

FUNKČNÍ VZOREK

TH03030050-V004

Definování způsobu převodu rostlin ex vitro

Výstup z projektu TH03030050: Tvorba nových genotypů hrachu s využitím planých druhů/forem a biotechnologických metod (2018 – 2021).

Smluvní strany

AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o.

se sídlem Zemědělská 2520/16, 78701 Šumperk

34%

Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i.

se sídlem Květnové náměstí 391, 252 43 Průhonice

33%

Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

se sídlem Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod

33%



Vypracoval:

AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o.

Ing. Iva Smýkalová, Ph.D.

Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i.

Ing. Jana Šedivá, Ph.D.

Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

Ing. Marie Greplová, Ph.D.

OBSAH

Obsah	3
Charakteristika funkčního vzorku	3
Podstata technického řešení	3
Předmět inovace řešení	4
Postup	4
Formulace složení substrátů.....	4
Aklimatizace rostlin – aplikace podpory růstu	4
Stimulátory rozvoje kořenové soustavy	5
Ochrana kořenů před půdními fytopatogeny	6
Technické řešení aklimatizační jednotky	6
Erlenmayerovy baňky, minipařníky, hydroponické systémy.....	6
Příklad využití	8
Pěstování – faktory úspěšnosti	8
Dopěstování linií z <i>in vitro</i> selekcí	9
Literatura	10
Závěr	11

CHARAKTERISTIKA FUNKČNÍHO VZORKU

Jedná se o definování způsobu převodu rostlin *ex vitro*, kdy pro rostliny dochází ke změně kultivačních podmínek. Postupné otužování na změnu klimatických podmínek vyžaduje velmi citlivé nastavení pěstebních podmínek. Součástí je nastavení doby aklimatizační fáze v závislosti na citlivosti genotypů, definování substrátu vzhledem k požadavkům hrachu, speciální ošetření zakořeněných prýtů např. proti výskytu patogenů (přechod ze sterilních do nesterilních podmínek). Plně funkční postup aklimatizace umožní dosažení dopěstování zakořeněných prýtů jako nového šlechtitelského materiálu. Namnožení semenného potomstva slouží k získání dostatečného množství osiva k testování v polních podmínkách, k prokázání zjištěné odolnosti a využití jako jedinečného materiálu.

PODSTATA TECHNICKÉHO ŘEŠENÍ

Fáze aklimatizace rostlin je charakterizována zejména ztrátou turgoru (vysoká vlhkost ve zkumavkách *in vitro*) a vytvořením plně funkčních zejména pokožkových pletiv. Tyto změny jsou často provázeny snížením životaschopnosti nebo odumíráním již *in vitro* zakořeněných rostlin.

Současné techniky konvenčního šlechtění zahrnují poměrně zdlouhavé postupy při vytváření nových genotypů, odrůd. Aplikace biotechnologických metod značně zefektivňují tento proces (doba šlechtění, pracovní a energetická náročnost). Rostlinné biotechnologie dokážou zkrátit proces až 4-5x, před tržním potenciálem těchto biotechnologií je nezbytné provést optimalizaci pro plodinu, pro rostlinný druh a genotyp. Kritickým koncovým krokem je převod rostlin z *in vitro* do *ex vitro* podmínek a zachování reprodukceschopnosti získaného materiálu. Lze provést indukované kvetení *in vitro* (některé druhy luskovin), techniku embryo rescue (velmi obtížně) nebo využít kompatibilní rhizobiální symbiotické kmeny. Proto je mikropropagace meriklonů stále nejvýhodnější.

PŘEDMĚT INOVACE ŘEŠENÍ

Na základě předchozích výstupů (Smýkalová a kol. 2019, Šedivá a kol. 2020) došlo u většiny planých druhů hrachu při převodu zakořeněných rostlin z perlitu do pěstebního substrátu k velkým ztrátám. U dlouhodobých pasáží *in vitro* kultur (dlouhodobé kultury), kde rovněž dochází ke snížení schopnosti zakořeňování, při převodu z perlitu do pěstebního substrátu přežije průměrně $76,6 \pm 8,7$ % rostlin. U planých druhů hrachu, kde se odvozují MSC kultury z naklíčených semen a po krátkodobé pasáži se z ní získávají prýty na zakořeňování dle výše zmíněné metodiky (Smýkalová a kol. 2019), byly zjištěny průměrné ztráty již zakořeněných rostlin v perlitu $67,6 \pm 13,4$ % a následně v pěstebním substrátu $57,1 \pm 14,7$ %. Ztráta rostlin mezi perlitem a substrátem nebyla již tak významná $85,1 \pm 15,4$ %. Mezi jednotlivými planými druhy byl rozdíl v aklimatizační schopnosti.

První krok je stejný B6 médium (100 %), následná kultivace rostlin na médiu může ovlivnit počet zakořeněných rostlin (**Tabulka 1**).

Tabulka 1. Vliv kultivačního média na úspěšnost tvorby kořenů pro jednotlivé prýty (výhony).

½ MS médium (zakořeňovací)	Úspěšnost (%)	MSB0 médium → ½ MS médium (zakořeňovací)	Úspěšnost (%)
Perlit	27,1±13,0	Perlit	55,8±7,7
Substrát	12,8±8,5	Substrát	40,7±14,9

Inovativní přístup je vytvoření systému převodu rostlin z aklimatizační fáze do *in vivo* podmínek poplatného pro celou řadu genotypů u hrachu v návaznosti na biotechnologické přístupy. Parametrem hodnocení při porovnávání několik způsobů aklimatizace je počet dopěstování rostlin do semen. Kvalita rostlin je důležitým parametrem při posuzování vhodnosti zvoleného systému.

POSTUP

Formulace složení substrátu

Perlit je chemicky neutrální inertní nosič vhodný pro mladé rostlinky, který je využitelný zejména v aklimatizační fázi pro své tepelné a vlhkostní vlastnosti. Nová formulace pěstebního substrátu v aklimatizační fázi byla založena i na požadavcích hrachu, jako plodiny. Většina zahradních komerčních substrátů ve svém složení používá jako převažující díl rašelina a kůrový humus, které dodávají těmto substrátům specifické vlastnosti včetně kyselé půdní reakce (pH 5,5 Agro CS, c.s. Říkov, Česká republika). Z pěstitelského hlediska, hrách vyžaduje rád zásaditou půdní reakci (optimum je 6,2 – 7, <https://www.agromanual.cz>). Doporučené složení je rašelina, kůrový humus, jíl a písek, pH 6-7, bohatý na NPK živiny, odlehčeno perlitem.

Aklimatizace rostlin – aplikace podpory růstu

Technické řešení této fáze, která je rozhodující pro dopěstování rostlin do semenného stavu, velmi závisí na typu *in vitro* kultur, ze kterých rostliny vstupují do této fáze, a genotypové výbavy čelit osmotickému stresu. Zmírnění účinků můžeme přispět různými podpurnými prostředky na rozvoj kořenové soustavy a technicky i aklimatizačními jednotkami, které jsou dostupné na trhu.

Stimulátory rozvoje kořenové soustavy

Stimulátor AS-1 (AgroBio, s.r.o. Opava, CZ) obsahuje kyselinu *p*-naftyloctovou a kyselinu nikotinovou. Podporuje tvorbu kořenů. Kořeny rostlin se vloží do pudru a přebytek se oklepe zpět do nádoby, takto položíme šikmo do substrátu, opatrně přihneme, aby se nesetřel ulpělý stimulátor.

Symbiotické inokulum, **bakteriální suspenze** *Rhizobium sp.*, 10^7 CFU/ml. Indukce tvorby hlízek se provede *in vitro* inokulací kořenů specifickým kmenem symbiotických bakterií za sterilních podmínek (Barbulova a Chiurazzi v Márquez, 2005). Ve flowboxu probíhá nalití média do kultivačních misek pro tkáňové kultury o velikosti 120x120 mm nebo Petriho misek o průměru 90 mm, 50 ml nebo 25 ml 1/2MS média. Po ztuhnutí média se do každé kulivační misky přidá sterilní půlkruh filtračního papíru. Pro inokulaci každého primárního kořenového meristému se použije 20 μ l bakteriální suspenze a misky se utěsní Parafilmem. Hliníková fólie je omotána kolem spodní části misek, aby udržovala kořeny ve tmě (**Obrázek 1.**). Čtyři dny po infekci se filtrační papír odstraní (aby se zabránilo vysušení) a rostliny se ponechají pro další růst na stejných miskách. Růst inokulovaných rostlin po infekci probíhá při 23 °C, fotoperioda 16/8 hodin, 246 μ E s⁻¹ m⁻². Inokulované rostliny se použijí pro převod do nesterilních podmínek v hydroponickém systému nebo přímo do substrátu.

Obrázek 1. *In vitro* inokulace: vlastní inokulace bakteriální suspenzí, vývoj kořenového systému rostlin, rostliny připravené pro převod do nesterilních podmínek (klíčící rostliny nebo dobře zakořeněné rostliny z *in vitro* kultur).





Ochrana kořenů před půdními fytopatogeny

Fungicid **MAXIM XL 035FS** (Syngenta Czech a.s., Praha, CZ), komplexní dvousložkové fungicidní mořidlo ve formě kapalného suspenzního koncentrátu (účinné látky: 25 g/l fludioxonil a 10g/l metalaxyl-M) určené k ochraně osiva a vzcházejících rostlin proti houbovým chorobám přenosným osivem i půdou, bez negativního vlivu na klíčivost, ochrana proti hnilobám vzcházejících rostlin, jejichž příčinami jsou fuzariózy (*Fusarium* spp.).

Biopreparát **Polyversum Biogarden** (Biopreparáty, s.r.o., Úherce, CZ), mikrobiologický fungicidní preparát používaný k ochraně rostlin proti houbovým chorobám napadajícím především kořeny, kořenové krčky či paty stébel. Jeho hlavní účinnou složkou je mikroskopický houbový organismus (Oomyceta) *Pythium oligandrum*. Máčení kořenů sazenic 0,05 % suspenzí přípravku (0,5 g / 1 l) před výsadbou.

Technické řešení aklimatizační jednotky

Erlenmayerovy baňky, minipařníky, hydroponické systémy

Obrázek 2. dokumentuje technické možnosti pro zajištění aklimatizační fáze rostlin při jejich převodu z *in vitro* do *ex vitro* podmínek. Hydroponie je moderní systém pěstování rostlin v umělých podmínkách růstu, kde je možnost zvýšené vzdušné vlhkosti a posílení kořenového systému před převodem do nesterilních podmínek, do pevného substrátu. Omývání kořenů destilovanou vodou k odstraňování zbytků z kultivačního média, včetně cukerných složek, které mohou zvýšit možnost napadení kořenovými patogeny substrátech nebo aplikace živného roztoku, k posílení rozvoje kořenové soustavy. Využití malých hydroponických jednotek dovoluje například aplikace spojené s navožením stresu suchem dodáním do živného roztoku PEG6000. Za těchto podmínek lze odebrat vzorky k dalším analýzám.

Obrázek 2. Technické řešení aklimatizace rostlin – použití Erlenmayerových baněk s perlitem, minipařníků s kontejnery, nebo hydroponické jednotky.



Obrázek 3. Převod rostlin z *in vitro* podmínek (dlouhodobé kultury) a simulace stresu v hydroponii, využití PEG6000.



Součástí Gfunk jsou dva systémy: aklimatizační a inokulační.

U klimatických systémů nevýhodou je kolísavá vysoká vlhkost, která je příčinou určité části ztrát rostlin. Navrhovaný aklimatizační systém je nutné pravidelně zvlhčovat a denně kontrolovat stav převedených rostlin. K tomuto účelu v případě minipařníků lze využít sensorické zabarvení silikagelu, který odčerpává přebytečnou vlhkost ze systému. V hydroponii lze využít krátkodobé kultivace a převodu rostlin do minipařníků.

Inokulační systémy vyžadují především ověření kompatibility symbiomy s daným genotypem luskovin. Specifita procesu je základní předpoklad úspěšnosti. Výhodou je nenáročný proces *in vitro* inokulace a možnost převodu do sterilního substrátu v podmínkách minipařníku.

PŘÍKLAD VYUŽITÍ

Pěstování – faktory úspěšnosti

Pro sledování funkčnosti různých systémů a způsobů aklimatizace a úspěšnosti převedení rostlin *in vitro* bylo využito několik materiálů s různou úrovní zakořenění a převoditelnosti. Testy byly provedeny s těmito materiály: odrůda Eso (*in vitro* rizogeneze je 19 %), plané formy hrachu (*in vitro* rizogeneze je 20-80 %), dlouhodobá kultura hrachu Bohatýr z roku 1983 a odvozené meriklony BOH 3, 6 a původní kultura 10/83 (nízká úroveň *in vitro* rizogeneze 12,7 %) a *Vavilovia formosa* (*in vitro* rizogeneze je 25–30 %).

Tabulka 2. Testování různých způsobů zakořeňování a převodu zakořeněných rostlin do *ex vitro* podmínek.

Systém	médiu	Úspěšnost rizogeneze (%)				
		10/83	BOH3	Vailovia	BOH6	
<i>In vitro</i>						
B6 médiu	½ MS médiu (zakořeňovací)	11,69±5,58	10,02±5,14	-	6,96±7,87	
MSB0 médiu	½ MS médiu (zakořeňovací)	15,54±4,14	11,24±7,32	-	8,91±1,72	
médiu IBA+NAA	½ MS médiu (zakořeňovací)	-	-	26,7±4,5	-	
<i>In vitro</i> inokulace - <i>Rhizobium sp.</i> , <i>Azotobacter</i>	substrát	Eso	BOH3	BOH6	10/83	
Minipařník	zemina	100	100	0	0	
<i>In vitro</i> grafting	substrát	<i>Vavilovia</i>	plané druhy		Hybrid F2	
	perlit	56,71±27,41	22,2		66,6	
<i>In vitro</i> grafting + <i>In vitro</i> inokulace	substrát	<i>Vavilovia</i>				
	perlit	55,6				
		Úspěšnost aklimatizace (%)				
Aklimatizace		10/83	BOH3	BOH6	<i>Vavilovia</i> (<i>in vitro</i> grafting)	
Minipařník	perlit - zemina	77,50±7,21	72,05±19,42	69,08±21,53	43,3±29,4	
		plané druhy	odrůdy		<i>Vavilovia</i> (<i>in vitro</i> grafting)	
Hydroponie - minipařník	zemina	100	100		40	
Hydroponie - skleník	zemina	36,4	62,5		-	
<i>Ex vitro</i> / <i>In vivo</i>		Úspěšnost pěstování (%)				
		Eso	BOH3	BOH 6	10/83	<i>Vavilovia</i> (<i>in vitro</i> grafting ± <i>in vitro</i> inokulace)
	zemina + <i>Polyversum</i>	100	100	25	0	-
	zemina + NAA	100	100	-	66,7	33,3
	zemina+ <i>Polyversum</i> +silikagel	-	-			62,5
	zemina+NAA+silikagel	-	-			57,2
	zemina + MAX	100	-			-
	zemina	-	-			30

Výsledkem testování jsou pro každý sledovaný genotyp rozdílné podmínky pro zlepšení aklimatizační fáze (**Tabulka 2.**). U dlouhodobé kultury hrachu odvozené od odrůdy Bohatýr 10 / 83, která je od roku 1983 v *in vitro* kultuře, a dalších dvou odvozených dlouhodobých linií BOH3 a BOH6, je zakořeňování jednotlivých prýtů možné zvýšit uplatněním kultivace prýtů na MSB0 médiu bez fytohormonů. Během zakořeňování lze uplatnit *in vitro* inokulaci symbiotickými rhizobiálními N fixujícími kmeny bakterií (4–5 dnů). *In vitro* inokulace nemá vliv na přežití rostlin u odrůdy Eso a linie 10 / 83, ale u linií BOH3 a BOH6 došlo k odumření rostlin v substrátu v podmínkách minipařníku. *In vitro* grafting je stará technika, která by mohla v budoucnu být prospěšná pro *in vitro* kultury, kde se nepodaří *in vitro* zakořeněné prýty převést *in vivo*, tzn. překlenout aklimatizační fázi. Tak se nabízí *Vavilovia formosa*. U této rostliny je ve vývoji aplikace tohoto postupu. V porovnání s jinými genotypy, dosahuje srovnatelnou úroveň hybridizace kořenů a prýtů jako jiné semenné hybridní materiály (F2) a vyšší úroveň než některé plané formy hrachu.

Aklimatizační fáze je nejcitlivější částí testovaných materiálů. Systémy, které funkční vzorek nabízí je minipařník s převedenými rostlinami přímo z *in vitro* do substrátu, lze vyzkoušet různé podpůrné prostředky pro zakořenění nebo na ochranu rostlin vůči fytopatogenům, zejména kořenovým. Aklimatizační fáze z perlitu do substrátu je provázena ztrátami u linií 10 / 83, BOH3 a BOH6 přibližně ze 30 %, u *Vavilovia formosa* mnohem vyššími přibližně ze 60 %. Pokud předchází ještě krátkodobá aklimatizace v hydroponii (7–10 dnů) před minipařníkem můžeme počítat s bezztrátovými převody rostlin u planých druhů nebo odrůdy Eso, u *Vavilovia formosa* je přežití kolem 40 %. Pokud je převod uskutečněn bez využití minipařníku přímo do substrátu v kontejnerech může dojít opět k vysokým ztrátám rostlin, více u planých forem (30–40 %) než u odrůd (přibližně 60 %). Můžeme shrnout, že citlivost planých forem k aklimatizační fázi je vyšší než u odrůd hrachu.

Při převodech z *in vitro* nebo z aklimatizační fáze do substrátu 2,5 : 1 : 1 (pěstební substrát : křemičitý písek : zeolit) byly využity některé podpůrné prostředky jako je **Stimulátor AS-1** obsahující v práškové formě (obsahuje kořenový stimulátor NAA) nebo **Biogarden Polyversum** zálivka obsahující spóry mykoparazitické houby (*Pythium oligandrum*). Při porovnání účinnosti **NAA** a **Polyversum** u odrůdy Eso obě varianty odpovídali kontrolnímu ošetření s fungicidem **MAX XL 035 FS** (Syngenta a.s., ČR), 100 % převoditelnost rostlin. U linie BOH3 je použití Polyversum nebo NAA další z možností, aby nedošlo ke ztrátám. U linie BOH 6 s aplikací Polyversum přežilo jen 25 % a u linie 10 / 83 nepřežila žádná z rostlin. Pro linii 10 / 83 je možná aplikace NAA. U *Vavilovia formosum* bez aplikace nebo s NAA přežilo přibližně 30 %, Polyversum nebo NAA v kombinaci se silikagelem, který absorbuje přebytečnou vlhkost z minipařníku je možné dosáhnout zvýšení přežití převáděných rostlin přímo z perlitu.

Dopěstování linií z *in vitro* selekcí

Důležitá hodnotící část pro úspěšnost aklimatizační fáze je reprodukce schopnost linií. Pěstování do semenného stavu je možné v kontrolovaných podmínkách růstu (např. pěstírna) nebo ve skleníku. Ve skleníkových podmínkách lze získat následující generaci (přesev semen). **Reprodukce schopnost je závislá na genotypu (Tabulky 3, 4, 5)**. Můžeme získat například potomstvo *in vitro* selektovaných linií s cílem dalšího výběru na základě selekčního znaku a pro namnožení s cílem dalšího šlechtění. Reprodukce semen v druhé generaci po přesevu je vyšší a dává nám možnost výběru. Pokud se vyskytne somaklonální variabilita popřípadě mutace, můžeme ji dobře popsat ve skleníkových podmínkách.

Tabulka 3. Počet semen získaných z *in vitro* potomstva linií dlouhodobě kultivovaných na zvýšené koncentraci Zn v médiu (100 mg/l) a potomstvo získané přesevem osiva v skleníkových podmínkách.

Genotyp	Počet rostlin v pěstírně	Počet lusků/počet semen	Počet semen na lusk	Přesev ve skleníku – počet rostlin	Počet lusků/počet semen	Počet semen/lusk	
P5	<i>P. dinocarpum</i>	3	20 / 36	1,8	6	29 / 85	2,9
P11	<i>P. mesomelan</i>	13	25 / 87	3,5	5	23 / 151	6,5
P12	<i>P. abyssinicum</i>	1	4 / 7	1,8	5	8 / 30	3,7
P7	<i>P. koernickei</i>	4	20 / 44	2,2			
P8	<i>P. thebaicum</i>	4	53 / 49	0,9			

Tabulka 4. Počet semen získaných z *in vitro* potomstva získaných cestou *in vitro* graftingu planých druhů a dlouhodobých kultur šlechtitelských linií z PEG a NaCl *in vitro* selekce .

in vitro grafting planých druhů			
Genotyp		Počet lusků/počet semen	Počet semen na lusk
P10	<i>P. nigroumbilicatum</i>	4 / 24	6,0
P13	<i>P. fulvum</i>	5 / 7	1,4
PEG a NaCl			
Genotyp		Počet lusků/počet semen	Počet semen na lusk
W1	lpa 1-150-81 mutant	1 / 2	0,5
W2	lpa 1-2347-144 mutant	4 / 5	1,3
W3	AGT 3LM mutant	11 / 23	2,1
W4	AGT 3 Lwt	6 / 7	1,2
W5	AGT 1LM mutant	4 / 5	1,3

Tabulka 5. Počet semen získaných z *in vitro* potomstva F2 hybridních linií č.6 a č.8.

Genotyp		Typ	Počet lusků/počet semen	Počet semen na lusk
F2 č.6	<i>P. sativum</i> LG Aspen x <i>P. ssp. glaucospermum</i>	úponky	2 / 4	2,0
F2 č.8	<i>P. ssp. balticum</i> x <i>P. ssp. pseudoroeseum</i>	1A	6 / 9	1,5
		1B	2 / 3	1,5
		1C	18 / 29	1,6
		2A	29 / 50	1,7
		2B	12 / 27	2,3
		2C	15 / 23	1,5

Schopnost produkce semen a jejich počet na lusk je genotypově závislý. Jedná se především o mohutnost rostlin a vytvoření plodných výhonů, které spolurozhodují o výnosu semen na rostlině. V podmínkách dopěstování rostlin regenerovaných z *in vitro* podmínek se vždy očekává nižší výnos, než je tomu ve skleníkových podmínkách při přesevu semenného potomstva. Nicméně, lze i u vzácných materiálů v případě selektovaných nebo hybridních materiálů s ohledem na úspěšnou aklimatizační fázi získat početné potomstvo. Obvykle průměrný počet semen kolísá mezi 1–2 semeny na lusk.

Závěr

Funkční vzorek „Definování způsobu převodu rostlin *ex vitro*“ byl připraven na základě znalostí získaných při řešení navržených aktivit, jež jsou součástí projektu TH03030050. Podařilo se vytvořit nové způsoby převodů rostlin z *in vitro* do *ex vitro* a zajistit zvýšení přežití

u některých vzácných genotypů hrachu. Úspěšnost použití zvolených kombinovaných přístupů je genotypově závislá, ale aplikovatelná na další rostlinné druhy.

Uživateli výsledku budou šlechtitelé, Agritec s.r.o., SEMO a.s. Smržice, SELGEN CZ a.s., případně další zájemci (Genová banka apod.). Procesně spojené výstupy z projektu TH03030050, umožní rozšířit biotechnologické aplikace šlechtění hrachu a využít celý proces i pro udržování genových zdrojů hrachu formou *in vitro* genové banky.

Literatura

Barbulova a Chiurazzi v Márquez (2005): A procedure for *Lotus japonicus in vitro* nodulation studies. In: Ed. AJ Marquez: Lotus japonicus handbook. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15: 473–497.

Jana Šedivá, Marie Greplová, Iva Smýkalová: Creation of new genotypes of peas with the use of wild species and biotechnological methods In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 14Th Quadrennial Congress of the IAPB, Dublin, Ireland 19th-28th August 2018, Congress Abstract Issue, Springer vol. 54 pp. 62-63, **2018**, ISSN 1054-5476, <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9927-9>

Smýkalová I., Šedivá J., Greplová M.: In vitro multiplikační protokol planých druhů (forem) hrachu, rod *Pisum*. AGRITEC výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. ISBN 978-80-87360-62-0. 1.vydání, **2019**.

Šedivá J., Greplová M., Smýkalová I., Drahošová H.: Biotechnologické postupy pro rozšíření variability u luskovin. AGRITEC výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. ISBN 978-80-87360-64-4. 1.vydání, **2020**.