



Fotosynteza jako marker fizjologiczny jakości kultur pędowych i otrzymanych roślin

Bożenna Borkowska

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice

Photosynthetic activity as physiological marker in the evaluation of the quality of shoot cultures and obtained plantlets

Summary

Chlorophyll *a* fluorescence has become a routine method for obtaining information on various aspects of photosynthesis. The terms and definitions are sometimes used convertibly, which became a source of misunderstanding. In this article, the most accepted viewpoint is presented on chlorophyll fluorescence meaning in monitoring and characterising of photosynthetic events.

It was exemplified that strawberry shoot cultures show photosynthetic activity through multiplication subculture. Light and dark phases of photosynthesis function better when glucose is added to the medium in comparison to sucrose-medium. Photosynthetic efficiency of acclimated plantlets is higher than that of cultured shoots, but it is far from full activity of plants growing in natural conditions. The leaves formed during *in vitro* life slowly decrease, but newly formed leaves acquire the photosynthetic activity at the time of acclimatisation.

Key words:

chlorophyll *a* (Ch) fluorescence, shoot cultures, strawberry, light, sugars, CO₂.

Adres do korespondencji

Bożenna Borkowska,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarstwa,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice;
e-mail:
bborkow@insad.pl

1. Wstęp

Fotosynteza jest procesem w którym energia świetlna jest wykorzystywana do wytworzenia węglowodanów z dwutlenku węgla i wody. Wydajność procesu fotosyntezy jest oceniana:

– na poziomie molekularnym – określenie relacji pomiędzy ilością zaabsorbowanych kwantów i asymilacją jednej cząsteczki CO₂.

W optymalnych warunkach (nie stresowych) „zebranie” przez anteny energetyczne 20 moli kwantów powoduje wytworzenie trzech cząsteczek ATP i dwóch NADPH, które są wykorzystywane do redukcji jednej cząsteczki CO₂.

– na poziomie wyższym – wyrażana jest produkcją suchej masy w stosunku do dostępnego PAR (promieniowania fotosyntetycznie czynnego).

Przez wiele lat sądzono, że w kulturach *in vitro* proces fotosyntezy nie zachodzi nawet w układzie zawierającym zielone tkanki/organy. Później zaczęto dopuszczać możliwość fotosyntezy jednak o bardzo słabej wydajności. Obecnie jest wiele dowodów na to, że fotosynteza zachodzi w kulturach *in vitro*, a jej znaczenie może być bardzo duże szczególnie w procesie aklimatyzacji i adaptacji do warunków naturalnych (1).

Aktywność fotosyntetyczna w kulturach *in vitro* zależy od takich samych czynników środowiskowych jak w warunkach naturalnych: światła, CO₂, wody, temperatury. W kulturach *in vitro* dochodzą dodatkowe czynniki, które mają niebagatelny wpływ na aktywność fotosyntetyczną zarówno kultur jak i otrzymanych roślin. Aktywność fotosyntetyczna w kulturach *in vitro* jest zależna (w sposób pośredni lub bezpośredni) od składu pożywki – przede wszystkim od obecności cukrów, od rodzaju przykrycia naczynia w którym znajdują się kultury, liczby pędów/liści w danej kulturze, długości pojedynczego pasaży, także ogólnej liczby pasaży (2-6).

2. Światło

W warunkach naturalnych wysycenie fotosyntezy następuje przy napromienowaniu 460-690 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sek}$ (7). W produkcji pod osłonami (w tunelach i w szklarni) rośliny uprawiane są w szerokim zakresie natężenia napromienowania od 100 do 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sek}$, w zależności od rodzaju uprawianych roślin, źródła światła, pory roku (8). Pędowe kultury *in vitro* (głównie stosowane dla celów mikrorozmnażania) trzymane są z reguły w świetle o bardzo niskim natężeniu napromienowania od 20 do 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sek}$.

Intensywność światła, która jest niezbędna dla funkcjonowania fotosyntezy zależy od adaptacyjnych zdolności roślin do nieoptymalnych warunków świetlnych. Kultury *in vitro* mogą być porównywane z roślinami rosnącymi w głębokim cieniu. Dotyczy to zarówno cech morfologicznych jak i budowy aparatu fotosyntetycznego. U roślin zaadaptowanych do cienia stosunek PSII do PSI jest wyższy, anteny są większe i zawierają więcej chlorofilu w przeliczeniu na jedno centrum reakcji. Oznacza to, że wysycenie fotosyntezy roślin ceniolubnych występuje przy niskiej intensywności napromienowania. Świetlny punkt kompensacyjny dla roślin ceniolubnych występuje pomiędzy 1-15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sek}$, podczas gdy dla roślin rosnących w pełnym świetle pomiędzy 10-20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sek}$ (9). Oznacza to równocześnie, że rośliny ceniolubne osiągają plateau fotosyntezy znacznie szybciej i przy niższym napromienowaniu niż rośliny rosnące w pełnym świetle.

Oprócz intensywności światła, na fotosyntezę ma wpływ jego rodzaj (długość fali). Regulacja może mieć charakter pośredni jako wynik zmian fotomorfogenetycznych lub bezpośredni związany z absorbowaniem przez chlorofile *a* i *b* promieniowania w zakresie 460 nm i 600-700 nm (10-13). Pośredni udział światła monochromatycznego w fotosyntezie kultur *in vitro* może być także związany ze wzbogaceniem atmosfery w CO₂. W atmosferze kultur trzymanych w świetle czerwonym stężenie CO₂ jest znacznie wyższe w porównaniu do kultur znajdujących się w warunkach standardowych (13). Nie można jednak przewidzieć jednoznacznie jaka będzie reakcja kultur (morfologiczna i fizjologiczna) na światło monochromatyczne lub „przybliżone” do monochromatycznego. Zależy to bowiem od wielu innych czynników, jak: rodzaj/gatunek rośliny; morfologia pędów i liści; wiek kultur; skład pożywki (rodzaj i ilość cukrów i regulatorów wzrostu).

Światło można wykorzystywać do regulacji fotosyntezy zmieniając fotoperiod. Standardowy fotoperiod wynosi 16/8 (dzień/noc). W okresie nocnym stężenie CO₂ w atmosferze naczyń z kulturami wzrasta. W 16-godzinny okres jasny stężenie CO₂ spada gwałtownie, co ogranicza, a nawet uniemożliwia funkcjonowanie cyklu Calvina. Zmiana fotoperiodu na cykle, np. 2/2, 2/4 lub 4/4 (dzień/noc) stwarza możliwość podwyższenia aktywności fotosyntetycznej przez zapewnienie względnie stałego stężenia CO₂ w atmosferze otaczającej kultury (13,14).

3. CO₂

Podczas gdy światło decyduje o świetlnej stronie fotosyntezy, funkcjonowanie strony ciemniowej rozpoczyna się od asymilacji CO₂. W pomieszczeniach w których trzymane są kultury (fitotron, różne kamery wzrostowe) zawartość CO₂ w powietrzu może być porównywalna ze stężeniem dwutlenku węgla w otwartej przestrzeni. Wewnątrz naczyń z kulturami stężenie CO₂ ulega zmianie i dużym wahaniom. Wahania występują głównie między dniem i nocą oraz między początkiem i końcem pasażu. Zawartość CO₂ w atmosferze zależy w bardzo dużym stopniu od rodzaju cukru dodanego do pożywki. Najczęściej do pożywki dodawana jest sacharoza, ale dodaje się także glukozę. Ostatecznym produktem przemian węgla cukru jest dwutlenek węgla. W przypadku najczęściej stosowanej sacharozy, stężenie CO₂ na początku pasażu jest niskie i wzrasta gwałtownie w drugiej połowie pasażu 5-tygodniowego. Jeżeli do pożywki dodawana jest glukoza, stężenie CO₂ jest wysokie od samego początku pasażu, a pod koniec pasażu CO₂ jest praktycznie nieobecny (13-16).

4. Woda i temperatura

Podczas gdy dostępność wody i temperatura są czynnikami środowiskowymi istotnie wpływającymi na wydajność fotosyntezy, w warunkach *in vitro* te dwa czynniki nie odgrywają roli w fotosyntezie. Oba czynniki są stałe i dobrane optymalnie.

5. Metoda fluorescencji chlorofilu *a* (Ch)

Aktywność świetlnej fazy fotosyntezy i w pewnym stopniu fazy ciemniowej ocenia się metodą fluorescencji chlorofilu *a* (Ch) (17-19). Metoda ta dostarcza informacji o funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego i jego zdolności adaptacyjnej do warunków stresowych (wydajność kwantowa procesów fotochemicznych). Poszczególne parametry uzyskiwane w czasie pomiaru liści adaptowanych do ciemności i po naświetleniu, pozwalają dokładnie scharakteryzować poszczególne etapy fotosyntezy. Podstawowe dwa parametry określające „całościowo” wydajność fotochemiczną to: F_v/F_m – otrzymywany po całkowitym zaciemnieniu liścia, oraz Y – analogiczny do F_v/F_m tylko otrzymywany po naświetleniu liścia. Parametr F_v/F_m określa potencjalną (maksymalną) aktywność fotochemiczną, podczas gdy Y określa faktyczną aktywność fotochemiczną. Parametr F_o otrzymywany po zaciemnieniu, określa funkcjonowanie anten czyli zdolność liścia do „zbierania” energii świetlnej. Dwa inne podstawowe parametry to, F_m (maksymalna wartość fluorescencji) i T_{fm} (czas potrzebny do osiągnięcia wartości F_m od wartości początkowej F_o). Wykorzystując te trzy parametry oblicza się szereg innych wskaźników, co pozwala scharakteryzować nie tylko funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego, ale także zdolność adaptacyjną roślin do warunków stresowych. Jeżeli liść adaptowany do ciemności zostanie naświetlony światłem modulowanym to otrzymuje się trzy bardzo ważne parametry qP , qN i NPQ . Parametry te określają tzw. wygaszanie czyli zużywanie energii. Całkowita energia świetlna zaabsorbowana przez anteny może być zużywana w trzech odrębnych drogach: wykorzystywana w ciemniowej fazie fotosyntezy (qP), tracona w postaci ciepła (NPQ) oraz może nastąpić reemisja do atmosfery w postaci fluorescencji (qN). Te trzy drogi wygaszania są ze sobą ściśle powiązane tak, że wzrost wartości jednego parametru powoduje zmniejszenie drugiego.

6. Aktywność fotosyntetyczna kultur pędowych truskawek

6.1. W czasie pasażu

Kultury truskawek były prowadzone standardowo, przy zastosowaniu metody Boxusa (20).

W naszych doświadczeniach fluorescencja chlorofilu mierzona była początkowo fluorymetrem typu PEA (Hansatech, Anglia) – pomiar w świetle bezpośrednim, później fluorymetrem typu PAM (MINI-PAM, Waltz, Niemcy) – w świetle modulowanym. Pomiary wykonywane były po zaciemnieniu liści, a następnie po ich naświetleniu. Otrzymywano w ten sposób „komplet” parametrów, po analizie których można było ocenić funkcjonowanie strony świetlnej fotosyntezy i w pewnym zakresie strony ciemniowej.

Pędy truskawek nie wydłużają się. Na skróconym pędzie znajdują się liście, tworząc rozetę. Każdy pasaż rozpoczyna się wyłożeniem na pożywkę rozet zawierających 3-4 liście z ogonkami o długości 1,0-1,5 cm. Standardowy pasaż trwa 5-6 tygodni, a przedłużony jest do 10 tygodni. W czasie pasażu powstają nowe liście i ich liczba zależy od cukru dodanego do pożywki. Standardowa pożywka Boxusa zawiera glukozę w obecności której powstaje wielokrotnie więcej liści niż na pożywce z sacharozą. Wyniki przedstawione w tabeli 1 pozwalają prześledzić zmiany w aktywności fotosyntetycznej liści w czasie pasażu prowadzonego standardowo.

Wartość F_v/F_m (potencjalna wydajność kwantowa procesów fotochemicznych) powyżej 0,800 wskazuje na dobrze wykształcone i prawidłowo funkcjonujące fotosystemy. Zmniejszanie się wartości F_v/F_m liści znajdujących się w kulturach od początku pasażu (nazwanych „stare”) wskazuje na rozpoczęcie procesu starzenia. Równocześnie wartość F_v/F_m liści wytwarzanych w czasie pasażu (nazwanych „młode”) wzrastała, co było związane z rozwojem ich aparatu fotosyntetycznego. Parametry F_m i T_{fm} należy analizować równocześnie. T_{fm} oznacza czas potrzebny do osiągnięcia maksymalnej fluorescencji (F_m) od poziomu wyjściowego F_o . Po 10 tygodniach pasażu, niższa wartość F_m i wyższa T_{fm} w liściach starych, wskazuje na znacznie gorsze funkcjonowanie fotosystemów w tych liściach w porównaniu do liści młodych. Wartość bezwzględna T_{fm} dla liści młodych – około 400, przy wysokiej wartości F_m oznacza sprawny aparat fotosyntetyczny. Parametr Sc jest wskaźnikiem zawartości nie zredukowanych akceptorów elektronów i wskazuje na sprawność przekazywania energii pomiędzy PSII i PSI. W liściach pędów wyjściowych (0 tyg.) wartość Sc była niska. Pod koniec 6 tygodni wartość Sc liści starych była wysoka, ale w ciągu następnych tygodni spadała. Odwrotny proces występował w liściach nowo wytwarzanych.

Dwa pozostałe wskaźniki: F_s (wartość stała po całkowitym wygaszeniu) i R_{fd} (indeks witalności) pozwalają wnioskować o funkcjonowaniu strony ciemniowej fotosyntezy. Wysoka wartość F_s świadczy o inhibicji PSII spowodowanej niewielkim zużyciem energii chemicznej w reakcjach enzymatycznych. Wzrastająca wartość R_{fd} (skorelowana z niską wartością F_s) świadczy o prawidłowym przebiegu procesów enzymatycznych. U roślin rosnących w warunkach naturalnych wykazujących wysoką aktywność fotosyntetyczną wartość R_{fd} wynosi 4-5. W kulturach *in vitro* R_{fd} może mieć wartość nawet poniżej 1,0. Z danych zawartych w tabeli 1 wynika, że wartość R_{fd} była najwyższa po szóstym tygodniu pasażu. Dla liści starych R_{fd} był niższy niż dla liści młodych.

Wyniki przedstawione w tabeli 1 wskazują, że liście truskawek w kulturach są aktywne fotosyntetycznie. Świetlna faza funkcjonuje znacznie sprawniej niż ciemniowa. Sprawność funkcjonowania fotosystemów liści, które znajdowały się w kulturach od początku pasażu wzrastała do szóstego tygodnia, po czym spadała. Liście, które wyrastały w czasie trwania pasażu początkowo wykazywały niską aktywność fotosyntetyczną, która wzrastała i pozostawała na wysokim poziomie nawet po dziesięciu tygodniach.

Tabela 1

Wartość wybranych parametrów fluorescencji Ch *a* liści „wyjściowych” (starych) i utworzonych w czasie pasażu pędów truskawek odmiany Senga Sengana

Tygodnie	Rodzaj liścia	Parametry fluorescencji					
		Fv/Fm	Fm	Tfm	Sc	Fs	Rfd
0	stary	0,823	2369	354	365	1096	1,50
	nowy	—	—	—	—	—	—
6	stary	0,839 b*	2514 b	377 b	664 b	980 b	1,70 a
	nowy	0,823 a	2337 a	234 a	466 a	871 a	1,97 b
10	stary	0,817 a	2504 a	682 b	457 a	1265 b	1,08 a
	nowy	0,830 b	2768 b	406 a	642 b	956 a	1,78 b

* Analiza wariancji osobno dla danych po 6 i 10 tygodniach. Istotność różnic oceniana testem Duncana przy poziomie wiarygodności $P = 0,05$. Dane oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie.

6.2. Na pożywce z glukozą lub sacharozą

Istotne znaczenie zarówno dla wzrostu jak i fotosyntezy mają cukry dodane do pożywki. W metodzie mikrorozmnażania opracowanej przez Boxusa (20) do pożywki dodawana jest glukoza (40 g/l). Zarówno współczynnik proliferacji (liczba tworzonych pędów) jak i ogólna produkcja biomasy były znacznie wyższe na pożywce zawierającej glukozę (21).

W tabeli 2 podane zostały wyniki charakteryzujące aktywność fotosyntetyczną kultur w zależności od źródła C. Aktywność fotosyntetyczna liści z pożywki z glukozą była wyższa niż na pożywce z sacharozą. Wprawdzie wartość parametru Fv/Fm powyżej 0,800, wskazuje na prawidłowe wykształcenie aparatu fotosyntetycznego dla obu źródeł węgla, jednak w obecności glukozy Fv/Fm było istotnie wyższe. Dynamika przekazywania energii (Fm i Tfm) była taka sama dla obu wariantów pożywki. Istotnie wyższa wartość Sc wskazuje na większą pulę plastochinonu (przebieżnika energii pomiędzy PSII i PSI) w liściach kultur z pożywki z glukozą. Istotne różnice dla parametrów Fs (niższy C-glukoza) i Rfd (wyższy C-glukoza) oznaczają lepsze funkcjonowanie strony ciemniowej liści korzystających z glukozy jako źródła węgla.

Tabela 2

Wartość wybranych parametrów fluorescencji Ch *a* liści truskawek odmiany Senga Sengana z kultur rosnących na pożywce z glukozą lub sacharozą, po 6 tygodniach pasażu

Cukier w pożywce	Parametry fluorescencji chlorofilu					
	Fv/Fm	Fm	Tfm	Sc	Fs	Rfd
glukoza	0,836 b*	2461 a	352 a	435 b	1041 a	1,37 b
sacharoza	0,810 a	2349 a	341 a	244 a	1204 b	1,03 a

* Istotność różnic określana testem Duncana przy poziomie wiarygodności $P = 0,05$. Dane oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie.

Wyniki te wskazują, że mimo „gotowego” źródła energii w pożywce, pędy truskawek są aktywne fotosyntetycznie. Rodzaj cukru może obniżać lub podwyższać zdolność pędów do fotosyntezy.

W czasie przebywania w kulturach *in vitro* obniżenie aktywności fotosyntetycznej nie ma większego znaczenia dla produkcji biomasy, ze względu na istniejące konkurencyjne źródło węgla w pożywce. Zdolność do fotosyntezy ma natomiast istotne znaczenie po przeniesieniu roślin do warunków *in vivo*, kiedy rośliny muszą stać się w pełni autotroficzne (1).

6.3. W czasie aklimatyzacji

Wykonując pomiar fluorescencji chlorofilu *a* w świetle modulowanym (w naszych doświadczeniach aparatem MINI-PAM), można dokładnie określić wykorzystywanie wytworzonej energii chemicznej.

Wyniki przedstawione w tabeli 3 pokazują relacje pomiędzy zużyciem energii do asymilacji CO₂ i jego redukcji oraz strat w postaci fluorescencji i ciepła.

Tabela 3

Relacje między wygaszaniem chemicznym (qP) i nie chemicznym (qN i NPQ) kultur anturium*, po pełnym pasażu namnożeńiowym. Dane przedstawione w procentach (całkowite wygaszanie = 100%)

qP	qN	NPQ
5,7	42,0	52,3

* Podobne relacje między wygaszaniem chemicznym i nie chemicznym otrzymuje się dla kultur truskawek.

Wartość qP w kulturach *in vitro* jest niska, co wskazuje na słabe funkcjonowanie strony ciemniowej fotosyntezy. Większość zaabsorbowanej energii świetlnej jest tracona w formie fluorescencji (qN) i ciepła (NPQ).

Rośliny truskawki w czasie aklimatyzacji do warunków *ex vitro* wytwarzają nowe liście. Równocześnie na roślinie znajdują się liście wytworzone w warunkach *in vitro*. Większy udział wygaszania chemicznego i mniejszy nie chemicznego liści młodych w porównaniu do starszych wskazuje na starzenie się tych drugich i przejmowanie aktywności fotosyntetycznej przez liście młode (tab. 4). W porównaniu do liści znajdujących się w kulturach *in vitro* (tab. 3) udział wygaszania chemicznego (qP) jest bardzo wysoki, co wskazuje na wysoką aktywność strony ciemniowej fotosyntezy.

Tabela 4

Relacje między wygaszaniem chemicznym (qP) i nie chemicznym (qN i NPQ) roślin truskawki odmiana Senga Sengana, po okresie aklimatyzacji. Dane przedstawione w procentach (całkowite wygaszanie = 100%)

Rodzaj liści	qP	qN	NPQ
młode, wytworzone <i>in vivo</i>	32,4	26,0	40,6
stare, wytworzone w kulturach <i>in vitro</i>	26,6	26,9	46,5

Mimo że w czasie aklimatyzacji wzrasta fotosynteza proporcje między wygaszaniem chemicznym i nie chemicznym są ciągle znacznie gorsze niż dla roślin z warunków naturalnych. Dane zawarte w tabeli 5 pokazują relacje w wykorzystywaniu energii roślin rosnących w warunkach optymalnych i stresowych. Dane te są raczej teoretyczne, ponieważ warunki środowiskowe nigdy nie są optymalne i udział wygaszania chemicznego jest poniżej 80%.

Tabela 5

Relacje między wygaszaniem chemicznym i nie chemicznym roślin rosnących w warunkach naturalnych

Warunki	Wygaszanie chemiczne (%)	Fluorescencja (%)	Ciepło (%)
optymalne	84	2	14
stresowe	0	12	88

7. Podsumowanie

1. Metoda pomiaru fluorescencji chlorofilu *a* pozwala na precyzyjną charakterystykę przebiegu procesu fotosyntezy.

2. Kultury pędowe truskawek wykazują aktywność fotosyntetyczną. Strona świetlna fotosyntezy funkcjonuje lepiej niż ciemniowa.

3. W kulturach pędowych truskawek, glukoza dodana do pożywki jest korzystniejsza dla aktywności fotosyntetycznej niż sacharoza.

4. W czasie aklimatyzacji roślin wzrasta wykorzystanie energii chemicznej w cyklu Calvina i zmniejszają się straty na fluorescencję i ciepło.

Podstawowe jednostki i terminy

- strumień promieniowania (energii promienistej) wychodzący ze źródła światła (*radiant flux*): W (wat);
- natężenie napromieniowania – strumień energii padający na powierzchnię (*irradiance, energy flux*): $W \cdot m^{-2}$;
- strumień kwantów – mol (liczba Avogadro);
- natężenie napromieniowania kwantowego (*quantum irradiance*): $\mu mol/m^2/sek$;
- natężenie oświetlenia (*illuminance*): Lx (luks); wg SI jest to jednostka zarezerwowana dla fotometrii;

- anteny energetyczne (*LHC – light harvesting complex*). Stanowią kompleks barwników i białek;
- jednostka fotosyntetyczna (*photosynthetic unit*) – 2500 cząsteczek chlorofilu „kooperujące” z wydzieleniem jednej cząsteczki tlenu;
- kwantowa wydajność procesów fotochemicznych (*quantum yield of photochemistry*) – sprawność przemiany zaabsorbowanej energii świetlnej w energię chemiczną;
- kwantowa wydajność fotosyntezy (*quantum yield of photosynthesis*) – liczba moli zaasymilowanego CO₂ przypadająca na mol zaabsorbowanych kwantów;
- wydajność kwantowa fluorescencji (*quantum yield of fluorescence*) – stosunek wyemitowanych kwantów w zjawisku fluorescencji do zaabsorbowanych przez anteny energetyczne.

Literatura

1. Grout B. W. W., Millam S., (1985), *Ann. Botany*, 55, 129-131.
2. Sallanon H., Dimon B., Carrier P., Chagvardieff P., (1995), 241-249.
3. Serret M. D., Trillas M. I., Araus J. L., (2001), *Photosynthetica*, 39, 67-73.
4. Solarova J., Pospisilova J., Catsky J., Santrucek J., (1989), *Photosynthetica*, 23, 629-637.
5. Ticha I., (1996), *Photosynthetica*, 32, 475-479.
6. Yue De., Gosselin A., Desjardins Y., (1993), 419-424.
7. Czarnowski M., (1993), *Wiadomości Bot.*, 37, 59-72.
8. Tazawa S., (1998), publikacja elektroniczna, [http:// directory.google.com/Top/Science/Agriculture/Horticulture](http://directory.google.com/Top/Science/Agriculture/Horticulture) (search the web: Tazawa Shinji, Effects various...)
9. Serrano L., Pardos J. A., (1995), *Handbook of Plant and Crop Physiology*. Ed. Pessaraki M., Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong, 243-256.
10. Gabryszewska E., Rudnicki R., (1995), *Acta Agrobot.*, 105-111.
11. Michalczuk B., (2000), *Zeszyty Naukowe ISK*, 7, 93-98.
12. Yanagi T., Okamoto S., Takita S., (1996), *Acta Hort.*, 440, 117-122.
13. Youshie M., Kimura T., Kitaya Y., Kozai T., (1994), *Third International Symposium Artificial Lighting in Horticulture*, Noordwijkerhout, the Netherlands.
14. Borkowska B., (2002), *Materiały z rocznej konferencji COST-843: Assessment of Performance of Tissue Culture-derived Plants for Agriculture, Forestry and Pharmacy*, Koszyce, Słowacja.
15. Morini S., Sciutti R., Fortuna P., (1992), *Plant Cell, Tissue & Organ Cult.*, 28, 245-248.
16. Zenkteler E., Borkowska B., (2002), *Acta Hort.*, 567, 309-312.
17. Govindjee, (1995), *Austr. J. Plant Physiol.*, 22, 131-160.
18. Maxwell K., Johnson G. N., (2000), *J. Exp. Bot.*, 51, 659-668.
19. Serret M. D., Trillas M. I., Matas J., Araus J. L., (2001), *Photosynthetica*, 39, 245-255.
20. Boxus Ph., (1974), *J. Hort. Sci.*, 49, 209-210.
21. Borkowska B., (2000), *Acta Hort.*, 530, 333-337.