

EFECTO DE H₂O₂ EN LA TUBERIZACIÓN *in vitro* DE *Solanum tuberosum* L. DURANTE TRES SUBCULTIVOS

EFFECT OF H₂O₂ ON THE *in vitro* TUBERIZATION OF *Solanum tuberosum* L. THROUGH THREE SUBCULTURES

María E. Salazar-Laureles¹, Ramón M. Soto-Hernández^{1*}

¹Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Montecillos, Texcoco, México. (msoto@colpos.mx).

RESUMEN

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) está limitado en su producción por la falta de semilla sana, certificada y de buena calidad. La tuberización *in vitro* podría satisfacer esta necesidad. Los reguladores de crecimiento y moléculas como H₂O₂ se han usado para la inducción de microtubérculos. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del H₂O₂ como inductor de la microtuberización durante tres subcultivos. La hipótesis sugiere el efecto inductor del H₂O₂ en la tuberización *in vitro* de *S. tuberosum* en más de un subcultivo. El diseño experimental fue un factorial de 2×6×3, los factores principales fueron tratamiento con H₂O₂, días de observación y subcultivos; cada subcultivo tuvo 12 unidades experimentales con tres repeticiones por tratamiento. Explantes nodales de microplantas de papa se sumergieron en H₂O₂ 5 mM por 1 h, se colocaron en medio MS y se incubaron 30 d, este fue el primer subcultivo. Parte de las microplantas de este subcultivo se transfirieron a medio de tuberización y la otra parte se subcultivó dos veces. El primer subcultivo se sumergió en H₂O₂. El efecto inductor del H₂O₂ se observó en la microtuberización de los tres subcultivos. El H₂O₂ estimuló la tuberización *in vitro* en los días de observación y los tres subcultivos. El número mayor de microtubérculos (MT) se registró en el subcultivo II, respecto a I y III; no obstante, el efecto inductor del H₂O₂ se observó en los tres subcultivos. La correlación entre el peso y tamaño de los MT fue positiva ($r^2=0.63$) y 64% de los MT brotaron antes de la cosecha. El H₂O₂ podría incluirse en sistemas de producción intensivos de MT.

Palabras clave: microtuberización, papa, peróxido de hidrógeno, biotecnología.

ABSTRACT

The production of potato crops (*Solanum tuberosum* L.) is limited by the lack of healthy, certified, and good quality seed. *In vitro* tuberization could satisfy this need. Growth regulators and molecules such as H₂O₂ have been used to induce microtubers. The objective of this investigation was to evaluate the effect of H₂O₂ as inducer of microtuberization in three subcultures. The hypothesis suggests H₂O₂ has an inducing effect on the *in vitro* tuberization of *S. tuberosum* in more than one subculture. The experimental design was a 2×6×3 factorial design, in which the main factors were: H₂O₂ treatment, observation days, and subcultures; each subculture had 12 experimental units with three replicates per treatment. Nodal explants of potato microplants were immersed in 5 mM of H₂O₂ for 1 h, and then they were incubated in a MS medium, during 30 d: this was the first subculture. One part of the microplants of this subculture were transferred to a tuberization medium, and another part was subcultured twice. The first subculture was submerged in H₂O₂. The inducing effect of H₂O₂ was observed in the microtuberization of the three subcultures. H₂O₂ stimulated the *in vitro* tuberization in the three subcultures during the observation days. The largest number of microtubers (MT) was recorded in subculture II; however, the inducing effect of H₂O₂ was observed in all three subcultures. The correlation between the weight and size of MT was positive ($r^2=0.63$) and 64% of MT sprouted before the harvest. H₂O₂ could be included in MT intensive production systems.

Keywords: Microtuberization, potato, hydrogen peroxide, biotechnology.

INTRODUCTION

Biotechnology allows the quick and efficient production of globally important crops such as potatoes (*Solanum tuberosum* L.), and in Mexico, potato is appreciated for its availability throughout the year, price, and nutritional value. The continuous growth of world population demands the

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: marzo, 2018. Aprobado: noviembre, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 53: 1233-1245, 2019.

INTRODUCCIÓN

La biotecnología permite la producción rápida y eficiente de cultivos de importancia mundial como la papa (*Solanum tuberosum* L.), y en México la papa se aprecia por su disponibilidad durante el año, precio y valor nutricional. El incremento constante de la población global exige aumentar la producción y proveer al mercado tubérculos sanos, inocuos y de buena calidad. La tuberización *in vitro* o microtuberización ha cobrado importancia por las ventajas de manejo, producción y embalaje de semillas sanas. Los reguladores vegetales y las moléculas, como H_2O_2 , favorecen este proceso y se utilizan para incrementar la producción.

El H_2O_2 es una molécula oxidante, como otras especies reactivas de oxígeno (ERO) en las células de las plantas; como otros oxidantes, se produce naturalmente debido a reacciones celulares de óxido-reducción, en respuesta a interacciones con el ambiente. Su producción aumenta con el estrés biótico y abiótico y, por su naturaleza química, es potencialmente dañina en concentraciones elevadas. Foyer y Noctor (2005) señalaron que el H_2O_2 es una molécula señal, que actúa como segundo mensajero en procesos asociados durante el crecimiento y desarrollo de las plantas (Foreman *et al.*, 2003; Mittler *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2012).

El H_2O_2 se identificó como molécula inductora de la tuberización (Mani *et al.*, 2012) y de la microtuberización en papa (Sánchez-Rojo y López-Delgado, 2010; López-Delgado *et al.*, 2012). Además, López-Delgado *et al.* (2012) señalaron el potencial de inducción del H_2O_2 a largo plazo durante 30 d de crecimiento, después de la inmersión de los explantes por 1 h en concentraciones de 1, 5 y 50 mM y subcultivo posterior en medio de tuberización. Estos autores observaron que 1 y 5 mM de H_2O_2 en dos temperaturas y oscuridad incrementaron el porcentaje de microtuberización, el peso de microtubérculos (MT) y la brotación, respecto al testigo.

Además, el H_2O_2 se asoció con la respuesta de tolerancia a estrés biótico (Romero-Romero y López-Delgado, 2009, Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2012), abiótico en papa (Mora-Herrera *et al.*, 2005), al incremento en el número de tubérculos, diámetro del tallo y contenido de almidón y de lignina (López-Delgado *et al.*, 2005) y al crecimiento de raíces en papa (Deng *et al.*, 2012).

increase of production, and the supply of healthy, innocuous, and good quality tubers to the market. *In vitro* tuberization or microtuberization has gained importance, due to the advantages provided by the handling, production and packaging of healthy seeds. Plant regulators and molecules (such as H_2O_2) favor this process and are used to increase production.

H_2O_2 is an oxidant molecule which —like other reactive oxygen species (ROS)— can be found in plant cells; just as other oxidants, it occurs naturally, as a result of cellular oxidation-reduction reactions, in response to interactions with the environment. Its production increases with biotic and abiotic stress and, because of its chemical nature, it is potentially harmful at high concentrations. Foyer and Noctor (2005) pointed out H_2O_2 is a signal molecule, which acts as a second messenger in associated processes during the growth and development of plants (Foreman *et al.*, 2003; Mittler *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2012).

H_2O_2 was identified as a molecule that induces tuberization (Mani *et al.*, 2012) and microtuberization in potato (Sánchez-Rojo and López-Delgado, 2010; López-Delgado *et al.*, 2012). Besides, López-Delgado *et al.* (2012) reported the long-term induction potential of H_2O_2 during 30 d of growth, after the explants were immersed for 1 h at 1, 5, and 50 mM concentrations, and subsequent subculture in a tuberization medium. The authors observed that 1 and 5 mM of H_2O_2 at two temperatures and darkness increased the microtuberization percentage, the weight of microtubers (MT), and the sprouting, with respect to the control.

In potatoes, H_2O_2 was also associated with: tolerance response to biotic stress (Romero-Romero and López-Delgado; 2009, Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2012), abiotic stress (Mora-Herrera *et al.*, 2005), increase in the number of tubers, stem diameter, and starch and lignin content (López-Delgado *et al.*, 2005), and root growth (Deng *et al.*, 2012).

H_2O_2 is mobilized between cellular compartments through aquaporins (Bienert *et al.*, 2007), it is related to salicylic acid (AS) in several physiological processes in plants and acts as a second messenger (An and Mou, 2011). Its participation is probably similar to AS', since it takes part in the O_2 transfer reaction during the synthesis of cinnamic acid, which is a precursor of AS (Gilbert *et al.*, 2004); in this interaction, it could act in the signal transduction, in low concentrations, from the moment it crosses the cell membranes.

La movilización del H₂O₂ entre compartimentos de la célula es mediante las acuaporinas (Bienert *et al.*, 2007), está relacionado con el ácido salicílico (AS) en varios procesos fisiológicos en plantas y actúa como segundo mensajero (An y Mou, 2011). Su participación es probable que sea similar a AS, ya que interviene en la reacción de transferencia de O₂ en la síntesis del ácido cinámico, que es un precursor de AS (Gilbert *et al.*, 2004); en esa interacción podría actuar en la transducción de señales, en concentraciones bajas, desde que atraviesa las membranas celulares.

En la tuberización *in vitro* de *S. tuberosum* participan: fotoperiodo, cantidad de sacarosa y otras condiciones del medio de cultivo como los reguladores de crecimiento, inhibidores de las giberelinas (Sadder y Suwwan, 2004; Ghavidel *et al.*, 2012), temperatura (Kolachevskaya *et al.*, 2015) e interacción de señales endógenas y ambientales (Ferreira *et al.*, 2010). Los reguladores del crecimiento son determinantes para la tuberización. La citocinina benzil amino purina (BAP) estimula la microtuberización y participa en la emisión y crecimiento de brotes (Ghavidel *et al.*, 2012; Roumeliotis *et al.*, 2012; Pasare *et al.*, 2013; El Dessoky *et al.*, 2015). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto inductor del H₂O₂ en la tuberización *in vitro* de *S. tuberosum* hasta el tercer subcultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El estudio incluyó microplantas de papa libres de virus, del clon 981819, del banco de germoplasma *in vitro* del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, campus Metepec, México. Con las microplantas de 30 d de edad se obtuvieron explantes nodales, que se plantaron en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con 1 mg L⁻¹ ácido giberélico (GA₃), sacarosa 3% (P/V) y *phytagel* (2.25 g L⁻¹), como gelificante (Espinoza *et al.*, 1986). Los explantes se mantuvieron a 20±1 °C, con fotoperiodo de 16 h con fuente fluorescente (35 μmol m⁻² s⁻¹, 400-700 nm).

Inducción de la tuberización *in vitro*

Explantes nodales sin hoja, aislados de microplantas de 30 d de edad, se mantuvieron inmersos por 1 h en H₂O₂ 5 mM pH 5.6, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se plantaron en el medio MS donde se mantuvieron 30 d. Los explantes testigo se sumergieron en agua destilada estéril al mismo pH. Setenta micro-

Factors which are involved in the *in vitro* tuberization of *S. tuberosum* include: photoperiod, quantity of sucrose, and other conditions of the culture medium—for instance, growth regulators, gibberellin inhibitors (Sadder and Suwwan, 2004; Ghavidel *et al.*, 2012), temperature (Kolachevskaya *et al.*, 2015), and interaction of endogenous and environmental signals (Ferreira *et al.*, 2010). The growth regulators are determinants for tuberization. Cytokinin benzylaminopurine (BAP) stimulates microtuberization and participates in the production and growth of sprouts (Ghavidel *et al.*, 2012; Roumeliotis *et al.*, 2012; Pasare *et al.*, 2013; El Dessoky *et al.*, 2015). The objective of this research was to evaluate the inducing effect of H₂O₂ on the *in vitro* tuberization of *S. tuberosum* up to the third subculture.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The study included virus-free potato microplants (clone 981819) from the *in vitro* germplasm bank of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, campus Metepec, Mexico. Nodal explants obtained from 30 days old microplants were planted in a MS culture medium (Murashige and Skoog, 1962) with 1 mg L⁻¹ gibberellic acid (GA₃), 3% sucrose (W/V), and *phytagel* (2.25 g L⁻¹) as a gelling agent (Espinoza *et al.*, 1986). The explants were kept at 20±1 °C, for a 16 h-photoperiod with fluorescent source (35 μmol m⁻² s⁻¹, 400-700 nm).

Induction of *in vitro* tuberization

Nodal explants without leaves, isolated from 30 d old microplants, were immersed for 1 h in H₂O₂ (5 mM, pH 5.6), rinsed three times with sterile distilled water, and planted in the MS medium where they were kept 30 d. The control explants were immersed in sterile distilled water with the same pH. Seventy microplants were obtained from each treatment. After 30 d, 12 microplants per replicate were obtained from each treatment. Those rootless microplants were individually subcultured in a tuberization medium within glass tubes (CIP, 1988) with MS salts, 80% sucrose (W/V), 5 mg L⁻¹ BAP, and 4.5 g L⁻¹ *phytagel*. In order to induce microtuberization, the microplants were kept for 15 d under lighting and afterwards in darkness. Two subcultures of nodal explants were developed with the remaining microplants of this first subculture. The microtuberization induction in these

plantas se obtuvieron de cada tratamiento. Después de los 30 d, se obtuvieron 12 microplantas, por repetición, de cada tratamiento; sin raíz y subcultivadas individualmente en tubos de vidrio con medio de tuberización (CIP, 1988) con sales MS, sacarosa 80% (P/V), BAP 5 mg L⁻¹ y *phytagel* 4.5 g L⁻¹. Las microplantas se mantuvieron 15 d con iluminación y luego en oscuridad, para inducir la microtuberización. Con las demás microplantas de este primer subcultivo se hicieron dos subcultivos de explantes nodales. El seguimiento para inducir la microtuberización en estos subcultivos fue similar al primero y únicamente cuando se estableció el primer subcultivo, los explantes se sumergieron en el H₂O₂.

Los MT se cosecharon 60 d después de que las microplantas estuvieron en medio de inducción de microtuberización y en oscuridad. Todos los MT que no brotaron en el tubo, se subcultivaron en medio MS con AG₃ (0.05 mg L⁻¹) (López-Delgado *et al.*, 2012) y mantuvieron con luz difusa para inducir la brotación.

Variables evaluadas

El número de MT se registró durante la inducción de la tuberización *in vitro* cada 10 d por 2 meses. Al finalizar, se contabilizó el número total de MT y se registró el peso, tamaño, y porcentaje de brotación *in situ*. Los MT que no brotaron en el tubo se mantuvieron 120 d más para registrar la brotación.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue un factorial 2×6×3, los factores principales fueron el tratamiento con H₂O₂, los días de observación y los subcultivos. Cada subcultivo tuvo 12 unidades experimentales con tres repeticiones por tratamiento. Los resultados se analizaron con un ANDEVA y SAS 9.0 (SAS, 2004). El modelo fue:

$$Y_{ijkl} : \mu + \zeta_i + \gamma_j + \tau_k + \zeta^* \gamma_{ij} + g^* \tau_{jk} + z^* \tau_{ik} + z^* g^* \tau_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde, Y_{ijkl} : variable respuesta (formación de MT), m : media general. Los efectos principales fueron: ζ_i : efecto del i -ésimo tratamiento (H₂O₂ 5 mM y testigo), γ_j : efecto principal de los días de observación (j : 10, 20, 30...60), τ_k : efecto del k -ésimo subcultivo (k : 1,2,3), las interacciones, ε_{ijkl} : el error experimental.

La comparación de medias de los efectos principales se obtuvo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Peso y tamaño de los MT se examinaron con la prueba de rango múltiple de Duncan. El análisis de correlación lineal simple entre ambas variables cuantitativas se desarrolló y el porcentaje de brotación de los MT *in situ* (en el tubo) se cuantificó y se observó solo la brotación de los MT que no brotaron en el tubo.

subcultures was similar to the first one. Only when the first subculture was established, the explants were submerged in H₂O₂.

The MT were harvested, sixty days after the microplants had been left in the dark, within the microtuberization induction medium. All the MT that did not sprout in the tube were subcultured in a MS medium with AG₃ (0.05 mg L⁻¹) (López-Delgado *et al.*, 2012); in order to induce sprouting, they were kept under a diffuse light.

Variables evaluated

During the induction of *in vitro* tuberization, the number of MT was recorded every 10 d for 2 months. At the end, the total number of MT, as well as the *in-situ* weight, size, and percentage of sprouting were documented. Those MT that did not sprout in the tube were kept 120 d more in order to register the sprouting.

Statistical analysis

The experimental design was a 2'6×3 factorial, the main factors were H₂O₂ treatment, observation days, and subcultures. Each subculture had 12 experimental units with three replicates per treatment. The results were analyzed with ANOVA and SAS [9.0] (SAS, 2004). The model was:

$$Y_{ijkl} : \mu + \zeta_i + \gamma_j + \tau_k + \zeta^* \gamma_{ij} + g^* \tau_{jk} + z^* \tau_{ik} + z^* g^* \tau_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

where: Y_{ijkl} : response variable (formation of MT), m : general mean. The main effects were: ζ_i : effect of the i -th treatment (5 mM of H₂O₂ and control), γ_j : main effect of observation days (j : 10, 20, 30 ... 60), τ_k : effect of the k -th subculture (k : 1,2,3), the interactions, ε_{ijkl} : experimental error.

The mean comparison of the main effects was obtained with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The weight and size of MT were examined with Duncan's multiple range test. The simple linear correlation analysis between two quantitative variables was developed and the sprouting percentage of MT *in situ* (in the tube) was quantified. Only the sprouting of those MT that did not sprout in the tube was observed.

RESULTS AND DISCUSSION

Induction of *in vitro* tuberization

The effect of H₂O₂ on the induction of microtuberization was confirmed in the three subcultures. Sánchez-Rojo and López-Delgado (2010) and López-Delgado *et al.* (2012) demonstrated the

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de la tuberización *in vitro*

El efecto del H₂O₂ en la inducción de la microtuberización se confirmó en tres subcultivos. Sánchez-Rojo y López-Delgado (2010) y López-Delgado *et al.* (2012) demostraron la capacidad inductora en *S. tuberosum*. cv. Atlantic. El efecto del H₂O₂ se evaluó por 30 d, correspondientes a un subcultivo. En nuestro estudio se demostró la capacidad inductora del H₂O₂ en la microtuberización hasta el tercer subcultivo.

En los efectos simples (los tratamientos, los días de observación y los subcultivos) se observaron diferencias y la interacción entre los tratamientos y los subcultivos fue significativa ($p \leq 0.05$). El efecto inductor del H₂O₂ en la microtuberización se confirmó con el número de MT producido por microplanta tratada con H₂O₂; en los tres subcultivos superó significativamente al testigo (Cuadro 1 y Figura 1).

Los MT variaron en el tiempo. Los subcultivos primero y tercero produjeron 13 y 10.66 MT y el se-

inducing capacity in *S. tuberosum*. cv. Atlantic. The effect of H₂O₂ was evaluated for 30 d, corresponding to one subculture. In our study, the inducing capacity of H₂O₂ in microtuberization was demonstrated up to the third subculture.

In the simple effects (treatments, observation days, and subcultures) there were differences and the interaction between treatments and subcultures was significant ($p \leq 0.05$). The inducing effect of H₂O₂ on the microtuberization was confirmed based on the number of MT produced by each microplant treated with H₂O₂; in all three subcultures, the control was significantly surpassed (Table 1 and Figure 1).

The MT varied over time. The first and third subcultures produced 13 and 10.66 MT, and the second 18.33 MT. In the three subcultures, the H₂O₂ treatment produced more MT at 60 d (Figure 2). At the time of the harvest, 7 of the 12 control microplants had developed microtubers. However, when H₂O₂ was used, 9.3 microplants developed microtubers, which confirmed its inducing capacity.

Cuadro 1. Comparación de medias de los efectos simples, tratamientos, días de observación y subcultivos, del número promedio de MT producidos por microplanta.

Table 1. Comparison of the means of the simple effects—treatments, observation days, and subcultures—of the average number of MT produced per microplant.

		Microtuberización (Número de MT)
Tratamientos		
	H ₂ O ₂	0.8518 a
	Testigo	0.5246 b
Días de observación		
	60	0.9537 a
	50	0.7916 ab
	40	0.7500 bc
	30	0.6342 bc
	20	0.5879 cd
	10	0.4120 d
Subcultivos		
	I	0.6250 b
	II	0.8263 a
	III	0.6134 b

Medias con letra distinta en una hilera son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$), $n=3$. ❖ Means with different letter in a row are statistically different (Tukey, $p \leq 0.05$), $n=3$.

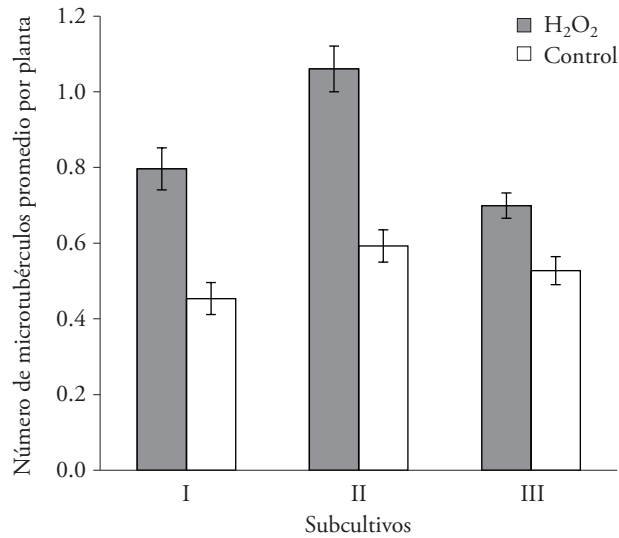


Figura 1. Microtubérculos producidos por microplanta en cada subcultivo con el tratamiento H₂O₂ 5 mM y el testigo respectivo. Los datos representan las medias de tres repeticiones por subcultivo. (Tukey, p≤0.05).

Figure 1. Microtubers produced per microplant in each subculture with the 5 mM of H₂O₂ treatment and the respective control. The data represent the means of three replicates per subculture. (Tukey, p≤0.05).

gundo 18.33 MT. En los tres subcultivos el tratamiento con H₂O₂ produjo más MT a los 60 d (Figura 2). En la cosecha, siete de las 12 microplantas del testigo microtuberizaron. Pero con H₂O₂, microtuberizaron 9.3, lo que confirmó su capacidad inductora.

Las diferencias indicaron que la presencia de H₂O₂ 5 mM estimuló la tuberización *in vitro*, en el tiempo y en los tres subcultivos. Estos resultados coinciden con los de Sánchez-Rojo y López-Delgado (2010),

The differences indicated that the presence of 5 mM of H₂O₂ stimulated *in vitro* tuberization in the three subcultures. These results match those of Sánchez-Rojo and López-Delgado (2010), who observed the physiological effect of 1 and 50 mM of H₂O₂ in the induction of microtuberization; this effect may be the consequence of genotype or temperature. Mani *et al.* (2012) evaluated the effect of H₂O₂ on the tuberization of cv. Spunta, and they

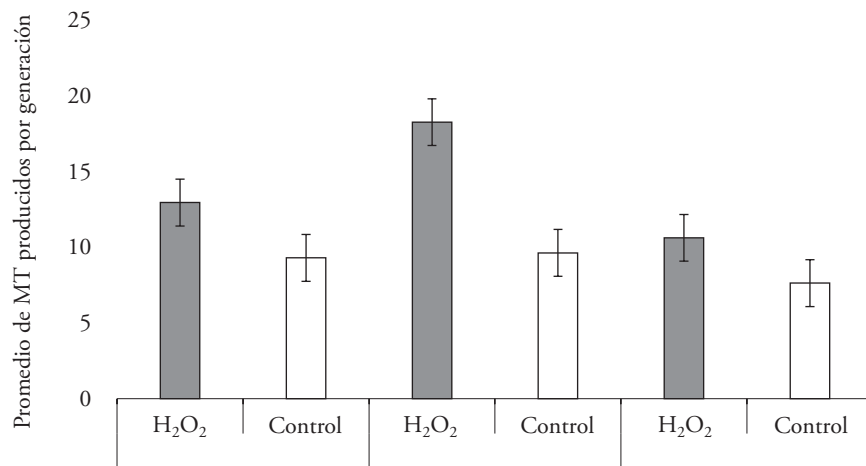


Figura 2. Microtubérculos producidos en 60 d, por subcultivo en presencia de H₂O₂ 5 mM y el control respectivo (Tukey, p≤0.05; n=3).

Figure 2. Microtubers produced after 60 d per subculture in the presence of 5 mM of H₂O₂ and the respective control (Tukey, p≤0.05), n=3.

quienes observaron efecto fisiológico de H₂O₂ 1 y 50 mM en la inducción de la microtuberización; la respuesta puede deberse al genotipo o a la temperatura. Mani *et al.* (2012) evaluaron el efecto del H₂O₂ en la tuberización del cv. Spunta, y encontraron que 40 mM de H₂O₂ favorecieron el rendimiento del cultivo, pero no superaron al testigo y concentraciones mayores afectaron negativamente las plantas.

El incremento en el número de MT, en las microplantas tratadas con H₂O₂, respecto al testigo en los tres subcultivos, pudo deberse a que la molécula es reconocida como un segundo mensajero en procesos asociados con el crecimiento y desarrollo de las plantas (Foreman *et al.*, 2003; Foyer y Noctor, 2005). Al respecto, una de las principales rutas por las que las plantas transmiten información es la vía de producción de superóxido en la membrana plasmática (Doke *et al.*, 1994; Schoper, 1996, Bienert *et al.*, 2007). Además, el H₂O₂ pudo haber actuado en sinergia con la BAP en el medio de tuberización. Wilson-García *et al.* (2008) señalaron la asociación similar de BAP y H₂O₂ al evaluar el efecto de la citoquinina en el crecimiento y senescencia de *Dactylis glomerata* L.

Correlación del peso y tamaño de los MT

El peso y tamaño promedio de MT por subcultivo mostraron diferencias significativas con H₂O₂ 5 mM y el testigo (Cuadro 2). En el tratamiento con H₂O₂ el subcultivo I presentó los valores mayores en ambas variables y el subcultivo II mostró los valores menores, pero ambos fueron superiores a los otros subcultivos (Figura 1). El testigo mostró que la producción menor de MT generó tamaño y peso mayores. En ambos casos la correlación entre ambas variables fue positiva.

observed that 40 mM of H₂O₂ favored crop yield, but did not surpass control's; meanwhile, higher concentrations had a negative impact on the plants.

The increase in the number of MT in microplants treated with H₂O₂ compared to the control in the three subcultures— could be the result of the molecule being recognized as a second messenger in processes associated with plant growth and development (Foreman *et al.*, 2003; Foyer and Noctor, 2005). In this regard, one of the main ways in which plants transmit information is the production of superoxide in the plasma membrane (Doke *et al.*, 1994, Schoper, 1996, Bienert *et al.*, 2007). In addition, H₂O₂ likely acted in synergy with the BAP in the tuberization medium. Wilson-García *et al.* (2008) reported a similar association between BAP and H₂O₂, when they evaluated the effect of cytokinin on the growth and senescence of *Dactylis glomerata* L.

Correlation of weight and size of MT

The average weight and size of MT per subculture showed significant differences with 5 mM of H₂O₂, and the control (Table 2). In the H₂O₂ treatment, subculture I had the highest values in both variables, while subculture II showed the lowest values; however, both were higher than the other subcultures (Figure 1). The control showed that the lower production of MT generated larger size and weight. In both cases, the correlation between both variables was positive.

The size and weight are variables that evaluate the production of MT and depend on factors such as the amount of sucrose, growth regulators, and anti-gibberellics compounds (Hoque, 2010). The size

Cuadro 2. Comparación de medias del peso y longitud de los MT producidos en tres subcultivos (n=3).

Table 2. Comparison of the mean weight and length of MT produced in three subcultures (n=3).

Subcultivo	H ₂ O ₂ (5 mM)		Testigo	
	Peso (mg)	Tamaño (cm)	Peso (mg)	Tamaño (cm)
I	82.37 a	0.68 a	59.52 b	0.49 b
II	63.97 b	0.52 b	60.42 a	0.51 a
III	65.97 b	0.56 b	63.39 a	0.53 a

Medias con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Duncan, $p \leq 0.05$). ❖ Means with different letters in the columns are statistically different (Duncan, $p \leq 0.05$).

El tamaño y peso son variables que evalúan la producción de MT y dependen de factores como la cantidad de sacarosa, reguladores del crecimiento y compuestos antigibérelcos (Hoque, 2010). El tamaño y peso de los MT coincidieron con los reportados por Sadler y Suwvan, (2004) y Uranbey *et al.* (2004). Ellos observaron que aunque la morfología y el proceso de división y alargamiento celular de la tuberización *in vitro* es similar a la condición natural, en la primera el crecimiento se detiene cuando MT alcanza diámetro aproximado de 0.8 cm; lo que explica el nombre de MT y tamaño promedio que puede lograr. El tamaño y peso en el primer subcultivo se explica por la actividad mayor del H₂O₂ en el citoplasma celular, pues su vida molecular media es corta (Foyer *et al.*, 1997). Además, la inmersión de los explantes en H₂O₂ pudo activar señales durante los subcultivos, ya que, la producción continuó y el tamaño y peso de los MT fue proporcional en prácticamente tres subcultivos (Figura 3).

La presencia de BAP y la concentración de sacarosa en el medio de tuberización (CIP; 1988) probablemente contribuyeron a la correlación estrecha entre el peso y tamaño de los MT; BAP es una de las principales hormonas que estimula la tuberización *in vitro* (Ghavidel *et al.*, 2012; Joseph *et al.*, 2015) y funciona en la emisión y crecimiento de brotes (Wilson-García *et al.*, 2008; El Dessoky *et al.*, 2015). La disponibilidad de sacarosa en el medio de cultivo promueve la brotación y posiblemente actúa como molécula

and weight of MT coincided with those reported by Sadler and Suwvan (2004) and Uranbey *et al.* (2004). They observed that —although the morphology and the cell division and lengthening process of the *in vitro* tuberization are similar to those under natural conditions— in the first case growth stops when MT reaches an approximate diameter of 0.8 cm —which explains the name of MT and the average size that can be achieved. The greater activity of H₂O₂ —which has a short average molecular life— is short in the cellular cytoplasm accounts for the size and weight in the first subculture (Foyer *et al.*, 1997). In addition, the immersion of the explants in H₂O₂ could have activated signals during the subcultures, since the production continued and the size and weight of MT were proportional in practically all three subcultures (Figure 3).

The presence of BAP and the concentration of sucrose in the tuberization medium (CIP, 1988) probably contributed to the close correlation between the weight and size of MT; BAP is a major hormone that stimulates *in vitro* tuberization (Ghavidel *et al.*, 2012; Joseph *et al.*, 2015) and influences the emission and growth of sprouts (Wilson-García *et al.*, 2008; El Dessoky *et al.*, 2015). The availability of sucrose in the culture medium promotes sprouting and possibly acts as a signal molecule (Perl *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 2010) and as a nutrient, because it is a primary source of C for

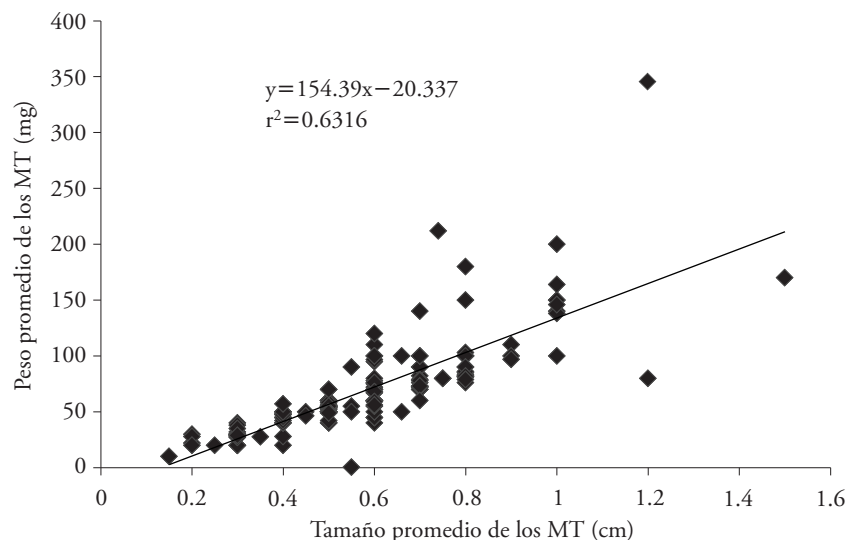


Figura 3. Correlación entre peso y tamaño de MT producidos usando tres subcultivos (Duncan, $p \leq 0.05$).

Figure 3. Correlation between weight and size of the MT produced using three subcultures (Duncan, $p \leq 0.05$).

señal (Perl *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 2010) y como nutriente, ya que es fuente primaria de C para las microplantas (Gopal *et al.*, 2004; Aafia e Iqbal, 2010). La concentración de azúcar en el medio de inducción provee condición osmótica favorable para el desarrollo de MT (Sadder y Suwwan, 2004; Sabba *et al.*, 2007; Sonnewald y Sonnewald, 2014; Joseph *et al.*, 2015). Además, Ozaki *et al.* (2008) demostraron que H₂O₂ 20 mM, considerada una concentración baja, actuó como molécula señal para la síntesis y asimilación de azúcares solubles en plantas de melón de tres meses y aumentó su contenido en hojas y frutos. El H₂O₂ en los explantes durante la inmersión pudo favorecer la entrada posterior de la sacarosa del medio de inducción de la tuberización.

El tamaño y peso de MT son importantes en un sistema de producción; para beneficiar estas características deba regularse la concentración de BAP y sacarosa, el tiempo de inmersión de los explantes en H₂O₂, su concentración y evaluar otros cultivares.

Brotación de los MT

Los MT se cosecharon a los 60 d, en la cosecha los del tratamiento con H₂O₂ 5 mM y el testigo presentaron más de 50% de brotación (Figura 4). En ambos casos los brotes fueron alargados y frágiles (Figura 5), aunque más notorio con H₂O₂. Esto

microplants (Gopal *et al.*, 2004; Aafia and Iqbal, 2010). The concentration of sugar in the induction medium establishes favorable osmotic conditions for the development of MT (Sadder and Suwwan, 2004; Sabba *et al.*, 2007; Sonnewald and Sonnewald, 2014; Joseph *et al.*, 2015). Furthermore, Ozaki *et al.* (2008) showed that a low concentration (20 mM) of H₂O₂ acted as a signal molecule for the synthesis and assimilation of soluble sugars in 3 months old melon plants and increased their content in leaves and fruits. The H₂O₂ in the explants during the immersion likely favored the subsequent entry of sucrose from the tuberization induction medium.

The size and weight of MT are important in a production system. In order to take advantage of these characteristics, the following aspects should be taken into account: the regulation of the concentration of BAP and sucrose; the time that the explants are immersed in H₂O₂; their concentration; and the evaluation of other cultivars.

Sprouting of MT

The MT were harvested at 60 d, MT with 5 mM of H₂O₂ and the control had more than 50% sprouting (Figure 4). In both cases, the sprouts were elongated and fragile (Figure 5), although this phenomenon were more noticeable with H₂O₂. This indicates that

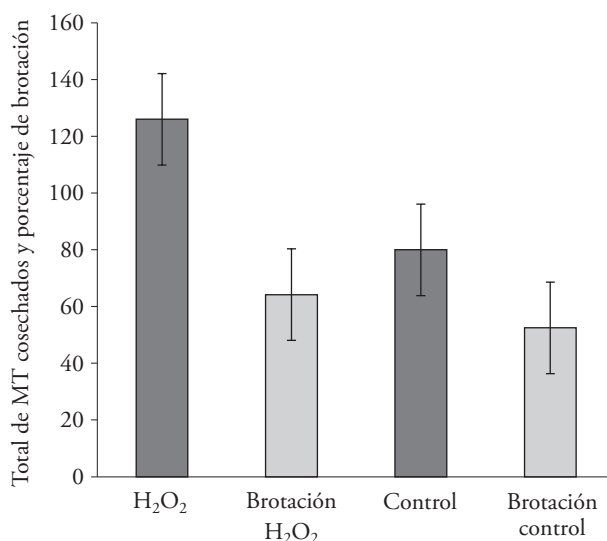


Figura 4. Porcentaje de brotación promedio registrado en la cosecha (60 d), respecto al total de MT cosechados en tres subcultivos.

Figure 4. Average sprouting percentage registered during the harvest (60 d), in relation to the total MT harvested from three subcultures.

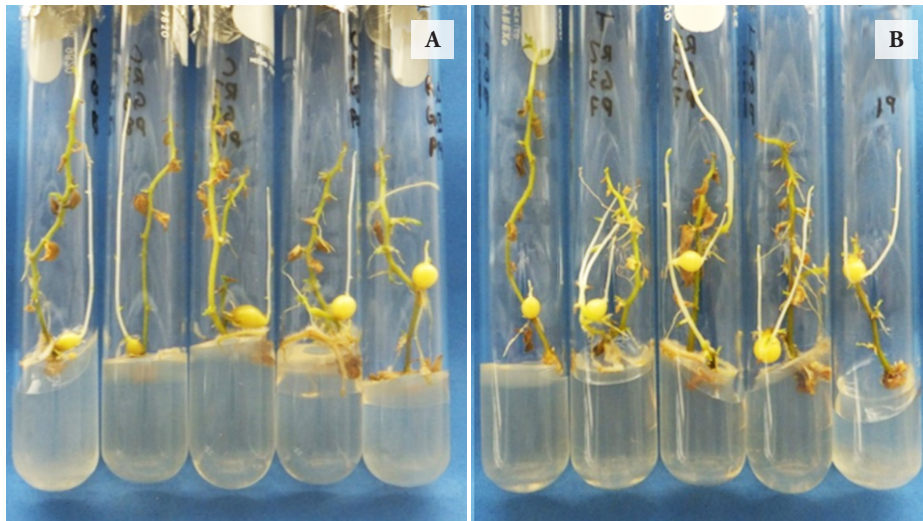


Figura 5. Brotación *in situ* de MT cosechados a los 60 d en medio de tuberización. A: Testigo; B: H_2O_2 5 mM.

Figure 5. *In situ* sprouting of MT harvested at 60 d in the tuberization medium. A: Control; B: 5 mM of H_2O_2 .

indica que los primeros MT que se formaron y permanecieron más tiempo en la oscuridad, brotaron en el tubo; este fenómeno se documentó cuando los tubérculos se almacenaron en oscuridad (INIA, 2009; CIP- INIAP, 2011).

La brotación de los MT *in situ*, como en esta investigación, es indeseable, pero indica la capacidad de los MT para generar plantas nuevas y su cosecha puede realizarse en menos tiempo. La brotación de los MT *in situ* pudo deberse a la temperatura (20 ± 1 °C) en la etapa de inducción de la microtuberización y disponibilidad de BAP (Ghavidel *et al.*, 2012; Joseph *et al.*, 2015) y sacarosa (Gopal *et al.*, 2004; Aafia e Iqbal, 2010; Ferreira *et al.*, 2010), ya que favorecen esta respuesta fisiológica; el periodo de oscuridad en el que los MT permanecieron hasta la cosecha y probablemente al H_2O_2 . Este pudo actuar como molécula señal que ocasionó acumulación y almacenamiento de proteínas para coordinar cambios metabólicos y transcripcionales que favorecen la brotación de MT (Kloosterman *et al.*, 2008; Ozaki *et al.*, 2008; Sonnewald y Sonnewald, 2014). También, el H_2O_2 pudo limitar la actividad meristemática que por lo general coincide con el inicio de la latencia (Joseph *et al.*, 2015). Estos resultados permitieron determinar que el periodo para la producción de tubérculos *in vitro* puede ser menor respecto a la producción convencional, lo que podría beneficiar un sistema de producción intensivo de MT de papa.

the first MTs that grew and remained more time in the dark sprouted in the tube; this phenomenon was documented when the tubers were stored in darkness (INIA, 2009, CIP-INIAP, 2011).

In the case of this research, the *in situ* sprouting of MT is undesirable; however, it indicates that MT are capable of generating new plants, and it shows that they can be harvested at an earlier date. The *in situ* sprouting of MT might be due to the temperature (20 ± 1 °C) during the induction of microtuberization and the availability of BAP (Ghavidel *et al.*, 2012; Joseph *et al.*, 2015) and sucrose (Gopal *et al.*, 2004; Aafia and Iqbal, 2010; Ferreira *et al.*, 2010), which favor this physiological response; the period that MT remained in darkness until harvest; and probably H_2O_2 . This could act as a signal molecule that caused protein accumulation and storage to coordinate metabolic and transcriptional changes that favor the sprouting of MT (Kloosterman *et al.*, 2008; Ozaki *et al.*, 2008; Sonnewald and Sonnewald, 2014). Additionally, H_2O_2 likely limited meristematic activity, which generally coincides with the beginning of the latency period (Joseph *et al.*, 2015). Based on these results, it was established that the period for the *in vitro* production of tubers can be shorter than in conventional production. This could be advantageous for an intensive potato MT production system.

Los MT que no brotaron *in situ* se cosecharon y sembraron en medio MS, con una concentración baja de AG₃, para promover la brotación que ocurrió entre 50 a 120 d. Estos resultados difirieron de los reportados por Sánchez-Rojo y López-Delgado (2012), quienes obtuvieron 50 a 70% de brotación en los MT tratados con 1 y 5 mM de H₂O₂, 20 d después de permanecer en el medio de inducción de la brotación. La diferencia en el tiempo de brotación pudo deberse a los genotipos diferentes. En este estudio, el tiempo prolongado para la brotación se debió al tamaño variable de los MT, los de mayor tamaño tardaron más en brotar, pero los brotes fueron cortos, verdes y vigorosos; los de tamaño menor ya habían brotado y formado raíz a los 50 d, pero parecían menos vigorosos.

La brotación de los MT es un proceso fisiológico que se manifiesta después del periodo de reposo; en la mayoría de los cultivares de papa varía entre 1 y 6 meses, en dependencia del cultivar y otros factores (Alonso, 1996). El H₂O₂ afecta la brotación de MT de papa y el efecto está relacionado con la temperatura a la que se realice la inducción de la microtuberización (Sánchez-Rojo y López-Delgado, 2012). Thieme (1992) sugirió que temperaturas bajas durante la formación de MT pueden extender significativamente la latencia. Este efecto lo comprobamos en esta investigación, pues 90% de los MT transferidos al medio de inducción, para la brotación, después de la cosecha presentaron latencia de 50 a 120 d cuando se mantuvieron entre 8 y 10 °C durante la formación de los MT.

CONCLUSIONES

El efecto inductor de H₂O₂ en la tuberización *in vitro* de *S. tuberosum* se confirmó en un genotipo diferente a los probados previamente y el efecto persistió hasta el tercer subcultivo. El H₂O₂ en el pretratamiento de explantes, en sistemas de producción intensivos de papa, es una opción porque en concentraciones bajas es inocuo, su costo es bajo, su manipulación es segura y su efecto es de largo plazo en la producción de MT.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través del Colegio de Postgraduados y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias de

The MT that did not sprout *in situ* were harvested and planted in a MS medium with low AG₃ concentration; they sprouted between 50 to 120 d later. The results differed from those reported by Sánchez-Rojo and López-Delgado (2012) who recorded 50-70 % sprouting in MT treated with 1 and 5 mM of H₂O₂, 20 days after they were placed in a sprouting induction medium. The difference in sprouting time could be the result of different genotypes. In this study, the lengthy sprouting time was caused by the variable size of MT: the larger ones took longer to sprout, but their sprouts were short, green, and vigorous; the smaller ones had already sprouted and grown root at 50 d, but they looked less vigorous.

The sprouting of MT is a physiological process that becomes evident after the resting period; depending on the cultivar and other factors, this occurs between the first and the sixth month, in most of potato cultivars (Alonso, 1996). The H₂O₂ affects the sprouting of potato MT, and this effect is related to the temperature at which microtuberization was induced (Sánchez-Rojo and López-Delgado, 2012). Thieme (1992) suggested that low temperatures during MT formation can significantly extend latency. This research verified this effect: 90% of MT transferred to the induction medium for sprouting had a 50-120 days latency after the harvest; this was the case when the temperature for MT in formation was kept at 8 to 10 °C.

CONCLUSIONS

The inducing effect of H₂O₂ on the *in vitro* tuberization of *S. tuberosum* was confirmed in a genotype not previously tested, and the effect persisted up to the third subculture. In the pretreatment of potato explants, H₂O₂ is an option that can be taken into account in intensive production systems, because it is innocuous in low concentrations, it is inexpensive, it can be handled without risk, and it has a long-term effect in MT production.

—End of the English version—



México; por el apoyo de una beca de estancia posdoctoral para la realización de la presente investigación, y por las facilidades otorgadas para llevar a cabo los experimentos, respectivamente.

LITERATURA CITADA

- Aafia, A., and J. Iqbal. 2010. Combined effect of cytokinin and sucrose on *in vitro* tuberization parameters of two cultivars i.e. Diamante and red Norland of potato (*Solanum tuberosum* L.). Pak. J. Bot. 42: 1093-1102.
- Alonso, F. 1996. El Cultivo de la Papata. Madrid, España. Ed. Mundi Prensa. 272 p.
- An C., and Z. Mou. 2011. Salicylic acid and its function in plant immunity. J. Integr. Plant Biol. 53: 412-428.
- Bienert, G. P., A. L. B. Moller, K. A. Kristiansen, A. Schulz, I. M. Moller, J. K. Schjoerring, and T. P. Jahn. 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. J. Biol. Chem. 282: 1183-1192.
- CIP, 1988. Informe Anual. Centro Internacional de la Papa. Perú. 178 p.
- CIP-INIAP. 2011 Manejo del tubérculo semilla del Centro Internacional de la Papa (CIP) e Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Ecuador. 23 p.
- Deng, X. P., Y. J. Cheng, X. B. Wu, S. S. Kwak, W. Chen, and A. E. Eneji. 2012. Exogenous hydrogen peroxide positively influences root growth and exogenous hydrogen peroxide positively influences root growth and metabolism in leaves of sweet potato seedlings. Aust. J. Crop Sci. 6: 1572-1578.
- Doke, N., Y. Miura, L. Sánchez, and K. Kawakita. 1994. Involvement of superoxide in signal transduction: Responses to attack by pathogens, physical and chemical shocks, and UV radiation. In: C. H. Foyer, and P. Mullineaux (eds). Causes of Photo Oxidative Stresses and Amelioration of Defense Systems in Plants. pp: 177-198.
- El Dessoky, S. D., A. O. Attia, I. A. Ismail, and E. I. ElHallous. 2015. *In vitro* propagation of potato under different hormonal combination. I. J. Adv. Res. 4: 684-689.
- Espinoza, N. O., R. Estrada, D. Silva-Rodríguez, P. Tovar, R. Lizarraga, and J. H. Dodds. 1986. The potato: A model crop plant for tissue culture. Outlook Agric. 15: 21-26.
- Ferreira, S. J., M. Senning, S. Sonnewald, P. M. Kessling, R. Goldstein, and U. Sonnewald. 2010. Comparative transcriptome analysis coupled to X-ray CT reveals sucrose supply and growth velocity as major determinants of potato tuber starch biosynthesis. BMC Genomics 11: 1-17.
- Foreman, J. V., V. Demidchik, J. H. Bothwell, P. Mylona, H. Miedema, M. A. Torres, P. Linstead, S. Costas, C. Brownlee, J. D. Jones, J. M. Daves, and L. Dolan. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature 27: 442-446.
- Foyer, C. H., H. A. López-Delgado, J. F. Datt, and I. M. Scott. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. Plant Physiol. 100: 241-254.
- Foyer, C. H., and G. Noctor. 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. Plant Cell Environ. 28: 1056-1071.
- Ghavidel, R. A., A. R. Bolandi, H. Hamidi, and S. Foroghian. 2012. Effects of plant growth regulators and photoperiod on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). Afr. J. Biotechnol. 11: 11585-11590.
- Gilbert, B. C., J. R. L. Smith, A. M. Payeras, J. Oakes, and R. P. Prats. 2004. A mechanistic study of the epoxidation of cinnamic acid by hydrogen peroxide catalyzed manganese 1,4,7-trimethyl-1,4,7-triazacyclononane complexes. J. Mol. Catal. 219: 265-272.
- Gopal, J., A. Chamail, and D. Sarkar. 2004. *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: Effect of genotype, abscisic acid and sucrose. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 40: 486-490.
- Hoque, M. E. 2010. *In vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Omics J. 3: 7-11.
- INIA, 2009. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Ministerio de Agricultura. Manual de Papa para la Araucanía: Manejo y Plantación. Chile. Boletín 193. 115 p.
- Joseph, N., M. Anbazhagan, and S. Srinivasan. 2015. *In vitro* growth of potato plant (*in vitro* tuberization). Int. J. Curr. Sci. 17: E29-36.
- Kloosterman, B., D. De Koeyer, R. Griffiths, B. Flinn, B. Steuernagel, U. Scholz, S. Sonnewald, U. Sonnewald, G. J. Bryan, S. Prat, Z. Banfalvi, J. P. Hammond, P. Geigenberger, K. L. Nielsen, R. G. Visser, and C. W. Bachem. 2008. Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on transcriptional changes using POCI array. Funct. Integr. Genomics 8: 329-334.
- Kolachevskaya, O. O., V. Alekseeva, L. I. Sergeeva, E. B. Rukavtsova, 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*. J. Integr. Plant Biol. 40: 1-10.
- López-Delgado, H. A., H. A. Zavaleta-Mancera, M. E. Mora-Herrera, M. Vázquez-Rivera, F. X. Flores-Gutiérrez, and I. M. Scott. 2005. Hydrogen peroxide increases potato tuber and stem starch content, stem diameter and stem lignin content. Am. J. Potato Res. 82: 279-285.
- López-Delgado, H. A., S. Sánchez-Rojo, M. E. Mora-Herrera, and R. Martínez-Gutiérrez. 2012. Micro-tuberization as a long term effect of hydrogen peroxide on potato plants. Am. J. Potato Res. 89: 240-244.
- Mani, F., T. Bettaieb, K. Zheni, N. Doudech, and C. Hannachi. 2012. Effect of hydrogen peroxide and thiourea on fluorescence and tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). J. Stress Physiol. Biochem. 8: 61-71.
- Martínez-Gutiérrez, R., M. E. Mora-Herrera, and H. A. López-Delgado. 2012. Exogenous H₂O₂ in phytoplasma-infected potato plants promotes antioxidant activity and tuber production under drought conditions. Am. J. Potato Res. 89: 53-62.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery, and F. Van Breusegem. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci. 9: 490-498.
- Mora-Herrera, M. E., H. A. López-Delgado, A. Castillo-Morales, and C. R. Foyer. 2005. Salicylic acid and H₂O₂ function by independent pathways in the induction of freezing tolerance in potato. Plant Physiol. 125: 430-440.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiol. 15: 473-497.
- Ozaki, K., A. Uchida, T. Takabe, F. Shinagawa, Y. Tanaka, T. Takabe, T. Hayashi, T. Hattori, A. K. Rai, and T. Takabe. 2008. Enrichment of sugar content in melons fruits by hydrogen peroxide treatment. J. Plant Physiol. 166: 569-578.

- Pasare, S. A., L. J. Ducreux, W. L. Morris, R. Campbell, S. K. Sharma, E. Roumeliotis, W. Kohlen, S. van der Krol, P. M. Bramley, A. G. Roberts, P. D. Fraser, and M. A. Taylor. 2013. The role of the potato (*Solanum tuberosum*) *CCD8* gene in stolon and tuber development. *New Phytol.* 198: 1108-1120.
- Perl, A., D. Aviv, L. Willmitzer, and E. Galun. 1991. *In vitro* tuberization in transgenic potatoes harboring b-glucuronidase linked to a patatin promoter: Effects of sucrose levels and photoperiods. *Plant Sci.* 73: 87-95.
- Romero-Romero, M. T., and H. A. López-Delgado. 2009. Ameliorative effects of hydrogen peroxide, ascorbate and dehydroascorbate in *Solanum tuberosum* infected by phytoplasma. *Am. J. Potato Res.* 86: 218-226.
- Roumeliotis, E., B. Kloosterman, M. Oortwijn, W. Kohlen, H. J. Bouwmeester, and R. G. F. Bachem. 2012. The effects of auxin and strigolactones on tuber initiation and stolon architecture in potato. *J. Exp. Bot.* 63: 4539-4548.
- Sabba, R. P., A. J. Bussan, B. A. Michaelis, R. Hughes, M. J. Drilias, and M. T. Glynn. 2007. Effect of planting and vine-kill timing on sugars, specific gravity and skin set in processing potato cultivars. *Am. J. Potato Res.* 84: 205-215.
- Sadder, M. T., and A. Suwwan. 2004. *In vitro* factors involved in potato (*Solanum tuberosum* L.) microtuberization. *Dirasat Agric. Sci.* 31: 157-167.
- Sánchez-Rojo, S., y H. A. López-Delgado. 2010. Peróxido de hidrógeno como inductor de tuberización *in vitro* en plantas de papa. *Interciencia* 35: 213-216.
- SAS, 2004. Statistical Analysis System, Software. Version 9.0.
- Schopfer, P. 1996. Hydrogen peroxide-mediated cell-wall stiffening *in vitro* in maize coleoptiles. *Planta* 199: 43-49.
- Sonnewald, S., and U. Sonnewald. 2014. Regulation of potato sprouting. *Planta* 239: 27-38.
- Thieme, R. 1992. An *in vitro* potato cultivar collection: Microtuberization and storage of microtubers. *Plant Genet. Resour. Newsl* 88: 17-19.
- Uranbey, S., I. Parmaksiz, C. Sancak, S. Cocu, and S. Ozcan. 2004. Temperature and gelling agent effects on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 19: 89-94.
- Wilson-García, C. Y., H. A. Zavaleta-Mancera, H. López-Delgado and A. Hernández-Garay. 2008. The cytokinin BAP delays senescence and increases antioxidants, protein and growth in Orchard grass (*Dactylis glomerata* L.). *Agrociencia* 42: 799-806.

