

## POTENCIAL OSMÓTICO DEL MEDIO DE CULTIVO CON DIFERENTES COMPONENTES PARA LA PROPAGACIÓN *in vitro*

### OSMOTIC POTENTIAL OF CULTURE MEDIUM WITH DIFFERENT COMPOUNDS FOR THE *in vitro* PROPAGATION

Ma. Alicia Cárdenas Lara<sup>1\*</sup> y  
Ángel Villegas Monter<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Agronomía y Ciencias. Apdo. Postal 337. Cd. Victoria, Tamaulipas, México.<sup>2</sup> Colegio de Postgraduados, Especialidad de Fruticultura, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. C.P. 56230 Montecillo, Estado de México. Correo electrónico: avillega@colpos.mx

\* Autor responsable

#### RESUMEN

Algunas especies propagadas *in vitro* presentan diversos desórdenes fisiológicos, como la hiperhidratación, debido entre otros factores a la alta humedad relativa en los recipientes. Por ello es importante conocer el potencial osmótico del medio de cultivo en función de la concentración de solutos. En este trabajo se evaluaron *in vitro* varias fuentes de carbono: sacarosa, glucosa, manitol, sorbitol y mioinositol, así como los compuestos minerales:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en tres diferentes concentraciones cada uno. El potencial osmótico de los tratamientos se midió en un osmómetro de Presión de vapor Wescor 5100C. El potencial osmótico del medio con 90 mM de sacarosa fue -0.39 MPa. En general, en las fuentes y niveles de carbono evaluados, al aumentar la concentración el potencial osmótico fue más negativo. Para el caso de los macronutrientes la tendencia fue similar para  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$ , pero en el resto de ellos no hubo diferencias significativas. Los resultados obtenidos muestran la importancia de conocer el efecto de los solutos en el medio de cultivo, sobre los posibles desórdenes fisiológicos de los explantes creciendo *in vitro*.

**Palabras clave:** Potencial osmótico, carbohidratos, macronutrientes, cultivo de tejidos, agar.

#### SUMMARY

Some species propagated *in vitro* show several physiological disorders, such as hyperhidricity caused among other factors by a high relative humidity in the vessels. Therefore, it is important to know the osmotic potential of the culture medium as affected by its solute concentration. Different sources of carbon (sucrose, glucose, mannitol, sorbitol, myoinositol) and three different concentrations of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  were evaluated *in vitro*. Treatments osmotic potential was measured in a vapor pressure osmometer Wescor 5100C. The osmotic potential of the 90 mM sucrose medium was -0.39 MPa. When the sources and levels of carbon were increased, the osmotic potential became more negative. The osmotic potential was also more negative when the con-

centrations of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and  $\text{KNO}_3$  were increased, while the other mineral compounds studied did not show significant differences. These results show the importance of studying the effect of solutes in the culture medium because of the possible physiological disorders which may affect plants growth *in vitro*

**Index words:** Osmotic potential, carbohydrates, macronutrients, tissue culture, agar.

#### INTRODUCCIÓN

Cada vez son más los estudios sobre la fisiología de las plantas *in vitro* para lograr mejor respuesta en el desarrollo de éstas. Al crecer dentro de un ambiente pequeño y controlado, se presentan problemas diferentes a los que ocurren cuando una planta se desarrolla en un ambiente natural. Un aspecto que es necesario estudiar, es la apariencia morfológica anormal en tejidos y órganos cultivados *in vitro*, especialmente en hojas que presentan una apariencia translúcida, húmeda y vidriosa (Debergh *et al.*, 1992), conocida como hiperhidratación. En este sentido, es conveniente conocer el efecto que los solutos del medio de cultivo tienen en el potencial osmótico, debido a que pueden ocasionar que los explantes *in vitro* absorban mayor cantidad de agua y ocurra hiperhidratación de tejidos.

Entre las principales causas de la hiperhidratación están el potencial osmótico y la concentración de agar en el medio de cultivo. Así, conforme el potencial osmótico es más negativo y se cambia el potencial matricial del medio, la hiperhidratación disminuye como consecuencia de una menor absorción de agua que se dificulta la multiplicación de vástagos axilares; además, el explante tiene un contacto menos eficiente con el medio, lo que dificulta la disponibilidad de los macro y micronutrientes del medio, dependiendo de la concentración del agar (George, 1993).

Reyes (1992) encontró que la mejor fuente de amonio para la multiplicación de brotes de *Malus robusta* fue  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , en comparación con  $\text{NH}_4\text{NCL}$  y  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , que tuvieron efectos secundarios; también observó que al incrementar la concentración de amonio en el medio se aumentó el contenido de agua en los tejidos, lo que ocasionó daño a los brotes. Al utilizar dosis superiores a 12 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , se redujo el número y calidad de los brotes.

Brand (1993) cultivó ápices de brotes de *Amelanchier arborea* en los medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) y medio para plantas leñosas (WPM) con 4.4  $\mu\text{M}$  de BA y varias concentraciones de agar (0.4, 0.6 ó 0.8 %) con 3 % de sacarosa. En el medio MS la materia fresca, materia seca y contenido de nitrato fueron mayores que en el medio WPM; el número de brotes y el porcentaje de hiperhidratación también fue más alto en el medio MS. El porcentaje de materia seca fue la única variable más alta en

WPM que en MS. El contenido de nitrato en el tejido se incrementó significativamente al aumentar la concentración de agar, a una tasa más rápida en el medio MS que en el WPM, pero la hiperhidratación disminuyó significativamente en el medio WPM, ya que de 35.1 disminuyó hasta 2.1 % con 0.8 % de agar.

El potencial osmótico es uno de los componentes del potencial de agua y su determinación se basa principalmente en el cambio de las propiedades físicas y químicas de ésta, debido a la presencia de solutos (propiedades coligativas de las soluciones). Al aumentar la concentración de la solución, la presión osmótica también aumenta, el punto de congelación desciende, la presión de vapor disminuye y el punto de ebullición aumenta (Larqué-Saavedra y Trejo, 1990).

Pierik (1990) señala que la concentración total de las sales de un medio de cultivo determina el potencial osmótico del medio. Éste se obtiene de la suma de los potenciales osmóticos de sus componentes, donde influyen no sólo los pesos sino también el grado de disociación de las sales que lo constituyen; en la práctica el potencial osmótico se determina en forma directa en el medio de cultivo.

Con respecto a los azúcares, es preciso tener en cuenta que un disacárido como la sacarosa se convierte (por hidrólisis) durante la esterilización, en dos monosacáridos (glucosa y fructuosa), lo que provoca un cambio en su potencial osmótico. El efecto que tienen los azúcares y macronutrientes en el potencial osmótico, es diferente en los distintos medios de cultivo, como puede observarse en el Cuadro 1 (Yoshida *et al.*, 1973).

Cuadro 1. Valores de potencial osmótico en bares (1 bar = 10<sup>5</sup> Pa) de algunos medios de cultivo (Fuente: Yoshida *et al.*, 1973).

Medio de cultivo	Macronutrientes	Azúcares
White	- 0.43	-1.46
Hildebrandt	- 0.67	-1.46
Heller	- 0.96	-4.05
Murashige y Skoog	- 2.27	-2.20

Según Pierik y Steegmans (1975), el crecimiento y organogénesis del cultivo *in vitro* se detienen si el potencial osmótico es más negativo que aproximadamente -3 x 10<sup>5</sup> Pa = -3 bar (= -0.3 MPa), porque se impide la absorción de agua.

Al estudiar el efecto del potencial osmótico en el cultivo *in vitro* de brotes de manzano (*Malus pumila*), modificándolo con la adición de manitol, Lankes y Zimmerman (1990) encontraron que el genotipo fue el factor más importante para enraizamiento, así como el medio básico con la osmolaridad más alta por la adición de nutrientes y

fuelle de energía; en cambio, para la formación de brotes, el resultado fue mejor con la reducción de cualquiera de esos factores. Lipavska y Vreugdenhil (1996) encontraron que cuando se utiliza una concentración alta de sacarosa aumenta la acumulación de materia seca, lo cual atribuyen al menor potencial osmótico del medio de cultivo. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue conocer el potencial osmótico del medio de cultivo cuando se utilizan diferentes fuentes y concentraciones de carbono y macronutrientes en un medio de cultivo *in vitro*, bajo la hipótesis de que una concentración alta de estos compuestos hace el potencial osmótico más negativo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el medio de cultivo empleado por Aguilar y Villegas (1993) en portainjertos de cítricos, a excepción de las sales de nitrato de amonio que se redujeron a 50 % (Cuadro 2). Las mediciones de potencial osmótico se hicieron en un osmómetro de presión de vapor Wescor modelo 5100C, de acuerdo con el Manual M2010 (Wescor, Inc, 1984).

Cuadro 2. Medio de cultivo utilizado para la medición del potencial osmótico.

Compuesto	Concentración
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	10.3 mM
KNO <sub>3</sub>	18.8 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.5 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	0.2 mM
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 mM
<b>Micronutrientes</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100.0 µM
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	100.0 µM
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	30.0 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.0 µM
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.1 µM
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.1 µM
<b>Compuestos Orgánicos</b>	
Glicina	13.32 µM
Tiamina -HCl	2.96 µM
Piridoxina -HCl	4.86 µM
Bencilaminopurina	2.66 µM
Ácido Indolbutírico	0.49 µM
Agar	6.0 g L <sup>-1</sup>

Los 30 tratamientos utilizados, consistieron de cinco fuentes de carbono y cinco macronutrientes en tres diferentes concentraciones de cada compuesto (Cuadro 3). Para cada tratamiento, se utilizaron dos tubos de ensaye y en cada uno se tomaron tres lecturas de potencial osmótico.

Es diseño experimental empleado fue completamente al azar, y el análisis estadístico se realizó con los datos obtenidos en mmol/kg y después se convirtieron a MPa mediante la fórmula propuesta por George (1993).

Cuadro 3. Tratamientos utilizados para la medición del potencial osmótico en medio de cultivo sin material vegetal y con agar como soporte.

Tratamiento	mM	Tratamiento	mM
1 Sacarosa	60	16 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	10
2 Sacarosa	90	17 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	15
3 Sacarosa	120	18 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	20
4 Glucosa	50	19 $\text{KNO}_3$	10
5 Glucosa	80	20 $\text{KNO}_3$	15
6 Glucosa	110	21 $\text{KNO}_3$	20
7 Manitol	40	22 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1
8 Manitol	60	23 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2
9 Manitol	80	24 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4
10 Sorbitol	40	25 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1
11 Sorbitol	60	26 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5
12 Sorbitol	80	27 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
13 Mioinositol	50	28 $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1
14 Mioinositol	80	29 $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.5
15 Mioinositol	110	30 $\text{KH}_2\text{PO}_4$	2

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En medio de cultivo el agar actúa reteniendo agua y afecta el potencial matricial, pero no tiene efecto como osmorregulador a las concentraciones regularmente empleadas (Cárdenas, 1999). De igual manera, al probar varias concentraciones de agar, Brand (1993) encontró que éste actúa reteniendo agua, por lo que la hiperhidratación en tejidos se reducía en concentraciones altas de agar. En cambio, los azúcares y macronutrientes sí afectan el potencial osmótico del medio de cultivo (George, 1993; Yas-hida *et al.*, 1973).

En este trabajo se encontró que en todos los tratamientos que contenían carbohidratos, el potencial osmótico fue más negativo al aumentar su concentración. Los valores obtenidos con sacarosa fueron los más negativos y los menos negativos con sorbitol (Figura 1); esto se atribuye a que los tratamientos con sacarosa fueron los de concentración más alta, además de que durante la esterilización la sacarosa es hidrolizada y el potencial osmótico se hace más negativo (Lazzeri *et al.*, 1988). Los tratamientos con sorbitol y manitol tuvieron concentraciones iguales (40, 60 y 80 mM), pero los potenciales osmóticos obtenidos con manitol fueron más negativos que los de sorbitol (Figura 1). Los tratamientos de glucosa y mioinositol también eran iguales en concentración, pero el potencial osmótico mostró diferencia estadística entre ellos (Cuadro 4), con valores más negativos con la solución de glucosa, probablemente porque ésta es un azúcar y el mioinositol es un azúcar alcohol. Entre manitol y mioinositol, no hubo diferencias estadísticas (Cuadro 4), aún cuando los tratamientos

eran diferentes, debido posiblemente a que los dos son azúcares alcoholes (Figura 1).

Cuadro 4. Potencial osmótico promedio de las tres concentraciones en cada uno de los componentes del medio de cultivo para propagación *in vitro* ( $n=9$ ).

Fuente de carbono	Potencial osmótico (MPa)	Macronutriente	Potencial osmótico (MPa)
Sacarosa	- 0.40 a*	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	- 0.42 a*
Glucosa	- 0.31 b	$\text{KNO}_3$	- 0.41 ab
Mioinositol	- 0.26 c	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	- 0.40 bc
Manitol	- 0.26 c	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	- 0.39 bc
Sorbitol	- 0.23 d	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	- 0.39 bc
DMSH	0.0106	DMSH	0.101

\* Medias con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente (Tukey, 0.05).

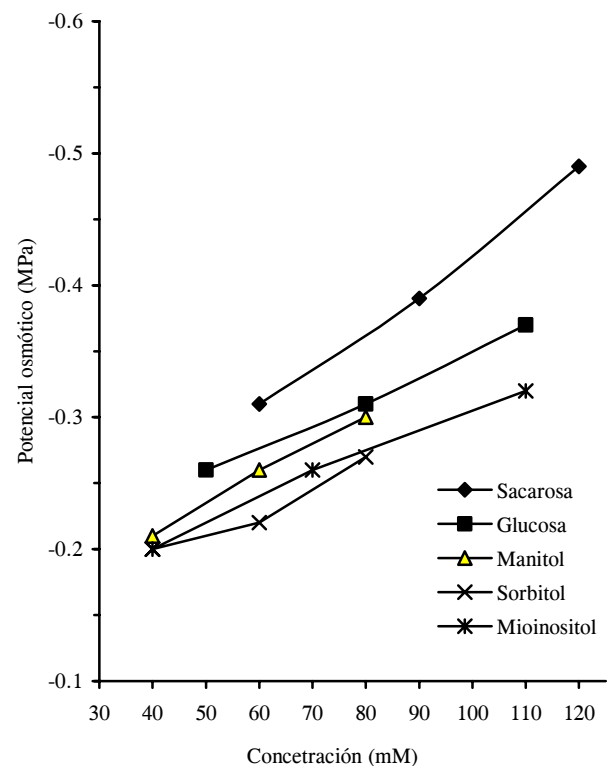


Figura 1. Potencial osmótico del medio de cultivo con agar 0.6 % en diferentes concentraciones de carbohidratos.

De acuerdo con Lankes y Zimmerman (1990), el enraizamiento *in vitro* se incrementa al aumentar la concentración de sacarosa, mientras que la obtención de brotes es mayor al reducir los macronutrientes y los carbohidratos. En la mayoría de los trabajos de enraizamiento se sugiere reducir la concentración de sacarosa, contrario a lo indicado por estos autores.

Los datos de potencial osmótico en función de los macronutrientes se muestran en la Figura 2. En los tratamientos con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$ , se observó que a medida que se aumentó la concentración del compuesto de 10 a 20

mM, el potencial osmótico se hizo más negativo, demostrando así el impacto de estos macronutrientes sobre este factor en el medio y con ello su posible influencia en la hiperhidratación. Entre las sales minerales (Cuadro 4) hubo diferencias significativas, donde los valores más negativos ocurrieron con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$  en 20 mM, con -0.44 y -0.43 MPa, respectivamente (Figura 2). En el caso del  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , las tres concentraciones utilizadas (1, 2 y 4 mM) no ocasionaron efecto en el potencial osmótico, que en todos los casos fue -0.40 MPa. En los tratamientos con  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  no se observó una tendencia definida en los resultados obtenidos, cuyos valores fueron de -0.38, -0.39, -0.38 y -0.41, -0.37 y -0.40 MPa en las tres concentraciones utilizadas (1, 1.5 y 2 mM) de ambos compuestos; cabe indicar que tampoco hubo diferencias significativas entre ellos, debido posiblemente a las bajas concentraciones utilizadas (Cuadro 4). Esto demuestra el reducido efecto en el potencial osmótico que tienen las sales minerales que se incorporan al medio de cultivo en concentraciones inferiores a 4 mM.

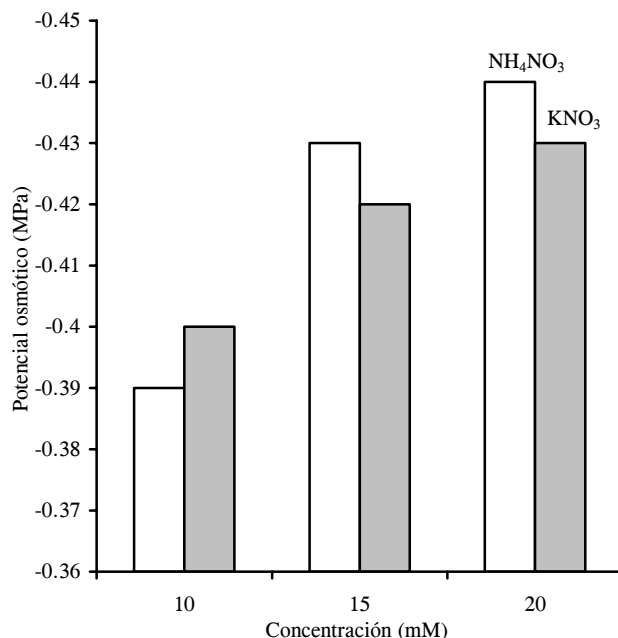


Figura 2. Potencial osmótico del medio de cultivo con agar 0.6 % en diferentes concentraciones de macronutrientes.

Según Pierik y Steegmans (1975), los medio que presentan potencial osmótico de aproximadamente -0.3 MPa permiten el crecimiento y organogénesis *in vitro*; tales tratamientos en este experimento fueron: sacarosa 60 mM (-0.31 MPa), glucosa 80 mM (-0.31 MPa), manitol 80 mM (-0.3 MPa) y mioinositol (-0.32 MPa). En el caso de los macronutrientes el potencial osmótico más bajo fue -

0.37 MPa con 1.5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , -0.38 con  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , y -0.39 MPa con 10 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; los demás tratamientos presentaron valores más negativos que los recomendados.

Considerando que el medio de cultivo más empleado es el de Murashige y Skoog (1962), éste presenta potencial osmótico de -0.23 MPa de los macronutrientes y de -0.22 MPa de la sacarosa (Yoshida *et al.*, 1973), por lo que el potencial osmótico del medio combinado sería -0.45 MPa, que es uno de los más negativos comparado con el de Withe (1943) que es de -0.19 MPa. Los valores obtenidos en este estudio, en ningún caso rebasan los parámetros recomendados.

De acuerdo con Reyes (1992), al incrementar la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  se aumenta el contenido de agua en los tejidos, lo que puede ocasionar desórdenes fisiológicos en el desarrollo de los brotes. Por ello es importante conocer el contenido de sales de los medios y su potencial osmótico. Considerando los valores aquí obtenidos con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$ , las concentraciones de estos macronutrientes no deberían ser superiores a 10 mM.

## CONCLUSIONES

El potencial osmótico más negativo (-0.49 MPa) se obtuvo con 120 mM de sacarosa y el menos negativo (-0.37 MPa) con 1.5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 1.5 mM. En los tratamientos donde las concentraciones de solutos fueron de 10 a 20 y de 40 hasta 120 mM, se observó que a mayor concentración el potencial osmótico fue más negativo, y en los tratamientos donde las concentraciones fueron de 1 a 4 mM no se detectaron diferencias significativas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar C A, A Villegas M (1993) Enraizamiento *in vitro* y establecimiento en suelo de portainjertos tolerantes a la tristeza de los cítricos. In: V Congreso Nacional de Horticultura. Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas A. C. Veracruz, Ver. México. p. 84.
- Cárdenas L M A (1999) Osmorreguladores en el cultivo *in vitro* de portainjertos de cítricos. Tesis Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. Edo. de México, México. 94 p.
- Brand M H (1993) Agar and ammonium nitrate influence hyperhidricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 35:203-209.
- Debergh P, J Aitken-Christie, D Cohen, B Grout, S von Arnold, R Zimmerman, M Ziv (1992) Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30: 135-140.
- George E F (1993) Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology. Exergetics Ltd. Edington, Wilts. England. 574 p.
- Lankes C, R Zimmerman (1990) Impact of osmotic potential on *in vitro* cultures of apple. Acta Hort. 280: 417-424.

- Larqué-Saavedra A, C Trejo L (1990)** El Agua en las Plantas. Edit. Trillas. México. 88 p.
- Lipavska H, D Vreugdenhil D (1996)** Utake of mannitol from the media by in vitro grown plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 45 (2):103-107.
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantar.* 15: 437-497.
- Pierik R L M (1990)** Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Edic. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
- Pierik R L M, H H M Steegmans (1975)** Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of rhododendrom. *Scientia Hort.* 3:1-20.
- Reyes S M I (1992)** Efecto de la fuente y concentración de amonio sobre la proliferación *in vitro* de portainjertos de manzano. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Edo de México. 73 p.
- Wescor Inc (1984)** Manual de Instrucción del Osmómetro de Presión de Vapor modelo 5100C. Logan, Utah 84321. U. S. A.
- White P R (1943)** A Handbook of Plant Tissue Culture. The Jacques Cattell Press, Inc., Lancaster, Pennsylvania. 433 p.
- Yoshida F, T Kobayashi, T Yoshida (1973)** The mineral nutrition of cultured chlorophyllous cells of tobacco I. Effects of  $\pi$ salts,  $\pi$ sucrose, Ca, Cl and B in the medium on the yield, friability, chlorophyll contents and mineral absorption of cells. *Plant Cell Physiol.* 14:329-339.