

**MASARYKOVA UNIVERZITA V BRNĚ
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE
ODDĚLENÍ FYZIOLOGIE A ANATOMIE ROSTLIN

Metody kultivace rostlinných explantátů v tekutých médiích

Matěj Róth

Bakalářská práce



Vedoucí práce:

RNDr. Jaroslava Dubová, CSc.

Brno, Česká republika, 2011

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat své vedoucí bakalářské práce RNDr. Jaroslavě Dubové, CSc. za odborné rady, vstřícnost, pomoc a trpělivost během zpracování mé práce. Dále děkuji za podnětné rady Prof. Ing. Miloši Bartákovi, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a použil pramenů a literatury uvedených na seznamu.

V Brně, dne 12. května 2011

Matěj Róth

Abstrakt

Kultivace rostlinných explantátů a jejich mikropropagace je využívána nejen při základním fyziologickém výzkumu, ale také při produkci sekundárních metabolitů nebo velkokapacitní produkci sazenic, a to jak u hospodářky významných polních plodin a lesních dřevin, tak i okrasných rostlin, ovocných stromů a keřů. Kultivace explantátů v tekutých médiích je dalším krokem ve zlepšování kvality i kvantity těchto technik a použití bioreaktorů je jeho logickým vyvrcholením. Kultivace v bioreaktorech umožňuje kultivaci za řízených podmínek, což však sebou přináší řadu nečekaných problémů a vyžaduje detailní porozumění rostlinné fyziologii, interakcím mezi vnějším prostředím a rostlinou a také vzájemným interakcím fyzikálních a chemických faktorů. Práce je zaměřena na popis základních principů kultivace explantátů v podmínkách *in vitro*, dále na faktory vnějšího prostředí ovlivňující růst explantátů, výčet typů bioreaktorů využitelných při kultivaci rostlinných explantátů a popis techniky měření indukované fluorescence chlorofylu. Součástí práce je také kultivační experiment, ve kterém byl použit bioreaktor RITA® pracující na principu dočasného zaplavování kultur a souběžného měření kvantového výtěžku fluorescence chlorofylu fluorimetrem MONI PAM 2000, které bylo použito jako indikátor fyziologického stavu explantátů.

Abstract

Cultivation of explants and their micropropagation are used not only in basic physiological research, but also in the production of secondary metabolites or production of seedlings both in economically-important field crops and forest trees, ornamental plants, fruit trees, and bushes. Cultivation of explants in liquid media is the next step in the improvement of the quality and quantity of these techniques and the use of bioreactors is a logical culmination of such trend. Cultivation in bioreactors allows explant cultivation under controlled conditions, but this brings a lot of unexpected problems and requires a better understanding of plant physiology, the interaction between the external environment and plants and also the mutual interaction of physical and chemical factors. The work is aimed at the description of the basic principles of cultivation of explants *in vitro*, as well as the environmental factors affecting growth of explants, lists the types of bioreactors that might be available for crop cultivation, explants and description of the technique of induced chlorophyll fluorescence measurements. Part of the Bc. thesis describes an experiment in which RITA ® bioreactors operating on the principle of temporary flooding of cultures were used. Simultaneously, measurements of fluorescence quantum yield of photosystem II by fluorimeter PAM MONI 2000 were done. Quantum yield was used as an indicator of physiological status of explants.

Obsah

1.	Úvod	6
1.1.	Definice a historický vývoj	6
1.1.1.	Teoretická východiska.....	6
2.	Postupy a metody kultivace rostlinných explantátů	8
2.1.	Kultury zachovávající původní genotyp.....	11
2.2.	Kultury zvyšující genetickou variabilitu	12
2.3.	Fotosyntetické procesy	14
3.	Faktory životního prostředí rostlinných explantátů.....	19
3.1.	Regulátory růstu	19
3.2.	Složení živných médií	21
3.3.	Světelné podmínky kultivace	25
3.4.	Tepelné podmínky kultivace	28
3.5.	Kultivační atmosféra	28
3.6.	Relativní vlhkost.....	32
3.7.	Vzájemné působení faktorů životního prostředí a aklimatizace.....	33
4.	Bioreaktory	35
4.1.	Bioreaktory použitelné pro produkci rostlinných explantátů	38
4.2.	Bioreaktory s mechanickou agitací (<i>mechanically agitated bioactors</i>).....	39
4.3.	Bioreaktory s pneumatickou agitací (<i>pneumatically agitated bioactors</i>)	40
4.3.1.	Bioreaktory s pravidelným zaplavováním (<i>temporary immersion bioreactors</i>)	44
4.4.	Bioreaktory bez agitace (<i>non-agitated bioactors</i>).....	47
5.	Bioreaktory RITA® - praktická část	51
5.1.	Cíle experimentu	51
5.2.	Charakteristika bioreaktoru RITA®.....	51
5.3.	Materiál a metody.....	54
5.4.	Výsledky a diskuze.....	55
6.	Použitá literatura.....	61

1. Úvod

1.1. Definice a historický vývoj

Jako explantát je označován každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo soubor orgánů, který je vytržen z korelačních vztahů celku a je pěstován v umělých podmínkách (Bauer, 1939). Využití kultur explantátů se nevztahuje pouze na vědecký výzkum, ale i na komerční sektor, který touto metodou produkuje sazenice nebo rostlinné sekundární metabolity. K těmto účelům byly vyvinuty různé metody kultivace explantátů, a to jak na ztužených médiích tak i v tekutých médiích.

Teoretické začátky těchto metod lze vystopovat v 19. století, kdy se začalo experimentovat s rostlinami a byly položeny základy rostlinné fyziologie studující význam minerálních živin a dalších látek na vývoj rostlin. V této souvislosti lze připomenout pražské experimenty Julia Sachse, které jsou zahrnuty v jeho knize *Handbuch der Experimental-Physiologie der Pflanzen* (Sachs, 1865). V této práci jsou základy hydroponických kultur. Jedním z prvních experimentátorů na poli izolovaných rostlinných pletiv byl Gottlieb Haberlandt. Jeho publikace *Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen* vyšla v časopise *Sitzungsberichte der Wissenschaftlichen Akademie zu Wien* (Haberlandt, 1902). Haberlandtovy pokusy ale nebyly velmi úspěšné, protože si jako objekt kultivace vybral diferencovaná listová pletiva a v té době nebyly ještě známy potřebné informace týkající se desinfekce a výživy kultur nebo existence růstových regulátorů. Proto přežívání jeho kultur bylo jen krátkodobé.

1.1.1. Teoretická východiska

Kultivační techniky *in vitro* vycházejí z předešlých pokusů rostlinných fyziologů a metodik kultivace mikroorganismů v mikrobiologii. Pokusy se prováděly na ztužených médiích, které explantáty upevňovaly a poskytovaly jim oporu, aby se celý explantát neponořil do média a neuhynul na následky hypoxie. Paralelně se však začaly rozvíjet i techniky využívající média tekutá. Tekutá média oproti ztuženým mají homogennější prostředí, umožňují lepší difúzi látek a snadnější automatizaci procesu kultivace. U jednoduššího typu kultur, které používají menší nádoby jako jsou např. Erlenmayerovy baňky, je celá rostlinná biomasa ponořena v kultivačním médiu. Aby nedošlo k udušení pletiv, bylo nutné zajistit nějakým způsobem jejich aeraci. Pro tyto účely se používal papírový nebo plastový můstek, který by držel explantát nad hladinou média a současně umožňoval kontakt s živným médiem. Jiný přístup využívá promíchávání tekutého obsahu kultury pomocí třepaček nebo rolerů.

Následoval další vývoj pracovních protokolů, aparatur a samotných kultivačních nádob, do kterého zasáhl objev účinků ethylenu na rostlinná pletiva a zjištění, že v případě příliš těsného uzavření kultivačních nádob dochází uvnitř k jeho hromadění. Tato skutečnost vyvolala nutnost provětrávání kultivační atmosféry při současném zajištění sterility kultury. Postupně byly vyvinuty různé plyn propouštějící filtry a sítky, ty ovšem nebyly příliš úspěšné, protože rychlost výměny plynů uvnitř nádoby byla velmi pomalá.

V šedesátých a sedmdesátých letech nastal velký rozmach vývoje kultivačních technik v tekutých médiích a to především díky financování biotechnologií ze strany farmaceutických společností, které v tomto odvětví viděly velké možnosti pro produkci sekundárních metabolitů. Bohužel velká očekávání se dosud zcela nenaplnila, protože dosud nejsou dostatečně pochopeny všechny principy fungování a regulace rostlinného metabolismu v umělých podmínkách. Komerční kultivace rostlin v *in vitro* podmínkách se v současné době prosadila hlavně na poli propagace sazenic a to hlavně u okrasných rostlin i u geneticky modifikovaných zemědělských plodin.

Komerční sféra se zaměřuje hlavně na automatizaci jednotlivých kultivačních etap a tím na snížení výrobních nákladů, protože největším nákladem je cena lidské práce, kdežto výzkum se ubírá směrem optimalizace environmentálních podmínek uvnitř kultivačních nádob a zařízení, a tím dosažení vitálnějšího růstu a snížení míry mortality po převodu do nesterilních (*ex vitro*) podmínek. Tyto dva úhly pohledu se více či méně daří spojit dohromady s použitím různých bioreaktorů založených na principu spojených nádob a vyměňujících kultivační atmosféru s prostředím. Tyto snahy byly patrné již od 60. let minulého století, kdy např. Heller (1965) zmiňoval možnost využití takového principu pro *in vitro* kultivaci. Pravděpodobně jako první tohoto systému užili u explantátových kultur Tisserat a Vandercook (1985), avšak až v posledních dvaceti letech tyto systémy dosáhly praktického uplatnění (Alvard *et al.*, 1993) v podobě bioreaktoru RITA® (CIRAD, Francie).

Velmi důležitým faktorem charakterizujícím úspěšnost či neúspěšnost kultivace *in vitro* je kondice vypěstovaných rostlin, která je velmi důležitá pro jejich další přežití ve vnějším prostředí. Většina metod určujících fyziologický stav rostlin je destruktivní a pro účely mikropropagace se nehodí. A proto se v poslední době začíná používat pro charakteristiku fyziologického stavu rostlin nedestruktivní metoda hodnocení jejich fotosyntetické aktivity, měřením fluorescence chlorofylu. Někteří autoři, např. Ibaraki (2006), používají jako kritérium fotosyntetické aktivity maximální teoretický kvantový výtěžek.

2. Postupy a metody kultivace rostlinných explantátů

Experimentální systémy založené kultivací rostlinných buněk a pletiv lze charakterizovat jako použití izolovaných částí rostlin, tzv. explantátů, získaných z intaktní rostliny a jejich kultivaci ve vhodném živném médiu. Toto živné médium slouží jako náhrada za látky dodávané okolními buňkami, pletivy, nebo vodivými elementy původně sousedícími s explantátem. Tyto experimentální systémy jsou obvykle udržovány za aseptických podmínek.

Pomocí buněčných a pletivových kultur může současná věda studovat zákonitosti růstu a rozvoje rostlin, zejména biochemických a fyziologických reakcí buněčného materiálu na různé faktory v řízených podmínkách, s nadějí na získání vhledu do života intaktní rostliny i v jejím přirozeném prostředí (Neumann *et al.*, 2009). Ve srovnáním s použitím celistvé rostliny je hlavní výhodou těchto systémů poměrně snadná manipulace s chemickými a fyzikálními faktory růstového prostředí. S výhodou mohou proto být zkoumány reakce rostlinných explantátů na proměnlivé zásobené živinami, rostlinnými hormony, stopovými prvky, případně jinými látkami. Rovněž studium působení fyzikálních faktorů na růst buněk či pletiv je jednodušší než u celé rostliny nebo populace.

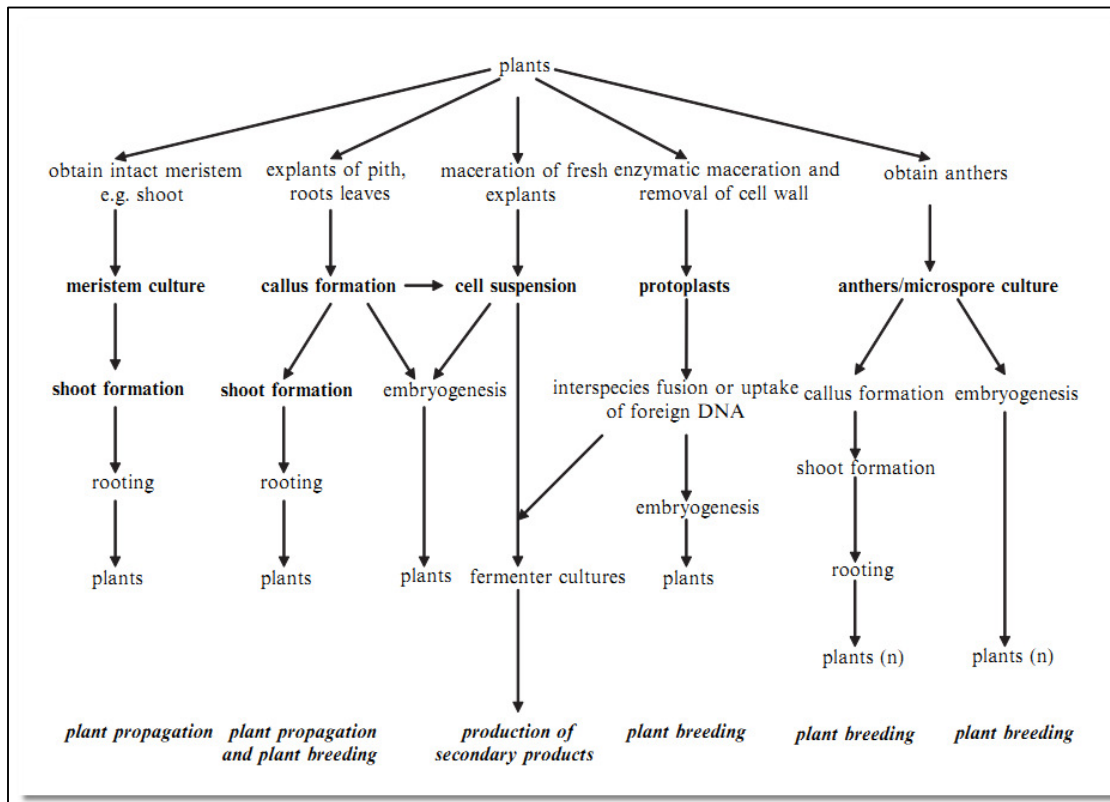
Výhody těchto systémů jsou však vyváženy některými nevýhodami. Především heterotrofní a mixotrofní systémy vyžadují potřebné živiny, vysoké koncentrace organických látek (zejména cukru 2% i více), což je spojené s vysokým rizikem mikrobiální kontaminace. Další nevýhodou je omezení extrapolace výsledků získaných *in vitro* na celé rostliny rostoucí v přirozených podmínkách. Pletivové kultury jsou proto pouze modelovými systémy a výsledky v nich získané se zpravidla ověřují doplňkovými experimenty *in vivo*.

Oblast buněčných a „tkáňových“ kultur je poměrně široká. Techniky explantátových kultur se nazývají především podle jednotlivých typů kultur. Někdy jsou nazývané podle metodologie (např. mikropropagace).

Pokud jde o praktické aspekty, lze v zásadě podle Neumanna *et al.* (2009) rozdělit metody *in vitro* kultur na pět oblastí (viz Obr. 1):

- **kalusové kultury,**
- **buněčné (suspenní) kultury,**
- **protoplastové kultury,**
- **prašňkové kultury,**

- **meristémové (orgánové) kultury.**



Obr. 1 Schématické zobrazení hlavních oblastí rostlinných buněčných a pletivových kultur a některé oblasti jejich použití. Podle autorů Neumann *et al.* (2009).

Z hlediska biotechnologií a jejich využití ve šlechtitelství rozdělují Seman *et al.* (1990) techniky kultur explantátů do dvou hlavních kategorií:

- **techniky zachovávající původní genotyp a**
- **techniky indukce genetické variability.**

O genetické stabilitě kultury rozhoduje průběh morfogeneze. Je závislá na vlastnostech původního explantátu, na složení živného média – především na typech a koncentraci použitých růstových regulátorů a na průběhu diferenciaci během kultivace *in vitro*. Geneticky stabilní systém *in vitro* je vázán na organizovaný typ vývinu *in vitro*. Je u něj eliminována fáze dediferenciaci a kalusového růstu. Tato podmínka je splněna pouze u meristémových a embryonálních kultur. Variabilita kalusových kultur a kultur z nich vycházejících může být spontánní nebo záměrně vyvolaná působením různých faktorů.

Typy regeneračních procesů (Němec, 1905) lze rozdělit na **restituci** (meriklonální množení – meristémy), **reprodukcí** (regeneraci z již existujících základů) a regeneraci *de novo* (odvozování přes kalus, v něm diferenciací adventivních pupenů).

Pojmy **rozmnožování rostlin, mikropropagace, klonování *in vitro* (meristémové kultury, somatické embryogeneze)** jsou názvy pro stejnou skupinu technik, které dnes patří již ke klasickým metodám rozmnožování rostlin komerčně ve velkém měřítku (*mass propagation*). V tomto případě nejčastěji izolované primární nebo sekundární meristémy se hromadně množí za účelem získání rostlin v zahradnictví, lesnictví i zemědělství.

Z hlediska morfogeneze a vlastností buněk, které jsou jim dány geneticky (totipotence, dediferenciací, regenerace) lze rozdělit explantátové kultury na dva základní typy (George, 2008, Neumann *et al.*, 2009):

- **kultury z diferenciováných orgánů** (determinovaných), z orgánů s určenou strukturou a funkcí, např. listy, stonky, květy atd., s ukončeným nebo omezeným růstem. Velmi zajímavé z šlechtitelského hlediska jsou protoplastové kultury (*Protoplast cultures*), které umožňují somatickou hybridizaci. Jedná se vlastně o kultury buněk zbavených buněčných stěn. A nakonec prašnickové kultury (*Anther cultures*), díky kterým je možné získat velmi rychle homozygotní linie.
- **kultury z nediferenciováných orgánů** (nedeterminovaných), z orgánů, kde růst je potenciálně neomezený (nekvetoucí výhonky, apikální meristémy kořenů). Nediferencované kultury zahrnují meristémové kultury (*Meristem cultures*), které obvykle neobsahují jenom vlastní meristémy, ale i listová primordia. Tyto bývají většinou využívány při ozdravování rostlin od virových infekcí. Protože tyto části rostliny ještě nemají vodivá pletiva, je zamezeno šíření virových infekcí, které se mohou jimi šířit. Dalším příkladem mohou být kultury stonkových apexů (*Shoot cultures*), které většinou neobsahují pouze apikální meristém, ale i meristémy úžlabních pupenů. Těmito jsou velice podobné kultury nodálních segmentů (*Node cultures*). Poněkud méně obvyklé jsou kultury izolovaných kořenů (*Isolated root cultures*) a embryonální kultury. Nediferencované kultury zahrnují kalusové kultury (*Callus or tissue cultures*), které tvoří neorganizované pletivo, suspenzní nebo buněčné kultury (*Suspension or cell cultures*), které jsou velmi podobné kulturám kalusovým pouze s tím rozdílem, že se jedná o suspenzi buněk nebo shluků buněk.

Diferenciované rostlinné orgány mohou být pěstovány v kultuře bez ztráty integrity. Původně se předpokládalo, že nediferenciované části rostlin neumožní vznik nové rostliny tak, jak to umožňuje i z historie známé nepohlavní množení rostlin z determinovaných orgánů. Současné výsledky výzkumu v této oblasti spolu s technologickým rozvojem metodik však potvrdily opak.

2.1. Kultury zachovávající původní genotyp

V současné době existuje několik technik, které v podmínkách *in vitro* umožňují rozmnožování rostlin bez významnějších genetických změn. Patří sem kultury, které umožňují klonování *in vitro*. Jsou to meristémové kultury a embryonální kultury.

Meristémové kultury

Meristém vhodný na založení kultury *in vitro* definoval Holings (1965) jako strukturu obsahující vlastní apikální meristém a jeden až dva páry listových primordií. Tento typ kultury se běžně označuje jako meristémová kultura.

Meristémové kultury jako výchozí materiál využívají apikální části stonků (resp. kořenů), která se skládá z vlastní meristemické zóny vrcholu a několika listových primordií (základů). Explantáty používané k mikropropagaci mají velikost 0,5-3 mm. V podmínkách *in vitro* je možné kultivovat i samotnou meristemickou zónu 0,3-0,5mm, čehož se využívá spíše v základním výzkumu, nebo při ozdravování kultur od virových infekcí (Kováč, 1992). Tento způsob klonálního množení funguje na základě toho, že za každým listem se nachází spící (dormantní) pupen, který je inhibován apikální dominancí a díky metodám *in vitro* (přidáním cytokinu do media) je možné tuto dominanci přerušit a indukovat axilární růst, a tak znásobovat počet regenerantů. Tento proces je možné neustále opakovat k dosažení potřebného počtu rostlin. Poté musejí být prýty přeneseny na medium s nižším obsahem cytokininů (popřípadě bez nich) a s vyšším obsahem auxinů, čímž je dosaženo jejich zakořenění, případně mohou být prýty zakořeňovány po přenosu do *ex vitro* podmínek.

Embryonální kultury

Embryokultury můžeme rozdělit (Kováč, 1992) na kultury izolovaných zygotických embryí (bipolární struktura s plně diferencovaným kořenovým a stonkovým meristémem) a kultury proembryí (veškerá stadia nezralých zárodků předcházející diferenciaci děloh).

Přímá embryogeneze je charakteristická vznikem somatických embryí na primárních explantátech z pletiv označovaných jako proembryogeneticky determinovaná. Jsou to pletiva

zygotických embryí, děložních lístků a hypokotylu klíčnicích rostlin nebo meristémů. Tento způsob množení byl popsán u mrkve, vojtěšky, vinné révy, citrusů atd.

Při somatické embryogenezi vznikají embrya z jiných buněk, než z oplozených vajíček resp. zygoty. Při tomto procesu je nejprve nutné z diferenciovaného pletiva odvodit embryogenní kalus, který je tvořen malými na cytoplazmu bohatými buňkami. K indukci z primárního explantátu se používá růstový regulátor 2,4-D. Pro odvození embryogenního kalusu jsou stejně, jako u přímé embryogeneze vhodná pletiva embryí, ale také jiná juvenilní pletiva, jako například květní primordia, prašníky, pylová zrna atd. Somatická embrya během svého vývoje procházejí stejnými vývojovými fázemi jako embrya zygotická. První somatická embrya odvodil v roce 1958 Steward z kalusu mrkve. Embryogeneze je vysoce specifický proces, kterého bylo v podmínkách *in vitro* dosaženo pouze u některých druhů rostlin. Avšak představuje velmi výnosnou variantu rozmnožování rostlin a proto je intenzivně zkoumána.

Rozhodující fází ve vývoji embryí je po ustavení jejich struktury dozrávání – maturace (Lipavská a Konrádová, 2004). Z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících maturaci, je dostupnost sacharidů.

Somatická embryogeneze, pokud je indukovatelná, představuje kromě množení i výtečný model pro studium zárodečného vývoje rostlin.

2.2. Kultury zvyšující genetickou variabilitu

Kalusové kultury

Morfogenezi *in vitro* kultury podmiňují především dva druhy růstových regulátorů - cytokininy a auxiny. Pokud jsou hormony v kultivačním médiu v rovnováze, dochází k tvorbě kalusu (Neumann *et al.*, 2009). Kalus vzniká neorganizovanou proliferací buněk explantátu. Je to nepravidelně strukturovaný shluk buněk, které jsou různého tvaru a velikosti a v různém stadiu diferenciaci. Kalusy jsou schopny zpětně tvořit organizované struktury, které tak představují nepřímou diferenciaci pupenů, výhonků, kořenů nebo somatických embryí. Kalus můžeme teoreticky získat kultivací kterékoliv části rostliny. Největší kompetencí však disponují buňky méně diferencované a vývojově mladší.

V průběhu tvorby kalusu dochází k určitému stupni dediferenciaci. Hlavním důsledkem této dediferenciaci je u většiny kultur ztráta schopnosti fotosyntézy (Slater *et al.*, 2003). Na tvorbu kalusu mají kromě složení živného média vliv jak kultivační podmínky, tak zdroj explantátu i genotyp mateřské rostliny. Kalusy indukované z explantátu mohou být udržovány izolovaně

i několik let v kontinuální kultuře opakovanou subkultivací na čerstvé živné médium s vyváženým obsahem auxinu a cytokininu.

Uchovávané kalusové kultury jsou cenným východiskovým materiálem pro různé využití, například na regeneraci nových rostlin, nebo na založení buňkových suspenzních kultur (Vanisree and Tsay, 2004; Vanisree *et al.*, 2004).

„Tkáňové kultury“ jsou hojně využívány pro studium a často i řízenou produkci cílových **sekundárních metabolitů**. *In vitro* kultivace je výhodná, neboť poskytuje čisté látky bez nutnosti dalších technologických mezikroků. Proto jsou *in vitro* techniky v posledních desetiletích intenzivně využívány pro pěstování rostlinných druhů s vysokou tvorbou farmaceuticky účinných látek a stávají se nedílnou součástí komplexních výzkumů rostlin využitelných v biotechnologiích. Přesto však, po mnoha letech biochemických výzkumů, prozatím rozumíme fyziologickým jevům v *in vitro* kulturách pouze omezeně. Mechanizmy produkce sekundárních metabolitů a strategie zlepšení produkce metabolitů v *in vitro* kulturách popsal Hermann *et al.* (2009).

Buněčné suspenze (kultury)

V ideálním případě jsou v buněčné kultuře izolovány všechny buňky. V praktických podmínkách je však obvyklý vysoký výskyt mnohobuněčných agregátů. To se řeší zvyšováním hladiny enzymů, mechanickou macerací, nebo mícháním v tekutém médiu. Buněčné suspenze se skládají z nejrůznějších buněk a jsou méně homogenní, než kalusové kultury (Neumann *et al.* 2009).

Protoplastové kultury

V tomto případě jsou enzymaticky odstraněny buněčné stěny a explantát je tak tvořen kulturou jednotlivých buněk obalených pouze plazmatickou membránou. Z těchto protoplastových kultur jsou rostliny regenerovány procesem somatické embryogeneze. Tato metoda nachází využití při zkoumání procesů regenerace, transportu živin, při mezidruhové asexuální hybridizaci a regeneraci rostlin v šlechtitelských programech (Neumann *et al.* 2009).

Prašníkové nebo mikrosporové kultury

Kultivací prašníků nebo mikrospor izolovaných z prašníků za vhodných podmínek můžeme získat haploidní rostliny prostřednictvím somatické embryogeneze. S použitím látek blokujičích tvorbu mikrotubulů, např. kolchicinu, je možné dosáhnout vývoje dihaploidů. Metody prašníkových kultur jsou výhodné pro získání homozygotních rostlin a jejich následnou hybridizaci ve šlechtitelství (Neumann *et al.* 2009).

2.3. Fotosyntetické procesy

Základní fotosyntetické děje (světelná fáze fotosyntézy) se odehrávají v chloroplastech na thylakoidní membráně a jejím okolí. Z fluorescenčního hlediska je důležitý fotoaktivní pigment P680 účastnící se lineárního elektronového transportu, který zachytává světelné kvantum, a tím excituje elektron, který přechází systémem redoxních přenašečů do reakčního centra P700. Při tomto průchodu elektronu se vytváří H⁺ na vnitřní stranu thylakoidu, a tak vzniká protonový gradient, který je schopen dodávat energii nutnou pro tvorbu ATP z ADP a P NADPH z NADP+H.

Energie světelného záření je ve fotosyntetickém aparátu zachycena nejprve ve světlosběrných komplexech a poté ve formě vln (excitonu) navedena do reakčních center. Molekuly chlorofylu jsou touto energií excitovány, tj. přecházejí do energeticky vyššího, avšak nestabilního stavu. Poté mohou takto energetizované molekuly podstoupit jeden ze tří možných způsobů deexcitace, a to že je buď' užito ve fotosyntetických dějích, jistá část této energie ve formě excitovaných elektronů se přemění na teplo jejich návratem do původního neexcitovaného stavu nebo je vyzářena zpět v podobě fluorescence chlorofylu. Tyto tři procesy (disipace energie v podobě tepla, fluorescence nebo fotochemie) mezi sebou soutěží. Změna kvantového výtěžku jakéhokoliv z těchto tří de-excitačních procesů se projeví změnou v ostatních dvou. Díky tomu mohou změny fluorescence poskytnout informace o účinnosti fotochemických dějů. (Maxwell and Johnson 2000). V listech zdravých rostlin v optimálních podmínkách je zhruba 80 % absorbované světelné energie použito ve fotochemických procesech, 15 % je vyzářeno v podobě tepla a asi 3 - 5 % je re-emitováno na principu fluorescence na delších vlnových délkách než původně přijaté světlo (Soukupová and Roháček 2003). Množství fluorescence by se mohlo zdát zanedbatelné, ale díky moderním dostatečně citlivým technikám jsme tuto fluorescenci schopni měřit a také interpretovat, díky čemuž získáváme užitečné informace o aktuálním stavu fotosyntézy potažmo o celkovém stavu rostliny. I když tam, kde to situace dovolí, je vhodné tuto techniku využít spolu například s gazometrickými metodami, které kvantifikují rychlost fotosyntetické fixace molekul CO₂.

Metoda měření fluorescence chlorofylu

V posledních letech se technika měření indukované fluorescence chlorofylu často využívá při popisu fyziologického stavu rostlin, a to hlavně díky rozšíření relativně levných a snadno ovladatelných přenosných fluorimetrů.

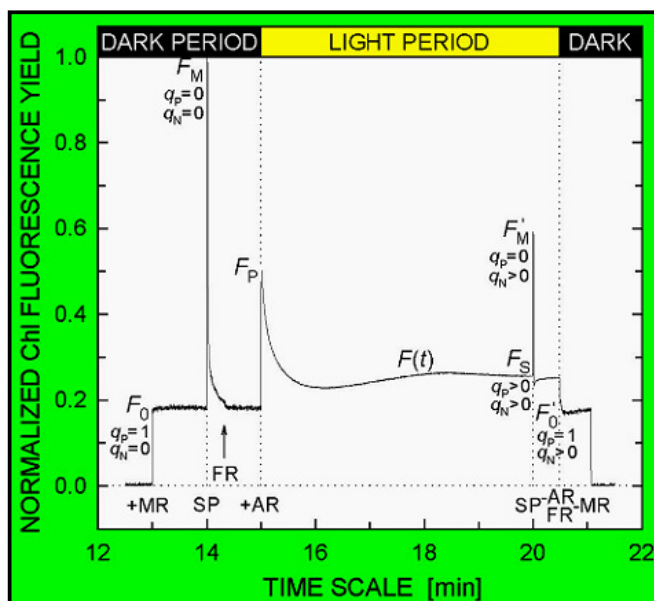
K popsání procesu emise fluorescence byl zaveden termín kvantový výtěžek fluorescence Φ_F , který bývá i nejčastěji využíván a který je definován jako podíl počtu všech vyzařených fotonů (n_f) a počtu všech absorbovaných fotonů (n_a):

$$\Phi_F = n_f / n_a .$$

Kvantový výtěžek fluorescence chlorofylu se dá vyjádřit i jinými způsoby, např. jako v následující obecné rovnici:

$$\Phi = I_F / I_A = k_F / \Sigma k_i,$$

kde I_F intenzitu fluorescence, I_A intenzitu absorbovaného záření, k_F rychlostní konstantu procesu emise fluorescence a Σk_i představuje sumu rychlostních konstant všech konkurujících si procesů, které vedou k návratu molekuly Chl z excitovaného do základního stavu. (Soukupová and Roháček 2003, Roháček and Barták 1999). V experimentální praxi je tento parametr označován nejčastěji jako Φ_{PSII} (kvantový výtěžek fotochemických procesů ve fotosystému II). Jako takový může poskytnout informaci o množství elektronů proudících lineárním transportem elektronů, tzn. údaj o celkové fotosyntéze. V laboratorních podmínkách existuje silná lineární vazba mezi tímto parametrem a účinností fixace uhlíku, avšak k rozdílu mezi těmito dvěma parametry může dojít za určitých podmínek stresu, v důsledku změn v rychlosti fotorespirace nebo pseudocycklického transportu elektronů (Fryer *et al.*, 1998). Vzhledem k tomu může být Φ_{PSII} (kvantový výtěžek) fotochemie PSII použit pro výpočet rychlosti lineárního elektronového transportu (J), a tedy celkové kapacity fotosyntézy *in vivo* (Genty *et al.*, 1989). Využití tohoto parametru ve fotosyntetických a produkčně biologických studiích shrnují přehledně například (Maxwell and Johnson 2000), (Roháček *et al.* 2008).



Obr. 2 Fluorescenční indukční křivka chlorofylu (Soukupová and Roháček, 2003)

Meření kvantového výtěžku (Φ_{PSII}):

a) s využitím světla vytvářeného fluorimetrem

Změny v kvantovém výtěžku fluorescence poprvé pozoroval Kautsky a Hirsch v 30. letech minulého století (Kautsky and Hirsch, 1931). Bylo definováno množství fluorescenčních parametrů a i množství vzorců pro tyto parametry. Na Kautského počest byla pojmenována fluorescenční indukční křivka chlorofylu (Obr. 2). K jejím základním parametrům patří minimální fluorescence F_0 . Tuto veličinu je možné zaznamenat pomocí slabého měřicího modulovaného záření v temnostně adaptovaném stavu, kdy jsou všechna reakční centra fotosystému II. a navazující elektronové přenašeče neoxidovány.

V listech adaptovaných na tmu po ozáření slabým modulovaným zářením se všechna reakční centra PSII „otevrou“ - reoxidují a může být zaznamenán minimální výtěžek fluorescence chlorofylu (F_0). Hodnota F_0 je nezávislá na fotosyntetické aktivitě a je konstantní. Krátce potom se vzorek ozáří krátkým saturačním pulzem, dojde k „uzavření“ reakčních center PSII – dojde k redukci většiny elektronových akceptorů. To se projeví prudkým vzrůstem fluorescence chlorofylu (během 0,1 – 0,2 s), který bývá považován za maximální F_M . Fluorescence se zvyšuje až do bodu F_P (peak), což je maximum při dané hodnotě ozáření, a pak pomalu klesá, až se ustálí na určité hodnotě F_S (steady state).

Rozdíl mezi F_M a F_0 je označován jako **maximální výtěžek variabilní fluorescence** v temnostně adaptovaném stavu F_V . F_V lze vypočítat ze vztahu:

$$F_V = F_M - F_0 .$$

Jednou z metod, jak odhalit vliv nejrůznějších faktorů na fyziologii rostlin pomocí fluorescence chlorofylu je sledování poměru F_V / F_M . Tento poměr je nazýván jako **maximální kvantový výtěžek chlorofylu** v temnostně adaptovaném stavu nebo též maximální kvantový výtěžek efektivity PSII. Je to podíl mezi maximální variabilní a maximální fluorescencí chlorofylu. Určuje míru maximální fotochemické kapacity FS II a jeho střední hodnota u mnoha druhů rostlin v optimálních podmínkách nabývá hodnot 0,75 – 0,85. Působení stresových faktorů tuto hodnotu snižuje.

Pozorované změny ve výtěžku fluorescence, jsou zapříčiněny současně působícími procesy fotochemickými a nefotochemickými. Fotochemické procesy souvisí s rozdělením náboje v reakčních centrech PSII, které je spojeno se změnami účinnosti dějů v elektronovém transportním řetězci. Nefotochemické procesy zahrnují vytváření pH-gradientu, nezářivou disipaci energie na teplo v thylakoidních membránách, fosforylaci mobilních světlosběrných komplexů PSII, fotoinhibici reakčních center PSII atd.

Při záznamu kvantového výtěžku fluorescence rozeznáváme dvě fáze. Rychlá fáze fluorescenční indukce v čase mezi F_0 a F_p souvisí s primárními procesy fotochemie na PSII. Pomalá fáze mezi body F_p a F_s souvisí s přechodem fotosyntetického aparátu z temnostně do světelně adaptovaného stavu, který je charakteristický nepřetržitou syntézou ATP, NADPH+H⁺ a souběžnou fixací CO₂. Po ustanovení rovnováhy mezi procesy elektronového transportu a spřaženými biochemickými reakcemi se dostává i výtěžek fluorescence do ustáleného stavu tzv. *steady-state* – F_s . Při použití saturačního pulzu v tomto světelně adaptovaném ustáleném stavu získáváme maximální kvantový výtěžek fotosynézy (F_M'). Následně je aktinické záření vypnuto a proběhne krátký pulz dlouhověkého červeného záření, které napomáhá reoxidaci akceptorové strany PSII, a poté je zaznamenán minimální výtěžek fluorescence ve světelně adaptovaném stavu F_0' . Pak je možné určit maximální výtěžek variabilní fluorescence ve světelně adaptovaném stavu (F_V') podle vztahu:

$$F_V' = F_M' - F_0'$$

Stanovení Φ_{PSII}

$$\Phi_2 = (F_M' - F_s) / F_M' = \Delta F / F_M' \quad (0 \leq \Phi_2 < 1)$$

b) s využitím externího světelného zdroje

V současné době nejvíce používanými přístroji pro měření fluorescence (fluorimetry) jsou fluorimetry pracující na principu Plzní amplitudové modulace (PAM) fluorescenčního signálu (tzn. že je zdroj měřícího signálu s vysokou frekvencí zapínán a vypínán a detektor je vyladěn pouze pro měření fluorescence excitované měřícím zářením). Lze jimi přesně měřit fluorescenci chlorofylu dokonce i na pozadí denního světla v polních podmínkách (Maxwell a Johnson, 2000, Soukupová a Roháček, 2003).

c) pomocí zobrazovacích metod

Fluorimetry se dělí na nezobrazovací a zobrazovací. Nezobrazovací fluorimetry integrují fluorescenční signál z celého měřeného vzorku, kdy výstupem měření je jediná fluorescenční indukční křivka nebo soubor fluorescenčních parametrů pro daný vzorek. Lze jimi měřit velmi rychlé procesy na fotosyntetické membráně. Zobrazovacími fluorimetry nelze měřit primární fotosyntetické procesy na velmi malých ploškách (pixelech) tvořících obraz fotosyntetizujícího objektu (například listu), ale zároveň umožňují zobrazit změny fluorescence nebo parametrů z ní odvozených (například Φ_{PSII}) na celé ploše objektu. Tím lze zobrazit prostorovou heterogenitu zkoumaného vzorku, a to jak na mikroskopické (μm), tak makroskopické úrovni. Zobrazovací fluorimetry lze využít např. k lokalizaci působení stresového faktoru dříve, než jsou důsledky patrné volným okem (Soukupová and Roháček 2003).

Využití Φ_{PSII} pro indikaci radiačním a teplotním stresem

Jak již bylo uvedeno, fluorescence chlorofylu poskytuje informace o stavu fotosystému II., což nám může napovědět, do jaké míry PSII využívá energii pohlcenou chlorofylem a do jaké míry je poškozen nadměrným ozářením. To nám dává možnost odhadnout účinnost fotosyntetického aparátu, za podmínek, ve kterých by jiné metody selhaly, a to nedestruktivně a relativně rychle (jedno měření trvá obvykle 10 minut). PSII je také vnímán jako nejzranitelnější část fotosyntetického aparátu ke světlem indukovanému poškození. Poškození PSII může být často prvním projevem stresu v listu. Přestože fluorescence je efektivní technikou, má svá omezení. Souborné fyziologické, ekofyziologické či produkčně-biologické studie zpravidla nevyužívají fluorimetrii jako jedinou metodu, ale kombinují ji s jinými technikami, zejména s měřením čisté rychlosti fotosyntézy pomocí výměny plynů (infračervené analyzátoři CO_2). To pak umožňuje získat úplnou představu o reakcích fotosyntézy rostlin na jejich dlouhodobé i krátkodobé změny v prostředí, ve kterém rostou (Maxwell and Johnson 2000).

3. Faktory životního prostředí rostlinných explantátů

Environmentální faktory ovlivňující růst rostlin v prostředí *in vitro* jsou především světlo, teplota a složení kultivačního prostředí. Tradiční pohled na kulturu rostlinných pletiv zahrnuje umístění malého kousku pletiva na rosolovitý povrch ztuženého média v nádobě a umožňuje exponenciální růst v jednotném mikroprostředí.

In vitro kultura je polouzavřený systém, který poskytuje asepticky kyslík, vodu, organické zdroje uhlíku (nebo CO₂ a světlo), živiny a regulátory růstu rostlin při regulované teplotě. Živné médium nahrazuje část přírodních podmínek a zdrojů látek nezbytně nutných k regeneraci.

Mezi základní parametry ovlivňující úspěšnost kultury patří především endogenní faktory ovlivňující kvalitu výchozího materiálu jako zdroje explantátů, tedy rostlina, její fyziologický a genetický stav, dále udržení sterility kultivace, které vyžaduje desinfekci použitého materiálu i speciální manipulace. K exogenním faktorům patří složení živného média (výživa, růstové regulátory, osmotická hodnota) a fyzikální faktory zahrnující teplotu a osvětlení (Hermann, 2009).

Specifikaci podmínek kultivace nelze chápat pouze staticky. Pokud bychom dokázali udržet externí podmínky kultivace konstantní, i tak musíme počítat s dalším faktorem, kterým jsou: změny látkového složení kultivační atmosféry a kultivačního média v průběhu kultivace v důsledku životních procesů rostlin. Změny složení plynů v kultivační nádobě, hromadění „odpadních“ látek v kultivační atmosféře a v médiu může významně ovlivnit růst a vývoj kultury. Taktéž pokles obsahu živin v médiu omezuje růst kultur, a proto je třeba tyto látky pravidelně doplňovat, což se provádí buď pasážováním kultury na čerstvé médium nebo s použitím podpurných zařízení bioreaktorů pro doplňování živin a výměnu plynné fáze.

3.1. Regulátory růstu

Je obtížné empiricky zkoumat účinky různých růstových regulátorů na růst a fyziologii. Vliv jednotlivých koncentrací růstových regulátorů se bude lišit v závislosti na různých proměnných, jako je tok fotonů, teplota, koncentrace anorganických živin, pH a přítomnost či nepřítomnost dalších regulátorů. Například Davies *et al.* (2002) ukazují, jak vliv ABA na růst a funkčnost stonků závisí na pH média a místní koncentraci vápníku na místě interakce v listu. Z těchto a dalších důvodů je vhodné vyhnout se příliš dogmatickému postupu, co se týče složení média, pokud všechny jiné rostlinné a kultivační proměnné jsou dobře definovány, protože rostlinné

proměnné se budou dramaticky lišit s věkem, vývojovou fází a fyziologickým stavem matečních rostlin.

Růst a organogeneze *in vitro* jsou vysoce závislé na interakci mezi přirozeně se vyskytujícími endogenními látkami ovlivňujícími růst a obdobnými syntetickými regulátory růstu, které mohou být přidány do média. Zjištění endogenní hladiny fytohormonů může být stanoveno, ale jen pracně s použitím fyzikálně-chemického zařízení anebo pomocí imunologických metod, které samy o sobě musí být ověřeny pomocí fyzikálně-chemických technik, jako je GC-MS (plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie). To znamená, že je často obtížné přesně charakterizovat počáteční stav explantátů a pak jsou mnohdy účinky různých růstových regulátorů na růst zjišťovány pouze empiricky. Růstové regulátory mohou navodit morfogenezi *de novo* na médiích obsahujících suboptimální koncentrace solí a podstatně zvýšit morfogenezi na jinak optimálním médiu (Margara, 1969). Účinek růstového regulátoru nebo kombinace regulátorů bude záviset i na ostatních složkách média (George and Davies, 2008).

Růstové regulátory jsou velmi důležitou součástí kultivačních médií. Můžeme je rozdělit na přirozené a syntetické. Přirozené regulátory jsou vytvářeny rostlinou samotnou (fytohormony), které jsou produkovány v určité části rostliny za účelem vyvolat v jiné části rostliny odpovídající reakci. Působení regulátorů, jak přirozených, tak syntetických může být buď povzbuzující nebo tlumící. Podle toho je dělíme na stimulatory a inhibitory. Jedna látka však může při různé koncentraci fungovat různě, někdy jako stimulator, jindy jako inhibitor.

Výrazné rozdíly jsou v regeneračních schopnostech rostlin, vyplývající z jednoduchých médií, které by mohly být vyrobeny za použití vhodných růstových regulátorů. Dělohy pocházející z oddělených klonů douglasky vykazují značné rozdíly v schopnosti produkovat adventivní pupeny na médiu bez růstových regulátorů, ale s přidáním vhodného auxinu a cytokininů, je možné tuto variabilitu značně omezit (Cheng, 1976). To je pravděpodobně proto, že se klony lišily v koncentraci endogenního hormonu.

Regulátory růstu vykazují silnou genotypovou specifičnost. Liší se složením nebo koncentrací v *in vitro* kultuře podle druhů nebo kultivovaných rostlinných odrůd a dokonce i různým účinkem (stimulator/inhibitor). Proto je často nutné měnit složení regulátorů růstu anebo jejich koncentrace při kultivaci *in vitro* podle druhů nebo odrůd rostlin, které jsou pěstovány. Je vždy lepší otestovat růst všech nových genotypů na médiích obsahujících několik různých kombinací regulátorů růstu. V literatuře existuje mnoho příkladů této genotypově závislé specifičnosti, například při testování koncentrace 2,4-D potřebné pro rozvoj a další růst kalusu z pletiva

hypokotylu fazolu bylo prokázáno, že závisí na druhu a množství rostlin, z nichž byly odebrány explantáty (Mok and Mok, 1977).

3.2. Složení živných médií

Hodně publikovaných prací uvádí, že je potřeba pro různé rostlinné taxony používat různá složení média, a to také podle typu kultury, která má být propagována. V některých případech také může být potřebné přecházet od jednoho složení kultivačního média k jinému, když je třeba změnit styl růstu kultury nebo vyvolat morfogenezi. Týká se to především složení makroelementů, například koncentrace a formy dodaného dusíku. Naopak mnoho různých druhů rostlinných kultur může být pěstováno na jediném složení média a z kritického pohledu je třeba říci, že hodně prací o účincích složení médií je vysoce empirických a mnoha výzkumníkům se nedaří dostatečně obhájit, proč jsou přidávány některé přídavky do médií. Mnoho času a nákladů se dá ušetřit, pokud použijeme univerzální složení živného média, např. Murashige a Skoog (1962) anebo měníme kultivační média méně často v průběhu propagace rostlin.

Při zakořeňování některých druhů může přímá formace kořenů proběhnout na explantátech samovolně ve vodě. Velmi jednoduché médium obsahující sacharózu a relativně nízkou koncentraci minerálních solí je vše, co je obecně třeba pro růst kořenových kultur a mikropropagaci většiny orchidejí. U některých jiných rostlin, ale může přímá i nepřímá morfogeneze v *in vitro* podmínkách záviset na složení použitého média a na určité rovnováze anorganické, organické a růstově regulační složky. Pro zlepšení růstu explantátových kultur byla vyvinuta různá složení kultivačních médií. Ovšem růst a vývoj různých druhů, eventuálně kultivarů, může být diferencially ovlivněn jediným druhem média, jehož složení může být změněno pouze v malém rozsahu (např. pšenice - Lazar *et al.*, 1983; řepky - Narasimhulu and Chopra, 1988; a vojtěšky - Brown, 1988).

Konzistence médií

Rychlost růstu a produkce prýtů během mikropropagace může být ovlivněna fyzikálním stavem média. Explantátové kultury mohou být pěstované na tekutém médiu nebo na polotuhém médiu (agarem zpevněném médiu).

Polotuhá média (*semisolid*) lze specifikovat jako média, jejichž viskozita a pevnost je někde mezi hodnotami pro pevné a kapalné skupenství. Kultury s tekutým médiem se také nazývají *dynamické* – *suspenzní* kultury a kultury na zpevněném médiu *statické*. Tato média jsou také často označována i jako pevná nebo ztužená média.

Pro mnoho účelů se konvenčně používají polotuhá média s přidáním gelovacího agens jako je například želatina nebo agar (dodávaný pod různými obchodními názvy jako je Gelrite, Phytigel, Kelcogel), algináty, škrob, 'Kappa'-karagenan (produkt mořského plevele *Euchema*), pektiny a jiné želírovací látky (Thorpe *et al.*, 2008).

Použití polotuhých médií přináší některé výhody např. stabilizace polohy explantátů a jejich lokalizace (jsou dobře vidět a lépe se s nimi manipuluje), explantáty si zachovávají stejnou orientaci v celé kultuře, výhonky a kořeny rostou orientovaně, protože médium se nepohybuje. Navíc lze rostlinný materiál umístit nad kapalným médiem tak, že není potřeba žádný zvláštní způsob provzdušňování kultury.

V pohybujícím se tekutém médiu může být růst dezorientovaný. Pokud iniciujeme kulturu vícenásobných prýtů v tekutém médiu, nebude indukce prodlužování prýtů většinou úspěšná a pokud ano, bývá obtížné tyto prýty oddělit. V tekutém protřepávaném médiu může být kalus rozrušen, a vytvořit tak suspenzní kulturu, k čemuž na ztuženém mediu nedochází. Ne vždy však může být polotuhé médium přínosem. Některé druhy agarů totiž obsahují látky, které fungují jako inhibitory, takže mohou bránit morfogenezi, nebo mohou snížit tempo růstu. Pokud explantát produkuje exudáty, chemicky různorodé látky vylučované rostlinami, na povrch v důsledku poranění nebo napadení patogenem, mohou tyto exudáty v polotuhém médiu difundovat pomalu a mít toxické účinky. Stejným problémem může být špatná difúze kyslíku k vyvíjejícím se kořenům. To však může být problém i v provzdušňovaných kapalných médiích. Nízká tenze kyslíku má vliv na růst kořenů a jejich funkčnost. To je pravděpodobně jedním z důvodů, proč jedinci z kultur často vykazují po přenesení do vnějšího prostředí léze v kořenech s potenciálně velmi vážnými důsledky pro vodní režim a kvalitu produkovaných rostlin.

Tekutá média (liquid culture) jsou nezbytnou součástí suspenzních kultur. Mohou být také výhodně použita pro kalusové a orgánové kultury. Tekuté médium může být úspěšně užito pro kultury množení prýtů. Použití tekutých médií má často za následek rychlejší růstovou křivku, než je možné dosáhnout na polotuhém médiu. Větší část povrchu explantátů je v kontaktu s tekutinou, což zvyšuje účinnost látek obsažených v médiu, především regulátorů růstu. V kombinaci s agitací umožňuje efektivnější vyživování a navíc toxické metabolity, které se hromadí v okolí pletiva jsou rozptylovány a v kořenových pletivech je zvýšen parciální tlak kyslíku. Protože rostlinný materiál musí být zásobován kyslíkem, použití statické kapaliny má svá omezení. Provzdušňování nemusí být problémem v kulturách, které obsahují velmi malé objemy kapaliny (např. závěsné kapky), nebo v těch částech rostlin, které jsou ponořeny do mělké vrstvy tekutého média. V případě, že statická kapalina má být použita pro kulturu

s velkými kusy pletiv nebo orgánů, musí být buď explantáty umístěny ve velmi mělké vrstvě tak, aby část pletiva vyčnívala nad povrch, nebo musí plavat na jeho povrchu, anebo musí mít nějakou oporu, která udržuje jejich část nad hladinou média. Dodávka kyslíku pro ponořené části buněk, pletiv nebo orgánů ve velkých objemech tekutých médií se běžně zajišťuje třepáním, rotováním nádob, stálým mícháním, nebo zavedením proudu rozptýleného sterilního vzduchu (příp. kontrolované směsi plynů) skrze médium. Tyto provzdušňovací techniky mají také za následek pohyb a promíchávání kultivovaných buněk nebo pletiv. Tato opatření však nemusí být dostatečná k tomu, aby se zabránilo rozvoji hypoxie v kořenech. To pak vede k hromadění toxických metabolitů a jejich působením kořeny ztrácí svou funkčnost. Navíc proudění v tekutých kulturách může poškozovat jemné buňky pletiva.

Zvýšená tvorba ethylenu při nízkém tlaku kyslíku může dramaticky omezit tvorbu prýtů a jejich funkčnost (Sharp, 2002), a to zejména v případě, že se plyn hromadí v kultivační nádobě v důsledku jejího utěsnění a nemožnosti výměny plynů s vnější atmosférou.

Malé orgány nebo malé kousky pletiv mohou lépe plout na povrchu tekutého média, je-li hustota kapaliny zvýšena přidáním zahušťovačů (např. Ficoll).

Ve výjimečných případech je použití tekutých médií nevýhodné. Například buňky kukuřice v suspenzní kultuře produkují sliz, který narušuje růst buněk. Pro některé druhy kultur mohou být nevýhody polotuhého nebo kapalného média odstraněny růstem buněk, pletiv nebo orgánů v porézním materiálu (Thorpe *et al.*, 2008) zavlažovaném tekutým médiem.

Tekuté médium lze úspěšně použít pro kultury prýtů. Je obvyklé že v I. etapě (založení kultury) jsou explantáty umístěny na ztužené médium a následně v etapě II. jsou přeneseny do tekutého média, aby byla zajištěna rychlá proliferace explantátů. Axilární výhonky jsou od sebe odděleny a zakořeněny na ztuženém médiu ve stadiu III. nebo jsou zakořeněny v podmínkách *ex vitro*.

V masové propagaci je nejčastější snaha o užívání tekutého média z důvodů ekonomických. Nejvíce pokusů v produkci velkého množství rostlin *in vitro* metodami spoléhá na užití tekutých médií pro výhonky nebo multiplikaci výhonků meristému. Pokusy ke zvyšování produkce kultury prýtů ve velkých nádobách tekutého média byly v minulosti neúspěšné z důvodu hyperhydricity, ale v poslední době byl zaznamenán významný pokrok (Hvoslef-Eide, 2005).

Rozdílné výsledky získané v tekutém a tuhém médiu mohou často být efektivně kombinovány k získání výkonnějšího systému mikropropagace. Například nově vznikající prýty na pevném médiu mohou být převedeny do tekutého média s rychlejším růstem prýtů.

Množení listových výhonků ponořených v tekutém médiu je velice problematické. Listy hyperhydrických výhonků jsou často abnormálně široké a tlusté a nejsou schopny rozvoje za normálních podmínek. Snadněji uhynou vysycháním nebo nadměrným slunečním zářením a přežívají velmi špatně, když jsou subkultivovány nebo přemístěny do vnějšího prostředí.

Snaha o překonání nedostatků při propagaci vedla některé experimentátory k přidání vrstvy statického kapalného média na polotuhé médium. Kombinování užívání pevného i tekutého média bylo patentováno v Maďarsku jako zdokonalená metoda *in vitro* masové propagace. Molnár (1987) uvádí, že kultury prýtlů široké škály rostlin prokázaly produkci více axilárních pupenů a výhonků ve dvoufázovém systému, než ve srovnatelném polotuhém médiu.

Vliv tvaru a objemu kultivační nádoby

Výtěžnost mikropropagace určitého druhu rostliny bude záviset i na vlivu kultivační nádoby. Test vlivu různých kultivačních nádob (komerčních sklenic, nádob Magenta® a nádob na jedno použití) a želírující látky (agar, agargel, Phytigel, a rostlinný agar) na mikropropagaci banánů provedl (Kaçar *et al*, 2010). Snažil se určit kombinaci, která produkuje nejvyšší počet dostatečně kvalitních sazenic. Výrazně vyšší počet byl zjištěn u kombinací komerční sklenice + Phytigel a komerční sklenice + rostlinný agar než u ostatních kombinací.

Vzájemný vliv použitého druhu média (gel agens: Bacto agar, Phytigel, Swallow agar, Type 900 agar) a propustného uzávěru kultivační nádoby (bavlna, plast, parafin, hliníková fólie) na hyperhydricitu a obsah chlorofylu v listech popisuje ve své práci Winarto (2004).

Objem nádoby někdy může ovlivnit růst a morfogenezi *in vitro*. Tyto účinky jsou pravděpodobně důsledkem různé koncentrace kyslíku, oxidu uhličitého, ethylenu a jiných těkavých látek ve vzduchu uvnitř kultivační nádoby a v médiu. Například růst prýtlů *Saintpaulia* při stejném množství média byl větší ve 120 ml sklenici než v 60 ml (Start and Cumming, 1976).

Tvar nádoby může mít vliv na tempo růstu kultur ovlivněním rychlosti plyné difúze (Bateson *et al.*, 1987). Tvar nádoby má prokazatelně vliv především z hlediska typu kultury. Vývoj bioreaktorů je toho důkazem (Viz. kapitola Bioreaktory v této práci).

Nelze doporučit obecně optimální velikost a tvar kultivační nádoby pro konkrétní typ mikropropagace bez předchozího experimentování.

3.3. Světelné podmínky kultivace

Spektrum slunečního záření, které prostupuje atmosférou, obsahuje širokou oblast optického záření. Zahrnuje světlo o vlnových délkách 300 až 380 nm (ultrafialové záření), 380 až 780 nm (viditelné záření) a 780 až 3000 nm (infračervené záření). Veškeré sluneční záření (přímé a rozptýlené z oblohy) se označuje jako globální záření. Viditelné spektrum radiační energie zahrnuje vlnové délky od přibližně 390 nm (fialová) do přibližně 700 nm (červená část spektra).

Rostliny získávají světelnou energii prostřednictvím světelných kvant - fotonů. Fotony jsou pohlcovány fotosynteticky aktivními barvivy (fytochromy) především chlorofylem, ale i jinými pigmenty. Fotosyntéza probíhá u vyšších rostlin ve dvou fázích – ve fázi fotofyzikální (světelné – vyžadují osvětlení) a chemosyntetické (temnostní – nevyžadují světlo). V první fázi zajišťují absorpci kvant světelného záření pigment-proteinové komplexy PSI (fotosystém I) a PSII (fotosystém II). Nejdůležitějším fotosynteticky aktivním pigmentem je chlorofyl-a. Ostatní pigmenty (zejména karoten) energii svého excitovaného stavu po dopadu a absorpci energie předávají chlorofylu-a, který obsahuje jen modrou a červenou část spektra. Fotosyntéza zelených rostlin využívá světelné záření v rozsahu vlnové délky 380–760 nm. Tento rozsah má název fotosynteticky aktivní záření (**FAR** nebo **PhAR**).

Podíl FAR je asi 45% z globálního záření. FAR se hodnotí buď energetickými, nebo kvantovými (fotonovými) jednotkami. Kvanta jsou měřena v molech (SI jednotka), nebo Einsteinech. Fotonové jednotky jsou $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ pro **fotonový tok**, $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pro **intenzitu ozáření** a $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ pro **dávku ozáření** (množství energie). Pro mikropropagaci jsou světelné podmínky kvantifikovány analogicky jako svítivost (luminous intensity), světelná intenzita (Light intensity, Irradiance), nebo osvětlení (illuminance).

Vztah mezi energetickými jednotkami a fotonovými jednotkami je závislý na spektrálním složení záření a je tedy pro každý zdroj jiný. Fotonové jednotky jsou závislé na vlnové délce záření (λ).

Pro jednu vlnovou délku platí převod

$$1 \text{ mmol}\cdot\text{s}^{-1} = 119,64/\lambda \text{ (W)}.$$

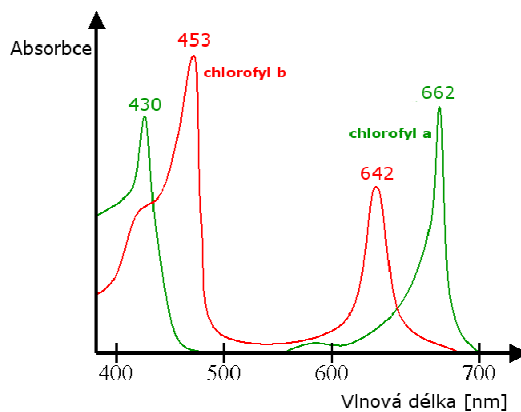
Jednotka dávky ozáření je

$$1 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1} = 1 \text{ } \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1} = 0.215 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2} = 0.215 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}.$$

Jeden Einstein (E) je definován jako jeden mol fotonů (Avogadrova konstanta 6.023×10^{23}). Substance musí absorbovat jeden Einstein radiační energie na mol, aby se účastnila fotochemické reakce.

Hodnotu intenzity FAR lze změřit pyranometrem nebo solarimetrem. Luxmetry nejsou vhodné, protože jsou založeny na spektrální citlivosti lidského oka. Rostlinný pigment nemá stejnou relativní sensitivitu jako lidské oko k radiční energii různých vlnových délek. Proto i definice jednotek pro světelný režim je vhodnější definovat v energetických (kvantových) jednotkách.

Intenzita FAR určuje rychlost fotosyntézy. Účinnost fotosyntézy je vyšší při malých úrovních ozáření, s rostoucí intenzitou klesá a může dosáhnout saturační úrovně. Vzájemný vztah mezi fotosyntézou a FAR je závislý především na druhu rostliny, vývojovém stadiu a ostatních podmínkách růstu. Důležité je stanovit tzv. světelný kompenzační bod, který stanovuje mezní intenzitu ozáření, při kterém ještě dochází k nárůstu rostlinné hmoty. Při nižších hodnotách rostliny sice asimilují, ale asimilát je zároveň odbouráván dýcháním rostlin.



Obr. 3: **Spektrální citlivost chlorofylu**
(Janoušek, 2011)

Reakce růstu a vývoje rostlin na světlo se odráží jednak ve fotosyntéze (procesu, kdy světelná energie je přeměněna na energii chemickou), fotomorfogenezi (což je světlem indukovaný vývoj struktur a forem) a dále ve fototropizmu (růstové odpovědi rostlin, která je navozena jednostranným světlem). Fotosyntéza, fotomorfogeneze a fototropismus jsou vyvolány podněty v pletivech, které absorbují radiaci jednotlivých vlnových délek. Růst rostliny může sledovat dvě alternativy rozvojových strategií závislejších na tom, zda vyrostla na světle (fotomorfogeneze) nebo ve tmě (skotomorfogeneze- etiolizovaný růst), kdy nedochází k rozšiřování listů a neformuje se funkční fotosyntetický aparát.

Vliv světla na mikropropagaci

Vlastnosti světla, které nejvíc ovlivňují úspěch mikropropagace jsou tři:

- fotoperioda
- intenzita osvětlení
- kvalita světla-vlnová délka

Vliv fotoperiody:

Pod termínem fotoperioda rozumíme časový průběh a střídání fází světla a tmy. Vlivem změn světelných podmínek na zemi (střídání dne a noci, střídání ročních období) došlo u rostlin k vytvoření citlivosti na tyto změny z důvodu přežití. Proto je tento faktor důležitý pro jednotlivé

fáze vývoje rostliny. Tato citlivost se projevuje i u částí rostlin a samozřejmě i u explantátů v *in vitro* prostředí. Fotoperioda má vliv na morfogenezi explantátů, např. tvorbu květů. Většina rostlin pro růstovou fázi vývoje potřebuje 12 až 16 hodin světla denně, mezi jednotlivými druhy se ale odpovědi velmi liší s ohledem na přirozené stanoviště rostliny, které v průběhu evoluce vedlo k zafixování optimální fotoperiody. Proto je pro úspěšnou kultivaci *in vitro* potřeba znát fotoperiodu přirozeného stanoviště a životní cyklus daného experimentálního taxonu.

Světelná intenzita

Světelnou intenzitou chápeme fotonový tok, který dopadne na explantát za určitý čas, čili množství dodané světelné energie. Množství energie, pokud ho fotosynteticky aktivní pigmenty přijmou, určuje vydatnost fotosyntézy. A na ní závisí růst a vývoj rostlin. Světelná intenzita má také vliv na vývoj a stavbu listu a rovněž na obsah chlorofylu v něm obsažený. Světelná intenzita v kombinaci s dostatkem oxidu uhličitého jako substrátem fotosyntézy má vliv na její vydatnost. V kultivačních místnostech je ozáření poměrně nízká a ani explantáty nedisponují příliš rozvinutým fotosyntetickým aparátem. Rostliny se v podmínkách *in vitro* chovají semiheterotrofně a proto musí mít náhradní zdroj energie, kterým je cukr obsažený v médiu. Situace se tím však komplikuje - zvýšení světelné intenzity má při přítomnosti cukru v médiu negativní účinky na růst.

V poslední době je snaha o rozvoj techniky **podněcování fotoautotrofie explantátů** odebráním cukru z tekutého kultivačního média a zvyšováním intenzity světla a obsahu oxidu uhličitého v kultivační atmosféře (Afreen *et al.* 2002).

Vliv kvality světla (světelného spektra)

Pod kvalitou světla chápeme především vlnovou délku, případně spektrum a další fyzikální vlastnosti světla (např. polarizace), které mohou mít vliv na fotosyntetickou aktivitu rostlin.

Rostliny přijímají světelnou energii ve vlnových délkách mezi 400 a 700 nm. U rostlin se projevuje největší absorpce světelné energie v krajních oblastech vlnových délek – v modré a červené části (Obr. 3). Červená část spektra stimuluje fotosyntézu a tím růst rostliny, modrá část zlepšuje morfologické vlastnosti (fotomorfogeneze), podporuje odnožování, množení listů, zabraňuje přílišnému vytahování rostlin do výšky. Modré světlo obvykle inhibuje prodlužování stonku a červené světlo prodlužování stonku podporuje (záleží na ekologických nárocích pěstovaných rostlin).

Pro osvětlení *in vitro* kultur jsou používány zářivky se spektrem tzv. studená bílá (cool white – dále jen CW) , nebo teplá bílá (warm white). Především se používá studená bílá. Spektrum CW

zářivek se nejvíce podobá dennímu spektru. Jako perspektivní světelný zdroj se v poslední době testuje osvětlení využívající světlo emitující diody (SB LED).

3.4. Tepelné podmínky kultivace

V přirozeném prostředí rostliny obvykle přicházejí do styku se změnami teploty mezi dnem a nocí. Pravděpodobně není nezbytné napodobovat den a noc, ale měli bychom mít na paměti, že stejná teplota ve dne a v noci nemusí mít vždy stejný efekt na růst rostlin. Růst rostlinných kultur může být zlepšen snížením noční teploty, protože se omezí temnostní respirace. Přímé účinky noční teploty na růst jsou různorodé, se zvyšující se noční teplotou klesá u některých rostlinných druhů délka internodií a u jiných zase vzrůstá. Další výhodou je, že střídání teplot pomáhá výměně plynů v kultivačních nádobách (Chalupa, 1987). Nicméně, tato výměna není zásadní a v mnoha laboratořích jsou pletivové kultury udržovány při stejné teplotě ve dne i v noci. Navíc je někdy technicky nemožné vytvoření optimální teploty pro každou plodinu, pokud se pěstuje několik druhů v jedné kultivační místnosti.

Průměrná konstantní teplota v kultivačních místnostech zmiňovaná ve velkém vzorku pokusných zpráv byla 25 °C. Tropické a subtropické rostliny, jako jsou bavlna, rýže, citrusy a popínavé rostliny, jsou kultivovány při mírně vyšších teplotách, než druhy mírného klimatu (průměrně 27,7 °C, s rozptylem 24 až 32 °C). Neexistuje jedna jediná definovaná teplota pro kultivaci explantátových kultur každého jednoho druhu, a v publikovaných pracích často záleží hlavně na technických možnostech zařízení, ve kterém je kultivováno.

Teplota je také jedním z faktorů, které v součinnosti s regulátory růstu mohou ovlivnit požadovaný vývoj, nebo jeho indukci, a účinky mohou být různé. Organogeneze často dosáhne optima v úzkém rozmezí teplot, které se liší mezi jednotlivými druhy. Indukce může probíhat za relativně nízkých teplot. Například Heide (1965) popisuje že pro zahájení formace adventivních výhonků na listu *Begonia cheimantha* je teplotní optimum 15 C , pro listové segmenty a pro segmenty řapíku při 15-20°C (Fonnesbech, 1974). Proces iniciace je podpořen přidavkem cytokininů. U některých rostlin jsou nejlepší teploty pro indukci adventivních prýtů vyšší, než teploty jaké jsou potřebné pro růst.

3.5. Kultivační atmosféra

Na rostliny nebo jejich části pěstované *in vitro* mají vliv především plyny se silným fyziologickým dopadem: O₂, CO₂ a C₂H₄ (kyslík, oxid uhličitý, ethylen).

Technologie explantátových kultur téměř vždy zahrnují nějakou formu těsně uzavřené nádoby a tehdy vzniká potřeba zajistit výměnu plynů mezi kultivovaným materiálem a vnější atmosférou. Ještě složitější to může být v suspenzních kulturách, kde kultivovaný materiál je ponořen v tekutém médiu. Kyslík a CO₂ jsou hlavními substráty nebo produkty aerobního dýchání a fotosyntézy a jsou tedy životně důležité pro rostlinné buňky. Jsou zdrojem energie. Naproti tomu ethylen je rostlinný hormon. Ten může ovlivnit vývojové procesy, jako jsou dělení buněk, jejich stárnutí a diferenciaci již při relativně nízkých koncentracích [0,01 - 10 ppm]. V těchto koncentracích je ethylen snadno měřitelný, proto může být vhodným ukazatelem stavu provzdušňování. (Jackson *et al.* 1987).

Většina výměny kyslíku a ostatních plynů v kultivovaných rostlinných pletivech je způsobena difúzí (Jackson *et al.*, 1987). Pouze malá část toku plynu do kultivovaných rostlinných pletiv a ven z nich je způsobena kolísáním teploty a atmosférického tlaku.

Klíčem k přiměřenému provětrávání kultivační nádoby, je tedy maximalizace koncentračního gradientu pro plyn mezi interiérem a bezprostředním vnějším okolím pletiva a minimalizace hustoty toku na jednotku plochy potřebné k udržení normálního růstu a to dýcháním a tam, kde je to vhodné fotosyntézou.

Kyslík

Dostupnost kyslíku v kultivovaných rostlinných tkáních je ovlivněna:

- koncentrací plynu v okolní atmosféře,
- jeho rychlostí difúze do kultivační nádoby a
- jeho rychlostí difúze do kultivované buňky nebo pletiva.

Nejjednodušším způsobem, jak ovlivnit koncentraci kyslíku v tkáňových kulturách je změna koncentrace ve vnějším ovzduší. Koncentrace kyslíku ve vzduchu je za normálních okolností téměř 21%. V kultivační komoře může být koncentrace kyslíku udržována na koncentraci, která je nad nebo pod úrovní koncentrace ve vnějším ovzduší. Parciální tlak kyslíku ve vzduchu kultivační komory je jen přibližný vůči množství kyslíku, který má k dispozici kultivované pletivo. Pokud je sterilizovaný vzduch nebo směs plynů zaváděna přímo do kultivační nádoby problémy s difúzí plynu nenastávají. Nicméně při kultivaci v uzavřených nádobách bez možnosti ventilace může být koncentrace kyslíku na úrovni media nebo tkání značně nižší než v okolní atmosféře. To proto, že spotřeba kyslíku kulturou vytváří lokální deficit, který není jak kompenzovat, rychlost kompenzace závisí na těsnosti a propustnosti uzávěru pro plyny.

Koncentrace kyslíku v pletivech kultur pěstovaných převážně nad hladinou média je do značné míry ovlivněna parciálním tlakem plynu v nádobě. Kyslík difunduje značně pomaleji ve vodě, než ve vzduchu. Příjem kyslíku pletivy na polotuhém médiu převážně probíhá přes ty části explantátu, které se nalézají nad povrchem média (George and Davies, 2008). Difúze kyslíku do média je nižší než do vody, a to díky jevu, který se nazývá „vysolovací efekt“. Rozpuštěné soli a neelektrolyty, jako například sacharóza, snižují rozpustnost plynů. Bylo zjištěno, že závisí na velikosti povrchu v poměru k objemu média v kultivační nádobě a na koncentraci (parciálním tlaku) v bezprostřední plynné fázi. Přechod O₂ bude menší, pokud je stejný objem média vložen do zkumavky, než v Petriho misce. Poměr povrchu k objemu se zvyšuje, pokud jsou kapalná média třepána, nebo když jsou do nich vháněny plynné směsi. Některé překvapující výsledky naznačují, že většina rostlin pěstovaných v živných provzdušňovaných roztocích s neomezeným příivodem kyslíku pro prýty, může také vykazovat určité omezení ve funkčnosti kořenů v důsledku omezené dodávky kyslíku.

Redoxní potenciál (oxidačně-redukční potenciál) (E) vodného roztoku je míra jeho tendence buď získat nebo uvolnit elektrony (tj. oxidovat nebo redukovat nově dostupné látky). Redoxní potenciál se měří v elektrických jednotkách rozdílu potenciálu (Volt). Čím více pozitivní hodnoty E, tím větší je podíl oxidantů k reduktantům v roztoku. Jak se E stává více negativní, relativní podíl reduktantů se zvyšuje. To je analogické s pufrováním roztoku proti změnám pH. Redoxní potenciál kultivačního média se liší v závislosti na koncentraci rozpuštěného kyslíku a respirační aktivity buněk nebo pletiv, které v něm rostou (George and Davies, 2008). Pokud je kyslíku nedostatek, TCA cyklus nemůže fungovat, ale rostliny mohou získat energii některými dalšími způsoby. Ovšem s mnohem menší účinností - dekarboxylací pyruvátu na acetaldehyd a redukcí produktu na etanol (fermentace). Přítomnost těchto dvou posledních látek v pletivu nebo kultivačním médiu naznačuje, že probíhá glykolýza následovaná fermentací v některých částech kultivovaného pletiva (Jackson *et al.*, 1987). Obě chemikálie byly běžně zjištěny tam, kde se zjišťovala přítomnost těkavých látek /například v nádobách, které obsahovaly kalusové kultury (Thomas and Murashige, 1979), nebo v prýtových kulturách švestky (Righetti *et al.*, 1988)/.

Někteří výzkumníci se domnívají, že vývoj pletiv je spojen s hypoxií, ostatní si myslí, že je to proces oxidační. Publikace popisují přísady jak oxidačních, tak redukčních činidel do rostlinných tkáňových kultur, jež poskytly důkazy podporující oba pohledy (George and Davies, 2008). Redoxní potenciál ovlivňuje dostupnost anorganických iontů v rostlinných kulturách, protože rozpustnost kovových iontů ve vodě může záviset na pH a E. Například Fe₂⁺ se stává více rozpustný, když poklesne E i pH.

Oxid uhličitý

Další složkou plyné atmosféry je oxid uhličitý. Nízká koncentrace oxidu uhličitého může stimulovat biosyntézu ethylenu, při vyšších koncentracích (1-10% CO₂) konkurenčně inhibuje vliv ethylenu. Zdá se pravděpodobné, že velkou část z vlivu CO₂ na pletivové kultury lze připsat účinku ethylenu. Přítomností oxidu uhličitého lze podpořit zahájení buněčného dělení v buněčné suspenzi (optimální parciální tlak 10kPa). Mohlo by se zdát samozřejmé, že při zvýšených koncentracích CO₂ by měl posílit růst rostlin, protože jsou autotrofní, ale nemusí to tak být vždy. Kvůli vysokým koncentracím cukru v médiu může být potlačena fixace CO₂ (Van Huylenbroeck *et al.*, 1998). Některé rostliny mají průduchy, které jsou velmi citlivé k vysokým úrovním CO₂ a které spíše reagují intuitivně a to může mít za následek nízkou koncentraci CO₂ v listu, i když v kultivační nádobě je koncentrace vysoká.

Ethylen

Ethylen je nejjednodušší plyný rostlinný hormon. Ovlivňuje stárnutí listů, květů, dozrávání plodů a prodloužení prýtů. V explantátových kulturách působí negativně z výše uvedených důvodů. Ethylen také zvyšuje náchylnost kultur k hyperhydricitě.

Typ buněčné diferenciaci v kultuře může být ovlivněn dostupnou koncentrací kyslíku. Vývoj chloroplastů v suspenzní kultuře pozitivně ovlivňuje nízký parciální tlak kyslíku a vysoké koncentrace CO₂ (5-10%). Ethylen, přirozeně vznikající v kultuře, působil antagonisticky (Dalton and Street, 1976).

Na základě analýzy Fickova zákona dospěl Jackson (Jackson, 2005) k závěrům, že k udržení kultury v optimálním stavu lze dosáhnout zvýšením difúzní ventilace objemu kultury, minimalizací odporu k pohybu plynu, minimalizací tloušťky vody nad explantátem, vyhýbáním se polopevným médiím ztuženým agarem. Dále je důležité minimalizovat objem pletiv. Toto vše snižuje hustotu toku na jednotku plochy pletiva potřebné k jejímu provzdušňování a zkracuje interní difúzní dráhy. Skutečným úspěchem je určení hustoty toku plynů potřebných k podpoře požadované míry růstu, nebo rozvoje struktury. Toto je obzvláště náročné, pokud kultury mají být autotrofní, protože CO₂ je téměř vždy nedostatek. Cílem je optimalizovat větrání pro klíčové plyny jako CO₂, O₂ a ethylen.

Jednoduchý přístup k dosažení tohoto cíle je použít kultivační nádoby, které jsou velké ve vztahu k množství pletiva, protože poskytují větší rezervy O₂ nebo CO₂ a účinnější ředění metabolicky vytvořených plynů, jako je ethylen. V praxi je to však téměř nemožné, zvláště při autotrofních kulturách. Jedním z řešení je potlačení potřeby CO₂ pomocí cukrů. Tato často používaná metoda vychází z přísného požadavku na sterilitu. Využití cukru ale vyvává potenciální problémy pro

přizpůsobení kultury na autotrofní metabolismus při konečném převodu *ex vitro*. Minimalizace ethylenu v uzavřeném prostoru se prováděla absorbenty, např. alkalickým manganistanem draselným nebo chloristanem rtuťnatým (Jackson, 2005).

Uspokojivých výsledků se dosáhlo zajištěním konvenčního průtoku vzduchu (nebo média v suspenzních kulturách) tak, aby se zvýšila difúze samovolně. Samozřejmě je potřeba vzduch a médium zabezpečit v požadované čistotě a kvalitě. Výměna plynů v explantátové kultuře může být zajištěna dvěma různými metodami. Buď snížením parciálního tlaku plynu, nebo konvektivním průtokem. V druhém případě jsou plyny dodávány (nebo odebírány) rostlinnému pletivu tokem nosného plynu (vzduchu), nebo tokem rozpouštědla (vody), který je poháněn přes povrch buněk nebo pletiv nějakou vnější silou, obvykle tlakovým gradientem (čerpádem).

Mezi pletivem a médiem, se pohyb provádí téměř výhradně difúzí. Pouze v celé rostlině rostoucí v přírodním prostředí, kde jsou přítomny rozsáhlá propojená porézní pletiva (aerenchym), může vnitřní konvektivní tok hrát významnou úlohu při provzdušňování.

Jednoduché konvektivní proudění v oblasti kultury může být využito ke zvýšení výměny plynů pletivové kultury. Téhož lze dosáhnout pod lehce zvýšeným tlakem řízeným tokem plynu (Zobayed *et al.*, 2001), nebo tokem provzdušněného média přes kultivované pletivo, nebo mícháním provzdušňovaného média. Možností pro zvýšení difúzního provzdušňování pletivových kultur je mnoho a zahrnují např. metody dočasného ponoření kultury (TIS), vybavení kultivačních nádob vstupy nebo výky propouštějící plyny. Nároky na větrání lze minimalizovat omezením hloubky kultivačního média na tenkých vrstvách, udržováním pletiv na minimu objemu a používáním nízkých teplot. Biologická účinnost kteréhokoliv systému bude ovlivněna mnoha faktory.

3.6. Relativní vlhkost

Relativní vlhkost je míra množství vodní páry obsažené v plynné atmosféře. Je vyjádřena jako poměr množství vody, kterou atmosféra skutečně obsahuje, k tomu, co může obsahovat, když je nasycena. Když je teplota vzduchu stejná jako teplota média a nádoba je neprodyšně uzavřená, relativní vlhkost by teoreticky měla být v rozmezí 98-99,5 %. Vzduch může být téměř nasycen, pokud teplota média je vyšší než teplota vzduchu. Pro kultivační místnost je obvykle doporučovaná relativní vlhkost cca 70 %.

Stanovit optimální vlhkost pro kultury je důležité. Pokud by byla vlhkost nízká, mohou kultury hynout. Jones (1974) zjistil, že embrya mrkve by nepřežila desikaci a je nejlepší je uchovávat

v relativní vlhkosti 80-90 %. Jestliže je vlhkost nižší než 60 %, hynou (George and Davies, 2008). Většinou však rostou kultury ve vysokých vlhkostech a jsou náchylné k hyperhydricitě. Ideální by bylo obklopit kultury prýtlů a orgánů vzduchem, který není plně nasycen vodní párou. Vlhkost v nádobách obsahujících kultury prýtlů také závisí na rozvoji listů.

Relativní vlhkost uvnitř kultivační nádoby je obvykle velmi vysoká, což vede k málo rozvinutým epikutikulárním vrstvám vosku a selhání funkce průduchů na listech explantátu. Proto je důležité mít možnost tento parametr měřit a nějak toto negativum ovlivnit.

Vlhkost uvnitř kultivační nádoby je závislá především na mnoha parametrech jako je absolutní vlhkost vnitřní atmosféry, absolutní vlhkost vnější atmosféry, odpařování vlhkosti z média, kondenzace vlhkosti do média, relativní vlhkost v okolí explantátů, vstupní energie tepelného záření (ze světelného zdroje), teplota média, teplota okolí nádoby, teplota vzduchu v okolí explantátu, objem nádoby, atd. Určit vztahy a stanovit model k popisu faktorů, které ovlivňují relativní vlhkost v nádobě a model odpařování média není proto jednoduché.

Možností kvantifikovat tyto faktory se zabývá ve své práci Chiachung Chen (Chen, 2004). Dospěl k výsledkům poukazujícím na vztah mezi teplotou vnitřní atmosféry a relativní vlhkosti (se zvyšující teplotou se zvyšuje relativní vlhkost), relativní vlhkostí a odpařováním média (se zvyšující se relativní vlhkostí odpařování klesá). Vztah mezi ozařováním a vlhkostí nebyl z měření průkazný.

3.7. Vzájemné působení faktorů životního prostředí a aklimatizace

Jedním z hlavních problémů, se kterými se setkávají rostliny v in vitro prostředí je hyperhydratace. Je způsobena nevyhovujícími podmínkami v horní části kultivační nádoby používané pro mikropropagaci. Typické prostředí v in vitro má vysokou relativní vlhkost (95 - 100% RH), nízkou intenzitu světla (30 - 75 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a velké výkyvy CO_2 . Tyto podmínky mohou přispět ke zvýšení hyperhydratace, snížené fotosyntetické schopnosti, nebo zvýšené transpiraci u rostlin ve srovnání s dospělými exempláři v přirozených podmínkách. Přítomnost doplňkové sacharózy v růstovém médiu, která kompenzuje snížení fotosyntézy, může rovněž snížit fixaci CO_2 . Další deficit CO_2 je způsoben utěsněním kultivační nádoby z důvodu zachování sterility vnitřního prostředí, což také vede ke špatné výměně plynů mezi pletivem a vnější atmosférou.

Hyperhydratace snižuje výtěžnost rostlin přenesených z prostředí in vitro do ex vitro podmínek (Ziv, 2000). Rostliny, které jsou hyperhydratované často nepřežijí mimo in vitro prostředí.

4. Bioreaktory

Bioreaktory pro kultivaci rostlinných explantátů jsou v podstatě stejné jako pro kultivaci mikrobiálních a živočišných buněk.

Použití bioreaktorů zvyšuje produktivitu a efektivitu i u množení rostlin. Výhody, které se ukázaly při použití tekutého média pro rozmnožování rostlin v bioreaktoru jsou následující Takayma (2006)

- v jedné dávce v bioreaktoru lze snadno vyprodukovat velké množství sazenic
- lze škálovat velikost a počet bioreaktorů
- snadná manipulace kultur při inokulaci a sklizni
- je snadná možnost snížení počtu kultivačních nádob a zmenšení prostorů potřebných ke kultivaci, čímž se snižují celkové náklady
- lepší využívání živin díky neustálému kontaktu celého povrchu kultur s médiem a zvyšování tempa růstu
- zvyšování rychlosti růstu i konečného množství biomasy nuceným provětráváním
- pohyb kultury v bioreaktoru má za následek potlačení apikální dominance, čímž se stimuluje růst mnohonásobných prýtů

Přes tyto nesporné výhody mají technologie bioreaktorů některá úskalí. Jsou jimi především hyperhydricita, nežádoucí variabilita velikosti jedinců, mikrobiální kontaminace atd. Největším problémem je však existence druhů, které lze sice kultivovat na ztuženém médiu, ale kultivaci v tekutém médiu odolávají.

Bioreaktory můžeme třídit z technologického hlediska Yesil-Celiktas (2010), dle **agitační metody a konstrukce nádoby** na:

bioreaktory s mechanickou agitací (*mechanically agitated bioreactors*):

- bioreaktory s mechanickým mícháním a provzdušňováním (*stired tank bioreactors*),
- bioreaktory s aerací a agitací (*aeration agitation bioreactors*),
- bioreaktory s rotujícím bubnem (*rotating drum bioreactors*),
- bioreaktory s rotujícím filtrem (*spin filter bioreactors*),

bioreaktory s pneumatickou agitací (*pneumatically agitated bioeractors*):

- nemíchané bublinové bioreaktory (*unstirred bubble bioreactors*) neboli
- bioreaktory s agitací provzdušňováním (*aeration-agitation bioreactors*),
- bioreaktory s bublinovým sloupcem (*bubble column bioreactors*),
- bioreaktory se "vzdušným výtahem" (*air-lift bioreactors*),

kapalně disperzní bioreaktory (*liquid dispersed bioreactors*),
 bioreaktory balónového typu (*baloon type bioreactors*),
 bioreaktory dočasně zaplavované (*temporary imersion bioreactors*) nebo přílivové (*ebb and flow*),
 bioreaktory s hydrodynamickým (gravitačním, vlnovým) promícháváním (*wave bioreactors*),

bioreaktory bez agitace (*non-agitated bioreactors*):

bioreaktory s plynnou fází (*gaseous phase bioreactors*),
 bioreaktory s provzdušňováním membránou propouštějící kyslík (*oxygen permeable membrane aerator bioreactors*),
 bioreaktory s „overlay aeration“ (*overlay aeration bioreactors*).

Ačkoli základní požadavky pro suspenzní kultury rostlinných buněk jsou podobné suspenzním mikrobiálním kulturám, fermentory pro mikrobiální buněčné kultury nejsou vhodné pro kultury rostlinných buněk, protože existují významné rozdíly mezi vlastnostmi a potřebami růstu těchto dvou typů buněk. Tyto rozdíly jsou shrnuty v tabulce 1.

Charakteristika	Typická mikrobiální buňka	Typická rostlinná buňka
Velikost (délka μm)	2-10	50-100
Čas pomnožení	1 h	2-6 dnů
Výchozí materiál	Samostatné buňky, pelety, mycélia	Shluky
Doba fermentace	2-10 dnů	2-3 týdny
Spotřeba kyslíku	1-3 $\text{mmol g}^{-1}\text{h}^{-1}$	10-100 $\text{mmol g}^{-1}\text{h}^{-1}$
Citlivost na smyk	Necitlivé	Citlivé
Obsah vody	Přibližně 80	>90
Regulační mechanismus	Složitý	Velmi složitý
Genetická stabilita	Stabilní	Může být variabilní
Akumulace produktu	Často extracelulární	Většinou intracelulární

Tab.1 **Rozdíly mezi mikrobiálními a rostlinnými buňkami s ohledem na použití bioreaktorů.** (Bhojwani, 1996)

Efektivní promíchávání rostlinných buněk kultivovaných ve velkém měřítku je nesmírně důležité k zajištění jednotných fyziologických podmínek uvnitř kultivační nádoby. Míchání zvyšuje

kontakt živin obsažených v médiu s buňkami, a tím podporuje lepší růst zvýšením převodu živin z kapalné a plynné fáze do buněk, a rovnoměrný rozptyl vzduchových bublin pro jejich efektivnější okysličení.

I když mají rostlinné buňky vyšší pevnost v tahu ve srovnání s mikrobiálními buňkami, jejich značná velikost, pevná celulózová stěna a velké vakuoly způsobují jejich zvýšenou citlivost na smykové napětí a tudíž nutí k omezení používání silného míchání s účinným provzdušňováním. Rostlinné buňky se proto často pěstují v modifikovaných bioreaktorech s mechanickým mícháním s velmi nízkými rychlostmi míchání.

Všechny rostlinné buňky jsou aerobní a vyžadují nepřetržité zásobování kyslíkem. Rostlinné buňky vyžadují více kyslíku než mikroorganismy, přestože mají pomalý metabolismus. Promíchávání je proto doplňováno provzdušňováním. Vzduch je obvykle vháněn nebo rozptylován do reaktoru v jeho spodní části. Vysoké koncentrace kyslíku však mohou být naopak dokonce toxické pro metabolické aktivity buněk.

I když jsou bioreaktory s mechanickým mícháním v průmyslu nejrozšířenější, v použití pro rostlinné kultury na buněčné bázi jsou vhodnější jiné konstrukce bioreaktorů a to bioreaktory s pneumatickou agitací (bioreaktory s bublinovým sloupcem nebo „air-lift“ bioreaktory), kde lze smykové tření eliminovat na minimum.

U meristémových kultur je těchto problémů víc. K těm hlavním patří únik endogenních růstových faktorů, potřebných pro počáteční vysokou koncentraci inokula, hyperhydricita a malformace, tvorba pěny, přítomnost smykových (střížných) sil a oxidační stres a hlavně malformace kořenů v tekutém médiu (Ziv, 2005).

Pokusy o kontrolu hyperhydricitních deformit se zaměřily na metody provzdušňování a metody občasného zaplavování médiem (temporary immersion bioreactors) (Teisson *et al.*, 1996, Escalona *et al.*, 1999).

4.1. Bioreaktory použitelné pro produkci rostlinných explantátů

Bioreaktor lze definovat jako uzavřený sterilní prostor (nádobu, kontejner atd.) s tekutým médiem nebo s tekutou a vzdušnou fází s pravidelným zaplavováním, který zajišťuje optimální podmínky pro růst s možností regulace fyzikálních a chemických faktorů.

Úkolem bioreaktoru je zajistit sterilní prostředí obsahující živiny a látky potřebné pro růst a jeho regulaci. Přesněji řečeno zajistit prostředí s kontrolovanými podmínkami, jako je míchání, provzdušňování, teplota, pH roztoku, osvětlení atd. (Preil, 2005).

„Škálovatelnost“ hlavních podmínek (tedy možnost monitorovat a regulovat množství) umožňuje nejen výzkum vlivu těchto podmínek na růst, vývoj nebo produkci, ale i jejich nastavení pro optimální růst a vývoj rostliny nebo produkci požadovaného výstupu.

Bioreaktory pro produkci rostlinných explantátů můžeme rozdělit do dvou základních skupin podle způsobu ponoření (Afreen, 2006):

- **Bioreaktory s tekutým médiem**, explantáty jsou kompletně ponořeny v tekutém médiu.
- **Bioreaktory s pravidelným zaplavováním** (*temporary immersion bioreactor TIB*), explantáty jsou pravidelně zaplavovány tekutým médiem.

U všech bioreaktorů se stálým ponořením explantátů jde o snahu zajistit nějakým způsobem provzdušňování, protože explantáty jsou kompletně ponořeny v tekutém médiu a tím je zamezena přirozená výměna plynů. Neustálý kontakt s médiem, nedostatek potřebných plynů může vyústit ve vitifikaci nebo hyperhydricitu rostlinného pletiva.

Rostlinná buňka potřebuje pro svůj normální metabolismus určité množství kyslíku. Uspokojení poptávky aktivního dýchání rostlinných tkání v kultivačním médiu může zajistit jen kyslík rozpuštěný v médiu.

V bioreaktoru s tekutým médiem je omezen přenos kyslíku uzavřením v sterilní nádobě. Proto je třeba dodatečně zajistit přísun kyslíku a jeho přenos z plynné do kapalné fáze vynucenou difúzí. Děje se tak obvykle provzdušňováním, cirkulací, promícháváním se vzduchem kolébáním nebo třepáním kontejnerem, případně jiným druhem pohybu zajišťujícím zvětšení kontaktní plochy tekutého média s plynným a tím zvýšení difúze plynu.

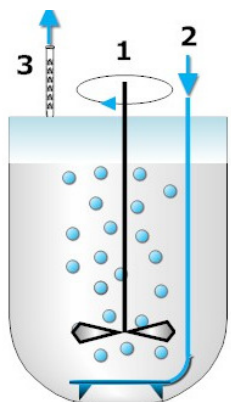
Snaha o zajištění dostatku kyslíku pro kultivované rostliny a snaha o snižování nákladů při produkci velkého množství kvalitních rostlin, snížení vitifikace a hyperhydricity vyústila ve

vývoj technologií se zcela odlišným přístupem - technologií využívajících pravidelné zaplavování. Bioreaktory s pravidelným zaplavováním (dále jen TIB) se staly díky své jednoduchosti a vysoké produktivitě velice oblíbenými.

4.2. Bioreaktory s mechanickou agitací (*mechanically agitated bioeractors*)

V současné době se pro propagaci rostlin používají tyto typy mechanických bioreaktorů (Mehrotra *et al.*, 2007):

- s mechanickým mícháním (stired tank bioreactors),
- s mechanickým mícháním a provzdušňováním (aeration agitation bioreactors),
- s rotujícím bubnem (rotating drum bioreactors),
- s rotujícím filtrem (*spin filter bioreactors*).



Obr.4 **Dávkový reaktor.**

1) míchání, 2) přívod vzduchu,
3) odvod vzduchu.

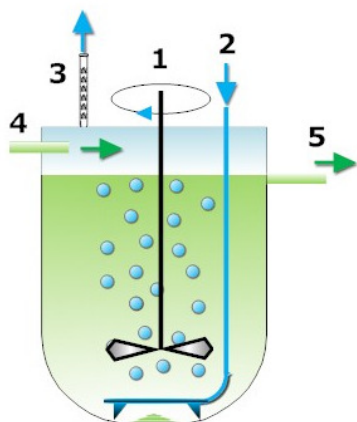
U bioreaktorů s mechanickým mícháním (*stired tank bioreactors* **STR**) je promíchávání a provzdušňování zajišťováno mechanicky (turbíny, vrtule, rotační disky, míchadla s různými profily). Regulace provětrávání a promíchávání funguje na principu regulace otáček míchadla. Tento reaktor je vhodný a hojně používaný pro kultivaci mikroorganismů, kvasinek a rostlinných buněčných kultur. Teplota, pH, množství rozpuštěného kyslíku i koncentrace živin mohou být v tomto reaktoru lépe kontrolovány, než v jiných typech reaktorů.

Problémem u těchto typů je smykové napětí mezi pohyblivou částí a biomasou. Obecně platí, že míchadla použitá v tomto reaktoru produkují vysoké smykové napětí (střížné síly) v porovnání s jinými typy bioreaktorů.

Podle způsobu kultivace můžeme bioreaktory rozdělit na dva základní typy: dávkové a kontinuální (*batch/continuous*).

V **dávkovém** (diskontinuálním) **bioreaktoru** (obr.4) probíhá kultivace přerušovaně. Po dokončení kultivace je obsah vyjmut a je vloženo čerstvé médium a inokulum. Tento reaktor je vhodný pro roztoky substrátů o relativně vysoké viskozitě a imobilizované enzymy s relativně nízkou aktivitou. Problémem je, že imobilizované enzymy mají tendenci se rozkládat při

fyzickém míchání. Dávkový systém je obecně vhodný pro výrobu poměrně malých množství produktů.



U **kontinuálního reaktoru** (Obr.5) je zajištěn na jedné straně přívod čerstvého média a na druhé straně odběr požadovaného produktu. Mechanické promíchávání je účinnější než v dávkovém reaktoru, ale zařízení je konstrukčně složitější.

Obr.5 **Kontinuální reaktor.**

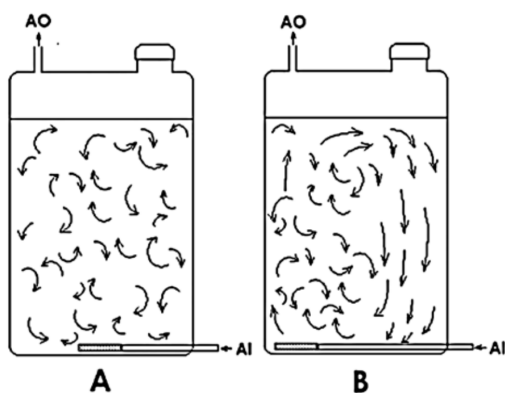
- 1) míchání, 2) přívod vzduchu,
- 3) odvod vzduchu,
- 4) přívod média,
- 5) odvod produktu.

4.3. Bioreaktory s pneumatickou agitací (*pneumatically agitated bioeractors*)

Tvoří skupinu nejčastěji používaných bioreaktorů pro propagaci rostlin.

Bioreaktory s jednoduchou aerací (*simple aeration bioreactor*)

nazývané též nemíchané bublinové bioreaktory (*unstirred bubble bioreactors*), nebo tzv. bioreaktory míchané provzdušňováním (*aeration-agitation bioreactors*).



Tento reaktor je jedním z nejjednodušších typů reaktorů. Je snadné regulovat jeho produkci množstvím vháněného vzduchu. U tohoto typu a jeho dalších odvozenin (bioreaktory s bublinovým sloupcem, bioreaktory se "vzdušným výtahem") je vytvářeno menší smykové napětí ve srovnání s mechanickým mícháním. To je užitečné pro organizované struktury, jako jsou tvořící se embrya

Obr.6 **Nemíchaný bublinový bioreaktor**

(Takayama, 2006) (*unstirred bubble bioreactor*)

AI – přívod vzduchu, AO – odvod vzduchu

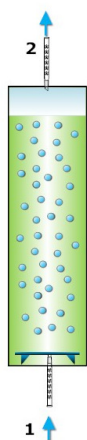
A, B: změna cirkulace polohou přívodu vzduchu

nebo kořeny. U tohoto typu lze intenzitu probublávání postupně zvyšovat se vzrůstající hustotou kultivovaných buněk, pletiv nebo orgánů.

Jeho nevýhodou je nedefinované proudění uvnitř reaktoru v důsledku nehomogenního promíchávání včetně zpomalení růstu při vysoké hustotě pletiv (Takayama, 2006).

Snaha o odstranění tohoto problému vedla ke vzniku variant s možností měnit polohu přístupu vzduchu (Obr.6). Technicky méně náročným řešením tohoto problému jsou následující dva typy bioreaktorů: s bublinovým sloupcem a vzdušným výtahem.

Bioreaktory s bublinovým sloupcem (*Bubble column bioreactors*)



Obr.7 **Bioreaktor s bublinovým sloupcem.**
(Takayama, 2006)
1) přívod vzduchu,
2) odvod vzduchu.

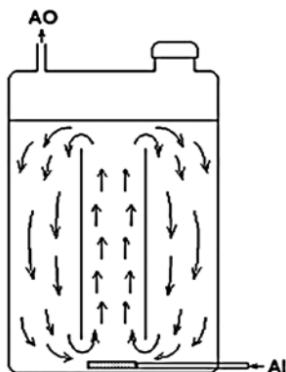
Tyto reaktory jsou také konstrukčně jednoduché. Zúžení agitačního prostoru u těchto bioreaktorů má snížit nedefinované proudění uvnitř nádoby. Jsou to vysoké úzké trubice, které využívají pouze vzduch k promíchávání obsahu reaktoru.

Provzdušňování, míchání a cirkulace v reaktorech bublinově-sloupcových probíhá za pomoci vzduchu vháněného do nádoby ze spodní části přes „rozptylovač“ (Obr.7). Vzduchové bublinky při probublávání strhávají biomasu, čímž dochází k jejímu promíchávání a požadovanému okysličování. Pro správné promíchávání je důležitý optimální přívod plynu a jeho disperze v médiu. Bylo prokázáno, že míchání plynem v bublinovém sloupci nebo u bioreaktorů bez lopatek je pro růst biomasy daleko méně škodlivé než mechanické míchání (Ziv, 2005).

Bioreaktory se "vzdušným výtahem" (*air-lift bioreactors*)

Stejně jako předešlý typ bioreaktoru je tento bioreaktor poháněn z vnějšku dodávaným vzduchem, který jednak obsah provzdušňuje ale odpovídá i za jeho promíchávání (Takayama and Akita, 2006). Od předešlého typu bioreaktoru se liší sací trubicí („draft tube“), která snižuje turbulence uvnitř nádoby. Princip je patrný z Obr.8. Sací trubice může být umístěna uvnitř, pak jde o **bioreaktor s vnitřní cirkulací** (*air-lift bioreactor with an internal loop*), nebo při umístění vně nádoby jde o **bioreaktor s vnější smyčkou** (*air-lift bioreactor with an external loop*). Bioreaktor s vnější smyčkou je konstrukčně náročnější, má však lepší vlastnosti z hlediska oběhu média, přenosu kyslíku a vyrovnání smykových sil.

Air-lift bioreaktor na rozdíl od mechanicky promíchávaných typů nevytváří tak velké střížné síly, a tak omezuje stres rostlinných buněk a orgánů v něm kultivovaných a to zvláště těch, které jsou na smykové namáhání citlivější.



Obr.8 Bioreaktor se vzdušným „výtahem“ (Draft-tube airlift bioreactor) (Takayma, 2006)
AI – přívod vzduchu,
AO – odvod vzduchu.

Taktéž použití jednorázových plastových „air-lift“ bioreaktorů pro pupenové nebo meristemické kultury přineslo zvýšení proliferace a snížení smykového napětí (Ziv, 2005).

Nicméně, tento dávkový „air-lift“ reaktor není vhodný pro kultury s vysokou hustotou protože nezajišťuje dostatečné promíchávání obsahu. V 2,5 l kořenové kultuře *Pueraria phaseoloides* je akumulace puerarinu 200 krát větší než v 250 ml třepané láhvi s touto kulturou (Choi *et al.*, 2006).

Existuje mnoho kombinací a modifikací těchto tří typů, ale vždy fungují na již zmíněných principech.

Snížení smykového napětí je užitečné zejména pro propagaci různých druhů pomocí pletivových kultur z výhonků, cibulí a hlíz.

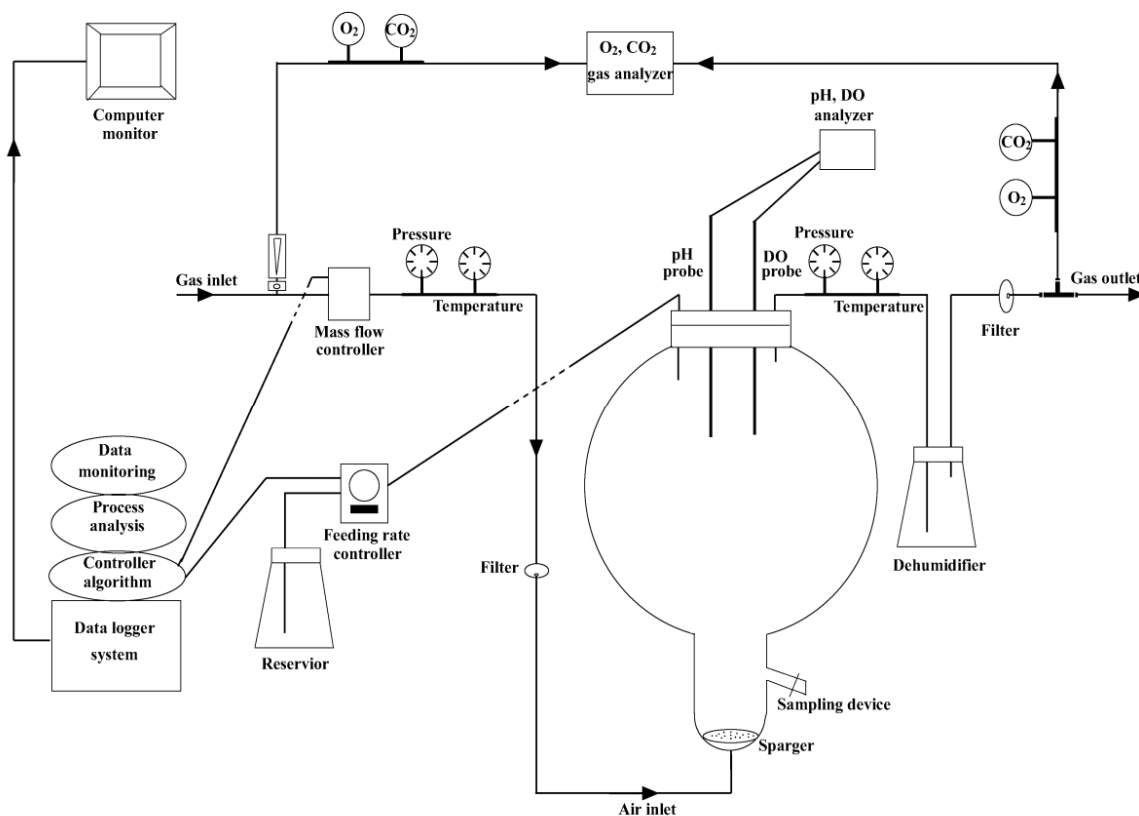
Nevýhodou těchto typů reaktorů je vznik pěny vyvolané velkými objemy vzduchu, a růst buněk v horní části prostoru a na stěnách reaktoru v důsledku stejné šířky podél celého reaktoru. Při hledání řešení tohoto problému byl navržen bioreaktor, který má rozšířenou horní část, tzv. bioreaktor balónového typu.

Bioreaktory balónového typu s probubláváním (*baloon type bubble bioreactors* BTBB)

Uspořádání BTBB jako součást automatického systému je uvedeno na obr.9. Agitační nádoba má ve spodní části trubici, kde dochází k promíchávání kultury vzduchem přivedeným do spodní části nádoby. Nádoba se v horní části rozšiřuje, takže na větší hladině již probublávání nevyvolává masivní pění.

Systém se skládá z hlavní části, vzduch vhnějícího zařízení, parogenerátoru pro sterilizaci zařízení, vzduchového přívodu, ventilačního systému, a různých kontrolních systémů pro kontrolu teploty, obsahu kyslíku, pH, dále potrubních systémů pro přenos páry, vzduchu, média, a kořenové hmoty. Pro chod reaktoru jsou nezbytná i další přídatná zařízení, jako nádrž na destilovanou vodu, míchačka média, sterilizátor média a inokulační zařízení.

Bylo zjištěno, že tento bioreaktor je vhodný pro buněčné, tkáňové a orgánové kultury. Tyto bioreaktory se vyrábějí v rozsahu desítek litrů (skleněné) nebo jako tanky z nerezové oceli o objemu 300, 500 a 1000 litrů, dokonce i bioreaktory ve velikosti 10 000 a 20 000 litrů byly využity pro produkci biomasy z různých cenných druhů rostlin (Choi *et al.*, 2006).



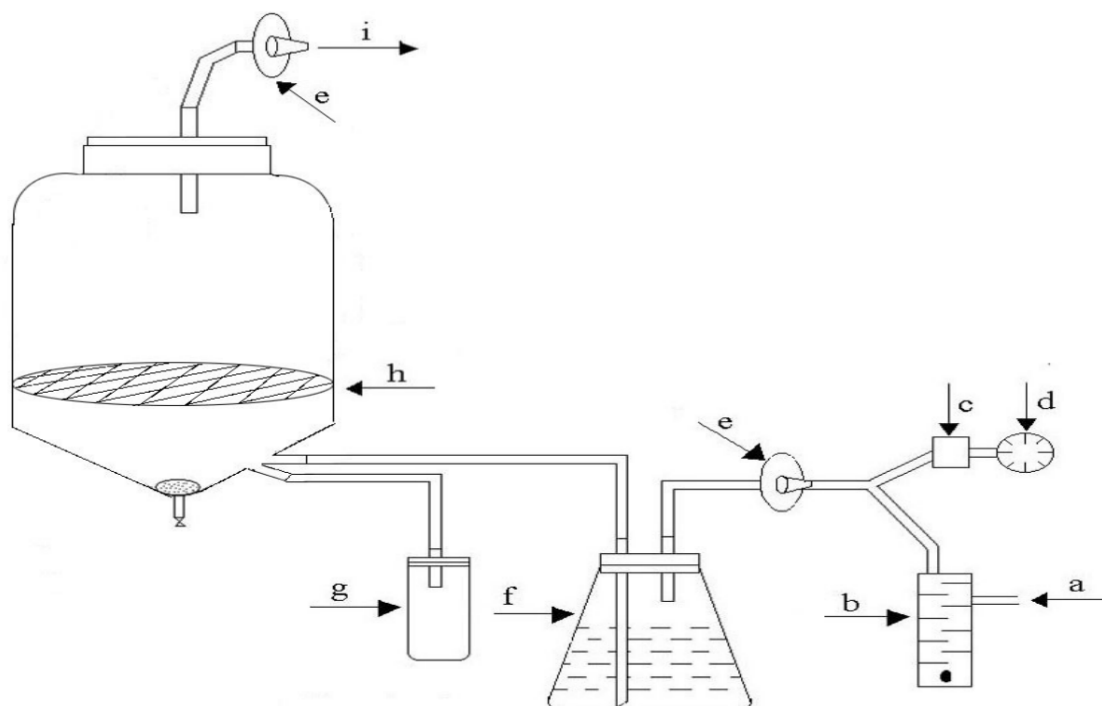
Obr. 9 **BTBB bioreaktor balónového typu (*balloon type bioreactor*)**.
(Paek *et al.*, 2005)

Bioreaktor s tekutou a vzdušnou fází s pravidelným zaplavováním (*Layout of an ebb and flood bioreactor system BTBB*)

Dalším novým systémem pro masovou propagaci je systém periodického ponořování. Základní vybavení bioreaktoru přílivu a odlivu (*ebb and flood*) je stejné jako u BTBB. Aby se zabránilo úplnému ponoření explantátů do tekutého média, pokládá se rostlinný materiál na podpůrné rošty (mřížky, sítě).

V tomto systému je médium čerpáno ze zásobníku do kultivační nádoby. Série kanálků pomáhá dodat živný roztok rovnoměrně na rostlinný materiál, což vede k vytvoření stejných podmínek pro růst v celé kultivační nádobě. Rostlinný materiál zůstává ponořen několik minut a pak je médium odčerpáno zpět do zásobníku k opětovnému použití. Odvodňování je řízeno

elektronicky v intervalech 4 až 8 hodin v závislosti na typu explantátu a druhu rostliny (Paek *et al.*, 2005).



Obr.10 **Bioreaktor s tekutou a vzdušnou fází s pravidelným zaplavováním** (*Layout of an ebb and flood bioreactor system*) (Paek, 2005) (a) přívod vzduchu, (b) měřič průtoku vzduchu, (c) časovač, (d) elektromagnetický ventil, (e) membránový filtr, (f) zásobník média, (g) výstup pro odběr vzorků, (h) podpůrná síť, (i) výstup vzduchu

4.3.1. Bioreaktory s pravidelným zaplavováním (*temporary immersion bioreactors*)

Též systémy s dočasným zaplavováním (*Temporary immersion systems TIS*).

Bioreaktory s dočasným zaplavováním (*Temporary immersion bioreactors TIB*) představují způsob, jak použít kapalně médium a zároveň regulovat plynné prostředí. Umožňuje to jednoduchou automatizaci výrobního systému s nízkými výrobními náklady. Hlavní složky těchto bioreaktorů jsou stejné, jako u bioreaktorů s bublinovým sloupcem nebo bioreaktorů se "vzdušným výtahem" s tím rozdílem, že obsahují pevnou nebo plovoucí oporu pro explantáty uvnitř kultivační nádoby. Pneumatická podpora navíc umožňuje účinnou výměnu plynů mezi explantáty a vzduchem v kultivační nádobě a účinnější využití živin včetně zvýšení účinnosti regulátorů. Výhoda technických řešení kombinující nízkonákladová zařízení a snadnou manipulaci s kulturami začala být zřejmá, když se ve velkém měřítku začaly s úspěchem

používat TIS systémy: dvoj-baňkový (twin-flasks) systém BIT® (Escalona *et al.*, 1999) a systémem RITA®, nebo jim podobné.

RITA®

Techniky pravidelného zaplavování, při kterých se ponoření explantátu v tekutém médiu střídá s umístěním ve vzduchu, poprvé popsal Steward *et al.* (1952). Systém spočíval v použití výrnných baněk s bočními výběžky, které byly umístěny na šikmé ploše roleru. Později tento systém upravili Steward and Shantz (1956) a Harris and Mason (1983). První automatizované zařízení založené na principu pravidelného zaplavování aplikovali Tisserat and Vandercook (1985). Tím byly zahájeny výzkumy pěstování *in vitro* kultur metodou dočasného zaplavování. V používání této techniky nastal průlom, když Alvard *et al.* (1993) představil systém RITA® a Teisson and Alvard (1995) prohlásili systémy s dočasným zaplavováním za nový koncept kultivace používající kapalná média. RITA® patří mezi systémy s kompletním zaplavováním (*complete immersion*) s pneumatickým pohonem bez výměny média stejně jako systém BIT®. Ovšem lze nastavit i jen částečné zaplavování bází explantátů.

Systém činnosti RITA® je postaven na principu, že tekuté médium je čerpáno do kultivačního prostoru ze zásobníku média. Médium zůstane v kultivačním prostoru jen pár minut, dokud trvá tlakování nádoby, pak postupně ztéká zpět do zásobníku k opětovnému použití. Celý proces je řízen spínačem vzduchování a doba intervalu se pohybuje mezi třemi až šesti hodinami, v závislosti na druhu rostlin nebo požadavku explantátů (Podrobnější popis a činnost viz kap. 7. Praktická část).

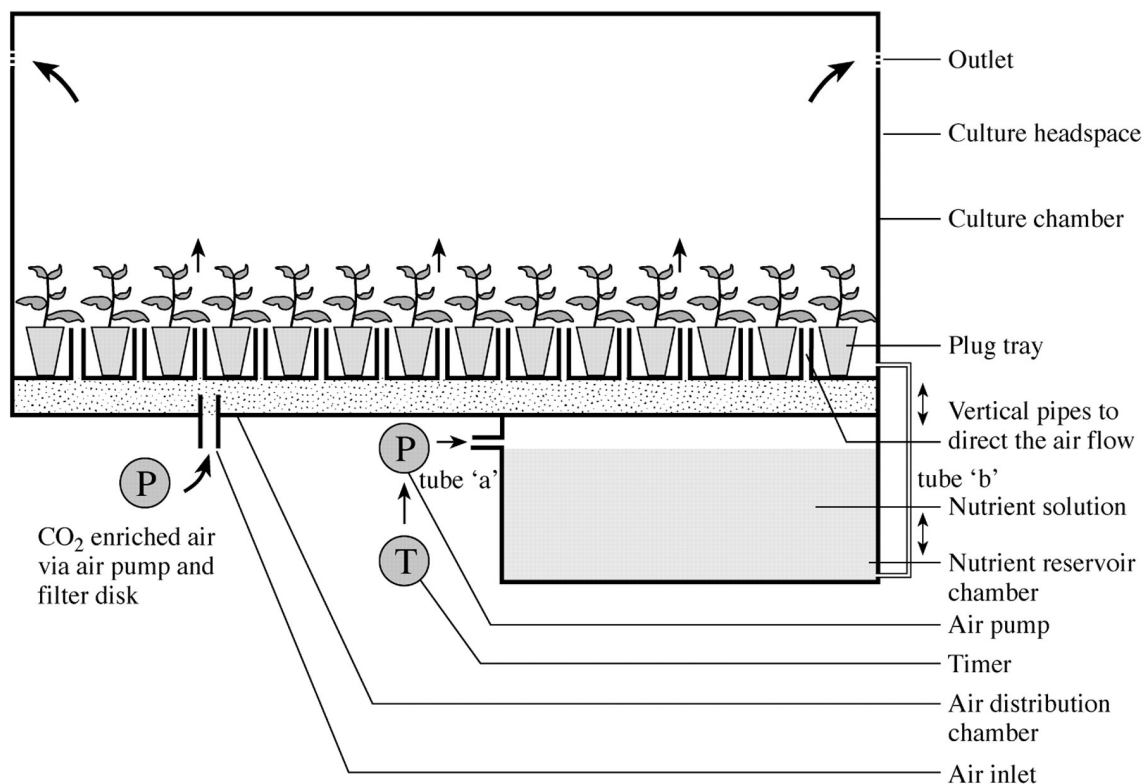
Bioreaktory s tekutými kulturami jsou vhodné zejména pro produkci somatických embryí, růst cibulek, oddenkových hlíz, mikrohlíz, kompaktních kultur prýtů apod. Komplexnější přehled o konkrétních aplikacích uvádí ve své práci Berthouly a Etienne (2005).

Bioreaktory RITA® nebyly vyvinuty pro kultivaci rostlin za fotoautotrofních podmínek. Obecně platí, že bioreaktory RITA® se používají pro vývoj rostlin z embryogenních kultur buněčné suspenze, používajících média obsahujících cukr.

Bioreaktory s dočasně zaplavovanými kořeny (*temporary root imersion TRI*)

Bioreaktor navržený autory Afreenem *et al.* (2002) je soustavou dvou hlavních komor (obr. 11). Dolní komora slouží jako zásobník živného roztoku a horní pro kultivaci embryí. Pod kultivačním prostorem se nachází nízká komora pro distribuci vzduchu. Filtrovaný vzduch se přivádí dvěma vstupy, které jsou označeny jako [Ⓟ]. Do kultivační komory ústí vertikální

provzdušňovací trubičky, které umožňují lepší provzdušňování v horní části kultivační nádoby vzduchem obohaceným CO₂. Na bočních stěnách bioreaktoru jsou výstupní otvory se vzduchovými filtry. Kontejnery pro umístění rostlin jsou vyjímatelné a lze je autoklávovat.



(P)	CO ₂ enriched air via air pump and filter disk	vzduch obohacený o CO ₂ přes vzduchové čerpadlo a filtrační disk	
(P)	tube 'a'	Přívod vzduchu k zásobníku živin	
Outlet	výstup pro vzduch s filtrem	Nutrient solution	živný roztok
Culture headspace	horní část kultivační nádoby	Nutrient reservoir chamber	zásobník živin
Culture chamber	kultivační komora	Air Pump	vzdušné čerpadlo
Plug tray	vyjímatelné kontejnery	Timer	časovač
Vertical pipes to Direct the air flow	vertikální trubičky pro přímé proudění vzduchu	Air distribution chamber	komora pro rozvod vzduchu
tube 'b'	přívod média	Air inlet	vstup vzduchu

Obr. 11 **Popis bioreaktoru TRI.** Afreen *et al* (2002).

Přívod vzduchu k zásobníku živin (*tube 'a'*) vytlačí na pokyn časovače přívodem médiem (*tube 'b'*) do dolní části kultivační komory. Zaplavena je pouze kořenová zóna po určité době (např. 15 min.). Po vypnutí čerpadla přebytek živného roztoku působením gravitace odteče zpět do zásobníku. Akce se po delším časovém intervalu (cca 6 hod.) opakuje.

Ve své studii provedl Afreen (2006) srovnání fotoautotrofní propagace rostlin z embryí v systému TRI se systémy využívajícími nádoby Magenta® a nádoby RITA® upravenými pro fotoautotrofní propagaci. Nárůst v modifikovaném bioreaktoru RITA® byl podstatně nižší ve

srovnání s růstem v bioreaktoru TRI. To bylo s největší pravděpodobností důsledkem toho, že v modifikovaném bioreaktoru RITA® po každém ponoření rostlinného materiálu zůstal na rostlinkách tenký film živného i po opadu média. Protože relativní vlhkost vzduchu je v kultivační nádobě vysoká (95-99%), povrch rostlinného materiálu buď není nikdy zcela vysušený, nebo to trvá dlouhou dobu, než vyschne. Tenká vrstva média tak brání výměně plynů a snižuje fixaci CO₂ v chlorofylu, klíčovém faktoru pro růst fotoautotrofních embryí. Navíc byl bioreaktor RITA® upraven na připojení tří membránových plynových filtrů, stejně jako nádoby Magenta, což také přispělo k odlišným výsledkům, než jsou výsledky běžně očekávané u bioreaktorů RITA® při použití živných roztoků s cukrem. Explantáty pěstované v bioreaktoru TRI vykazaly v této studii nejen nejlepší růst, ale byly i fyziologicky normální a lépe připraveny na převod do podmínek *ex vitro*.

U bioreaktoru TRI je zaplavována pouze kořenová zóna a zbytek rostlin zůstává netknutý a tím výměna plynů mezi rostlinou a okolním prostředím není omezována vrstvou média. Proto zde rostlina může snadněji vytvářet vlastní sacharidy fotosyntézou.

4.4. Bioreaktory bez agitace (*non-agitated bioeractors*)

Kapalně disperzní bioreaktory (*liquid dispersed bioreactors*)

Jsou to bioreaktory využívající disperzi média. Byly vyvinuty pro kořenové kultury s ohledem na jejich fyziologii a jejich potřebu většího kontaktu s atmosférou, ke kterému při jejich trvalém ponoření do média nedochází. Tyto reaktory mohou být klasifikovány buď jako bioreaktory s kapalnou fází nebo s plynou fází.

Kapalně disperzní reaktory jsou výhodné, jak pro dostatečný přísun kyslíku ke kořenům, tak pro minimální stres vyvolaný smykovým napětím ve srovnání s reaktory, ve kterých kořeny zůstávají ponořené v tekutém prostředí.

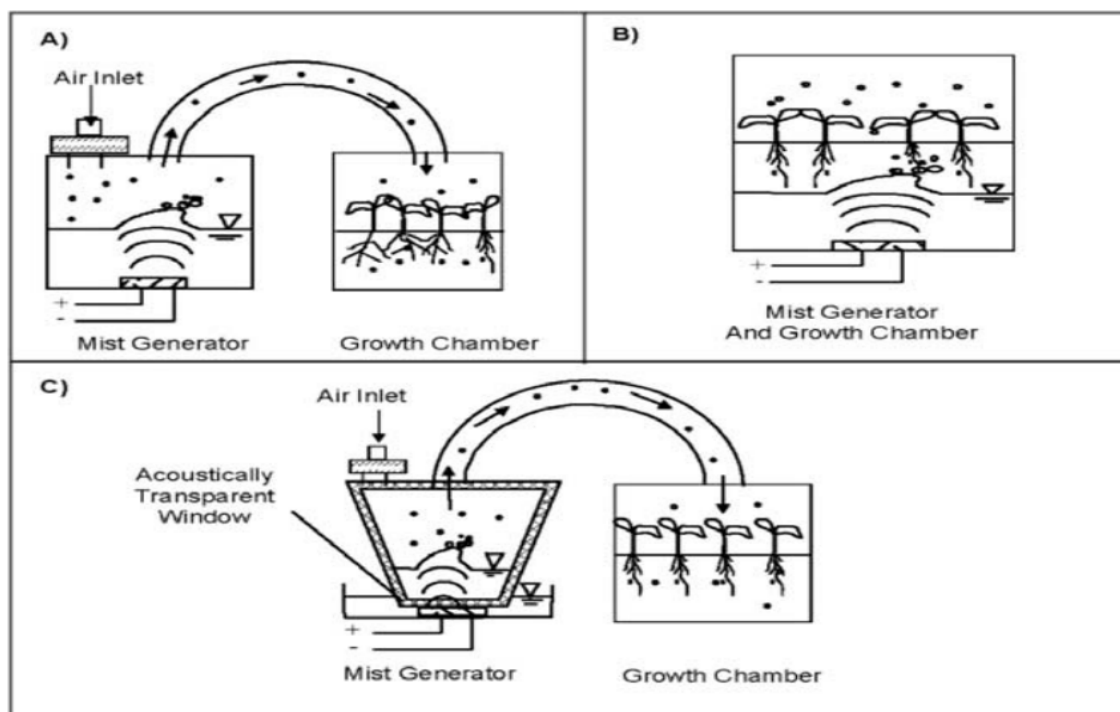
V kapalně disperzních reaktorech jsou kořeny vystaveny atmosféře nebo směsi plynů a živného média, které je rozptýleno rozprašením nebo mlžením na vrcholu nádoby obsahující kořeny. Stékající médium je odčerpáváno ze dna nádrže do zásobníku a po té znovu použito. Stupně disperze kapaliny se liší podle mechanismu rozprašování. Bylo vyvinuto několik typů těchto bioreaktorů speciálně pro kořenové kultury: kapkové, mlžné, „trickle bed“, „tricking film“ a „drip-tube“ reaktory. Aby nedocházelo k poškození kořenů nadměrným pohybem, bylo vyvinuto několik druhů mechanických opor jako jsou například sítě, polyuretanová pěna,

skleněné perly, keramické nebo kovové kroužky, ocelové dráty, válcová oka atd. (Choi *et al.*, 2006).

Ultrazvukové mlžné reaktory

Použijeme-li půdu, nebo nějaký substrát jako médium zajišťující přísun živin pro rostlinu, mluvíme o tzv. geoponii. Aeroponie je proces pěstování rostlin ve vzduchu v mlžném aerosolovém prostředí bez použití půdy, případně agregátu média. Aerolinie, narozdíl od hydroponie a konvenčních metod kultivace *in vitro*, které používají pro přísun živin a minerálů vodu, používá jako přenosové médium vodní mlhu.

Aeroponické technologie byly již použity ke studiu biologických jevů u rostlin, symbiotických vztahů, mykorhizních asociací, ke zkoumání účinků onemocnění, minerální výživy, celkové morfologii a fyziologii rostlin, atd. (Waethers and Zobel, 1992).



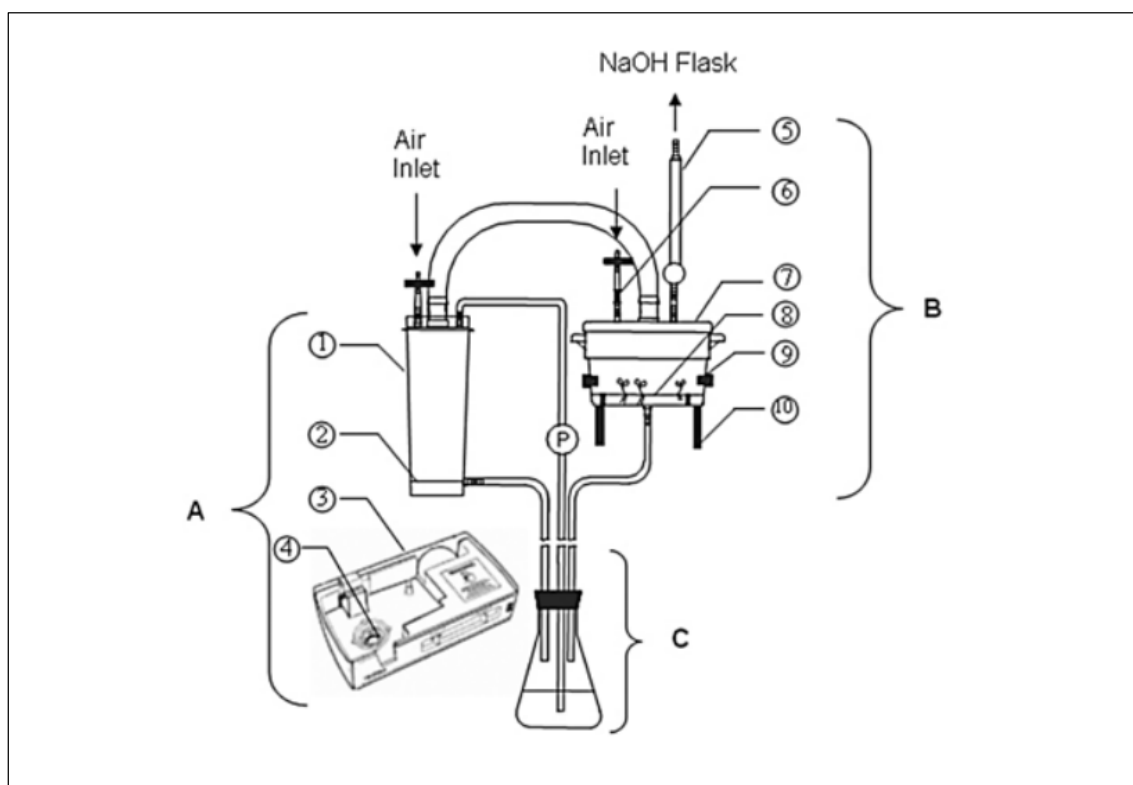
Obr. 12. **Tři typy ultrazvukových mlžných reaktorů:** (A) generátor mlhy a růstová komora jsou v samostatných částech, (B) generátor mlhy a růstová komora jsou ve stejné nádobě, (C) generátor je oddělen od autoklávované komponenty akustickým oknem. Směr pohybu mlhy je indikován šipkami. Popis: generátor mlhy (Mist Generator), růstová komora (Growth Chamber), akustické transportní okno (Acoustically Transparent Window), přívod vzduchu (Air Inlet). (Towler, 2006)

Aeroponie byla již využita v *in vitro* kulturách rostlinných diferencovaných pletiv, při rostlinné mikropropagaci a při kultuře transformovaných kořenů pro produkci sekundárních metabolitů. Z hlediska aeroponie jsou možné dvě hlavní kategorie bioreaktorů: **reaktory s kapalnou fází** a **reaktory s plynnou fází**.

U první skupiny je pletivo ponořeno v médiu. Jedním z největších problémů v těchto kultur je dostupnost kyslíku k ponořenému pletivu v důsledku jeho malé rozpustnosti v tekutém médiu.

V reaktorech s plynnou fází je explantát vystaven vzduchu nebo směsi plynů a živiny jsou dodávány jako kapičky. Velikost kapek se pohybuje v rozmezí $0,01\mu\text{m} - 10^3\mu\text{m}$ (mlha-sprej). Omezení přenosu zejména kyslíku, může být výrazně zmenšeno nebo odstraněno pomocí plynné fáze v systému kultury.

Původní konstrukce aeroponických systémů pomocí trysek vyžadovaly stlačený plyn a byly náchylné k zanášení se usazeninami solí. Ultrazvukové měniče, ponořené do kapaliny tento problém odstranily. Nastal však jiný problém, měniče byly součástí prostředí a tudíž musely být desinfikovány v autoklávu, což značně snižovalo jejich životnost (obr. 13A a 13B. Po nalezení vhodných materiálů schopných přenášet akustické vlny (např. polyuretan), došlo k oddělení



Obr 13. **Ultrazvukový mlžný reaktor s oknem.** (Towler *et al.*, 2006)

A. generátor mlhy: (1) polypropylénová mlžná komora, (2) hladina výživného média, (3) zvlhčovač, (4) ultrazvukový generátor.

B. mikropropagační komora: (5) „coalescer“, (6) jednosměrný ventil, (7) mikropropagační komora, (8) základna pro rostlinky, (9) port pro odběr vzduchu, (10) opora komory.

C. zásobník média: (P) peristaltické čerpadlo pro čerpání média do mlžné komory.

generátoru vln od média akusticky transparentním oknem (obr. 13C). Náročnost výroby okna vedla k náhradě komerčně dostupnou polypropylénovou nádobou. Tato konstrukce byla již úspěšně použita v mikropropagaci. Dnes se používají modifikace obou těchto variant.

Výhodou systémů s plynnou fází, jako jsou bioreaktory s živinovou mlhou (*nutrient mist bioreactor*), je možnost přesného ovládní složení plynu a relativní vlhkosti v okolí rostliny. Tyto parametry mohou významně ovlivnit míru rozmnožování, zakořeňování a aklimatizace. Autoři Towler *et al.* (2006) citují studie, které využily tento typ bioreaktoru např. pro mikropropagaci a kulturu kořenů hvozdíku.

5. Bioreaktory RITA® - praktická část

5.1. Cíle experimentu

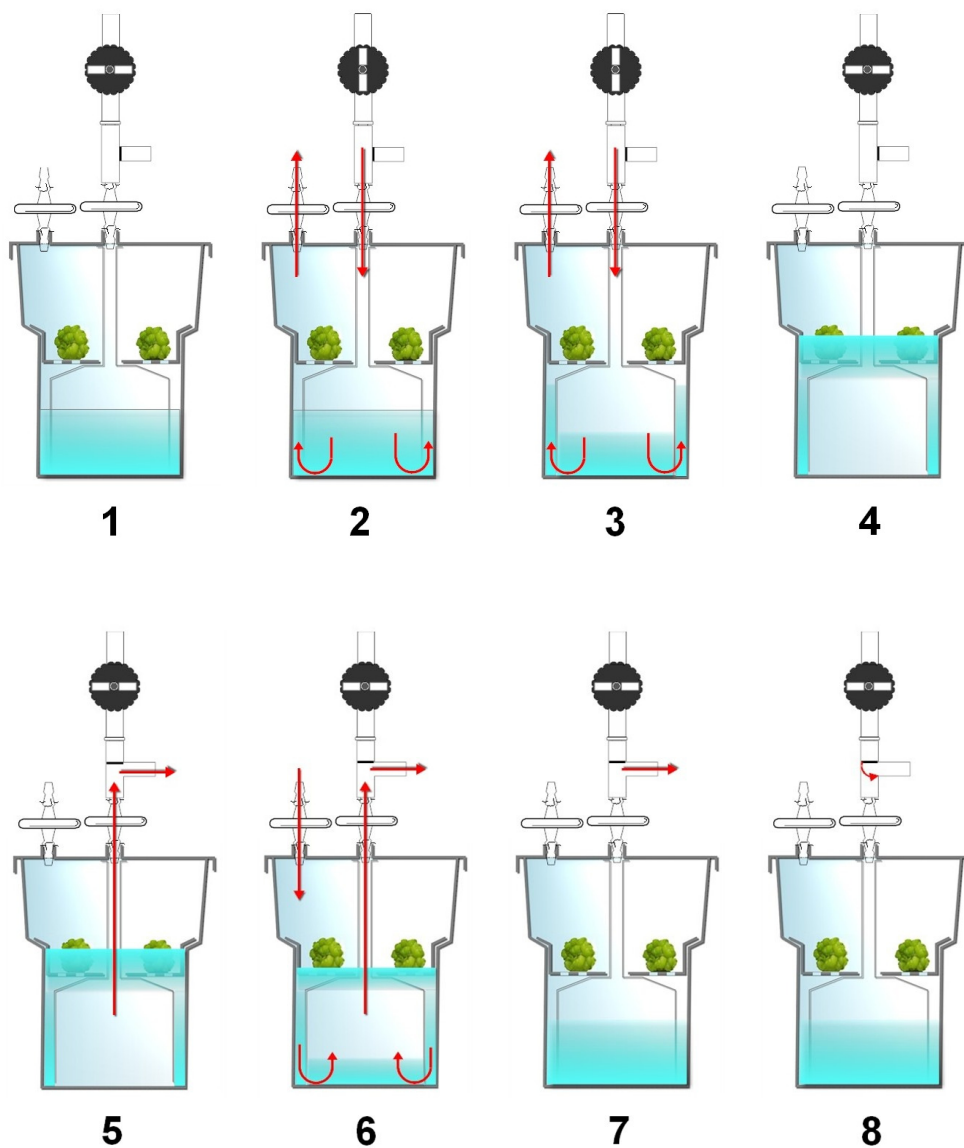
Testování kultivace různých druhů rostlin v bioreaktoru RITA® a měření fotosyntetické aktivity explantátů pomocí indukované fluorescence chlorofylu u kultury orchidejí *Potinara hybr.*

5.2. Charakteristika bioreaktoru RITA®

Systém RITA® (Vitropic, 2011) pracuje na principu periodického zaplavování kultury tekutým živným médiem. Oproti dlouhodobému ponoření částí rostlin do média, při kterém často dochází k vývoji vitifikace a asphyxie v důsledku přílišného pronikání kultivačního média do rostlinných pletiv a nevhodné koncentrace plynů, představuje systém RITA® řešení těchto problémů. Systém periodického zaplavování kultury živným médiem umožňuje pro různé rostlinné druhy nastavit jak délku periody zaplavování, tak četnost opakování (frekvenci zaplavování), aby byly optimální pro daný druh. Jednotlivé bioreaktory RITA® jsou válcovité nádoby z trvanlivého autoklávovatelného plastu o celkovém objemu 1 litr, ve kterých je na perforované podložce ve střední části bioreaktoru připevněna polypropylénová síťka pro umístění explantátů. Spodní část obsahuje kultivační médium. Kontejner je připojen přes sterilní filtr na automatické vzduchové čerpadlo, které vytváří přetlak ve spodní části nádoby, čímž vytlačuje médium vzhůru k explantátům. Vzduchové čerpadlo je řízeno časovačem, který určuje dobu trvání a četnost ponoření explantátů do média. Sterilitu kultury zajišťují vzduchové filtry (milipore) (Dubová *et al.* 2009, Róth *et. al.* 2010).

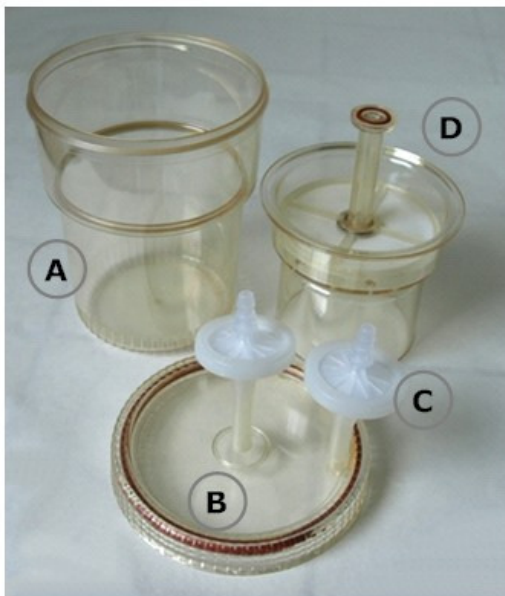
V první fázi (pohotovostní fáze - *stand by*) je bioreaktor v klidu a explantáty jsou vystaveny plynné atmosféře (Obr.14.(1)). Tato fáze je ze všech nejdelší. Druhá fáze (zaplavení kultury) je velmi krátká a několikrát denně se opakuje. Periody zaplavování se pohybují v rozmezí 1 krát 1 minuta za den až po 4 krát 15 minut za den. Optimální doba je stanovena až při vlastním experimentu

Otevřením solenoidního ventilu (Obr 14.(2)) kompresorem vháněný vzduch začne vytlačovat kapalinu ze zvonovité části nádoby, hladina v nádobě začne stoupat (Obr 14.(3)), až je celý prostor pod zvonem zaplněný vzduchem a explantát v horní části je zaplaven (Obr 14.(4)). V této chvíli je médium probubláváno, čímž se okysličuje. Zároveň roste tlak, který umožňuje lepší difúzi plynů do média a pletiv explantátů. Po uzavření solenoidního ventilu a otevření klapky (Obr 14.(5)) se médium začne vracet do spodní části nádoby (Obr 14.(6),(7)), sloužící jako zásobník a tlak v bioreaktoru klesne. Tím nastává další klidová fáze (Obr 14.(8)).



Obr.14 Činnost bioreaktoru RITA® (Afreen, 2006), (Vitropic, 2011)

Bioreaktor RITA® představuje efektivní způsob pro propagaci rostlin v podmínkách *in vitro* s využitím tekutého média a nucené cirkulace kultivační atmosféry a je využíván pro masovou propagaci některých hospodářsky významných plodin. Výrazně snižuje objem vynaložené práce a umožňuje kultivovat větší množství explantátů na jednotku plochy než klasická metoda kultivace na ztuženém médiu. Bioreaktory RITA® byly na Oddělení fyziologie a anatomie rostlin Ústavu experimentální biologie Př.F. MU zakoupeny v roce 2009 v rámci projektu FRVŠ 2362/2009.



Obr. 15 **Součásti Bioreaktoru RITA®**
 (A) vlastní nádoba, (B) víko se vzduchovými filtry, (C) vnitřní část se sítkou, košíkem a zvonem spojená centrální trubičkou.



Obr. 16 **Vzhled kultury kapradiny *Nephrolepis exaltata* pěstované v bioreaktoru RITA®,**

Celý kultivační systém byl v rámci výše uvedeného projektu Fondu rozvoje vysokých škol doplněn o zakázkově vyrobené speciální zdroje světla, které lze individuálně nasadit na horní část kultivačních nádob. Zdrojem záření pro každý bioreaktor RITA® je panel osazený pěti super-svitivými LED diodami spojený s pasivním chladičem. Každý světelný zdroj je připojen k řídicí jednotce, která umožňuje pomocí řídicího elektronického modulu nastavit různou úroveň ozáření pro jednotlivé kultivační nádoby. Osvětlovací systém vyvinul Ústav teoretické a experimentální elektrotechniky, fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií VUT v Brně. (Dubová *et al.* 2009, Róth *et al.* 2010). Abychom byli tuto aparaturu schopni co nejlépe využít a nastavit její optimální chod, rozhodli jsme se sledovat reakce explantátů na změny okolního prostředí a hodnotit jejich fyziologický stav pomocí metody měření indukované fluorescence chlorofylu. Důvodů pro využití této metody je hned několik. Jedná se o nedestruktivní metodu a na rozdíl od gazometrie nevyžaduje přímé začlenění do kultivační aparatury a tak nenarušuje chod kultivace. Dále jde o její velmi snadnou instalaci nad zkoumanými objekty. Neméně podstatným důvodem bylo to, že sledování indukované fluorescence je poměrně novou metodou, i když její princip je znám již delší dobu. Její širší rozšíření a využití však umožňuje teprve až současný pokles cen na trhu informačních technologií. A tak se pomalu začíná tato metoda uplatňovat i na poli explantátových kultur.

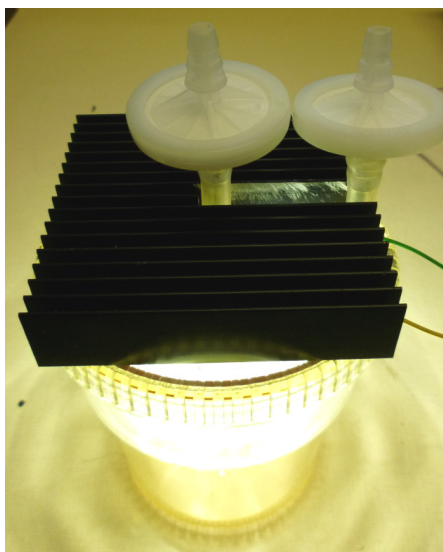
RITA® na VUT v Brně: způsob umístění osvětlovacích zařízení na bioreaktor RITA® - pohled shora na pasivní chladič

5.3. Materiál a metody

K založení kultivačního experimentu byly použity orchideje druhu *Potinara hyb.* z již zavedené *in vitro* kultury ve fázi multiplikace. Ve zkušební fázi kultivace explantátů v bioreaktoru RITA® bylo také testováno chování dalších rodů rostlin (*Nephrolepis exaltata*, *Verbascum thapsus*, *Cymbidium eburneum*, *Dionaea muscipula*)

Jako médium bylo použito tekuté MS médium (Murashige and Skoog, 1962) o poloviční koncentraci makroelementů, s 2% sacharosou, bez přídavku exogenních růstových stimulátorů.

Ke kultivaci byly využity bioreaktory RITA® s periodou zaplavování 7 intervalů po 5 minutách v průběhu 24 hodin. Pro srovnání byla stejná kultura kultivována také na MS médiu stejné koncentrace ztuženém 0,7% agarem.



Obr. 17 Systém supersvitivých světloemitujících diod (SB LED) zkonstruovaný pro bioreaktory RITA®.

Explantáty byly kultivovány za kontinuálního osvětlení při 2 různých světelných intenzitách - při nízké ozáření asi $80 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a za vysoké ozáření $150 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Jako světelné zdroje posloužily u nízké ozáření klasicky využívané zářivky a panel osazený pěti super-svitivými LED diodami spojený s pasivním chladičem a ovládaný řídicí jednotkou, která umožňuje pomocí řídicího elektronického modulu regulaci intenzity záření, poskytoval vysokou ozáření bioreaktoru. Tento panel je zobrazen na Obr. 17.

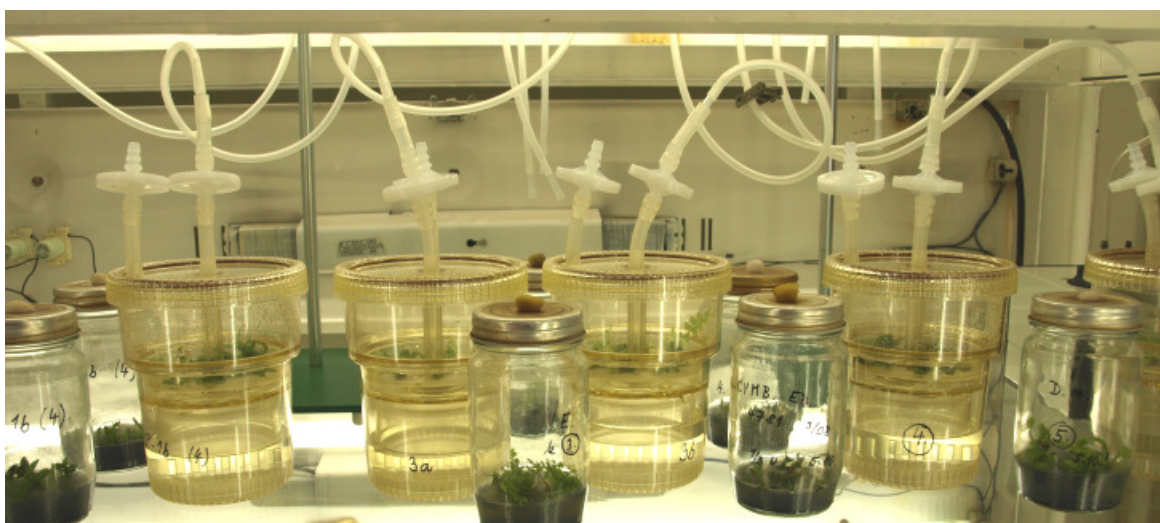
Kultivační teplota byla řízena automatickým nastavením teploty místnosti. Teplota byla konstantní v celém průběhu kultivací a činila $20 \pm 0.9\text{C}$. Drobné teplotní výkyvy v kultivační místnosti byly způsobeny zapínáním/vypínáním termostatu.

Pro měření indukované fluorescence chlorofylu jsme využili fluorometrickou aparaturu MONI PAM (H.WALZ, Německo), která sestává z měřících sond, elektronické jednotky vysílající v 10 minutových intervalech krátké saturační pulsy záření vůči experimentálním rostlinám a dále ze záznamové ústředny (MONI-DA logger, H. Walz, Německo) registrující v automatickém režimu fluorometrické údaje. Tato aparatura byla instalována na bioreaktor

RITA®. Saturační puls umožňuje stanovit hodnotu kvantového výtěžku fotosyntetických procesů ve fotosystému II, a tedy vyjádřit okamžitou hodnotu rychlosti fotosyntézy pomocí rychlosti toku elektronů (ETR) membránovým systémem thylakoidů v chloroplastu.

Relativní tok elektronů ($ETR_{rel.}$) je vyjádřen jako součin Φ_{II} kvantového výtěžku fotosyntetických procesů a hodnoty ozáření fotosynteticky aktivní radiace (PAR) dopadající na rostlinu. Aktuálním kvantovým výtěžkem elektronového transportu (Φ_{II}) rozumíme počet molů elektronů zpracovaných fotosystémem II na jeden mol fotonů absorbovaných listem. Kvantový výtěžek elektronového transportu je ukazatelem aktuální kapacity fotosystému II pro fotochemické procesy (udává míru „otevřenosti“ reakčních center PS II). Proto se kvantový výtěžek elektronového transportu PS II používá pro výpočet rychlosti čisté fotosyntézy.

5.4. Výsledky a diskuze



Obr.18 Kultivační skleněné nádoby a bioreaktory RITA® připojené k rovdzdušňovacímu systému.

V tomto experimentu byly srovnávány rozdíly v růstu explantátů na ztuženém a tekutém médiu a vliv různé intenzity světla na fotosyntetické procesy explantátů kultivovaných v bioreaktorech RITA®. Ztužené médium obsahovalo plnou koncentraci anorganických solí MS média a tekuté pouze poloviční koncentraci. Obě varianty rostly bez přídavku exogenních regulátorů růstu. Na obrázcích Obr.18 jsou vidět kultivační nádoby (200 ml sklenice), ve kterých byly explantáty pěstovány na agaru a bioreaktory RITA, ve kterých bylo kultivační médium tekuté. Explantáty

kultivované na agarrech byly po celou dobu růstu vystaveny světelné intenzitě $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (zdroj světla: zářivky v kultivační skříni).

Měření indukované fluorescence probíhala pouze u dvou bioreaktorů, neboť pro vlastní experiment byly k dispozici pouze dvě zařízení (sensory fluorescence chlorofylu) pro sledování fotosyntetických procesů. První bioreaktor byl vystaven pouze světlu tvořenému běžným venkovním světlem dopadajícím do kultivační místnosti a světlem ze zářivek umístěných na vnitřních stěnách kultivačních skříní. Kombinací těchto dvou složek vznikla intenzita osvětlení, která byla relativně nízká a kolísala uvnitř bioreaktoru v rozmezí $80 \pm 15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Druhý bioreaktor byl osvětlován panelem s SB LED diodami, jehož intenzita záření byla $150 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Při vyhodnocení kultivačního experimentu byly pozorovány výrazné rozdíly v růstu kultur na ztuženém médiu oproti tekutému médiu. Na ztuženém médiu se vyvíjely mohutné rostliny (průměrná výška 8 cm) s potlačeným vývojem adventivních prýtů a bohatým kořenovým systémem, zatímco v kapalném médiu byly explantáty menší (do 3 cm výšky) a vytvářely kulturu mnohonásobných prýtů s potlačenou tvorbou kořenů.

Rozdíly v růstu explantátů mezi kulturami v bioreaktorech pěstovaných za různé intenzity světla byly stanoveny biometrickou analýzou. Explantáty pěstované za vyšší intezity záření měly na konci experimentu o 30% vyšší biomasu(vyjádřenou v suché hmotnosti- data v této práci neuvedena). Výška explantátů se mezi variantami lišila, explantáty pěstované ve vyšší ozáření



Obr.:19 **Kultura protokormů** *Potinara hyb.* kultivovaná za nízké ozáření



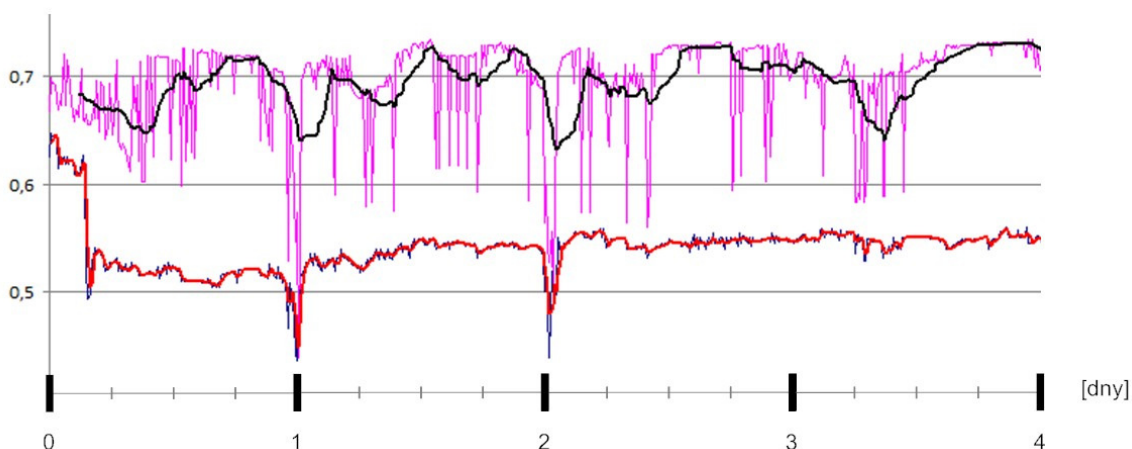
Obr.:20 **Kultura protokormů** *Potinara hyb.* kultivovaná za vysoké ozáření

měly své vrcholové části umístěny blíže zdroji záření než druhá varianta. To vedlo k výrazné změně zabarvení vrcholových částí explantátů (to je patrné na obrázcích Obr.19 a Obr.20). Šlo o ztmavnutí a v konečné fázi o zhnědnutí asimilačních pletiv v důsledku příliš vysokých intenzit světla.

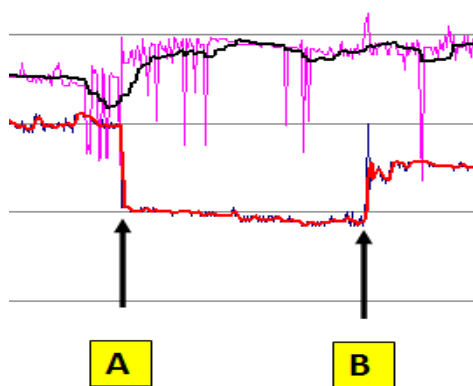
Tento světelný stres lze odvodit z extinkční křivky fotosynteticky aktivní radiace (PAR) emitované zdrojem záření (data v této práci neuvedena). Je zřejmé že v místě růstu terminálních částí explantátů byly hodnoty radiace vyšší než $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Tato hodnota je velmi vysoká a pro optimální růst explantátů nevhodná. Svědčí o tom údaje z literatury, které uvádí nižší hodnotu optimum kultivačního světla pro různé druhy rostlin. Zhang *et al.* (2009) uvádějí hodnotu $100 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ za vyhovující a to I za fotoautotrofních růstových podmínek na mediu neobsahujícím přidaný cukr. U explantátů jahodníku dochází k destrukci fotosyntetického aparátu již při světelné intenzitě $150 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Borkowska, 2006). Někteří autoři uvádějí jako nízkou ozářenost pro *in vitro* kultury $50 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a vysokou ozářenost $200 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Hofman *et al.* 2002). Radonová and Tichá (2008) uvádějí postupnou nekrotizaci listů tabáku pěstovaných *in vitro* za ozářenosti nízké (LI) $60 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, střední (MI) $180 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a vysoké, (HI) $270 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. V nejvyšší ozářenosti se objevily velmi brzy příznaky stárnutí listů, po další kultivaci byly zaznamenány i u středních hodnot ozářenosti. Poškozené listy rovněž vykazovaly pokles parametrů fluorescence chlorofylu (Fv/Fm a Φ II). Z těchto studií je zřejmé, že s výjimkou světlotolerujících rostlinných druhů je pro *in vitro* kultivaci vhodné pěstování explantátů ve svělených intenzitách do $150 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Pokud jsou *in vitro* rostliny pěstovány za vyšších hodnot světla, pak se u nich aktivují fotoochranné mechanismy, neboť se rostliny musí vyrovnat se negativním působením fotoinhibice. Mezi mechanismy, zjištěné pro *in vitro* rostliny kultivované ve vyšších ozářenostech (až do $380 \mu\text{mol}$ fotonů $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) patří snížení obsahu chlorofylu, zvýšení relativního množství pigmentů xantofylového cyklu, aktivace nefotochemického zhášení absorbované energie světla, zvýšení činnosti askorbát-glutathionového cyklu (Kadleček *et al.* 2003).

Jako explantát je označován každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo soubor orgánů, který je vytržen z korelačních vztahů celku a je pěstován v umělých podmínkách (Bauer, 1939). Využití kultur explantátů se nevztahuje pouze na vědecký výzkum, ale i na komerční sektor, který touto metodou produkuje sazenice nebo rostlinné sekundární metabolity. K těmto účelům byly vyvinuty různé metody kultivace explantátů, a to jak na ztužených médiích tak i v tekutých médiích.

Metoda měření kvantového výtěžku fotosyntézy je komparativní metoda, která umožňuje srovnání fotosyntetické činnosti explantátů. Měříme-li kvantový výtěžek za konstantní ozáření, pak vyšší hodnoty F II znamenají vyšší rychlosti fotosyntézy. V oblasti *in vitro* kultivací je tato metoda využívána pro posouzení vitality pěstovaných explantátů, často doprovázena sledováním dalších markerů (např. indexů reflektance, (Ibaraki and Gupta 2010) nebo úspěšnosti přenosu rostlin z *in vitro* do *ex vitro* podmínek (Hofman *et al.* 2002). V případě našeho experimentu však kvantový výtěžek sloužil k porovnání okamžitých rychlostí fotosyntetických procesů kultur protokormů *Potinara* vystavených různé ozáření. Je zřejmé, že kvantový výtěžek u explantátů vystavených během růstu vyšším intenzitám světla vykazoval trvale nižší hodnoty. Obr.21 znázorňuje hodnoty kvantového výtěžku fotosyntézy dvou vzorků. Vzorek 1 (fialová/černá barva) – představuje kvantový výtěžek fotosyntézy protokormů pěstovaných za nízké ozáření (LL = 80 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$), vzorek 2 (modrá/červená barva) – protokormy pěstované za vysoké ozáření (HL = 150 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Osa x znázorňuje délku trvání experimentu v dnech, osa y znázorňuje hodnoty kvantového výtěžku fotosyntézy. Z grafu jasně vyplývá, že více ozářená varianta (HL) vykazuje nižší kvantový výtěžek oproti variantě méně ozářené (LL), což je typické pro rostliny aklimatizované na velké dávky fotosynteticky aktivní radiace. V experimentech tohoto typu obecně platí, že čím nižší je zjištěná hodnota kvantového výtěžku, tím více je fotosyntetický aparát rostliny energetizován a pracuje s nižší efektivitou transformace absorbované energie záření do primárních biochemických produktů fotosyntézy. Tento fakt je obecně znám a vychází ze základní studie zabývající se vztahem mezi kvantovým výtěžkem fotosyntetických procesů probíhajících ve fotosystému II a celkovou rychlosti fotosyntézy v závislosti na aktuálním ozáření (Genty *at al.* 1989). Nicméně, i tato nižší efektivita typická pro rostliny kultivované v HL podmínkách je dostatečná pro to, aby celkový fotosyntetický výkon (vyjádřený například pomocí toku elektronů, ETR) byl vyšší u rostlin vystavených vyšším hodnotám kultivační ozáření. (Róth *et al.* 2010). Podstatou vyššího fotosyntetického výkonu je fakt, že ETR závisí jak na hodnotách F II, tak na množství dopadajícího fotosynteticky aktivního záření využitím při fotosyntéze ($\text{ETR} = \text{F II} * \text{PAR} * \text{Abs} * 0,5$). Proto v našich pokusech využívajících bioreaktory RITA® byly hodnoty ETR (Roth *et al.* 2010) přibližně 2,5 krát vyšší u explantátů *Potinara* sp. pěstovaných ve vyšší ozáření než u explantátů pěstovaných za nižší ozáření.



Obr. 21 Aklimatizace reprezentovaná prudkým poklesem a následným růstem kvantového výtěžku. (čas: 1.-4. den).



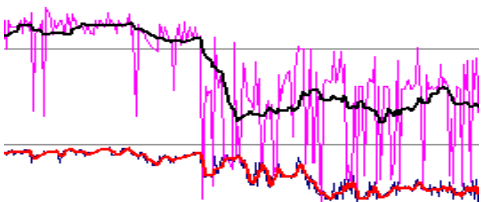
Obr.22 reakce kvantového výtěžku na změnu intenzity záření

A: Pokus o nápravu závady: po upevnění světla mírné zvýšení intenzity.

[Pokles kvantového výtěžku](#)

B: Nastavení původní úrovně intenzity světla.

[Po aklimatizaci návrat na původní hladinu kvantového výtěžku](#)



Obr.23 Pokles kvantového výtěžku v důsledku zvýšení intenzity světla v kultivační místnosti po uvedení do provozu druhé kultivační skříně. (Zvýšila množství světelné intenzity pozadí).

U horní křivky je patrný vliv denní fotoperiody, u dolní křivky se nevyskytuje, protože na explantáty bylo svíceno nepřetržitě. Při měření kvantového výtěžku fluorescence u ozářené varianty byla zachycena aklimatizační křivka typická prudkým poklesem hodnot F_{II} při transferu explantátů v bioreaktorech do vyšší ozářenosti a postupným nárůstem hodnot s délkou kultivace. Po přemístění explantátů ze ztuzeného média do bioreaktoru došlo k prudkému poklesu fluorescence a následné aklimatizaci, tato aklimatizace na změněné podmínky trvala několik dní viz. 21.

Také byla zachycena reakce fotosyntetických procesů:

(1) prvotní růst kvantového výtěžku fotosyntézy způsobený aklimací na danou intenzitu, (2) reakce na posunutí (změnu pozice, bod A, B v obr. 22) osvětlovací jednotky.

U varianty s nízkou světelnou intenzitou se projevila periodicitu chodu fotosyntézy díky střídání dne a noci. A zahlazení rozdílů mezi dnem a nocí z důvodu spuštění druhé kultivační skříně obr.1 (a 8)(fialová barva křivky). Z obrázku je dále patrné, že docházelo k výrazným

výkyvům intenzity v průběhu celé doby trvání pokusu. Tyto píky byly způsobeny kondenzující vodou na uzávěru nádoby a způsobovaly zeslabení či naopak zesílení měřicího signálu. K tomu nedocházelo u HL varianty, protože teplo ze světelného zdroje zabraňovalo kondenzaci.

Závěr a budoucí směr výzkumu:

V rámci bak. práce uskutečněná literární rešerše shrnula klady a zápory kultivace rostlinných explantátů v tekutých mediích (bioreaktorech). Dočasně zaplavované kultury pěstované v kultivatorech RITA® představují vhodný metodický postup při studiu mikropropagace různých druhů rostlin, resp. na nároků rostlin na fyzikální parametry prostředí pro optimální kultivaci.

K nejdůležitějším zjištěním získaným v experimentální části bakalářské práce patří, že rostliny pěstované v bioreaktorech RITA® vykazovaly větší míru multiplikace oproti kontrole rostoucí na ztuženém médiu, kde byl pozorován menší počet více vyvinutých rostlin. Což potvrdilo výsledky z publikací jiných autorů (Alvard *et al.* 1993, Mc Alister *et al.* 2005) o kultivaci rostlin v bioreaktorech RITA® popisující vyšší multiplikaci explantátů ve druhé mikropropagační etapě (multiplikace).

Metodou měření indukované fluorescence chlorofylu (MONI-PAM) byly určeny rozdíly v kvantovém výtěžku mezi kulturami pěstovanými v různých ozářenostech uvnitř kultivační nádoby. Rostliny významně reagovaly nejen na změny v intenzitě záření, ale i na fotoperiodu. Příštím krokem v optimalizaci kultivace v bioreaktorech RITA® bude monitorování fyzikálních podmínek uvnitř nádoby bioreaktoru, a to zejména teploty a vlhkosti uvnitř kultivační nádoby při různé experimentální ozářenosti. Přesné zjištění těchto parametrů umožní vyčíslit rychlost čisté fotosyntézy ze získaných fluorometrických údajů (ΦII). (Róth *et al.* 2010)

6. Použitá literatura

- Adelberg, J.** (2006): Agitated, thin-films of liquid media for efficient micropropagation. 101-118. - In: Dutta Gupta, S., Ibaraki, Y.(Eds.). Plant tissue culture engineering. Springer, Dordrecht.
- Afreen, F.** (2006): Temporary immersion bioreactor. Engineering considerations and applications in plant micropropagation, 187-201. - In: Dutta Gupta, S. and Ibaraki, Y. (Eds.). Plant Tissue Culture Engineering, Springer.
- Afreen, F., Zobayed, S. M. A. and Kozai, T.** (2002): Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: Development of a bioreactor for the large-scale plantlet conversion from cotyledonary embryos. - Ann. Bot. 9: 20-29.
- Aitken, J., Horgan, K. J. and Thorpe, T. A.** (1981): Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissues of *Pinus radiata*. - Can. J. Forest Res. 11: 112- 117.
- Alvard, D., Cote, F. and Teisson, C.** (1993): Comparison of methods of liquid medium culture for banana propagation. Effects of temporary immersion of explants. - Plant Cell Tissue Org. Cult., 32: 55-60.
- Barrett-Lennard, E. G. and Dracup, M.** (1988): A porous agar medium for improving the growth of plants under sterile conditions. - Plant Soil 108, 294-298.
- Bateson, J. M., Grout, B. W. W., Lane, S.** (1987): The influence of container dimensions on the multiplication rate of regenerating plant cell cultures. pp. 275-277 - In Ducaté *et al.* (Eds.) 1987 (q.v.).
- Bauer, K.** (1939): Über Explantation „in vitro“. - Ergebnisse Biol. 16: 336-512.
- Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K.** (1996): Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition. - Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1996, ISBN 0-444-81623-2, 767s.
- Blake, J. and Eeuwens, C. J.** (1982): Culture of coconut palm tissues with a view to vegetative propagation. pp. 145-148 - In Rao A.N. (Ed.) 1982 (q.v.).
- Borkovska, B.** (2006): Proceeding of the 5.th Inter. Symposium on artificial lightning in horticulture. Pp. 177-182, Lillehammer.
- Brown, D. C. W.** (1988): Germplasm determination of *in vitro* somatic embryogenesis in alfalfa. - HortScience 23: 526-531.
- Buwalda, F. and Greenway, H.** (1989): Nitrogen uptake and growth of wheat during O₂ deficiency in root media containing NO₃⁻ only, or NO₃⁻ - plus NH₄⁺. - New Phytol. 111: 161-166.
- Cardoso, M. B., Bodanese-Zanettini, M. H., de Mundstock, E. C. and Kaltchuk-Santos, E.** (2007): Evaluation of gelling agents on anther culture: Response of two soybean cultivars. - Brazilian Archiv. Biol. Technol., 50/6: 933-939.
- Carvalho, L. C., Santos, S., Vilela, B. J., Amancio, S.** (2008): *Solanum lycopersicon* Mill. and *Nicotiana benthamiana* L. under high light show distinct responses to anti-oxidative stress J. plant phys., 165: 1300-1312.
- Crawford, R. M. M. and Brendle, R.** (1996): Oxygen deprivation stress in a changing environment. - J. Exp. Bot. 47: 145-159.
- Dalton, C. C. and Street, H. E.** (1976): The role of the gas phase in the greening and growth of illuminated cell suspension cultures of spinach (*Spinacea oleracea* L.). - In Vitro 12: 485-494.

- Davies, W. J., Wilkinson, S. and Loveys, B.** (2002): Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. -*New Phytol.* 153: 449-460.
- Dubová, J., Barták, M., Hájek, J.** (2010): Závěrečná zpráva projektu FRVŠ 2362/2009. Inovace kultivace rostlinných explantátů ve výuce předmětu Bi6120 Rostlinné explantáty a návazných předmětů. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y. and Borroto, C.G.** (1999): Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems.- *Plant Cell Rep.* 18: 743-748.
- Fonnesbech, M.** (1974): The influence of NAA, BA and temperature on shoot and root development from *Begonia cheimantha* petiole segments grown *in vitro*. - *Physiol. Plant.* 32: 49-54.
- Fryer, M. J., Andrews, J. R., Oxborough, K., Blowers, D. A., Baker, N. R.** (1998): Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature.- *Physiol. Plant.* 116: 571–580.
- Gangopadhyay, G., Bandyopadhyay, T., Gangopadhyay, S. B. and Mukherjee, K. K.** (2004): Luffa sponge – a unique matrix for tissue culture of *Philodendron* - *Curr. Sci.*, 86/2: 315-319.
- Genty, B., Briantais, J. M., Baker, N. R.** (1989): The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence *biochimica* . – *Bio. acta.* 999: 87-92.
- George, E. F.** (2008): Plant Tissue Culture Procedure. Background, 1-28. - In: George, E.F., Hall, M. A., Klerk, G.-J. (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition: Volume 1. The Background*, Springer, Dordrecht.
- George, E. F. and Davies, W.** (2008): Effects of the Physical Environment, 423-464. - In: George, E. F., Hall, M.A., Klerk, G.-J. (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* , Volume 1. The Background, Dordrecht, 501 s., ISBN 978-1-4020-5005-3 (e-book).
- Gertsoon, U. E.** (1988): Development of micropropagated plants from different clones of *Senecio hybridus* in relation to BAP concentration and temperature *in vitro*. - *J. Hortic. Sci.* 63: 489-496.
- Gonçalves, L. A., Geraldine, R. M., Picli, E. A. T., Vendrame, W. A., de Carvalho, C. R. and Otoni, W. C.** (2008): In vitro propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (*Herreriaceae*) as affected by different sealing materials and gaseous Exchange. - *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 92: 243–250. Springer Science+Business Media B.V., 2007
- Gorter, C. J.** (1965): Vegetative propagation of *Asparagus officinalis* by cuttings. - *J. Hortic. Sci.* 40: 177-179.
- Haberlandt, G.** (1902): Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. - *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math.-Naturwiss.* 111/1: 69–92.
- Harris, R. E. and Mason, E. B. B.** (1983): Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. - *Can. J. Plant Sci.* 63: 311-316.
- Heide, O. M.** (1965): Interaction of temperature, auxins and kinins in the regeneration ability of *Begonia* leaf cuttings. - *Physiol. Plant.* 18: 891-920.

- Heller, R.** (1965): Some aspects of the inorganic nutrition of plant tissue cultures, pp. 1-8. – In: White, P. R. and Grove, A. R. (Eds.). Proceedings of an International Conference on Plant Tissue Culture. England.
- Hermann, K.H., Kumar, A. and Imani, J.** (2009): Secondary metabolism, 181-225 - In: Hermann, K. H., Kumar, A. and Imani, J. (Eds.). Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Hofman, P., Haisel, D., Komenda, J., Vagner, M., Tichá, I., Schafer, C., Čapková, V.**(2002): Impact of *in vitro* cultivation conditions on stress responses and on changes in thylakoid membrane proteins and pigments of *tobacco* during *ex vitro* acclimation .Biol. plantarum. 45: 189-195.
- Hollings, M.,** (1965): Disease control through virus-free stock. - Annu. Rev. Phytopathol. 3: 367–396.
- Huang, Ch. and Chen, Ch.** (2005): Physical Properties of Culture Vessels for Plant Tissue Culture. - Biosystems Engineering. 91/4: 501–511, © 2005 Silsoe Research Institute, Published by Elsevier Ltd., available online at www.sciencedirect.com
- Hussey, G. and Falavigna, A.** (1980): Origin and production of *in vitro* adventitious shoots in the onion *Allium cepa* L. J. Exp. Bot. 31, 1675-1686.
- Hvoslef-Eide, A. K., Preil, W.** (2005): Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, 588 s., Springer, Dordrecht.
- Chalupa, V.** (1987): Temperature. pp. 142-151 - In Bonga, J.M. and Durman, D.J. (Eds.) Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 1. General Principles and Biotechnology. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.
- Chen, C.** (2004): Humidity in Plant Tissue Culture Vessels. - Biosystems Engineering 88/2: 231–241., doi:10.1016/j.biosystemseng.2004.02.007, Available online at www.sciencedirect.com
- Cheng, T.-Y.** (1976): Organogenesis in culture from cotyledon explants of Douglas fir.-Plant Physiol. 57, Suppl., 66.
- Choi, Y.-E., Kim, Y.-S., Paek, K.-Y.** (2006): Types and designs of bioreactors for hairy root culture, 161-172, - In: Dutta Gupta, S. and Ibaraki, Y.(Eds.) Plant tissue culture engineering, Springer, Dordrecht, 480s., ISBN-13 978-1-4020-3694-1 (e-book)
- Ibaraki, Y.** (2006): Evaluation of photosynthetic capacity in micropropagated plants by image analysis, pp 15–20. -In: Dutta Gupta, S. and Ibaraki, Y. (Eds.). Plant Tissue Culture Engineering, Springer, Dordrecht.
- Ibaraki, Y., Dutta Gupt, S.** (2010) , *In vitro* cellular and development biology – plant. 6: 530-536.
- Jackson., M. B.** (2005): Aeration stress in plant tissue cultures, 459-474, - In: Hvoslef-Eide, A.K., Prezil, W.: (Eds.) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, Springer, Dordrecht.
- Jackson, M.B., Abbott, A. J., Belcher, A. R. and Hall, K.C.** (1987): Gas exchange in plant tissue cultures. -In: Jackson, M.B., Mantell, S.H. and Blake, J. (Eds.) Advances in the Chemical Manipulation of Plant Tissue Cultures Monograph No. 16 (pp. 57-72). British Plant Growth Regulator Group, Bristol.
- Jain, R.and Barbar, S. B.**(2005): Guar gum and isubgol as cost-effective alternative gelling agents for *in vitro* multiplication of an orchid *Dendrobium chrysotoxum*.- Curr. Sci., 88/2: 292-295.

- Janoušek, J.** (2011): www:
[http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Chlorophyll_ab_spectra_\(cs\).png](http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Chlorophyll_ab_spectra_(cs).png), 4.5.2011, 21:55
- Jones, L.H.** (1974): Long-term survival of embryoids of carrot (*Daucus carota* L.). - Plant Sci. Lett. 2: 221-224.
- Joshi, P., Trivedi, R. and Purohit, S.D.** (2009): Micropropagation of *Wrightia tomentosa*: Effect of gelling agents, carbon source and vessel type. - Indian J. Biotechnol. 8: 115-120.
- Kaçar, Y.A., Biçen, B., Varol, İ., Mendi, Y.Y., Serçe, S. and Çetiner, S.** (2010): Gelling agents and culture vessels affect *in vitro* multiplication of banana plantlets. – Gen. Mol. Res. 9/1: 416-424. (2010), ©FUNPEC-RP, www.funpecrp.com.br
- Kaczmarczyk, A., Shvachko, N., Lupysheva, Y., Hajirezaei, M.-R. and Joachim Keller, E. R.** (2008): Influence of alternating temperature preculture on cryopreservation results for potato shoot tips. - Plant Cell Rep. 27:1551–1558.
- Kadleček, P., Rank, B., Tichá, I.** (2003): Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* grown plantlets. Physiol. Plant. 150: 1017-1024.
- Kautsky, H. and Hirsch, A.** (1931): Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. Naturwissenschaften. 48: 964.
- Kessel, R. H. L. and Carr, A. H.** (1972): The effect of dissolved oxygen concentrations on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. - J. Exp. Bot. 23: 996-1007.
- Kováč, J.** (1992): Explantátové kultury rostlin. Skriptum, 1. vyd. Ústí nad Labem : Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, fakulta pedagogická, 146 s.
- Lipavská, H. a Konrádová, H.** (2004): Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. Invited review. -In vitro Cell Dev. Biol.-Plant, 40:23-30
- Langton, F.A. and Cockshull, K. E.** (1997): Is stem extension determined by DIF or by absolute day and night temperatures? -Sci. Hortic. 69: 229-237.
- Lazar, M. D., Collins, G.B. and Vian, W. E.** (1983): Genetic and environmental effects on the growth and differentiation of wheat somatic cell cultures. - J. Hered. 74: 353-357.
- Martyra, J.** (1969): Étude des facteurs de la néoformation de bourgeons en culture *in vitro* chez le chou-fleur (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*). -Ann. Physiol. 11: 95-112.
- Margara, J. and Leydecker, M.-T.** (1978): Différents types d'organogénèse observés chez le Colza, *Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzg. - Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 287D: 17-20.
- Maxwell, K. and Johnson, G. J.** (2000): Chlorophyll fluorescence - a practical guide. J. Exp.Bot. 51/345: 659 - 668.
- McAlister, B., Finnie, J., Watt, M. P. and Blakeway, F.** (2005): Use of temporary immersion bioreactor system (RITA ®) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA). – Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 81: 347-358
- Mehrotra, S., Goel, M. K., Kukreja, A. K. and Mishra, B. N.** (2007): Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialisation. - African J. of Biotechnol. 6/13: 1484-1492. 4 July, 2007, Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>, ISSN 1684–5315 © 2007 Academic Journals
- Mok, M. C. & Mok, D. W.** (1977): Genotypic responses to auxins in tissue culture of *Phaseolus*. Physiol. Plant. 40: 261-264.
- Molnár, G.Y.** (1987): A new patented method for mass propagation of shoot cultures.-Acta Hortic. 212: 125-130.

- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962): A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. - *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Němec, B.** (1905) Studien uber regeneration . Berlín. 387 str.
- Neumann, K.-H., Kumar, A. and Imani, J.** (2009): *Plant Cell and Tissue Culture. A Tool in Biotechnology.* - Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Novák, F. J.** (1990): *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin.* Academia, Praha, 208 s.
- Narasimhulu, S. B. and Chopra, V. L.** (1988): Species specific shoot regeneration response of cotyledonary explants of Brassicas. - *Plant Cell Rep.* 7: 104-106.
- Negrutiu, I. and Jacobs, M.** (1978): Factors which enhance *in vitro* morphogenesis of *Arabidopsis thaliana*. - *Z. Pflanzenphysiol.* 90: 423-430.
- Paek, K. Y., Chakrabarty, D. and Hahn, E. J.** (2005): Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. - In: Hvoslef-Eide, A.K., Preil, W. (Eds.) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, 588 pp., Springer, Springer, Dordrecht. ISBN 1-4020-3200-5
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol.** 1998. *Fyziologie rostlin.* Academia, Praha, 484 s.
- Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D. and Plzánková, S.** (1999): Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. - *Biol. Plant.* 42: 481-497.
- Pierik, R.L.M.** (1987): *In vitro Culture of Higher Plants.* - Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 344 pp.
- Preil, W.** (2005): General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture, 1-20 -In: Hvoslef-Eide, A. K., Prezil, W.(Eds.) *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, Springer, Dordrecht.
- Radochová B., Tichá, I.** (2009): Leaf anatomy during leaf development of photoautotrophically *in vitro*-grown tobacco plants as affected by growth irradiance. *Biol. Plantarum.* 53: 1-27.
- Righetti, B., Magnanini, E. and Maccaferri, M.** (1988): Ethylene and other volatile substances produced by *in vitro*cultured *Prunus avium*. - *Acta Hort.* 227: 402-404.
- Roháček K., Barták M.** (1999): Technique of the modulated chlorophyll fluorescence – basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* 37: 339-363.
- Róth, M., Dubová, J., Barták, M. and Rotkovská, J.** (2010): Zkušenosti s kultivací explantátů v bioreaktorech RITA®. – In: Barták M., Hájek J. and Dubová J. /Eds./ *WORKSHOP: Rostlinné biotechnologie - Současné trendy ve výuce a výzkumu*, Brno 25.11.2010,p.29-33.
- Said, A. G. E. and Murashige, T.** (1979): Continuous cultures of tomato and citron roots *in vitro*. -*In Vitro* 15: 593-602.
- Saglio, P. H, Rancillac, M., Bruzan, F. and Pratet, A.** (1984): Critical oxygen pressure for growth and respiration of excised and intact roots.- *Plant Physiol.* 76: 151-154.
- Sachs, J.** (1865): *Handbuch der Experimental-Physiologie der Pflanzen.* Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Seman, I. a kol.** (1990): *Biotechnologické metody v šlechtění poľných plodín*, Příroda, Bratislava, 271 s.
- Sharp, R. E.** (2002): Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. - *Plant Cell Environ.* 25: 211-222.

- Short, K. C., Warburton, J. and Robert, A.V.** (1987): *In vitro* hardening of cultured cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. - Acta Hort. 212: 329-334.
- Slater, A. , Scott, N. W. and Fowler, M. R.** (Eds.) (2003): Plant Biotechnology. The genetic manipulation of plants. - 1st Edition. Oxford University Press, New York, pp1-346.
- Soukupová, J. a Roháček, K.** (2003): Fluorescence, fotosyntéza a stres: Jak to spolu souvisí? Ústav fyzikální biologie JU. AVČR. 14s.
- Start, N. G. and Cumming, B. G.** (1976): *In vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. – Hort Sci. 11: 204-206.
- Steward, F.C., Caplin, S. and Millar, F. K.** (1952): Investigations on growth and metabolism of plant cells. I. New techniques for the investigation of metabolism, nutrition and growth in undifferentiated cells. -Ann. Bot. 16: 57-77.
- Steward, F. C. and Shantz, E. M.** (1956): The chemical induction of growth in plant tissue cultures. - In: Wain, R.L. and Wightman, F. (Eds.) The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances , pp. 165-186) Butterworths Ltd., London.
- Street, H. E.** (1957): Excised root culture. - Biol. Rev. 32: 117-155.
- Street, H. E.** (1969): Growth in organised and unorganised systems - knowledge gained by culture of organs and tissue explants., pp. 3-224. -In Steward, F. C. (Ed.) Plant Physiology - a Treatise. 5B. Academic Press, New York.
- Takayama, S. and Akita, M.** (2006): Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation, 83-100. - In: Dutta Gupta, S., Ibaraki, Y. (Eds.) Plant tissue culture engineering, Springer, Dordrecht, 480s.
- Teisson, C. and Alvard, D.** (1995): A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary immersion. - In: Terzi, M., Cella, R., Falavigna, A. (Eds.) Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology (pp. 105-110). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Tisserat, B. and Vandercook, C. E.** (1985): Development of an automated plant culture system. Plant Cell Tissue Org. Cult. 5: 107-117.
- Thomas, D., Des, S. and Murashige, T.** (1979): Volatile emissions of plant tissue cultures. Identification of the major components.- In Vitro 15: 654-658.
- Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E.C., Klerk, G.-J., Roberts, A and George, E.F.** (2008): The Components of Plant Tissue Culture Media II : Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. -In: Georgie, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.-J. (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition , Volume 1. The Background, Springer Dordrecht.
- Towler, M. J., Yoojeong, K, Wyslouzil, B. E., Correll, M. J. and Weathers, P. J.** (2006): Design, development, and applications of mist bioreactors for micropropagation and hairy root culture, 119-134. - In: Dutta Gupta, S., Ibaraki, Y. (Eds.) Plant Tissue Culture Engineering, Springer, Dordrecht. ISBN-13 978-1-4020-3694-1
- Van Huylenbroeck, J.M., Piqueras, A. and Debergh, P.C.** (1998): Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. - Plant Sci. 134: 21-30.
- Vanisree , M., Lee, C. Y., She-Fung, L., Nalawade, S. M. L., Yih, C. and Tsay, H. S.** (2004): Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. – Bot. Bull. Acad. Sin. 45:1–22.

- Vanisree, M. and Tsay, H.-S.** (2004): Plant cell cultures—an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites.- *Int J Appl. Sci. Eng.* 2:29–48.
- Vitropic,S.A.** (2011): Saint Mathieu de Tréviars, <http://vitropic.pagesperso-orange.fr/rita/en/accueil.htm>. 8.1.2011, 12:15.
- Von Arnold S. and Eriksson T.** (1979): Bud induction on isolated needles of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) grown *in vitro*. - *Plant Sci. Lett.* 15: 363-372.
- Weathers, P. J. and Zobel, R. W.** (1992): Aeroponics for the cultures of organisms, tissues and cells. - *Biotech. Adv.* 10: 93-115.
- Walkey, D. G. A. and Woolfitt, J. M. G.** (1970): Rapid clonal multiplication of cauliflower by shake culture. -*J. Hortic. Sci.* 45: 203-206.
- Wang, P.-J. and Hu, C.-H.** (1982): *In vitro* mass tuberization and virus-free seed potato production in Taiwan. - *Am. Pot. J.* 59: 33-37.
- Winarto, B., Aziz, M. A., Rashid, A. A. and Ismail, M. R.** (2004): Effect of permeable vessel closure and gelling agent on reduction of hyperhydricity *in vitro* culture of carnation.- *Indonesian J. Agric. Sci.* 5/1: 11-19.
- Wyslouzil , B. E., Waterbury, R.G. and Weathers, P. J.** (2000): The Growth of Single Roots of *Artemisia annua* in Nutrient Mist Reactors. – *Biotechnik. Bioeng.*70/2: 143-150.
- Yann, L. K., Nornadia, K., Jin, Ch. S., Izzati, N., Bhatt, A., Ping, N. S. and Lai-Keng ,Ch.** (2010): Effect of perforations of culture vessel cap on growth and leaf microstructure of *in vitro* plantlets of *Artemisia annua* L. - *J. Med. Plants Res.* 4/21: 2273-2282., 4 November, 2010, Available online at <http://www.academicjournals.org/JMPR>, ISSN 1996-0875 ©2010 Academic Journals
- Yesil-Celiktas, O., Gurel, A. and Vardar-Sukan, F.** (2010): Large Scale Cultivation of Plant Cell and Tissue Culture in Bioreactors. -*Transworld Research Network* 37/661 (2): 1-54.
- Yong-Eui, Choi., Yoon-Soo, Kim and Kee-Yoep, Paek.** (2006): Types and designs of bioreactors for hairy root culture, 161-172. - In: Dutta Gupta, S., Ibaraki, Y.(Eds.) *Plant tissue culture engineering*, Springer, Dordrecht, 480s.
- Ziv, M** (2000): Bioreactor technology for plant micropropagation. - In: Janick, J. (Ed.) *Horticultural Reviews*. John Wiley and Sons, Inc., New York; 24:1-30.
- Ziv,M.** (2005): Simple bioreactors for mass propagation. 79-93. - In: Hvoslef-Eide A. K., Preil W. (Eds.) *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, Springer, Dordrecht.
- Zhang, M.J. , Zhao D.D., Ma, Z. Q., Li, X.D. Xiao, Z.L.** (2009): Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity – *Hortscience.* 44: 757-763
- Zobayed S.M.A., Armstrong, J. and Armstrong, W.** (2001): Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization.-*Ann. Bot.* 87: 53-59.