

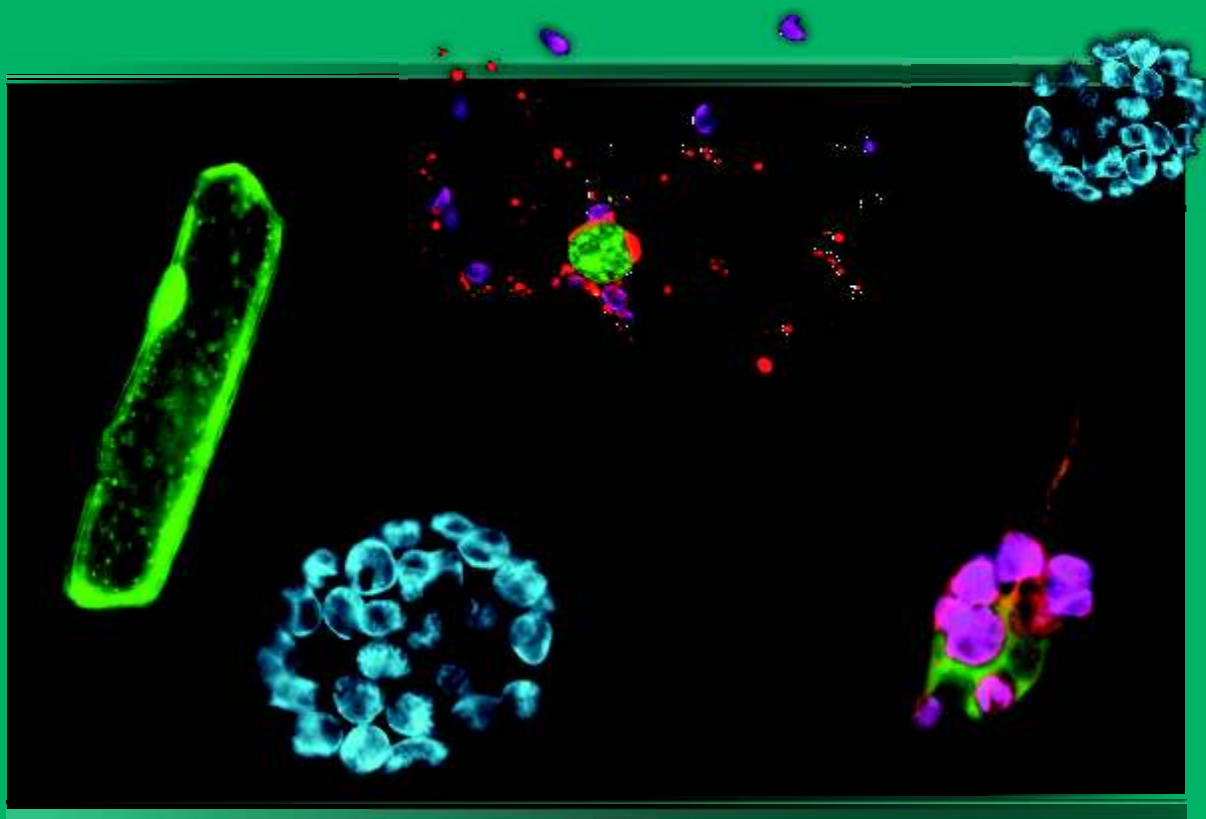
# Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II

Editores:

Gabriela Levitus, Viviana Echenique,  
Clara Rubinstein, Esteban Hopp y Luis Mroginski

ArgenBio 

Consejo Argentino para la Información  
y el Desarrollo de la Biotecnología



## ■ Ediciones

Instituto Nacional de  
Tecnología Agropecuaria





Consejo Argentino para la Información  
y el Desarrollo de la Biotecnología

## ***Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II***

**Editores:**

Dra. Gabriela Levitus,  
Dra. Viviana Echenique,  
Dra. Clara Rubinstein,  
Dr. Esteban Hopp  
Ing. Agr. Luis Mroginski.

## IV. CAPÍTULO 2

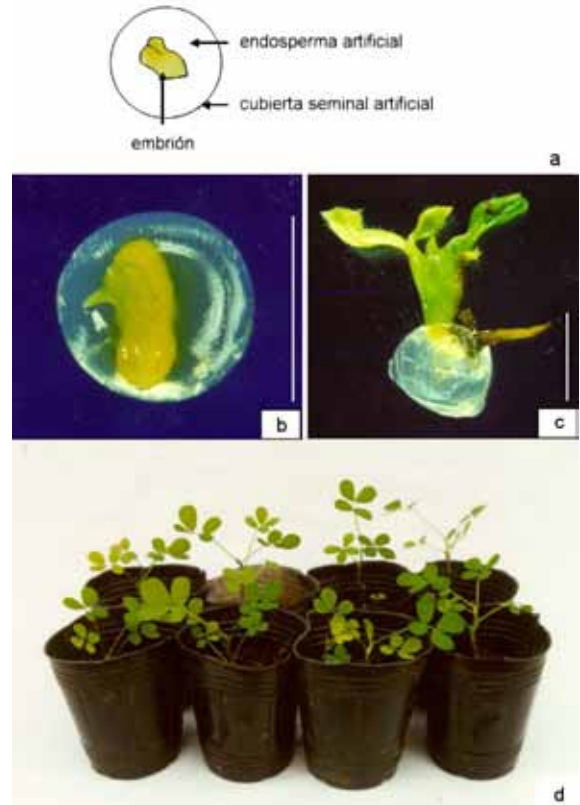
### Semilla Sintética

Hebe Y. Rey y Luis A. Mroginski

#### Concepto:

Resulta difícil tratar de determinar el origen de la idea de la producción de semillas sintéticas o artificiales. Es uno de los resultados de la aplicación en la Agricultura de los embriones somáticos descritos por primera vez en 1958, por Jakob Reinert y por F.C. Steward y colaboradores. Sin embargo, un gran propulsor de su utilización para la propagación en 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. 1a y b). Esta semilla, puesta en condiciones adecuadas, germina (Fig. 1c) y se convierte en una planta (Fig. 1d). Muchos grupos de investigación han contribuido al desarrollo de las semillas sintéticas. Entre ellos se deben destacar el grupo liderado por Keith Walker de la Compañía Monsanto que a partir de mediados de la década del 70 trabajaron 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 ser utilizados para producir semillas artificiales que podían germinar en condiciones de invernadero.

Hay que aclarar que además del concepto de semilla sintética definido más arriba, también es factible que en lugar de encapsular embriones somáticos, se encapsulen yemas. Este



**Fig. 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)

tipo de “semillas sintéticas” - de una utilización muy restringida- no será tratado en este capítulo.

#### Tipos de semillas sintéticas

Las semillas sintéticas pueden fabricarse de diferentes maneras (Fig.2). Básicamente se pueden usar embriones hidratados (tal como resultan de la 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 (Tipo 1 de la Fig. 2) sin cubierta:** Es un sistema muy simple, los embriones son desecados hasta alcanzar porcentajes de humedad de 8- 20%. En este caso los embriones no están provistos de ningún tipo de cubierta protectora. Embriones de alfalfa sometidos al desecamiento mostraron porcentajes de con-

versión en plantas de hasta el 95% (Cuadro 1), además es posible mantenerlos viables por cerca de un año en condiciones de laboratorio.

**Cuadro 1:** Semillas sintéticas de algunas especies 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

**2) Semillas sintéticas con embriones somáticos desecados y provistos de cubierta protectora (Tipo 2 de la Fig. 2).** Los embriones de zanahoria y apio fueron recubiertos con polyoxietileno y luego desecados. Los resultados han mostrado que si bien es factible lograr que los mismos sobrevivan, la conversión en plantas es realmente baja.

**3) Semillas sintéticas con embriones hidratados sin cubierta (Tipo 3 de la Fig. 2).** Es el sistema más simple, consiste en utilizar los embriones somáticos tal como resultan del proceso de la 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 de la Fig. 2).** Inicialmente fue desarrollado en zanahoria y más recientemente con batata.



**Fig.2.-** Tipos de semillas sintéticas

**5) Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados y provistos de una cubierta protectora (Tipo 5 de la Fig. 2).** Es el sistema más usado.

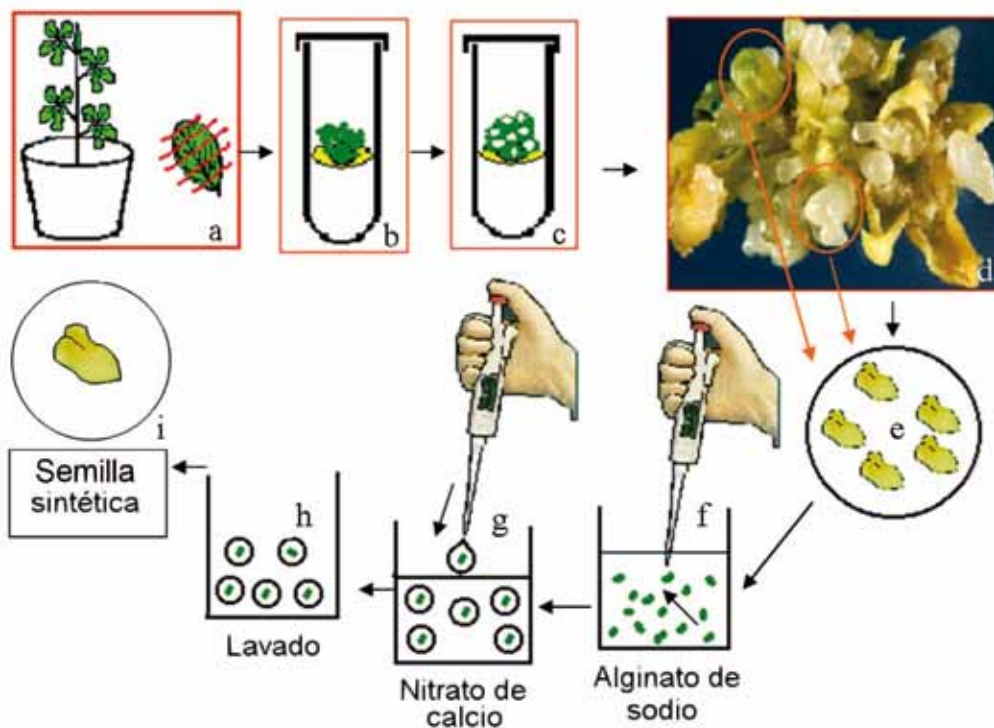
Por esta razón, de aquí en adelante cuando se mencione "semilla sintética" se referirá a este tipo. Tiene la ventaja de que los embriones no están sujetos a la desecación que constituye la princi-

pal 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 usadas consiste en lograr la formación de una cubierta protectora de alginato de calcio que es un compuesto que además de no ser tóxico para el embrión permite una rápida formación de la cubierta. El proceso es muy simple (Fig. 3) y consiste básicamente en sumergir los embriones somáticos en una solución de alginato de sodio (2%) y luego sumergirlo en un agente acomplejante [por ejemplo 100 mM de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ]. Con esta técnica se genera una semilla sintética consistente de un embrión somático con una cubierta seminal y un endosperma artificial (Fig.1a y b). Eventualmente estas cápsulas pueden ser recubiertas por sustancias tales como el polioxietilenglicol que sirven 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 los que se pueden mencionar la alfalfa, la zanahoria, el apio y especies forestales como *Picea abies*, *Pinus radiata*, *Santalum album* y *Pseudotsuga menziesii*.

### Producción de semillas sintéticas

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

En primera instancia es necesario contar con un eficiente sistema que asegure la inducción in vitro de la embriogénesis somática que brin-



**Fig.3.-** Inducción de la embriogénesis somática (a-d); selección de embriones somáticos (e); inmersión de los embriones en alginato de sodio (f); acomplejamiento con nitrato de calcio (g); lavado (h); semilla sintética (i)

de 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. 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 factores que regulan la embriogénesis somática. Sin embargo aún se dista mucho de conocer las bases genéticas de este fenómeno cuya ocurrencia, *in vitro*, si bien ha sido descrita en centenares de especies de Angiospermas y casi otro tanto de Gimnospermas, en muchos casos no es de utilidad para iniciar la producción de las semi-



**Fig. 4.** Etapas en la producción de las semillas sintéticas

llas sintéticas, por su baja tasa de producción de embriones aptos para ser encapsulados.

El segundo paso consiste en lograr una producción sincronizada y en gran escala de los embriones. Es fundamental contar con embriones simples que no se fusionen entre sí y que en un momento determinado se encuentren en estado cotiledonar y que no generen embriones secundarios. Diferentes procedimientos (basados en filtros y equipos clasificadores automáticos) han sido desarrollados para seleccionar estos embriones. Para la producción en gran escala se han desarrollado varios diseños de biorreactores y sistemas mecanizados de encapsulamiento adaptados a las particularidades de cada especie.

Se trabaja mucho para lograr una adecuada maduración de los embriones que es un proceso esencial para la obtención de altos valores de conversión en el suelo. Investigaciones hechas con alfalfa han mostrado la utilidad del empleo de tratamientos con ácido abscísico, maltosa y del pretratamiento 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. Las técnicas de la cryopreservación con nitrógeno líquido podrían resolver este punto.

Por último lo ideal es que la semilla sintética sea sembrada directamente al suelo con un alto porcentaje de conversión en plantas. Muchos factores inciden negativamente para que ello ocurra. Por ahora en la mayoría de los casos, las semillas sintéticas son sembradas primeramente en cámaras climatizadas o en invernaderos para luego ser llevadas al campo.

### **Calidad de la semilla sintética**

Un 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 las mismas son sembradas en

el suelo. Este aspecto está 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.

El tipo de embrión es quizás el factor más importante que influye en la calidad de la semilla sintética. Deben poder generarse rápidamente, en grandes cantidades, no fusionarse entre sí, ni formar callos. Deben desarrollarse de manera sincronizada y convertirse rápidamente en plantas. Es altamente deseable que conserven su viabilidad por largo tiempo en condiciones de laboratorio o mantenidos en refrigeradores comerciales. Generalmente la falta de embriones de calidad es el factor limitante de la producción de semillas sintéticas.

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 ceftoxina o ampicilina.

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

### **Ventajas del empleo de semillas sintéticas**

La mayoría de las plantas de interés económico son propagadas mediante semillas verdaderas. Éstas constituyen excelentes propágu-

los 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 hay muchas plantas que no se propagan mediante las semillas verdaderas y lo hacen a través de partes vegetativas (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 poca calidad (Muchas coníferas). En algunos casos si bien las plantas pueden propagarse por semillas, presentan dificultades para su germinación (por ej. yerba mate) o bien debido al alto grado de heterocigosis las poblaciones derivadas de semillas son muy

heterogéneas (té, yerba mate, paraíso) y es 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 es ventajosa. Las plantas serán clonadas, es decir cada planta derivada de una semilla sintética será una copia fiel de la planta madre, 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, los costos de los trasplantes se verán redu-

**Cuadro 2.** Necesidad de contar con semillas sintéticas en algunas plantas leñosas subtropicales de interés para Argentina y Estado actual de su desarrollo.v

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
<b>Aguái</b> ( <i>Chrysophyllum gonocarpum</i> )	XXX	X	---
<b>Araucarias</b> ( <i>Araucaria spp.</i> )	XXX	XX	---
<b>Algarrobo</b> ( <i>Prosopis spp</i> )	XXX	---	---
<b>Cítricos *</b> ( <i>Citrus spp.</i> )	XX	XXX	X
<b>Eucaliptos*</b> ( <i>Eucalyptus spp.</i> )	XXX	X	---
<b>Mango</b> ( <i>Mangifera indica</i> )	XX	X	---
<b>Paraíso</b> ( <i>Melia azedarach</i> )	XXX	XX	X
<b>Pinos*</b> ( <i>Pinus spp.</i> )	XXX	XX	X
<b>Quebracho</b> ( <i>Schinopsis balansae</i> )	XX	---	---
<b>Té</b> ( <i>Camellia sinensis</i> )	XXX	XXX	---
<b>Toona</b> ( <i>Toona ciliata</i> )	XXX	---	---
<b>Yerba mate</b> ( <i>Ilex paraguariensis</i> )	XXX	X	---

**Ref.:**

- \* depende de la especie
- nulo
- X escaso
- XX regular
- XXX grande

cidos, las poblaciones serán genéticamente uniformes y podrán ser comercializadas ciertos híbridos de plantas resultantes de costosas manipulaciones manuales.

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

La falta de una difusión más masiva de esta tecnología en la actualidad obedece por un lado a razones técnicas (En muchas especies aún no se ha logrado inducir eficientes sistemas que permitan la generación de grandes cantidades de embriones somáticos de calidad) y económicos (Cálculos hechos en 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 de algunos híbridos de alcaucil, geranio y gerbera.

### CONCLUSIONES

Si bien aún el uso de la semilla sintética en la Agricultura es insignificante y sólo es utilizada en cierto grupos de árboles forestales, hay coincidencia en el mundo en que esta tecnología se va a convertir en un futuro cercano en el principal método de propagación de las plantas. Los progresos logrados en los últimos 20 años han sido notables. Sin embargo hay que incrementar las investigaciones básicas sobre embriogénesis somática para luego abordar los aspectos "industriales" de la producción en gran escala de las semillas sintéticas. En la Argentina, si bien esta tecnología podría ser usada teóricamente en todas las Angiospermas y Gimnospermas, en la actualidad la mayor demanda de su utilización proviene de productores de plantas leñosas, con los cuales un rápido diagnóstico de lo que sucede en el área subtropical (Cuadro 2) nos ubica a Argentina en un estado de desarrollo inicial, con capacidad técnica y humana para encarar la producción de las semillas sintéticas.

### 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. J. E. Hartle. (1995). Manufactured seeds of woody plants. In S.M. Jain , P KGupta, R.J. Newton (eds.) Somatic embryogenesis in woody plants. London, Kluwe Acad. Press. 1: 253-263.
- Gray, D. J. (1991). Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. Critical Reviews in Plant Sciences 10: 33-61.
- Guerra, M. P. T., A.C. Teixeira, (1999). Embriogénesis somática e sementes sintéticas. In: A.C.Torres, L.S.Caldas, J.A.Busó (eds.) Cultura de Tecidos e Transformacao Genética de Plantas. CBAB. Embrapa. Brasilia . 2: 533-568.
- Ibaraki, Y. K., (2001). Automation of somatic embryo production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 65: 179-199.
- Jiménez González.A., E.Q. Mendoza (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., D.C.W.Brown (1996) Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. Seed Science Research 6: 109-126.
- Mroginski, L. A. H.Rey ,S. Olmos, V. Gonzalez (1995). Semillas artificiales para la propagacion 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.



## Auspicios

ArgenBio es el Consejo Argentino para la Información y Desarrollo de la Biotecnología. Es una organización sin fines de lucro que tiene como misión divulgar información sobre la biotecnología, contribuyendo a su comprensión a través de la educación y estimulando su desarrollo.

Consideramos prioritario el apoyo a iniciativas relacionadas con la biotecnología y dirigidas a la comunidad educativa de todos los niveles. En este sentido, este libro cubre una necesidad importante ya que aporta información completa y actualizada sobre las tecnologías de laboratorio que se aplican al mejoramiento vegetal, escrita por especialistas y en idioma español.

Confiamos en que tanto estudiantes con profesionales encontrarán en este libro una excelente fuente de información.

Para conocer más sobre ArgenBio, visitar [www.argenbio.org](http://www.argenbio.org)



Ministerio de  
Agricultura, Ganadería y Pesca  
Presidencia de la Nación