

Potenciales Osmóticos y Tuberización *in Vitro* de Secciones de Brotes y Esquejes de Papa¹

L. Martínez*, V.L. de Stecco**, R. Tizio*

ABSTRACT

The work aimed at establishing whether sugars play a role through osmotic effect in the mechanism of potato tuberisation. The action of mannitol and its interaction with sucrose was studied. Decapitated sprout sections of potato (*Solanum tuberosum* L.) were cultured *in vitro* in White-Nitsch-Morel medium supplemented with different levels of sucrose and/or mannitol. The cultures were placed in a dark location at a temperature of 20°C - 22°C until the end of the experiment. Mannitol did not promote tuberisation. Combinations with sucrose having identical osmotic potentials caused delayed tuberisation and abnormal tuber growth. The effects of mannitol were also evident when the explants pretreated during different periods were transferred to media with sucrose. The same was true when the explants were cultured during four days in increasing levels of mannitol and then transferred to media with sugar. Steam cuttings treated with mannitol showed severe water stress followed by death. Cuttings treated with sucrose showed normal growth and tuberisation. Considering that identical osmotic potentials provoked varying delays in tuberisation, it is difficult to ascertain whether sugars act or not through an osmotic effect or whether they are in some way involved in the hormonal mechanism of potato tuberisation.

INTRODUCCION

El manitol ha sido utilizado para estudiar el efecto de los potenciales del agua sobre el crecimiento de tejidos y órganos, y sobre el desarrollo del estrés hídrico en células y tejidos. Ello se ha basado en la presunción de que este compuesto penetra muy len-

COMPENDIO

El objetivo de este trabajo fue determinar si los azúcares desempeñan algún papel, a través de un efecto osmótico, en el mecanismo de tuberización de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Secciones de brotes se cultivaron *in vitro* en el medio de White-Nitsch-Morel, suplementado con diferentes niveles de sacarosa y, además o en su defecto, de manitol. Los cultivos se colocaron en la oscuridad a 20°C - 22°C hasta la finalización de los ensayos. Manitol no promovió tuberización. Diferentes combinaciones con sacarosa de iguales potenciales osmóticos provocaron retardos variables sobre la tuberización y alteraron el crecimiento normal de los tubérculos. Los efectos del manitol también se observaron cuando los explantos, pretratados en diferentes períodos, se repicaron en medios con sacarosa. Igual ocurrió cuando aquéllos fueron cultivados durante cuatro días en concentraciones crecientes de manitol y transferidos, luego, a medios con el azúcar. Esquejes foliosos tratados con manitol manifestaron severo estrés hídrico seguido de muerte. En medios con sacarosa crecieron y tuberizaron normalmente. Teniendo en cuenta que idénticos potenciales osmóticos provocaron retardos diferentes sobre la tuberización, es aún incierto establecer si los azúcares también actúan por efecto osmótico, o si están involucrados en el mecanismo hormonal de tuberización de la papa.

tamente dentro de las células sin interferir en el metabolismo celular (12, 13). Usando manitol, Lo *et al.* (7) estudiaron la posibilidad de que la tuberización de secciones de brotes de papa (*Solanum tuberosum* L.) cultivados *in vitro* podría deberse a bajos potenciales osmóticos (Ψ osm) en medios con altos niveles de sacarosa. Los autores determinaron que el manitol no promovía tuberización, y concluyeron que la sacarosa era efectiva como fuente hidrocarbonada y no a través de sus potenciales osmóticos.

Sin embargo, el manitol no sólo penetra dentro de ciertos tejidos modificando aquel parámetro, sino que también altera el metabolismo de las plantas tratadas (11, 16). En otras palabras, dicho compuesto es transportado desde las raíces hacia los ejes caulinares induciendo necrosis foliar (2, 4).

El objeto de este trabajo fue determinar si ciertos azúcares como la sacarosa pueden desempeñar algún papel, a través de un efecto osmótico, en el mecanismo

1 Recibido para publicación el 2 de noviembre de 1989. Trabajo realizado con subsidios PIDs 3028300 y 390721/85 del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Cuyo. Los autores agradecen a C.B. Passera, por la medición de los potenciales osmóticos de los medios de cultivo, y a L. Martínez, receptora de becas de iniciación y perfeccionamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Arg.

* Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo (UNC), 5505 Chacras de Coria, Mendoza, Arg.

** Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, 5800-Río Cuarto, Córdoba, Arg.

de tuberización de la papa. Con ese fin, se estudió la interacción del manitol con diferentes niveles de sacarosa sobre la tuberización de secciones de brotes de papa cultivadas *in vitro*. También se analizaron los efectos del manitol y la sacarosa usando esquejes foliosos de la misma especie.

MATERIALES Y METODOS

Tubérculos brotados de papa (*S. tuberosum* L.) de los cultivares Spunta y Bintje se colocaron en oscuridad continua a 20°C - 22°C durante 15 días, a fin de estimular el alargamiento de los brotes. A continuación fueron expuestos a luz natural difusa y a temperatura de laboratorio para estimular la diferenciación de los tejidos. Luego de la extracción de los brotes de primera brotación, los restantes fueron eliminados a fin de obtener secciones de segunda y aun de una tercera brotación en las condiciones descritas precedentemente.

Secciones de brotes de primera, segunda y tercera brotación, de 3 cm a 4 cm de longitud, con dos o tres yemas axilares, se esterilizaron con 75% de etanol durante 3 min y, luego, con una solución al 12% de hipoclorito de sodio comercial (80 g de cloro activo por decímetro cúbico) adicionada con 0.04% de Tween 20, durante 20 minutos.

Luego de tres enjuagues con agua bidestilada estéril, los explantos se cultivaron en tubos de ensayo con 25 ml de una mezcla de macronutrientes de White (17) y micronutrientes según Nitsch (9), adicionada con 0.75% de agar bacteriológico Difco, 10 mg/l de EDTA de Fe y diferentes concentraciones de sacarosa (0.25, 0.33, 0.42 y 0.5 M), acompañadas o no con manitol (0.08, 0.17 y 0.25 M). Luego del cultivo todos los tratamientos se expusieron a oscuridad continua a 20°C - 22°C hasta el final de los experimentos.

Los potenciales osmóticos de los testigos (sin sacarosa o manitol) se midieron con un conductímetro Aradel Mod 3 P en 36 tubos con el medio nutriente de White-Nitsch adicionado con 0.75% del agar y 10 ml/l de EDTA de hierro. Se midió un valor promedio de 1068.5 μ mhs a 2 cm de profundidad, que correspondió a un potencial osmótico de -0.38 atmósferas normales. Este valor (-0.4 atm) se adicionó a los potenciales osmóticos, calculados para las diferentes molaridades de sacarosa acompañada o no con manitol.

En el análisis estadístico se utilizó el test Tuckey de comparación múltiple. Los primeros dos ensayos (Cuadros 1 y 2) se llevaron a cabo usando un diseño completamente aleatorizado con diez repeticiones. Los restantes se realizaron en la misma forma, con siete repeticiones. Cada repetición consistió en seis tubos de cultivo que no presentaron signos de infección.

Cuadro 1. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa, manitol y combinaciones de ambos compuestos sobre la tuberización de secciones de brotes de papa del cv. Bintje, cultivadas *in vitro* (brotes de tubérculos de primera brotación).

Sacarosa (M)	Manitol (M) X	ψ osm (-atm)	Días para alcanzar 50% de explantos tuberizados	Tuberización luego de 76 días de cultivo (%)
0	0	0.4	>76	0
0.25	0	6.0	50bc	87
0.33	0	7.8	41ab	81
0.42	0	9.8	38a	89
0.50	0	11.6	39a	55
0.25	0.25	11.6	61	50
0.33	0.17	11.6	51c	67
0.42	0.08	11.6	41ab	70

HSD = α 0.05 = 9.17

CV = 17.81%

En el Cuadro 1 y en los siguientes, los valores medios acompañados por la misma letra no muestran diferencias significativas a nivel de Ψ 0.05 (Test Tuckey).

x = En todas las concentraciones utilizadas, el manitol solo no promueve tuberización.

Cuadro 2. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa, manitol y combinaciones de ambos compuestos sobre la tuberización de secciones de brotes de papa del cv. Spunta, cultivadas *in vitro* (brotes de tubérculos de segunda brotación).

Sacarosa (M)	Manitol (M) X	ψ osm (-atm)	Días para alcanzar 50% de explantos tuberizados	Tuberización luego de 65 días de cultivo (%)
0	0	0.4	>60b	0
0.25	0	6.0	30ac	100
0.33	0	7.8	27a	85
0.42	0	9.8	28a	83
0.50	0	11.6	44d	80
0.25	0.25	11.6	>60b	35
0.33	0.17	11.6	54	57
0.42	0.08	11.6	38cd	67

HSD = α 0.05 = 8.96

CV = 14.48%

x = En todas las concentraciones usadas, el manitol solo no promueve tuberización.

Esquejes foliosos de 13 cm a 15 cm de longitud se extrajeron de plantas jóvenes, no tuberizadas, colocadas desde la brotación bajo luz continua. Quince esquejes con 2 ó 3 hojas apicales se sumergieron por sus bases, cortadas a bisel, dentro de diferentes concentraciones de manitol o sacarosa (0.17; 0.25; 0.33; 0.42 y 0.5 M) durante 16 horas. Luego de los tratamientos, se plantaron en macetas con vermiculita húmeda, periódicamente regada con solución de Knop diluida a la mitad. Aquellas se colocaron en un invernáculo, a 22°C - 44°C con un fotoperíodo de 14 horas.

RESULTADOS

Ensayos preliminares mostraron que el manitol, en cualquiera de las concentraciones utilizadas, fue completamente inefectivo en promover tuberización, como fuera anteriormente demostrado por Lo *et al.* (7). Asimismo, y en ausencia de sacarosa, la tuberización no tuvo lugar (Cuadros 1 al 6). Sin embargo, en ambos casos, se observó un moderado crecimiento de los tallitos estoloníferos formados a partir de las yemas de los explantos, que siempre terminaron por envejecer y secarse.

Cuadro 3. Efecto de períodos crecientes de cultivo en 0.25 M de manitol sobre la tuberización de secciones de brotes del cv. Bintje, cultivadas *in vitro*, luego de la transferencia a medios con 0.25 M de sacarosa (secciones de brotes de tubérculos de segunda brotación).

Días en 0.25 M de manitol	Número de días para alcanzar 50% de explantos tuberizados	Tuberización luego de 60 días de cultivo (%)
0	30	100
4	38a	71
8	40a	77
16	54	62
24	> 60	0

HSD = α 0.05

CV = 5.92%

En secciones del cv. Bintje se observó una correlación directa entre la concentración de sacarosa en el medio del cultivo y tuberización precoz (Cuadro 1). En el cv. Spunta tal correlación no se observó, ya que altos niveles de sacarosa (0.5 M) retardaron considerablemente la formación de tubérculos (Cuadro 2).

En ambos cultivares, las combinaciones de sacarosa y manitol con idénticos potenciales osmóticos (-11.6

Cuadro 4. Efecto de períodos crecientes de cultivo en 0.25 M de manitol sobre la tuberización de secciones de brotes del cv. Bintje, cultivadas *in vitro*, luego de la transferencia a medios con 0.25 M de sacarosa (secciones de brotes de tercera brotación).

Días en 0.25 M de manitol	Número de días para alcanzar 50% de explantos tuberizados	Tuberización luego de 56 días de cultivo (%)
0	12	100
4	22	100
8	35	100
16	46	52
24	> 56	0

HSD = α 0.05 = 9.70

CV = 16.02%

Cuadro 5. Efecto del cultivo, durante cuatro días, en diferentes molaridades de manitol, sobre la tuberización de secciones de brotes, cultivadas *in vitro*, del cv. Bintje, luego de la transferencia a medios con 0.25 M de sacarosa (brotes de tubérculos de segunda brotación).

Manitol (M)	Número de días para alcanzar 50% de explantos tuberizados	Tuberización luego de 65 días de cultivo (%)
0	29	95
0.25	39a	85
0.33	45a	82
0.42	> 65b	31
0.50	> 65b	10

HSD = α 0.05 = 9.17

CV = 11.61%

atm) (Cuadros 1 y 2) retrasaron considerablemente la tuberización y alteraron el crecimiento normal de los tubérculos que resultaron muy pequeños y deformados.

En otros ensayos (Cuadros 3 y 4) se observó una correlación directa entre el lapso, durante el cual los explantos permanecieron en 0.25 M de manitol, y los retardos observados en la tuberización, luego del repique de los mismos a medios que contenían 0.25 M de sacarosa. En estos casos se reiteró el efecto detrimental del manitol sobre el crecimiento de los tubérculos.

Cuando las secciones se cultivaron en concentraciones crecientes de manitol durante un mismo

Cuadro 6. Efecto del cultivo, durante cuatro días, en diferentes concentraciones de manitol sobre la tuberización de secciones, cultivadas *in vitro*, del cv. Bintje, luego de la transferencia a medios con 0.25 M de sacarosa (secciones de brotes de tubérculos de tercera brotación).

Manitol (M)	Número de días para alcanzar 50% de explantos tuberizados	Tuberización luego de 40 días de cultivo (%)
0	10	100
0.25	19a	100
0.33	18a	100
0.42	22a	100
0.50	33	57

HSD = α 0.05 = 7.69

CV = 9.93%

lapso (4 d), y luego fueron transferidas a medios con 0.25 M de sacarosa, la tuberización fue progresivamente retardada y aun completamente inhibida (Cuadros 5 y 6).

En los esquejes foliosos, previamente tratados con diferentes concentraciones de manitol, se manifestó una rápida y severa marchitez seguida de muerte del material. Esquejes tratados con iguales concentraciones de sacarosa, enraizaron, crecieron y tuberizaron normalmente, luego de 20 d a 25 d desde la plantación.

DISCUSION

De los resultados expuestos en los Cuadros 1 y 2, claramente, se demuestra que el manitol, en combinaciones con sacarosa de iguales valores de potenciales osmóticos (-11.6 atm), no sólo es el causante de los retardos observados en la tuberización sino también del crecimiento anormal de los tubérculos. Esto implica que dicho compuesto penetró dentro de las secciones, e incluso probablemente modificó los potenciales osmóticos de sus tejidos. También es evidente que, en ambos cultivares, el efecto retardador que puede atribuírsele al manitol aparece como una función de su molaridad. Ello significaría que en todas las experiencias realizadas, el potencial osmótico de los medios de cultivo, igual que para todas las combinaciones de manitol con sacarosa, no ha sido el factor que controló la formación de los tubérculos.

Teóricamente, se cree que si el manitol hubiera actuado sólo como agente osmótico, sería correcto

deducir que en todos los casos la tuberización hubiera tenido lugar aproximadamente al mismo tiempo, sin presentar diferencias significativas entre las diferentes variables. Ello teniendo también en cuenta que la menor concentración utilizada de sacarosa (0.25 M) corresponde a un 8.56% en el medio de cultivo, que resulta más que suficiente para provocar la formación de tubérculos *in vitro* (15).

Sin embargo, podría argüirse que el efecto retardante del manitol se relacionaría con la conversión de sacarosa a almidón. En ese sentido, Oparka y Wright (10) demostraron que la conversión, en discos de tubérculos de papa, incubados en un determinado rango de manitol, fue óptima a 300 mM, pero declinaba considerablemente por encima o por debajo de esa concentración.

En opinión de los autores de este artículo, el fenómeno descrito no puede asimilarse a lo ocurrido en este caso, ya que el manitol, asociado con sacarosa, ejerce su acción retardante sobre la tuberización antes de que ésta tenga lugar, es decir, antes de que comience a sintetizarse el almidón en los meristemas subapicales o yemas axilares de los tallos estoloníferos.

Los resultados confirman que el manitol no actúa como fuente hidrocarbonada para la expresión de la tuberización (7). Sin embargo, y teniendo en cuenta los resultados expuestos, no resulta correcto concluir que, por la ausencia de tuberización en medios con manitol, los azúcares como la sacarosa no actúen sobre el fenómeno por acción de sus potenciales osmóticos tal como lo afirman Lo *et al.* (7).

Los resultados del presente trabajo también ponen de manifiesto un hecho que invalida, en nuestra opinión, las conclusiones de Lo *et al.* (7): no tuvieron en cuenta que el manitol podría haber penetrado dentro de los explantos de papa, alterando a su vez sus potenciales osmóticos iniciales. Los resultados de los Cuadros 3 y 4 demuestran que efectivamente es así, no sólo retardando la tuberización provocada por la disponibilidad de sacarosa, sino también alterando el normal crecimiento de los tubérculos.

Los resultados de los Cuadros 5 y 6 demuestran que el efecto retardante del manitol sobre la tuberización constituye una función de su concentración en presencia de niveles suficientes del azúcar como para desencadenarla.

La acción anormal del manitol sobre el crecimiento de los tubérculos es también ejercida en tejidos y órganos de otras especies (6, 8, 11). En papa, dicha acción se ha corroborado al utilizarse estacas foliasas tratadas con aquel compuesto. Ese comportamiento

fue similar al observado en otras especies como centeno, girasol, maíz y haba, las que muestran un rápido y severo estrés hídrico seguido de muerte cuando son regadas con soluciones de manitol (4).

La falta de una estrecha correlación entre niveles crecientes de sacarosa y precocidad de tuberización en el cv. Spunta (Cuadro 2), plantea también dudas acerca de la acción de los azúcares a través del desarrollo de sus potenciales osmóticos.

Por último, la precoz tuberización manifestada por las secciones de brotes de tercera brotación (Cuadros 4, 5 y 6) podría atribuirse al grado de incubación, o edad fisiológica mayor, alcanzado por los tubérculos de los que los explantos fueron extraídos (14). Algunos autores postulan, sin aportar pruebas concluyentes, que los azúcares no participan en el mecanismo de tuberización de la papa, aunque consideran que son esenciales para la síntesis de almidón, ligada al crecimiento de los tubérculos (1, 5).

Los resultados expuestos por este trabajo demuestran que aún es incierto establecer si los azúcares también actúan por efecto osmótico, o si están involucrados, juntamente con otros reguladores endógenos del crecimiento (3, 15), en el mecanismo de tuberización de la papa.

LITERATURA CITADA

- GREGORY, L.E. 1956. Some factors for tuberization in the potato plant. *American Journal of Botany* 43:281-288
- GROENEWEGEN, H.; MILLS, J.A. 1960. Uptake of manitol into the shoot of intact barley plants. *Australian Journal of Biological Sciences* 31:1-4.
- GUIÑAZU, M.; ABDALA, G.; TIZIO, R. 1988. Effect of free and conjugated gibberellins on roots of potato cuttings treated with CCC (2-chloroethyl trimethylammonium chloride) in relation to tuber formation. *Journal of Plant Physiology* 132:725-730.
- KOZINKA, V.; KLENOWSKA, S. 1965. The uptake of mannitol by higher plants. *Biologia Plantarum* 7:285-292.
- LAWRENCE, C.H.; BARKER, W.G. 1963. A study of tuberization in the potato *Solanum tuberosum*. *American Potato Journal* 40:349-356.
- LEWIS, D.H.; SMITH, D.C. 1967. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants. I. Distribution, physiology and metabolism. *New Phytologist* 66:143-184.
- LO, F.M.; IRVINE, B.R.; BARKER, W.G. 1972. *In vitro* tuberization of the common potato (*Solanum tuberosum*) is not a response to the osmotic concentration of the medium. *Canadian Journal of Botany* 50:603-605.
- MICHEL, B.E. 1970. Carbowax 6000 compared with mannitol as a suppressant of cucumber hypocotyl elongation. *Plant Physiology* 507-509.
- NITSCH, J.P. 1951. Growth and development *in vitro* of excised ovaries. *American Journal of Botany* 38:566-578.
- OPARKA, K.J.; WRIGHT, K.M. 1988. Osmotic regulation of starch synthesis in potato tubers? *Planta* 174:123-126.
- RIOV, J.; YANG, S.H. F. 1982. Stimulation of ethylene production in citrus leaf discs by mannitol. *Plant Physiology* 70:142-146.
- THIMANN, K.V. 1954. The physiology of growth in plant tissues. *American Scientist* 13:586-606.
- THIMANN, K.V.; LOSS, G.M.; SAMUEL, E.W. 1960. Penetration of mannitol into potato discs. *Plant Physiology* 35:848-853.
- TIZIO, R. 1979a. Effect de la lumière sur la tubérisation *in vitro* de germes de tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) d'âges physiologiques différents. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Série D: Sciences Naturelles* 289:275-277.
- TIZIO, R. 1979b. Contribution à l'étude du mécanisme hormonal de tubérisation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). Thèse Dr. d'État. Paris 6, Université Pierre et Marie Curie.
- TRIP, P.; KROTKOV, G.; NELSON, O.D. 1964. Metabolism of mannitol in higher plants. *American Journal of Botany* 51:828-835.
- WHITE, P.R. 1943. *A handbook of plant tissue cultures*. Lancaster, Pa., The Jacques Cattell Press.