



Biotechnologická produkce konopí setého
(*Cannabis sativa* ssp. *sativa* L.)

Autoři:

Ing. Iva Smýkalová, Ph.D.

Mgr. Karel Doležal, DSc.

Agritec Plant Research s.r.o.

Šumperk

2019

Biotechnologická produkce konopí setého (*Cannabis sativa* ssp. *sativa* L.)

In vitro multiplikace konopí setého, výběr výchozích explantátů, aplikace nových derivátů růstových regulátorů, regenerace nových jedinců, dopěstování rostlin do semen

Akronym:

Metodika vypracovaná jako výstup projektu MŠMT č. ROZ2018 (VZ08 Vývoj non-GM technologií u luskovin, lnu, konopí a kmínu BIOTECH).

Iva Smýkalová
smykalova@agritec.cz

V roce 2019 vydal Agritec Plant Research s.r.o. v nakladatelství AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk, <http://www.agritec.cz>

Oponenti:

RNDr. Aleš Soukup, Ph.D. – Katedra experimentální biologie rostlin, PřF UK Praha, Viničná 1965/5, 128 43 Praha, ales.soukup@natur.cuni.cz

Ing. Markéta Altová – Oddělení speciálních plodin, Ministerstvo zemědělství, Těšnov 17, Praha 1, 110 00, Marketa.Altova@mze.cz

© Foto – Mgr. Jiří Horáček, Ph.D., Ing. Iva Smýkalová, Ph.D.

© Agritec Plant Research s.r.o., Šumperk 2019

Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku ani po částech, uchovávána v médiích, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez uvedení osoby, která má k publikaci práva podle autorského zákona nebo bez jejího výslovného souhlasu. S případnými náměty na jakékoliv změny nebo úpravy se obraťte písemně na autora.

ISBN 978-80-87360-61-3 [PDF]

OBSAH

1	ÚVOD	3
1.1	Cíl metodiky	3
1.2	Dedikace	3
1.3	Novost postupů	3
1.4	Ekonomické aspekty	3
2	PRÁCE IN VITRO, PŘÍPRAVA MATERIÁLU	4
2.1	Zásady práce s <i>in vitro</i> kulturami	4
2.2	Materiál a pomůcky	4
2.3	Výběr odrůdy	4
2.4	Povrchová sterilizace osiva, nakličování semen	5
2.5	Příprava médií	5
2.5.1	Složení kultivačního média pro naklíčení semen	5
2.5.2	Složení kultivačního média pro tvorbu mnohočetných prýtů	6
2.5.3	Složení kultivačního média pro zakořeňování	7
3	IN VITRO ČÁST	7
3.1	Popis, výběr a kultivace výchozích explantátů	7
3.2	Explantáty bez meristémů	8
3.3	Explantáty s meristémy	9
3.4	Aplikace nového derivátu cytokininů, BAP9THP a ANTIAUXINU, PEO-IAA	9
3.5	Založení MSC (Multi Shoots Culture)	11
3.6	Indukce kořenů a aklimatizace	13
4	DOPĚSTOVÁNÍ ROSTLIN	14
4.1	Aklimatizace <i>ex vitro</i>	14
4.2	Tvorba osiva	15
5	ZÁVĚR	19
5.1	Popis uplatnění metodiky	19
5.2	Seznam použité literatury	19
5.3	Seznam publikačních výstupů předcházející metodice	19

1 ÚVOD

***In vitro* regenerační protokoly konopí setého**

In vitro systémy u konopí (*Cannabis sativa* L., rodina Cannabaceae) jsou především zaměřeny na využití kalusových nebo buněčných suspenzí (Cvečková a kol., 2015), nebo na regenerační systémy vhodné pro šlechtitelské programy. Byly publikovány protokoly, které lze využít pro mikropropagaci konopí. **Tabulka doplňková 6.** uvádí přehled použitých typů médií a explantátů pro mikropropagaci (multiplikaci). Ve vývoji systémů regenerace konopí lze zaznamenat experimenty se známými regulátory růstu (auxiny a cytokininy), ale v současnosti se setkáváme s experimenty, kde se využívají nové typy cytokininů jako je například *meta*-topolin (Lata a kol. 2016, Grulichová a kol. 2017), nebo se využívají nové deriváty cytokininů nebo další regulátory růstu (Smýkalová a kol, 2019). Nicméně *in vitro* kultivace konopí není z pohledu biotechnologické (komerční) produkce u této plodiny dořešena. Zakořeňování prýtů *in vitro* z různých systémů lze dobře dosáhnout aplikací IBA u konopí, často bez ohledu na složení předchozího indukčního nebo mikropropagačního média. Význam hraje přídavek aktivního uhlí do médií, které omezuje senescenci explantátů a zlepšují zakořeňování. Ale významně heterogenní přístup je k aplikacím růstových regulátorů včetně typu výchozího explantátu v průběhu indukce multiplikace. Je zřejmé, že je třeba optimalizovat několik faktorů, aby se vytvořil robustní systém regenerace / mikropropagace konopí, včetně výběru kultivaru, typu explantátu a regulátorů růstu. Pro rozvoj účinnějších protokolů mikropropagace technického konopí bylo využito znalostí a zkušeností s morfogenní reakcí výchozího explantátu na testovaný typ médií, aplikací nového derivátu cytokininů a antiauxinu, a rovněž analýzy *ex vitro* regenerace a dopěstování rostlin do semen.

1.1 Cíl metodiky

Cílem metodiky je zveřejnění postupu pro *in vitro* mikropropagaci a získávání nových jedinců cestou aklimatizace zakořeněných prýtů, převodu do nesterilních podmínek a dopěstování rostlin včetně produkce osiva v kultivačních místnostech s řízenými podmínkami růstu. Jedná se o komplexní biotechnologický postup, který má potenciál využití pro další odrůdy a kultivary technického konopí. Tento postup nebyl aplikován a není ověřen na léčebném konopí.

1.2 Dedikace

Certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory projektů č. TAČR-TA04010331 Technologická agentura ČR („Charakterizace a selekce *C. sativa* pro potravinářské i nepotravinářské využití pomocí biotechnologických postupů a vysokokapacitních metod“), 51834/2017-MZE-17253/6.2.8 a MZE-RO1018 (Ministerstvo zemědělství ČR).

1.3 Novost postupů

In vitro mikropropagace u konopí setého je možná pro řadu genotypů, ale tato metoda je spojena s nerovnoměrným vývojem takto získaných jedinců. Nový přístup je založen na zjištění příčin neúspěšné regenerace z primárních explantátů (rekalcitrantnosti) *in vitro* u konopí, kde hormonální nevyváženost explantátů může být jedním z důvodů. Je zde využito aplikace nových růstových regulátorů v indukčních médiích pro vybrané primární explantáty. Význam výběru explantátů vede k vytvoření fungujícího *in vitro* mikropropagačního protokolu pro technické konopí. Tento přístup není dosud v běžné praxi uplatňován.

1.4 Ekonomické aspekty

Jedním z ekonomických přínosů je možnost zrychleného vývoje nových odrůd, především jejich urychlené testování na různé druhy faktorů (fyzikální, chemické), které simulují stresové podmínky. Takové testování s využitím popisovaných *in vitro* kultur mnohočetných prýtů nebylo dosud z ekonomického hlediska hodnoceno. Nicméně koeficient množení vytváří potenciál pro rychlý screening a selekci potenciálně zajímavých somaklonů.

2 PRÁCE IN VITRO, PŘÍPRAVA MATERIÁLU

2.1 Zásady práce s *in vitro* kulturami

Rostlinný materiál je zdrojem nejrůznějších patogenů, *in vitro* kultury vyžadují sterilní materiál, tzn. materiál bez přítomnosti bakteriální nebo houbové či dokonce virové kontaminace. Pro získání takového sterilního rostlinného materiálu je nutné dodržovat zásady práce ve sterilních podmínkách, zejména při manipulaci s rostlinným materiálem. Práce probíhá ve sterilních kabinetech (flowboxy), kde je zaručen sterilní provoz. Ve flowboxech se používají sterilní nástroje (pinzety, skalpely, nůžky nebo jehly), sterilní sklo a rovněž tepelný zdroj (lihové nebo plynové kahany) pro sterilizaci nástrojů, popřípadě hrdel kultivačních baněk. Sklo a nástroje jsou sterilizovány v horkovzdušné sušárně (105 °C, 1 h); sklo, plast, média, perlit a substrát či další pomůcky jsou sterilizovány autoklávováním (15 min., 121 °C, 120 kPa). Pro některé termolabilní složky médií (růstové regulátory, antibiotika) se sterilizace provádí přímo ve flowboxu filtrací sterilní injekční stříkačkou přes jednorázové mikrofiltry (0,22 µm, Millipore, Carrigtwohill County Cork, Irsko). Pro povrchovou sterilizaci rostlinného materiálu se používají detergenty v kombinaci se smáčedly a sterilní destilovaná voda k oplachu zbytkových kapek detergentu. Rovněž při manipulaci s velmi malými objekty (prašníky, meristémy) je nutné pracovat ve flowboxu s binokulárním mikroskopem, který je řádně ořen lihem nebo jiným sterilizačním prostředkem. K přípravě kultivačního média se používají chemikálie v čistotě p.a. (produkty firem Duchefa, Sigma-Aldrich atd.). Při přípravě kultivačního média se používá destilovaná nebo deionizovaná voda. Agar nebo jiná gelující složka se v destilované vodě rozvaří v mikrovlnné troubě. Připravená média lze krátkodobě uskladnit v chladničce při teplotě 4 °C do doby jejich použití.

2.2 Materiál a pomůcky

- osivo
- Erlenmayerovy baňky (100ml, 250ml)
- pinzety, skalpel
- Petriho misky (podložní k manipulaci s klíčovými rostlinami a explantáty)
- skleněné nebo plastové nádoby na přípravu médií (zásobní roztoky)
- pH metr
- horkovzdušná sušárna a autokláv pro sterilizaci pomůcek a médií, substrátů
- binokulární mikroskop
- plastové jednorázové kontejnery (10 × 10 × 9 cm)
- perlit
- komerční substrát na dopěstování rostlin (pH 6–7)

2.3 Výběr odrůdy

Provedením testu klíčivosti vybrat odrůdy s nejnižším stupněm kontaminace (v závislosti na zdroji osiva – polní podmínky, nádobové přesevy, genové zdroje apod.) a s vysokým podílem klíčivých semen. Klíčivost osiva kopopí v *in vitro* podmínkách pro většinu odrůd je do 50 %. Předložená metodika byla vypracována na zvolené odrůdě USO-31 (1997, Glukhovskaja 10 x YUSO-1; Ukrajina). Jedná se o cizosprašnou jednodomou (samčí a samičí květy na jedné rostlině) odrůdu, kde samčí rostliny se vyskytují zřídka. Je to raně dozrávající odrůda, se středním až vyšším výnosem suché hmoty, s dobrou odolností vůči plísni šedé (*Botrytis cinerea*) a fusarióznímu vadnutí, vhodná pro pěstování na vlákno i semeno (Honzík a kol. 2012). Z hlediska *in vitro* manipulace tato odrůda je charakteristická nízkou úrovní kontaminací (vnější i vnitřní) osiva, snadnou dostupností v sortimentu nabízených komerčních odrůd a rovněž vyšší *in vitro* klíčivostí osiva (45–50%).

2.4 Povrchová sterilizace osiva, nakličování semen

Interní a certifikovaná ISBN 978-80-87360-55-2 metodiky jsou použity pro povrchovou sterilizaci semen konopí:

- vyzrálá a nepoškozená semena (110 semen / 1000 ml CO media) propláchnout 96% etanolem (2 min, třepačka – 135 rpm);
- ve flowboxu slít semena přes sítko, opláchnout sterilní destilovanou H₂O;
- sterilizovat v 10% roztoku chlornanu sodného (NaClO) s kapkou smáčedla (detergent např. JAR, 80% roztok Tween-20) po dobu 30 min na třepačce při pokojové teplotě;
- ve flowboxu slít semena, 4–5× propláchnout sterilní destilovanou H₂O a osušit na sterilním filtračním papíře ve flowboxu.

Povrchově sterilizované osivo pinzetou umístit po 4 semenech do sterilních 100ml Erlenmayerovy baňky s CO médiem (viz kapitola 2.5 *Příprava médií*). Vysterilizovaná semena pouze pokládat na povrch média, nezatlačovat je do média. Sterilní nakličování semen nechat probíhat při teplotě 19±2 °C nejprve ve tmě (4 dny) a poté 10 až 15 dnů při 16h světelné periodě (40–70 μmol.m⁻².s⁻¹PAR). Z klíčících rostlin odebrat primární explantáty (kapitola 3.1. *Popis, výběr a kultivace primárních explantátů*).

2.5 Příprava médií

2.5.1 Složení kultivačního média pro nakličování semen

Tabulka 1. Složení kultivačního média pro nakličování semen konopí (základní makroprvky odvozeny – modifikace Knop's médium, 1860).

makroprvky	na 1000 ml média (mg)	zásobní roztok (g.l ⁻¹)	příprava; odpipetovaný objem
KNO ₃	143	1,43	všechny komponenty postupně navážít do kádinky a rozpustit v destilované vodě, do konečného objemu 1000 ml; aplikace 100 ml zásobního roztoku na 1 000 ml kultivačního média
Ca(NO ₃) ₂	572	5,72	
MgSO ₄	143	1,43	
KH ₂ PO ₄	132	1,32	
KCl	71	0,71	
roztok železa			
Na ₂ EDTA	36,70	7,45	rozpustit zvlášť, smíchat a zahřát až roztok zežloutne; aplikace 5 ml zás. roztoku na 1 000 ml kultivačního média
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	5,57	
vitamíny			
kyselina nikotinová	1	0,01	navážít a postupně přidávat do destilované vody, celkový objem 100 ml; aplikace 10 ml zás. roztoku na 1 000 ml kultivačního média
pyridoxin HCl	1	0,01	
thiamin HCl	1	0,01	
ostatní složky			
sacharóza	20 g	přímo navážít do kádinky, přidání objemů roztoků makro, železa a vitamínů; do kádinky dát magnetické míchadélko a míchat na magnetické míchačce do úplného rozpuštění	
pH	5,8	změřit a upravit pH (za stálého míchání)	
agar (Difco Bacto)	5,5 g	přímo navážít, rozpustit ve větším objemu destilované vody a rozvařit	

2.5.2 Složení kultivačního média pro tvorbu mnohočetných prýtů

Tabulka 2. Složení kultivačního indukčního média 4 pro tvorbu mnohočetných prýtů (základní makroprvky a mikroprvky Murashige a Skoog, 1962; B5 vitamíny Gamborg a kol., 1968).

makroprvky	na 1000 ml média (mg)	zásobní roztok (g.l⁻¹)	příprava; odpipetovaný objem
CaCl ₂	332,02	6,64	komponenty postupně navážít do kádinky a rozpustit v destilované vodě do konečného objemu 1 000 ml; aplikace 50 ml zás. roztoku na 1 000 ml kultivačního média
KNO ₃	1900,00	38,00	
MgSO ₄	180,54	3,61	
KH ₂ PO ₄	170,00	3,40	
NH ₄ NO ₃	1650,00	33,00	
mikroprvky	na 1000 ml média (mg)	zásobní roztok 1000 ml	příprava; odpipetovaný objem
roztok železa			
Na ₂ EDTA	37,25	7,45 g	navážít a rozpustit zvlášť, smíchat a zahřát až roztok zežloutne; aplikace 2,5 ml zás. roztoku na 1 000 ml kultivačního média
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,85	5,57 g	
roztok A			
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	2,5 mg	navážít a postupně přidávat do 100 ml destilované vody; aplikace 0,5 ml zás. roztoku na 1 000 ml kultivačního média
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	2,5 mg	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	25,0 mg	
KI	0,83	83,0 mg	
roztok B			
H ₃ BO ₃	6,20	62,0 mg	navážít a postupně přidávat do 100 ml destilované vody, aplikace 5 ml zás. roztoku na 1 000 ml kultivačního média
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,90	169,0 mg	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60	86,0 mg	
vitamíny	na 1 000 ml média (mg)	zásobní roztok mg.l⁻¹	příprava; odpipetovaný objem
nikotinová kys.	1	10	navážít a postupně přidávat do 100 ml destilované vody; aplikace 10 ml zás. roztoku na 1 000 ml kultivačního média
pyridoxin HCl	1	10	
thiamin HCl	10	100	
ostatní složky			
myo-inozitol	100 mg	navážít a rozpustit zvlášť asi v 5 ml destilované vody; přidat k ostatním složkám média do kádinky	
adenin hemisulphate (AS)	40 mg	navážít a rozpustit zvlášť asi v 5 ml destilované vody; přidat k ostatním složkám média do kádinky	
sacharóza	30 g	přímo navážít do kádinky, přidat objemy roztoků makro, železa a vitamínů; do kádinky dát magnetické míchadélko a míchat na magnetické míchače do úplného rozpuštění	
aktivní uhlí (AC)	0,5 g	přímo navážít do kádinky	
pH	5,8–6,0	změřit a upravit pH (za stálého míchání)	
agar (Difco Bacto)	5,5 g	přímo navážít, rozpustit ve větším objemu destilované vody a rozvařit	
autoklávovat a další složky přidat do média ve flowboxu sterilizací přes mikrofiltry			
růstové regulátory	na 1 000 ml média (mg)	zásobní roztok	příprava; odpipetovaný objem
BAP9THP (T)	0,31	3,09 mg	navážít a rozpustit zvlášť v kapce DMSO a doplnit na 50 ml destilované vody; aplikace 5 ml zás. roztoku na 1 000 ml kultivačního média
PEO-IAA (P)	0,29	2,93 mg	navážít a rozpustit zvlášť v kapce DMSO a doplnit na 50 ml destilované vody; aplikace 5 ml zás. roztoku na 1 000 ml kultivačního média

2.5.3 Složení kultivačního média pro zakořeňování

Tabulka 3. Složení kultivačního zakořeňovacího média pro prýty – ½ MS médium (Murashige and Skoog, 1962) – makroprvky a mikroprvky, vitamíny dle **Tabulky 1.**

ostatní složky na 1 000 ml média		
myo-inozitol	100,0 mg	navážít a rozpustit zvlášť asi v 5ml destilované vody; přidat k ostatním složkám média do kádinky
sacharóza	10,0 g	přímo navážít do kádinky, přidat objemy roztoků makro, železa a vitamínů; do kádinky dát magnetické míchadélko a míchat na magnetické míchače do úplného rozpuštění
aktivní uhlí (AC)	0,5 g	přímo navážít do kádinky
růstové regulátory		
NAA (N)	3,0 mg	navážít a rozpustit zvlášť asi v 5ml destilované vody; přidat k ostatním složkám média do kádinky
IBA (I)	3,0 mg	navážít a rozpustit zvlášť asi v 5ml destilované vody; přidat k ostatním složkám média do kádinky
pH	5,8–6,0	změřit a upravit pH (za stálého míchání)
agar (Difco Bacto)	5,5 g	přímo navážít, rozpustit ve větším objemu destilované vody a rozvařit

Vysvětlivky: *BAP* 6-benzylaminopurin; *KIN* 6-furfurylaminopurin, kinetin; *NAA* 1-naftalen-octová kyselina; *IBA* indolylmáselná kyselina; *BAP9THP* 6-benzylamino-9-(tetrahydroxypranyl)purin; *PEO-IAA* α -(2-oxo-2-phenylethyl)-1*H*-indole-3-octová kyselina; *AC* aktivní uhlí; *AS* adenin hemisulfát.

3 IN VITRO ČÁST

3.1 Popis, výběr a kultivace výchozích explantátů

Pro mikropropagaci (mikroklonování nebo rozmnožování *in vitro* obecně) se musí vybrat takový výchozí explantát, u kterého nedojde k tvorbě kalusu, a mikropropagační cyklus představuje maximálně 3–6× pasáž (přenos explantátů na čerstvé médium).

Výběr výchozího explantátu významně ovlivňuje schopnost regenerace u konopí. Důvodem pro výběr výchozího explantátu je významný rozdíl v obsahu endogenních cytokininů, které jsou jedním z předpokladů úspěšné regenerace *in vitro*. Nerovnoměrný vývoj klíčnic rostlin je zdrojem různě dlouhých segmentů epikotylů, hypokotylů, které nelze využít pro explantaci (**Obrázek 1A**). Optimální vzhled klíčnic rostliny pro vytvoření výchozí populace meriklonů s přiměřeně vyrovnaným vývojem je na **Obrázku 1B**. Z klíčnic rostlin lze získat několik typů výchozích explantátů (**Obrázek 1C**). Vzrostlý vrchol je základem kultury mnohonásobných prýtů, kdy dochází k větvení a zmožení axilárních větví. Nod je základem nodálních kultur, prodloužený prýt s tvorbou několika pater s nody. Apikální meristém (2–5 mm) je nutné izolovat pod binokulárním mikroskopem. Jedná se o izolaci meristému se založenými listovými primordií. Meristémové kultury jsou geneticky stabilní.

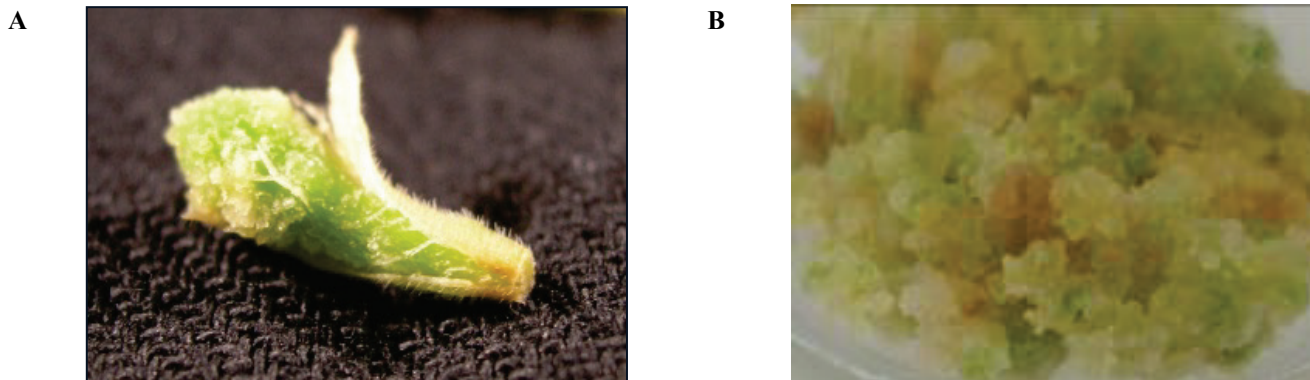
Výchozí explantáty kultivovat na pevných médiích, např. makro- a mikroprvky (Murashige and Skoog, 1962) a B5 vitamíny (Gamborg et al. 1968). Připravit zásobních roztoky a aplikovat odebraná množství dle **Tabulky 2**. Výchozí explantáty umístit po 4–5 explantátech do 100ml Erlenmayerových baněk. Umístit explantáty ve vertikální nebo horizontální poloze v závislosti na typu explantátu. U hypokotylů testovat poškození pokožkových pletiv (**Obrázek 1C**) a umístit v horizontální poloze, ale nebyl zjištěn významný vliv na regeneraci. Epidermální (pokožkové) buňky odumřou a nepodílí se na regeneraci. Regenerační funkci převezme parenchymatická vrstva buněk obsahující vodivé svazky (lýko a dřevo). Dřevnatá část stonku (dřeň) je viditelná na průřezu explantátu po dlouhodobější pasáži a tvoří uprostřed stonku dutinu.



Obrázek 1. Klíčící rostliny *Cannabis sativa* ssp. *sativa* L. a možnost výběru vhodného primárního explantátu pro indukci prýtů a k založení kultury mnohonásobných prýtů. A – nerovnoměrný vývoj klíčících rostlin; B – optimální vzhled klíčící rostliny k explantaci; C – primární explantáty – vrcholová část zahrnuje vzrostný vrchol s mnohočetnými meristematickými základy (VV), nodální segment s axilárními meristémy (N), tři týdny kultivovaný segment hypokotyly (H) a vyzolovaný apikální meristéum ze vzrostného vrcholu (M). Kultivaci explantátů nechat probíhat při 18/6h světelné periodě, teplotě 19 ± 1 °C v kultivační místnosti ($56 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

3.2 Explantáty bez meristémů

Regenerace ze segmentů hypokotyly na multiplikačním médiu s cytokininy vede k pouze ke kalogenezi (tvorba kalusu) z podkožkových pletiv s indukcí v místě bazální části segmentu (**Obrázek 2**). Aplikace cytokininů (BAP, KIN) nevedou k indukci regeneračního procesu, tj. hormonální absence využitelných forem cytokininů. Tyto kalusy nejsou vhodné pro indukci organogenních struktur ani v případě aplikace nových derivátů cytokininů jako jsou nejčastěji využívaný *meta*-topolin (**mT**) a dále 6-benzylamino-9-(tetrahydroypyranil)purin (**BAP9THP**) nebo regulátor metabolismu cytokininů inhibitor cytokinin oxidázy/dehydrogenázy 2-chloro-6-(3-methoxyfenyl)aminopurin (**INCYDE**) (Smýkalová a kol. 2019).

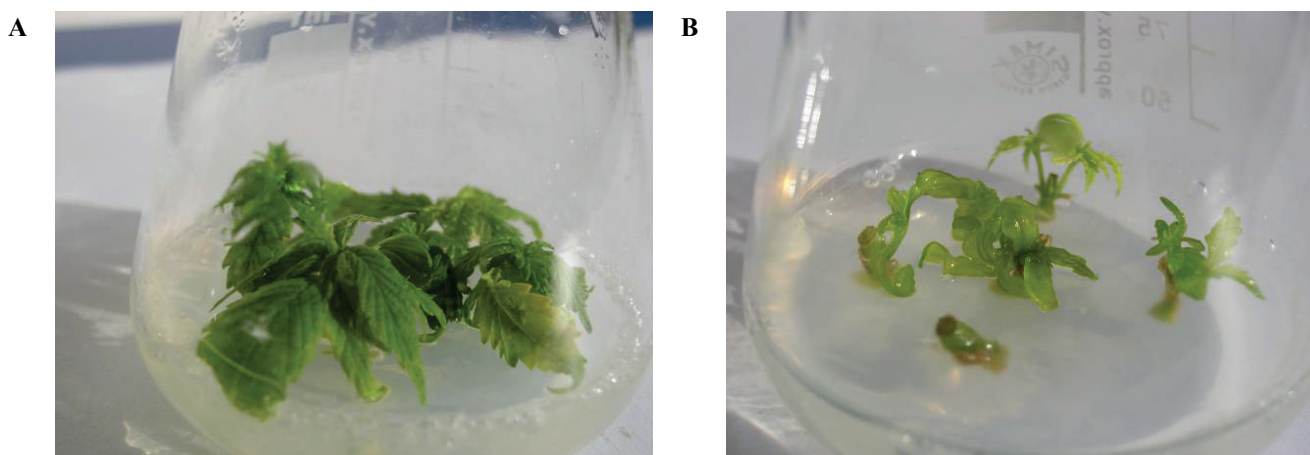


Obrázek 2. Kultura konopí odvozená ze segmentů hypocotylu. A – polární kalogeneze – kalus se tvoří na bazálním konci segmentu; B - vitální dlouhodobě udržovaný kalus se 14 denním subkultivačním intervalem po izolaci z primárního explantátu.

Výchozí primární explantáty musí obsahovat meristemické základy (aktivně se dělící buňky) – výsledek analýzy endogenních cytokininů (Smýkalová a kol., 2019). Zdrojové explantáty musí obsahovat buď apikální meristém, vrcholovou nebo nodální část klíčících rostlin částečně s diferencioványými pletivy epikotylu a prvních pravých listů. Nelze použít segmenty hypocotylů bez meristemických základů, u nichž nelze dosáhnout regenerace.

3.3 Explantáty s meristémy

Rychlost odrůstání prýtů z pupenů z primárního explantátu (prodlužovací růst) a reakce v meristemické zóně (multiplikace) jsou hlavní parametry hodnocení. Lze porovnat reakci odrůstání prýtů v kulturách nodálních segmentů nebo vzrostných vrcholů na médiích s cytokininy. Regenerace na multiplikačním médiu je rozdílná vlivem primárního explantátu i s přítomnými meristémy (**Obrázek 3**).



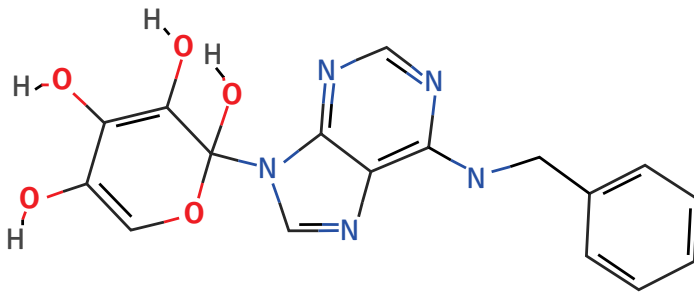
Obrázek 3. Vliv výchozího explantátu na regeneraci po třech týdnech kultivace na médiu pro multiplikaci prýtů. A - regenerace ze vzrostného vrcholu s apikálním meristémem (VV); B – regenerace z nodu s axilárními meristémy (N).

3.4 Aplikace nového derivátu cytokininů, BAP9THP a ANTIAUXINU, PEO-IAA

Transport růstových regulátorů v celistvé rostlině probíhá dle známých pravidel: auxiny bazipetálně a parenchymatickými buňkami; cytokininy xylémem (rychlý transpirační proud).

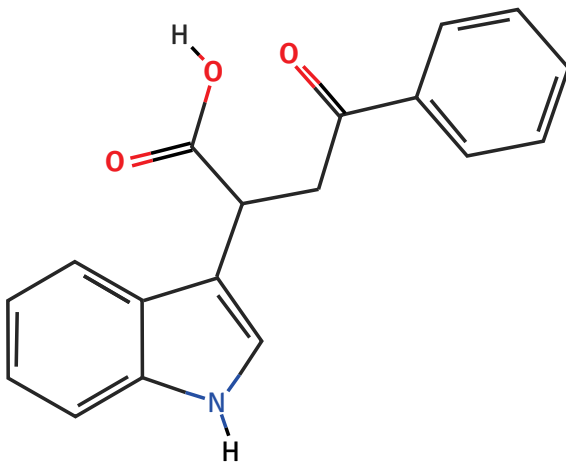
Růstové regulátory ovlivňují růst dle známých pravidel: auxiny způsobují dlouhivý růst buněk, podporují dělení buněk a navozují apikální dominanci (inhibice odrůstání pupenů) a ve vyšších koncentracích působí toxicky; cytokininy stimulují buněčné dělení a regenerační procesy *in vitro*, zpomalují stárnutí, ruší apikální dominanci.

Aplikací syntetických derivátů cytokininů a dalších látek, které ovlivňují metabolismus endogenních cytokininů lze regulovat organogenní regeneraci z primárních explantátů. V případě konopí lze pozitivně působit na kvalitu regeneračního procesu, a omezit tvorbu bazálního kalusu. Jsou to tyto syntetické růstové regulátory:



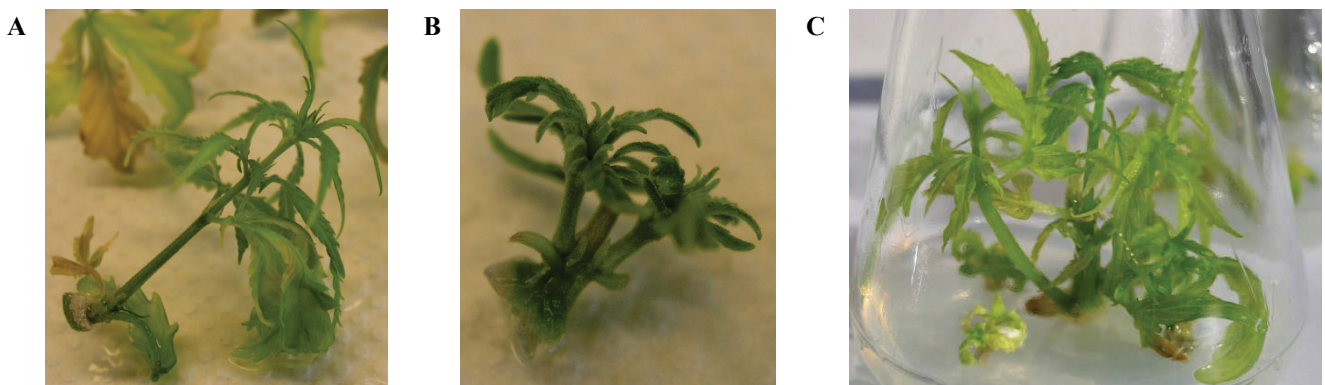
6-benzylamino-9-(tetrahydroxyppyranil)purin (BAP9THP)

Účinkem **BAP9THP** v základním MSB médiu dojde ke zmnožení prýtů z preexistujících meristematických základů (multiplikace).



α -(2-oxo-2-phenylethyl)-1H-indole-3-octová kyselina (PEO-IAA)

Účinkem **PEO-IAA** v základním MSB médiu dojde ke snížení účinku auxinů (potlačení apikální dominance jednoho z prýtů u N, v případě multiplikace vyrovnání vývoje mnohočetných prýtů) a k podpoře funkce endogenních cytokininů.



Obrázek 4. Potlačení apikální dominance aplikací PEO-IAA, která je součástí multiplikačního média (Tabulka 2.). Vzhled po 4 týdnech od izolace primárních explantátů. A – zkracování internodií na odrůstajícím apikálním prýtu (VV) – vyšší výtěžnost nodů pro multiplikaci; B – stejnoměrné odrůstání prýtů z obou axilárních meristémů (N); C – vyrovnaný vývoj zmnožených prýtů z jednoho explantátu.

Aplikace nových derivátů cytokininů vede k optimálnímu vzhledu explantátů: omezení senescence, nekróz – produkce fenolických látek, tvorby bazálních kalusů, rovnoměrného vývoje prýtů, omezení vitifikace. Opakovat

pasáž (2–3×) na *indukčním médiu* pro dosažení kvalitativně vyrovnaných prýtů ve zkráceném intervalu 14–21 dnů, v závislosti na rychlosti růstu explantátů. Při pasáži použít nodální segmenty z vytvořených *in vitro* prýtů.

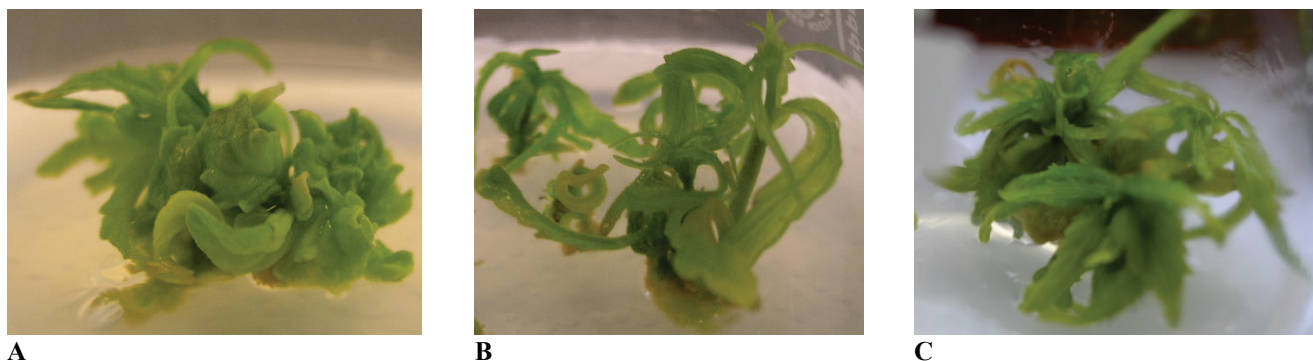
3.5 Založení MSC (Multi Shoots Culture)

Pro založení MSC kultivaci výchozích explantátů nechat probíhat na pevných MSB mediích, makro- a mikroprvky (Murashige and Skoog, 1962) a B5 vitamíny (Gamborg et al. 1968) s přidavky: 1,650 g.l⁻¹ NH₄NO₃; 0,1 mg.l⁻¹ myoinositol; 30 g.l⁻¹ sacharóza (**Tabulka 2.**). Porovnat média pro výběr vhodné kombinace: *indukční médium 1* s BAP9THP, *indukční médium 2* s BAP9THP a adenin-hemisulfátem (40 mg.l⁻¹ AS místo NH₄NO₃); *indukční médium 3* s BAP9THP a PEO-IAA (α -(phenylethyl-2-one)-indole-3-acetic acid). K porovnání charakteru regenerace a optimalizace MSC použít 3 typy explantátů: nod s axilárními meristémami (N), vzrostný vrchol (VV) a vyzizolovaný apikální meristém (M). Explantáty 3–4× pasážovat po třech týdnech kultivace na čerstvá indukční média. Regeneraci a indukci MSC dokumentovat popisem morfologických vlastností kultur a dále sledovat úroveň multiplikace prýtů na explantát. Výsledky pro odrůdu USO-31 jsou uvedeny v **Tabulce 4**.

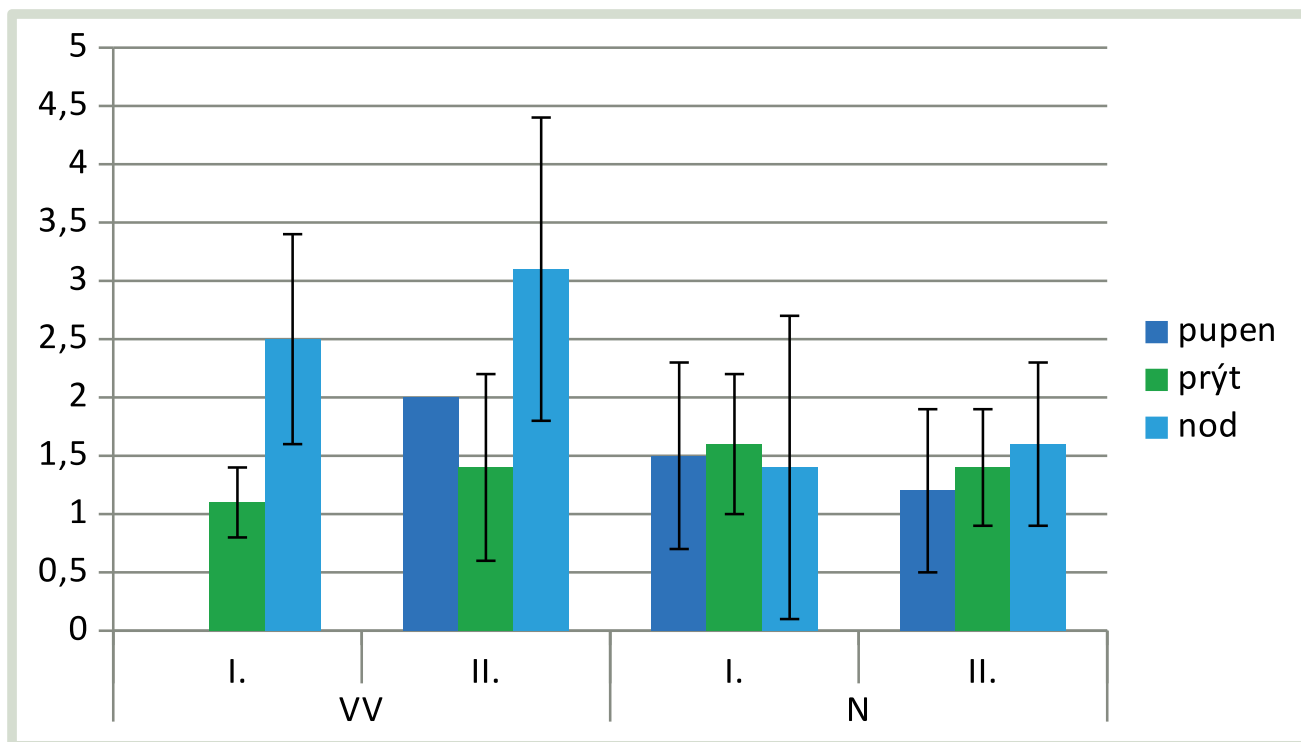
Tabulka 4. Hodnocení počtu prýtů na explantát, získaných opakovanou kultivací 3 typů explantátů na 3 typech indukčních médiích.

typ	nod	vzrostný vrchol	meristém
indukční médium 1	2.4±0.5	3.2±0.4	2.0±0.7
indukční médium 2	1.4±0.9	2.6±0.9	3.9±1.8
indukční médium 3	4.4±0.2	2.8±0.4	9.4±3.7

Lze pozorovat rychlou viditelnou interakci např. meristémů na použité indukční médium – morfologie explantátů (po 7 dnech kultivace). Pro odrůdu USO-31 jsou nejpravděpodobnější morfologické popisy následující. **Nody** (N) na *indukčním médiu 1* (BAP9THP) vytváří většinou 2 nerovnoměrně vyvinuté prýty se zkrácenými internodií, dochází k tvorbě bazálního kalusu. Charakter kalusu je odlišný od rozvolněného kalusu vznikajícího u hypokotylů (**Obrázek 2B**). Nody na *indukčním médiu 2* (BAP9THP + AS) vytváří většinou jeden prýt, tzn. inhibice multiplikace. Nody na *indukčním médiu 3* (BAP9THP + PEO-IAA) vytváří rovnoměrně vyvinuté krátké mnohočetné prýty (multiplikace). **Vzrostné vrcholy** (VV) na *indukčním médiu 1* vytváří většinou 3 prodloužené prýty (multiplikace), někdy s dominancí jednoho z prýtů, dochází k tvorbě bazálního kalusu. VV na *indukčním médiu 2* vytváří 3 prýty (multiplikace) s dominancí jednoho z prýtů a nedochází ke zkracování internodií, dochází k tvorbě bazálních kompaktních kalusů, VV na *indukčním médiu 3* vytváří 3 prýty s dominancí jednoho z prýtů, dochází k tvorbě bazálního kalusu a ke zkracování internodií. **Meristémy** (M) na *indukčním médiu 1* vytváří 2 pupeny nebo prýty (nedochází k multiplikaci), M na *indukčním médiu 2* vytváří 4 pupeny až zakrslé prýty většinou s dominancí jednoho z prýtů (multiplikace), dochází k tvorbě bazálního kalusu, M na *indukčním médiu 3* vytváří výraznou multiplikaci kvalitních prýtů (**Obrázek 5**).

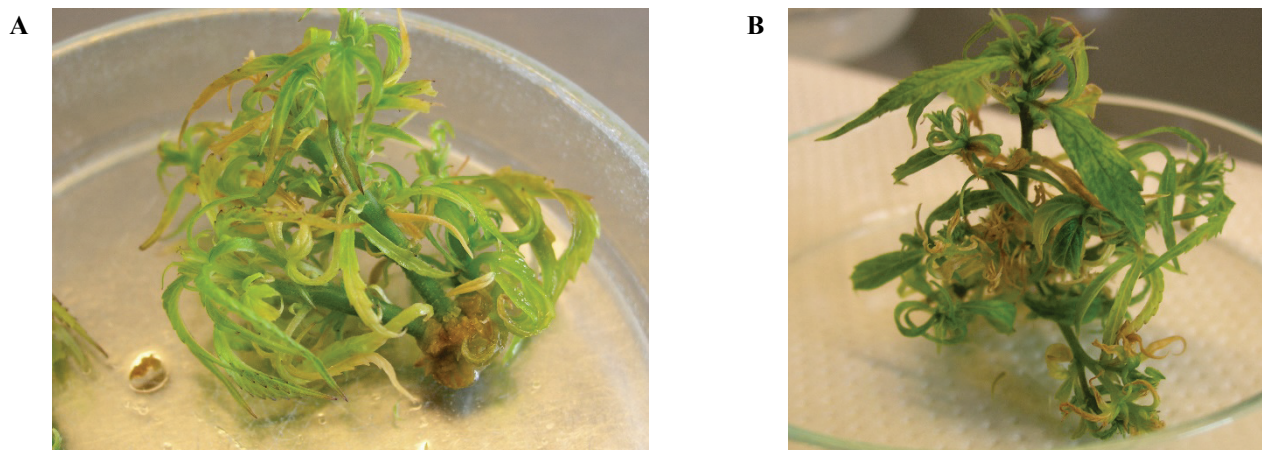


Obrázek 5. Vzhled kultivovaných meristémů na indukčních médiích s BAP9THP (6 týdnů). A – *indukční médium 1*; B – *indukční médium 2*; C – *indukční médium 3*.



Graf 1. Porovnání vlivu typu explantátu na utváření potenciálu pro založení MSC. Sledování počtu pupenů, prýtů a vytvořených nodů po 4 týdnech kultivace výchozích explantátů (VV a N) na *indukčním médiu 2*.

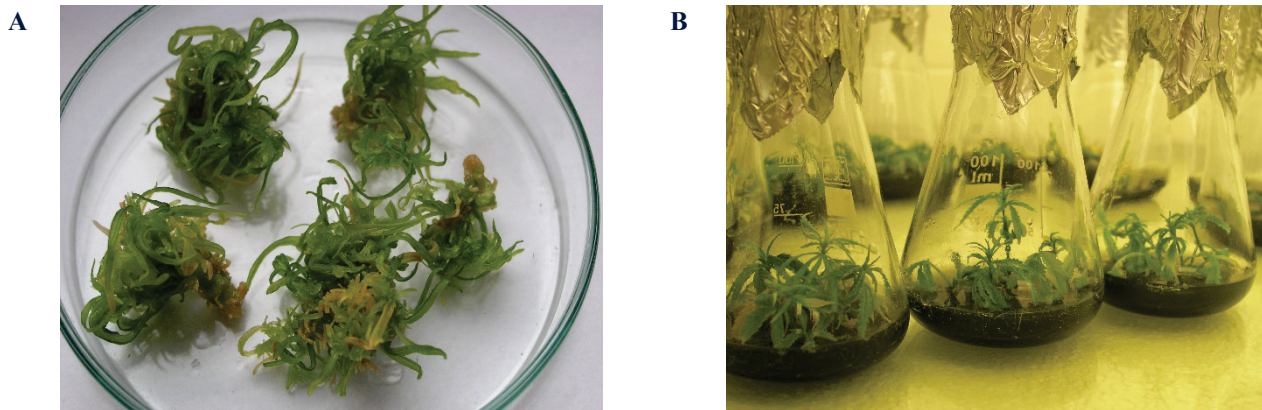
Výchozí počet při první explantaci I (14 – 18 dnů na nakličovacím C0 médiu) a při druhé explantaci II (30 až 37 dnů na *nakličovacím C0 médiu*) byl 23 a 28 explantátů. Potenciál produkce nodů a prýtů a stagnace explantace ve formě pupenů na *mediu 2* (**Graf 1**) ukazuje na významný rozdíl ve prospěch VV. Pro založení MSC je důležité zvolit pouze VV. U výchozích explantátů VV na obou *indukčních médiích 1, 2* lze dlouhodobou kultivací vytvořit dostatečné množství prýtů nebo donorů nodů pro multiplikaci (**Obrázek 6**).



Obrázek 6. Vzhled kultury po opakované kultivaci výchozích explantátů (VV) na médiích s BAP9THP. A – *indukční médium 1*; B – *indukční médium 2*.

Adenin hemisulfát (AS) je regulační molekula součást DNA a RNA a AS je použit jako zdroj pro podporu iniciace nových meristemických základů. Udržovat kultury mnohonásobných prýtů (MSC) na *indukčním médiu 3* (BAP9THP + PEO-IAA), platné pro odrůdu USO-31, kde ale dochází k významné vitifikaci (**Obrázek 7**). Vitifikované prýty jsou křehké a nevhodné na zakořeňovací proces. Proto posledním komponentem v indukčním multiplikačním médiu je **aktivní uhlí (AC)**. Aktivní uhlí (AC) působí jako adhezivum na fenolické látky, které se uvolňují při explantaci (zejména M a VV). Na plnohodnotném *indukčním médiu 4* s AC, AS, BAP6THP a PEO-IAA (**Tabulka 2**) nedochází k vitifikaci a lze tak získat kvalitativně optimální prýty pro zakořeňování (viz kapitola 3.6. *Indukce kořenů a aklimatizace*). Dlouhodobou kultivací MSC dochází ke snižování regenerace,

odumírání explantátů především jako důsledek hromadění metabolitů v důsledku opakované exogenní aplikace, nebo dochází ke genetickým změnám (somaklonální variabilita).



Obrázek 7. MSC kultura mnohonásobných prýtlů – indukce multiplikace (zmnožení) prýtlů z preexistujících meristémů na multiplikačním médiu. A – vitrifikace způsobená *indukčním médiem* bez aktivního uhlí; B – prýtlky bez vitrifikace na *indukčním médiu* s aktivním uhlím.

Opakovanou pasáží MSC kultur odvozených z klíčnic rostlin odrůdy USO-31 se může dosáhnout multiplikačního koeficientu až $11,7 \pm 4,53$ (produkce za 2 měsíce). Charakter kultur je genotypově závislý.

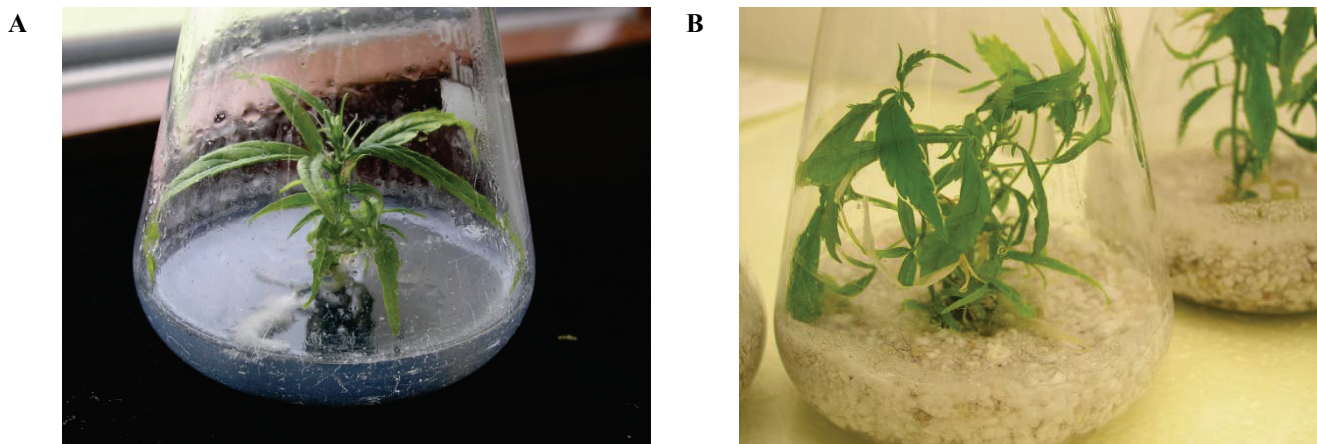
3.6 Indukce kořenů a aklimatizace

Zakořeňování – indukce kořenů a rozvoj kořenové soustavy je genotypově závislý proces. Předcházet přetrvávajícímu vlivu dlouhodobě aplikovaných regulátorů růstu v MSC lze opakovanou kultivací kultur na 1/2 MS médiu (2–3 pasáže). Růstové regulátory (komponenty indukčních médií) významně ovlivňují pozdější morfologii rostlin (víceprýtlový habitus bez dominantního prýtlku, viz kapitola 4. *Dopěstování rostlin*). Získané kvalitní prýtlky, bez vitrifikace odřezat a převést na zakořeňovací média: MS s aktivním uhlím (*zakořeňovací médium 1*) nebo 1/2MS s aktivním uhlím, NAA a IBA (*zakořeňovací médium 2*, složení **Tabulka 3**). Při zakořeňování rostlin je lépe vycházet z krátkodobých MSC kultur než dlouhodobých MSC kultur: u VV 18% pokles na 12 % zakořeněných rostlin a u N (25% pokles na 7 % zakořeněných rostlin. V **Tabulce 5**. je zhodnoceno zakořeňování vzhledem k typu pasáže. Zjištěná nízká úroveň zakořeňování prýtlů (do 15 %) získaných z dlouhodobé MSC není dostačující pro komerční využití.

Tabulka 5. Hodnocení zakořeňování z MSC. Procento zakořeněných rostlin z celkového počtu výchozích MSC prýtlů (průměrně 50) v závislosti na typu médií.

typ média → pasáž	indukční médium	
	médium 3	médium 3 → médium 4
zakořeňovací médium médium 1 → médium 2	20%	-
médium 2	23%	27%
dlouhodobá MSC: médium 1 → médium 2	8%	13%
dlouhodobá MSC: médium 2	0%	15%

Jednotlivé rostliny s dobře vytvořenou kořenovou soustavou na *zakořeňovacím médiu 2* převést do perlitu se zálivkou 1/2 MS média tak, aby rostliny nebyly přemokřené (**Obrázek 8**). Zakořenit i víceprýtlkové rozvětvené rostliny, u nichž došlo k indukci společného kořene. Dobře zakořeněné rostliny přímo převést do sterilního substrátu v kontejnerech (viz kapitola 4.1. *Aklimatizace ex vitro*). Doporučuje se tento druhý postup.

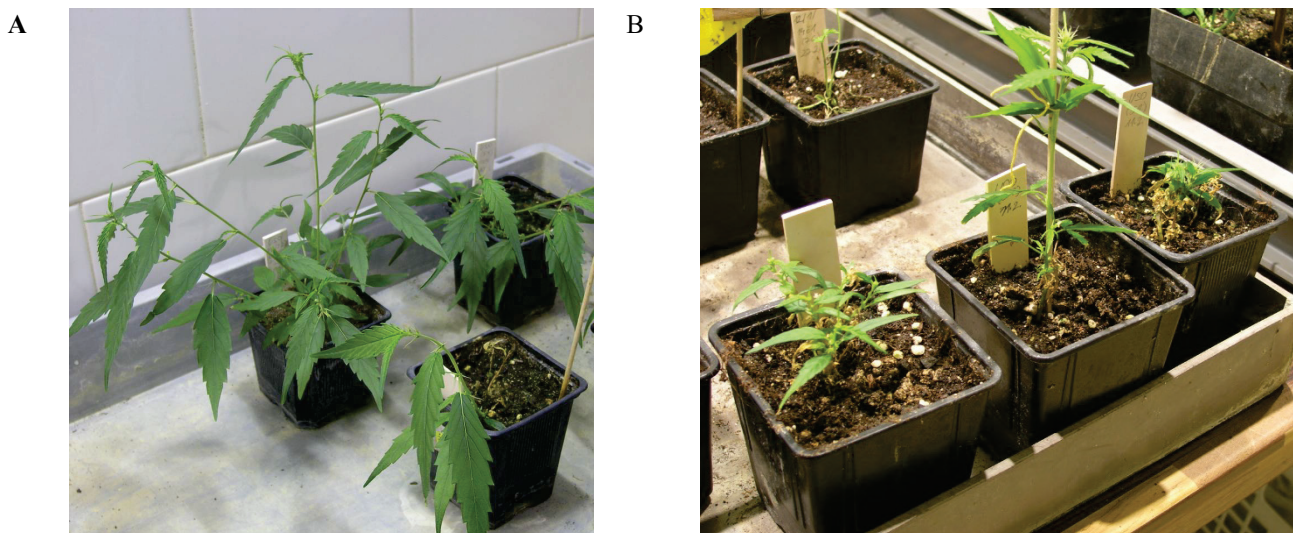


Obrázek 8. Indukce kořenů a rozvoj kořenové soustavy – individuální pro každého jedince. A – zakořeňování kvalitních prýtů na *zakořeňovacím médiu 2* (Tabulka 4); B – převod zakořeňených, někdy částečně rozvětvených prýtů do perlitu.

4 DOPĚSTOVÁNÍ ROSTLIN

4.1 Aklimatizace *ex vitro*

Vitální zakořeňené rostliny jsou převáděny z perlitu nebo přímo ze zakořeňovacího média v Erlenmayerových baňkách (250ml) do sterilního substrátu (př. směs rašeliny 60 %, humusu 5 %, písku a jílu, pH 6–7) v plastových kontejnerech (10 × 10 × 9 cm), vždy po jedné rostlině. Morfologie regenerovaných jedinců (rostlina s více větvemi nebo s jedním prýtem často s již nasazeným květenstvím) přetrvává po celou dobu života rostlin (**Obrázek 9**). Je nutné rostliny nejprve přikrýt na 10–14 dnů průhledným krytem s průduchy, kde by se udržela po dobu aklimatizace vyšší vlhkost vzduchu. V této fázi dochází k přizpůsobení stavby pokožky rostlin a zejména přizpůsobení na sníženou vlhkost okolního prostředí (hospodaření s vodou), na *ex vitro* podmínky. Dopěstování rostlin, včetně produkce osiva (viz kapitola 4.2. *Tvorba osiva*), se doporučuje nechat probíhat v růstových komorách nebo v místnostech s regulovatelnými světelnými a tepelnými podmínkami (**Obrázek 10**).



Obrázek 9. Rozdílná morfologie převedených rostlin – malé kontejnery. A – trsovitý vzhled a nízký vzrůst; B – dlouhé rostliny se vzpřímeným dominantním stonkem.



Obrázek 10. Rozdílná morfologie převedených rostlin – velké nádoby. A – trsovitý vzhled a nízký vzrůst; B – dlouhé rostliny se vzpřímeným dominantním stonkem; C – okamžitá klíčivost semen z výdrolu.

4.2 Tvorba osiva

Produkce osiv u rostlin, získaných *in vitro* mikropropagací a převedených do *ex vitro* podmínek probíhá stejně jako u rostlin z přesevu. Specifika při dopěstování rostlin z *in vitro* konopí jsou především daná genotypem. U cizosprašných jednodomých odrůd, jako je odrůda USO-31, lze očekávat produkci rostlin s obojím typem květů – samčích a samičích na jedné rostlině. Obecně vysoká diverzita (nevyrovnanost), charakteristická pro konopí, se týká i převažujícího typu rostlin vzhledem k zastoupení samčích a samičích rostlin (**Obrázek 11**).



A



B



C



D



E

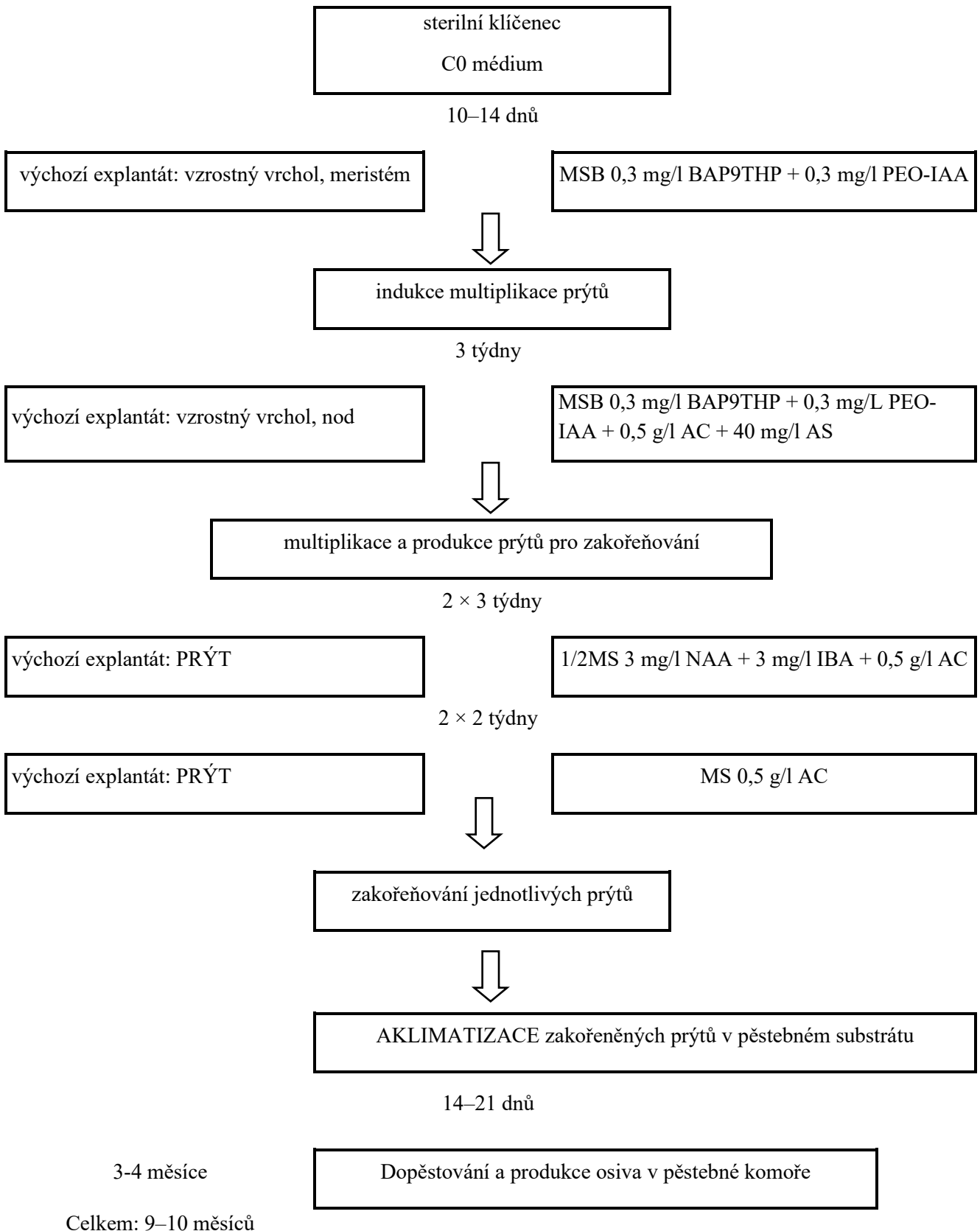
Obrázek 11. Nasazení na květ – typy květů. A – samičí květenství; B – samčí květenství; C – samčí květy a nasazení plodů (jednodomost); D – převažující samičí rostlina; E – převažující samčí rostlina.

U souboru převedených rostlin genotypu USO-31 lze očekávat většinu (70 %) rostlin se samičími květy (produktivní rostliny, **obrázek 11A,D**). Samčí květy jsou zastoupeny v menší míře (30 %) nebo ojediněle, tj. rostliny s převažujícími samčími květy (**obrázek 11E**). U rostlin se samičími květy dopěstovat do semen (**Obrázek 12**) s různým stupněm vyžralosti (postupné dozrávání). Zralé osivo se postupně uvolňuje a vykazuje okamžitou klíčivost z výdrolu (**obrázek 10C**).



Obrázek 12. Produkce osiva z rostlin, dopěstovaných v pěstební komoře. Postupné dozrávání ovlivňuje i konečnou zralost (kvalitu) osiva.

Schéma biotechnologické produkce konopí odrůdy USO-31



Tabulka 6 (doplňková). Mikropropagační systémy – přehled publikovaných protokolů.

genotyp/odrůda	typ explantátu	indukční médium	regenerace	zakořeňovací médium	úspěšnost	zdroj
<i>C. sativa</i> L.	pupeny z donorových rostlin (1 m)	MS médium 2 g/l AC 0,45 mg/l BAP + 20 µg/l IBA	prýty – nodální segmenty	MS médium 100 µmol/l IBA	70%	Mandolino a Ranalli, 1999
<i>C. sativa</i> L.	0,5cm stonkové segmenty s axilárními pupeny	B5 médium 2 g/l AC 0,45 mg/l BAP + 20 µg/l IBA	70% růst nevyrovnaný vývoj prýtů, dlouhodobě žloutnutí, odumírání	B5 médium 20 mg/l IBA	stimulace	Mandolino a Ranalli, 1999
<i>C. sativa</i> L.	list hypokotyl	MS médium 3–10 mg/l 2,4-D + 0,01-0,1 mg/l BAP	kalus prýty, kalus	-	-	Mandolino a Ranalli, 1999
<i>C. sativa</i> L. Silesia, Novosadska, Fedrina-74	řapík	MS médium 2–3 mg/l DICAMBA	regenerace prýtů z kalusu (1,4–2,5 %)	MS médium 1mg/l NAA+1mg/l IAA	70%	Slusarkiewicz-Jarzina a kol. 2005
<i>C. sativa</i> L. Changtu - Čína	vzrostlý vrchol	MS médium 0,2 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	prorůstání axilárních pupenů (2–3 pupeny/exp)	1/2MS, MS média 0.1 mg/l IBA + 0.05 mg/l NAA	75–85%	Wang a kol. 2009
<i>C. sativa</i> L. lékařské konopí	nodální segmenty s axilárními pupeny matečných rostlin (1 rok staré)	MS médium 0,5 µmol/l TDZ + 2 µmol/l <i>m</i> -TOP	regenerace prýtů	1/2MS, MS média 0,5g/l AC+3µmol/l IBA	95%*	Lata a kol. 2009, 2016
<i>C. sativa</i> L. lékařské Bedrocan	děložní listy, listy	B5 médium 0,5 mg/l NAA + 5 mg/l BAP + 40 mg/l AS 0,5 mg/l GA ₃ 0,25 mg/l KIN + 3 mg/l GA ₃	indukce a vývoj somatických embryí z kalusu	modif. B5 médium 1,5mg/l IAA	100%	Farag, 2014
<i>C. sativa</i> L. íránské	dělohy, epikotyl	MS médium 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA	regenerace prýtů	MS médium 0,1 mg/l IBA 0,5 mg/l NAA	70%	Movahedi a kol. 2015
<i>C. sativa</i> L. Bialobrzeskie, Monoica	vzrostlý vrchol (2cm)	MS médium 0,5 mg/l <i>m</i> -TOP 1 g/l AC	nejvyrovnanější vývoj prýtů	MS médium 0,5 mg/l <i>m</i> -TOP+1 g/l AC	není uvedeno	Grulichová a kol. 2017

Mandolino a Ranali, 1999: NAA formace kalusu, kombinace KIN a IBA nelze zakořeňovat prýty; *nízký výchozí počet prýtů (do 10 explantátů)

5 ZÁVĚR

5.1 Popis uplatnění metodiky

Tato metodika byla vytvořena za účelem jejího využití pro další biotechnologické postupy, včetně agrobakteriální transformace konopí. Představuje základní postup pro regeneraci nových jedinců, umožňuje namnožení jedinečného materiálu, včetně hybridů. Pro tyto postupy bude metodika dále využita. Metodika stanovila specifické požadavky konopí na úspěšnou regeneraci s využitím nových regulátorů růstu, dosud neaplikovaných u konopí. Tímto metodickým postupem je dán i obecný návod, jak postupovat při zakládání *in vitro* kultur a zohledňovat výběr výchozích explantátů.

5.2 Seznam použité literatury

- Farag S (2014) Cannabinoids production in *Cannabis sativa* L.: An *in vitro* approach. Dissertation, Technical University of Dortmund, Germany, <http://dx.doi.org/10.17877/DE290R-16424>.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158.
- Honzík R., Bjelková M., Muñoz J., Váňa V. (2012) Pěstování konopí setého *Cannabis sativa* L. pro výrobu bioplynu. Metodika pro praxi. ISBN 978-80-7427-27-4.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I., ElSohly, M.A. (2009) Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 45:12–19.
- Lata, H., Chandra, S., Techen, N., Khan, I.A., ElSohly, M.A. (2016) *In vitro* mass propagation of *Cannabis sativa* L.: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3: 18–26.
- Mandolino G, Ranalli P (1999) Advances in biotechnological approaches for hemp breeding and industry. In: Ranalli P (ed) *Advances in Hemp Research*. Haworth Press, Binghamton, Inc. New York, London, pp. 185–208.
- Movahedi M, Ghasemiomran V, Torabi S (2016) Effect of explants type and plant growth regulators in vitro callus induction and shoot regeneration of *Cannabis sativa* L. *Iranian J Med Aromatic Plants* 32:758–768.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497.
- Ślusarkiewicz-Jarzina A, Ponitka A, Kaczmarek Z (2005) Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47:145–151.
- Wang, R., He, L.S., Xia, B., Tong, J.F., Li, N., Peng, F. (2009) A micropropagation system for cloning of hemp (*Cannabis sativa* L.) by shoot tip culture. *Pakistan Journal of Botany*, 41(2): 603–608.
- Grulichová M, Mendel P, Lalge AB, Slamova et al (2017) Effect of different phytohormones on growth and development of micropropagated *Cannabis sativa* L. *Mendelnet* November 8-9, Brno, Czech Republic, 618–623.

5.3 Seznam publikačních výstupů předcházející metodice

- Cvečková M, Griga M. Testing arsenic (As) resistance and accumulation potential by *in vitro* system of hemp (*Cannabis sativa* ssp. *sativa* L.) for phytoremediation purposes. Poster pre-sentation on NAROSSA - 19th International Conference for Renewable Resources and Plant Biotechnology. 16. – 17. 6. 2014 Poznaň, Poland.
- Cvečková M., Smýkalová I., Větrovcová M., Vrbová M.: Metodika testování těžkých kovů pomocí suspenzních kultur konopí setého (*Cannabis sativa* ssp. *sativa* L.). Certifikovaná metodika. Agritec, s.r.o. ISBN 978-80-87360-35-4, 1. vydání, 2015.

- Plačková L., Hrdlička J., Smýkalová I., Cvečková I., Novák O., Griga M., Doležal K.: Cytokinin profilig of long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Growth Regulation*. DOI 10.1007/s10725-015-0044-z, **2015**.
- Bjelková M., Šmirous P., Vrbová M., Vaculík A.: Komplexní metodika pěstování konopí setého. Certifikovaná metodika. Agritec, s.r.o. ISBN 978-80-87360-55-2, 1. vydání, **2017**.
- Smýkalová I., Vrbová M., Cvečková M., Plačková L., Žukauskaitė A., Zatloukal M., Hrdlička J., Plíhalová L., Doležal K., Griga M.: The effects of novel synthetic cytokinin derivatives and endogenous cytokinins on the *in vitro* growth responses of hemp (*Cannabis sativa* L.) explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* DOI 10.1007/s11240-019-01693-5, **2019**.



Agritec Plant Research s.r.o.
Zemědělská 2520/16
787 01 ŠUMPERK
ČESKÁ REPUBLIKA
info@agritec.cz | www.agritec.cz

ISBN 978-80-87360-61-3



9 788087 360613