

Aportes de la biotecnología al cultivo de la palma de aceite en PIPOC 2005

Biotechnology Contribution to Oil Palm in PIPOC 2005

Pedro Rocha S., Ph.D¹ Resumen

Dentro de las actividades académicas del sector palmero en el ámbito mundial, se destacan el *International Palm Oil Congress* (Pipoc, Malasia) y la Conferencia internacional de Palma de Aceite (Cenipalma y Fedepalma, Colombia). Del 25 al 29 de septiembre de 2005, se llevó a cabo en Malasia, el Congreso internacional de aceite de palma (Pipoc, 2005). En este evento participaron más de 1.800 personas incluidos 16 miembros del sector palmero colombiano. Con el objetivo de mantener informada a la mayor parte de la comunidad palmera, en el presente artículo se presenta una revisión sobre lo que el autor considera fueron algunos de los resultados destacados en el área de biotecnología que se presentaron en dicha reunión. Además, discute el impacto de dichos avances sobre la palmicultura colombiana.

Summary

Some of the most important academic activities of the oil palm sector world wide are the «*International Palm Oil Congress*» (PIPOC, Malaysia) and the «*International Conference of Oil Palm*» (Cenipalma and Fedepalma, Colombia). From 25 to 29 of September this year, it was carried out PIPOC 2005 in Malaysia. In this event, around 1.800 people across the world, including 16 members of the Colombian oil palm sector, participated of this scientific exchange. With the aim of keeping informed the Colombian oil palm community, this paper presents a brief review about some of the topics and results the author considers relevant for the oil palm biotechnology. In addition, it discusses the impact of such advances on the Colombian oil palm sector.

Palabras Clave

Secuenciación, transformación genética, cultivo de tejidos, marcadores moleculares.

1. Investigador titular. Director del Laboratorio de Caracterización Molecular de Cenipalma.
E-mail: pedro.rocha@cenipalma.org
Recibido: 21 de noviembre de 2005. Aprobado: 25 de enero de 2006.

Introducción

Por las características propias de la palma de aceite, la investigación está ciertamente rezagada cuando se compara con oleaginosas de ciclo corto tales como soya, colza, maíz y algodón, entre otras. Sin embargo, la aplicación de herramientas biotecnológicas en palma de aceite está cerrando la brecha de conocimiento entre la palma y los demás cultivos y es así como en el Pipoc 2005, avances importantes en secuenciación de ADN, transformación genética, genómica y bioinformática fueron reportados.

Secuenciación de los genomas de *E. guineensis* y *E. oleífera*

La secuenciación es una metodología que permite conocer la posición exacta de cada uno de los nucleótidos que conforman una molécula de ADN (Rocha, 2003a). La importancia de poseer la secuencia del genoma de un organismo está relacionada con las posibilidades de manipulación de su información genética. Pues con la secuencia completa del genoma se tiene, al menos en teoría, acceso a todas las características que definen a un individuo. Desde 1995, los genomas de más de 180 organismos han sido secuenciados (<http://www.genomenetwork.org>). Se ha calculado que el genoma de palma de aceite, al igual que el de soya, es cerca de tres veces mayor que el tamaño del genoma de arroz y casi la mitad del tamaño del genoma humano. Por tal razón, para secuenciar el genoma de palma se necesitaría una infraestructura enorme y la conformación de un consorcio.

Según Budiman *et al.* (2005), el *Malaysian Palm Oil Board* (MPOB, Selangor, Malasia) en asocio con *Orion Genomics* (St. Louis, Missouri, Estados Unidos) y *Cold Spring Harbor Laboratory* (Nueva York, Estados

Unidos) conformaron la alianza para el descubrimiento de la palma de aceite (*The Oil Palm Discovery Alliance*). Este consorcio de investigación secuenció, en 16 meses, los genomas de *Elaeis guineensis* Jacq. tipos Dura (D), Pisífera (P) y Ténera (T, híbrido DxP).

De manera adicional, secuenciaron dos clones de *E. guineensis*, uno normal y otro que presentaba aberraciones florales. Por último, se secuenció *Elaeis oleífera* [HBK] Cortés y el híbrido interespecífico *E. oleífera* x *E. guineensis* (OxG). Los tejidos de los materiales secuenciados fueron recolectados y exportados por MOPB a Orion Genomics. Esta empresa utilizó la tecnología conocida como *GeneThresher® methylation filtering technology*, la cual remueve el «ADN basura» metilado de librerías de ADN genómico de plantas, dejando solo una pequeña porción del genoma (la no metilada) que contiene los genes (<http://www.oriongenomics.com>). Con la tecnología de GeneThresher®, a julio de 2005, cerca de 401.172 secuencias de ADN nuclear habían sido generadas. Al final del proyecto (septiembre de 2005) se había cubierto 92% de los genomas estudiados.

Sin duda, esta iniciativa de secuenciación se convierte en el avance técnico más importante para las especies *E. guineensis* y *E. oleífera* y marca un hito para el desarrollo del cultivo de palma de aceite, pues disminuye de manera considerable la brecha que se tenía con las oleaginosas de ciclo corto (soya, maíz, colza, algodón, etcétera).

El impacto que esta información tendrá sobre el sector palmero de Malasia estará relacionado con el uso que se haga del inventario de genes asociados con el control de la saturación del aceite, tamaño del fruto, tasas de crecimiento y de maduración. Con la secuencia de los geno-

Sin duda, esta iniciativa de secuenciación se convierte en el avance técnico más importante para las especies *E. guineensis* y *E. oleífera* y marca un hito para el desarrollo del cultivo de palma de aceite.

mas, y con el desarrollo de la genómica y la bioinformática, los fitomejoradores podrán identificar los genes individuales responsables de las variantes naturales de palma de aceite seleccionadas. Además se podrá emplear esta información para ahondar en el conocimiento de la fisiología y la genética de la palma.

Palma de aceite y tecnología transgénica

Paul Christou, experto mundial en transformación genética, discutió la importancia que para el desarrollo de la biotecnología vegetal tienen i) el entendimiento de los mecanismos que controlan la integración de múltiples transgenes en una especie cultivable y ii) la información acerca de la expresión coordinada de transgenes en un genoma huésped, lo que hace posible hablar de características multigénicas de «segunda y tercera generación». En términos más coloquiales, según Christou (2005), en la actualidad existe la posibilidad real, mediante transgénesis, de introducir y expresar características complejas codificadas por varios genes.

La tecnología de transferencia de genes es un paso esencial en cualquier programa de biotecnología (Rocha, 2004a). El entendimiento de los mecanismos de integración de transgenes al genoma y sus implicaciones facilita el desarrollo e implementación de nuevas estrategias de transformación. Es así como la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* cede terreno a la biobalística, debido que con *Agrobacterium* se están incorporando secuencias ajenas al objeto del gen de interés y a menudo dichas secuencias precipitan rearrreglos que conducen a la inactivación del gen introducido. Esto es más frecuente en especies con genomas complejos como en el caso de cereales y leguminosas (Christou, 2005). Por esta razón la tecnología de

ADN limpio [*clean DNA technology*, Fu *et al.*, 2000] se constituye en la herramienta a utilizar en esta nueva generación de plantas transgénicas (Rocha, 2004a). Con la tecnología de ADN limpio ha sido posible introducir hasta cinco genes diferentes de manera simultánea en la misma célula y se plantea que, en principio, no debería existir límite en términos del número de transgenes que se puedan introducir (Christou, 2005).

En la actualidad, las plantas son vistas como entidades que pueden ser usadas para la producción, a gran escala, de proteínas recombinantes con interés farmacéutico (área conocida como *molecularfarming* o *molecular pharming*). Los cultivos de monocotiledóneas y más específicamente los de cereales, constituyen las opciones más atractivas para la aplicación de esta tecnología (Ma, Drake y Christou, 2003; Twyman *et al.*, 2003). La mayor ventaja de los cereales es que las proteínas recombinantes pueden ser marcadas de tal manera que se acumulen específicamente en la semilla (por ejemplo, en la capa de aleurona o el endospermo).

En los mejores casos, las proteínas recombinantes expresadas en semillas han permanecido estables y activas después de almacenamiento a temperatura ambiente durante más de dos años (Stoger *et al.*, 2000). Las proteínas recombinantes se almacenan en altas concentraciones en un volumen pequeño de tejido, lo cual facilita su extracción. En términos de procesamiento, la ventaja de los cereales radica en la ausencia de compuestos fenólicos y alcaloides, los cuales podrían interferir con los procesos de extracción y convertirse en contaminantes de la molécula objetivo.

Según Christou (2005), algunos factores necesarios para considerar el cereal más apropiado para la expre-

sión de cualquier proteína incluyen consideraciones geográficas relacionadas con la siembra y cosecha, la facilidad de la transformación y regeneración, la producción anual de semilla por unidad de área, la producción de proteína por kilogramo de semilla, el precio del cultivo, el porcentaje de proteína recombinante que contiene la semilla e inevitablemente los aspectos relacionados con los derechos de propiedad intelectual (Rocha, 2003b; Rocha, 2004a).

Con respecto a la generación de plantas transgénicas resistentes a insectos, en la actualidad se desarrollan dos conceptos, transgenesis piramidal y fusiones de genes insecticidas. La transgénesis piramidal consiste en la introducción y expresión simultánea (cotransformación y coexpresión) de múltiples genes que afectan al mismo insecto mediante diferentes mecanismos (Bano Maqbool *et al.*, 2001). La segunda estrategia es el uso de fusiones insectidas entre bien estudiados genes insectidas (por ejemplo, Bt) con moléculas de lectina que tienen dominios adicionales para incrementar las interacciones y la unión de las toxinas con los receptores del intestino medio (Mehloefaí., 2005).

La transformación genética en palma de aceite avanza a pasos agigantados en MPOB, aunque hasta el momento, los esfuerzos se realizan exclusivamente en el ámbito académico y de investigación (Madon *et al.*, 2005). Gracias a los desarrollos en propagación vegetativa de palma de aceite mediante cultivo de tejidos (Rohani, Zamzuri y Tarmizi, 2003) y a la disponibilidad de un sistema de transformación eficiente (Parveez y Christou, 1998) es posible producir palmas transgénicas en cuatro o cinco años desde el momento en que el material se encuentra en estado *in vitro* (Madon *et al.*, 2005).

De acuerdo con los objetivos definidos por el programa de ingeniería genética del MPOB, se están llevando a cabo experimentos de transformación genética para incrementar el contenido de ácido oleico mediante la inducción de la ketoacil-ACP-sintasa II (KASII) y la disminución de la actividad de la enzima palmitoil-ACP-thioesterasa. Palma transgénica con alto estearato mediante la represión de la enzima estearoil-ACP desaturasa. La acumulación de ácido palmitoleico (ácido graso de importancia para la industria farmacéutica) se está logrando mediante el incremento de la actividad de la stearoil-ACP desaturasa. Se reportó el tamizaje, mediante HPLC, de plantas transgénicas que sintetizan plásticos biodegradables (Madon *et al.*, 2005).

Cultivo de tejidos

La propagación *in vitro* de palma de aceite fue uno de los primeros retos (y fracasos) biotecnológicos para el sector en el ámbito mundial. Sin embargo, hace ya algunos años, fue posible sobrepasar tales problemas (Wong, Tan y Soh, 1997; Rohani *et al.*, 2003) y se encontró que el problema de la propagación está relacionado con la inducción de una variación somaclonal conocida como masculinización [*mantled*], en la cual los componentes tanto de las flores masculinas como femeninas se transforman en carpelos.

En el Pipoc 2005, Linden y colaboradores (2005) reportaron el aislamiento de genes MADS de las inflorescencias de palma de aceite. Los ADNc aislados incluyeron genes que probablemente funcionan en los estados iniciales de la floración al igual que genes que pueden funcionar en la determinación de la inflorescencia y en la identidad de las flores. Tres de los genes encontrados fueron homólogos a genes conocidos

que afectan partes reproductivas de la flor. El gen MADS tipo B, homólogo del gen *Pistillata*, involucrado en la formación de estambres y el candidato más probable en el desarrollo de la condición «masculina»; el gen MADS tipo C, involucrado en la formación del estambre y del carpelo y un homólogo del gen *SEP3*, que posiblemente actúa junto con los genes MADS tipo A, B y C en la formación del verticilo floral.

De manera adicional, Low y colaboradores (2005) reportaron la utilización de la tecnología de microarreglos y los detalles técnicos para la consecuente generación de un chip de ADN con 3.806 EST [*Expressed Sequences Tags*] usado para identificar genes que permitan diferenciar callos embriogénicos de no embriogénicos. A su vez este chip se utiliza para estudiar el fenómeno de anormalidad floral (Low *et al.*, 2005).

Es de anotar que la información presentada es importante para los desarrollos que el gremio palmicultor colombiano necesita en cuanto a la clonación de materiales elite. Pues se dispone de herramientas que pueden disminuir la presencia de aberraciones en los clones, lo cual es un fenómeno muy conocido por las plantaciones. Con estos avances Cenipalma podrá entrar sin mayores contratiempos a la era de clonación de materiales en su Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

Marcadores moleculares y selección asistida

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN que pueden ser localizados físicamente dentro del genoma de un organismo (Rocha, 2003). La localización de los marcadores y sus distancias relativas a lo largo del cromosoma permiten la creación de mapas genéticos. Estos mapas brindan información de interés

para el mejoramiento genético, así los marcadores moleculares se pueden usar en la selección temprana, aun antes de que una característica se manifieste en la planta. A este proceso de apoyo de mejoramiento se le conoce como selección asistida por marcadores (SAM). La utilización del SAM, en principio, brinda enormes cantidades de información y herramientas estadísticas que reducen el tiempo requerido por el mejorador para la generación de nuevas variedades.

En términos generales, pocos son los avances en MAS aplicados a palma de aceite. Se han tratado de generar marcadores asociados con grosor de cuesco (para diferenciar en previvero duros, písíferas y téneras), con color externo del fruto [*viriscens* y *nigrescens*] y con características cuantitativas asociadas con la calidad del aceite. En particular, con la composición de ácidos grasos. Sin embargo, no se reportó ningún avance significativo para la selección temprana de estas características mediante el empleo de técnicas moleculares.

El avance más notable se relaciona con los marcadores empleados para detección de clones anormales. Los marcadores moleculares desarrollados hasta el momento son los MSAP (por *Methylation-Sensitive DNA Polymorphism*) y los RFLP (por *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Los dos tipos de marcadores se pueden utilizar en palma de aceite debido a que explotan la particularidad presentada por los clones anormales de cambiar sus patrones de metilación en la molécula de ADN (Jaligot, Beule y Rival, 2005). Si bien la tecnología está disponible, no existe evidencia de que se esté utilizando de manera rutinaria por parte de plantaciones comerciales debido a su efecto sobre el incremento de los costos de producción del material a sembrar (Rocha, 2004b).

Se dispone de herramientas que pueden disminuir la presencia de aberraciones en los clones... Cenipalma podrá entrar sin mayores contratiempos a la era de clonación de materiales en su Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

Algunos de los avances notables y de potencial utilidad, en un futuro inmediato, para los programas de fitomejoramiento y de transformación genética están relacionados con la caracterización de genes que codifican enzimas que participan en la síntesis del aceite de palma (sintasas, desaturasas, tioesterasas y aciltransferasas, entre otras, Manaf, Othmany y Ramli. 2005).

Consideraciones finales

Hasta el momento, se ha presentado una revisión de lo que el autor considera fueron los trabajos de mayor relevancia que en el área de biotecnología fueron presentados en el Pipoc 2005. Es evidente que esta revisión es incompleta pues se basó sólo en los artículos incluidos en las memorias, faltó así la inclusión de los trabajos tipo póster y la información detallada de las conferencias. Muy seguramente para próximas conferencias será necesario ampliar la participación de los asistentes colombianos (en particular, de Cenipalma) a este evento.

Con respecto a los avances en biotecnología, es claro que existe una enorme distancia que separa los desarrollos de investigación en biotecnología de palma de aceite en países como Malasia, de las iniciativas del sector palmero colombiano (representadas en biotecnología por el

Laboratorio de Caracterización Molecular -LCM- de Cenipalma). Si bien existe un notable desequilibrio en cuanto a la magnitud de recursos económicos y de personal, también es cierto que el LCM ha establecido líneas de investigación (ya con resultados) enfocadas al apoyo al programa de fitomejoramiento (Montoya *et al*, 2005; Rocha *et al*, 2005).

Hace poco se han dado los primeros pasos para desarrollar el área de fitopatología molecular, la cual no ha sido estudiada en detalle por las instituciones de investigación en palma de aceite de Malasia o Francia. Es indispensable que el gremio palmicultor colombiano a través de sus instituciones, Fedepalma y Cenipalma, establezcan las políticas de negociación de propiedad intelectual (Rocha. 2003b) para que de esta manera se pueda tener acceso, en un futuro cercano, a la información genómica generada por instituciones como el MPOB y en consecuencia se pueda emplear en el desarrollo de los proyectos de investigación del gremio.

Agradecimientos

El autor agradece a Pedro León Gómez Cuervo por sus valiosos comentarios en la crítica de este manuscrito. La investigación de Cenipalma es apoyada por el Fondo de Fomento Palmero administrado por Fedepalma.

Bibliografía

Bano Maqbool. S; Riazuddin. S; Loc, NT; Gatehouse, AMR; Gatehouse. JA; Christou. 2001. Expression of multiple transgene insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. *Molecular Breeding* 7:85-93.

Budiman, MA; Singh, R; Low. ETL; Nunberg, A; Citek. R; Rohlfing,

T; Bedell. JA; Lakey, ND, Martienssen. RA; Cheah, SC. 2005. Sequencing of the oil palm genespace. Proceedings of the Pipoc 2005 International Palm Oil Congress (Agriculture, Biotechnology and Sustainability). Sunway Lagoon Resort Hotel. Petaling Jaya. Selangor:628-639.

Christou. P. 2005. Challenges and opportunities in applied plant biotechnology. Proceedings of the Pipoc 2005 International Palm

Oil Congress (Agriculture. Biotechnology and Sustainability). Sunway Lagoon Resort Hotel. Petaling Jaya. Selangor:523-527.

Fu. X; Duc, LT; Fontana, S; Bong. B; Tinjuangjun. P; Sudhakar. D; Twyman. RM; Christou, P; Cooli. A. 2000. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Research* 9:11-19.

- Jaligot, E; Beule, T; Rival, A. 2005. Methylation associated tissue culture abnormality. Proceedings of the Pipoc 2005 International Palm Oil Congress (Agriculture, Biotechnology and Sustainability). Sunway Lagoon Resort Hotel. Petaling Jaya. Selangor:550-561.
- Linden, G; Sharifah, SA; Angenent, G; Cheah, SC; Smulders, R. 2005. Molecular characterization of flower development in oil palm in relation to the mantling abnormality. Proceedings of the Pipoc 2005 International Palm Oil Congress (Agriculture, Biotechnology and Sustainability). Sunway Lagoon Resort Hotel. Petaling Jaya. Selangor:531-549.
- Low, ETL; Tan, JS; Chan, PL; Boon, SH; Wong, YL; Rozana, R; Ooi, LC-L; Ong-Abdullah, M; Cheah, SC; Singh, R. 2005. Application of DNA chip towards developing a diagnostic tool for tissue culture. Proceedings of the Pipoc 2005 International Palm Oil Congress (Agriculture, Biotechnology and Sustainability). Sunway Lagoon Resort Hotel. Petaling Jaya. Selangor:562-578.
- Ma, JK; Drake, PMW; Christou, P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews in Genetics* 4:794-805.
- Madon, M; Maizura I; Singh R; Parveez GKA. 2005. Oil palm improvement: MPOB's experience. Proceedings of the PIPOC 2005 International Palm Oil Congress (Agriculture, Biotechnology and Sustainability). Sunway Lagoon Resort Hotel. Petaling Jaya. Selangor. p. 607-627
- Manaf, MAA; Othman, A; Ramli, US. 2005. Characterisation of genes encoding key enzymes in oil synthesis in the oil palm. Proceedings of the Pipoc 2005 International Palm Oil Congress (Agriculture, Biotechnology and Sustainability). Sunway Lagoon Resort Hotel. Petaling Jaya. Selangor:583-606.
- Mehlo, L; Gahakwa, D; Nghia, PT; Loc, NT; Capell, T; Gatehouse, J; Gatehouse, A; Christou, P. 2005. An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. *Proceedings National Academy of Sciences USA* 102:7812-7816.
- Montoya, C; Arias, D; Rocha, PJ; Rey, L. 2005. Evaluación preliminar de *Elaeis guineensis* (Jacq.) proveniente de Angola mediante marcadores moleculares. *Ceniavances* (121):1-4.
- Parveez, GKA; Christou, P. 1998. Biolistic-mediated DNA delivery and isolation of transgenic oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryogenic callus cultures. *J. Oil Palm Res.* 10:29-38.
- Rocha, PJ. 2003a. Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *Palmas* 24(2):11-25.
- Rocha, PJ. 2003b. Derechos de propiedad intelectual, la manera de proteger invenciones. *Palmas* 24(1):9-17.
- Rocha, PJ. 2004a. Plantas transgénicas frente a la realidad del mercado. *Palmas* 25(3):55-69.
- Rocha, PJ. 2004b. Reporte de visita técnica a Malasia y Reino Unido. Septiembre 9 a 17 de octubre. Reporte técnico. Bogotá. 45p.
- Rocha, PJ; Rojas-Pulido, Y; Rey, L. 2005. Caracterización molecular preliminar del banco de germoplasma de *Elaeis oleifera* [HBK] Cortés mediante microsatélites. *Ceniavances* (130):1-4.
- Rohani, O; Zamzuri, I; Tarmizi AH. 2003. Oil palm cloning: MPOB protocol. *MPOB Technology* 26:20p.
- Stoger, E; Vaquer, C; Torres, E; Sack, M; Nicholson, L; Drossard, J; Williams, S; Keen, D; Perrin, Y; Christou, P; Fischer, R. 2000. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology* 42:583-590.
- Twyman, RM; Stoger, E; Schillberg, S; Christou, P; Fisher, R. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* 21:570-578.
- Wong, G; Tan, CC; Soh, AC 1997. Large scale propagation of oil palm clones -Experiences to date. Proceedings Third International Symposium on in vitro culture and horticultural breeding. *Acta Horticulture* 447: 649-658.

TARIFAS DE SUSCRIPCIÓN 2006

PUBLICACIÓN	PERIODICIDAD	COLOMBIA	EXTERIOR
Palmas	Trimestal (4 ejemplares/año)	\$175.000	US\$90
El Palmicultor	Mensual (12 ejemplares/año)	\$130.000	US\$80
Tarifa Palmera		\$120.000	
(Palmas, El Palmicultor, Ceniavances y Calendario)			
Oferta sólo para palmicultores colombianos)			



* Tarifa regular por un año (incluye porte de correo)
 Informes: Teléfono (571) 3138600 ext.160 - Fax (571) 2113508 - www.fedepalma.org