

Avances en biotecnología para el cultivo de palma de aceite: temas principales en PIPOC 2009

Advances in Biotechnology for Oil Palm Crop: Main Topics in Pipoc 2009

AUTOR

Pedro Jesús Rocha S. Ph.D.

Especialista en Tecnología
e Innovación,
Instituto Interamericano de
Cooperación para la Agricultura,
Colombia.
E-mail: pedrojrocha@yahoo.com

Palabras CLAVE

Genómica, Proteómica,
Bioinformática, Cultivo de tejidos,
Selección asistida por marcadores.

Genomics, Proteomics,
Bioinformatics, Tissue culture,
Molecular assisted selection.

Recibido: 6 Enero de 2010
Aceptado: 21 abril de 2010

Resumen

La biotecnología es una herramienta de enorme importancia para el desarrollo de la competitividad y sostenibilidad de los cultivos. En palma de aceite, uno de los eventos de mayor relevancia en biotecnología ha sido el “*PIPOC 2009 International Palm Oil Congress: Palm Oil – Balancing Ecologics with Economics*”, llevado a cabo en Kuala Lumpur del 9 al 11 de noviembre. Debido a la importancia del tema para el desarrollo del cultivo y con el objeto de contribuir a la actualización del sector palmicultor colombiano, se presenta aquí una revisión que incluye los avances biotecnológicos allí considerados y algunas reflexiones que podrían ser de utilidad para el desarrollo del sector. Las ideas expresadas son responsabilidad del autor y en ningún momento comprometen la posición de la entidad a la cual está vinculado.

Summary

Biotechnology is a tool of enormous importance for the development of crop's competitiveness and sustainability. In oil palm, one of the most relevant events in biotechnology has been the “*PIPOC 2009 International Palm Oil Congress: Palm Oil – Balancing Ecologics with Economics*”, which was carried out in Kuala Lumpur from 9 to 11 of November. Due to the importance of the subject for the development of the crop and with the aim of contributing to keep up to date the Colombian oil palm sector, here it is presented a review that includes the advances in biotechnology presented there and some considerations that could be useful for the development of the oil palm sector. The ideas expressed here are responsibility of the author and in no way compromise the official position of the entity to which he is linked.



Introducción

En la versión 2009 del PIPOC el componente de biotecnología incluyó 11 presentaciones orales y 36 pósteres, lo cual superó la participación de esta disciplina en la conferencia inmediatamente anterior (Rocha, 2007a) y deja entrever el dinamismo, la importancia y la necesidad de este tema para la competitividad y sostenibilidad del sector palmero (Kishore, 2009). Las principales temáticas desarrolladas estuvieron relacionadas con el uso de la genómica, bioinformática, proteómica y metabolómica, la utilización de marcadores moleculares, la identificación de genes y el análisis de su expresión y el cultivo de tejidos, incluido la transgénesis. De igual manera, es importante el hecho de que la biotecnología se esté implementando no solo en palma de aceite sino además en especies del hongo *Ganoderma* sp., agente causal de la Pudrición basal (*Basal Stem Rot*, BSR).

Genómica

Se presentaron trabajos en el área de genómica (Wahid, 2009; Tee *et al.*, 2009; Clough, 2009); y bioinformática (Mayes, 2009). La genómica es el estudio detallado de los genomas (Borevitz & Ecker, 2004), es decir, involucra estudios a gran escala de un vasto número de genes simultáneamente y su fundamento es la secuenciación del ADN, un procedimiento que permite determinar el orden de los nucleótidos (secuencia) en un segmento de una molécula de ADN. Por su parte, la bioinformática se define, en sentido amplio, como una ciencia dedicada al manejo y el análisis de una vasta cantidad de información biológica (Atwood, 2002), mientras que, en sentido estricto, el término bioinformática hace referencia a la aplicación de la tecnología informática (o ciencia computacional) al campo de la biología molecular.

En Pipoc 2009 se reconoció a la secuenciación de genomas como el factor que más acelerará la investigación científica en plantas (Wahid, 2009; Yang *et al.*, 2009), pues abre la posibilidad de incrementar el conocimiento sobre los procesos evolutivos de las plantas, permite la identificación de genes de interés agronómico y comercial, facilita las aplicaciones y manipulaciones al nivel más fino de resolución y ciertamente causa impactos notables sobre el desarrollo sostenible y el impulso a las bio-economías (Wahid, 2009).

La obtención de secuencias de ADN es el primer paso dentro de la genómica. Sin embargo, es necesario acoplar dicha información a sistemas de anotación de alta calidad e integrarla al conocimiento de la estructura del genoma y de la evolución, de la arquitectura del gen y de los elementos que controlan la transcripción de secuencias de genes conocidos (Wahid, 2009). Además, es necesario incrementar la resolución de la estructura del genoma mediante el mapeo genético. Los esfuerzos en genómica funcional incluyen el diseño de microarreglos de todo el genoma (Ti *et al.*, 2009) y programas de mutagénesis a gran escala. De hecho, el *Malaysian Palm Oil Board* (MPOB) en asocio con *Oxford Gene Technologies* (OGT) reportaron el diseño de sus propios microarreglos basados en oligonucleótidos con el fin de realizar investigación que permita hacer análisis más detallado de la funcionalidad de los genes en palma de aceite (Clough, 2009). Es de enorme importancia implementar estrategias y utilizar herramientas que permitan ahondar en el conocimiento de la función de los genes en palma de aceite, pues de este modo se incrementará el conocimiento sobre la genética y la fisiología de la especie y se disminuirá la brecha que en aspectos básicos de utilidad agronómica se tiene frente a otros cultivos de oleaginosas tales como soya, maíz, etc. La información resultante de la articulación los análisis de microarreglos y de las posteriores actividades de investigación aplicada tendrán rápida aceptación para apoyar los procesos de selección de los programas de fitomejoramiento de las instituciones de investigación y de las casas productoras de semilla.

Resultados de la investigación en genómica para la identificación de los mecanismos moleculares de la Pudrición basal fueron presentados por Tee *et al.* (2009), quienes mediante estudios con microarreglos de ADN compararon raíces de palmas sanas y afectadas por *Ganoderma boninense*. De dicha comparación, se identificaron 173 genes que fueron diferencialmente expresados en raíces de palmas infectadas, 13% de los cuales (el mayor porcentaje) fueron genes relacionados con la defensa y el estrés. Otros genes conformaron las categorías de regulación génica (9%), desarrollo y codificación de hormonas (7%), proteínas estructurales (5%), metabolismo (5%) y transducción de señales (2%). Los genes que se indujeron en las palmas infectadas incluyeron a la isoflavona reductasa



(IFR, enzima clave en la síntesis de fitoalexinas, compuestos antimicrobiales), la super-óxido dismutasa de Cu/Zn y la familia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, mientras que los genes que fueron reprimidos en palmas infectadas, es decir, aquellos que seguramente fueron desactivados por el patógeno para suprimir el sistema de defensa de la planta, incluyeron las defensas (péptidos antimicrobianos), la fracción 7S de la globulina, la lectina unida a manosa (involucrada en el reconocimiento de los glicanos de microorganismos extraños) y thioredoxina peroxidasa. Adicionalmente, reportaron el perfil molecular de la interacción entre la palma de aceite y micorrizas arbusculares como mecanismo de protección contra *Ganoderma* (Tee *et al.*, 2009).

Es de anotar que la investigación para elucidar los mecanismos moleculares que subyacen la relación palma-*Ganoderma* está siendo muy activa e incluye no solo el uso de genómica sino de herramientas de la biotecnología tradicional. Por ejemplo, Obaidi *et al.* (2009) reportaron la clonación del gen que codifica para la proteína PR10 (de las proteínas PR se hablará más adelante) y la realización de experimentos de cuantificación de sus niveles de expresión. Como resultado, se encontró que después de la infección de la palma por parte del hongo se disminuye la expresión del gen que codifica para PR10. Adicionalmente, Sheong *et al.* (2009) identificaron homólogos de genes NBS y homólogos de genes de resistencia en palma de aceite. De otro lado, Fazliza *et al.* (2009) encontraron varios genes (ACS, proteínas de choque térmico, sintasa de sacarosa) que se han reportado como asociados a mecanismos de patogenicidad, de defensa contra enfermedades y de adaptación a diversos tipos de estrés en otras especies, lo cual se constituye en información valiosa para entender la relación de palma con sus agentes patógenos.

Bioinformática

Se presentó un ejemplo de análisis bioinformático basado en la comparación de secuencias de los factores de liberación de péptidos (RF1) de los cloroplastos de diversas especies (Azizi *et al.*, 2009). Ciertamente, la bioinformática se está empleando para almacenar y manejar las vastas cantidades de información generadas por los proyectos de secuenciación (Mayes, 2009). Sin embargo, a diferencia de la pasada conferencia en

la que varias plataformas fueron presentadas (MIMOS y Synamatix; Rocha, 2007a), esta vez se mostraron ejemplos de iniciativas específicas de cada laboratorio (Wahid, 2009; Mayes, 2009). Esta puede ser una señal para fortalecer los esfuerzos de esta área en Colombia (Rocha, 2008c; Rocha *et al.*, 2008a).

A diciembre de 2009, 6.324 genomas habían sido completamente secuenciados (<http://www.genomesonline.org>), incluidos alrededor de una docena de genomas vegetales, y 1.253 proyectos de secuenciación de otros genomas que estaban siendo desarrollados. En contraste con el dinamismo de esta tecnología en el mundo, en Colombia, el desarrollo de la genómica en el sector agrícola es pobre y heterogéneo, limitado a algunos cultivos de interés comercial y a relativamente pocos grupos de investigación. Dentro de los proyectos en desarrollo se destacan la iniciativa *Oil Palm Genome Project* (OPGP), consorcio liderado por CIRAD y Neiker con la presencia de Cenipalma y el proyecto genoma de café de Cenicafé (Rocha, 2008a). Adicionalmente, mención especial merece la iniciativa Gebix en metagenómica, área en la que también el sector palmero incursionó hace algún tiempo como acercamiento al estudio de la Pudrición del cogollo (PC, Rocha *et al.*, 2008b).

**A diciembre 2009,
6.324 genomas
habían sido
completamente
secuenciados y
1.253 proyectos de
secuenciación de
otros genomas que
estaban siendo
desarrollados.**

A manera de reflexión, valdría la pena establecer programas de genómica basados en la secuenciación de especies de interés para el país, por ejemplo, cacao, caucho, forestales, frutales, palma, papa y yuca, entre otros. Particular interés deberían tener los cultivos perennes, pues, por su biología misma, cuando se comparan con sus contrapartes anuales, son cultivos con enormes brechas tecnológicas y en los cuales existe desconocimiento de aspectos básicos de utilidad

para mejorar su desempeño. Además, la genómica y la bioinformática pueden incorporar herramientas que apoyen al fitomejoramiento tradicional y aceleren la producción de variedades, mediante la identificación de genes asociados con características orientadas a manejo eficiente de agua y nutrientes, crecimiento en suelos salinos y resistencia a enfermedades. Adicionalmente, con la aplicación de tales herramientas se pueden generar bioinsumos de espectro específico, los cuales mitigan parcialmente el impacto negativo causado por la actividad agrícola sobre el ambiente, fomentando así la sostenibilidad. De igual manera,

La proteómica se está utilizando para la elucidación de los mecanismos de defensa de la palma ante el ataque de hongos.

el conocimiento de la genómica de los cultivos y el análisis de la información mediante bioinformática los hace más competitivos, pues genera valor agregado en términos de conocimiento para el incremento en la productividad, disminución de costos o mejora de la calidad de los productos (Rocha, 2008a, 2008c).

Proteómica

Se define a la proteómica como el estudio sistemático del “proteoma”, el cual no es más que el grupo de todas las proteínas que están siendo expresadas en un estado particular de desarrollo, o bajo determinadas condiciones en un tejido u órgano específico (Tyers & Mann, 2003; Zhu *et al.*, 2003). La proteómica emplea técnicas de química analítica, incluidas la espectrometría de masas (MS) combinada con la electroforesis en dos dimensiones (2DE, por sus siglas en inglés), la cromatografía en fase reversa, la secuenciación de péptidos, etc. (Dyer *et al.*, 2009).

Muchos aspectos de la proteómica tales como la identificación de proteínas, la caracterización y la función de cada proteína y el análisis de su regulación pueden apoyar a la solución de problemas prácticos asociados, por ejemplo, con las respuestas de las plantas

frente a condiciones de estrés o enfermedad y con la manipulación de rutas metabólicas para la obtención de nuevos productos o de mayor calidad, etc.

Chung y Ramli (2009) describieron resultados parciales de la investigación de la variación natural del proteoma en diferentes estados de desarrollo del mesocarpo de fruto de palma de aceite. Aunque se enfocaron en los aspectos técnicos a tener en cuenta en la optimización de metodologías analíticas tipo 2DE y de caracterización mediante MS, en particular temas relacionados con la preparación de las muestras para el análisis (remoción de lípidos, eliminación de contaminantes fenólicos, utilización de reactivos específicos, etc.), se presentó la lista de las proteínas identificadas en el mesocarpo del fruto de palma de aceite y su posible función basada en la homología existente con las proteínas de otras especies que están reportadas en las bases de datos (Chung y Ramil, 2009). Este reporte se constituye en una herramienta de utilidad para el desarrollo de la proteómica en palma de aceite.

De igual manera, la proteómica se está utilizando para la elucidación de los mecanismos de defensa de la palma ante el ataque de hongos, específicamente de *G. boninense*, la especie más destructiva del género *Ganoderma* en palma. Es conocido que durante las infecciones fúngicas se expresan algunas proteínas de bajo peso molecular. Estas pequeñas proteínas se conocen como proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), se clasifican en cinco grupos (PR1 a PR5) y tienen su propia actividad antifúngica (Kitajima & Sato, 1999). Mediante la utilización de 2DE y subsecuente análisis mediante MS, Syahanim *et al.* (2009) generaron el mapa del proteoma de las raíces de palma de aceite tratadas con *G. boninense* en contraste con las palmas control (que no estuvieron en contacto con el hongo). Aparte de entregar aspectos técnicos de importancia relacionados con la optimización del proceso de extracción de proteínas, los autores reportaron señales de proteínas con pesos moleculares en el rango de 10 a 100 KDa. Un análisis más detallado resultó en señales de ocho proteínas con masas entre 10 y 15 KDa que estuvieron presentes solamente en las raíces de las palmas tratadas, lo cual podría relacionarse con la presencia de proteínas PR. El resultado no es concluyente, pero abre una enorme posibilidad para el conocimiento molecular y la definición de estrategias de control de la enfermedad. Análisis simi-



lares debieran ser considerados como acercamiento al análisis de la PC, pues basado en el conocimiento del agente causal de esta enfermedad (Martínez *et al.*, 2009) es necesario enfocarse en la elucidación de los mecanismos de defensa o respuesta de la palma al disturbio, considerando la vasta información que sobre los sistemas de inmunidad de las plantas se ha reportado (Jones & Dangl, 2006).

Metabolómica

Uno de los objetos de estudio más complejos y variados de la biotecnología, en particular la vegetal, son los metabolitos. Recientemente, se ha introducido el término “metaboloma” para referirse a la dotación de moléculas resultantes del metabolismo primario (carbohidratos y lípidos) o secundario (en plantas, metabolitos secundarios tipo terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos) que se encuentran en un tejido o estado particular de desarrollo bajo determinadas condiciones medioambientales o biológicas (Weckwert, 2003). Los metabolitos secundarios han sido estudiados por la química orgánica y la bioquímica desde hace muchos años. Como resultado de dispendiosas labores de investigación se han aislado, descrito y caracterizado más de 30.000 terpenoides (que incluyen aceites esenciales, caucho, glicósidos, etc.; McGarvey & Croteau, 1995; Gershenzon & Kreis, 1999), alrededor de 12.000 alcaloides (Wink, 1999) y cerca de 5.000 compuestos fenólicos (dentro de los cuales están los flavonoides, antocianinas, ligninas, taninos, etc.; Madhuri & Reddy, 1999).

Por las características biológicas de la palma de aceite se hace necesario conocer la composición de los metabolitos presentes en diversos tejidos y elucidar las funciones de los mismos. Para ello se necesitan metodologías que permitan trabajar de manera sistemática con metabolitos desconocidos y elucidar su función biológica. La biotecnología moderna está utilizando las mismas técnicas empleadas por la química y la bioquímica (HPLC, GC-MS, NMR, etc.), además está introduciendo técnicas y equipos de alta eficiencia (MALDI-TOF, SELDI, etc., Dyer *et al.*, 2009; Chung y Ramli, 2009) que permiten hacer análisis en masa de miles de muestras, trayendo como consecuencia la generación de una cantidad desbordante de información con potencial aplicación en diversos campos.

Mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), Tahir *et al.* (2009) determinaron el perfil de metabolitos presentes en tejidos de mesocarpio de frutos de *E. guineensis* tipo Ténera. Debido a que no existe una librería de masas espectrales para ESI-MS (*Electrospray Ionizations*) la estandarización de muchos parámetros para diferentes instrumentos y tipos de muestra es ardua, razón por la cual el reporte se enfoca a presentar los detalles técnicos de las determinaciones (preparación de las muestras, obtención de extractos, equipamientos, valores para las determinaciones, espectros, etc.). Desafortunadamente, no se presenta la identificación de los compuestos. Sin embargo, es un buen documento de referencia técnica.

De otro lado, Sékou *et al.* (2009) reportaron el análisis de compuestos fenólicos como método de selección de plántulas resistentes a la Marchitez Vascular (*Fusarium Wilt*, FW), enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Elaeidis*. Los autores encontraron, mediante HPLC, cinco compuestos fenólicos (de la familia de los flavonoides) que son producidos en las raíces y bulbos de las plántulas que exhiben la característica de resistencia cuando son inoculadas con *Fusarium*. Con este tipo de metodología se abre la posibilidad de reducir el tiempo requerido para la evaluación de los materiales a seleccionar si, por ejemplo, se acopla al desarrollo de sistemas de evaluación en campo.

Para examinar las relaciones entre la diversidad microbiológica del suelo y la sanidad de la palma, en particular relacionada con la afectación por *Ganoderma*, experimentos de determinación de perfiles metabólicos basados en pruebas bioquímicas fueron reportados por Low *et al.* (2009). Si bien no es metabolómica en sentido estricto es una aproximación interesante para el estudio de los microorganismos asociados con la salud o enfermedad de las palmas.

Marcadores moleculares: Microsatélites como herramienta predominante

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN de función desconocida que pueden ser localizados físicamente en el genoma y se constituyen en herramientas de utilidad para determinar los grados de parentesco, la variación y la diversidad genética de individuos de una población y entre poblaciones. En la actualidad, diversas metodologías permiten detectar

tales fragmentos de manera más eficiente (revisado por Mayes *et al.*, 2009) que las reportadas hasta hace algunos años (revisado por Rocha, 2003). Sin embargo, una de las más utilizadas en palma de aceite es la metodología de microsatélites (SSR, por sus siglas en inglés), la cual fue originalmente desarrollada para esta especie por Billotte *et al.* (2001), ha sido empleada de manera rutinaria por las diferentes instituciones de investigación en palma de aceite (CIRAD, MPOB, Ceni-palma) y recientemente, como se verá más adelante, se reporta su utilización por parte de los programas de fitomejoramiento de empresas palmicultoras de Malasia e Indonesia, principalmente.

En Pipoc 2009, fue predominante la utilización de microsatélites con diversos propósitos. Por ejemplo, en ejercicios de caracterización de la diversidad genética de palma *Pt Sampoerna Agro Tbk* reportó la caracterización de 173 accesiones con cuyos resultados se obtuvo evidencia de que los cruces entre Avros y progenitores africanos presentan efectos positivos asociados con la heterosis, similares a los que se obtienen al cruzar materiales Deli y africanos (Putri *et al.*, 2009). Adicionalmente, se reportó la diversidad genética intra e inter poblacional de familias TxP y clones de Pisíferas de origen nigeriano, obtenidos mediante cultivo de tejidos y que son usadas como fuente de polen por *PT Sampoerna Agro Tbk*. Como conclusión, la diversidad genética entre individuos dentro de cada población fue alta y los clones de material Pisífera mostraron una alta similitud entre ellos (Zulhermana *et al.*, 2009).

Se reportó la evaluación de la diversidad genética en el germoplasma de *Sumatra Bioscience*, la estimación de la heterocigocidad, la identificación de las palmas altamente homocigóticas y la variación de la heterocigocidad en material experimental y mejorado (Alfiko *et al.*, 2009). Este hallazgo es de importancia para la identificación de cuellos de botella en el material élite actual de esa compañía y en la definición de estrategias de fitomejoramiento, pues la heterocigocidad contribuye a la heterosis y en parte al vigor híbrido y productividad de los genotipos Ténera. Sin embargo, el material heterocigota produce un amplio rango de genotipos con consecuencias indeseables en la uniformidad del material comercial.

En identificación varietal e identificación de “contaminación”, Fillianti *et al.* (2009a), utilizando combinaciones de SSR reportadas previamente por CIRAD, identificaron 96 SSR polimórficos, de los cuales tres *loci* fueron altamente polimórficos y permitieron diferenciar clones que habían sido mezclados durante el transporte. De 2.719 plántulas de un embarque, cerca de 2.600 fueron clasificadas inequívocamente en uno de los diez genotipos que comprendían el embarque. Sin embargo, se descartó el 4,7% porque se encontraron inconsistencias con los diez genotipos de referencia (Fillianti *et al.*, 2009a). Este resultado es uno de los primeros ejemplos de la utilidad real de los marcadores moleculares con fines de asegurar la calidad de los materiales entregados por una casa comercial de semilla.

De otro lado, Bakoumé *et al.* (2009) reportaron la utilización de diez combinaciones de SSR, previamente generadas por Cirad, para identificar cinco clones diferentes de palma de aceite. Los análisis de agrupamiento UPGMA basados en la distancia genética¹ mostraron cinco subgrupos, cada agrupamiento de clones correspondiente al mismo *ortet*, con lo cual se mostró el potencial de los SSR para la identificación de material obtenido mediante cultivo de tejidos. Este hallazgo es de importancia para los experimentos de evaluación de calidad de los clones de palma generados en Colombia, pues la metodología SSR es utilizada rutinariamente (Montoya *et al.*, 2005), con lo cual se podrá contribuir a garantizar la homogeneidad de los materiales y la trazabilidad de los mismos de manera eficaz y relativamente económica.

Se han reportado SSR en regiones diferentes de diversos genes, por ejemplo, repeticiones mononucleotídicas en la enoyl-ACP reductasa, la palmitoil-ACP thioesterasa y la oleoyl-ACP thioesterasa y repeticiones tetranucleotídicas en KAS II (Lim *et al.*, 2009). Con esta información se hace posible la selección asistida por marcadores para tamizaje por calidad de aceite, lo cual podría abrir nuevas oportunidades para el desarrollo de mercados de aceites con composiciones específicas.

Recientemente, se ha introducido una variación en la técnica de SSR en palma de aceite, el EST-SSR, que surge como resultado de la investigación para

1. El concepto de distancia genética para esta clase de análisis se entiende como el grado en el cual varios alelos no están igualmente representados en los *ortets* analizados.



identificar miles de secuencias expresadas (conocidas como EST, por *Expressed Sequence Tag*) las cuales se han incorporado a la base de datos de EST de palma de aceite del *Malaysian Palm Oil Board* (MPOB) y mediante análisis informático se han identificado secuencias microsatélites asociadas con la porción expresable del genoma. Cerca de 19.250 EST fueron usadas para identificar la frecuencia y distribución de SSR en secuencias codificantes y regiones no traducidas de los EST de palma. La información resultante de esta “minería de datos” puede ser revisada en detalle en Rosli *et al.* (2009). Adicionalmente, mediante esta técnica se realizó el tamizaje de 16 poblaciones avanzadas DxD, 12 TxT y 4 DxP usando diez marcadores EST-SSR que produjeron 42 alelos (Ithnin *et al.*, 2009). Como conclusión, se encontró un nivel de polimorfismo más bajo que el reportado para las colecciones de germoplasma, aunque los niveles de heterocigocidad entre las poblaciones se mantienen. Muy seguramente será necesario ajustar algunos de los procedimientos de análisis estadístico para obtener el máximo potencial de esta metodología.

Otras metodologías de marcadores moleculares mencionadas fueron la caracterización mediante las técnicas de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) y AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) para la estimación de relaciones genéticas entre material mejorado y material silvestre proveniente de Ghana (Wening *et al.*, 2009) y el uso de HRM-PCR (*High Resolution Melting – Polymerase Chain Reaction*, Fillianti *et al.*, 2009b) para la detección de SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) explotando las características de desnaturalización del ADN causada por el polimorfismo de la secuencia misma y que trae como ventajas la detección en tiempo real, la ausencia de sistemas de electroforesis y la posible automatización, lo cual la convierte en una técnica con potencial de utilización en tamizaje en masa de materiales.

Marcadores moleculares asociados con genes de tolerancia o resistencia a *G. boninense* en distintas progenies fueron obtenidos por Sheong *et al.* (2009) mediante un tamizaje genotípico conocido como perfil NBS (por *Nucleotide Binding Site-Profiling*) que fue usado para identificar y mapear genes análogos de resistencia (RGA por sus siglas en inglés). Un total de 21 combinaciones de cebadores y enzimas de restricción fueron probados en individuos tolerantes

y susceptibles. De este tamizaje, siete combinaciones fueron identificadas como de alto potencial y con ellas se obtuvieron 11 y 13 marcadores asociados con tolerancia y susceptibilidad a *Ganoderma*, respectivamente. Los análisis de secuencia de los marcadores han identificado homólogos de genes NBS y homólogos de genes de resistencia.

Adicionalmente, Nurniwalis *et al.* (2009) aislaron de regiones ITS (*Internal Transcribed Spacer*) entre 650 y 1.000 pb, del ADN ribosomal (ADNr) de las cuatro especies de *Ganoderma* que afectan a la palma de aceite, mostrando una región conservada de 14 pb exclusiva para *Ganoderma*, con la cual se puede hacer tamizaje de plántulas infectadas y sanas. Así, se tiene un marcador molecular asociado con la detección de *Ganoderma* en plantaciones de palma de aceite.

Con el poder que brindan de las herramientas de marcadores moleculares para la determinación de la variabilidad genética, el conocimiento de los agentes causales de algunas de las enfermedades más devastadoras como la Pudrición del cogollo causada por *Phytophthora palmivora* (Sarria *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2009) o la Pudrición basal causada por *G. boninense* y el desarrollo de modelos matemáticos de dinámica de tales enfermedades (Corredor y Gómez, 2009; Betitis *et al.*, 2009), se abre la posibilidad de desarrollar modelos que relacionen datos moleculares, poblacionales y epidemiológicos que permitan establecer el grado de variabilidad de los patógenos para que de esta manera se contribuya al conocimiento molecular de la enfermedad, se establezcan los bancos de las posibles diversas cepas de los agentes causales y con todo esto se pueda aportar a la generación de estrategias de manejo específicas y duraderas, como se ha demostrado en otros pato-sistemas (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

Se tiene un
marcador
molecular
asociado con la
detección de
Ganoderma en
plantaciones
de palma
de aceite.

Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos es una herramienta de enorme importancia para especies perennes y monocotiledóneas como la palma de aceite. Ciertamente, esta tecnología ha presentado inconvenientes para ser utilizada de manera rutinaria en el cultivo de palma de aceite (Rocha, 2007b). Sin embargo, año tras año se presentan modificaciones y se hacen ajustes metodológicos que, aunque son aparentemente sencillos, permiten ser mucho más eficientes en la propagación (clonación) de material élite. Aspectos tales como la concentración, la combinación y la secuencia de reguladores de crecimiento, fuente de carbohidratos, etc. son factores clave para el éxito del

El cultivo de tejidos es una herramienta de enorme importancia para especies perennes y monocotiledóneas como la palma de aceite.

cultivo de tejidos, como es mostrado por (Reflini *et al.*, 2009). De igual manera, cada vez son más las empresas que hacen uso del cultivo de tejidos bien como estrategia principal bien como complemento a los programas de mejoramiento. Por ejemplo, Iswandar *et al.* (2009) reportan la estrategia de *SumBio* de usar cultivo de tejidos para pro-

ducir clones de parentales Dura seleccionados para producción de semilla semiclinal. Las plantas producidas son llevadas a campo y cruzadas con Pisíferas seleccionadas para producir progenies Ténera semiclinales. Los autores reportan que las palmas semiclinales exhiben floración normal y material de siembra uniforme (no idéntico). Esta se constituye en una estrategia para producir cantidades considerables de semilla normal cuando el polen o las inflorescencias femeninas son el factor limitante.

Una metodología propia del cultivo de tejidos es la generación de plantas haploides mediante el cultivo de anteras. Sin embargo, Mienanti *et al.* (2009) reportan experimentos con plántulas haploides para la genera-

ción de palmas de aceite doble haploides mediante diferentes tratamientos con colchicina sin la utilización de cultivo de tejidos. Es interesante anotar cómo algunas empresas han reconocido el papel importante de los haploides en fitomejoramiento en la producción de dobles haploides que son homocigotos y pueden ser usados como parentales en la producción de la generación F1. De esta manera, se predice que el vigor híbrido de las palmas se incrementará hasta en tres veces los valores actuales (Mienanti *et al.*, 2009). En Colombia, se consideró alguna vez el desarrollo de dobles haploides en palma de aceite, sin embargo, no se concretó dicha posibilidad y sería conveniente evaluar su pertinencia en la actualidad.

En Pipoc 2009 se reportó el desarrollo del sistema MosLIM (*two-in-one MPOB Simple Impeller*, Tarmizi *et al.* 2009), un sistema económica y logísticamente eficiente, el cual permite proveer de manera simultánea la aireación y la agitación (dos en uno) de cultivos líquidos. Con este sistema se reportan incrementos de tres a cinco veces en peso fresco de clones de palma multiplicados durante 40 días. Adicionalmente, el sistema puede ser empleado en otras especies y tiene potencial de ser automatizado.

Especial mención merece el estudio (Ooi *et al.*, 2009) que evaluó, mediante PCR en tiempo real, la respuesta molecular y midió los niveles de expresión de algunos genes de respuesta a hormonas vegetales cuando explantes cultivados fueron tratados con las hormonas 2,4-D y NAA. Diferentes genes fueron expresados (*EgIAA13*, *EgIAA9*) y se constituyeron en un indicador de la capacidad de los *ortets* de responder a la aplicación exógena de auxinas. Estos resultados complementan la batería de marcadores moleculares que han sido desarrollados para material *in vitro* de palma de aceite (revisado por Singh *et al.*, 2009).

Transgénicos

Desde hace algunos años se ha descrito un método de transformación genética eficiente en palma de aceite basado en biobalística (Parveez & Christou, 1998), el cual es utilizado de manera rutinaria, en particular por el MPOB. Mayor información sobre el sistema de biobalística y la importancia de los promotores puede ser encontrada en una revisión previa (Rocha,



2004). Mediante la utilización de dicho método se ha obtenido como resultado de relevancia la producción de plásticos biodegradables (polihidroxibutirato: PHB y polihidroxibutirato-co-valerato: PHBV) en hojas de palma (Hanin y Parveez, 2007). Además, existe un potencial enorme de manipulación genética con los ensayos de ingeniería metabólica que están siendo realizados por MPOB (Rocha, 2007a).

En Pipoc 2009, Bohari *et al.* (2009) reportaron la utilización exitosa de sistemas de selección de materiales de palma transgénica basados en la utilización el gen de la fosfomanosa isomerasa de *Escherichia coli* y manosa como agente de selección, lo cual disminuye la preocupación por el uso de sistemas de selección basados en herbicidas o antibióticos. De otra parte, y con el objeto de incrementar la eficiencia y seguridad de los sistemas de transformación genética, Masura *et al.* (2009) caracterizaron un promotor constitutivo de palma de aceite derivado del gen que codifica para la proteína de extensión de la ubiquitina (*uep1*, por sus siglas en inglés). Dicho promotor condujo la expresión del gen reportero en tejidos de callo embriogénico, embrioides, hojas jóvenes y maduras, tejidos meristemáticos, mesocarpo, etc. De otro lado, Hasnuladi *et al.* (2009), utilizando transgénesis como herramienta, evaluaron la actividad del promotor del gen de la estearoil-ACP desaturasa (SAD) en diferentes tejidos de la palma de aceite y determinaron las regiones regulatorias dentro de la secuencia promotora, lo cual es de importancia si se tiene en cuenta que SAD desempeña un papel importante en la producción de ácido oleico monoinsaturado, además la presencia de este gen en el mesocarpo y el cuesco se correlaciona con el patrón de síntesis de aceite.

Finalmente, se continúa con la utilización de transgénesis en plántulas de *Arabidopsis* para la realización de experimentos de expresión y complementación de genes obtenidos de palma de aceite (Safiza *et al.*, 2009 a y b).

Consideraciones Finales

Varios son los puntos de reflexión a considerar los trabajos presentados en Pipoc 2009. Por ejemplo, que la interacción entre la genómica, los estudios de expresión de genes, la proteómica y la bioinformática está llamada a ser fundamental para el

establecimiento de estrategias altamente específicas de manejo de enfermedades (PC, BSR) y bien con el uso de métodos químicos, de control biológico o biotecnológicos (transgénicos). El camino es complejo pero ciertamente una combinación de todas ellas puede ser la estrategia más eficiente y menos costosa en términos de tiempo, recursos e impacto sobre el ambiente.

Para incluir las estrategias moleculares en estudios de PC, será necesario generar métodos de inoculación de la enfermedad altamente eficientes, que permitan hacer el tamizado de materiales susceptibles y tolerantes de manera acertada, con el fin de utilizarlos con propósitos de investigación (identificación de mecanismos moleculares, detección de proteínas o metabolitos marcadores, etc.) y de generación de sistemas de diagnóstico y de control eficientes. Con base en el conocimiento del agente causal de la PC, es necesario enfocarse en la elucidación de los mecanismos de defensa o de respuesta de la palma a la enfermedad.

Con las fortalezas que presentan algunas instituciones colombianas en el análisis de metabolitos es pertinente el desarrollo de la metabolómica de palma de aceite para el mayor conocimiento de enfermedades, la mejora de la polinización en los híbridos interespecíficos OxG y en la generación de correlaciones de presencia de compuestos en plántulas con calidad de aceite, etc.

Colombia está en mora de establecer una iniciativa de prospección de palmas o especies productoras de aceite con potencial industrial y alimenticio (Rocha, 2008b). Los materiales identificados podrían ser caracterizados y analizados en los ámbitos agronómico, bioquímico y molecular (Rocha y Rey, 2007) con el fin de identificar las características y eventuales genes que podrían tener impacto económico para el sector. Esta estrategia ha venido siendo desarrollada progresivamente por algunas instituciones de Malasia y ya tienen resultados, por ejemplo en chontaduro (*Bactris gasipaes*) y en palma de seje (*Jessenia bataua*, Kock y Ramli, 2009; Sharian *et al.*, 2009). De hecho, en Colombia el resultado de esta estrategia de evaluación de la biodiversidad ha arrojado resultados importantes, por ejemplo, en el caso de *E. oleifera* (Rey *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2006).

Agradecimientos

El autor agradece al Centro de Documentación Palmero por el acceso a las memorias y demás material de con-

sulta requerido para escribir el presente artículo. De igual manera, agradece las sugerencias de los evaluadores.



Referencias Bibliográficas

- Alfiko, Y; *et al.* 2009. Heterozygosity screening in oil palm. *Pipoc* 2009, v.2, AP41: 922-929.
- Attwood, TK; Parry-Smith, DJ. 2002. *Introducción a la Bioinformática*. Prentice Hall, España. pp. 1-36, 209.
- Azizi, N; *et al.* 2009. Identification and characterisation of oil palm chloroplast sequences. *Pipoc* 2009, v.3, AP85.
- Bakoumé C; *et al.* 2009. Identification of different oil palm clones using microsatellite markers. *Pipoc* 2009, v. 2, AP22: 650.
- Beitiss, S; *et al.* 2009. New Britain Palm Oil Limited's approach to using GIS as an Alternative Tool in monitoring the spread of *Ganoderma boninense* in Numundo Plantation. *Pipoc* 2009, v. 3, AP24: 672-680.
- Billotte, N; *et al.* 2001. Development, characterisation, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers. *Genome*, 44 (3): 413-425.
- Bohari, B; *et al.* 2009. Phosphomannose isomerase as an alternative selectable marker gene for oil palm transformation. *Pipoc* 2009, v. 1, AP 73: 1254-1266.
- Borevitz, JO; Ecker, JR. Plant Genomics: The third wave. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 5: 443-477.
- Chung BLY; Ramli US. 2009. Tackling the oil palm proteome: Evaluation of sample preparation techniques for protein profiling via MALDI-TOF mass spectrometry. *Pipoc* 2009, v. 3, AP65: 1136-1157.
- Clough, J. 2009. Custom oligonucleotide microarray design and analysis for oil palm gene expression quantification. *Pipoc* 2009, v. 1, A14:256.
- Corredor, JE; Gómez JE. 2009. A mathematical approach towards understanding the dynamics and outcome of "Bud Rot Disease" in oil palm, in different palm producing areas of tropical America. *Pipoc* 2009, v. 2, AP20: 632-640.
- Dyer, J; *et al.* 2009. Advances in redox proteomics and metabolomics: application to oil palm. *Pipoc* 2009, v. 1, AP17: 259-260.
- Fazliza MA; *et al.* 2009. Differentially expressed genes in tolerant oil palm progeny artificially infected with *Ganoderma boninense*. *Pipoc* 2009, v. 3, AP75: 1282-1291.
- Fillianti H; *et al.* 2009a. Varietal fingerprinting: confirmation of identity using SSR markers. *Pipoc* 2009, v. 2, AP42: 922-930.
- Fillianti H; *et al.* 2009b. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) detection using High Resolution Melt PCR. *Pipoc* 2009, v. 2, AP43: 930-934.
- Gershenzon, J; Kreis W. 1999. *Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, sterols, cardiac glycosides and steroid saponins*. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. M. Wink. Sheffield, CRC Press: 222-229.
- Genomes On Line Database v 2.0. <http://www.genomesonline.org> Consultado 2 de diciembre de 2009.
- Hammond-Kosack, K; Jones, JDG. 2000. Responses to plant pathogens. *En*: Buchanan, BB; Gruissem W; Jones RL. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. P. 1102-1156.
- Hasnuladi AAH; Akmar Abdullah SN; Kadir MA. 2009. Functional analysis of the oil palm Stearoyl-ACP Desaturase promoter gene using transient expression assay. *Pipoc* 2009, v. 3, AP61: 1087-1094.
- Iswandar HE; *et al.* 2009. Semi-clonal seed production in oil palm. *Pipoc* 2009, v. 2, AP45: 943-947.
- Ithin M, Singh R; Nookiah R. 2009. SSR analysis of genetic diversity among selected oil palm advanced breeding populations. *Pipoc* 2009, v. 3, AP74:1267-1281.
- Jones, JD; Dangl, JL. 2006. *The plant immune system*. *Nature* 444:323-329.
- Kishore, GM. 2009. Sustainability through Biotechnology. *Pipoc* 2009, v. 1, A24: 369.
- Kitajima, S; Sato, F. 1999. Plant Pathogenesis-Related Proteins: Molecular Mechanisms of Gene Expression and Protein Function. *Journal of Biochemistry* 12(1):1-8
- Kock, TO; Ramli US. 2009. Molecular characterization of b-Ketoacyl ACP Synthase (KAS) II cDNA from *Jessenia bataua*. *Pipoc* 2009, v. 3, AP62: 1095-1106.
- Lim, CK; Eng Ti, LL; Singh R. 2009. Identification and localization of simple sequence repeats for genes encoding fatty acid biosynthetic enzymes. *Pipoc* 2009, v. 2, AP29: 774-778.
- Low YC; *et al.* 2009. Metabolic profiles of functional microbes in *Ganoderma* and non *Ganoderma* infected oil palm rhizospheres. *Pipoc* 2009, v. 2, AP37: 868-874.
- Madhuri, G.; A.R. Reddy (1999). "Plant biotechnology of flavonoids." *Plant Biotechnol.* 16(3): 179-199.
- Martínez, G; *et al.* 2009. Advances in the research of *Phytophthora palmivora*, the causal agent of bud rot of oil palm in Colombia. *Pipoc* 2009, v. 2, AP38: 875-890.
- Masura, S; Parveez AK; Ismail I. 2009. Characterization of an oil palm constitutive promoter ubiquitin extension protein. *Pipoc* 2009, v. 3, A70: 1222-1228.



- Mayes, S. 2009. Bridging genome and information technology. *Pipoc* 2009, v. 1, A16: 258.
- Mayes, S; *et al.* 2009. Marker assisted selection in plant breeding – generating large datasets for trait analysis. *Pipoc* 2009, v. 1, A11: 226-235.
- McGarvey, DJ; Croteau R. 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1015-1026.
- Montoya C., *et al.* 2005. Diversidad genética de materiales *Elaeis guineensis* Jacq. procedentes de Angola. *Fitotecnia Colombiana* 5(2): 1-10.
- Mienanti, D; *et al.* 2009. Chromosome doubling of oil palm haploids. *Pipoc* 2009, v. 2, AP46: 948-953.
- Nurniwalis, AW; Arif MA; Idris AS. 2009. An amplified internal transcribed spacer region- a potential marker to a distinguish *Ganoderma* and oil palm DNA preparations. *Pipoc* 2009, v. 3, AP68: 1192-1204.
- Obaidi JRA; Mohd-Yusuf Y; Othman RY. 2009. Expression analysis of oil palm (*Elaeis guineensis*) pathogen related protein (PR10) gene in response to the Basal Stem Rot infection caused by the fungus *Ganoderma boninense*. *Pipoc* 2009, v. 2, AP18: 615-624.
- Ooi, S-E; *et al.* 2009. Response of hormone-responsive genes to 2,4-D vs. NAA treatment of explants cultures via gene expression analysis. *Pipoc* 2009, v. 3, AP80: 1339-1350.
- Parveez, GKA; Christou P. 1998. Biolistic-mediated DNA delivery and isolation of transgenic oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryogenic callus cultures. *J. Oil Palm Res.* 10: 29-38.
- Putri, LLAP; *et al.* 2009. Assessing genetic diversity of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) germplasm collections using microsatellite markers. *Pipoc* 2009, v. 2, AP34: 823-835.
- Reflini, Forster BP; Nelson SPC; Caligari, P. 2009. Factors influencing callogenesis and embryogenesis in oil palm cultures. *Pipoc* 2009, v. 2, AP44: 935-943.
- Rey, LR.; *et al.* 2003. Colecta de material genético de palma noli *Elaeis oleifera* [H.B.K.] Cortés en el Trapecio Amazónico. *Ceniavances* (Colombia) 101, p.1-4.
- Rocha, PJ. 2003. Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección de palma de aceite. *Palmas* (Colombia) 24(2):11-25.
- Rocha, PJ. 2004. Plantas transgénicas frente a la realidad del mercado. *Palmas* (Colombia) 25(3):55-69.
- Rocha PJ. 2007a. Biotecnología en el cultivo de palma de aceite: Aspectos sobresalientes en *Pipoc* 2007. *Palmas* (Colombia) 28(3): 47-55.
- Rocha, PJ. 2007b. Cultivo de tejidos: una herramienta valiosa para el desarrollo de la palma de aceite en Colombia. *Palmas* (Colombia) 28(1):53-64.
- Rocha, PJ. 2008a. *Propuesta de fortalecimiento de la capacidad en genómica en Colombia*. Informe de consultoría. Disponible en Dirección Nacional de Planeación. Bogotá, 58p.
- Rocha, PJ. 2008b. *Propuesta para el fortalecimiento de la capacidad nacional de bioprospección mediante herramientas biotecnológicas*. Disponible en Dirección Nacional de Planeación. Bogotá, 39p.
- Rocha, PJ. 2008c. *Revisión crítica de iniciativas para el desarrollo de la bioinformática en Colombia*. Informe de consultoría. Disponible en Dirección Nacional de Planeación. Bogotá, 29p.
- Rocha, J; *et al.* 2006. Caracterización bioquímica parcial de genotipos de la colección de *Elaeis oleifera* de Cenipalma provenientes de la Amazonía colombiana. *Palmas* (Colombia) 27(3):35-44.
- Rocha, PJ; Rey, L. 2007. Partial agronomical, biochemical and molecular characterisation of Colombian *Elaeis oleifera* germplasm bank. *En: Proceedings of the PIPOC 2007 International Palm Oil Conference (Agriculture, Biotechnology & Sustainability)*. Kuala Lumpur Convention Centre, Malaysia: 1193-1199.
- Rocha, PJ; Mutis, G; Restrepo, S. 2008a. Generación de la plataforma bioinformática para palma de aceite de Cenipalma. *Palmas* (Colombia) 29(2): 19-28.
- Rocha, PJ; *et al.* 2008b. Ensayos preliminares de la estrategia meta-genómica para la posible identificación de agentes asociados a la Pudrición de Cogollo. *Ceniavances* 158: 1-4.
- Rosli, R; *et al.* 2009. Data mining for Simple Sequence Repeat (SSR) markers for coding and untranslated regions of the expressed sequence tag (EST) collection of oil palm. *Pipoc* 2009, v. 3, AP54: 1018-1026.
- Safiza M; Mohamad Arif AM; Abrizah O. 2009a. Functional complementation study in *Arabidopsis thaliana* of oil palm Lysophosphatidyl acyltransferases. *Pipoc* 2009, v. 3, AP72: 1244-1253.
- Safiza M; *et al.* 2009b. Functional characterization of oil palm Stearoyl-ACP Desaturase by overexpression in wild type *Arabidopsis* and complementation of *fab2* mutant. *Pipoc* 2009, v. 3, AP71: 1229-1243.
- Sarria, GA; *et al.* 2008. *Phytophthora* sp. Es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del Cogollo (PC) de la palma de aceite en Colombia. *Palmas* (Colombia) 29(especial): 31-41.
- Sharian, MS; *et al.* 2009. Protein expression of Stearoyl- ACP desaturase from *Jessenia bataua* in *Escherichia coli*. *Pipoc* 2009, v. 3, AP66: 1158-1167.
- Sékou, D; *et al.* 2009. Phenolic diversity in the defense reaction of the oil palm against vascular wilt disease. *Pipoc* 2009, v. 3, AP55: 1027-1034.
- Sheong, TJ; *et al.* 2009. Identification of *Ganoderma boninense* resistance/tolerance genes by NBS profiling method. *Pipoc* 2009, v. 2, AP31: 790-801.
- Singh, R; *et al.* 2009. Molecular markers in oil palm breeding and tissue culture: MPOB-Industry's experience. *Pipoc* 2009, v. 1, A12: 236-248.
- Syahanim S; *et al.* 2009. Protein spots of oil palm root treated with *Ganoderma boninense*. *Pipoc* 2009, v. 3, AP69:1205-1221.
- Tahir NI; Mohammad A. R; Ramli US. 2009. Development of liquid chromatography- mass spectrometry (LC-MS) technique for non-targeted analysis of low molecular weight metabolites from mesocarp of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Pipoc* 2009, v. 3, AP 67: 1168-1191.
- Tarmizi, AH; Zaiton R; Rosli MY. Multiplication of oil palm liquid cultures in the two-in-one MPOB simple impeller system (2-in-1 Moslim). *Pipoc* 2009, v. 2, AP21: 641-649.
- Tee, S-S; *et al.* 2009. Global transcript profiling of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) infected by *Ganoderma boninense*. *Pipoc* 2009, v. 1, A13: 249-255.

- Ti, LLE; *et al.* 2009. Protocol optimization and quality assessment of oil palm cDNA microarray experiments. *Pipoc* 2009, v. 1, AP78: 1313-1330.
- Tyers, M; Mann M. 2003. From genomics to preteomics. *Nature* 422(6928):193-197.
- Wahid, MB. 2009. Sequencing the oil palm genome: The beginning. *Pipoc* 2009, v. 1, PL: 3.
- Weckwerth, W. 2003. Metabolomics in System Biology. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 669-689
- Wening S; *et al.* Genetic relationship studies of Sumatra Bioscience oil palm germplasm using ISSR and AFLP profiles. *Pipoc* 2009, v. 2, AP40: 903-912.
- Wink, M. (1999). *Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites*. Biochemistry of plant secondary metabolism. M. Wink, CRC Press: 1-16.
- Yang, B., Huang S., Yang, H. 2009. Unraveling whole genome sequence for plant improvement. *Pipoc* 2009, v. 1, L2:193-202.
- Zhu, H; Bilgin, M; Snyder, M. 2003. Proteomics. *Annual Review of Biochemistry* 72: 783-812.
- Zulhermana, Sudarsono, Asmono D; Raganata AP; Roselina MD. 2009. Intra- and inter population genetic diversity based on SSR marker analysis of pisifera palm collection in Pt Sampoerna Agro Tbk. originated from Nigeria. *Pipoc* 2009, v. 2, AP39: 891-902.

PAUTA FOTON