

Clonación en palma de aceite

Técnica y razones

Cloning Oil Palm Technique and Rationale

Girlye Wong¹,
C.C. Tang,
A.C. Soh



Palabras Clave

Palma de aceite, clonación,
rendimiento.

Resumen

En Malasia, la producción de clones se lleva a cabo en siete laboratorios de cultivo de tejidos de propiedad de ocho plantaciones. Seis laboratorios producen menos de 200.000 anualmente. Se estima que para el año 2005 la producción de brotes llegará a un millón y en el año 2006 superará esa cifra. Un nuevo laboratorio se acaba de construir para este propósito. Este año la composición clonal es de 600.000 clones usando el sistema en gel y 150.000 clones usando el sistema de suspensión líquida. El plan es incrementar la producción de clones usando el sistema de suspensión líquida, pero se requieren resultados más concretos antes de iniciar el proyecto. En la actualidad, cerca de 521.000 clones se producen a partir de clones primarios y 228.000 clones a partir de re-clones. El nuevo laboratorio tiene un área de transferencia que permite almacenar unas 65 cámaras de flujo laminar que es más o menos la cantidad necesaria para producir más de un millón de brotes.

Summary

In Malaysia, clone production is carried out in seven tissue culture cloning laboratories owned by eight plantation companies. Six laboratories produce less than 200,000 annually. In 2005, it is estimated that the production of shoots will rise to one million shoots and in 2006 over a million shoots. A new laboratory has just been constructed and completed for this purpose. This year, the clonal composition is 600,000 clones using the gelled system and 150,000 clones using liquid cultures. The plan is to expand clones from liquid cultures but comprehensive field results are still needed before the project can push ahead. Currently, about 521,000 clones are produced from primary clones and 228,000 clones from re-clones, totaling 750,000. The new laboratory has a transfer area where it is possible to store about 65 laminar air floats which is about the amount needed to produce more than one million shoots.

1. A. A. Research, Malasia.

En esta presentación se discutirán los siguientes temas:

- 1) Clonación de palma de aceite - Técnicas y justificación.
- 2) Proceso comercial de cultivo de tejidos, incluyendo sistemas en sólido y en suspensión líquida, el estado actual, resultados, costos de producción, problemas y soluciones.
- 3) Aclimatación y/o acondicionamiento de plántulas.
- 4) Comportamiento y rendimiento de clones después de la siembra, incluyendo la anormalidad floral (masculinización) y otras anomalías.
- 5) Rendimiento de RFF y producción de aceite.
- 6) Siembra de clones - ¿Cuándo y cuánto cuesta?
- 7) La situación en Malasia - producción de clones y tasas de producción.

La palma de aceite es una planta monoica, es decir con flores masculi-

nas y femeninas en inflorescencias separadas, dando lugar a palmas heterocigotas en condiciones naturales. El desarrollo de una nueva generación de palma puede tardar alrededor de 20 años. Por lo tanto, la propagación clonal es adecuada para la palma de aceite, porque los padres no se originan a partir de líneas propiamente endogámicas.

Las plántulas comerciales de palma DXP son heterogéneas, dando como resultado rendimientos variables. Usando las mejores palmas, la propagación clonal puede ayudar a generar materiales de siembra uniformes, donde el aumento en rendimiento esperado fluctúa entre 15 y 30%.

En palma de aceite se realiza cultivo de tejidos debido a la dificultad de la propagación vegetativa convencional, ya que la palma consta de un solo tallo monocotiledóneo caracterizado por una dominancia apical persistente por lo que no se encuentran brotes axilares.

El cultivo de tejidos es una técnica usada para promover el crecimiento de tejidos en un medio de cultivo ajeno a la planta. Para que esta técnica funcione, se deben establecer protocolos eficientes de regeneración vegetal mediante embriogénesis somática con sus cuatro etapas de cultivo, como se muestra en la Figura 1.

La primera etapa involucra la inducción del callo a partir de los explantes, seguido por la diferenciación de los embrioides. Luego, los embrioides se dejan proliferar y durante el proceso los embrioides más viejos germinan para formar brotes. Luego los brotes se separan para enraizamiento y formación de plántulas.

En el cultivo de tejidos de palma de aceite se usan explantes de hojas jóvenes de flechas emergentes como material de iniciación para inducción de callo. Para no dañar la palma, se

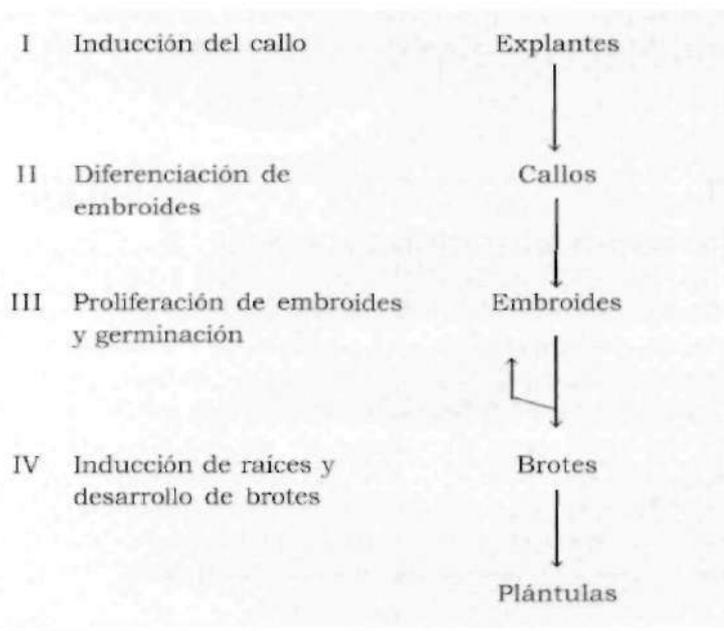


Figura 1 Estados del cultivo de tejidos para regeneración de plántulas.

debe quitar el mínimo posible de hojas. Generalmente, se quitan cuatro o cinco hojas para localizar las flechas emergentes.

Luego se abre un camino a aproximadamente 6 pulgadas por encima del ápice del brote, la flecha se separa de la palma y se baja al suelo dejando la base donde se encuentra el meristemo.

Con mantenimiento y cuidado apropiado el meristemo puede regenerar suficientes hojas para repetir el proceso a los dos años. La flecha cortada se envía al laboratorio y en una cámara de flujo de aire laminar se abre la flecha para exponer las cinco o seis hojas que contiene. Los extremos se descartan y el tejido se corta en trozos de aproximadamente 1 cm. de longitud para inoculación en tubos de ensayo.

La hinchazón normalmente comienza a los tres días después del cultivo. La formación de callo comienza aproximadamente tres meses después de la inoculación. Los callos básicamente son masas de tejido no diferenciado.

Luego, estos callos y plantas se someten a un tratamiento para formación de embrioides. Los embrioides, que son en realidad semillas somáticas, se separan de la masa callosa para someterlos a un tratamiento de proliferación.

A medida que los embrioides proliferan, los más viejos germinan para formar brotes, dando lugar a cultivos poliembriogénicos. Luego, los brotes se separan y se someten a un tratamiento de enraizamiento antes de ser transferidos al vivero.

El porcentaje de éxito de este proceso es diferente en cada etapa. En la etapa de inducción de callo, aunque todas las palmas produjeron callos, únicamente 19% de los explantes

tuvieron éxito, con porcentajes de 2% a 58% entre palmas, y la inducción de callos se hizo en forma escalonada entre los 3 y 12 meses después de la inoculación.

En la etapa de diferenciación, 84% de las palmas produjeron embrioides pero sólo 4% de los callos tenían embrioides, con porcentajes de 0% a 29% entre palmas. La diferenciación de los callos también fue escalonada durante un período de 5 a 15 meses después de la inoculación.

En la etapa de proliferación y germinación de embrioides, sólo el 53% de líneas embrioides proliferaron. La producción está limitada a 5.000 brotes por línea o 18 sub-cultivos. Este procedimiento permite evitar y/o disminuir anomalías florales. Durante la etapa de inducción, 85% de los brotes enraizaron entre dos y cuatro meses.

Los porcentajes de diferenciación de los callos fueron bajos y variaron entre palmas. Los porcentajes fueron impredecibles y fluctuaron con el tiempo y sólo 53% de las líneas de embrioides proliferaron, dando como resultado menor producción de brotes, lo que limita las líneas clonales para producción masiva o a gran escala.

El cuello de botella en el sistema en sólido para la producción masiva es la ocurrencia simultánea de proliferación y germinación de embrioides en las etapas de crecimiento. Esto requiere mucho trabajo y habilidad durante el sub-cultivo para separar los embrioides para mayor proliferación y desarrollo de brotes e inducción de raíces. De tal manera que el sub-cultivo en esta etapa requiere diferentes tipos de recipientes y medios de cultivo. Las etapas de crecimiento simultáneas también producen lotes inconsistentes de brotes.

Un prerrequisito para la producción masiva es la capacidad de man-

tener todos los propágulos o en estado de proliferación o en estado de germinación para permitir el manejo de clones en lotes de desarrollo uniforme y en las cantidades deseadas. Agricultural Applied Research (AAR) evaluó el sistema de suspensión líquida y encontró que esta técnica tiene potencial para producción masiva de clones de palma de aceite.

La Figura 2 compara las etapas y duración de cultivo del sistema en sólido y del sistema de suspensión líquida con un lote de 5.000 brotes. Los dos sistemas comparten las mismas etapas hasta la fase diferenciación. En el sistema sólido, después de la diferenciación del callo los embrioides se separan y se colocan en un gel para proliferación. A medida que los embrioides proliferan, los más viejos germinan para formar brotes. En esta etapa, se requieren unos 20 meses para separar 5.000 brotes.

En el sistema de suspensión líquida, después de la diferenciación del callo, los callos embriogénicos se separan de la masa callosa y se colocan en un medio líquido para prolife-

ración. Después de 4 sub-cultivos mensuales, se ha formado suficiente masa suspendida para producir 5.000 brotes. Luego, la masa de callo embriogénico se coloca en un medio sólido para conversión y formación de brotes.

En total, producir 5.000 brotes usando el sistema de suspensión tarda unos nueve meses, en comparación con el sistema en gel que tarda 20 meses para producir los mismos 5.000 brotes. Por tanto, el sistema en suspensión líquida es considerado más eficiente que el sistema en gel. El proceso de suspensión líquida consta de dos etapas - la iniciación de suspensión de callo embriogénico y la proliferación de callo embriogénico.

Después de la diferenciación, los callos embriogénicos se separan y se colocan en un medio líquido en un frasco cónico. Luego el frasco se coloca en un agitador orbital para formar una suspensión. La suspensión se somete a sub-cultivos mensuales o se transfiere mensualmente a un medio fresco para obtener una suspensión fina. Una vez que haya suficientes callos embriogénicos, se colocan en un gel, donde se convierten en embrioides, que luego germinan para producir brotes. Por último, después del enraizamiento, forman plántulas.

Al cabo de un mes, los callos embriogénicos comienzan a hincharse y algunos ya se han convertido en embrioides. Después de un mes, luego de la segunda siembra, aproximadamente 50% de los embrioides comienzan a madurar y germinar, desarrollando brotes. Los brotes se dejan crecer hasta una longitud de aproximadamente 8 cm. Luego, los brotes se separan y se colocan en un medio de enraizamiento.

El 75% de las líneas embriogénicas del 90% de los clones forman suspensiones. Aunque todas las líneas de

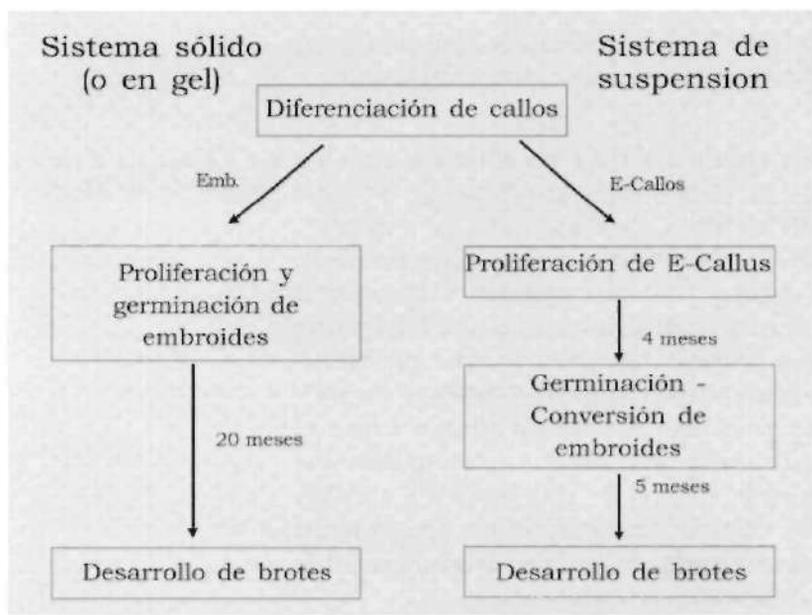


Figura 2 Estado del cultivo de tejidos y duración en sistemas sólido y de suspensión líquida para producir 5.000 brotes.

embrioides produjeron brotes, sólo el 60% de los embrioides formaron brotes en los primeros cinco meses. Esto se debió a que la germinación no estuvo sincronizada.

El sistema sólido y el sistema en suspensión líquida se pueden comparar en términos de los costos variables para producir 5.000 brotes. En los dos sistemas los costos laborales son los más altos, mientras que los costos del medio son los más bajos.

En total, los costos variables son aproximadamente 30% más altos en el sistema en sólido, donde el costo promedio de cada plántula es de unos 0,40 ringgit, mientras que en el sistema de suspensión líquida el costo por plántula es de aproximadamente 0,28 ringgit.

El porcentaje de los costos laborales fue de 63% en el sistema en sólido y 52% en el sistema de suspensión líquida. También se encontró que los costos laborales usando el sistema de suspensión líquida son 42% más bajos y los costos variables totales son 29% más bajos.

El sistema de suspensión líquida es adecuado para producción a gran escala ya que los cultivos se pueden manejar en lotes de desarrollo uniforme y en las cantidades deseadas. La etapa de proliferación de callos embriogénicos se puede automatizar ya que se realiza en un medio líquido.

La producción objetivo se puede lograr más rápido ya que existen fuentes abundantes y continuas de medios de cultivo, dando como resultado un uso más eficiente de las salas de cultivo.

El manejo *ex-vitro* de plántulas consta de: acondicionamiento, vivero y siembra en el campo.

El acondicionamiento de plántulas es una etapa de transición entre el laboratorio y el campo cuyo objetivo

es aclimatar las plántulas *in-vitro* a las condiciones ambientales.

El acondicionamiento es necesario porque las plántulas crecen bajo luz artificial y expuestas a alta humedad en el laboratorio. Las plántulas producidas *in-vitro* son diferentes a las plantas cultivadas en el campo debido a que producen menos cera superficial, sus estomas generalmente no cierran y las raíces pueden no funcionar apropiadamente. Esto produce pérdida excesiva de agua a través de la transpiración cuando las plántulas se siembran directamente en el campo.

Después de que los brotes han enraizado y han alcanzado una altura de más de 8 cm, se retiran de los recipientes de cultivo y se llevan a camas de arena. Aquí los brotes se cubren con plástico para proporcionar alta humedad.

Después de dos semanas, las cámaras de plástico se abren para reducir la humedad interna. Pasado un mes se retira el plástico para exponer las plántulas a las condiciones ambientales. Las cámaras de acondicionamiento están equipadas con sistemas automáticos de vaporización que se usan para irrigación y enfriamiento. Luego de tres meses, las plántulas producen cuatro o cinco hojas y están listas para ser transplantadas a los pre-viveros de las plantaciones.

Las plántulas se sacan de las camas de arena, se lavan con agua para remover la arena y se empacan en bolsas plásticas debidamente marcadas. Las bolsas se sellan con bandas plásticas y se colocan en cajas forradas con espuma de poliestireno. Las cajas se envían a las plantaciones donde las plántulas se siembran en el vivero.

En pre-vivero, las plántulas se mantienen con sombra parcial. A los

tres meses, se llevan al vivero principal donde se aplican las prácticas normales de la plantación. Después de un año, las plántulas están listas para sembrar en el campo.

Los clones son precoces y tienden a florecer antes que las plántulas producidas por semilla, presentando una etapa de floración pronunciada que en condiciones de clima seco producen inflorescencias masculinas con muy baja producción de racimos. Sin embargo, bajo buenas condiciones de clima producen una buena cantidad de racimos.

En nuestros campos de clones se ha observado anomalía floral, inmadurez prolongada y baja polinización. La anomalía floral ocurre tanto en inflorescencias masculinas como femeninas. En la inflorescencia femenina anormal, los estambres vestigiales se convierten en carpelos y forman un manto. Normalmente hay más de tres carpelos. En promedio se encuentran entre siete y ocho carpelos en un manto. En inflorescencias masculinas anormales los estambres se feminizan formando estructuras tipo estigma.

Las anomalías florales no se pueden detectar en el laboratorio o en el vivero. Las anomalías son esporádicas y varían entre clones y normalmente no se presentan en los primeros lotes de brotes producidos.

Las inflorescencias de la palma de aceite tienen una tendencia natural a presentar anomalías. Por ejemplo, se ha observado 0,2% de frutos anormales en poblaciones de palma producida por semilla. La Figura 3 muestra un corte de un manto genético de DXP con siete carpelos.

La anomalía floral afectó al 60% de nuestros clones. Entre 1987-1995, la tasa de anomalía floral era del 5%. Entre 1996-2002, la anomalía floral bajó a menos del 2%. como re-

sultado de la implementación de mejores protocolos en el laboratorio, especialmente al estricto descarte y selección en todas las etapas de cultivo. Clones con anomalías florales severas presentan abortos y por lo tanto esterilidad.

En casos de anomalías leves o moderadas, las palmas se recuperan y producen racimos normales. Cuando la anomalía es leve y no ha habido aborto, los racimos maduran y producen rendimientos. Normalmente, las palmas con anomalías florales son fáciles de localizar a distancia y sobresalen debido a su apariencia desordenada y desorganizada.

La tasa de anomalía floral en clones AAR oscila entre 2,6% para clones primarios y 2% para re-clones. Para clones regenerados usando el sistema de suspensión líquida, la tasa es de 1,9% y para re-clones en el mismo sistema es de 1,5%.

Con relación a la inmadurez prolongada, en casos severos la producción frecuente y prolongada de frutos partenocárpicos puede resultar en racimos perdidos. La inmadurez prolongada se asocia a veces con palmas erectas con hojas cortas, y puede durar hasta tres años.

Palmas erectas con frutos partenocárpicos representan el 2% de nuestros clones. Sin embargo, se ha observado la reversión de este comportamiento en algunos clones.

Los cultivos monoclonales pueden conducir a baja polinización. En 1997, una de nuestras plantaciones reportó un alto porcentaje de abortos. Después de investigar, encontramos que la siembra se hizo en 1992 y consistía principalmente en 35 hectáreas de clones derivados de un solo cruce y la proporción de inflorescencias masculinas y femeninas era de 1 a 119.

Con la lección aprendida en este estudio, ahora se incorpora 20% de plántulas DXP a todos los grandes cultivos clonales y cada paquete consta de 5 clones para proporcionar suficiente polen para la polinización.

Las DXP comerciales tienden a dar rendimientos variables, ya que en una mezcla de familias híbridas se presentan diferencias genéticas entre familias. Los padres de familias híbridas no son puramente endogámicos dando lugar a diferencias genéticas dentro de las familias.

Los resultados de nuestro ensayo con progenies de DXP mostraron que en las mejores familias híbridas el rendimiento de aceite aumentó entre 10% y 15% sobre el promedio.

Actualmente, la selección de ortets para clonación no es un proceso eficiente. El rendimiento de RFF es afectado por el ambiente.

En cuanto a los costos de los clones y la época de siembra, sería útil consultar un análisis económico basado en una combinación de 162 factores. Los resultados de este estudio serán publicados este año en *The Planter*.

Los siguientes factores se tomaron en cuenta al realizar el estudio:

- 1) Precio de clones en ringgit malasio¹ (RM) 10. 20 y 30
- 2) Rendimiento de RFF y TEA a 5%, 10%, 15% mejor que DXP.
- 3) Precio de ACP a 800, 1100, 1400.
- 4) Palmiste a 480, 660, 840 y a dos tasas de descuento de 5% y 10% para un total de 162 combinaciones.

Este análisis tomó en cuenta los costos de resiembra y producción

para híbridos DXP según informes de Ooi y Kodiappan en 2005 y tasas de descuento entre 5% y 10% para un período de 25 años. Además, RFF y TEA de los clones 5%, 10% y 15% más altos que los híbridos DXP.

Adicionalmente, se tomó en cuenta el costo del material de siembra. Para DXP por hectárea a un SPH de 136 libras por hectárea, el costo del material de siembra es de 190 ringgit (RM).

El precio de los clones es de 10. 20 o 30 ringgit malasio. Para un clon de 10 ringgit el costo del material de siembra será 1.600 y para 30 ringgit, el costo será de 4.800.

Los siguientes fueron los criterios económicos usados en la evaluación:

- 1) Valor presente neto (VPN). Compara la rentabilidad entre siembras de clones y DXP.
- 2) La tasa interna de rendimiento (TIR). Mide la rentabilidad del proyecto.
- 3) El período de recuperación de inversión. Se refiere al tiempo de recuperación de la inversión.

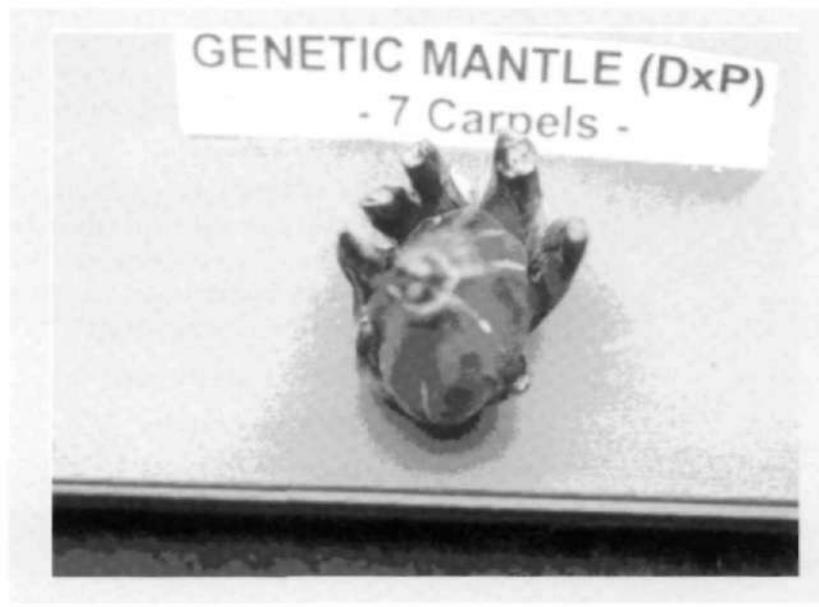


Figura 3 Corte de un manto genético de DXP con 7 carpelos.

1 El dólar equivale a 3,8 ringgit malasios.

tomando en cuenta una tasa de descuento de 5% a 10% para un período de 25 años.

Los resultados fueron:

Se obtuvo un valor presente neto negativo con precios bajos de aceite de palma crudo y palmiste de RM 800 y RM 480 por tonelada respectivamente, en 51 de las 54 combinaciones.

El estudio concluyó que en el 94% de los casos analizados no es rentable sembrar DxP y clones cuando los precios del aceite de palma crudo y palmiste están en 800 y 480 por tonelada, respectivamente.

Adicionalmente, el estudio también mostró que en el 97% de los casos, es rentable pagar el precio de los clones a 15 ringgit, en 94% de los casos pagar clones a 20 ringgit y en 81% de los casos pagar clones a 30 ringgit.

Especialmente vale la pena pagar por clones con alta TEA ya que esto da un rendimiento más alto de aceite de palma crudo. El estudio también mostró que es rentable sembrar clones cuando los precios de los productos de palma están entre medios y altos. Actualmente, los clones en nuestras plantaciones se venden a 15 ringgit.

En Malasia, el área total de cultivos clonales es de aproximadamente 15.000 hectáreas, involucrando 11 plantaciones. Las compañías dueñas de más de 1.000 hectáreas son:

Felda con 3.600 hectáreas

PPB con 3.500 hectáreas

UP con 1.000 hectáreas

KLK y Boustead son dueños de AAR

que a la fecha tienen 5.500 hectáreas sembradas.

En Malasia, la producción de clones se lleva a cabo en siete laboratorios de cultivo de tejidos de propiedad de ocho plantaciones. Seis laboratorios producen menos de 200.000 anualmente. Se estima que para el año 2005 la producción de brotes llegará a un millón y en el año 2006 superará esa cifra. Un nuevo laboratorio se acaba de construir para este propósito.

Este año la composición clonal es de 600.000 clones usando el sistema sólido y 150.000 clones usando el sistema de suspensión líquida. El plan es incrementar la producción de clones usando el sistema de suspensión líquida, pero se requieren resultados más concretos antes de iniciar el proyecto. En la actualidad, cerca de 521.000 clones se producen a partir de clones primarios y 228.000 clones a partir de re-clones.

El nuevo laboratorio tiene un área de transferencia que permite almacenar aproximadamente 65 cámaras de flujo laminar que es más o menos la cantidad necesaria para producir más de un millón de brotes. El cambio al sistema de suspensión líquida permitirá producir más de un millón de brotes.

Existen 17 salas de cultivo. 14 de las cuales son para las etapas de proliferación y germinación. Las salas de cultivo tienen luz artificial y están equipadas con controles automáticos que regulan la temperatura, la humedad y la luz. También hay dos salas de agitadores para producir la suspensión de los cultivos. Con tan sólo 20 agitadores es posible producir un millón de brotes al año.