

COMPUESTOS ENDÓGENOS CON EFECTO REGULADOR DE LA BROTAÇÃO DE ESTOLONEN *Solanum tuberosum* L.

ENDOGENOUS CHEMICAL COMPOUNDS HAVING REGULATORY EFFECT ON STOLON SPROUTING IN *Solanum tuberosum* L.

Abraham Coutiño-Magdaleno¹, Víctor A. González-Hernández^{1*}, Iván Ramírez-Ramírez^{1*},
Ma. de la Nieves Rodríguez-Mendoza²; R. Marcos Soto-Hernández³

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal; ²Postgrado en Edafología; ³Postgrado en Botánica; Colegio de Postgraduados. Apartado Postal 358, 56101. Texcoco, Estado de México. (vagh@colpos.mx).

RESUMEN

Para que el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) produzca tubérculos (órgano comestible), es necesaria la tuberización en un segmento del estolón; antes de esto es necesario que el estolón brote a partir de una yema del tallo subterráneo y se desarrolle. Ya que la brotación del estolón es clave en la producción del tubérculo, este estudio se enfocó a la búsqueda de compuestos endógenos (tipo hormonas), que puedan asociarse a esa regulación. Las yemas (200 mg) de estolones se muestrearon en cuatro eventos tempranos su desarrollo (yema latente, hinchada, brotada, y estolón diferenciado). El cultivo de papa de las variedades Ágata y Fianna se hizo en cámara con ambiente controlado y en macetas, con perlita como sustrato. Las extracciones se hicieron a partir de 50 yemas por variedad y por evento de desarrollo (400 en total) y para separarlas se utilizó un microscopio. De las yemas se obtuvieron extractos que se analizaron en HPLC, con detector UV-VIS, por triplicado. Los estándares de referencia fueron los reguladores vegetales comerciales Kin, 2iP, BAP, AIA, AG3 y ABA, y las medias y desviaciones estándar de los datos se analizaron. Ocho de los compuestos encontrados en las muestras fueron diferentes a los estándares. Los compuestos del tejido mostraron asociación con un tipo de auxina y uno tipo giberelina como represores de la brotación de la yema de estolón en ambas variedades.

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, brotación, yema, estolón.

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos más importantes en el mundo. De acuerdo con Fernie y Willmitzer (2001) ocupa

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2017. Aprobado: agosto, 2017.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 52: 77-89. 2018.

ABSTRACT

Before potato plants (*Solanum tuberosum* L.) produce tubers (edible organ), a stolon segment needs to undergo tuber formation. Prior to this event, the stolon must develop from an underground bud on the stem. Thus, sprouting of the stolon is a key event in tuber production, and this study searched for endogenous hormone-like compounds possibly associated to stolon development. Stolon buds were sampled (200 mg) in four early developmental stages: latent, swollen, sprouted and differentiated. Agata and Fianna potato varieties were grown in a controlled environment chamber in pots containing perlite as substrate. Extracts were collected from 50 buds per variety and developmental stage (400 total buds). Buds were separated under a microscope. Three repetitions per variety and stage were analyzed in an HPLC coupled to an UV-VIS detector. Commercial plant regulators Kin, 2iP, BAP, IAA, GA3 and ABA were used as reference for the analysis. Average peak areas and standard deviations were calculated. From the samples, eight different compounds to the reference compounds were separated. Two compounds were associated to repression of stolon sprouting in both varieties: one is related to auxin and the other to gibberellin.

Key words: *Solanum tuberosum*, sprouting, bud, stolon.

INTRODUCTION

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important crops in the world. According to Fernie and Willmitzer (2001), its annual world production ranks fourth after rice (*Oryza sativa* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.).

Strategies for improving potato production are then necessary. The potato tuber that is consumed as food is a shortened and engorged underground stem

el cuarto lugar en producción anual después de arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.). Por esto, las estrategias que permitan mejorar su producción son necesarias. El tubérculo de papa que se consume como alimento, es un tallo subterráneo acortado y ensanchado, derivado de la división y alargamiento celular de la región subapical de estolones. Los estolones son tallos producidos por el alargamiento y desarrollo de las yemas laterales subterráneas de la base del tallo principal de la planta (Xu *et al.*, 1998).

Las yemas de estolones se forman de tejidos no diferenciados resguardados en las zonas axilares del tallo, los que se distinguen de otros tejidos aledaños por sus células con núcleos grandes. Después de formarse, la yema del estolón tiende a formar y desarrollar entrenudos sucesivos. El ápice del estolón origina un par de primordios foliares inicialmente opuestos, luego alternos y entre ellos se ubica el domo del meristemo apical; con las divisiones continúa la diferenciación de otros tejidos en la porción proximal de este órgano (Salas *et al.*, 2003).

La producción de estolones y tubérculos varía con la variedad de papa (Hernández, 2012). Ágata es una variedad comercial que se caracteriza por su porte bajo (30 a 40 cm), ciclo de producción de 90 días (después de siembra, DDS), producción de 10 a 13 estolones por tallo vegetativo, y tasa mayor de inducción de estolones y tuberización en la etapa vegetativa (2 a 10 días después de la emergencia, DDE). En contraste, la variedad Fianna presenta plantas de porte mediano (50 a 80 cm) con ciclo de producción de 120 a 150 DDS, producción de seis a ocho estolones por tallo vegetativo, y tasa de inducción mayor de estos y tuberización en la segunda mitad de la etapa vegetativa (30 a 50 DDE). Según Trindande *et al.* (2003), los tubérculos se desarrollan a partir de las células de la médula de la región subapical del estolón, seguidos de la división celular rápida de la mayoría de células del parénquima; las divisiones cesan cuando el tubérculo tiene peso aproximado de 30 a 40 g.

Uno de los factores principales que afectan directamente la inducción de estolones y la formación de los tubérculos es el balance hormonal y de sustancias con efectos reguladores (Van den Berg *et al.*, 1996). Los reguladores de crecimiento vegetal que participan en el crecimiento y desarrollo de la planta son: auxinas, giberelinas, citocininas, brasinosteroides,

produced from cell division and elongation in the sub-apical stolon region. Stolons are stems produced by elongation and development of underground lateral buds at the base of the main plant stem (Xu *et al.*, 1998).

Stolon buds derive from undifferentiated tissue sheltered in the axillary stem areas. These buds can be identified from other surrounding tissues by their large-nuclei cells. After formation, the stolon bud tends to produce and develop successive internodes. The stolon apex originates a pair of opposed leaf primordia followed by a pair of alternate leaves. The apical meristematic dome is located inside these leaves, and it continues differentiation in other tissues close to this organ (Salas *et al.*, 2003).

Stolon and tuber production varies with the potato variety (Hernández, 2012). Agata is a commercial variety featuring a small size (30 to 40 cm) tuber, 90 days production cycle (after planting, DAP), 10 to 13 stolons per vegetative stem, and high rates of stolon induction and tuber formation during the vegetative stage (2 to 10 days after emergence, DAE). The Fianna variety has a contrasting phenotype: the plant is 50 to 80 cm tall; its production cycle lasts 120 to 150 DAP; it produces six to eight stolons per vegetative stem; shows a higher stolon induction rate and tuber formation in the second half of the vegetative stage (30 to 50 DAE). According to Trindande *et al.* (2003), tubers initially develop from cells in the sub-apical region of the stolon, followed by quick cell division from most of the parenchyma cells. These divisions cease when the tuber reaches approximately 30 to 40 g.

Stolon induction and tuber formation is directly influenced by the hormonal balance and substances with regulation effects (Van den Berg *et al.*, 1996). Substances that act as plant growth and development regulators are auxins, gibberellins, cytokinins, brassinosteroids, abscisic acid, ethylene, and jasmonic acid (Davies, 1988; Tanimoto, 2005). Gibberellins seem to be the most active in regulating the process of tuber formation (Jackson, 1999).

Ortiz and Flórez (2008) have detected the plant hormones trans-zeatin riboside (ZR), 6-dimethyl aminopurine riboside (iPA) and 6-dimethyl aminopurine (iP) during tuber formation in some potato varieties. Suttle *et al.* (2011) reported progressive decrease of tuberonic acid (TA) concentration in seed tubers as latency is lost, and the concentrations of

ácido abscísico, etileno y ácido jasmónico (Davies, 1988; Tanimoto, 2005), y las giberelinas parecen ser las más activas en regular el proceso de la tuberización (Jackson, 1999).

Ortiz y Flórez (2008) detectaron a las fitohormonas *trans*-zeatina ribósido (ZR), 6-dimetilaminopurina ribósido (iPA) y 6-dimetilaminopurina (iP) en la etapa de tuberización de algunas variedades de papa. Suttle *et al.* (2011) reportaron que la concentración de ácido tuberónico (TA) disminuye progresivamente en tubérculos semilla con la pérdida de su latencia, e incrementan las concentraciones de ácido jasmónico, N-jasmonoyl-L-isoleucina y ácido abscísico.

Sonnewald y Sonnewald (2014) afirmaron que un prerrequisito para el brotado de tubérculos es que haya suficiente sacarosa, que ABA y etileno funcionan como hormonas inhibitorias de la brotación de yemas, que AG y CK son hormonas promotoras de ruptura de latencia e iniciadores del estolón, y que las auxinas estimulan el desarrollo vascular del brote.

Dutt *et al.* (2017) describieron la tuberización de la papa como un fenómeno biológico complejo que involucra factores ambientales, genéticos y nutricionales. En él los principales metabolitos que regulan la tuberización de la papa son la proteína StSP6A, los ARN *StBEL5* y *miR172* y las giberelinas. Sevcikova *et al.* (2017) concluyeron que las señales predominantes para la tuberización parece que son la disponibilidad de carbohidratos y giberelinas. Los resultados de estudios *in vitro* e *in vivo* permitieron asegurar a Teo *et al.* (2017) que la floración y la formación de tubérculos en papa involucran las señales florígeno y tuberígeno, provenientes de las hojas; de éstas, el complejo activador de tuberígeno incluye proteínas como StSP6A, St 14-3-3s y StFDL1 que regulan la formación de tubérculos.

Kolachevskaya *et al.* (2017) propusieron un modelo de acción multi-hormonal que controla la formación de tubérculos, en el que las giberelinas inhiben la inducción e iniciación de tubérculos, las citocininas promueven ambos procesos, y las auxinas estimulan el crecimiento y desarrollo posterior de los tubérculos iniciados. Kolachevskaya *et al.* (2015) reportaron que el gen *tms1* se expresa más en tubérculos que en tallos, y que en tubérculos aumenta la síntesis de auxinas durante su formación; además, documentaron la correlación positiva entre la expresión de ese

jasmonic acid, N-jasmonoyl-L-isoleucine and abscisic acid increase.

Sonnewald and Sonnewald (2014) stated the prerequisites for tuber sprouting which are enough available sucrose, inhibition of bud sprouting by ABA and ethylene, promotion of latency rupture by GA and CK and stimulation of vascular development.

Dutt *et al.* (2017) described potato tuber formation as a complex biological phenomenon that involves factors like environment, genetics and nutrition. The major metabolites that regulate potato tuber formation are the protein StSP6A, RNAs *StBEL5* and *miR172*, and gibberellins. Sevcikova *et al.* (2017) concluded that the dominant signals for tuber formation seem to be carbohydrates and gibberellin availability. The results of *in vitro* and *in vivo* studies allowed Teo *et al.* (2017) to propose that flowering and potato tuber formation involve a signal, florigen and tuberigen, from the leaves. The activation complex for tuberigen includes proteins like StSP6A, St 14-3-3s, and StFDL1 regulates the tuber formation.

Kolachevskaya *et al.* (2017) proposed a multi-hormonal model that controls tuber formation. In this model, gibberellins inhibit tuber induction and initiation, while cytokinins promote both processes, and auxins stimulate future growth and development of the formed tubers. In 2015, Kolachevskaya *et al.* reported increased expression of the *tms1* gene in tubers compared to stems. Also, they found that auxin synthesis increases during tuber formation and documented a positive correlation between expression of this gene, IAA content, and tuber growth. GA3 mixed with zinc sulfate and sprayed after tuber sprouting increased tuber yield (38 %) and expression of crude protein (8.37 %) (Javanmardi and Rasuli, 2017). This treatment promoted stolon and tuber growth, but not its induction.

In the medicinal plant *Tulipa edulis*, high soluble sugar availability is essential for the initial development of the stolon (Miao *et al.*, 2016). This behavior confirmed the high activity of sucrose synthase (SS) and soluble starch synthase (SSS), and the expression of the *SS*, *SSSI* and *SSSII* genes. Additionally, gibberellin and zeatin riboside content reached their highest concentration at the beginning of stolon formation, while IAA and levels remained high from the beginning through the middle of this period, and decreased significantly at the end of stolon formation. In tubers of *Helianthus tuberosus* L., biomass and sugar

gen y el contenido de la auxina AIA y crecimiento del tubérculo.

El AG3, mezclado con sulfato de zinc, asperjado después del brotado de los tubérculos aumentó 38 % el rendimiento de tubérculo e incrementó (8.37 %) la expresión de proteína cruda (Javanmardi y Rasuli, 2017). Este tratamiento influyó en el crecimiento de estolones y tubérculos, pero no en su inducción.

En la planta medicinal *Tulipa edulis*, la disponibilidad alta de azúcares solubles es esencial para el desarrollo inicial del estolón (Miao *et al.*, 2016). Esto lo confirmó la actividad alta de sacarosa sintasa (SS) y almidón soluble sintasa (SSS), y la expresión de los genes *SS*, *SSSI* y *SSSII*. Además, las giberelinas y la zeatina ribósido alcanzaron sus máximos contenidos al inicio de la formación de estolones; en cambio, los niveles de AIA y ABA permanecieron altos del inicio a la mitad del periodo, y decrecieron significativamente al final de la formación de estolones.

En tubérculos de *Helianthus tuberosus* L. la acumulación de biomasa y de azúcar correlacionó positivamente con el contenido endógeno de zeatina y negativamente con el de AG3, AG3/ABA y AIA/ABA. Las proporciones AG3/ABA y AIA/ABA disminuyeron, los contenidos endógenos de zeatina, y ABA incrementaron durante el crecimiento del tubérculo, y AG3 y AIA decrecieron durante el estudio, excepto en las primeras dos semanas (Li *et al.*, 2017).

Actualmente no se han identificado con certeza las hormonas que regulan la iniciación de estolones en papa. Este aspecto conviene dilucidarse porque la formación de tubérculos depende de la formación de estolones. La detección de este tipo de compuestos químicos, que están en concentraciones bajas incluye purificación, cuantificación e identificación que puede hacerse mediante cromatografía. Entre los métodos más usados para la detección de los reguladores de crecimiento vegetal está la cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés) (Arteca, 1996) con detector UV-VIS (Olivella *et al.*, 2001; Oliveros *et al.*, 2011).

El objetivo de este estudio fue analizar los reguladores del crecimiento vegetal de ápices de estolones en estadios tempranos de desarrollo, de la fase latente a la diferenciación en estolón, mediante HPLC. Al respecto, se postuló que con lo anterior se detectarían los reguladores de crecimiento responsables de la diferenciación de estolón.

accumulation correlated positively with endogenous contents of zeatin and negatively with GA3, GA3/ABA and IAA/ABA contents. GA3/ABA and ABA/IAA ratios decreased, while endogenous zeatin and ABA content increased during tuber growth, and GA3 and AIA content decreased during the study after two weeks (Li *et al.*, 2017).

Currently, the hormones that regulate stolon initiation in potato have not been identified with certainty. It is then convenient to determine the hormones that promote stolon initiation since tuber formation depends on it. These compounds should be present at low concentrations and their characterization requires purification, quantification, and identification, which can be performed via chromatography. Among the methods used for detection of plant growth regulators is high pressure liquid chromatography (HPLC) (Arteca, 1996) coupled to a UV-VIS detector (Olivella *et al.*, 2001; Oliveros *et al.*, 2011).

This study analyzed plant growth regulators present in the stolon apex during early development stages of the latent phase of stolon differentiation using HPLC. The methodology proposed might identify plant growth regulators responsible for stolon differentiation.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Commercial varieties of Agata and Fianna potatoes were tested in this study. These varieties contrast in growth habit and tuber quantity. Seed tubers for both varieties, healthy and apparently pathogen and pest free were obtained from the municipality of Zaragoza, Puebla, México.

Seeds were sown in 4-L capacity black polyethylene bags and kept in a greenhouse. The bags were covered with anti-aphid mesh to control pests and diseases until production. Three seeds were placed into perlite at 10 cm depth. Bags were kept in a controlled-environment chamber (GCA model 815 Freas; USA) at 20 ± 1 °C, 50 % relative humidity, and in complete darkness. Ten days after sowing (DAS), tubers with vegetative shoots (Figure 1) were sampled. Sampled shoots were placed in a cooler (6 ± 1 °C) for dissection in the laboratory. Sampling continued until 30 DAS. Mother tubers were washed three times with distilled water to remove substrate particles. From each tuber, vegetative buds were extracted with a size 11 scalpel and a stereoscopic microscope (OLYMPUS model SZ-CTV; USA).

Samples of buds in four stages of stolon development were extracted from buds at the basal zone of the stem with a

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En el estudio se evaluaron las variedades comerciales de papa Ágata y Fianna. Ellas contrastan en hábito de crecimiento y cantidad de tubérculos. Los tubérculos semilla, sanos y en apariencia libres de patógenos y de plagas, de ambas variedades se obtuvieron del municipio de Zaragoza, Puebla, México.

La semillas se sembraron en bolsas de polietileno negro de 4 L de capacidad y se mantuvieron en un invernadero, con cubierta plástica y malla anti-áfidos para el control de plagas y enfermedades, hasta la producción. El sustrato fue perlita y a 10 cm de profundidad se depositaron tres tubérculos. Las bolsas se mantuvieron en una cámara con ambiente controlado (GCA® modelo Freas 815; EE.UU.) a 20 ± 1 °C, 50 % de humedad relativa y en completa oscuridad. Diez días después de la siembra (dds) se muestrearon los tubérculos con brotes vegetativos (Figura 1): Estos se colocaron en hielera (6 ± 1 °C) para su identificación en laboratorio. El muestreo de brotes continuó hasta 30 dds. Los tubérculos

stereoscopic microscope (Carl Zeiss model SZ60; Germany): E1) flattened and latent stolon bud at initial stage; E2) swollen and still latent stolon bud; E3) sprouted stolon bud, also called stolon primordia, in which it starts its elongation and development; and E4) stolon in early formation stage.

Two hundred mg of buds (containing almost no meristematic tissue) were placed in 2 mL Eppendorf tubes. This quantity was obtained with 50 buds per variety and in each development event. Microtubes containing the buds were kept at -20 °C (Puffer Hubbard model IUF1821, USA) until processing.

Buds at stages E1, E2, E3 and E4 were extracted by longitudinal dissection (with a metal blade; Guillette®) of axillary buds from underground stems from both varieties. Buds were stained with fuschine acid (0.05 %)

Extraction of plant growth regulators (plant hormones)

Before extraction, samples were lyophilized for 12 hours (Labconco model Freezone 4.5; USA). Ten mg from each lyophilized bud type were placed in a plastic microtube and

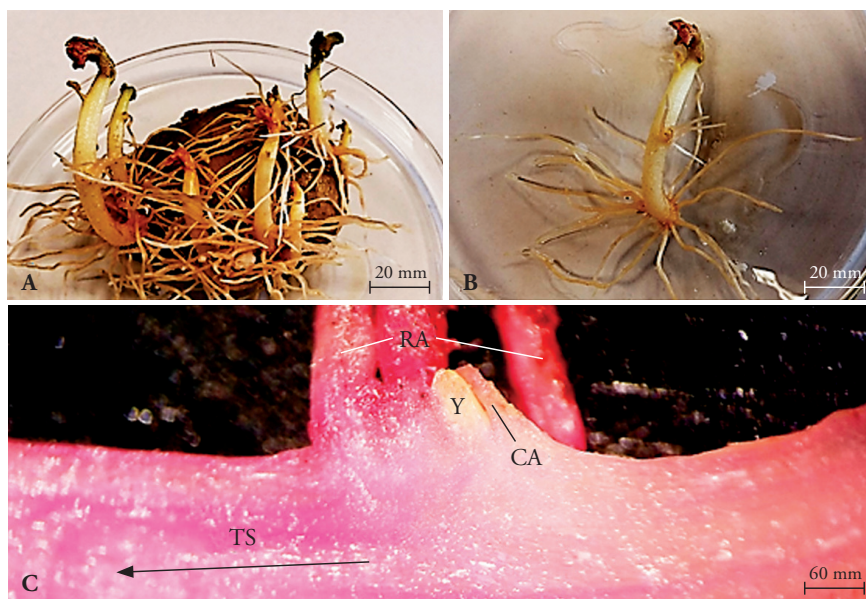


Figura 1. A) Tubérculo semilla con brotes vegetativos de *S. tuberosum* L. var. Ágata 15 días después de la siembra; B) Brote vegetativo; y C) Corte longitudinal del tallo de un brote vegetativo teñido con fuscina ácida al 0.05 % (microscopio estereoscópico; Carl Zeiss® SZ60). CA: catáfilo que cubre a la yema del estolón (Y), RA: raíces adventicias y TS: tallo subterráneo. La orientación del ápice de crecimiento lo indica la flecha negra.

Figure 1. A) Seed tuber with vegetative shoots of *S. tuberosum* L. var. Agata 15 days after sowing; B) Vegetative shoot; and C) Longitudinal dissection from the stem of a vegetative shoot stained with 0.05 % acid fuchsin (stereoscopic microscope, Carl Zeiss® SZ60). CA: cataphyll covering the stolon bud (Y), RA: adventitious roots, and TS: underground stem. Orientation of the growing apex is marked by the black arrow.

madre se lavaron tres veces con agua destilada para eliminar las partículas de sustrato. De cada uno de esos tubérculos se extrajeron los brotes vegetativos, con bisturí de hoja 11 y un microscopio estereoscópico (OLYMPUS modelo SZ-CTV; EE.UU.).

Las muestras de yemas en cuatro estadios del desarrollo del estolón se extrajeron de los brotes de la zona media basal del tallo con microscopio estereoscópico (Carl Zeiss modelo SZ60[®]; Alemania): E1) yema de estolón en etapa inicial, aplanada y latente, E2) yema de estolón en etapa hinchada y aún latente, E3) yema brotada de estolón, también llamada rudimento estolonífero, en la que el estolón inicia su alargamiento y desarrollo y E4) estolón en etapa temprana de su formación.

Doscientos mg de las yemas (con tejido no meristemático mínimo) se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL. Esa cantidad se obtuvo de 50 yemas de cada variedad y en cada evento de desarrollo. Los tubos con las yemas se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (en congelador; Puffer Hubbard[®] modelo IUF1821; EE.UU.) hasta que los tejidos se evaluaron.

Las etapas E1, E2, E3 y E4 se extrajeron mediante cortes (con navaja metálica; Guillette[®]) anatómicos longitudinales de yemas axilares de tallos subterráneos de ambas variedades, Ágata y Fianna, seguida de tinción con fucsina ácida (0.05 %).

Extracción de reguladores de crecimiento (fitohormonas)

Antes de la extracción las muestras se deshidrataron 12 horas en una liofilizadora (Labconco[®] modelo FreeZone 4.5; EE.UU.). De cada tipo de yema liofilizada se colocaron 10 mg en un tubo plástico y se le agregaron 500 μL de solución de extracción, según el protocolo propuesto por Pan (2010). La solución de extracción contenía 2-propanol grado HPLC (J. T. Baker[®]), agua desionizada y HCl concentrado grado reactivo (J. T. Baker[®]), en proporción 2:1:0.002. Los tubos se agitaron 30 min en vórtex (Scientific Industries, modelo G560[®]; EE.UU.) a 100 rpm y refrigeración ($6\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Después, a cada tubo se le agregaron 1000 μL de diclorometano grado HPLC (J. T. Baker[®]), se agitó 30 min a 100 rpm y centrifugó a 716 g por 10 min (Hettich[®], modelo EBA 21; EE.UU.). Luego, la fase orgánica (la inferior) se extrajo con una micropipeta Eppendorf[®] (EE.UU.) y se depositó en un tubo limpio. El disolvente se evaporó totalmente, con corriente de gas nitrógeno (grado alta pureza; Infra[®]) y se agregaron 500 μL de metanol filtrado grado HPLC (J.T. Baker[®]) al residuo de cada tubo. Los tubos se almacenaron hasta el análisis cromatográfico.

Preparación de soluciones de estándares analíticos

Los estándares cuantitativos de fitohormona fueron ácido giberélico 3 (AG3, pureza 90 %), ácido indol-3-acético (AIA,

500 μL of extraction solution added as per Pan's protocol (2010). The extraction solution contained 2-propanol HPLC grade (J.T. Baker[®]), deionized water and reagent grade concentrated HCl (J.T. Baker[®]) in a 2:1:0.002 ratio. Microtubes were agitated at 100 rpm for 30 minutes using a vortex (Scientific Industries model G560; USA) and kept at $6\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. After agitation, 1000 μL of HPLC-grade dichloromethane were added to each microtube. The mixture was agitated for 30 min at 100 rpm and then centrifuged at 716 g for 10 min (Hettich, model EBA 21; USA). The lower organic phase was extracted with an Eppendorf micropipette (USA) and placed in a clean microtube. Using nitrogen gas (high purity grade; Infra[®]), the solvent was completely evaporated, and 500 μL of HPLC-grade filtered methanol were added (J.T. Baker[®]) to each microtube. These microtubes were stored until chromatographic analysis.

Analytic standard preparation

Quantitative standards for this research were 3-gibberellic acid (GA3, 90 % purity), indole-3-acetic acid (IAA, 98 % purity), abscisic acid (ABA, 98.5 % purity), kinetin (KIN, 98 % purity), 6-(*l,l'*-dimethylalylamino)-purine (2-iP, 98 % purity) and 6-benzylaminopurine (BAP, 99 % purity) (Sigma-Aldrich[®]). For each standard, dilutions at 0.01, 0.1 and 1.0 mg mL⁻¹ were prepared in HPLC-grade methanol (J.T. Baker[®]).

Chromatographic analysis

An Agilent HPLC model 1100 coupled to an UV-Vis detector was used for detection. The column used for separation was a 4.6x75 mm Rx/SB-C8 column (model 866953-906; Agilent). The mobile phase contained an 80:20 mixture of solutions A and B. Solution A included HPLC-grade acetonitrile (J.T. Baker[®]) and trifluoroacetic acid spectrophotometric grade (Sigma-Aldrich[®]) in a 1:0.001 ratio. Solution B was a 1:0.001 mixture of deionized water and spectrophotometric-grade trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich[®]). Both solutions were filtered using 0.45 μm HV-type Millipore[®] membranes (adapted from Pan *et al.*, 2010).

Flow rate for the mobile phase was 2 mL min⁻¹. Three 20 μL replications of every extract were injected into the HPLC using a manual injector (Rheodyne[®], model 755). Readings were taken at three wavelengths, and the reading showing the highest absorption was chosen. The working wavelengths were 206 nm for gibberellins, 254 for auxins and abscisic acid (Harborne, 1994), and 280 for cytokines. Peak area was recorded as milli-absorbance units per second (mAU s⁻¹) (Ortiz and Flórez, 2008). The identity for each fraction was determined by comparison with retention time and maximum absorption wavelength for the standards. Calibration curves were also calculated for each standard.

pureza 98 %), (\pm)-ácido abscísico (ABA, pureza ≥ 98.5 %), cinetina (KIN, pureza ≥ 98 %), 6-(γ , γ -dimetilalilamino)-purina (2-iP, pureza 98 %) y 6-bencilaminopurina (BAP, pureza ≥ 99 %) (Sigma-Aldrich®). De ellos se prepararon diluciones con 0.01, 0.1 y 1.0 mg por mL de metanol grado HPLC (J.T. Baker®).

Análisis cromatográfico

El cromatógrafo para el estudio (Agilent, modelo 1100®) estuvo equipado con un detector UV-Vis y una columna Agilent® (modelo 866953-906 Rx/SB-C8 de 4.6×75 mm). La fase móvil fue la mezcla de las soluciones A y B (80:20). La solución A contenía acetonitrilo grado HPLC (J. T. Baker®) y ácido trifluoroacético grado espectrofotométrico (Sigma-Aldrich®) en proporción 1:0.001; la solución B contenía agua desionizada y ácido trifluoroacético grado espectrofotométrico (Sigma-Aldrich®) en proporción 1:0.001. Ambas soluciones se filtraron con membranas Millipore® tipo HV de 0.45 μm (protocolo adaptado de Pan *et al.*, 2010)

El flujo de la fase móvil fue de 2 mL min^{-1} . Con un inyector manual (Rheodyne®, modelo 755) se inyectaron 20 μL de cada extracto en triplicado. Las lecturas se hicieron en tres longitudes de onda y se eligió la de absorción máxima. Ellas fueron: 206 nm para giberelinas, 254 nm para auxinas y ácido abscísico (Harborne, 1994), y 280 nm para citocininas. La respuesta se expresó en mili-unidades de absorbancia por segundo (mAU·s) (Ortiz y Flórez, 2008). La identidad de las fracciones se determinó por comparación con los tiempos de retención y la longitud de onda de máxima absorción de los estándares. Además, las curvas de calibración se obtuvieron con los estándares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación y clasificación de yemas de estolones

La pérdida de latencia de la yema del estolón y su brotado se detectó en la etapa E3 (Figura 2).

El método de extracción y análisis estuvo diseñado para detectar y cuantificar hormonas; por lo que, en cada longitud de onda las fracciones correspondieron a compuestos con características físicas, químicas (tamaño y carga) similares a los estándares (Figura 3 y Cuadro 1). En este estudio ninguna fracción cromatográfica de ninguna longitud de onda se traslapó con otra; por lo que, cada pico, de las ocho fracciones que se obtuvieron, se consideró independiente (Cuadro 2).

RESULTS AND DISCUSSION

Identification and classification of stolon buds

Latency loss and sprouting in the stolon bud was detected at stage E3 (Figure 2).

The extraction and analysis method in this research was specifically designed to detect and quantify hormones. Thus, in each tested wavelength, each fraction should correspond to compounds with similar physical and chemical (size and charge) characteristics to the standards (Figure 3 and Table 1). In this research, no chromatographic fraction at any wavelength overlapped; thus, every peak from each of the eight fractions obtained was considered independent (Table 2).

Fractions F-1 and F-8 agreed with auxins, and their maximum absorption was at 254 nm. Fractions F-2, F-3 and F-4 agreed with cytokines, which absorb maximally at 280 nm. At 206 nm, fractions F-5, F-6 and F-7 matched gibberellins (Table 2).

The eight fractions changed concentration as stolon development stages progressed in both varieties (Figure 4). Four of the eight fractions appeared to be directly associated with stolon sprouting stages from E2 to E3, where E3 is the key event in the tuber formation. The fractions involved in this response were F-3, F-4 and F-8.

In both varieties, fraction F-7, a gibberellin-type compound, decreased sharply by E3 (less than 1000 mAU s^{-1}), and it accounted for 17 % of its content in the latent bud at E1 (Figure 4); F-8, an auxin-type compound, was expressed in E1 and E2 but not in E3. This behavior suggests that both growth regulators (F-7 and F-8) act as inhibitors of sprouting for stolon buds in the varieties Agata and Fianna, and probably in other potato varieties.

Detectable hormones during formation of stolons in *H. tuberosus* L. were GA3 and zeatin. The first hormone content increased initially and then decreased as tuber induction and growth continued. Zeatin content increased during all stages, and its lowest content occurred during stolon initiation (Li *et al.*, 2017).

According to Taiz and Zeiger (2002), low auxin levels promote bud development, and an increase in its concentration inhibits sprouting. In contrast, GA1 at low concentrations promotes stem elongation stems

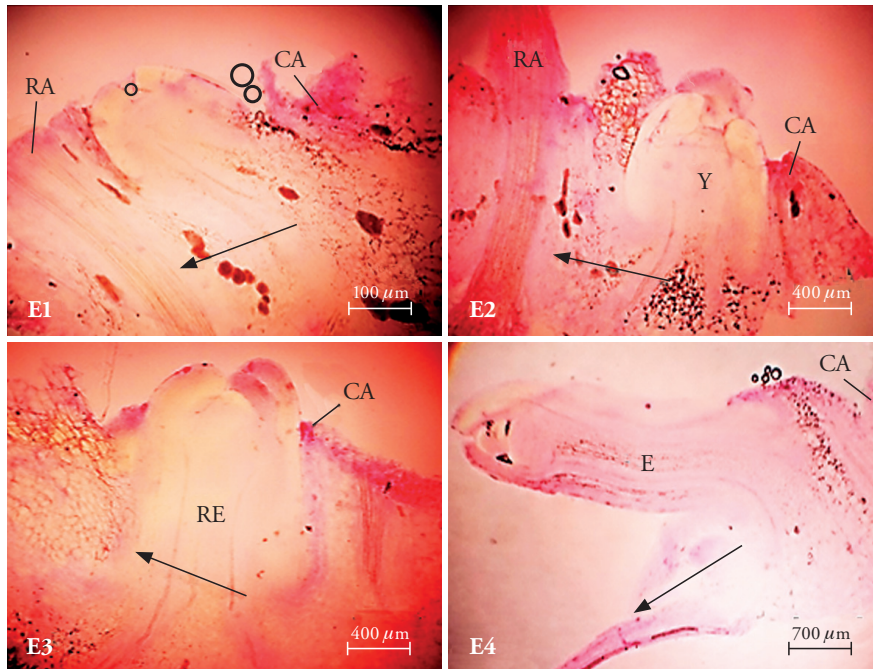


Figura 2. Cortes longitudinales de yemas de estolones axilares de tallos subterráneos de *S. tuberosum* L. var. Ágata, teñidos con fucsina ácida (0.05 %), vistos con microscopio (10X, Carl Zeiss®). E1) Yema de estolón en etapa inicial, aplanada y latente, con restos del catáfilo (CA) que cubre a la yema del estolón (Y), raíces adventicias (RA); el eje del tallo subterráneo y la orientación del ápice de crecimiento los señala la flecha. E2) Yema de estolón en etapa hinchada pero aún latente. E3) Yema brotada de estolón o rudimento estolonífero (RE) en etapa posterior a la pérdida de latencia e iniciando su alargamiento y desarrollo. E4) Estolón (E) en etapa temprana de desarrollo.

Figure 2. Longitudinal sections of buds taken from axillary stolons of underground stems of *S. tuberosum* L. var. Agata, stained with acid fuchsine (0.05 %), and observed under a microscope (10 X, Carl Zeiss®). E1) Stolon bud at initial, flattened and latent stage, with remains of the cataphyll (CA) covering the stolon bud (Y) and adventitious roots (RA); the axis of the underground stem and the orientation of the growth apex is marked by the arrow. E2) Stolon bud at a swollen but still latent stage. E3) Sprouted stolon bud or stolon primordia (RE) when stolon is clearly elongating and developing. E4) Stolon (E) at an early stage of development.

Las fracciones F-1 y F-8 coincidieron con las auxinas y su absorción fue máxima a 254 nm. Las fracciones F-2, F-3 y F-4 coincidieron con las citoquininas, cuya máxima absorción ocurrió a 280 nm. Las fracciones F-5, F-6 y F-7 coincidieron con las giberelinas, por su absorción máxima a 206 nm (Cuadro 2).

Las ocho fracciones cambiaron su concentración entre los eventos del desarrollo del estolón de las dos variedades (Figura 4). Cuatro de las ocho fracciones parecieron estar directamente asociadas con el brotado de estolones al pasar de E2 a E3, donde E3 es el evento clave en la formación de tubérculos. Las

and high concentrations tend to drastically reduce their growth rate.

An increase in the number of vegetative shoots in potato might be achieved faster by supplying GA3 at low concentrations; this behavior shows the important role gibberellins play in potato development (Alexopoulos *et al.*, 2007; Salimi *et al.*, 2010). Abdala *et al.* (2000) showed by comparison of potato organs that gibberellins influence stolon development in stages following sprouting. These authors obtained increased levels of jasmonates, GA1 and GA3 in sprouted and developing stolons, and such levels were higher during tuber formation.

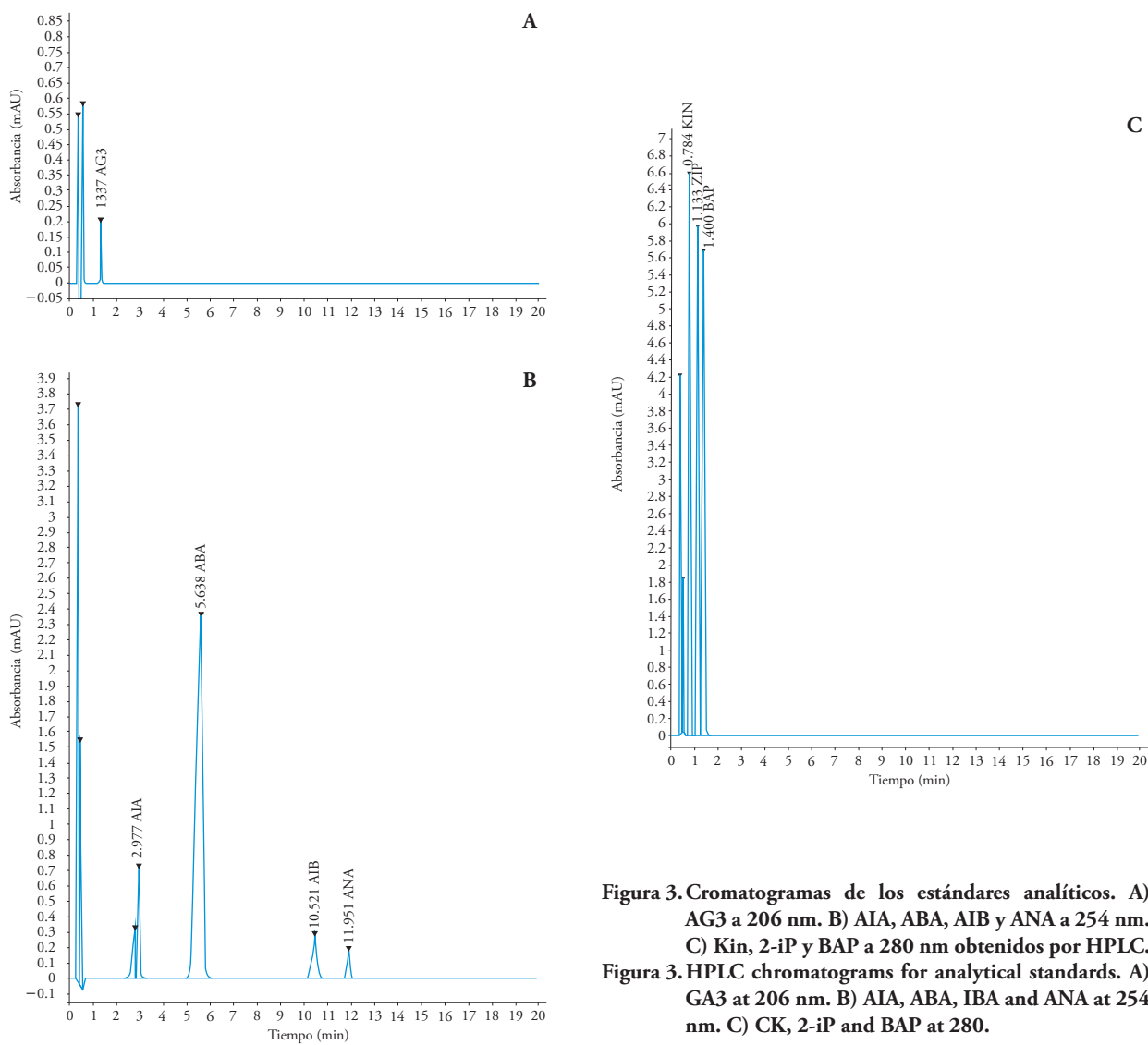


Figura 3. Cromatogramas de los estándares analíticos. A) AG3 a 206 nm. B) AIA, ABA, AIB y ANA a 254 nm. C) Kin, 2-iP y BAP a 280 nm obtenidos por HPLC. Figura 3. HPLC chromatograms for analytical standards. A) GA3 at 206 nm. B) AIA, ABA, IBA and ANA at 254 nm. C) CK, 2-iP and BAP at 280.

Cuadro 1. Tiempo de retención y longitudes de onda de absorbanza máxima de estándares cuantitativos de fitohormonas.

Table 1. Retention time and wavelength of maximum absorbance of quantitative standards of several plant hormones.

Compuesto	Tiempo de retención promedio (min)	Desviación estándar (min)	Longitud de onda (nm)
Cinetina (Kin, 6-furfurilaminopurina)	0.784	0.0095	280
6-(β,γ -Dimetilalilamino)-purina (2Ip)	1.133	0.0410	280
Ácido giberélico 3 (AG3)	1.337	0.0123	206
6-Bencilaminopurina (BAP)	1.407	0.0069	280
Ácido indol-3-acético (AIA)	2.977	0.0012	254
(\pm)-Ácido abscísico (ABA)	5.638	0.0052	254

fracciones involucradas fueron F-3, F-4, F-7 y F-8.

En ambas variedades la fracción F-7, de tipo giberelina, se redujo casi totalmente en E3 (a menos de 1000 mAU·s) y representó 17 % del contenido en la yema latente E1 (Figura 4); F-8, de tipo auxina, se expresó en E1 y E2 y no se detectó en E3. Esto permite sugerir que ambos reguladores del crecimiento (F-7 y F-8) actúan como inhibidores del brotado de yemas de estolones en las variedades Ágata y Fianna, y posiblemente en otras variedades de papa.

Las hormonas detectables durante el desarrollo de la formación de estolones de *H. tuberosus* L. fueron AG3 y zeatina. La primera aumentó su contenido inicial y disminuyó continuamente en etapas de inducción y crecimiento de tubérculos. La segunda incrementó durante todas las etapas, por lo que su contenido menor fue durante la iniciación de estolones (Li *et al.*, 2017).

De acuerdo con Taiz y Zeiger (2002), niveles bajos de auxina promueven el desarrollo de una yema vegetativa, y el incremento en su concentración inhibe la brotación; en contraste, la giberelina AG1 en concentraciones bajas favorece el alargamiento de los tallos y las concentraciones altas tienden a disminuir drásticamente su tasa de crecimiento.

El aumento del número de brotes vegetativos de papa puede lograrse en menos tiempo con aplicaciones de AG3 en bajas concentraciones, lo que evidencia el papel de las giberelinas en el desarrollo de la papa (Alexopoulos *et al.*, 2007; Salimi *et al.*, 2010). Abdala *et al.* (2000) demostraron, mediante la comparación de los órganos de papa, que las giberelinas influyen en el desarrollo del estolón en etapas posteriores a la brotación. Ellos obtuvieron las concentraciones mayores de jasmonatos, AG1 y AG3 en los estolones ya brotados y en pleno desarrollo, y los niveles fueron mayores durante la fase de tuberización.

Contrario a lo reportado por otros investigadores, en nuestro estudio la fracción de tipo giberelina (F-7) participó como represora en el brotado de las yemas de estolón (Figura 4). Esta fracción F-7 no correspondió al AG3, pues el estándar de esta hormona mostró un pico con tiempo de retención diferente al de F-7 (Cuadro 2 y Figura 4).

En contraste, solamente en la var. Fianna las fracciones F-3 y F-4, del tipo de citocinina, no estuvieron en los eventos de desarrollo E1 y E2, pero sí se expresaron en E3 y E4. Esto puede indicar que las dos fracciones promueven la brotación de estolones

Cuadro 2. Tiempos de retención (\pm desviación estándar) y longitud de onda de las fracciones de las muestras de *S. tuberosum* L. de las variedades Ágata y Fianna.

Table 2. Retention times (\pm standard deviation) and wavelength of the sample fractions of *S. tuberosum* L. of Agata and Fianna varieties.

Fracción	Tiempo de retención promedio (min)	Longitud de onda (nm)
1	0.556 \pm 0.0032	254
2	0.628 \pm 0.0058	280
3	0.859 \pm 0.0015	280
4	1.001 \pm 0.0010	280
5	1.580 \pm 0.0177	206
6	1.713 \pm 0.0132	206
7	2.199 \pm 0.0257	206
8	14.914 \pm 0.1693	254

Contrary to reports by other researchers, the results in our study show that the gibberellin-type fraction (F-7) participated as a repressor of sprouting of stolon buds (Figure 4). Fraction F-7 did not match GA3, as the analytical standard for this hormone had different retention time (Table 2 and Figure 4).

In contrast, in Fianna potato fractions F-3 and F-4 of the cytokinin-type, were not present in the developmental stages E1 and E2 but did show in E3 and E4. These results may indicate that the two fractions promote stolon germination only in some genotypes. When the stolon broke latency during stage E3 and E4, fractions F-3 and F-4 did not appear, thus suggesting that in this variety these cytokines are unnecessary to induce stolon sprouting. These results coincide with those of Ortiz and Flórez (2008); they pointed out that the interaction genotype \times cytokinins was not significant between the potato varieties in the study after detection and quantification of different kinds and concentrations of hormones.

It is then possible to assume that stolon sprouting in both varieties of potatoes takes place when gibberellin F-7 decreases and auxin F-8 is absent, because these two growth regulators, inhibit or suppress stolon sprouting. It can also be inferred that cytokinins participation in stolon sprouting is required only in some potato genotypes, and that the interaction of cytokinin \times genotype is associated with habits of expression of stolons. This can be appreciated in var. Agata: stolon induction was early and abundant

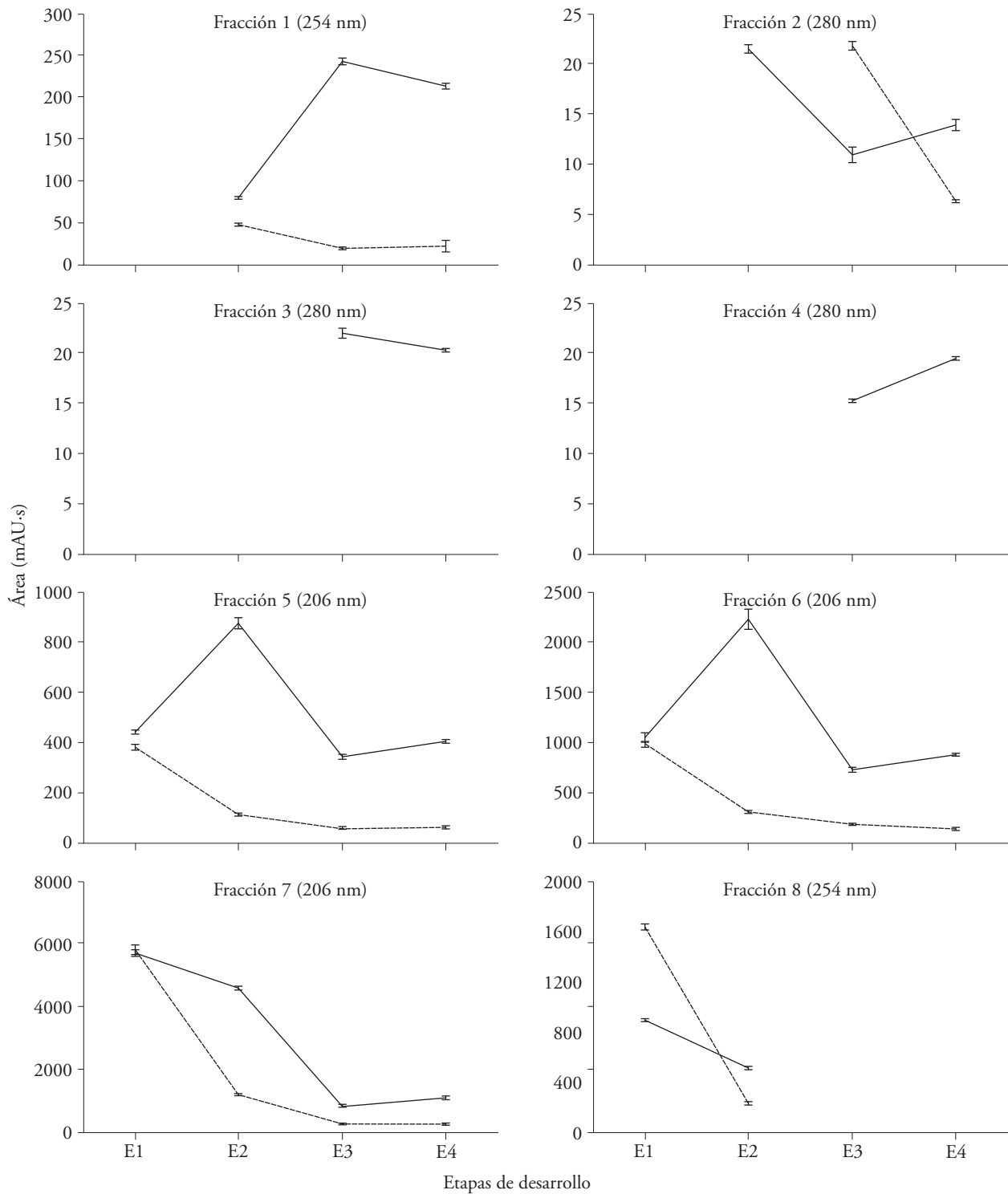


Figura 4. Cambios de concentración (\pm desviaciones estándar) en las fracciones extraídas de estolones en cuatro etapas de desarrollo. Variedades Ágata (---) y Fianna (—).

Figure 4. Changes in concentration (\pm standard deviations) in the fractions extracted from stolons at four stages of development. Varieties Ágata (---) and Fianna (—).

solo en algunos genotipos. Dado que en las etapas E3 y E4 de la var. Ágata no aparecieron las F-3 y F-4, cuando el estolón rompió la latencia y originó un estolón, es probable que en esta variedad estas citocininas sean innecesarias para inducir la brotación de estolones. Estos resultados coinciden con los de Ortiz y Flórez (2008); ellos señalaron que la interacción genotipo×citocininas no fue significativa entre las variedades de papa de su estudio, después de detectar y cuantificar diferentes tipos y concentraciones de hormonas.

Lo anterior permite inferir que el brotado de estolones, en ambas variedades de papa ocurre cuando la giberelina F-7 se reduce y la auxina F-8 está ausente, pues estos dos reguladores del crecimiento inhiben o reprimen la brotación de estolones. También puede deducirse que la acción probable de citocininas en la brotación de estolones la requieren solo algunos genotipos de papa, y que la interacción citocininas×genotipo está asociada con los hábitos de expresión de estolones. Este sería el caso de la var. Ágata, en la que la inducción de estolones fue precoz y abundante respecto a Fianna; pues, en esta última ese proceso ocurrió paulatinamente y en una etapa tardía.

Los resultados del presente estudio permiten avanzar en el conocimiento del proceso de iniciación de estolones de papa; pero, más estudios son necesarios para conocer la estructura química de los compuestos en las fracciones descritas en los párrafos anteriores, y también es necesario efectuar bioensayos con esos compuestos para establecer su efecto.

CONCLUSIONES

De las ocho fracciones descritas, las identificadas como F-7 (tipo giberelina) y F-8 (tipo auxina) son inhibitoras de la formación de estolones. Para que la yema brote y forme un estolón es necesario que en el ápice de la yema se reduzca la concentración de F-7 y que la fracción F-8 sea indetectable. Las fracciones F-3 y F-4 (tipo citocinina) regulan la diferenciación del estolón en interacción con el genotipo de papa, ya que estas fracciones se detectaron solo en la var. Fianna.

AGRADECIMIENTOS

Al M. C. Rubén Sanmiguel, investigador del Laboratorio de Fitoquímica del Programa de Botánica, Colegio de Postgra-

duados-Campus Montecillo, por su valiosa asesoría técnica en cromatografía de líquidos.

CONCLUSIONS

From the eight fractions described in this study, those identified as F-7 (gibberellin type) and F-8 (auxin type) inhibit stolon formation. For bud sprouting and stolon formation, it is necessary that the concentration of F-7 decreases and that F-8 is undetectable in the bud apex. Fractions F-3 and F-4 (cytokinin type) regulate the differentiation of the stolon in interaction with the potato genotype, since these fractions were detected only in var. Fianna.

—End of the English version—



duados-Campus Montecillo, por su valiosa asesoría técnica en cromatografía de líquidos.

LITERATURA CITADA

- Abdala, G., G. Castro, O. Miersch, and D. Pearce. 2002. Changes in jasmonate and gibberellin levels during development of potato plants (*Solanum tuberosum*). *Plant Growth Regul.* 36: 121-126.
- Alexopoulos, A. A., K. A. Akoumianakis, S. N. Vemmos, and H. C. Passam. 2007. The effect of postharvest application of gibberellic acid and benzyl adenine on the duration of dormancy of potatoes produced by plants grown from TPS. *Postharvest Biol. Technol.* 46: 54-62.
- Arteca, R. N. 1996. *Plant Growth Substances, Principles and Applications*. Editorial Chapman & Hall. New York, USA. 332 p.
- Davies, P. J. 1988. *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. 2nd ed. Editorial Kluwer. New York, USA. 681 p.
- Dutt, S., A. Sharma M., P. Raigond, B. Singh, S. Siddappa, V. Bhardwaj, P. G. Kavar, V. U. Patil, and H. B. Kardile. 2017. Key players associated with tuberization in potato: potential candidates for genetic engineering. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37: 2017.
- Fernie, A. R., and L. Willmitzer. 2001. Molecular and biochemical triggers potato tuber development. *Plant Physiol.* 127: 1459-1465.

- Harborne, J. B. 1984. *Phytochemical Methods*. 2nd ed. Editorial Chapman & Hall. London, England. 228 p.
- Hernández L., S. 2012. Caracterización de las variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) utilizadas en el Cofre de Perote, Xalapa, Veracruz, bajo regimen de temporal. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. 82 p.
- Jackson, S. D. 1999. Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiol.* 119: 1-8.
- Javanmardi, J., and F. Rasuli. 2017. Potato yield and tuber quality as affected by gibberellic acid and zinc sulphate. *Iran Agricultural Research* 36: 1-5.
- Kolachevskaya, O. O., V. V. Alekseeva, L. I. Sergeeva, E.B. Rukatsova, I. A. Getman, D. Vreugdenhil, Y. I. Buryanov, and G. A. Romanov. 2015. Expression of auxin synthesis gene *tms1* under control of tuber-specific promoter enhances potato tuberization *in vitro*. *Journal of the Integrative Plant Biol.* 57: 734-744.
- Kolachevskaya, O. O., L. I. Sergeeva, K. Flokova, I. A. Getman, S. N. Lomin, V. V. Alekseeva, E. B. Rukavtsova, Y. I. Buryanov, and G. A. Romanov. 2017. Auxin synthesis gene *tms1* driven by tuber-specific promoter alters hormonal status of transgenic potato plants and their responses to exogenous phytohormones. *Plant Cell Rep.* 36: 419-435.
- Li, L., T. Shao, H. Yang, M. Chen, X. Gao, X. Long, H. Shao, Z. Liu, and Z. Rengel. 2017. The endogenous plant hormones and ratios regulate sugar and dry matter accumulation in Jerusalem artichoke in salt-soil. *Sci. Total Environ.* 578: 40-46.
- Miao, Y., Q. Guo, Z. Zhu, X. Yang, C. Wang, Y. Sun, and L. Liu. 2016. Dynamic changes in starch metabolism and endogenous hormones during stolon formation in *Tulipa edulis*. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 141: 211-221.
- Olivella, C., M. Vendrell y R. Sauvé. 2001. Determinación de ácido abscísico, ácido indolacético, zeatina y ribósido de zeatina en hojas desarrolladas de *Gerbera jamesonii* cv. Bolus y su variación con la edad. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* 16: 333-342.
- Oliveros B., A., I. Cordero, D. Paredes, D. Buendía, y F. A. Macías D. 2011. Extracción y cuantificación de cumarina mediante HPLC-UV en extractos hidroetanólicos de semillas de *Dipteryx odorata*. *Rev. Latinoam. Quím.* 39: 17-31.
- Ortiz, L. Y., y V. J. Flórez. 2008. Comparación cuantitativa de ácido abscísico y citoquininas de *Solanum tuberosum* L. y *S. phureja* Juz. *et Buk. Agron. Colomb.* 26: 32-39.
- Pan, X., R. Welti and X. Wang. 2010. Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 5: 986-992.
- Salas, J. E., N. J. Mogollón, M. E. Sanabria. 2003. Anatomía de estructuras vegetativas y origen de los estolones, microtubérculos y raíces adventicias en plantas *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. Granola. *Rev. Fac. Agron.* 20: 131-143.
- Salimi, Kh., R. Tavakkol A., M. B. Hosseini, and P. C. Struik. 2010. Effects of gibberellic acid and carbon disulphide on sprouting of potato minitubers. *Sci. Hortic.* 124: 14-18.
- Sevcikova, H., P. Maskova, D. Tarkowska, T. Masek, and H. Lipavska. 2017. Carbohydrates and gibberellins relationship in potato tuberization. *J. Plant Physiol.* 214: 53-63.
- Sonnevald, S. and U. Sonnewald. 2014. Regulation of potato tuber sprouting. *Planta* 239: 27-38.
- Suttle, J. C., L. L. Huckle, and E. C. Lulai. 2011. The effects of dormancy status on the endogenous contents and biological activities of jasmonic acid, N-(jasmonoyl)-isoleucine and tuberonic acid in potato tubers. *Am. J. Potato Res.* 88: 283-293.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. 3rd ed. Sinauer Associates, Inc. USA. 1338 p.
- Tanimoto, E. 2005. Regulation of root growth by plant hormones-roles for auxin and gibberellin. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24: 249-265.
- Teo C.-T., K. Takahashi, K. Shimizu, K. Shimamoto, and K. Taoka. 2017. Potato tuber induction is regulated by interactions between components of a tuberigen complex. *Plant Cell Physiol.* 58: 365-374.
- Trindade M. L, B. Horvath, C. Bachen, E. Jacobsen, and R. G. F. Visser. 2003. Isolation and functional characterization of a stolon specific promoter from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Gene* 303: 77-87.
- Van den Berg, J. H., E. E. Ewing, R. L. Plaisted, S. McMurry, and M. W. Bonierbale. 1996. QTL analysis of potato tuberization. *Theor. Appl. Genet.* 93: 307-316.
- Xu, X., D. Vreugdenhil and L. A. Van. 1998. Cell division and cell enlargement during potato tuber formation. *J. Bot.* 49: 573-582.