

V.-Capítulo 2

Semilla sintética

Rey, Hebe Y.; Mroginski, Luis A.

1 Concepto

Resulta difícil determinar como se originó la idea de producir semillas sintéticas o artificiales. Estas son el resultado de la aplicación en agricultura del fenómeno de embriogénesis somática, descrito por primera vez en 1958 por Jakob Reinert y F.C.Steward y colaboradores. Sin embargo, un gran propulsor de su utilización para la propagación a gran escala de plantas fue Toshio Murashige, quien en un simposio realizado en 1977 en Ghent (Bélgica) presentó formalmente la idea de la producción de las semillas sintéticas, entendiendo como tal a un simple embrión somático encapsulado. Esta semilla se diferencia de la semilla verdadera en que el embrión es somático (producido por el fenómeno conocido como embriogénesis somática) y no cigótico, y que si tiene endosperma y cubierta, éstos son artificiales (Fig.1 a y b). Esta semilla, puesta en condiciones adecuadas, germina (Fig.1 c) y se convierte en una planta (Fig.1 d). Muchos grupos de investigación han contribuido al desarrollo de tales semillas. Entre ellos se deben destacar el grupo liderado por Keith Walker de la Compañía Monsanto, quien a partir de mediados de la década que va de 1970 a 1980 trabajó especialmente con alfalfa. También hay que mencionar la labor de Robert Lawrence de la Union Carbide, quienes comenzaron los trabajos con especies forestales, lechuga y apio. Otros investigadores como Drew, Kitto y Janick realizaron sus trabajos con zanahoria. El aporte del grupo liderado por Keith Redenbaugh de la Plant Genetic Inc. fue muy importante, especialmente por su descubrimiento de que hidrogeles como el alginato de sodio podían utilizarse para producir semillas artificiales que podían germinar en condiciones de invernadero.

Existe otro tipo de semilla sintética, diferente del definido más arriba, donde, en lu-

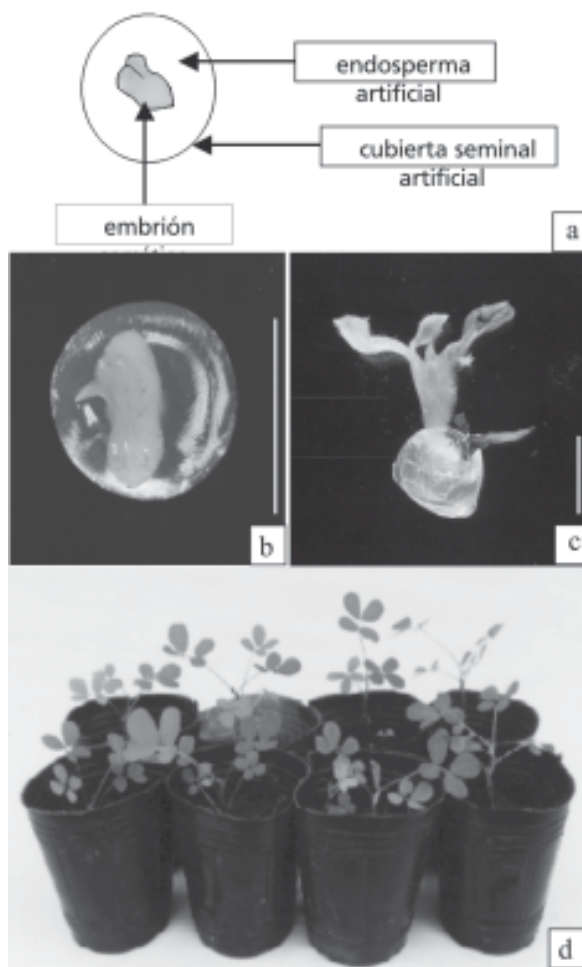


Figura 1: a) Partes de una semilla sintética. b, c y d) Obtención de plantas de *Arachis pintoi* ($2n=3x=30$) mediante semillas sintéticas (las barras verticales indican 3 mm).

gar de encapsular embriones somáticos se encapsulan yemas. Este tipo de «semillas sintéticas» –de una utilización muy restringida– no será tratado en este capítulo.

2 Tipos de semillas sintéticas

Las semillas sintéticas pueden fabricarse de diferentes maneras (Fig. 2). Básicamente pueden utilizarse embriones hidratados, tal como resultan del proceso de embriogénesis somática, o bien pueden ser desecados. En algunos casos estos embriones están protegidos por cubiertas protectoras. De esta manera se pueden distinguir 5 tipos básicos de semillas sintéticas:

1) Semillas sintéticas con embriones desecados sin cubierta (Tipo 1, Fig. 2). Se

trata de un sistema muy simple donde los embriones son desecados hasta alcanzar porcentajes de humedad del 8 al 20% y no están provistos de ningún tipo de cubierta protectora. En el caso de alfalfa, embriones sometidos a la desecación mostraron porcentajes de conversión en plantas de hasta el 95% (Tabla 1). Es posible mantener la viabili-

de los embriones somáticos tal como resultan del proceso de embriogénesis somática, sin ningún tipo de cubierta protectora. Este sistema ha sido desechado en la práctica por la escasa conversión de embriones en plantas.

4) Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados suspendidos en un gel viscoso («fluid drilling»)(Tipo 4,

Fig. 2). Inicialmente fue desarrollado en zanahoria y más recientemente en batata; consiste en la inclusión de varios embriones en una especie de tubo que contiene un gel viscoso.

5) Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados y provistos de una cubierta protectora (Tipo 5, Fig. 2).

Es el sistema más usado. Por esta razón, de aquí en adelante, cuando se mencione «semilla sintética» se referirá a este tipo. Tiene la ventaja de que los embriones no están sujetos a la desecación, que constituye la principal causa de los bajos valores de conversión en plantas. Si bien se han ensayado numerosas sustancias para encapsular a los embriones somáticos (agar, gelrite, gomas), una de la técnicas más utilizadas consiste en lograr la formación de una cubierta protectora de alginato de calcio, compuesto que no es tóxico para el embrión y permite una rápida encapsulación. El proceso es muy simple y consiste básicamente en sumergir a los

embriones somáticos en una solución de alginato de sodio al 2%, pasándolos luego a una solución acomplejante de, por ejemplo, 100 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Fig. 3). Con esta técnica se genera una semilla sintética consistente en un embrión somático recubierto con una cubierta seminal y provisto de un endosperma artificial (Fig.1 a y b). Eventualmente estas cápsulas pueden ser recubiertas por sustancias tales como polioxietilenglicol, que sirve para mantener una adecuada hidratación de las cápsulas y embriones. Este procedimiento ha posibilitado la obtención de semillas sintéticas de numerosas especies de interés económico, entre las que pueden mencionarse alfalfa, zanahoria, apio y especies forestales como *Picea abies*, *Pinus radiata*, *Santalum album* y *Pseudotsuga*

Tabla 1: Ejemplos de semillas sintéticas basadas en la desecación de embriones sin cubierta protectora.

Especie	% humedad en la semilla	% conversión en plantas
<i>Apium graveolens</i>	10-13	35-85
<i>Dactylis glomerata</i>	13	5-30
<i>Medicago sativa</i>	8-20	33-95

dad de este tipo de embriones por un año, aproximadamente, en condiciones de laboratorio.

2) Semillas sintéticas con embriones somáticos desecados y provistos de cubierta protectora (Tipo 2, Fig. 2). Esta técnica ha sido utilizada en zanahoria y apio, donde los embriones fueron recubiertos con polyoxietileno y luego desecados. Los resultados han mostrado que es factible lograr una buena supervivencia de éstos; sin embargo, la conversión en plantas es realmente baja.

3) Semillas sintéticas con embriones hidratados sin cubierta (Tipo 3, Fig. 2). Es el sistema más simple; consiste en la utilización

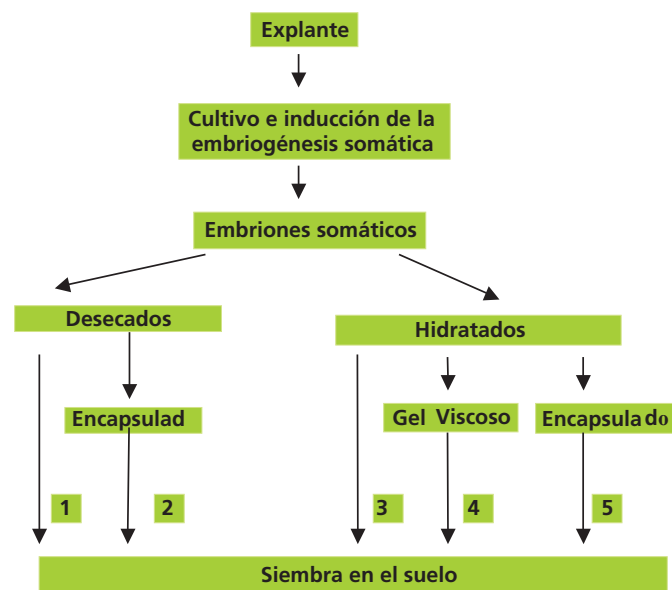


Figura 2: Tipos de semillas sintéticas.

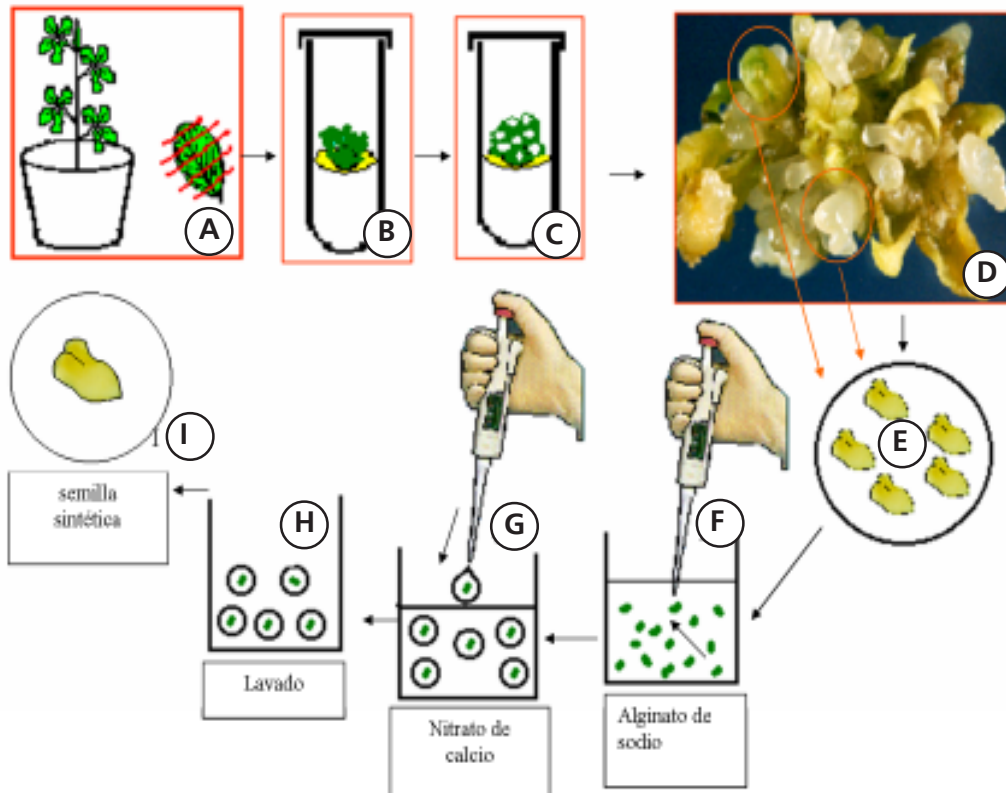


Figura 3: A-D) Inducción de la embriogénesis somática, E) selección de embriones somáticos, F) inmersión de los embriones en alginato de sodio, G) acomplejamiento con nitrato de calcio, H) lavado, I) semilla sintética (i)

tores que regulan la embriogénesis somática. Sin embargo, en muchos casos, la base genética de este fenómeno no está completamente dilucidada. En alfalfa es un carácter heredable, codificado por dos genes dominantes de segregación independiente.

Una vez inducida la embriogénesis somática, el s e g u n d o

menziesii.

3 Producción de semillas sintéticas

En la Fig.4 se esquematizan 6 aspectos que deben tenerse en cuenta para la producción y manipulación de las semillas sintéticas.

En primera instancia es necesario contar con un sistema eficiente de inducción de embriogénesis somática *in vitro*, es decir, la producción de embriones sin la necesidad de la fusión de gametas. Estos embriones deben ser estructuras bipolares perfectas (con un polo que genere el vástago y el otro la raíz) capaces de convertirse («germinar») en plantas enteras (ver II.-2).

Si bien la existencia de embriogénesis somática ha sido informada en centenares de especies de angiospermas y gimnospermas, en muchos casos no es de utilidad para iniciar la producción de semillas sintéticas debido a la baja tasa de producción de embriones aptos para la encapsulación.

En los últimos años se han hecho notables avances en el conocimiento de los fac-

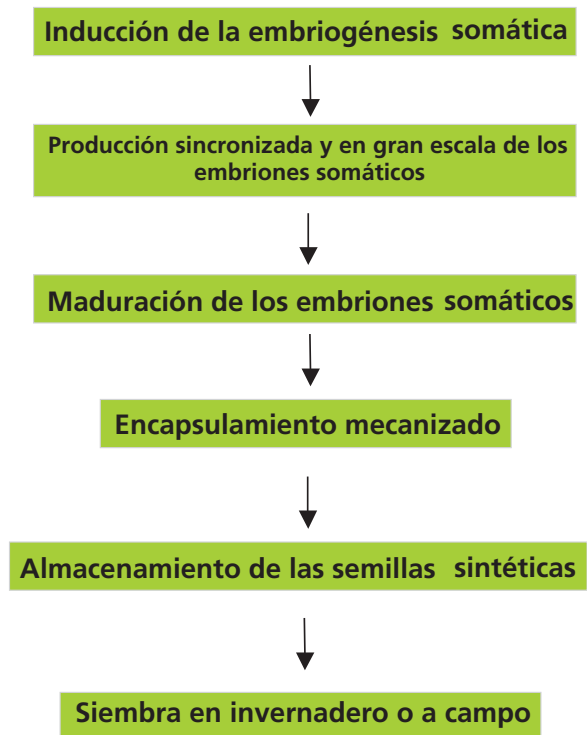


Figura 4: Etapas en la producción de las semillas sintéticas.

paso consiste en lograr una producción sincronizada, a gran escala, de los embriones. Es fundamental contar con embriones simples, en estado cotiledonar, que no se fusionen entre sí y que no generen embriones secundarios. A fin de seccionarlos se han desarrollado diferentes procedimientos basados en filtros y equipos clasificadores automáticos. Para la producción a gran escala se han diseñado biorreactores y sistemas mecanizados de encapsulamiento adaptados a las particularidades de cada especie.

Gran parte de la investigación se halla centrada en lograr una adecuada maduración de los embriones, que es un factor esencial para la obtención de altos valores de conversión en el suelo. En alfalfa se ha demostrado la necesidad del empleo de tratamientos con ácido abscísico, maltosa y de pretratamientos con temperaturas bajas (4°C).

El almacenamiento de las semillas sintéticas es otro aspecto importante a tener en cuenta. Lo ideal sería que las semillas sintéticas tuvieran un comportamiento similar al de la mayoría de las semillas verdaderas y permanecieran viables por mucho tiempo. Los resultados obtenidos con semillas sintéticas de muchas especies muestran que aún hay que trabajar arduamente para que ello ocurra. La criopreservación con nitrógeno líquido (ver V.3) podría resolver este punto.

Por último, si bien muchos factores inciden negativamente para que ello ocurra, lo ideal sería que la semilla sintética fuera sembrada directamente en el suelo, rindiendo elevados porcentajes de conversión en plantas. Actualmente, en la mayoría de los casos, las semillas sintéticas son sembradas primeramente en cámaras climatizadas o en invernaderos para luego ser llevadas al campo.

4 Calidad de la semilla sintética

Otro aspecto de gran importancia tecnológica es el contar con semillas sintéticas que, además de no generar variantes somaclonales, tengan un alto porcentaje de conversión en plantas cuando éstas son sembradas en el suelo. Este aspecto se ve afectado por varios factores, entre los que figuran el tipo de embrión, la calidad del endosperma sintético, la dureza de la cápsula y la protección

contra agentes patógenos.

Generalmente, la carencia de embriones de calidad es el factor limitante para la producción de semillas sintéticas. Los mismos deben poder generarse rápidamente, en grandes cantidades, sin fusionarse entre sí ni formar callos. Deben desarrollarse de manera sincronizada y convertirse rápidamente en plantas. Es además altamente deseable que conserven su viabilidad por largo tiempo en condiciones de laboratorio o preservados en refrigeradores comerciales.

El endosperma sintético tiene que proteger y nutrir al embrión hasta que germine y pueda crecer autotróficamente. En este punto es preciso recordar que si bien los embriones somáticos son muy similares a los embriones cigóticos, carecen de las sustancias de reserva necesarias para su conversión en plántulas. El endosperma sintético generalmente está compuesto de los mismos medios de cultivo que se usan para inducir la germinación *in vitro* de los embriones. Estos medios contienen macro y micronutrientes, vitaminas, sacarosa y sustancias reguladoras de crecimiento. La composición de este endosperma lo hace susceptible al ataque de patógenos, por lo que también se incorporan compuestos de acción fungicida y bactericida. Es común el agregado de 1-5 mg/L de benomyl y de algunos antibióticos como cefotaxina o ampicilina.

La dureza de la cápsula puede afectar, por acción mecánica o por dificultar la respiración, la conversión de los embriones en plantas. En general, la dureza debe ser del orden de 0,2 y 2 Kg/cm² de presión, y puede obtenerse mediante una adecuada manipulación de la concentración de alginato y de los tiempos de la reacción de acomplejamiento.

5 Ventajas del empleo de semillas sintéticas

La mayoría de las plantas de interés económico son propagadas mediante semillas verdaderas. Estas constituyen excelentes propágulos que pueden ser producidos a bajo costo, en forma rápida, y pueden ser sembrados mecánicamente. Además, la mayoría de ellas pueden ser conservadas fácilmente por mucho tiempo. Sin embargo, existen muchas plantas que no se propagan median-

te semillas verdaderas y lo hacen a través de sus partes vegetativas, como es el caso, entre otras, de la caña de azúcar, mandioca, ajo, frutilla, papa, batata, varios árboles y plantas ornamentales. Otras especies tienen semillas de baja calidad (muchas coníferas) o presentan dificultades para la germinación (como, por ejemplo, la yerba mate). En otras un alto grado de heterocigosis hace que las poblaciones derivadas de semillas sean muy heterogéneas (té, yerba mate, paraíso), lo que hace muy recomendable su propagación asexual. También es el caso de muchos híbridos y de plantas que no producen semillas verdaderas o bien el caso de ciertas plantas transgénicas. En todas estas situaciones el uso de semillas sintéticas resultaría ventajoso. Las plantas podrán ser clonadas y sembradas en el campo utilizando sembradoras similares a las que hoy se emplean con las

semillas verdaderas. Adicionalmente las semillas sintéticas podrán actuar como transportadoras de reguladores de crecimiento, microorganismos y pesticidas que se quieran incorporar durante la siembra. De esta manera, los costos de los trasplantes se verán reducidos, las poblaciones serán genéticamente uniformes y podrán ser comercializados ciertos híbridos resultantes de costosas manipulaciones manuales.

En la Tabla 2 se señalan algunas especies para las cuales sería necesario contar con un sistema de semilla sintética.

La falta de una difusión masiva de esta tecnología en la actualidad obedece a razones técnicas, ya que en muchas especies aún no se ha logrado inducir eficientes sistemas que permitan la generación de grandes cantidades de embriones somáticos de calidad, y económicas. Los cálculos realizados en rela-

Tabla 2. Necesidad de contar con semillas sintéticas en algunas plantas leñosas subtropicales de interés para la Argentina y estado actual de su desarrollo.

Especie	Interés en contar con semillas sintéticas	Estado de desarrollo de la inducción de la Embriogénesis Somática	Estado de desarrollo de la producción de la semilla sintética
Aguai (<i>Chrysophyllum gonocarpum</i>)	XXX	X	—
Araucarias (<i>Araucaria spp.</i>)	XXX	XX	—
Algarrobo (<i>Prosopis spp.</i>)	XXX	—	—
Cítricos* (<i>Citrus spp.</i>)	XX	XXX	X
Eucaliptos* (<i>Eucalyptus spp.</i>)	XXX	X	—
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	XX	X	—
Paraíso (<i>Melia azedarach</i>)	XXX	XX	X
Pinos* (<i>Pinus spp.</i>)	XXX	XX	X
Quebracho (<i>Schinopsis balansae</i>)	XX	—	—
Té (<i>Camellia sinensis</i>)	XXX	XXX	—
Toona (<i>Toona ciliata</i>)	XXX	—	—
Yerba mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	XXX	X	—

Ref.:

* depende de la especie — Nulo, X escaso, XX regular, XXX elevado

ción a alfalfa indican que su costo de producción supera en casi cien veces el costo de producción de la semilla verdadera. Sin embargo, este costo es casi similar o incluso inferior al de la producción de semillas verdaderas para algunos híbridos de alcaucil, geranio y gerbera.

6 Conclusiones

Si bien el uso de semilla sintética en la agricultura es aún incipiente y sólo es utilizada en ciertos grupos de árboles forestales, las perspectivas para esta tecnología son altamente promisorias, pudiendo llegar a convertirse, en un futuro cercano, en el principal método de propagación de plantas. Si bien los progresos logrados en los últimos 20 años han sido notables, existe aún la necesidad de realizar estudios básicos sobre embriogénesis somática para luego abordar los aspectos «industriales» de la producción a gran escala de semillas sintéticas, tanto de angiospermas como de gimnospermas. En la Argentina, la mayor demanda proviene del sector de productores de plantas leñosas, donde el desarrollo de esta tecnología es aún incipiente (Tabla 2). Existe, sin embargo, la capacidad técnica y humana para encarar este desafío.

7 Lecturas recomendadas

CANTLIFFE, D. J. 2001. Bioreactor technology in plant cloning, *Proceedings of the Fourth International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding*. Acta Horticulturae. 560: 345-351.

CARLSON, W. C.; HARTLE J. E. 1995. Manufactured seeds of woody plants. In S.M. Jain , P K.Gupta,R.J. Newton (eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants*. London, Kluwer Acad. Press. 1 : 253-263.

GRAY, D. J. P., A. 1991. «Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology.» *Critical Reviews in Plant Sciences* 10: 33-61.

GUERRA, M. P. T., A.C.; TEIXEIRA, J.B. 1999. Embriogénesis somática e sementes sintéticas. In: A.C.Torres, L.S.Caldas, J.A.Busó (eds.) *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. CBAB. Embrapa. Brasília . 2: 533-568.

IBARAKI, Y. K., K. 2001. Automation of somatic embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65: 179-199.

JIMÉNEZ GONZÁLEZ,E.A.; MENDOZA ,E.Q. 1998. In :Pérez Ponce,J.N. (ed.) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biología de Plantas.Santa Clara. Cuba. pp.225-240.

McKERSIE,B.D.; BROWN D.C.W. 1996. Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. *Seed Science Research* 6: 109-126.

MROGINSKI, L. A.; REY, H.; OLMOS, S.; GONZALEZ, V. 1995. Semillas artificiales para la propagación de plantas. *Paradigmas* 1: 5-9.

TIMMIS,R. 1998. Bioprocessing for tree production in the forest industry: Conifer somatic embryogenesis. *Biotechnol. Progress* 14: 156-166.