentes tipos de callo producidos por las palmas, (A) Callo húmedo; compacto, (B) Callo nodular rizogénico, (C) Callo compacto tipo chunky, (D-F) Diferentes tipos de callo embriogénico, (E) Detalle callo embriogénico sobre el tamiz de 0,4 mm.

De los 12 *ortets* seleccionados sólo ocho han producido CE (Tabla 1). Entre 80-90% de éxito es reportado usando diferentes protocolos y orígenes genéticos, no todas las palmas producen callo embriogénico, en promedio entre 80 a 90% de palmas embriogénicas producen CE (Wong *et al.*, 1999; Rival *et al.*, 2001; Sohet *et al.*, 2001). En nuestro caso, las

palmas *E. guineensis* han producido mayor cantidad de callos con características de CE. El porcentaje obtenido hasta el momento es 66,7%; sin embargo, esta cifra puede aumentar cuando la evaluación de los *ortets* finalice en el año 2013, debido a que los explantes provenientes de los *ortets* aún pueden producir callos embriogénicos.

**Tabla 1.** Producción de CE por tipo de *ortet*.

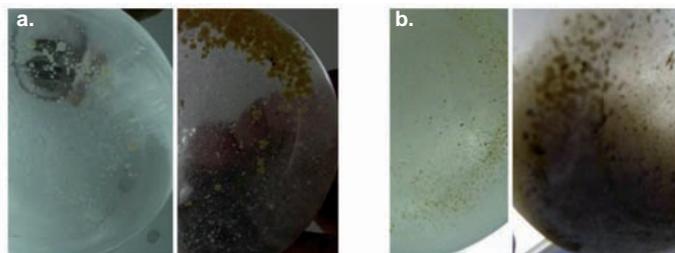
Tipo de <i>ortet</i>	Cantidad de <i>ortets</i> evaluados	<i>Ortets</i> que produjeron callo con características de CE	%
Dura	1	0	0,0
Pisifera	1	1	100,0
Tenera	6	5	83,3
Híbrido OxG	4	2	50,0
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>66,7</b>

### Proliferación y germinación del CE

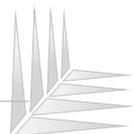
Hasta ahora, 54,55% de las líneas proliferaron y germinaron exitosamente (Tabla 2). El *ortet* 5 y el 7 produjeron callos con características de CE pero la proliferación fue muy baja y no germinó cuando se subcultivó en medio sólido. El resto de *ortets* han producido entre 1 y 15 líneas, las cuales han germinado con porcentajes entre 42,86 y 100% (Tabla 2). La proliferación del CE en general aumentó en una tasa de 1 a 3 erlenmeyers por erlenmeyer original en cada subcultivo (datos no mostrados). Se observaron diferencias morfológicas en los callos que proliferaron, algunos presentaban nódulos entre 1 y 5 mm (Figura 3A). El *ortet* 2 fue el único que además del callo mencionado anteriormente presentó CE con una textura más

friable, de color blanco grisáceo y de menor tamaño (Figura 3B). Este CE friable mostró un crecimiento más rápido que el callo nodular. De ambos tipos de callos se han obtenido plántulas a las cuales se les evaluará su fidelidad clonal (similitud de las características de los clones con el *ortet*) a futuro en campo.

Duval en 1995, usando concentraciones entre 50 y 200 mg/L de 2,4 D, reportó diferencias morfológicas y fisiológicas entre dos tipos de callos embriogénicos que denominó callo nodular compacto y callo de crecimiento rápido, este último ocurre con muy poca frecuencia, menos de 1%, y está asociado con presencia de anomalías. Todos estos aspectos serán tenidos en cuenta al momento de evaluar los clones producidos en campo mediante esta tecnología.



**Figura 3.** Diferentes tipos de callo embriogénico en subcultivo inicial y subcultivo número 4 en suspensión líquida. (A) Callo nodular compacto, (B) Callo friable.



La conversión del callo embriogénico en embrioides se presentó principalmente entre el subcultivo 1 y 2; en el subcultivo 1 se observó principalmente el crecimiento del CE y se evidenció la presencia de embrioides. En el subcultivo 2, la diferenciación del CE en embrioides es mayor, las estructuras de los embrioides se mostraron claramente y la cantidad de CE comienza a descender (Figuras 4A-4C).

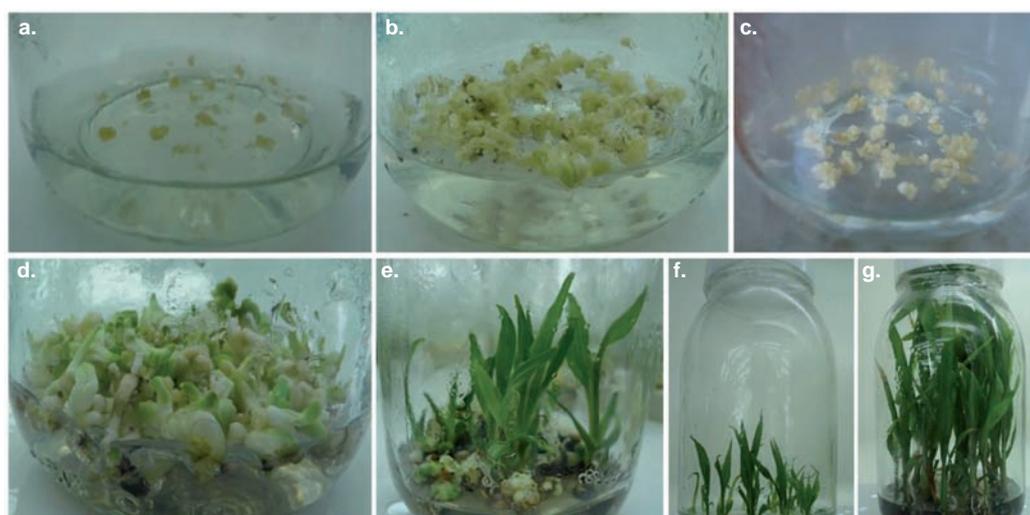
Después del subcultivo 3 en adelante, los embrioides germinan y se empiezan a desarrollar como plántulas (Figuras 4D y 4E). Desde el subcultivo 3 al 5 se presentaron brotes, los

cuales respondieron bien a la fase de desarrollo de brotes y a la fase de inducción de raíz (Figuras 4F y 4G). Estos resultados concuerdan con el proceso reportado por Wong *et al.*, (1999).

El *ortet* 6 produjo el mayor número de líneas germinadas (9) y la mayor cantidad de brotes, los cuales se encuentran en fase de desarrollo de brotes, algunas líneas tuvieron una proliferación muy baja aunque germinaron produciendo poca cantidad de plántulas como en el caso del *ortet* 4 (datos no mostrados). Aún continúa en proceso de evaluación la producción de brotes de las diferentes líneas.

**Tabla 2.** Proliferación y germinación de líneas embriogénicas con CE que se pusieron a proliferar en medio líquido.

<i>Ortet</i>	Tipo de <i>ortet</i>	Líneas que se pusieron a crecer	Líneas germinadas	%	Producción de plántulas
1	Pisifera	2	1	50,00	SI
2	Tenera	7	3	42,86	SI
3	Tenera	2	2	100,00	SI
4	Tenera	1	1	100,00	SI
5	Tenera	1	0	0,00	NO
6	Tenera	15	9	60,00	SI
7	Híbrido OxG	2	0	0,00	SI
8	Híbrido OxG	3	2	66,67	NO
<b>Total</b>		<b>33</b>	<b>18</b>	<b>54,55</b>	



**Figura 4.** Conversión del CE a embriones somáticos (A) Subcultivo de C.E. sobre medio semisólido después del filtrado. (B) Conversión del C.E. después de 4 semanas. (C) Segundo subcultivo del C.E. en medio semisólido. (D) Tercer subcultivo en medio semisólido. (E) Cuarto subcultivo en medio semisólido. (F) Brotes en etapa de desarrollo. (G) Plántulas listas para ser adaptadas.

## Conclusiones

La implementación de esta técnica es un paso importante para la producción de *ramets* en el laboratorio de cultivo de tejidos, en nuestro caso al igual que en otros laboratorios la producción de *ramets* mediante suspensiones líquidas es más sincronizada y se puede producir una mayor cantidad por línea comparado con el sistema que utiliza únicamente medio semisólido, adicionalmente este sistema es más rápido y demanda menos mano de obra en algunas fases.

Aunque la producción de CE depende principalmente del material genético de la palma y

no todas las palmas producen CE, esta técnica puede ser útil para producir clones de *ortets* seleccionados a menores costos.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Fondo de Fomento Palmero (FFP) administrado por Fedepalma y por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias, por la cofinanciación de este proyecto; a todo el grupo de trabajo de cultivo de tejidos, y especialmente a la Doctora Girlie Wong por sus valiosos aportes durante todo el proceso.



## Bibliografía

- Corley, R H V. y Tinker, P B. 2009. Propagación vegetativa y biotecnología. En: La Palma de Aceite. Cuarta Edición. Colombia. p. 217-233.
- De Touchet, B., Duval, Y. Pannetier, C., 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). Plant Cell Rep. Vol. 10 p. 529-532
- Duval, Y., F. Aberlenc and B. Touchet. 1995. Use of embryogenic suspensions for oil palm micropropagation. In: Rao, V., Hensosn, I.E. and Rajanaidu, N. (eds.) Recent dev. In oil palm tissue culture and Biotech. Proc ISP Int'l Symp. 24-25 sept.1993, Kuala Lumpur, Malasya.p.34-47
- Corret, N., bin Rosli, S.M., Oppenheim, S.F., Willis, L.B., Lessard P. A., Rha, C.K., Sinskey A. J. 2004. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. Journal of Biotechnology. Vol. 108 p. 253–263
- Kushairi, A., Tarmizi, A., Zamzuri, I., Ong-Abdullah, M., Samsul Kamal, R., Ooi, S. and Rajanaidu N. 2010. Production, Performance and Advances in Oil Palm Tissue Culture. Paper in International Seminar on Advances in Oil Palm Tissue Culture, 29 May 2010. Indonesia. International Society for Oil Palm Breeders (ISOPB)
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum, Vol.15, pag. 473-497
- Rival, A., Tregear, J., Jaligot, E., Morcillo, F., Aberlenc, F., Billotte, N., Richaud, F., Beule, T., Borgel, A., Duval, Y., 2001. Oil palm biotechnology: progress and prospects. OCL-OI. Corps Gras Lipids 8, p 295–306
- Rohani, O.; Sharifah, S.A.; Raffi, Y.; Tarmizi, M.; and Zamzurri, I. 2002. Tissue Culture of Oil Palm In Advances in Oil Palm Research. MPOB p. 238-283
- Soh, A C; Wong, G; Tan, C C; Chew, P S; Chong, S P; Ho, Y W; Wong, C K; Choo, C N; Nor Azura, H and Kumar, K. 2011. Commercial-Scale propagation and planting of elite oil palm clones: research and development towards realization. Journal of Oil palm Research. Vol. 23 April 2011. p. 935-952
- Sumaryono, Riyadi I, Kasi P.D. and Ginting G 2008 Growth and differentiation of embryogenic callus and somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). in temporary immersion system. Indonesian journal of agriculture Vol. 1(2) 2008 p. 109-114
- Tahardi, J.S. 1998. Improvement of oil palm somatic embryogenesis by periodic immersion in liquid medium. In A. Jatmika et al., (Eds.). Proc. International Oil Palm Conference, Bali, Indonesia. p. 595-601
- Tarmizi, A., M.A. Norhijan, R.S. Kamal, R. Zaitun, and S.C. Soh. 2003. Mass propagation of oil palm planting materials using liquid culture and bioreactor technology. In Proc. PIPOC 2003 International Palm Oil Congress (Agric.). p. 130-143