

## AUTORES



Norbet Billote,  
P Amblard,

T Durand-Gasselin,

A Flori, B Nouy,

F Potier, F Richaud,

A Rival, T Beule,

F Morcillo,

Cirad, TA 40/03

Avenue Agropolis, 34398 Montpellier

Cedex 5, Francia.

**B. Adon,**

CNRA, Station de La Mé, 13

BP989 Abidjan 13, Côte d'Ivoire

**MF Jourjon, B Mangin,**

INRA - Chemin de Borde-Rouge-

Auzeville - BP 52627, F-31326

Castanet-Tolosan cedex, Francia

**F Aberlenc-Bertossi,**

H Adam, Y Duval,

**S Jouannic, J Tregear**

IRD - 911 av Agropolis -

BP 5045, 34032

Montpellier Cedex 1 - Francia

**Z Hayun**

Socfindo, Jl. K.L. Yos Sudarso

N° 105, Medan 20115 P.O. Box

1254 Medan 2001 Indonesia

Autor que presenta:

norbert.billote@CIRAD.fr

## Palabras CLAVE

Embriogénesis, somática,  
marcadores de la palma de  
aceite, rotulación de clones,  
biotecnología vegetal.

Somatic embryogenesis, oil  
palm markers, clone labeling,  
plant biotechnology

Traducido por Fedepalma.  
Versión original en inglés  
disponible en el Centro de  
Documentación de Fedepalma.

# BIOTECNOLOGÍA EN LA PALMA DE ACEITE EN EL CIRAD

Mejoramiento y producción de semilla

## OIL PALM BIOTECHNOLOGY AT CIRAD

Breeding and Seed Production



### RESUMEN

Cirad y su socio francés IRD están ejecutando un proyecto de largo plazo en múltiples etapas, encaminado a la selección asistida por marcadores de la palma de aceite (*E. guineensis* Jacq.), para utilizar de forma óptima la red existente de experimentos genéticos en el terreno, mientras se aprovechan los avances recientes en la biotecnología vegetal. Generalmente, los proyectos clásicos de mejoramiento molecular se combinan con herramientas novedosas, para la clonación y marcación de genes agronómicos clave, como: (i) EST (Etiqueta de Secuencia Expresada) de secuencias de ADNc, (ii) mapeo cartografía de clones BAC, (iii) cartografía de ADNc-AFLP, (iv) análisis diferencial de ADNc, (v) tecnología de macro y microalineamientos. Se está estableciendo una red de ensayos metodológicos en el terreno con el fin de validar los marcadores genéticos/QTL, para la ejecución de las estrategias de selección asistidas por marcadores y lograr la cartografía física que permita la caracterización, clonación y rotulación de los clones útiles. Al mismo tiempo, el equipo Cirad-IRD está explorando los mecanismos moleculares implícitos de la embriogénesis somática de la palma de aceite y la variación somaclonal del manto. La elaboración de un protocolo de regeneración basado en el uso de suspensiones celulares embriogénicas y resultados fisiológicos, ha proporcionado un método que permite la producción a gran escala de embriones somáticos únicos que presentan similitudes estructurales con los embriones cigóticos de semillas. Con el fin de establecer un procedimiento de pruebas tempranas de conformidad clonal, se realizaron estudios moleculares tanto de los cambios en la metilación del ADN genómico como de la expresión genética inducida por el cultivo de tejidos. En el momento, los esfuerzos se dirigirán al aprovechamiento de este nuevo conocimiento para el desarrollo de las pruebas de conformidad clonal.

## SUMMARY

CIRAD and its French partner IRD are being implementing a long-term multi-stage project towards the marker-assisted selection of the oil palm (*E. guineensis* Jacq.) in order to make optimum use of the existing network of field genetic experiments while capitalising upon recent advances in plant biotechnology. Classical molecular breeding projects are originally combined with novel tools, for the cloning and tagging of key agronomic genes, such as: (i) EST (Expressed Sequence Tag) of cDNA sequences, (ii) physical mapping of BAC clones, (iii) cDNA-AFLP mapping, (iv) differential analysis of cDNAs, (v) macro- and micro-arrays technology. A network of field methodological trials is being established in order to validate QTL/gene markers, to implement marker-assisted selection strategies and to pursue physical mapping towards the characterisation, cloning and tagging of useful genes. In parallel, the CIRAD-IRD team is exploring the molecular mechanisms underlying the oil palm somatic embryogenesis and mantled somaclonal variation. The development of a regeneration protocol based on the use of embryogenic cell suspensions and physiology results has provided a method which allows the production on a large scale of single somatic embryos displaying structural similarities with zygotic seed embryos. In order to establish an early clonal conformity testing procedure, molecular studies were carried out on both genomic DNA methylation changes and gene expression induced by tissue culture. Efforts will now being directed towards the exploitation of this new knowledge in the development of clonal conformity tests.



## INTRODUCCIÓN

Debido a la creciente demanda de palma de aceite, la escasez de tierra para sembrarla y el previsible aumento en los costos del cultivo, es necesario poner a disposición de los cultivadores material vegetal con mayor potencial genético. En la actualidad, el material vegetal disponible está compuesto principalmente por híbridos de Ténera (frutos con cuesco de grosor intermedio), que son el resultados de cruces entre tipos Dura (cuesco grueso) y Pisífera (cuesco delgado). El grosor del cuesco está controlado por un gen monofactorial denominado *Sh* (Beirnaert y Vanderweyen, 1941). Las estrategias de fitomejoramiento llevadas a cabo por los productores de semillas están encaminadas a la producción de híbridos de Dura x Pisífera entre cuyas características se encuentren: alta productividad de aceite con una proporción superior de ácidos grasos insaturados; baja tasa de crecimiento del estípite y, en algunos casos, resistencia/tolerancia a enfermedades como el marchitamiento vascular causado en África por *Fusarium oxysporum* F. sp. *elaeidis* (Hardon *et al.*, 1976).

Una característica original de la palma de aceite es su alta capacidad de multiplicación a partir de semillas. La cual permite a los mejoradores construir

familias de individuos de parientes completos para la evaluación efectiva de las habilidades combinatorias generales y específicas de los progenitores, si se ensayan en las estructuras apropiadas. Esta calidad, junto con la coexistencia de varias generaciones de palmas seleccionadas y de pruebas genéticas establecidas en una amplia red experimental extendida a lo largo de África, el Sureste Asiático y Latinoamérica, hacen de la palma de aceite una planta modelo para la genética cuantitativa del cultivo del árbol tropical.

El esquema de mejoramiento genético ejecutado por el Cirad y sus socios es una variación del esquema de selección recurrente recíproca que Comstock *et al.* (1949) aplicaron al maíz. Se basa en dos grupos de genotipos con componentes de rendimiento complementarios: el grupo A (poblaciones Deli, Angola) y el grupo B (poblaciones africanas), ensayados en combinación (Meunier y Gascon, 1972). Las etapas avanzadas del esquema de selección se basan en un número relativamente limitado de progenitores, que difieren en términos de origen y características genéticas. Aunque las técnicas utilizadas aún precisan optimización, la propagación vegetativa por embriogénesis somática desarrollada por el grupo Cirad-IRD ha abierto el camino para la selección clonal y la distribución en masa de los mejores progenitores que



no pueden reproducirse a partir de semilla. El avance genético en términos de producción de aceite es de 15-18% para el segundo ciclo de selección en Cirad (Cochard *et al.*, 1993), en comparación con el primer ciclo, y debería presentarse el 30% adicional por medio de la selección clonal de los mejores individuos obtenidos de las mejores progenies (Baudouin y Durand-Gasselin, 1991). No obstante, se han enfrentado limitaciones inherentes a varios factores, en particular: (i) la duración de una generación para el cultivo y los largos ciclos de selección (10-12 años) que tienen que establecerse en amplias áreas experimentales; (ii) el conocimiento limitado de la diversidad genética y el grado de heterocigocidad del material ensayado; (iii) la expresión fenotípica compleja de los principales caracteres fenotípicos que se han seleccionado; (iv) la imposibilidad de determinar en la etapa de vivero la variedad de los individuos que se sembrará, que resulta al no realizar ensayos de individuos Ténera x Ténera, cuyo 25% de individuos Pisífera son muy numerosos, y al no sembrar parcelas puras de Pisífera masculino seleccionado para la producción de semilla comercial de Dura x Pisífera.

Además de la naturaleza perenne y de las dimensiones de la planta, la falta de conocimiento del genoma de la palma aceitera impide el fitomejoramiento óptimo tradicional. En la actualidad, se tiene una idea clara de los requisitos, relacionados con un mejor conocimiento de la estructura genética de las poblaciones, la verificación de la identidad y heterocigocidad de las progenies, estudios más efectivos de los vínculos genéticos entre los caracteres seleccionados y, ante todo, la disponibilidad de ayudas tempranas de selección (Jones, 1989; Brown, 1993; Jack y Mayes, 1993; Mayes *et al.*, 1996b; Cheah *et al.*, 1999; Cheah, 2000).

Como cada ciclo de selección tiene una duración cercana a los 10 años, el mejoramiento genético es lento, inclusive habiéndose alcanzado progresos significativos en los últimos 50 años (Jacquemard *et al.*, 1997). Se observa una alta heterogeneidad entre los híbridos y algunas palmas producen 60% más aceite que el promedio de la progenie para un cruce dado (Noiret, 1981). Estas características deben considerarse junto con una baja densidad de siembra (generalmente 143 palmas por hectárea) y la necesidad de establecer viveros de semillas para la producción de material de siembra comercial; por tanto, puede

observarse que el mejoramiento de la palma es intenso en mano de obra y en tiempo y, por tanto, costoso. El enfoque biotecnológico que se le da al mejoramiento de la palma de aceite ha aumentado en importancia, en la selección asistida por marcadores, en la micropropagación y más generalmente en los estudios fisiológicos y moleculares de la expresión de genes de valor agronómico superior (floración, abscisión de frutos, etc.). Siguiendo el mandato del Cirad, éste y el IRD han aprovechado los trabajos en esta área con el objetivo final de desarrollar la agricultura tropical, obtener, proteger, multiplicar y diseminar entre los cultivadores el material genético mejorado de la palma de aceite.

## MEJORAMIENTO MOLECULAR

### Repaso de las principales investigaciones de los años noventa

El mejoramiento molecular puede entenderse como un procedimiento de mejoramiento diferente que utiliza la información molecular a nivel del ADN o del transcrito. Generalmente, los marcadores moleculares son etiquetas de ADN utilizadas para identificar y evaluar los genes de interés agronómico en una planta. Son neutros con respecto al medio ambiente, y pueden detectarse en cada etapa del crecimiento de la planta. Los marcadores moleculares son particularmente útiles en las especies perennes con ciclos generativos largos, ya que permiten las pruebas de selección temprana en el material mejorado. Además, desempeñan un papel crucial en el aislamiento y clonación de genes en las especies vegetales, con miras al diseño y uso de las secuencias de ADNc. El uso de los marcadores moleculares en la palma de aceite se inició principalmente en Malasia y el Reino Unido a principio de la década del noventa, para la identificación clonal y la cartografía genética (Cheah y Wooi, 1993; Mayes *et al.*, 1997). Se desarrolló de forma prospectiva, con la presencia de nuevas técnicas: estudios de diversidad genética de *E. guineensis* utilizando RFLP o marcadores RAPD (Cheah *et al.*, 1991; Shah *et al.*, 1994); genotipificación de RFLP de las accesiones de *E. guineensis* y *E. oleifera* (Jack *et al.*, 1995; Mayes *et al.*, 1996a); la búsqueda de marcadores de genes ADNc comprometidos en el desarrollo floral (Singh y Cheah, 1996, 2000) o genes

que codifican las enzimas de biosíntesis de ácidos grasos (Rashid y Shah, 1996; Shah y Cha, 2000); la búsqueda de marcadores RAPD de variantes somaclonales (Paranjothy y col., 1993; Chowdhury, 1993; Rival, 1998b); y la detección de RAPD de tolerancia a la pudrición del cogollo (Ochoa *et al.*, 1997). El Instituto de Fitomejoramiento publicó el primer mapa genético RFLP de la palma de aceite (Mayes *et al.*, 1997); aunque era incompleto -con 860 Mc cartografiados y 24 grupos de ligamiento comparados con 16 pares de cromosomas-, se constituyó en el primer paso hacia el uso racional de los marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares han permitido enriquecer el genoma a través de la selección fenotípica de características importantes.

Otro trabajo de cartografía se realizó en Brasil (Moretzsohn *et al.*, 2000) y en Malasia (Cheah *et al.*, 1999; Cheah, 2000).

Al principio, el trabajo de Cirad se concentró en el análisis molecular de la diversidad genética de *E. guineensis* utilizado en los programas de mejoramiento genético, con marcadores isoenzimáticos (Ghesquière, 1983), del germoplasma de *E. oleifera* utilizando

ADNc o sondas genómicas RFLP (Barcelos *et al.*, 1999) y cepas de patógeno de *Fusarium oxysporum* *F. sp. elaeidis* responsable de la enfermedad del marchitamiento vascular, con marcadores RFLP (Mouyna *et al.*, 1996). Además, se estudió el uso conjunto de los índices de selección y de los marcadores moleculares para optimizar el sistema de mejoramiento (Purba *et al.*, 2000, 2001).

### Desarrollo en masa de marcadores basados en microsatélites PCR

Cirad presta atención especial al uso de técnicas moleculares que han tenido éxito en otras plantas, y su posible transferencia a pequeñas unidades de

investigación en las estaciones experimentales de palma de aceite en ultramar. Las repeticiones de secuencias simples (SSR), también llamadas microsatélites, son alineamientos en tándem de motivos nucleótidos simples que son componentes ubicuos de los genomas eucarióticos (Delseny *et al.*, 1983; Tautz, 1989; Tautz y Renz, 1984). Heredados de forma mendeliana (Saghai Maroof *et al.*, 1994; Weissenbach *et al.*, 1992), su polimorfismo de longitud hipervariable se revela simplemente por la reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando cebadores flanqueantes que generan marcadores codominantes.

Smith *et al.* (1997) describieron la tecnología SSR como algo que presenta las ventajas de confiabilidad, reproducibilidad, discriminación, estandarización y costo-eficacia. El Cirad ha emprendido el desarrollo en masa de marcadores basados en PCR microsatelitales, con el fin de desarrollar estudios de diversidad genética, identificación varietal, análisis de pedigrí al igual que cartografía de los genomas y detección de QTL para las actividades de selección asistida por marcadores. Billotte *et al.* (1999) elaboraron una técnica rápida y simple para la construcción de bibliotecas enriquecidas con microsatélites a partir de una metodología de captura basada en la hibridación, que utiliza oligosondas microsatelitales marcadas con biotina y perlas magnéticas recubiertas con estreotavidina. Esta técnica permitió la construcción de varias bibliotecas enriquecidas de palma de aceite (GA)<sub>n</sub>, (GT)<sub>n</sub> o (CCG)<sub>n</sub> a partir del ADN genómico total. Alrededor de 400 pares de cebadores funcionales para la amplificación microsatelital en el ADN de la palma de aceite fueron diseñados y caracterizados (Billotte *et al.*, 2001 y 2005). Un uso óptimo de los marcadores SSR de *E. guineensis* se observó en la especie estrechamente relacionada *E. oleifera*. Los análisis de datos multivariados mostraron la habilidad de los marcadores SSR de revelar eficientemente la estructura de la diversidad genética del género *Elaeis* de conformidad con los orígenes geográficos conocidos y la relación genética medida en estudios moleculares previos. Altos niveles de variabilidad genética indicaron que SSR en *E. guineensis* es una herramienta poderosa para los estudios genéticos del género *Elaeis* que incluye la identificación varietal y la cartografía genética intra- o interespecífica. Las pruebas de amplificación de PCR, de un subconjunto de otras



16 especies de palmas, y los datos de las secuencias alélicas mostraron que SSR en *E. guineensis* son marcadores putativos transferibles a lo largo de la unidad taxonómica de la palma y, según las secuencias flanqueantes conservadas, se trata de un recurso molecular de utilidad potencial para cualquier investigador que estudia la filogenia de la unidad taxonómica de la palma. Estos marcadores microsatelitales son la base principal en la estrategia de selección asistida por marcadores que el Cirad desarrolla para la palma de aceite, en colaboración con sus socios.

### **Estrategia de selección asistida por marcadores para la palma de aceite**

Los marcadores moleculares han permitido enriquecer el genoma a través de la selección fenotípica de características importantes, mediante la selección indirecta sobre la base de marcadores estrechamente ligados a los genes de interés (Gallais, 1993) y, para áreas experimentales idénticas, se ha logrado más rápidamente un mayor progreso genético. En términos generales, los marcadores moleculares desarrollados en la palma de aceite permitirán la evaluación de todos los progenitores que se utilizan en los programas de mejoramiento, y seleccionar solamente aquellas palmas que portan los alelos favorables de los genes agronómicos -desde la etapa de vivero- para un mayor mejoramiento o para la producción de semilla. Además, los marcadores moleculares que se buscan en todas partes para satisfacer los objetivos específicos de algunas regiones geográficas (resistencia al marchitamiento vascular en África, resistencia a la pudrición del cogollo en Latinoamérica), una vez identificados, permitirán seleccionar los progenitores disponibles y realizar una selección asistida por marcadores del germoplasma más apropiado para estas regiones. La mayoría de las características agronómicas que están bajo el control de varios genes que interactúan con efectos menores, se denomina Locus de un Carácter Cuantitativo o QTL. Poco se conoce del número y del efecto de estos genes, que lleva a una selección fenotípica imprecisa. El concepto de selección asistida por marcadores (MAS) asume que existe un fuerte vínculo genético entre los marcadores y los locus de los genes estudiados. Comprende necesariamente la cartografía genética previa de las especies (Mohan y col., 1997). Los marcadores están ubicados en el genoma, de una forma

suficientemente densa para que cada locus esté fuertemente unido al menos a uno de estos. En una segunda etapa, la detección del locus y la evaluación de los efectos de los genes valiosos se basa en un estudio de la relación entre el polimorfismo molecular de los marcadores y la variación de las características estudiadas (Charcosset, 1996). En esta etapa, el valor aplicado de la detección de QTL utilizando marcadores, depende de la adopción de un diseño experimental que permite una estimación del tipo (aditivo, dominante) y de la estabilidad de los efectos del QTL (bases genéticas, medio ambiente). La investigación biomolecular aplicada a la selección asistida por marcadores de la palma de aceite tiene un enfoque de largo plazo. Las diferentes etapas identificadas y emprendidas por Cirad para la palma de aceite se presentan en detalle más adelante (Billotte y Baudouin, 1997).

### **Establecimiento de un mapa genético de referencia para la palma de aceite**

Además de brindar conocimiento adicional sobre el genoma, el objetivo de trazar mapas de referencia de una especie dada es la selección racional de marcadores y progenitores que se usarán posteriormente en los planes de selección asistida por marcadores. Un cruce de control de Ténera La Mé x Dura Deli (LM2T x DA10D) ampliamente utilizada en el sistema de mejoramiento fue seleccionada por el Cirad para establecer un mapa de enlaces de ligamiento de alta densidad de la palma de aceite (Billotte *et al.*, 2005). Un conjunto de 277 pares de cebadores SSR (256 de la palma de aceite y 21 del coco) y de 126 pares de cebadores EcoRI/MseI o TaqI/HindIII AFLP se utilizaron para la genotipificación de 116 individuos de este cruce. El mapa se construyó bajo JOINMAP 3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001). Un marco denso y amplio a escala del genoma de microsatélites, al igual que de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados saturados (AFLP), permitió la construcción de un mapa de ligamiento que consistía en 255 microsatélites, 688 AFLP y el locus del gen Sh, que controla la presencia o ausencia del cuesco en el fruto de la palma de aceite. Se cartografió un marcador AFLP E-Agg/M-CAA132 a 4.7 cM del locus Sh. Los 944 marcadores genéticos estaban distribuidos en 16 grupos de ligamiento (LG) y cubrían 1,743 cM. Nuestro mapa de ligamiento es el primero en la palma

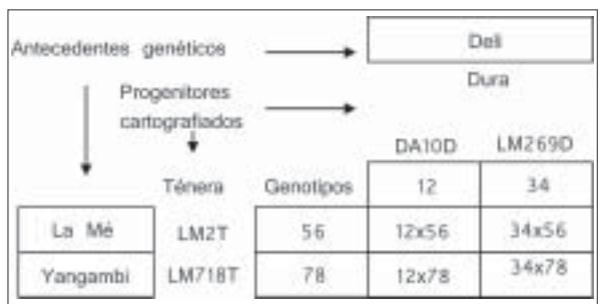
de aceite que tiene 16 grupos independientes de grupos de ligamiento que corresponden a los 16 pares de cromosomas homólogos de la planta. Además, es el único mapa de ligamiento de alta densidad con tantos marcadores satelitales en una especie *Arecacea*. Así mismo, representa un paso importante hacia el análisis de QTL y la cartografía física en la especie *E. guineensis*.

**Establecimiento paralelo de un mapa de consenso de progenitores múltiples**

El trabajo teórico realizado por Muranty (1996 y 1997) mostró que un mapa de consenso de progenitores múltiples, establecido con varios progenitores (al menos de cuatro a seis), y de familias de parientes completos ligadas dentro de un diseño de apareamiento factorial o dialélico, es el más efectivo en la búsqueda de QTL apropiados para su uso en selección asistida por marcadores. Además de garantizar una detección más precisa en comparación con un solo mapa de dos progenitores, debido al análisis de una diversidad alélica parental mayor, al igual que un número creciente de progenies cartografiadas, permite igualmente una evaluación de los efectos del QTL dependiendo de su tipo (aditivo, dominante) y de bases genéticas diferentes. Este mapa de progenitores múltiples fue establecido por el Cirad en colaboración con Socfindo (Indonesia), utilizando marcadores satelitales en un diseño de apareamiento factorial completo de 2 x 2 de cuatro progenitores no relacionados (Figura 1), que se había observado para la mayoría de los caracteres de producción y vegetativos (Billotte *et al.*, en preparación). Los cuatro progenitores pertenecían a la población africana La Mé (Ténera LM2T), a la población africana Yangambi

(Ténera LM718T) y a la población Deli introducida a Indonesia en el siglo XIX (Dura DA10D, Dura LM269D). El genoma de cada progenitor era una mezcla de partes fijas y heterocigotas (es decir, obtenidas de intercrucos sucesivos, retrocrucos o generaciones de autofecundación de los antepasados). La población del mapa de progenitores múltiples consiste en cuatro familias parientes completos de Dura x Ténera, que incluyen la población del mapa de referencia LM2T x DA10D, utilizada anteriormente para el establecimiento del mapa de ligamiento de alta densidad. Cada familia es un cruce sencillo entre dos progenitores heterocigotas: una hembra de la variedad de fruto ténera (genotipo Sh-/Sh+), un macho de la variedad de fruto dura (genotipo Sh+/Sh+). Cada cruce estuvo representado por 61 parientes completos Ténera o Dura, entre las palmas en producción que sobrevivieron (legítimas, normales y sanas). Un conjunto adicional de 55 parientes completos LM2T x DA10D completaron el diseño del mapa de ligamiento, es decir, un total de 299 genotipos.

Se aplicó una metodología paso a paso para construir el mapa de consenso de progenitores múltiples. Principalmente, se basó en: 1) La selección de 277 locus SSR para la cartografía de ligamiento, que incluye 255 SSR cartografiados en el mapa de ligamiento de alta densidad de LM2T x DA10D (Billotte *et al.*, 2005). Los criterios para seleccionar estos SSR fueron: (i) una buena distribución a lo largo del genoma, con una densidad promedio de 10 a 20 cM, que es apropiada para el análisis QTL (Muranty, 1997); (ii) una proporción tan grande como sea posible de locus comunes a ambos progenitores de un cruce dado y/o de cruces diferentes, para establecer un mapa de ligamiento de biprogenitores para cada cruce y el mapa de consenso de múltiples progenitores del diseño de apareamiento factorial. 2) Un mapa de ligamiento SSR integrado, establecido para cada cruce utilizando el software Carthagene (Schiex y Gaspin, 1997), que de forma simultánea genera y estima la confiabilidad de varios mapas de probabilidad multipuntos. Cada cruce entre los progenitores homocigotas se consideró como un cruce doble de pseudo-prueba (Grattapaglia y Sederoff, 1994). La función cartográfica Haldane se utilizó para convertir las frecuencias de recombinación en distancias del mapa (Haldane, 1919). 3) La integración de los



**Figura 1.** Sistema de cartografía de progenitores múltiples de cuatro familias relacionadas de parientes completos.

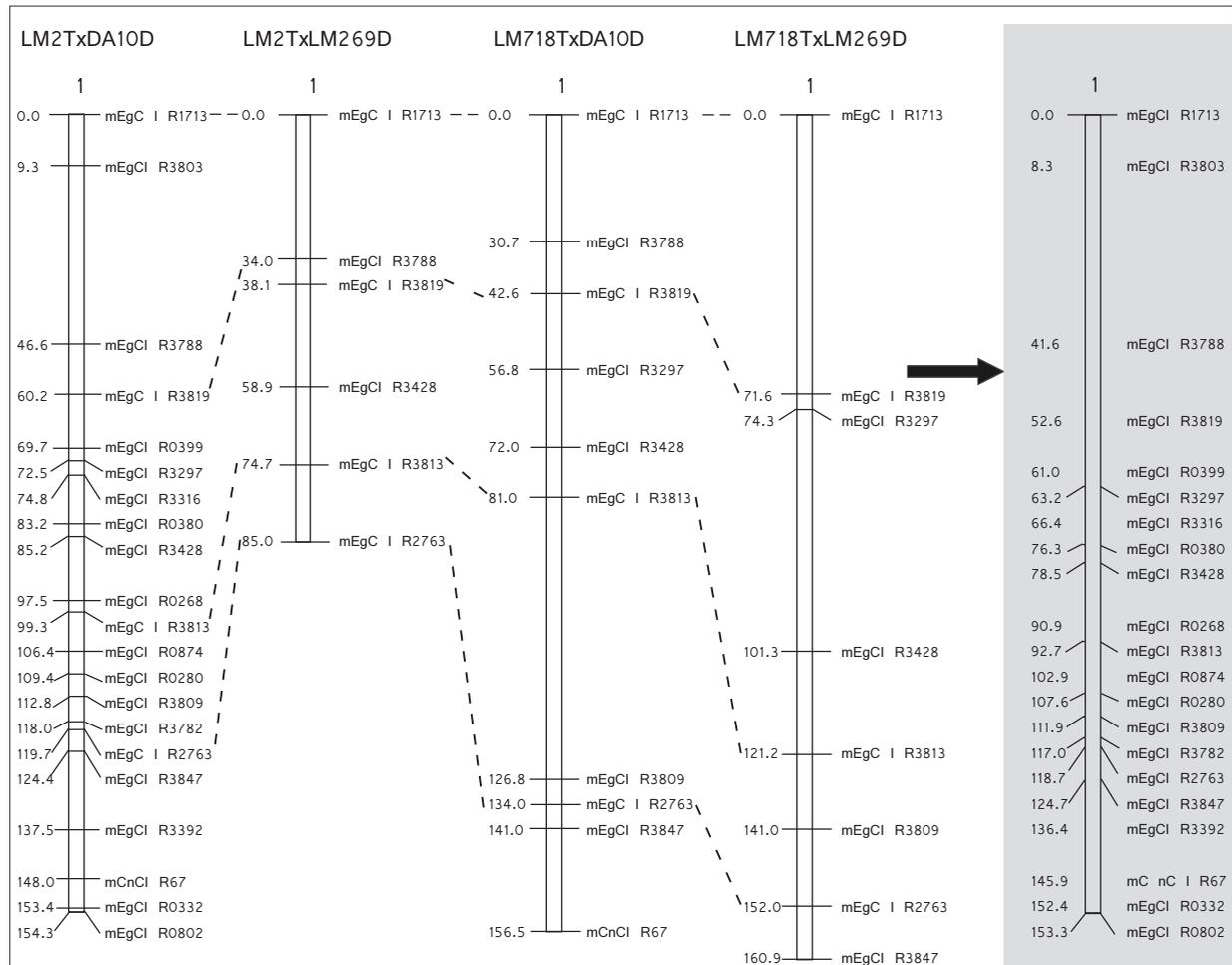


cuatro mapas individuales de ligamiento en un mapa único de consenso Haldane del diseño factorial, utilizando Carthagene, gracias a los marcadores comunes SSR que conectan los mapas individuales (Figura 2). El mapa integrado SSR para LM2T x DA10D tenía 16 grupos de ligamiento y 253 locus, de los cuales 251 eran SSR, el locus Sh y su marcador E-Agg/M-CAA132. Medía 1479 cM con una densidad promedio de marcado de 6 cM. Los mapas de ligamiento de SSR de los otros tres cruces, se elaboraron con locus marcadores de 111, 130 y 93, respectivamente, inclusive con el locus Sh. En promedio, 3 locus SSR eran comunes a los cuatro mapas en cada grupo de ligamiento (48 en total). El único mapa de consenso del diseño factorial de 2 x 2 constaba de 253 locus (251 SSR, el locus Sh y su

marcador E-Agg/M-CAA132). El mapa de consenso SSR que mide 1731 cM reveló una buena cobertura genómica, salvo en algunos casos en las regiones distales de los cromosomas. La densidad promedio del marcador para ese mapa era de 7 cM.

**Búsqueda de QTL útiles o genes mayores**

El QTL (locus de característica cuantitativa) para las características cuantitativas y de rendimiento, se detectó al estudiar la correlación existente entre los marcadores y los caracteres fenotipicos de los individuos que pertenecen al mapa de consenso de progenitores múltiples del diseño de apareamiento factorial de 2 x 2, descrito anteriormente (Billotte *et al.*, en preparación). La búsqueda de QTL por medio de cartografía de ligamiento de múltiples progenitores



**Figura 2.** Integración de cuatro mapas individuales de ligamiento SSR del diseño de apareamiento factorial de 2 x 2, en un mapa de consenso único de ligamiento de progenitores múltiples, bajo el software Carthagene (Inra, Francia) – Caso del grupo de ligamiento N° 1.

se realizó utilizando un nuevo algoritmo, intercruce MCQTL (Inra, Francia), desarrollado para cruces entre progenitores heterocigotos. El algoritmo, que actualmente puede utilizarse en otras especies de polinización cruzada, se utilizó para ensayar dos modelos lineales aditivos para búsquedas QTL, un modelo de un solo cruce para manejar cada cruce sencillo de forma separada, y un modelo interfamiliar para ligar los cruces múltiples. La caracterización individual de 26 características fenotípicas cuantitativas comprometidas en el crecimiento y rendimiento vegetativo confirmó que el determinismo aditivo genético era pertinente para explicar su variación en la palma de aceite. Un conjunto de 84 QTL comprometidos en estas

Los estudios moleculares generales de la diversidad genética de la palma de aceite y de *E. oleifera* americana se basarán parcialmente en marcadores QTL.



características se identificó por medio de un método de búsqueda iterativa a través del cual los modelos podrían aplicarse a múltiples QTL por cromosoma. No se identificó ningún QTL de rendimiento en la región genómica del gen mayor Sh, una vez que se corrigieron los efectos de ese locus antes del análisis QTL. Una comparación de los re-

sultados de detección de QTL indicó que el modelo interfamiliar se mostró eficiente e indispensable, aunque no se descartó la necesidad del análisis de un solo cruce para respaldar la veracidad del QTL detectado, en el caso de las poblaciones del mapa de la palma de aceite con pequeños números de individuos. Se realizó un meta-análisis (Goffinet y Gerber, 2000) del QTL para definir la proximidad cromosómica y esbozar su uso potencial en una estrategia de selección asistida por marcadores. La variabilidad de los efectos de QTL también se debería estudiar dependiendo del entorno, con base en la progenie de control duplicada bajo diferentes condiciones agroclimáticas.

Cirad seleccionó un cruce Deli DA115D x La Mé LM2T de 232 individuos para realizar la búsqueda del QTL de la tolerancia genética al marchitamiento vascular (basado en la prueba de tolerancia en el vivero realizada en Côte d'Ivoire, en colaboración con CNRA [Centre National de Recherche Agronomique]). La búsqueda de material tolerante a la pudrición del cogollo en Latinoamérica, también se realizará mediante la cartografía genética de los genes tolerantes en la especie americana *E. oleifera* (Le Guen et al., 1991) para lograr su introgresión en *E. guineensis* mediante retrocruce asistido por marcadores. Este último proyecto se basa en la cartografía genética de un retrocruce interespecífico de primera generación (BC1) para el que se evalúa la resistencia a la pudrición del cogollo de cada genotipo, mediante la prueba en el terreno de 200 descendientes clonales que se sembraron dentro del diseño experimental en un área fuertemente afectada por la enfermedad.

#### **Validación de los marcadores moleculares para la selección asistida por marcadores**

Los sistemas de ensayos en el terreno (FTS) que constan de varias poblaciones que utilizarán el Cirad y sus socios para programas futuros de selección asistida por marcadores, se están estableciendo mediante el uso de nuevos diseños genéticos factoriales sembrados en diferentes sitios y que consisten en varios miles de genotipos y comprometen a los progenitores más interesantes (familias de parientes completos). Los objetivos son ensayar la precisión de los marcadores moleculares en las familias de parientes completos resultantes de bases genéticas amplias y dedicadas a una amplia identificación de diversidades entre y dentro de poblaciones de QTL mediante el uso tanto de germoplasma de *E. guineensis* como de *E. oleifera*. Además. Los resultados se integrarán en los programas en curso, de mejoramiento de la palma de aceite, en forma de una estrategia de selección aplicada de caracteres múltiples asistida por marcadores para los genes útiles. Se utilizarán varios progenitores, incluyendo las palmas que se sospecha o se sabe que presentan factores de resistencia genética a enfermedades letales causadas por *Ganoderma* o *Fusarium oxysporum*. Algunas pruebas ensayarán los retrocruces interespecíficos de primera o segunda generación para la detección asis-



tida por marcadores y la rápida introgresión de caracteres importantes de *Elaeis oleifera* en la palma de aceite: bajo crecimiento y alta calidad del aceite, pero también los factores de resistencia genética a las enfermedades letales como pudrición del cogollo, ganoderma y marchitamiento vascular. Esta red de ensayos genéticos en el terreno que se estableció para validar los marcadores QTL también se dedica a la implementación de estrategias de selección asistidas por marcadores, y a la búsqueda de la cartografía física para la caracterización, clonación y etiquetado de los genes útiles. Además, los estudios moleculares generales de la diversidad genética de la palma de aceite y de *E. oleifera* americana se basarán parcialmente en marcadores QTL, y determinarán el potencial para aplicar la diversidad natural, particularmente para predecir la heterosis, especialmente a través de estudios del desequilibrio del ligamiento realizados en poblaciones naturales o seleccionadas de acuerdo con la metodología de Reich *et al.* (2001), que primero se aplicó a los humanos y hoy día se utiliza para las especies vegetales (Jannoo, 1999; Remington *et al.* 2001).

### **Genómica estructural y funcional**

Los marcadores utilizados para la cartografía en las especies perennes son principalmente marcadores neutros dirigidos a ADN genómico anónimo. Los marcadores obtenidos en el análisis de QTL se determinan a través de un procedimiento estadístico. Generalmente, solo están asociados (es decir, más o menos ligados) con las características de interés. Por tanto, su uso es limitado en la identificación del gen responsable o en la búsqueda de variantes alélicas más eficientes del gen, en las colecciones de germoplasma. Diferentes herramientas novedosas se han desarrollado para el aislamiento de genes, las cuales se aplican hace poco e incluyen:

(i) EST (Etiqueta de Secuencia Expresada) de secuencias de ADNc – La búsqueda de genes candidato a través de estudios de expresión es una alternativa, en la estrategia de cartografía fina fisicogenética, para el aislamiento de un gen. Con base en el ARN mensajero (ARNm), se refiere a la construcción de librerías de ARNm expresado, que posteriormente se convierte, por medio de RT-PCR, en secuencias de ADNc, de las que se puede analizar la EST (Etiqueta de Se-

cuencia Expresada). El laboratorio de Cirad-IRD en Montpellier ha establecido una colección de varias librerías de ADNc de palma de aceite y EST que representan genes expresados en tejidos específicos del fruto y etapas de desarrollo floral de interés (Jouanic *et al.*, 2005). El objetivo es ensamblar un catálogo extensivo de genes, que pueden seleccionarse por sus afinidades de secuencia (similitud con los genes conocidos de interés), a través de diferentes técnicas de análisis o mediante el uso de selección de alta producción con macro o micro alineamientos para controlar sus patrones de expresión.

(ii) Cartografía física de clones BAC – Una librería de clones de palma de aceite BAC se encuentra disponible en el Cirad para la cartografía física (Piffanelli *et al.*, 2002). Se construyó sobre el genotipo Ténera LM2T y comprende 92.160 clones de 120 kb en promedio, que representan 6 equivalentes de genoma.

(iii) Cartografía ADNc-AFLP – los chips de ADNc son una buena herramienta para el análisis de la expresión genómica, pero es necesaria la información detallada sobre su secuencia o al menos una gran colección de fragmentos de ADNc. Si estos elementos no están disponibles, la técnica ADNc-AFLP de Bachem *et al.* (1996, 1998) es más asequible y apropiada para este tipo de análisis. Este método AFLP en el ADNc puede utilizarse para identificar los genes comprometidos en varios procesos biológicos. Es complementario de la tecnología del chip y útil en el descubrimiento de genes (Breyne y Zabeau, 2001). Existen procedimientos para el enriquecimiento de fragmentos de ADNc, utilizando PCR y etapas de hibridación como las descritas por Diatchenko *et al.* (1996) o Ivashuta *et al.* (1999). Una búsqueda de genes de expresión específica en el fruto de la palma de aceite, se realizará principalmente combinando la técnica ADNc –AFLP y la metodología de Michelmore *et al.* (1991) aplicada a la identificación del gen Sh que codifica para el cuesco en el fruto de la palma de aceite.

(iv) Display diferencial de ADNc – La obtención de ADNc por otros métodos, como el display diferencial, es complejo pero es un enfoque complementario. El Cirad utiliza actualmente el display diferencial para el análisis de transcritos a fin de identificar los genes comprometidos putativamente en la anomalía somaclonal del manto (ver parte B.4.) al igual que la del gen Sh.

(v) Tecnología de macro y micro-alineamientos – Es claro que entre las herramientas novedosas desarrolladas por Cirad e IRD para la identificación y el marcaje intragénico de los genes útiles se encuentran los macro y micro-alineamientos de fragmentos genómicos de ADN (cartografía física) o los ADNc expresados.

## MICROPROPAGACIÓN CLONAL Y ACTIVIDADES ASOCIADAS DE INVESTIGACIÓN

Las limitaciones que existen en el fitomejoramiento de la palma de aceite conducen a la necesidad de desarrollar una técnica de propagación vegetativa que permita: (1) la explotación de la variabilidad existente entre los híbridos de Ténera por medio de la clonación de individuos élite (Noiret, 1981); (2) el aumento en la producción de semillas de alta calidad mediante la clonación del mejor progenitor masculino (Pisífera), ya que la producción de polen puede ser un factor limitante (Hartley, 1988; Krikorian, 1989); (3) la explotación de híbridos interespecíficos (*E. guineensis* x *E. oleifera*), un número limitado de los cuales son fértiles, pero que pueden mostrar una buena tolerancia a las plagas y enfermedades, especialmente en Suramérica (Meunier, 1975); (4) la producción de semillas biclonales a partir de progenitores derivados de embriogénesis somática (Hartley, 1988); (5) La regeneración auténtica de material de ingeniería genética que porta características agronómicas útiles (Rival, 2000).

### Propagación a gran escala a través de cultivos embriogénicos de suspensión celular

El grupo Cirad-IRD realizó una investigación (de Touchet *et al.*, 1991; Duval *et al.*, 1995a,b; Aberlenc-Bertossi *et al.*, 2000) con el fin de desarrollar nuevos métodos de micropropagación a gran escala de la palma de aceite. El desarrollo de un protocolo de regeneración, basado en el uso de suspensiones celulares embriogénicas, ofrece un método que permite la producción a gran escala de embriones somáticos únicos que exhiben similitudes estructurales con embriones de semillas cigóticas. Cirad-Irad establecieron suspensiones celulares embriogénicas de callos friables, nodulares (Duval *et al.*, 1995a). La suspen-

sión embriogénica se preparó mediante la disociación del callo inicial en un medio líquido agitado y posteriormente se seleccionaron los nódulos meristemáticos que se multiplican en presencia de 2,4-D durante subcultivos posteriores. Varias observaciones histológicas revelaron la considerable homogeneidad de los tejidos y la forma de proliferación de la suspensión celular. La tasa de crecimiento de la suspensión fue de 2 a 3 por ciclo de cultivo mensual. La transferencia de agregados celulares a un medio líquido libre de reguladores de crecimiento, durante cuatro semanas, activó la expresión de la embriogénesis. Los agregados celulares posteriormente se diferenciaron en pro-embriones que consistían en células meristemáticas. Esta etapa, que se reduce a la supresión de la auxina, es esencial para detener la proliferación e inducir la expresión de la embriogénesis. Al final de esta etapa, se filtró la suspensión (malla de 1mm), con el fin de mantener solo los agregados más pequeños, que son los únicos capaces de desarrollarse en plántulas individualizadas. Posteriormente, se alcanzó la maduración del embrión dispersando el filtrado en un medio sólido, a una tasa de 0,05ml PCV (volumen de células empaquetadas) por plato Petri, que lleva a la diferenciación de unos 300 embriones por plato, bajo estas condiciones. Las primeras fases de este paso estuvieron caracterizadas por la formación de una epidermis, que da una apariencia blanca brillante a los embriones, seguida de la diferenciación tanto del brote como de los polos radiculares. En muchos casos, solamente se podía observar el desarrollo radicular. La modificación de la relación auxina/citoquina, a través de la adición de 5 $\mu$ M BAP (bencilaminopurina) en el medio de maduración, condujo a un aumento significativo en el número de brotes individualizados, con una concomitante parada del desarrollo radicular. El sistema de producción que se utiliza actualmente en nuestro laboratorio comprende cuatro etapas diferentes: proliferación con 2,4-D en medio líquido, pretratamiento en medio líquido sin regulador de crecimiento, maduración en medio gelificado, germinación en medio gelificado. Hasta la fecha, se han mejorado con éxito los protocolos para las suspensiones celulares embriogénicas. Es claro que los esfuerzos de investigación sobre la implementación de la producción basada en el uso a gran escala de

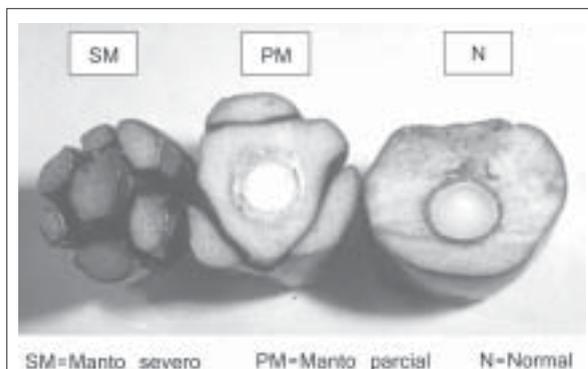


suspensiones celulares embriogénicas, ha estado en peligro por el problema crítico de la variación somaclonal (Figura 3). Por tanto, se están realizando estudios en el terreno para la evaluación de la fidelidad clonal de las plántulas que provienen de cultivos de suspensiones celulares mejoradas. Los primeros resultados que se obtuvieron de los clones derivados de cultivos suspendidos son bastante alentadores. Se podría seguir una estrategia de manejo, basada en la criopreservación secuencial de las líneas embriogénicas, que hoy día es viable en el laboratorio de Cirad-Irad, con el fin de reducir el riesgo de perder la capacidad embriogénica en las suspensiones, durante la multiplicación (Chabrilange *et al.*, 2000). Además, se precisa planear la producción simultánea de un número limitado de embriones a partir de un gran número (10-20) de líneas clonales, para mantener la base genética más amplia posible para la producción clonal.

### Estudios de fisiología de los materiales *in vitro*

#### Maduración de embriones

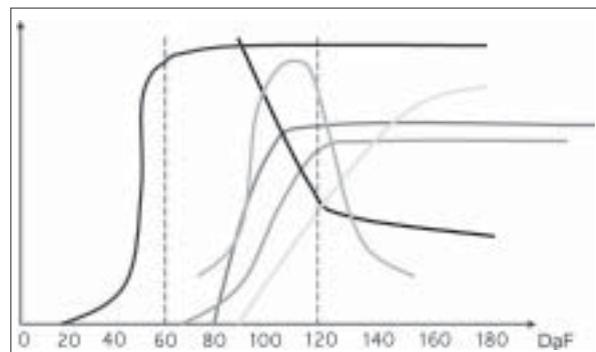
Los embriones somáticos de la palma de aceite producidos de los cultivos embriogénicos en suspensión presentan una maduración incompleta, y se desarrollan directamente de la germinación sin pasar por una fase quiescente (Aberlenc-Bertossi *et al.*, 1999). Se realizaron estudios para mejorar el conocimiento de la biología del desarrollo embrionario y la identificación de factores (azúcares, ABA y proteínas de almacenamiento) comprometidos en la maduración, un paso crítico para la determinación de la calidad del embrión somático en varias especies



**Figura 3.** Frutos de la palma de aceite afectados por la anomalía floral homeótica del manto.

(Merkle *et al.*, 1995). En resumen, la adquisición de la tolerancia a la deshidratación entre el tercero y el quinto mes, se asociaba con los azúcares y la síntesis de ABA (Figura 4), y subrayaba el papel de estos componentes en el fenómeno (Aberlenc-Bertossi *et al.*, 1995, 2001). El enriquecimiento del medio con sacarosa y ABA mejoró la maduración del embrión somático y la tolerancia a la deshidratación, que no obstante sigue siendo incompleta al compararla con los embriones cigóticos (Aberlenc-Bertossi *et al.*, 2001). Se caracterizó la acumulación de proteínas de almacenamiento durante el desarrollo del embrión de la palma de aceite (Morcillo *et al.*, 1997). La acumulación de globulinas 7S, las principales proteínas de almacenamiento de la palma de aceite, se caracterizó en los embriones cigóticos y somáticos (Morcillo *et al.*, 1998, 1999). Se encontró que la cantidad de globulinas 7S en los embriones somáticos, aumentaba durante las primeras etapas de desarrollo, pero era unas 80 veces menor que en los embriones cigóticos. La producción *in vitro* de globulinas 7S (y con mayor frecuencia de proteínas solubles en sales) mejoró al agregar al medio de cultivo glutamina, arginina, sacarosa y ABA, ya que los efectos de estos componentes son aditivos (Morcillo *et al.*, 1999). Se ha realizado el análisis de caracterización y expresión del gen GLO7A de la palma de aceite, que codifica una proteína globulina 7S (Morcillo *et al.*, 2001).

Estos resultados alcanzados con los embriones somáticos nos permiten definir las condiciones de cultivo *in vitro* para una mayor tolerancia a la deshidratación y la acumulación de proteínas de almacenamiento de los embriones somáticos. Estos resultados tam-



**Figura 4.** Cambios en los parámetros bioquímicos y fisiológicos que se presentan *in planta* a través de la embriogénesis de la palma de aceite.

bién abren el camino para el uso de “semillas artificiales” en la palma de aceite obtenidas de embriones producidos a una alta tasa de suspensiones celulares embriogénicas, que posteriormente podrían tratarse de forma correcta para alcanzar la maduración natural (enriquecimiento en proteínas de almacenamiento). Los embriones somáticos únicos posteriormente se encapsularían y almacenarían (ya sea a temperatura ambiente o a 0-4°C) antes de su entrega en el momento apropiado, según la estación de siembra, a los laboratorios de cultivos de tejido o a los viveros que se encuentran cerca a las plantaciones, donde podría realizarse la germinación *in vitro* o *ex vitro*.

### **Fisiología de las plantas *in vitro***

Después de la inducción con tratamiento de auxinas, el desempeño del enraizamiento *in vitro* de los brotes de la palma de aceite varía ampliamente. Los estudios sobre los cambios en la actividad de guayacolperoxidasa como un marcador del enraizamiento *in vitro* de las plántulas clonales de palma de aceite de Rival *et al.* (1997a) han llevado a la implementación de un protocolo mejorado de enraizamiento, que se ha desarrollado con éxito en unidades de producción a gran escala. En la actualidad, se utiliza un paso único de enraizamiento, con un tratamiento con auxinas que se aplica durante un período de tiempo mucho más largo (8 semanas) utilizando concentraciones menores de NAA (ácido naftaleno acético) (0.5-1.0 mg.l<sup>-1</sup>). Se han realizado varios estudios de fotosíntesis *in vitro* y de aclimatización en la palma de aceite a fin de reducir las pérdidas por aclimatización (Rival *et al.*, 1994, 1996, 1997b,c,d, 1998a). Este problema fisiológico ha tenido un serio impacto en los costos de producción, porque se presenta en la etapa final del proceso de cultivo. Los parámetros fotosintéticos *in vitro* de las plántulas somáticas se han medido a través del procedimiento de clonación basado en la embriogénesis de Cirad-IRD, con el fin de caracterizar el estado fisiológico de las plantas regeneradas *in vitro* y así optimizar las tasas de éxito durante la aclimatización (Rival *et al.*, 1997c). La medición *in vivo* de la fluorescencia de la clorofila indicó que la actividad fotoquímica máxima del fotosistema II (PSII) era muy baja en los embriones proliferantes y presentó un fuerte aumento en etapas posteriores de desarrollo, llegando finalmente a una actividad muy cercana a la

medida en plantas aclimatadas. Las mediciones de intercambio de CO<sub>2</sub> mostraron que los niveles absolutos de la fotosíntesis *in vitro* eran muy bajos, pero mensurables.

Las actividades de las dos enzimas primarias de la fijación de CO<sub>2</sub>, es decir PEPC (Fosfenol piruvato carboxilasa, EC 4.1.1.31) y RubisCO (Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa, EC 4.1.1.39), se midieron por el proceso de micropropagación. La relación PEPC: RubisCO disminuyó de forma progresiva, debido a un agotamiento sustancial de la actividad de PEPC. Todos los parámetros fotosintéticos estudiados (actividades de carboxilasa, actividad fotoquímica, intercambio CO<sub>2</sub>) indican que se puede medir la actividad fotosintética de la palma de aceite, en una etapa temprana, desde el primer paso de calogénesis, que muestra un aumento importante durante la segunda etapa. Posteriormente, la fotosíntesis disminuyó durante el crecimiento radicular. En relación con la clasificación de Grout (1988), puede suponerse que la palma de aceite pertenece a la clase de plantas en las que las hojas que crecen *in vitro* pueden contribuir a la autotrofia y posteriormente desempeñar un papel activo en la aclimatización. Por tanto, es altamente probable que las pérdidas por aclimatización se deban principalmente a un enraizamiento malo o incompleto y/o a un manejo inapropiado del ambiente de las vitroplantas (especialmente en relación con la HR) durante este paso tan crítico.

### **Tasa global de metilación de ADN de las variantes somaclonales**

En los últimos años se ha acumulado evidencia sobre el importante papel que desempeña la metilación del ADN a escala del genoma, en la regulación del desarrollo de la planta (Finnegan *et al.*, 2000). Los patrones de metilación de ADN se establecen y mantienen por medio de las ADN metiltransferasas, que catalizan la transferencia del grupo metilo de S-adenosilmetionina (SAM) a la posición C-5 en el anillo pirimidina de la citosina. En las plantas, los residuos 5mC se encuentran principalmente en las secuencias simétricas CpG y CpNpG, pero también se presentan en las citosinas en las secuencias no simétricas. Se ha mostrado que los cambios en la metilación de ADN sobre los residuos de la deoxicitidina (dC) están comprometidos en la regulación de la expresión del

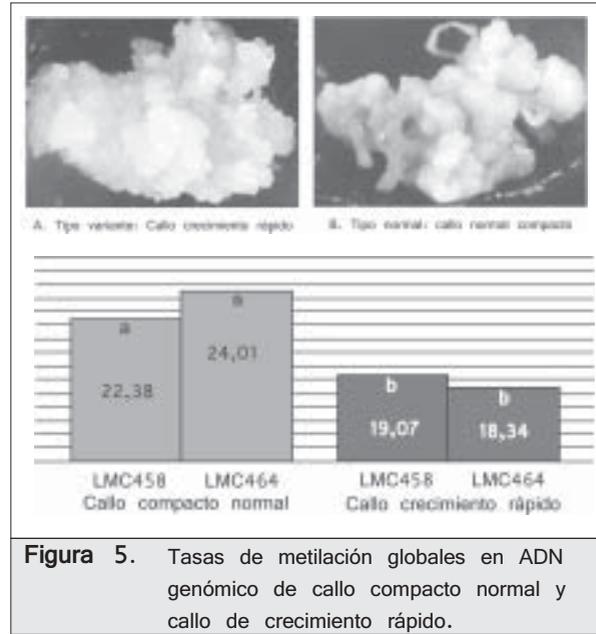


gen a nivel transcripcional, particularmente durante los procesos de diferenciación/dediferenciación y como una respuesta a una gama de estrés ambiental. La variación somaclonal es una variación fenotípica que se presenta en los regenerantes vegetales y su origen puede ser genético, (mutaciones, reordenamientos cromosómicos), aunque un cuerpo de datos crecientes sugiere que los cambios epigenéticos (a escala del cromosoma sin modificación en las secuencias de ADN), están asociados con este fenómeno.

Los protocolos de micropropagación comprenden con frecuencia tratamientos con reguladores del crecimiento, que pueden afectar el nivel de metilación de ADN. En la actualidad, es claro que los mecanismos epigenéticos desempeñan un papel importante en la variación somaclonal, que podría no ser el resultado de un solo mecanismo causal (Finnegan *et al.*, 1993; Kaeppler *et al.*, 2000). El equipo de investigación de Cirad-IRD primero decidió utilizar un enfoque global para la investigación de la tasa de metilación de ADN, encaminado a revelar las diferencias entre el material vegetal *in vitro* normal y variante en la palma de aceite. Usando dos métodos de cuantificación a escala del genoma (estimación de HPLC de concentraciones totales de 5mdC y saturación *in vitro* de sitios CG con grupos metilo por medio del ensayo de aceptación de metilasa Sssl), al igual que métodos de selección de RFLP y AFLP sensibles a la metilación que comprenden las enzimas isoquiméricas MspI y HpaII, se demostró la ocurrencia de una hipometilación genómica significativa en callo y hojas anormales de regenerantes del manto frente a la contraparte normal (Jaligot *et al.*, 2000). Se reporta que los callos variantes dan origen a más del 95% de las palmas del manto y se caracterizan por el 13% de disminución en los niveles de metilación cuando se comparan con sus contrapartes normales (Figura 5). Este estudio sobre las tasas de metilación globales brinda una primera mirada de los cambios moleculares asociados con la anomalía del manto, y es consistente con los caracteres epigenéticos observados, incluida la recesión.

### Expresión genética asociada con la anomalía somaclonal del manto

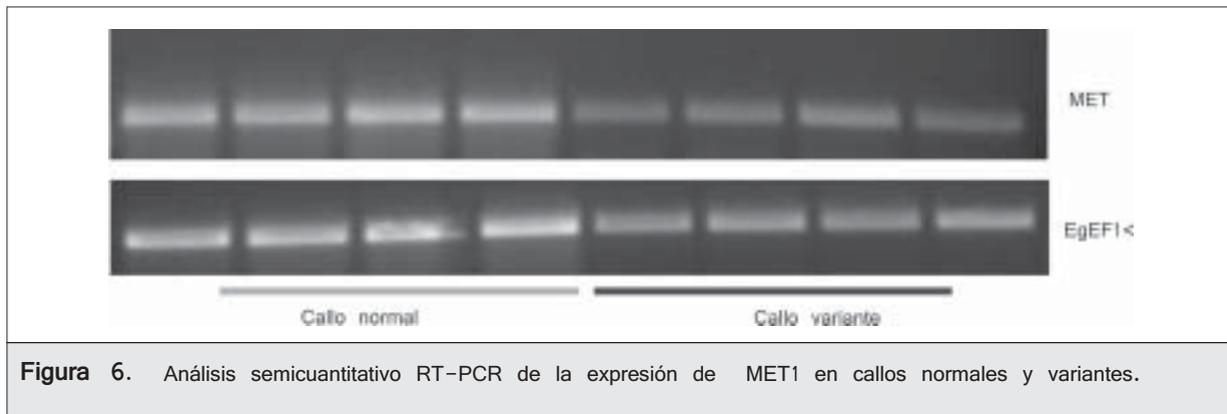
A pesar de la alta reducción en la tasa de metilación que se observó en las palmas del manto, muy pocas



**Figura 5.** Tasas de metilación globales en ADN genómico de callo compacto normal y callo de crecimiento rápido.

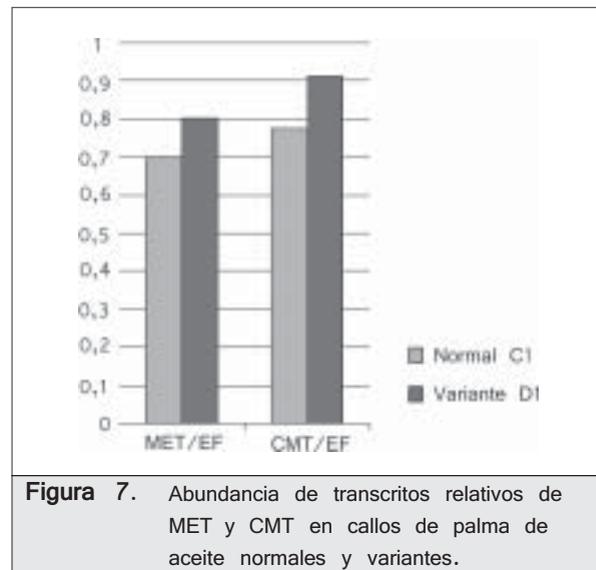
de las citosinas correspondientes desempeñan un papel en la activación del genotipo variante somaclonal. Como la anomalía del manto es epigenética, no puede detectarse con marcadores moleculares estructurales tradicionales. Por tanto, para desarrollar un medio de diferenciación entre los cultivos de callo que portan o carecen de la anomalía del manto, se utilizó un enfoque de expresión genética dirigida, de forma más precisa a aquellas secuencias que cuando se desregulan podrían representar potencialmente el fenotipo del manto, o podrían utilizarse como marcador para la detección temprana de la perturbación en la metilación de ADN, en el proceso de regeneración.

Rival (2005), en colaboración con CSIRO (Australia), utilizó la expresión de metiltransferasas de ADN que posiblemente está comprometida en la variación somaclonal de la palma de aceite para: (i) determinar la causa de los niveles de metilación de ADN alterados en el material variante, (ii) identificar los marcadores tempranos para la detección de los regenerantes variantes. Dos diferentes metiltransferasas de ADN de la palma de aceite que pertenecen a las familias MET1 y CMT3 se aislaron y caracterizaron: MET1 es una Mtasa de mantenimiento (motivos CG), mientras que CMT está a cargo de la metilación de ADN heterocromático (motivos CNG). La abundancia relativa de los transcritos de la palma de aceite MET1 y CMT3 se ha estudiado de forma comparativa en callos



normales y variantes del mismo genotipo, utilizando RT-PCR semicuantitativos (Figura 6). Los resultados indican que las diferencias en los niveles globales de metilación de ADN entre el material de callo normal y variante no pueden atribuirse a los cambios en la abundancia relativa de ARN MET1 o CMT3 (Figura 7). Las principales conclusiones del estudio son que: (i) no se pudo detectar cambio en las actividades de MTasas MET1 y CMT3 en los callos variantes y normales de la palma de aceite; (ii) este resultado es paralelo a la principal paradoja no resuelta sobre la metilación de ADN y la investigación del cáncer: la hipometilación global de ADN ocurre mientras que la actividad de ADN MTasas permanece estable e inclusive aumenta y mide la hipermetilación global específica al gen; (iii) la discrepancia entre la expresión de MTasa ADN y su actividad real como se refleja en los niveles de las tasas globales de metilación en los callos, indica la existencia de un mecanismo que controla la actividad de ADN-MTasas. Por tanto, la investigación futura explorará la expresión diferencial de las MTasas de la palma de aceite de la familia DRM (metilación de motivos C aislados) y se concentrará en la situación de la metilación alrededor de genes blanco, incluidos los análogos en la palma de aceite de los genes MADS box que codifican para una gran familia de factores de transcripción que regulan el desarrollo en plantas superiores, especialmente la formación de flores.

En realidad, el hecho de que la anomalía del manto comprende una modificación característica homeótica de la arquitectura floral de la palma de aceite, implica que la actividad de un subconjunto de genes ha sido alterado en plantas variantes somaclonales,



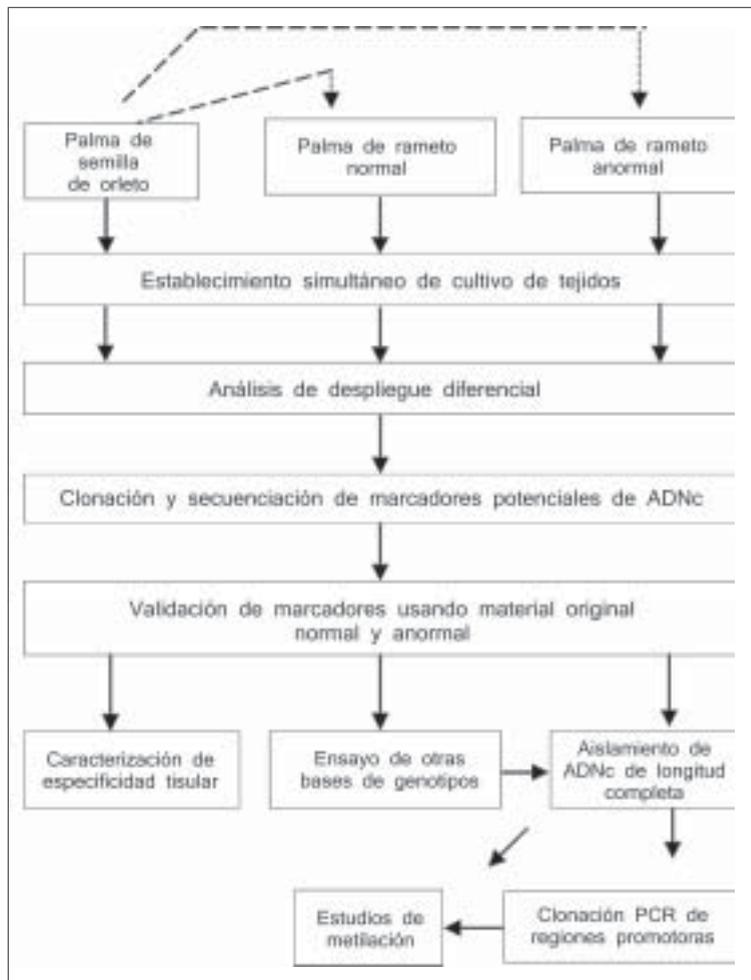
al menos dentro de los tejidos de la flor y el fruto. El equipo de Cirad-IRD actualmente está tratando de identificar los genes homeóticos florales de la familia del factor de transcripción MADS box que podría estar afectado por la cadena de eventos que resultan en la anomalía del manto. Tales miembros de la familia de genes MADS box se han caracterizado en la palma de aceite (Adam *et al.*, 2006). En este estudio, 13 genes MADS box de la palma de aceite se identificaron y caracterizaron. Se encontró que pertenecen a cinco subfamilias diferentes, es decir los grupos anteriormente definidos SQUAMOSA, AGAMOUS, AGAMOUS-like2, DEFICIENS, y GLOBOSA. Los genes que pertenecen a cada uno de estos grupos desempeñan un papel crítico en la determinación de la estructura floral como se define en el modelo ABCDE. Los perfiles de expresión *in planta* de los genes MADS box de la palma de aceite se estudiaron y se investigó



la diversidad de la secuencia filogenética y RT-PCR dentro de las subfamilias individuales al comparar sus secuencias de proteína con aquellas de otras angiospermas. Se observó que la mayoría de las frecuencias estudiadas en la palma de aceite se agrupaban con clades diferenciados y soportados dentro de su subfamilia. Algunas agrupaciones inesperadas se observaron entre las secuencias de monocotiledóneas (incluida las de la palma de aceite) de origen no poaceo, que probablemente ilustra la importancia de obtener una adecuada representación del grupo en las filogenias moleculares de las monocotiledóneas.

En colaboración con MPOB, dentro del marco de la iniciativa “variación somaclonal en la palma de aceite”, el equipo Cirad-IRD realizó extensos estudios de la expresión de los genes, en diferentes etapas del proceso de regeneración del cultivo de tejidos, mediante el uso de la técnica de display diferencial (ddRT-PCR) (Liang y Pardee, 1992). Este enfoque permite la identificación de genes específicos afectados por eventos de variación somaclonal, que posteriormente pueden ser objeto de un estudio adicional mediante el control de su expresión en todo el proceso de regeneración y más allá en materiales tanto normales como anormales. La técnica de display diferencial aprovecha la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para comparar la abundancia de ARNm entre dos o más muestras de ARN extraídas del material vegetal de interés. El aislamiento, validación y caracterización de los marcadores de expresión de la anomalía del manto comprenden varias etapas (Figura 8). La etapa de display diferencial brinda marcadores candidato, que deben ser validados utilizando un rango de diferentes técnicas. Inicialmente, se utiliza la transferencia *northern* para confirmar la expresión diferencial, utilizando el mismo material que para el experimento de display diferencial. Posteriormente, los marcadores que se confirman como diferenciales, se ensayan en otros cultivos para evaluar si la expresión de los genes

está asociada de forma consistente al estado del manto. Cualquier marcador que se considera suficientemente promisorio después de esta etapa, se caracteriza de forma detallada por el aislamiento de la secuencia de codificación de ADNc, los estudios Northern de la especificidad del tejido y el aislamiento de la región genómica flanqueante 5'. Esto último permite investigar si se encuentra presente algún elemento conservado que actúa en cis, en la región promotora, que podría dar luz sobre la regulación del gen en cuestión. Una ilustración de los resultados obtenidos en las diversas etapas del aislamiento y validación del marcador constituye uno de los marcadores más promisorios, que fue patentado conjuntamente por Cirad y MPOB (Tregear *et al.*, 2002). De los estudios de display diferencial realizados en los



**Figura 8.** Estrategia experimental para la identificación y caracterización de los genes que despliegan un patrón de expresión dependiente del manto.

cultivos de tejido de la palma de aceite que portan o carecen de la anomalía de la floración homeótica epigenética del manto, se ha identificado y caracterizado EGAD1, un gen que codifica una defensina putativa de la planta. En plantas completas, se detectaron transcritos del gen EGAD1 solamente en las inflorescencias. El pariente caracterizado más cercano del gen EGAD1 de la palma de aceite es el gen *Petunia PPT*, que se expresa principalmente en el pistilo de la flor. Los 77 polipéptidos aminoácidos codificados por el gen EGAD1 presentan fuertes similitudes con varias proteínas defensinas de las plantas, que se cree desempeñan un papel protector

**En las próximas etapas de este trabajo, se ensayará la confiabilidad de los marcadores de genes, en una gama más amplia de genotipos.**



y que en algunos casos se ha mostrado que poseen propiedades antimicóticas. Los cultivos de tejidos de la palma de aceite presentan una inducción generalmente fuerte de la acumulación de transcritos de EGAD1, que se identificaron en diferentes magnitudes en todas las etapas del proceso de regeneración del cultivo de tejidos. Se encontró que la región flanqueante 5' del gen EGAD1 contenía dos tipos diferentes de elemen-

to potencial ADN de acción cis, anteriormente identificado en los promotores de los genes relacionados con la defensa de la planta, que podrían explicar la expresión observada en los cultivos de tejidos. En la etapa de callo del proceso de regeneración *in vitro*, se observó una acumulación diferencial de transcritos EGAD1 que se correlacionaba con la presencia o ausencia de la anomalía del manto de la floración. Por tanto, la expresión del gen EGAD1 puede ser un marcador de los eventos epigenéticos de variación somaclonal. Recientemente se caracterizaron dos genes novedosos de la palma de aceite, EgM39A y EgIAA1, ambos de los cuales presentan un mayor expresión en las líneas de células epigenéti-

camente anormales (Morcillo y col., 2006). EgIAA1 codifica un pariente de la palma de aceite de la proteína de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh AXR3/IAA17 comprometida en la respuesta temprana de la auxina, y EgM39A codifica una proteína de una función desconocida que comparte similitudes de secuencia con sintetasa asparagina. Además de su aumento en la expresión en las líneas de callo somaclonal variante, ambos genes desplegados aumentaron la acumulación del transcrito en respuesta al tratamiento con auxina. Ambos genes muestra potencial como marcadores tempranos de conformidad clonal y pueden ayudar a aclarar la naturaleza de los cambios epigenéticos que causan la anomalía del manto. En las próximas etapas de este trabajo, se ensayará la confiabilidad de los marcadores de genes, en una gama más amplia de genotipos. Esto ofrecerá un cuadro más claro de su confiabilidad y nos permitirá seleccionar marcadores específicos de interés para pruebas de conformidad clonal, a escala piloto. Esto último podría lograrse mediante varias técnicas diferentes, que incluyen la hibridación northern, la inmunodetección o PCR. La selección final dependerá de varios factores, especialmente la naturaleza de gen marcador y la etapa de desarrollo y el tejido seleccionado para la prueba. Esta selección de marcador tendrá que integrar el costo real de la técnica, en comparación con los costos de producción de las vitroplantas de palma de aceite.

### **Estudios de proteínas**

Con el fin de comprender el fenómeno de expresión diferencial de genes que está implícito en la aparición de la anomalía del manto y para elaborar estrategias para la ejecución de pruebas de conformidad clonal sencillas y poco costosas, Cirad-IRD se encuentran en el proceso de realizar estudios de proteínas como un enfoque complementario al trabajo basado en el transcriptoma. El trabajo inicial está encaminado a caracterizar las variaciones en la abundancia de los polipéptidos individuales en relación con la conformidad clonal, mediante el uso de la electroforesis en dos dimensiones de gel de poliacrilamida (2D SDS-PAGE). Aunque esta última técnica se ha practicado durante muchos años, en sus orígenes estuvo afectada por problemas de reproducibilidad, que han mejorado de forma considerable gracias a los recientes esfuerzos en esta área (Wilkins *et al.*, 1995). Por



tanto, ha nacido un nuevo campo de la proteómica que permite hacer comparaciones globales entre ARNm y acumulación de proteínas. Este enfoque se utiliza para tratar de identificar los marcadores tempranos de la proteína de los tejidos normales o variantes. Una ventaja inherente del enfoque basado en la proteína es que permite una progresión más rápida hacia una prueba de anticuerpos en comparación con los estudios de ARN.

### Estudios de ingeniería genética

Como un enfoque complementario adicional de apoyo al fenómeno molecular, que es básico en la anomalía del manto, IRD está trabajando en su laboratorio en el establecimiento de un sistema experimental de transformación de la palma de aceite. Esto permitirá el estudio de las actividades *in vivo* de los diferentes genes promotores y la funcionalidad de las secuencias de genes que posiblemente están comprometidos en la variación somaclonal. IRD preparó construcciones GUS promotoras que se ensayaron en cuanto a su actividad, mediante análisis de extensión transitorio utilizando el bombardeo de partículas. Esto puede brindar indicadores para conocer si la metilación de ADN desempeña un papel directo en la determinación del patrón de expresión diferencial de un gen dado, ya que la actividad del gen promotor que porta el ADN exógeno derivado del plasmido, probablemente en este caso no se verá afectada por la conformidad clonal. En contraposición, si el patrón de expresión determina los elementos de señalización que se encuentran aguas arriba en una cascada regulatoria, se esperaría que la actividad del promotor bombardeado esté influida por la conformidad tisular. A largo plazo, IRD establecerá un sistema para la transformación estable de la palma de aceite, que permitirá estudiar la regulación del desarrollo de los promotores del gen marcador durante el proceso de regeneración *in vitro*. Para el trabajo de transformación, IRD ha decidido concentrarse en el uso de suspensiones celulares embriogénicas como el material vegetal iniciador, ya que esto podría simplificar el proceso de regeneración.

### CONCLUSIÓN

Cirad-IRD, al tiempo que colaboran con algunos grupos de investigación especialmente en los países productores, han aprovechado al incorporar con

regularidad en sus estrategias globales de fitomejoramiento y micropropagación los nuevos enfoques de la biotecnología, iniciando con aquellos basados en la selección clásica y de cultivo de tejidos, y continuando con los estudios fisiológicos y de marcadores moleculares, análisis de la expresión de genes diferenciales y transformación genética.

En el área del fitomejoramiento, los datos neutros y de marcadores moleculares genéticos estarán relacionados con caracteres fenotípicos asociados, para aplicar el sistema asistido por marcadores que está en proceso de diseño. Este uso de los marcadores moleculares aumentará la eficiencia del fitomejoramiento tradicional en términos de precisión y ahorro de tiempo. Se trata de una herramienta de selección temprana. Será más fácil determinar el genotipo del material que se va a ensayar, en una etapa temprana. Esto limitará el periodo de tiempo entre generaciones seleccionadas, acelerará la ganancia genética y aumentará así la calidad esperada de la semilla comercial.

Las principales aplicaciones se relacionan con el manejo de la variabilidad (germoplasma, grupos con habilidad combinatoria), la genotipificación de caracteres altamente influidos por el entorno o cuya medición es costosa, el control y monitoreo de las recombinaciones, la predicción de los valores genotípicos para los caracteres complejos, al igual que la predicción del valor de un cruce, a partir de información de los progenitores. La genotipificación automática se refiere a los progenitores principales útiles y las poblaciones del estudio se integrarán en el sistema de mejoramiento de la palma de aceite, al igual que la verificación asistida por marcadores y la selección de los progenitores que ya se utilizan en los huertos comerciales de semillas. Así, los resultados biomoleculares, en términos de detección y evaluación de genes favorables con las herramientas moleculares, se aplicarán a todo el sistema de mejoramiento. Los resultados recientes en micropropagación utilizando suspensiones celulares embriogénicas, abren el camino para el uso de estrategias basadas en el concepto de "semillas artificiales" para la palma de aceite. Esto último podría lograrse a partir de embriones producidos a una alta tasa de suspensiones celulares embriogénicas, que posteriormente podrían tratarse correctamente para alcan-

zar la maduración (enriquecimiento en proteínas de almacenamiento). Los estudios sobre las tasas de metilación nos han brindado una primera mirada de los cambios moleculares asociados con la anomalía del manto y esto es consistente con los caracteres epigenéticos observados, que incluyen la reversión. Esperamos que al aislar los genes de base de la palma de aceite, la anomalía del manto, los marcadores tempranos podrían ayudar a elucidar los cambios epigenéticos que causan esta variación somaclonal y a elaborar un procedimiento de pruebas tempranas de conformidad clonal.

## AGRADECIMIENTOS

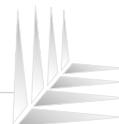
El trabajo de investigación que se describe en este artículo estuvo a cargo de dos institutos franceses: Cirad (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) e IRD (antiguo Orstom; Institut de Recherche pour le Développement). La investigación de mejoramiento

molecular recibió la financiación parcial del Centro Nacional de Secuencias (Genoscope, Francia) de la Comisión de la Comunidad Europea (proyecto EC no. ICA4-CT-2001-10066 - Dirección General de Investigación - Inco-Dev y el proyecto de la CE Eureka 2005-2008 no. 3303). La investigación sobre variación somaclonal recibió financiación parcial con apoyo de una donación de la Junta de Palma de Aceite de Malasia (anteriormente Porim) a través de un proyecto colaborativo de investigación (no. CRB-96-001). Nuestra investigación en biotecnología no habría sido posible sin la estrecha colaboración de nuestros socios en los países productores: CNRA en La Mé en Côte d'Ivoire, Inrab en Pobé en Benin, Socfindo y Iopri en Indonesia, Hacienda La Cabaña en Colombia, y Felda y MPOB en Malasia. Además, hacemos extensivos nuestros sinceros agradecimientos a nuestros socios en investigación en Europa: Inra en Francia, el Instituto Neiker en España y el Instituto Max-Planck en Alemania, al igual que CSIRO en Australia.



## BIBLIOGRAFÍA

- Aberlenc-Bertossi, F. *et al.* 1995. Factors involved in desiccation tolerance in oil palm embryos. *In: Proc. International Congress on Integrated Studies on Drought Tolerance of Higher Plants*. 31 Aug.-2 Sept. 1995, Montpellier, France, Abstract, IV-1.
- Aberlenc-Bertossi, F.; Noirot, M.; Duval, Y. 1999. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 56(1) 53-57.
- Aberlenc-Bertossi, F.; Chabrilange, N.; Duval, Y. 2000. Tolérance à la dessiccation des embryons de palmier à huile. Poster, Colloque AUPELF-UREF "Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes", Montpellier, 3-5 juillet 2000.
- Aberlenc-Bertossi, F.; Chabrilange, N.; Duval, Y. 2001. Abscisic acid and desiccation tolerance in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. *Genetics Selection Evolution*.
- Adam, H. *et al.* 2006. MADS box genes in oil palm (*Elaeis guineensis*): patterns in the evolution of the SQUAMOSA, DEFICIENS, GLOBOSA, AGAMOUS, and SEPALLATA subfamilies. *J Mol Evol* 62(1):15-31.
- Bachem, CWB; Oomen, RJFJ; Visser, RGF. 1998. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. *Plant Mol Biol Rep* 16: 157-173.
- Bachem CWB. *et al.* 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* 9:745-753.
- Barcelos, E. *et al.* 1999. *In: Evolution, variation and classification of palms*. A. Henderson and F. Borchsenius (Eds). Memoirs of the New York Botanical Garden, 83. The New York Botanical Garden Press. New York. p.191-201.
- Baudouin, L.; Durand-Gasselin, T. 1991. Genetic transmission of characters linked to oil yields in oil palm by cloning results for young palms. *Oléagineux* 46(8-9): 313-319.
- Beirnaert, A.; Vanderweyen, R. 1941. Contribution à l'étude génétique et biométrique des variétés d'*Elaeis guineensis* Jacq.. *Publ. de l'I.N.E.A.C., Série Sci.*, n° 27.
- Billotte, N.; Baudouin, L. 1997. Strategy in biomolecular research applied to oil palm breeding. ISOPB Seminar. December 1997. Kuala Lumpur. Malaysia. 9p.
- Billotte, N. *et al.* 1999. Microsatellite enriched-libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288.
- Billotte, N. *et al.* 2001. Development, characterisation, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers. *Genome* 44: 1-14.



- Billotte, N. *et al.* 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor Appl Genet* 110: 754-765.
- Billotte, N. *et al.* (In preparation). Microsatellite multi-parent genetic mapping and molecular detection of QTL (Quantitative Trait Loci) involved in vegetative and production characters in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) - potential application. *Genetics*.
- Breyne, P; Zabeau, M. 2001. Genome-wide expression of plant cell cycle modulated genes. *Cur Opin Plant Biol* 4: 136-142.
- Brown, PTH. 1989. DNA methylation in plants and its role in tissue culture. *Genome* 31: 717-729
- Chabrilange, N. *et al.* 2000. Cryopreservation of Oil palm embryogenics suspensions. In: *Engelmann F. & Takagi H. (Eds) Cryopreservation of tropical plant germplasm*. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba, Japan/IPGRI, Rome, Italy. p.172-177.
- Charcosset, A. 1996. L'identification de locus affectant des caractères quantitatifs (QTL) à l'aide de marqueurs génétiques est-elle justifiée pour la sélection? *Le Sélectionneur Français* 46: 35-45.
- Cheah, SC. *et al.* 1991. Detection of DNA variability in the oil palm using RFLP probes. In: *Proc 1991 Int Palm Oil Conf Malaysia*. 144-150.
- Cheah, SC; Rajinder, S; Madon, M. 1999. Generating molecular tools for oil palm improvement through the genomics approach. In: *Proc. 1999 PORIM Int. Palm Oil Congress, Emerging Technologies and Opportunities in the Next Millenium*. Palm Oil Res. Int. Malaysia, Kuala Lumpur. 297-329.
- Cheah, SC. 2000. Biotechnological strategies for improving plantation tree crops. The oil palm: a case study. In: *Proc. Int. Planters Conf. on Plantation Tree Crops in the New Millenium: The Way Ahead*. The Incorporated Society of Planters, Kuala Lumpur. 59-76.
- Chowdhury, MKU. 1993. Detection of variation in tissue culture-derived normal and abnormal clones of oil palm using RAPD method. *Proc 1993 ISOPB Symposium Malaysia* 190-194.
- Cochard, B. *et al.* 1993. Second cycle reciprocal recurrent selection in oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. Results of Deli X La Mé hybrid tests. *Oléagineux* 48(11): 441-451.
- Comstock, RE; Robinson, HF; Harvey PH. 1949. A breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. *Agron J*, 41: 360-367.
- Diatchenko, L. *et al.* 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes. *PNAS* 93: 6025-6030.
- Delseny, M; Laroche, M; Penon, P. 1983. Detection of sequences with Z-DNA forming potential in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116: 113:120.
- De Touchet, B; Duval, Y; Pannetier, C. 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), *Plant Cell Reports* 10: 529-532.
- Duval, Y; Aberlenc, F; de Touchet, B. 1995a. Use of embryogenic suspensions for oil palm micropropagation. ISOPB. International Symposium on Recent Development in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology. 24-25th september 1993, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Duval, Y; Engelmann, F; Durand-Gasselín, T. 1995b. Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), in Bajaj Y.P.S. (ed.), *Somatic embryogenesis and Synthetic Seed I*, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Springer Verlag, 30: 335-352.
- Finnegan, EJ; Brettel, RIS; Dennis, ES. 1993. The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression, in Jost J.P. and Saluz H.P. (eds.), *DNA methylation: Molecular biology and biological significance* p.218-261.
- Finnegan, EJ; Peacock, WJ; Dennis, E.S. 2000. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr Opin Genet Dev.* 10: 217-223.
- Ivashuta, S. *et al.* 1999. The coupling of differential display and AFLP approaches for nonradioactive mRNA fingerprinting. *Mol Biotechnol* 12: 137-141.
- Gallais, A. 1993. La sélection assistée par marqueurs. *Le Sélectionneur Français* 43: 43-62.
- Goffinet, B; Gerber, S. 2000. Quantitative Trait Loci: A Meta-analysis. *Genetics* 155: 463-473.
- Grout, B.W.W. 1988. Photosynthesis of regenerated plantlets in vitro, and the stresses of transplanting, *Acta Hort.* 230, 129-135.
- Guesquière, M. 1983. *Contribution à l'étude de la variabilité génétique du palmier à huile (Elaeis guineensis Jacq.)*. Le polymorphisme enzymatique. PhD Thesis. Université Paris-Sud. Centre d'Orsay. France, 116 p.
- Grattapaglia, D; Sederoff, R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-test cross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1121-1137.
- Haldane, JBS. 1919. The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linked factors. *J. Genet.* 8: 299-309.
- Hardon, JJ. *et al.* 1976. Major oil palm breeding programmes, in: Corley R.H.V, Hardon J.J. and Wood B.J. (eds.) *Development in Crop Science 1 Oil Palm Research*. Elsevier Sci. Publ. Co. 109-126.
- Hartley, CWS. 1988. *The Oil Palm*, Tropical Agriculture Series, Longman London, 761p.
- Jack, PL; Dimitrijevic, TAF; Mayes, S. 1995. Assessment of nuclear, mitochondrial and chloroplast RFLP markers in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor Appl Genet*, 90: 643-649.
- Jack, PL; Mayes, S. 1993. Use of molecular markers for oil palm breeding. II. Use of DNA markers (RFLPs). *Oléagineux* 48: 1-8.
- Jacquemard, JC; Baudouin, L ; Noiret, JM. 1997 *Le Palmier à huile*, in: Charrier A, Jacquot M, Hamon S. and Nicolas D. (eds.), *L'amélioration des Plantes Tropicales*, Editions Repères, ORSTOM/CIRAD. 507-532.
- Jaligot, E. *et al.* 2000. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis, *Plant Cell Rep.* 19: 684-690.

- Jannoo, N. *et al.* 1999. Linkage disequilibrium among sugarcane cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 99 : 1053-1060.
- Jones, LH. 1989. Prospects for biotechnology in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and coconut (*Cocos nucifera*) improvement. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 7: 281-296.
- Jouannic, S. *et al.* 2005. Analysis of expressed sequence tags from oil palm (*Elaeis guineensis*.) *In: Febs letters* 579 (12): 2709-2714.
- Kaeppler, SM; Kaeppler, HF; Rhee, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol* 43: 179-188.
- Krikorian, AD. 1989. The context and strategies for tissue culture of date, african oil and coconut palms, *in Vibha Dhawan (ed.)*, Applications of biotechnology in Forestry and Horticulture, Plenum Press New-York, 119-144.
- Le Guen, V. *et al.* 1991. IRHO *Elaeis oleifera* X *Elaeis guineensis* interspecific hybrid programme. *Oléagineux* 46(12): 479-487.
- Liang, P; Pardee, AB. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, *Science* 257: 967-971
- Mayes, S. *et al.* 1996a. The application of restriction fragment length polymorphism for the genetic fingerprinting of oil palm (*E. guineensis* Jacq.). *Molecular Breeding* 2: 175-180.
- Mayes, S. *et al.* 1996b. Integration of DNA markers into oil palm breeding programmes. *Proc. 1996 Int Palm Oil Conf Malaysia* 49-54.
- Mayes, S. *et al.* 1997. Construction of a RFLP genetic linkage map for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), *Genome* 40 (1): 116-122.
- Merkle, SA. 1995. Somatic embryogenesis in Magnoliaceae, in Bajaj Y.P.S. (ed.), Somatic embryogenesis and Synthetic Seed I, Biotechnology in Agriculture and Forestry, *Springer Verlag* 30: 388-403.
- Meunier, J; Gascon, JP. 1972. Le schéma général d'amélioration du palmier à huile à l'IRHO. *Oléagineux* 27(1): 1-12.
- Meunier, J. 1975. Le palmier à huile américain *Elaeis melanococca*, *Oléagineux* 30(2), 51-61.
- Michelmore, RW; Paran, I; Kesseli, RV. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828-9832.
- Mohan, M. *et al.* 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3: 87-103.
- Morcillo, F. *et al.* 1997. Characterization of 2S and 7S storage proteins in embryos of oil palm, *Plant Science* 122: 141-151.
- Morcillo, F. *et al.* 1998. Differential accumulation of storage protein, 7S globulins, during zygotic and somatic embryos development in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), *Plant Physiology and Biochemistry* 36(7), 509-514.
- Morcillo, F. *et al.* 1999. Differential effects of glutamine and arginine on 7S globulins accumulation during maturation of oil palm somatic embryos. *Plant Cell Reports* 18: 868-872.
- Morcillo, F. *et al.* 2001. Regulation of 7S globulin gene expression in zygotic and somatic embryos of oil palm. *Physiologia Plantarum* 112(2): 233-243.
- Morcillo, F. *et al.* 2006. Somaclonal variation in micropropagated oil palm. Characterization of two novel genes with enhanced expression in epigenetically abnormal cell lines and in response to auxin. *Tree Physiol* 26(5): 585-94.
- Moretzsohn, MC. *et al.* 2000. RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor Appl Genet* 100: 63-70.
- Mouyna, I; Renard, JL; Brygoo, Y. 1996. DNA polymorphism among *Fusarium oxysporum* f. sp. *Elaeidis* populations from oil palm, using a repeated and dispersed sequence Palm@. *Curr Genet* 30(2): 174-180.
- Muranty, H. 1996. Power of tests for quantitative trait loci detection using full-sib families in different schemes. *Heredity* 76: 156-165.
- Muranty, H. 1997. *Valorisation de plans de croisements pour la recherche de QTL chez les arbres forestiers, exemple d'un diallele merisier*. PhD Thesis, Centre d'Orsay, University of ParisXI, France. 131p.
- Noiret, JM. 1981. Application de la culture in vitro à l'amélioration et à la production de matériel clonal chez le palmier à huile, *Oléagineux*, 36, 123-126.
- Ochoa, I; Villegas, V; Beebe, S. 1997. Identification of RAPD molecular markers associated with resistance to the bud rot complex in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Palmas* 18(1): 33-38
- Paranjothy, K; Ong, LM; Sharifah, S. 1993. DNA and protein changes in relation to clonal abnormalities. *In: Proc. 1993 ISOPB Symposium Malaysia*, 86-97.
- Piffanelli, P. *et al.* 2002. Bactrop: Creation of a platform for physical mapping of tropical species. *Plant & Animal Genome Meeting X*. January 12-16 2002, San Diego, USA. Poster.
- Purba, AR. *et al.* 2000. A new aspect of genetic diversity of Indonesian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) revealed by isoenzyme and AFLP markers and its consequences to breeding. *Theor Appl Genet.* 101: 956-961.
- Purba, AR. *et al.* 2001. Prediction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) agronomic performance using the best linear unbiased predictor (BLUP). *Theor Appl Genet* 102: 787-792.
- Rashid, O; Shah, FH. 1996. The isolation, characterization and sequencing of cDNA clones coding for stearyl-ACP desaturase gene from oil palm (*Elaeis guineensis*). *Proc 1996 PORIM Int Palm Oil Congress Malaysia* 575-582.
- Reich, DE. *et al.* 2001. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 411: 199-204.
- Remington, DL. *et al.* 2001. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *PNAS* 98(21): 11479-11484.
- Rival, A. *et al.* 1994. Carboxylases (PEPc and RUBISCO) activities during *in vitro* development and acclimatization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), *In: Proc. VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, IAPTC*, Firenze, Abstract n°S20-13, p. 261.



- Rival, A. *et al.* 1996. Immunoenzymatic study of RubisCO in oil palm and coconut. *Plantations, Research, Development* 3(6), 55-61.
- Rival, A; Bernard, F; Mathieu, Y. 1997a. Changes in peroxidase activity during in vitro rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), *Scientia Hort* 71, 103-112.
- Rival, A. *et al.* 1997b. Scaling-up in vitro clonal propagation through somatic embryogenesis: the case of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 3(2): 74-83.
- Rival, A. *et al.* 1997c. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Rep.* 16: 884-887.
- Rival, A. *et al.* 1997d. Development of photosynthetic characteristics in oil palm during in vitro micropropagation, *J. Plant Physiol*, 150(5): 11-26.
- Rival, A. *et al.* 1998a. Growth and carboxylase activities in in vitro micropropagated oil palm plantlets during acclimatization: comparison with conventionally germinated seedlings. *Advances in Hort. Sci.* 3, 111-117.
- Rival, A. *et al.* 1998b. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Breeding* 117, 1, 73-76.
- Rival, A. 2000. Somatic embryogenesis in Oil Palm. In: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants, vol. 6, chap. 8.* Jain S.M, P.K. Gupta & R.J. Newton (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands, p.249-290.
- Rival, A. *et al.* 2005. Expression of DNA Methyltransferases and somaclonal variation in oil palm. In: *NGED Conference: International Frontiers in Science and Technology* "Epigenetic regulation and development in disease", Canberra, Australia. Dec. 2005. Poster.
- Saghai, Maroof MA; *et al.* 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 5466-5470.
- Shah, FH. *et al.* 1994. The utility of RAPD markers for the determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*). *Theor. Appl. Genet.* 89: 713-718.
- Shah, FH; Cha, TS. 2000. A mesocarp- and species-specific cDNA clone from oil palm encodes for sesquiterpene synthase. *Plant Science* 154:153-160.
- Schiex, T. Gaspin, C. 1997. Cartagene: Constructing and joining maximum likelihood genetic maps. In: *Proc 5<sup>th</sup> Int Conf Intelligent Systems for Molecular Biology*, Porto Caras, Halkidiki, Greece. p.258-267.
- Singh, R; Cheah, SC. 1996. Flower - specific gene expression in oil palm revealed by differential display. *Proc 1996 PORIM Int Palm Oil Congress Malaysia* 583-587.
- Singh, R; Cheah, SC, 2000. Differential gene expression during flowering in the oil palm (*Elaeis guineensis*). *Plant Cell Reports* 19: 804-809-
- Smith, JSC. *et al.* 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.), comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95:163-173.
- Tautz, D. *et al.* 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463-6471.
- Tautz, D; Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eucaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12: 4127-4138.
- Tregear, JW. *et al.* 2002. Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. *Journal Exp Bot* 53(373): 1387-1396.
- Van Ooijen, JW; Voorrips, RE. 2001. *JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps.* Plant Research International, Wageningen, The Netherlands.
- Weissenbach, J. *et al.* 1992. A second generation map of the human genome. *Nature.* 359: 794-801.
- Wilkins, MR. *et al.* 1995. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13:19-50.