

MAŁGORZATA LESIŃSKA**DANUTA SEKRECKA**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin

Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemiaka w Boninie

Czynniki indukujące tuberyzację ziemniaka w warunkach *in vitro* — przegląd literatury

Factors inducing *in vitro* tuberization in potato — a review

Mikrotuberyzacja, to proces tworzenia się bulw ziemniaka w warunkach *in vitro* (*Solanum tuberosum* L.). Rozmiar mikrobulw nie przekracza z reguły średnicy 10 mm i masy 0,7 g (Struik, Wiersema, 1999). Do ich produkcji stosuje się kulturę wyprowadzoną z jednowęzłowych fragmentów roślin, którą poddaje się działaniu chemicznych i fizycznych czynników indukujących tuberyzację. Z wyrosłej w takich warunkach rośliny otrzymuje się najczęściej jedną lub dwie mikrobulwy, o wysokiej zdrowotności (Struik, Wiersema, 1999). Stosuje się je do zachowania plazmy zarodkowej, a mały rozmiar i możliwość przechowywania przez dłuższy czas w ciemności ułatwiają ich transport (Ranalli, 1997). Dzięki temu, że kultury *in vitro* prowadzone są w kontrolowanych warunkach, istnieje możliwość zmiany każdego z czynników indukujących pojedynczo lub też można badać zachodzące pomiędzy nimi interakcje. Optymalizacja warunków hodowli ma na celu przede wszystkim uproszczenie stosowanych pożywek, a co za tym idzie, redukcję kosztów produkcji. W pracy omówiono wpływ różnych składników pożywki i czynników środowiskowych na tuberyzację ziemniaka w warunkach *in vitro*.

Słowa kluczowe: fragmenty jednowęzłowe, mikrotuberyzacja, optymalizacja warunków hodowli, produkcja masowa, regulatory wzrostu, suplementy organiczne, ziemniak

Microtuberization is the process which leads to obtaining potato tubers under *in vitro* conditions. The tubers are very small (up to 10 mm in diameter and 0.7g of weight). To produce microtubers single-node cuttings are used. Several chemical and physical factors are applied to enhance microtuberization. Single-node explants produce one or more healthy tubers. The tubers are used for germplasm storage, and their small size and a possibility to store them in the dark for a long time make their transport easier. Since, *in vitro* cultures are maintained in controlled conditions, it is possible to change one or more tuberization factors and to examine the interactions between these factors. Optimalization of culture conditions can lead to medium simplification and reduction of costs.

Key words: single-node cuttings, microtuberization, optimalization of culture conditions, mass production, growth regulators, organic supplements, potato

WPROWADZENIE

Opracowanie wydajnego systemu produkcji bulw ziemniaka w warunkach *in vitro* wiąże się z wieloma złożonymi problemami. Na zjawisko tuberyzacji ma wpływ wiele czynników. Oprócz składników pożywki i tego, czy jest ona płynna czy zestalona, warunki świetlne i termiczne odgrywają również istotną rolę w produkcji mikrobulw. W literaturze przedstawione są metody, których zastosowanie wpływa na zwiększenie zarówno liczebności, jak i rozmiarów otrzymywanych bulw. Kładzie się nacisk na upraszczanie metodyki produkcji, a co za tym idzie, obniżanie jej kosztów (usuwanie np.: listki z eksplantatów roślinnych, by umieszczać większą ich liczbę w naczyniu hodowlanym (Seabrook, Douglass, 1999). Zauważa się również dążenie do wyprodukowania w szybki i prosty sposób bulw o tak dużych rozmiarach, by nadawały się one do bezpośredniego wysadzania w polu. Poniżej omówiono czynniki indukujące tuberyzację ziemniaka w warunkach *in vitro*, zwracając również uwagę na interakcje zachodzące pomiędzy nimi.

Sacharoza

Sacharoza stanowi źródło energii, a jej optymalne stężenie w pożywce wynosi 8%. Przy 2% stężeniu tego związku lub niższym nie obserwuje się tuberyzacji. Stężenie cukru wpływa także na ostateczny rozmiar bulwek, który jest najwyższy przy 8%, natomiast przy 4, 6 czy 12% jest mniejszy (Xu i in., 1998). Poza tym sacharoza indukuje tuberyzację *in vitro* niezależnie od obecności w pożywce regulatorów wzrostu (Garner, Blade, 1989; Struik, Wiersema, 1999). Związek ten uważany jest za najważniejszy z czynników wpływających na mikrotuberyzację. Poza tym wraz ze wzrostem stężenia cukru w pożywce podczas indukowania mikrobulw, okres spoczynku bulw ulegał skróceniu nawet o 86 dni (Coleman i Coleman, 2000).

REGULATORY WZROSTU

Cytokininy

Wpływ cytokinin na tworzenie się bulw u ziemniaka został opisany w 1969 roku przez Palmera i Smitha, którzy przedstawili w swej pracy reakcję izolowanych stolonów *in vitro* na aplikację tego regulatora wzrostu do pożywki hodowlanej. Stwierdzono, iż najbardziej efektywna była kinetyna w stężeniu 2,5 mg/L, natomiast benzyladenina (BA) w stężeniu 25 mg/L inicjowała tuberyzację jedynie u 40% izolowanych stolonów. Aplikacja 2 mg/L BAP (benzylaminopuryny) zwiększała ilość bulw u roślin hodowanych w warunkach dnia krótkiego (Hussey, Stacey, 1984). W doświadczeniu Šimko (1993) 2,5 mg/L kinetyny nie miało wpływu na produkcję mikrobulw, natomiast po dodaniu paklobutrazolu (0,001 mg/L) otrzymywano większą liczbę bulw *in vitro*. W zautomatyzowanym systemie produkcji mikrobulw przy użyciu bioreaktora, dodanie BAP do pożywki prowadziło do wytworzenia bulw ważących powyżej 1,1 g (Piao i in., 2003).

Kwas jasmonowy

Kwas jasmonowy (JA — jasmonic acid) stymuluje proces tuberyzacji *in vitro* (Saniewski, 1997; Pruski i in., 2003 b). JA w przeciwieństwie do kinetyny, nie oddziałuje wyłącznie na jeden pąk (0,8 bulwy/stolon), lecz wywołuje ogólny stan indukcji w stolonie

(2,3 bulwy/stolon) (Pelacho, Mingo-Castel, 1991). Dodanie do pożywki MS (Murashige, Skoog, 1962) 20–50 mg/L JA hamuje wzrost fragmentów roślinnych hodowanych *in vitro*, natomiast stężenie 0,2–50 mg/L JA w zaproponowanym przez autorów systemie tuberyzacji dla 2 odmian nie miało znaczącego wpływu na tworzenie mikrobulw (Zhang i in., 2006). Wzbogacenie pożywki o ten regulator wzrostu ($0,8 \times 10^{-5}M$) przed ukorzeniem się fragmentów roślinnych może całkowicie znieść hamujący wpływ GA₃ (GA — kwas giberelinowy) na tuberyzację. Procent tuberyzacji z 9% dla pożywki z dodatkiem GA₃ wzrośnie do 58% dla pożywki GA₃ + JA, podczas gdy to samo stężenie JA zastosowane po ukorzeniu roślin nie wpłynie na tuberyzację (Castro i in., 2000). Pruski i wsp. (2003 a) sugerują, iż hodowla roślin *in vitro* na pożywce z JA, przed wyprowadzeniem z nich kultury fragmentów jednowęzłowych, podnosi jakość oraz liczbę mikrobulw. W warunkach naturalnych, produkowany w liściach JA transportowany jest do stolonów, gdzie wpływa na formowanie bulw (Pelacho, Mingo-Castel, 1991). Reakcja fragmentów roślinnych na JA, jest odmianowo specyficzna (Pruski, 2001).

Auksyny

Aplikacja IAA (kwas indolilo-3-octowy) do pożywki, zawierającej 8% sacharozę wpłynęła na indukcję mniejszych bulw, w porównaniu do analogicznej pożywki bez dodatku tego regulatora wzrostu (Xu, 1998). Efekt oddziaływania jednego regulatora wzrostu na tuberyzację *in vitro* jest łatwy do oceny. Mimo, iż hormony roślinne badane są od dziesięcioleci, interakcje zachodzące pomiędzy nimi nadal nie są wyjaśnione. Zhang i wsp. (2005) zastosowali kilka kombinacji tych związków, stwierdzając, iż BAP odgrywa kluczową rolę w tuberyzacji, poza tym zaobserwowano interakcję pomiędzy GA i IAA w mikrotuberyzacji. Zastosowanie IAA w celu wywołania tuberyzacji, nie dawało ani jednej mikrobulwki w opisanym przez Zhanga systemie eksperymentalnym, natomiast dzięki użyciu kombinacji IAA+GA+BAP i IAA+BAP wraz z wysokim stężeniem IAA wyprodukowane bulwy miały zarówno większą średnicę, jak i świeżą masę.

Gibereliny

Dodatek gibereliny (GA — gibberellic acid) do pożywki (Hussey i Stacey, 1984) lub jej aplikacja na pędy wpływa hamująco lub opóźnia formowanie bulw. Istnieje kilka typów giberelin (np.: GA₁, GA₃, GA₄...), które wykazują podobne działanie i hamują tuberyzację w kulturach wyprowadzonych z fragmentów jednowęzłowych (Vreugdenhil, Sergeeva, 1999). Poza tym, przy wyższych stężeniach egzogennej (dodawanej zewnętrznie) GA, bulwy są nie tylko znacznie mniejsze, ale mogą mieć również nietypowy kształt (Xu i in., 1998). Hamujące działanie endogennej GA, występującej w tkankach roślinnych, można znieść przez dodatek kwasu abscysynowego (ABA) (Xu i in., 1998) lub też zablokować biosyntezę gibereliny, przez dodatek odpowiednich związków chemicznych (np.: ancymidolu czy paklobutrazolu) (Vreugdenhil, Sergeeva, 1999). W zależności od stosowanych warunków świetlnych, stężenie i aktywność giberelin maleje lub rośnie (Martinez-Garcia i in., 2002). Abdala i wsp. (1995) nazywa GA₃ „czynnikiem korzeniowym” (root factor), odpowiedzialnym za opóźnienie tuberyzacji w roślinach ziemniaka.

Retardanty wzrostu

Związki należące do triazoli: triadimefon oraz unikonazol stosuje się także jako czynniki indukujące mikrotuberyzację. Triazole obok pełnienia funkcji fungicydów, są również regulatorami wzrostu roślin, hamującymi syntezę giberelin. W doświadczeniu Chandra i wsp. (1992) dla jednej z odmian otrzymano podobną liczbę bulw po zastosowaniu unikonazolu, triazolu i BAP, ale największą ich masę (140 mg) uzyskano na pożywce z unikonazolem. Zaletą stosowania tego związku jest również to, iż przy stężeniu tysiąckrotnie niższym niż BAP, otrzymuje się dużą liczbę mikrobulw, przez co możliwe jest tym samym obniżenie kosztów produkcji (Chandra i in., 1992). Dodanie do pożywki chlormekwatu (CCC) przyczynia się do znacznego obniżenia stężenia GA₃ w tkankach roślin *in vitro* (ok. 6-krotnie, w porównaniu z rośliną kontrolną, hodowaną na pożywce bez CCC) oraz do wcześniejszego tworzenia bulw (Abdala i in., 1995). Chlormekwat stosowany łącznie z BAP wzmacnia efekt działania tego drugiego związku na tuberyzację *in vitro* (Hussey i Stacey, 1984). Ancymidol znacznie zwiększa tworzenie się bulw przy niskim stężeniu cukru w pożywce (tj. 2 i 4%), dając kolejno 53,5% i 84,5% tuberyzacji dla odmiany wczesnej (przy kontroli 13% i 40%) oraz 6% i 12,5% dla odmiany późnej (przy kontroli 1% i 2,5%) (Ochotorena i in., 1999).

Kumaryna

Stallknecht (1972) badał wpływ tego inhibitora kiełkowania nasion, na tworzenie się bulw w kulturach pędowych ziemniaka hodowanych *in vitro*. Przy zastosowaniu 1 mg/L kumaryny nie zaobserwowano tuberyzacji, przy 10 mg/L tuberyzacja osiągnęła 30%. Stężenie od 25–50 mg/L było optymalne dla zawiązywania się bulw, natomiast przy 100 mg/L kumaryny tuberyzacja była opóźniona, a wyprodukowane bulwy były bardzo małe. W tym eksperymencie kontrolę stanowiły pędy hodowane bez dodatku kumaryny oraz pędy hodowane na pożywce wzbogaconej kinetyną w stężeniu wg protokołu Palmera i Smitha (1970). Bulwy hodowane na pożywce z dodatkiem kumaryny były zawsze większe, niż te, które uzyskano z pożywki wzbogaconej kinetyną.

SUPLEMENTY ORGANICZNE

Poszukiwaniom systemów mikrotuberyzacji bez dodatku regulatorów wzrostu poświęcono stosunkowo mało uwagi, prawdopodobnie, dlatego iż proces ten miałby być powolny i nieefektywny. Jednakże dostępność takich systemów tuberyzacji *in vitro*, daje możliwość produkcji mikrobulw, bez późniejszych problemów związanych z zakłóconą równowagą hormonalną (Pelacho i in., 1999). Według Ranalliego (1997) dobre efekty daje stosowanie węgla aktywowanego, który zwiększa ilość oraz średnią masę otrzymywanych mikrobulw. Działanie węgla polega na absorbowaniu różnych związków, w tym metabolitów hamujących wzrost. Prawdopodobnie wpływa on również na przemiany azotu w komórkach roślinnych, co ma również silny wpływ na rozwój mikrobulw (Bizarri i in., 1995).

Pelacho i wsp. (1999) zakładali hodowle kilku typów eksplantatów: stolonów, fragmentów jednowęzłowych lub wielowęzłowych roślin zawierających wierzchołek wzrostu i stosował kwasy organiczne w celu indukcji tuberyzacji *in vitro*, różne długości

fotoperiodu oraz pożywki płynne i półpłynne. Kwas octowy, propionowy, askorbinowy, acetylosalicylowy i salicylowy wywołały tuberyzację na wszystkich typach stosowanych eksplantatów. W przypadku hodowanych stolonów, najlepsze okazały się kwasy: propionowy (otrzymywano największe mikrobulwy) i acetylosalicylowy. Fragmenty jednowęzłowe w obecności kwasu propionowego i octowego zawiązały większą liczbę bulw, jeśli jednak stosowano pożywki płynne, wzbogacone kwasem octowym, otrzymano mniej liczne i znacznie mniejsze mikrobulwy. Eksplantaty wielowęzłowe z wierzchołkami wzrostu zawiązywały bulwy na pożywce z kwasem octowym, jednak wbrew przypuszczeniom, tylko nieliczne z nich dały więcej niż jedną mikrobulwę. Takie fragmenty roślinne zachowują się podobnie nawet w systemach mikrotuberyzacji z dodatkiem hormonów roślinnych. Kwasy organiczne wykazują działanie analogiczne do substancji antygiberelinowych (silnie hamujące wzrost korzeni i stolonów), jednak ich wpływ na mikrotuberyzację może być mało znaczący (wyniki porównywalne z wynikami otrzymanymi na pożywce kontrolnej), a przejawia się w podwyższaniu zawartości suchej masy mikrobulw oraz rezerw węglowodanów (Sharma i in., 2004).

AZOT

Zawartość i forma azotu są istotnymi czynnikami podczas mikrotuberyzacji (Ranalli, 1997; Struik, Wiersema, 1999). Ważne jest również zachowanie równowagi pomiędzy stężeniem amoniaku i azotanów w pożywce hodowlanej (Garner, Blake, 1989). Wysokie stężenie azotu ma negatywny (maleje współczynnik tuberyzacji) (Meltzer, 1990) oraz pozytywny wpływ na produkcję bulw *in vitro* rozmiar mikrobulw wzrasta (Garner, Blake, 1989). Dla produkcji masowej, należy optymalizować stężenie cukru, azotu i natężenie światła odmianowo specyficznie (Meltzer, 1990).

WARUNKI ŚRODOWISKA

Temperatura

W 26°C tuberyzacja w warunkach *in vitro* ulega zahamowaniu, przy czym nawet krótkotrwałe działanie wysokiej temperatury na kulturę roślinną obniża zawartość świeżej masy mikrobulw (średnio z ok. 57 mg na 38,4 mg po tygodniu inkubacji w 26°C oraz na ok. 31 mg po 2 tygodniach) (Harvey i in., 1992). Tworzenie bulw jest kontrolowane hormonalnie, a wysoka temperatura ma znieść równowagę pomiędzy poziomem inhibitorów, a endogeniczną gibereliną (Menzel, 1980). Co więcej, zaobserwowano interakcję pomiędzy wysoką temperaturą, a niskim natężeniem światła, sugerując, że plon bulw determinowany jest przez równowagę pomiędzy tymi czynnikami, a zwiększone stężenie gibereliny bezpośrednio przyczynia się do spadku tuberyzacji (Menzel, 1985). Hamujący efekt omawianego czynnika przy 14 h fotoperiodzie można znieść częściowo przez dodatek do pożywki kwasu abscysynowego (ABA) lub też prawie całkowicie, po zastosowaniu chlormekwatu (CCC) (Menzel, 1980). Optymalna temperatura hodowli powinna zawierać się w przedziale od 18°C do 20°C (Ranalli, 1997; Struik, Wiersema, 1999).

Światło

Garner i Blake (1989) prowadzili hodowlę kultur roślinnych początkowo przy 16 h fotoperiodzie przez okres miesiąca, po czym przenosili ją do 8 h fotoperiodu. Indukcja mikrobulw zachodzi w warunkach dnia krótkiego (8 h fotoperiod) lub w całkowitej ciemności (Struik, Wiersema, 1999; Donnelly i in., 2003). Zmiana warunków świetlnych z 16 h do 8 h fotoperiodu według wielu badaczy wywołuje wcześniejszą mikrotuberyzację lub otrzymane bulwy są liczniejsze i mają większą średnicę (Hussey, Stacey, 1984; Donnelly i in., 2003). Według Dobranszkiego i wsp. (1999) stosowanie ciemności po fazie indukcji tuberyzacji nie tylko przyspiesza zjawisko tworzenia mikrobulw, ale powoduje też jego synchronizację. Mikrotuberyzacja zachodzi szybciej i wcześniej w warunkach dnia krótkiego, niż długiego (Hussey, Stacey, 1984) i trwa ok. 4–5 miesięcy na pożywce wolnej od hormonów. Gopal i wsp. (1997) porównali potomstwo bulw białych, czyli hodowanych w ciemności i bulw zielonych, hodowanych przy 10 h fotoperiodzie. Zielone mikrobulwy mają więcej oczek, niż bulwy białe (średnio ok. 6 oczek/bulwę, wobec 3,5 oczek/bulwę) (Gopal i in., 1998), co może zwiększać ilość pędów na roślinie wyrosłej z zielonej bulwy.

AUTOMATYZACJA PRODUKCJI MIKROBULW ZIEMNIAKA

Użycie ciekłej pożywki w kulturze *in vitro* redukuje koszty produkcji i wydaje się być najlepszą metodą, by uzyskać automatyzację. Prostą metodę masowej produkcji mikrobulw w bioreaktorze przedstawił Piao i wsp. (2003). Zastosowali oni 2 typy hodowli roślin w bioreaktorze: z immersją okresową oraz z immersją ciągłą. Najwydajniejszy w produkcji bulw ziemniaka okazał się bioreaktor pracujący w systemie ciągłej immersji, wyposażony w siatkę podtrzymującą. Piao i wsp. (2003) stwierdzili, że kluczowym czynnikiem w otrzymywaniu dużych bulw (powyżej 1,1 g) jest odpowiednie, stałe zaopatrywanie w składniki odżywcze rosnących eksplantatów. Hodowla kultur roślinnych w ciekłej pożywce posiada również wady, mogą bowiem wystąpić zaburzenia fizjologiczne, takie jak witrifikacja (zeszklenie) roślin, poza tym prawdopodobnie w wyniku niedoboru tlenu podczas długotrwałego zanurzenia, wzrost fragmentów roślinnych jest spowolniony (Piao i in., 2003). Mikrobulwy otrzymane na ciekłych pożywkach nie przechowują się zbyt dobrze, a otwarte przetchniki umożliwiają wnikanie mikroorganizmów wywołujących zgniliznę (Seabrook i in., 2004) oraz powodują szybkie wysychanie bulw, natychmiast po zbiorze (Ranalli, 1997).

By uniknąć tych problemów, stosuje się następujące techniki:

- tratwy wspierające rośliny nad nieruchomą ciekłą pożywką,
- dolewanie ciekłej pożywki do kultury założonej na agarze,
- kultury zamglawiane.

Francuska firma CIRAD stworzyła dwukomorowy zbiornik RITA, dzięki któremu roślinki *in vitro* poddawane są okresowej immersji (zanurzeniu) w ciekłej pożywce. W badaniach wstępnych otrzymano bardzo obiecujące wyniki: bulwy były bardzo duże i liczne. Otrzymano nawet 3 mikrobulwy z początkowego fragmentu jednowęzłowego. Uważa się, iż tak dobre wyniki mają związek z:

- lepszym zaopatrzeniem w składniki odżywcze, przez bezpośredni kontakt z pożywką (Ranalli, 1997; Teisson, Alvard, 1999),
- krótkim przerwaniem wymiany gazów pomiędzy rośliną i atmosferą (krótki okres immersji w pożywce) (Teisson, Alvard, 1999),
- całkowitą wymianą atmosfery wewnątrz naczynia, w regularnych odstępach (Teisson, Alvard, 1999).

PODSUMOWANIE

Na zjawisko mikrotuberyzacji wpływa wiele czynników chemicznych i fizycznych. Produkcja mikrobulw w kontrolowanym, zamkniętym środowisku daje możliwość zwiększania ich liczebności, jak i rozmiaru poprzez zmianę pojedynczych lub kilku parametrów hodowli. Badania własne (dane niepublikowane) oraz dane literaturowe wskazują na ogromną rolę reakcji genotypów na czynniki indukujące tuberyzację (reakcje odmianowo specyficzne). Dlatego tak trudno opracować jednolity schemat produkcji mikrobulw. Zaleca się poszukiwanie systemów produkcji wolnych od hormonów roślinnych, ze względu na możliwość uniknięcia zmian genetycznych w bulwach potomnych, które mogą być wywoływane przez stosowanie tych związków.

LITERATURA

- Abdala G., Guinazu M., Tizio R., Pearce D., Pharis R. 1995. Effect of 2-chloroethyltrimethyl ammonium chloride on tuberization and endogenous GA₃ in roots of potato cuttings. *Plant Growth Regulation* vol. 17, no. 2: 95 — 100.
- Bizarri M., Borghi L., Ranalli P. 1995. Effects of activated charcoal effects on induction and development of microtubers in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Appl. Bio.* 127: 175 — 181.
- Castro G., Abdala G., Aguero C., Tizio R. 2000. Interaction between jasmonic and gibberellic acids on *in vitro* tuberization of potato plantlets. *Potato Research* 43: 83 — 88.
- Chandra R., Randhawa G. J., Chaudhari D. R., Upadhaya M. D. 1992. Efficacy of triazoles for *in vitro* microtuber production in potato. *Potato Research* 35: 339 — 341.
- Coleman W. K., Coleman S. E. 2000. Modification of potato microtuber dormancy during induction and growth *in vitro* or *ex vitro*. *American Journal of Potato Research* 77: 103 — 110.
- Dobranszki J., Tabori K. M., Ferenczy A. 1999. Light and genotype effects on *in vitro* tuberization of potato plantlets. *Potato Research* 42: 483 — 488.
- Donnelly D. J., Coleman W. K., Coleman S. E. 2003. Potato microtuber production and performance: A review. *American Journal of Potato Research*, vol. 80, no. 2: 103 — 115.
- Garner N., Blade J. 1989. The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. *Annals of Botany* 63: 663 — 674
- Gopal J., Minocha J. L., Sidhu J. S. 1997. Comparative performance of potato crops raised from microtubers induced in the dark versus microtubers induced in light. *Potato Research* 40: 407 — 412.
- Gopal J., Minocha J. L., Dhaliwal H. S. 1998. Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports* 17/10: 794 — 798.
- Harvey B. M. R., Crothers S. H., Watson S., Lee H. C. 1992. Heat inhibition of tuber development in potato (*Solanum tuberosum* L.): effects on microtuber formation *in vitro*. *Potato Research* 35: 183 — 190.
- Hussey G, Stacey N. J. 1984. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany* 53: 565 — 578.

- Martinez-Garcia J. F., Garcia-Martinez J. L., Bou J., Prat S. 2002. The interaction of gibberellins and photoperiod in the control of potato tuberization. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 377 — 386.
- Meltzer, von H. 1990. Physiological aspects of *in vitro* tuber production. *Potato Research* 33: 302.
- Menzel C. M. 1980. Responses to gibberellin and growth inhibitors. *Annals of Botany* 46: 259 — 265.
- Menzel C. M. 1985. Tuberization in potato at high temperatures: interaction between temperature and irradiance. *Annals of Botany* 55: 35 — 39.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473 — 497.
- Ochotorena M., Santamaria I., Arregui L. M., Mingo-Castel A. M. 1999. *In vitro* tuberisation of potato: the interaction of ancymidol and photoperiod. *Potato Research* 42: 601 — 606.
- Palmer C. E., Smith O. E. 1969. Cytokine's and Tuber Initiation in Potato *Solanum tuberosum* L. *Nature*, vol. 221/1: 18.
- Pelacho A. M., Mingo-Castel A. M. 1991. Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiology* 97: 1253 — 1255.
- Pelacho A. M., Martin-Closas L., Sanfeliu J. L. I. 1999. *In vitro* induction of potato tuberization by organic acids. *Potato Research* 42: 585 — 591.
- Piao X. C., Chakrabarty D., Hahn E. J., Paek K. Y. 2003. A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. *Current Science* vol. 84, no.8: 1129 — 1132.
- Pruski K. W. 2001. Micropropagation technology in early phases of commercial seed potato production. Wageningen University dissertation no. 3066. 31 October (published on-line).
- Pruski K. W., Astatkie T., Duplessis P., Stewart L., Nowak J., Struik P.C. 2003a. Manipulation of microtubers for direct field utilization. *American Journal of Potato Research* vol. 80, no 3: 173 — 181.
- Pruski K. W., Astatkie T., Duplessis P., Stewart L., Nowak J., Struik P. C. 2003 b. Use of jasmonate for conditioning of potato plantlets and microtubers in greenhouse production of minitubers. *American Journal of Potato Research* vol. 80, no 3: 183 — 193.
- Ranalli P. 1997. Innovative propagation methods in seed tuber multiplication programmes. *Potato Research* 40: 439 — 453.
- Saniewski M. 1997. Kwas jasmonowy i związki pokrewne. Regulatory wzrostu i rozwoju roślin str. 99. Praca zbiorowa pod redakcją L. S. Jankiewiczza, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Seabrook J. E. A., Douglass L. K. 1999. Reduction in vigor of leafless potato cuttings *in vitro*. *Potato Research* 37: 365 — 371.
- Seabrook J. E. A., Douglass L. K., Arnold D. A. 2004. Effect of leaves on microtubers produced from potato single-node cuttings *in vitro*. *American Journal of Potato Research* vol. 81, 1: 1 — 5.
- Sharma S., Chanemougasoundharam A., Sarkar D., Pandey S. K. 2004. Carboxylic acids affect induction, development and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers grown *in vitro* from single-node explants (Abstract). *Plant Growth Regulation* vol. 44, no. 3: 219 — 229.
- Šimko I. 1993. Effects of kinetin, paclobutrazol and their interactions on the microtuberization of potato stem segments cultured *in vitro* in the light (abstract). *Plant Growth Regulation* vol. 12, no 1–3: 23 — 27.
- Stallknecht G. F. 1972. Coumarin-induced tuber formation on excised shoots of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro* (short communication). *Plant Physiology* 50: 412 — 413.
- Struik P. C., Wiersema S. G. 1999. Seed Potato Technology. Chapter 7: Production of pre-basic seed. Wageningen Press, The Netherlands: 181 — 182.
- Teisson C., Alvard D. 1999. *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato Research* 42: 499 — 504.
- Vreugdenhil D., Sergeeva L. 1999. Gibberellins and tuberization in potato. *Potato Research* 42: 471 — 481.
- Xu X., van Lammeren A., Vermeer E., Vreugdenhil D. 1998. The role of gibberellin, abscisic acid and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. *Plant Physiology* 117: 575 — 584.
- Zhang Z., Zhou W., Li H. 2005. The role of GA, IAA I BAP in the regulation of *in vitro* shoot growth and microtuberization in potato. *Acta Physiologiae Plantarum* vol. 27 no. 3B. 363 — 369.

Zhang Z. J, Zhou W.J, Li H. Z., Zhang G.Q., Subrahmaniyan K. Yu J.Q. 2006. Effect of jasmonic acid on *in vitro* explant growth and microtuberization in potato. *Biologia Plantarum* vol. 50, no. 3: 453 — 456.