

LA BIOTECNOLOGÍA COMO UNA HERRAMIENTA

para agilizar la selección de nuevos materiales en palma de aceite

BIOTECHNOLOGY AS A TOOL

to Speed-up Selection of Oil Palm Materials

AUTOR



Pedro Jesús Rocha Salavarría, Ph.D.

Investigador titular,
Director Laboratorio de
Caracterización Molecular,
Cenipalma, Bogotá, Colombia.
pedro.rocha@unipalma.org

Palabras CLAVE

Marcadores moleculares,
análisis de diversidad genética,
microsatélites,
cultivo de tejidos.

Molecular markers, genetic
diversity analysis,
microsatellites, tissue culture.

RESUMEN

La biotecnología se ha constituido en una herramienta de importancia para apoyar los procesos de selección de materiales en los programas de mejoramiento genético de muchas especies. Para palma de aceite, el gremio palmicultor colombiano estableció, desde hace ya varios años, investigación en biotecnología. En un principio, se trabajó en la implementación de técnicas de marcadores moleculares para realizar análisis de caracterización molecular y de diversidad genética. Como resultado de dichas investigaciones se han desarrollado varios proyectos, y mucha de la información generada está siendo empleada por el programa de fitomejoramiento de Cenipalma. Recientemente, el Centro ha implementado el laboratorio de cultivo de tejidos con el objetivo de clonar materiales élite. Para el futuro, Cenipalma busca consolidar la investigación en estas dos áreas e incluir investigaciones en fitopatología molecular mediante el empleo de herramientas genómicas.

SUMMARY

Biotechnology is an important tool in order to support selection of plant material in breeding programs of several species. For oil palm, the Colombian oil palm sector established, some years ago, research in biotechnology. At the beginning, it worked in the implementation of molecular marker techniques to carry out molecular characterization and genetic diversity analysis. As result of such investigations, several projects have been developed and the generated information is currently being used by Cenipalma's breeding program. Recently, Cenipalma has implemented the Tissue culture Laboratory with the aim of doing clonal propagation of elite material. For the future, Cenipalma hopes to consolidate research in these areas and to include research in molecular phytopathology by using genomic tools.





INTRODUCCIÓN

El objetivo de un programa de fitomejoramiento es la producción de nuevos materiales con potenciadas características de interés. Una variedad vegetal es aceptada como tal cuando ha pasado pruebas de homogeneidad, estabilidad y distinguibilidad (Rocha, 2003b). En cultivos anuales, por ejemplo los de oleaginosas como soya, maíz, girasol, colza, etc., es probable obtener, bajo condiciones experimentales, varias generaciones en un año. Sin embargo, los programas de fitomejoramiento de cultivos perennes, la palma de aceite en particular, presentan una limitante enorme relacionada con los tiempos de espera para poder evaluar las características de interés para el mejorador.

En palma de aceite, componentes de productividad tales como peso de racimo, número de frutos, cantidad y calidad de aceite en fruto, pueden ser evaluados después de varios años, al menos a partir del tercer año, aunque lo óptimo es a partir del séptimo año, debido a que es en este punto donde se alcanza la estabilidad productiva de la palma. También puede ser objetivo de un programa de mejoramiento en palma de aceite evaluar la tolerancia (ideal resistencia) al ataque de cierta plaga o la presencia de una determinada enfermedad, para lo cual es indispensable conocer el patógeno y reproducir la enfermedad.

Dichas evaluaciones toman mucho tiempo, que sumado a los ingentes recursos que deben emplearse para el mantenimiento de los ensayos hacen que la producción de variedades de palma de aceite sea un proceso largo, dispendioso y muy costoso. Por esta razón, se hace necesario emplear herramientas que permitan acelerar algunas de las etapas del proceso de mejoramiento, por ejemplo, la selección. Una vez los materiales con mejores características son escogidos pueden emplearse técnicas de cultivo de tejidos para propagar dichos materiales élite y obtener así, clones que por su homogeneidad apoyen el incremento de la productividad.

El desarrollo de la biotecnología en Cenipalma comenzó con la utilización de marcadores moleculares (Cenipalma, 1996; Ochoa *et al.*, 1997; Villegas *et al.*, 2000; Villegas, 2000) y en la actualidad se está incurriendo en cultivo de tejidos. En el presente escrito

se describen brevemente los avances obtenidos con el empleo de técnicas moleculares para apoyar las actividades de selección de materiales del programa de mejoramiento genético de palma de aceite de Cenipalma. Adicionalmente, se presentan los lineamientos generales que rigen la investigación del Centro en cultivo de tejidos y algunas perspectivas del empleo de la biotecnología en el cultivo.

BIOTECNOLOGÍA EN PALMA DE ACEITE

La biotecnología vegetal es la aplicación de la ciencia y la ingeniería al uso directo de plantas, sus partes o sus productos, en sus formas naturales o modificadas (Rocha, 2003a). Las principales herramientas que ha desarrollado la biotecnología mediante la investigación básica incluyen el cultivo de tejidos, la generación y uso de bioreactores, el desarrollo y uso de marcadores moleculares, la transformación genética (Parveez y Christou, 1998) y la genómica.

Se considera que la biotecnología vegetal permite incrementar la productividad del cultivo de palma de aceite (Christou, 2005) mediante el desarrollo de la clonación de materiales élite (Rohani *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1997), la implementación de programas de selección asistida por marcadores moleculares (Rocha, 2003a) y la posibilidad de insertar genes (transgénesis) que confieran resistencia a insectos y a herbicidas (Mehlo *et al.*, 2005; Rocha, 2004; Sambanthamurthi *et al.*, 2002).

Recientemente uno de los avances más importantes para el cultivo de la palma de aceite ha sido el reportado (Budiman *et al.*, 2005) por la Alianza para el Descubrimiento de la Palma de Aceite (*The Oil Palm Discovery Alliance*), el consorcio de investigación que secuenció, en 16 meses, mediante la tecnología conocida como *GeneThresher® methylation filtering technology*, los genomas de *Elaeis guineensis* Jacq. tipos Dura (D), Pisífera (P) y Ténera (T, híbrido DxP), *Elaeis oleifera* [H.B.K.] Cortés y el híbrido interespecífico *E. oleifera* x *E. guineensis* (OxG), entre otros. Se espera que la información allí obtenida permita acelerar el desarrollo tecnológico del cultivo en Malasia y posteriormente a los países que accedan a dicha información (Rocha, 2005a).

MARCADORES MOLECULARES Y SU USO EN PALMA DE ACEITE

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que se han constituido en herramientas valiosas para la detección y el uso de la diversidad genética, con su consecuente aplicación en programas de selección genética de plantas, animales y microorganismos (revisión detallada en Rocha, 2003a). Aunque los marcadores moleculares están concebidos para asociarse con características de interés (Jaligot *et al.*, 2005; Billotte *et al.*, 2001b), el grado de desconocimiento en información básica de la fisiología, bioquímica y genética de la palma de aceite y la falta de información prácticamente total relacionada con los mecanismos de resistencia a patógenos hace que dicha aplicación no sea infalible (Arias y Rocha, 2003). Por tal razón, los marcadores moleculares han ganado un espacio importante y se están empleando en palma de aceite, al igual que para otros muchos cultivos, como la mejor herramienta para evaluar la diversidad genética de distintos materiales (Barcelos *et al.*, 2002; Barcelos, 1998)

Existen múltiples tipos de marcadores moleculares. Sin embargo, por su relación beneficio-costo, efectividad y gracias a la información reportada hace ya algunos años por Cirad (Billotte *et al.*, 2005; Billotte *et al.*, 2003; Billotte *et al.*, 1999), Cenipalma emplea de manera rutinaria la técnica de microsátélites con el fin de determinar las relaciones de similitud y posibles orígenes entre los distintos materiales que conforman sus colecciones de germoplasma de *Elaeis guineensis* (Meléndez, 2006; Montoya *et al.*, 2005a; Montoya *et al.*, 2005b) y *Elaeis oleifera* (López, 2006; Rocha *et al.*, 2005; Rojas, 2005; Herrera, 2005). También se ha complementado la caracterización de material Dura previamente realizada (Villegas *et al.*, 2000) y de materiales comerciales.

Una de las ventajas de amplificar *loci* de microsátélites con los cebadores específicos reportados por Billotte *et al.* (2003) está en que permite analizar simultáneamente *E. guineensis* y *E. oleifera*, aunque los datos para su análisis conjunto sean obtenidos en diferentes momentos o en materiales de diferentes edades.

La información molecular generada permite determinar la variabilidad que se presenta y de esta manera detectar duplicados o materiales muy parecidos. Esta información, junto con la morfoagronómica, es de enorme importancia para la selección de posibles parentales representativos de poblaciones o de grupos.

Por otro lado, la presencia de plagas y enfermedades que atacan al cultivo en Colombia han hecho que se introduzcan técnicas moleculares (Rocha, 2005b), en particular basadas en PCR, para el diagnóstico de enfermedades (Cenipalma, datos sin publicar). Además, se trata de incursionar en el área de genómica con el mismo fin.

En términos generales, bajo el término genómica se incluyen todas aquellas técnicas que permiten realizar análisis moleculares de múltiples genes, productos génicos o regiones del material genético a gran escala (Brent, 2000). Hace algunos años, la genómica se centraba en el análisis de genomas completos y se refería a la manera de manejar la información obtenida por los programas de secuenciación de genomas de distintos organismos. Sin embargo, en la actualidad el término es más amplio y se refiere a aplicaciones de tecnología molecular a gran escala para el ADN y el ARN independiente de si existen o no estudios que comprendan genomas completos.

Es de anotar que la tecnología genómica es altamente eficiente aunque relativamente costosa, si bien la relación beneficio costo es favorable debido a las economías de escala que maneja. Por esta razón, en un país como Colombia es necesario desarrollar alianzas estratégicas con otras instituciones para poder consolidar la investigación en esta área. Hasta el momento, Cenipalma hace parte de una iniciativa de "genómica para la agricultura" en la cual se busca optimizar la infraestructura existente en el país para el desarrollo de diferentes problemas que afectan a los cultivos de importancia en el país (café, palma de aceite, caña de azúcar, papa y caucho, entre otros). Sería importante evaluar si el sector palmero de la región está dispuesto a desarrollar esta área para generar una estrategia de colaboración entre los países con desarrollos técnicos importantes, por ejemplo, Costa Rica y Ecuador, entre otros.



CULTIVO DE TEJIDOS EN CENIPALMA

Recientemente, Cenipalma ha establecido su Laboratorio de Cultivo de Tejidos en el Campo Experimental Palmar de La Vizcaína. En su primera fase, el laboratorio busca hacer rescate de embriones de materiales oleífera cuya germinación no ha sido posible bajo condiciones estándar (cama de arena o cuarto caliente). Adicionalmente se han comenzado los ensayos de propagación de algunos genotipos nolí. Posteriormente se busca clonar materiales *E. guineensis* élite.

CONSIDERACIONES FINALES

La biotecnología es una herramienta valiosa para resolver problemas en cultivos. Una de sus especialidades (marcadores moleculares) es de particular importancia y es comúnmente empleada en los programas de fitomejoramiento como apoyo para la determinación de la variabilidad genética de los individuos que conforman las colecciones de germoplasma y apoyar (de manera directa o indirecta) la selección de materiales con características de interés. Ciertamente los marcadores moleculares no son la solución a los problemas del mejoramiento en cultivos perennes. Sin embargo, se constituyen en una herramienta que complementa y acelera las acciones del fitomejorador.

El mundo palmicultor debe estar atento a los desarrollos que en biotecnología se generen gracias a la información obtenida por el programa de secuenciación de los genomas de palma. Adicionalmente las instituciones interesadas o de alguna manera asociadas al cultivo deberían tratar de establecer

convenios o negociaciones para el acceso a dicha información y de esta manera potenciar el cultivo.

Pero los campos de acción de la biotecnología en palma de aceite no solo deben estar asociados con la caracterización de la diversidad y el apoyo en la selección y propagación (clonación) de materiales. La biotecnología brinda herramientas para contribuir a las soluciones de los diferentes problemas biológicos asociados con el cultivo (conocimiento y manejo de plagas y enfermedades) y puede ser de enorme importancia para el desarrollo de los diferentes eslabones de la cadena. Existen campos muy atrayentes para la biotecnología en palma y que deberían consolidar su desarrollo. Por ejemplo, la aplicación de la biotecnología ambiental (bioremediación para manejo de suelos, aguas y efluentes de la planta de beneficio). Un segundo campo es el desarrollo de la biotecnología industrial, por ejemplo, llevar a cabo investigación para encontrar microorganismos que realicen catálisis de reacciones químicas de interés (esterificaciones, lipólisis, etc.) para el procesamiento del aceite de palma. Dichos microorganismos podrían ser incorporados en bioreactores que podrían complementar los desarrollos de la industria química (oleoquímica) que se esperan realizar en un futuro no muy lejano.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al doctor Pedro León Gómez Cuervo y a Leonardo Rey Bolívar (Cenipalma) por sus valiosos comentarios. La investigación de Cenipalma es financiada por el Fondo de Fomento Palmero, administrado por Fedepalma.

BIBLIOGRAFÍA

- Arias D; Rocha PJ. 2004. Análisis de diversidad genética en materiales tolerantes y susceptibles a la pudrición de cogollo en palma de aceite mediante marcadores moleculares. *Palmas* (Colombia), 25 (3): 11-27.
- Barcelos, E; Amblard, P; Berthaud, J; Seguin, M. 2002. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. *Pesq. Agropec. Bras.* (Brasil), 37 (8): 1105-1114.
- Barcelos, E. 1998. Etude de la diversité génétique du genre *Elaeis* (*E. oleifera* (Kunth) Cortés et *E. guineensis* Jacq.) par marqueurs moléculaires (RFLP et AFLP). Tesis *PhD*, Université Montpellier II, Francia. 137p.
- Billotte N, Marseillac N, Risterucci AM, Adon B, Brottier P, Baurens FC, Singh R, Herrán A, Asmady, Billot C, Amblard P, Durand-Gasselín T, Courtois B, Asmono D, Cheah SC, Rohde W, Ritter E, Charrier A. 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theoretical and Applied Genetics* 110: 754-765.
- Billotte, N; Lagoda, P.J.L; Rusterucci, A.M; Baurens F.C. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* (Francia) 54 (4): 277-288.
- Billotte, N; Rusterucci, AM; Barcelos, E; Noyer, JL; Amblard, P; Baurens F.C. 2001a. Development, characterisation, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers. *Genome* (Canadá), 44: 413-425.



- Billotte, N; Frances, L; Amblard, P; Durand-Gasselin, T; Noyer, JL; Courtois, B. 2001b. Search for AFLP and microsatellite molecular markers of the SH gene in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) by bulk segregant analysis (BSA) and by genetic mapping. Proceedings of 2001 PIPOC International Palm Oil Congress – Cutting-edge technologies for sustained competitiveness (Agriculture). P.442-445.
- Brent, R. 2000. Genomic biology. *Cell* 100: 169-183
- Budiman, MA; Singh, R; Low ETL; Nunberg A; Citek R; Rohlfing T; Bedell JA; Lakey N.D., Martienssen RA; Cheah S.C. 2005. Sequencing of the oil palm genome. Proceedings of the PIPOC 2005 International Palm Oil Congress (Agriculture, Biotechnology and Sustainability). Sunway Lagoon Resort Hotel, Petaling Jaya, Selangor. p. 628-639.
- Cenipalma. 1996. Actividad: Identificación de marcadores RAPD asociados con la resistencia a pudrición de cogollo. *Ceniavances* (Colombia), 68: 1-4.
- Christou, P. 2005. Challenges and opportunities in applied plant biotechnology. Proceedings of the PIPOC 2005 International Palm Oil Congress (Agriculture, Biotechnology and Sustainability). Sunway Lagoon Resort Hotel, Petaling Jaya, Selangor. p. 523-527.
- Herrera, N.J. 2005. Caracterización molecular de 45 genotipos del banco de germoplasma de palma americana *Elaeis oleifera* [H.B.K.] de Cenipalma, por medio de marcadores moleculares tipo AFLP y microsatélites. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 89p.
- Jaligot E; Beule T; Rival A. 2005. Methylation associated tissue culture abnormality. Proceedings of the PIPOC 2005 International Palm Oil Congress (Agriculture, Biotechnology and Sustainability). Sunway Lagoon Resort Hotel, Petaling Jaya, Selangor. p. 550-561.
- López, P. 2006. Asistencia para la caracterización molecular por microsatélites de palma americana (*Elaeis oleifera* [H.B.K.] Cortés) del banco de germoplasma de Cenipalma. Trabajo de grado. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá. 49p.
- Meléndez, E. 2006. Caracterización molecular de *Elaeis guineensis* Jacq. procedente de Angola. Trabajo de grado. Ingeniería y Producción Biotecnológica, Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, Universidad Francisco de Paula Santander. San José de Cúcuta. 82p.
- Mehlo L; Gahakwa D; Nghia PT; Loc NT; Capell T; Gatehouse J; Gatehouse A; Christou P. 2005. An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. *Proceedings National Academy of Sciences USA* (Estados Unidos), 102: 7812-7816.
- Montoya C; Arias D; Rey, L; Rocha PJ. 2005a. Diversidad genética de materiales *Elaeis guineensis* Jacq. procedentes de Angola. *Fitotecnia Colombiana* (Colombia), 5 (2): 1-10.
- Montoya C; Arias D; Rey L; Rocha PJ. 2005b. Evaluación preliminar de *Elaeis guineensis* (Jacq.) proveniente de Angola mediante marcadores moleculares. *Ceniavances* (Colombia), 121: 1-4.
- Ochoa, IE; Villegas, VE; Beebe SE. 1997. Identificación de marcadores moleculares RAPD asociados con la resistencia al complejo de pudrición de cogollo en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Palmas* (Colombia), 18 (1): 33-38.
- Parveez, GKA; Christou P. 1998. Biolistic-mediated DNA delivery and isolation of transgenic oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryogenic callus cultures. *J. Oil Palm Res.* (Malasia), 10: 29-38.
- Rocha PJ. 2005a. Aportes de la biotecnología al cultivo de la palma de aceite en Pipoc 2005. *Palmas* (Colombia), 25 (4): 53-59.
- Rocha PJ. 2005b. Empleo de técnicas moleculares para la caracterización de hongos que afectan la palma de aceite. *Ceniavances* (Colombia), 128:1-4.
- Rocha PJ; Rojas Y; Rey, L. 2005. Caracterización molecular preliminar del banco de germoplasma de *Elaeis oleifera* [H.B.K.] Cortés, mediante microsatélites. *Ceniavances* (Colombia), 130:1-4.
- Rocha, PJ. 2004. Plantas transgénicas frente a la realidad del mercado. *Palmas* (Colombia), 25 (3): 55-69.
- Rey L; Gómez PL; Ayala I; Delgado W; Rocha, P. 2004. Colecciones genéticas de palma de aceite *Elaeis guineensis* (Jacq.) y *Elaeis oleifera* (H.B.K.) de Cenipalma: Características de importancia para el sector palmicultor. *Palmas* (Colombia), 25 (especial): 39-48.
- Rocha PJ. 2004. Conceptos básicos en biotecnología de la palma de aceite. *Palmas* (Colombia), 25 (especial): 11-17.
- Rocha PJ. 2003a. Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección de palma de aceite. *Palmas* (Colombia), 24 (2): 11-25.
- Rocha PJ. 2003b. Derechos de propiedad intelectual, la manera de proteger invenciones. *Palmas* (Colombia), 24 (1): 9-17.
- Rey L; Ayala I; Delgado W; Rocha PJ. 2003. Colecta de material genético de la palma americana noli *Elaeis oleifera* (H.B.K.) Cortez en el Trapecio Amazónico. *Ceniavances* (Colombia), 101:1-4.
- Rohani O; Zamzuri I; Tarmizi AH. 2003. Oil palm cloning: MPOB protocol. MPOB Technology 26. 20p.
- Rojas, Y. 2005. Caracterización molecular por microsatélites de genotipos de palma americana *Elaeis oleifera* (H.B.K.) Cortés, del banco de germoplasma de Cenipalma. Trabajo de grado. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja. 86p.
- Sambanthamurthi, R; Siti Nor A, Parveez, AGK. 2002. Genetic manipulation of the oil palm challenges and prospects. *The Planter* (Malasia), 78 (919): 547-562.
- Villegas, VE; Durán, C; Beebe, S. 2000. Caracterización molecular de materiales Dura. *Palmas* (Colombia), 21 (especial): 35-40.
- Villegas, VE; Gómez, P.L. 1998. Construcción de mapas genéticos. *Ceniavances* (Colombia), 54: 1-4.
- Villegas, V.E. 2000. Mejoramiento vegetal mediante selección asistida por marcadores. *Ceniavances* (Colombia), 68:1-4.
- Wong, G; Tan, CC; Soh, AC; Chong, SP. 1999. Clonal propagation of oil palm through tissue culture *The Planter* (Malasia), 75 (878): 221-230.
- Wong, G; Tan, CC; Soh, AC. 1997. Large scale propagation of oil palm clones –Experiences to date. Proceedings Third International Symposium on in vitro culture and horticultural breeding. *Acta Horticulture* 447: 649-658.