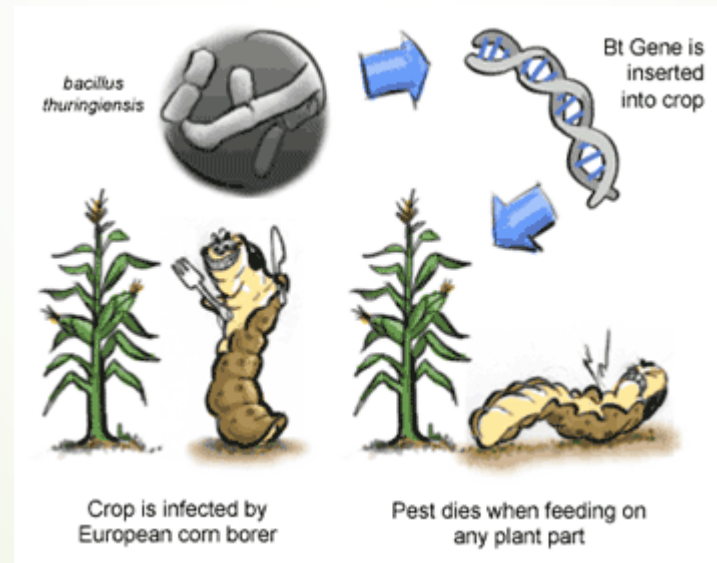


Agronomické využití toxinu *Bacillus thuringiensis*



Bacillus thuringiensis

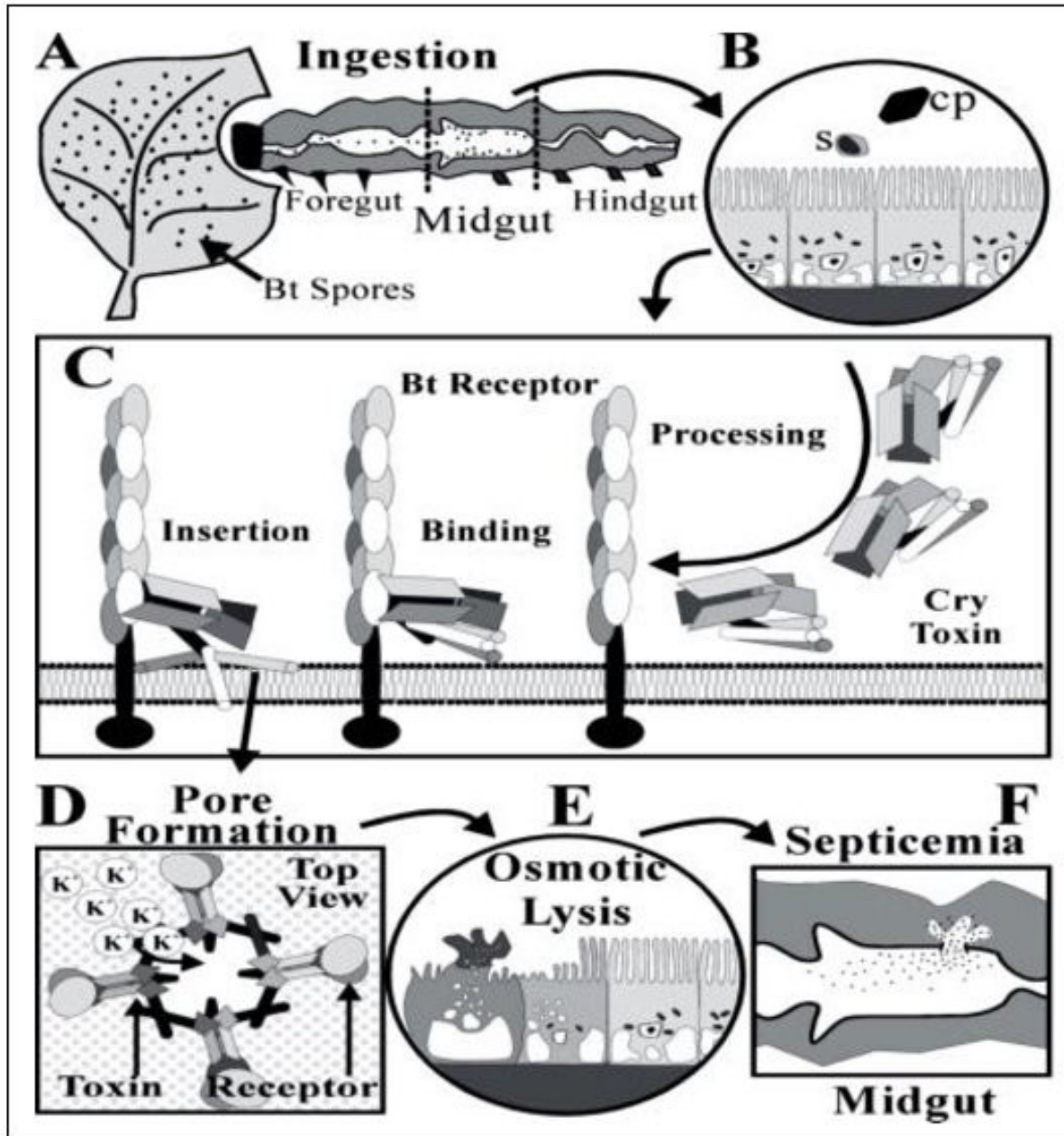
- ▶ v přírodě běžný mikrob = grampozitivní půdní bakterie z kmene *Firmicutes*
- ▶ je aerobní
- ▶ produkuje sporu, která má zachovat rod po dobu nepříznivých podmínek a současně syntetizuje zvláštní bílkovinu, která v buňce vykrytalizuje = bílkovina Cry (dříve δ -endotoxin)
- ▶ specifickým úkolem Cry je velmi výběrově zabít určitý hmyz, který se pak stane zdrojem výživy pro potomky bacila, které vyklíčí ze spor

Paleta kmenů *B. thuringiensis*

- ▶ tisíce kmenů s různou výběrovostí toxického účinku, v mnoha případech omezenou na velmi úzké skupiny hmyzu:
 - ▶ *Lepidoptera* (motýli, můry, moli)
 - ▶ *Diptera* (mouchy)
 - ▶ *Hymenoptera* (vosy, včely)
 - ▶ *Coleoptera* (brouci)
 - ▶ *Nematoda* (háďátka) - jen vzácně
- ▶ toxin *Cry1Ba* s širokým spektrem účinnosti, je spíše výjimkou

Podstata toxicity Cry

- po **pozření krystalu** proteinu se bílkovina **Cry** začne v zažívacím traktu hmyzu rozpouštět
- toxický účinek bílkoviny vzniká až trávicí proteázy **upraví molekuly** odštěpením jednoho nebo obou konců - tím začíná první hrubý výběr oběti, krystal se rozpouští jen za určité kyselosti prostředí (pH)
- larvy motýlů a much mají **silně alkalické prostředí** v zažívací trubici, brouci a jejich larvy **neutrální nebo mírně kyselé** - toxiny působící na prvou skupinu mají ve struktuře převahu **argininu**, pro brouky méně zásaditý **lysin**
- místem účinku upravených peptidů jsou **specifické povrchové receptory na epitelu** hmyzí trávicí trubice – po vazbě peptidu, změní formu své molekuly a v membráně buňky vytvoří otvor, který buňka není schopna zacelit
- důsledkem toho hyne ten, kdo krystal pozřel = hmyzí larva nebo dospělec



Využití toxinu z *Bacillus thuringiensis*

- 70. léta 20. století
- kultury *Bacillus thuringiensis* jako specifický biologický insekticid
- **Agrokombinát Slušovice** - velkoobjemová fermentace kultur a jejich polní použití (postřik plodin)
- obchodní název přípravku **Bathurin**

Využití Bathurinu a boraxu pro kontrolu mravenců *Monomorium pharaonis*

2 možné způsoby boje proti mravencům:

- **biologický**: nástrahy Bathurin v kombinaci s boraxem v koncentraci 1.3% (1. týden borax do mletého masa, další 3 týdny přidávaný Bathurin – opakováno 5x)
- **chemický**: insekticid Anthrix – méně úspěšný

výsledek: biologická cesta pracnější a zdlouhavější, ale mnohem účinnější

Motýl zavíječ kukuřičný

Ostrinia nubilalis

European corn borer

- Kromě jižní Moravy a středních Čech dnes významně škodí ve východních Čechách v oblasti Polabí i v okrese Ústí nad Orlicí
- Na Moravě se zavíječ kukuřičný vyskytuje kromě kukuřičné i po celé oblasti řepařské, především v okresech Prostějov, Vyškov a Kroměříž.



ztráty způsobené tímto škůdcem v České republice se pohybují v průměru kolem 10 až 20 %, ale mohou dosáhnout i 40 %

Motýl zavíječ kukuřičný (*Ostrinia nubilalis*)

- ▶ významný škůdce kukuřice
- ▶ v posledních letech se rozšířil do všech oblastí pěstování kukuřice v ČR, vyhovuje mu vlhké a zároveň teplé prostředí
- ▶ housenky přezimují ve zbytcích stonků a palic na kukuřičném strništi - škodí v porostech kukuřice vyžíráním otvorů a chodeb ve stéblech a palicích - vyvrtané otvory jsou pak vstupní branou pro napadení palic a stonků houbovými chorobami (zejména **fuzariózami** – výskyt **mykotoxinů**), zároveň jsou příčinou lámání stébel
- ▶ kuklí se přibližně ve druhé polovině května a brzy se začínají objevovat první dospělci - nálety probíhají ve vlnách a trvají většinou až do konce srpna
- ▶ způsobuje nejen **ztráty výnosu**, ale i významně **zhoršuje kvalitu produkce**



Technologie ochrany proti zavíječi kukuřičnému

liší se v účinnosti, nákladnosti i možném nepříznivém vlivu na životní prostředí

- **přírozená odolnost**: zajištěná mechanickými a fyziologickými vlastnostmi odrůdy = dosti nízká
- **chemická ochrana**: plošná aplikace insekticidů na porost kukuřice - působí proti dospělcům motýlů nebo mají morforegulační účinky proti vajíčkům nebo larvám
- **biologická ochrana**

Biologická ochrana

1. plošná aplikace přípravku se sporami půdní bakterie *Bacillus thuringiensis* (**Bathurin**)
2. ruční aplikace kapslí **Trichoplus®** obsahujících **chalcidky** - drobné parazitické vosičky rodu *Trichogramma* prodávající svůj vývoj ve vajíčkách motýlů
3. pěstování insekt-rezistentních geneticky modifikovaných **hybridů kukuřice (Bt)**, do jejichž genomu byla genetickou manipulací vnesena část genetické informace půdní bakterie *Bacillus thuringiensis*

Poznámka: Úspěšnost chemické ochrany, postřiku biologickým přípravkem nebo užití chalcidek jsou podmíněny aplikací těchto přípravků **v klíčových momentech rozmnožovacího cyklu** zavíječe, vždy na základě doporučení výrobce přípravku (podle signalizace - aplikace o několik dní dříve nebo později je jen málo účinná či zcela neúčinná)

Transgenní Bt plodiny

- do rostlinného genomu je vložen gen řídící tvorbu toxické části bílkoviny **Cry**
- enzymatické úpravy již nejsou nutné
- je zachována **specifita pro receptory** = Bt plodiny zneškodňují jen určitou skupinu hmyzích škůdců
- Bt kukuřice **MON 810** má přidaný gen pro toxin **cry1Ab** - je proto toxická jen pro larvy motýlů (**zavíječ kukuřičný - *Ostrinia nubilalis***), ale již ne pro brouky, jako je **bázlivec kukuřičný (*Diabrotica virgifera*)**
- toxicitu pro brouky zajistí gen **cry3Bb1** tvořící peptid toxický pro brouky (*Coleoptera*)
- připravují se hybridy transgenních linií kukuřice

Bázlivec kukuřičný

Diabrotica virgifera

larvy žijící v půdě mohou vážně poškodit kořeny kukuřice a způsobit ztráty na výnosu



western corn rootworm



<http://www.eppo.org>

<http://www.vodoley.dn.ua/eng/diabrotica.html>

Bázlivec kukuřičný

Diabrotica virgifera

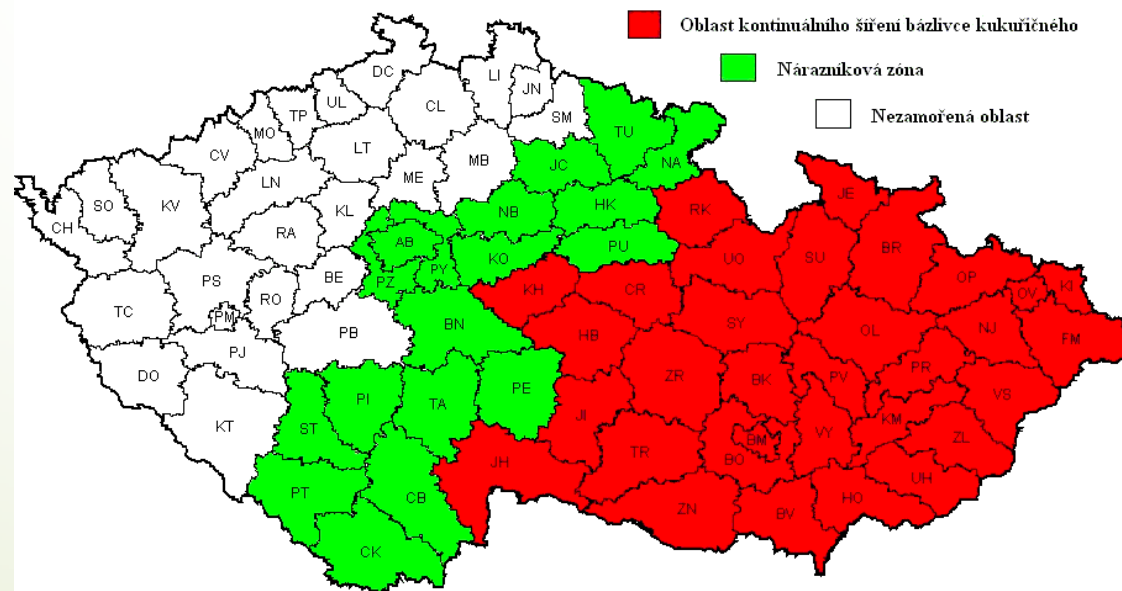
- ▶ jeden z nejvýznamnějších hmyzích škůdců zavlečených posledních padesáti letech do Evropy
- ▶ zavlečen ze Severní Ameriky koncem 20. století
- ▶ prvotní ohnisko v Srbsku – 1992 lokalita Surcin blízko mezinárodního letiště Bělehrad – i jinde pak kolem letišť
- ▶ v České republice poprvé nalezen v Čejči v roce 2002

2010



Zóny vymezené ke zpomalení šíření bázlivce kukuřičného v ČR pro rok 2011

2011



Transgenní Bt plodiny

- rostlina sama toxin produkuje uvnitř svých buněk = **odpadají náklady**
 - na insekticidy
 - výjezdy techniky
 - i starost s načasováním zásahu
- toxin zneškodní i larvu ukrytou uvnitř stonku (při používání insekticidů postřikem ne)
- to že rostlina tvoří "insekticid" ve svých buňkách je v přírodě časté: většina rostlin se podobně tvorbou repelentů brání býložravcům: štiplavé **silice** cibule, **solanin** v bramborech nebo **alyliothiokyanát** křenu, bez černý má proti savcům jed v kůře (**lektin**) - proto jej zajíc neohryže
- přítomnost bílkoviny **Cry** uvnitř buněk **Bt rostliny** je výhodná: hmyz s ní přijde do styku až když "si kousne" a bílkovina přejde do jeho zažívací trubice – tak je definován jako škůdce, protože málokdy označujeme hmyz okusující plodiny za užitečný
- hmyz si na toxin nemůže „zvyknout“ - dokud toxin nereaguje s receptory intestinálních buněk, hmyz o jeho přítomnosti „neví“ (ALE může vzniknout rezistence, podrobnosti v dalších slidech)



Kukuřice (Bt)

- ▶ v EU:
 - ▶ **MON 810 (Bt)** odolná proti napadení zavíječem kukuřičným (Monsanto)
 - ▶ Bt11 – insekticid i herbicid-rezistentní (Syngenta)
 - ▶ 1507 - insekticid i herbicid-rezistentní, syntetický Cry (DuPont)

- ▶ **MON89034 x MON88017** produkuje 3 rozdílné Bt proteiny – 2 proti napadení zavíječem kukuřičným a 1 proti napadení bázlivcem kukuřičným – **na univerzitě ve Würzburgu prokázali, že jejich pyl není toxický pro včely**

Vývoj ploch a počtu pěstitelů GM kukuřice v ČR

<i>Rok</i>	<i>Plocha (ha)</i>	<i>Počet pěstitelů</i>
2005	150	51
2006	1 290	82
2007	5 000	126
2008	8 380	167
2009	6 480	121
2010	4 680	82
2011	5 090	64
2012	3 050	41
2013	2 560	31
2014	1 754	18
2015	997	11
2016	75	1
2017	0	0
2018	0	0

Pramen: Mze.

Tab. Pěstování GM kukuřice v EU (ha)

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018*
Španělsko	53 200	53 670	75 148	79 269	79 706	76 575	97 346	116 307	136 962	131 537	107 749	129 081	124 228	115 246
Portugalsko	780	1 250	4 199	4 856	5 094	4 869	7 724	7 700	8 202	8 542	8 017	7 056	7 307	5 733
ČR	150	1 290	5 000	8 380	6 480	4 677	5 091	3 053	2 561	1 754	997	1	0	0
Polsko	0	100	100	300	3 000	3 500	3 900	4 000	0	0	0	0	0	0
Slovensko	0	930	930	1 930	875	1 281	760	189	100	411	400	112	0	0
Rumunsko	0	331	331	7 146	3 400	822	588	217	834	771	3	0	0	0
Francie	500	22 135	22 135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Německo	340	2 685	2 685	3 171	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CELKEM	54 970	82 391	110 528	105 052	98 555	91 724	115 409	131 466	148 659	143 015	117 166	136 250	131 535	120 979

Pramen: FAS,
ISAAA, MZe,
REA,
Ministerstvo
zemědělství
Španělska.

Pozn: *odhad
kromě ČR, kde
se jedná o
konečný údaj.



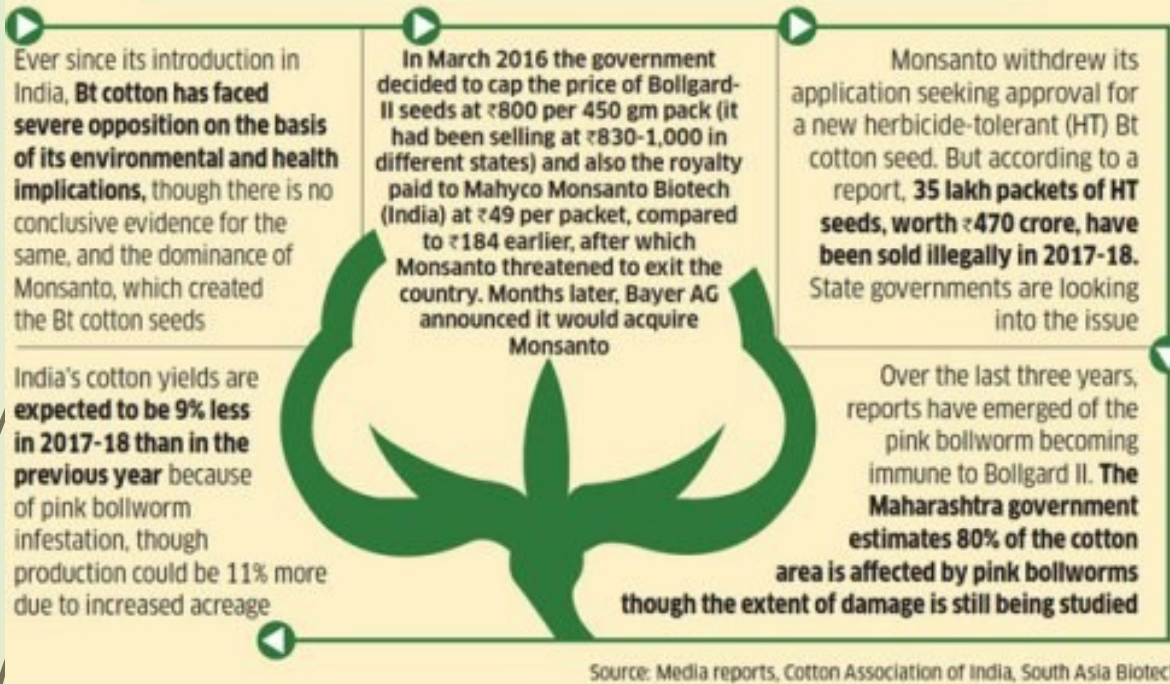
Bt bavlník

- Zavedení Bt plodin znamená značný přínos pro všechny zemědělce, ale zejména pro chudé země v subtropickém pásmu.
- V roce 2017 se pěstovalo 33.1 mil. ha Bt bavlníku (USA, Čína, Indie, JAR, Mexiko, Argentina, Pakistan) – více než 90 % celk. produkce
- Bavlník je obzvláště sužován hmyzími škůdci. Má-li jich být zbaven, musí se použít někdy až 28 postřiků (průměrně 11) chemickým insekticidem – za sezónu se utratí za insekticidy okolo 500 USD na hektar.
- kde na to rolník nemá - má velké ztráty na úrodě
- Když si může koupit insekticid a nikoli však potřebnou techniku, vyvolává jeho nechráněné použití mnoho otrav, dokonce i u dětí.
- Světová zdravotnická organizace (WHO) udává půl milionu případů otrav a z toho pět tisíc úmrtí.



Bavlník v Indii

BT COTTON: MIRED IN CONTROVERSY



- V současnosti ca. 90% bavlníku v Indii je bt bavlník (jediná GM rostlina povolená v Indii)

INDIA IS THE WORLD'S LARGEST PRODUCER OF COTTON

Estimated production in 2016-17 (million tonnes)



Source: International Cotton Advisory Committee, Cotton Association of India

US LEADS THE WORLD IN GM-CROP ADOPTION

Area under GM crops in 2016 (million hectares)



Source: International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications

Současný stav Bt plodin (2017)

247 milionů akrů celkem

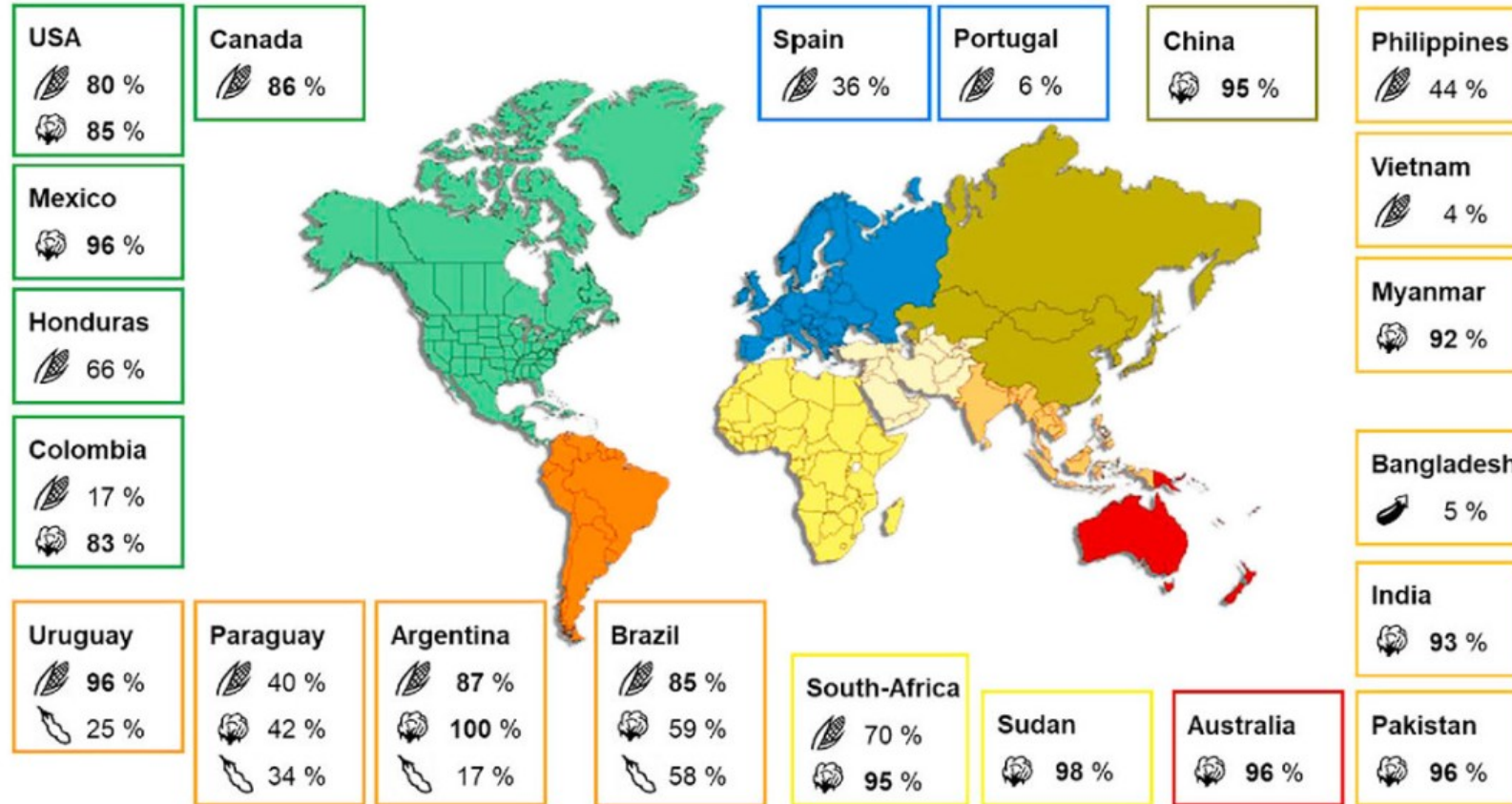


Fig. 1. Global adoption (in %) of GE crops (maize, cotton, soybean, eggplant) with insect-resistance traits (either alone or stacked with HT traits) in 2017 (data source: ISAAA, 2017). Only countries are listed where the biotech crop was grown on > 1000 ha. Adoption levels > 80% are highlighted in bold. In the case of Vietnam and Spain, adoption levels were calculated based on data from the USDA Foreign Agricultural Service (www.fas.usda.gov).



Některé poznatky získané
při pěstování Bt hybridů
v odrůdových pokusech ÚKZÚZ

v letech 2004 až 2006



Registrační zkoušky Bt-hybridů kukuřice

- probíhaly v ČR od roku 2004
- **Bt-hybridy** byly zkoušeny v rámci běžných registračních zkoušek kukuřice
- Zkoušení hybridů kukuřice bylo rozděleno do čtyř samostatných skupin ranosti: velmi raný, raný, středně raný, středně pozdní. Každá skupina byla zkoušena minimálně na čtyřech až šesti lokalitách, zkoušky trvají obvykle 2 - 3 roky.
- Zkoušení bylo organizováno v maloparcelkových pokusech v neúplných blocích typu alfa-design, ve třech opakováních.
- Během vegetace se hodnotily významné hospodářské vlastnosti hybridů, pokus se ukončil sklizní a zjištěním výnosových a kvalitativních ukazatelů.
- Výsledky pokusů (zkoušek užitné hodnoty) byly zpracovány, statisticky vyhodnoceny a slouží ÚKZÚZ jednak jako součást podkladu pro rozhodnutí o registraci a jednak jsou publikovány pro uživatele v praxi.

Přednosti Bt hybridů kukuřice

uplatnění především v oblastech se silným výskytem zavíječe

- stébla a palice nejsou poškozována požerem zavíječe, méně se lámou, déle asimilují, snižují se ztráty při sklizni
- v závislosti na stupni napadení porostu zavíječem mohou dosahovat vyšších výnosů než konvenční hybridy (ve zkouškách ÚKZÚZ byl zjištěn nárůst kolem 10 - 15 %, na lokalitách se silným výskytem zavíječe až 30 %)
- jsou méně napadány fuzariózami palic, lze předpokládat i **nižší obsah mykotoxinů** v produktu (v ČR není registrován žádný fungicidní přípravek účinný proti houbovým chorobám palic kukuřice)
- není potřebná **plošná** neselektivní nebo jen málo selektivní **insekticidní ochrana** proti zavíječi

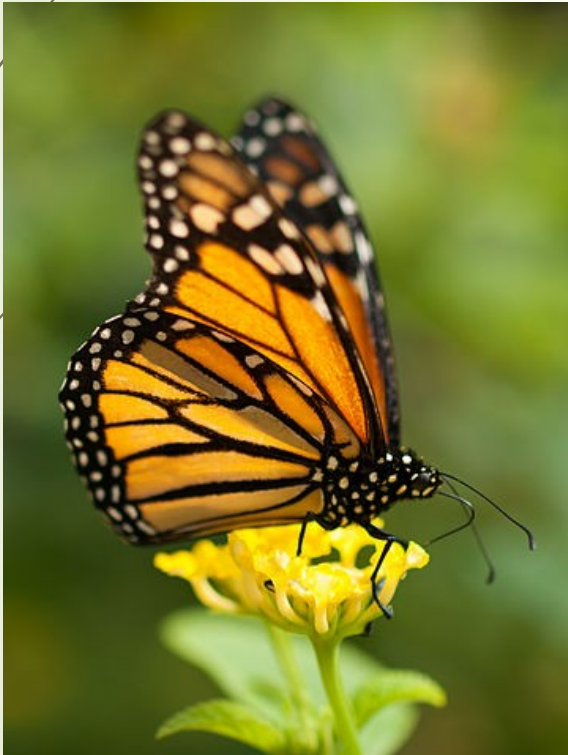
Možná negativa při pěstování Bt hybridů

- ▶ zavíječem nepoškozené rostliny **déle asimilují** a **vegetují** - může se mírně opožďovat dozrávání ve srovnání s konvenčními hybridy stejné kategorie ranosti
- ▶ **vyšší administrativní náročnost** - poskytování informace sousedům a státním orgánům, povinnost dodržování pravidel koexistence, povinnost označovat GM produkt
- ▶ možné **problémy s odbytem** kukuřice nebo s odbytem dalších produktů vzniklých za použití GM produktu

Od roku 2017 není v ČR žádná Bt kukuřice pěstována (ani jiná GM plodina)

Kauza: Bt kukuřice a monarcha stěhovavý

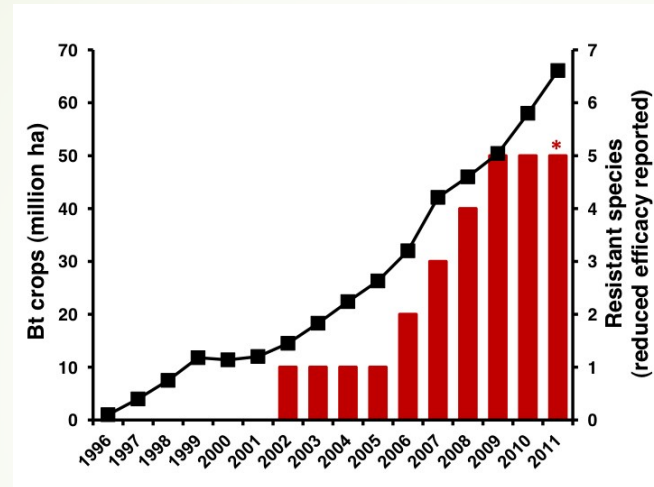
- Larvy motýla se živí pouze rostlinou *Asclepias* (česky klejicha, ang. milkweed)
- Klejicha roste často na polích kukuřice v CA a USA
- Pojídání pylu spadlého z květů kukuřic v době otvírání prašníků



By William Warby

- Losey et al. (1999): **Transgenic pollen harms monarch larvae.** Nature 399:214
- Pouze laboratorní testy toxicity
- pyl většiny hybridů kukuřice obsahuje mnohem méně Bt než zbytek rostliny
- Kontaminace pylu prašníky a jinými částmi rostlinného květu, které obsahují velké množství toxinu
- **Sears et al. (2001): Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations: A risk assessment.** PNAS 98 (21): 11937-11942.
- Kombinace laboratorních i polních testů, zvážení ostatních faktorů
 - pyl jen určitou část roku, rozmnožovací sezóna motýlů je delší
 - Poměr nezemědělských porostů vs. zemědělských porostů (larvy se neživí jen na kukuřičných polích...)
 - Pyl kukuřice přenášen do malé vzdálenosti – snižování koncentrace mimo pole kukuřice ...

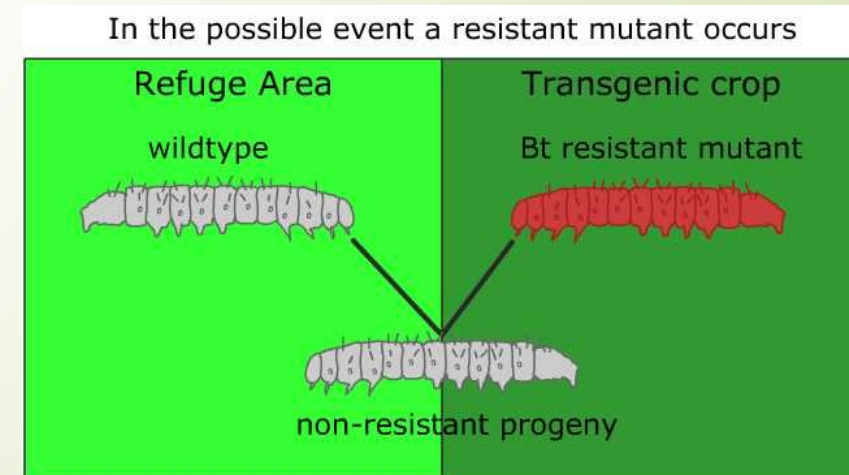
Obavy z rezistence hmyzu



By 2011, the area planted worldwide to genetically engineered Bt corn and Bt cotton increased to 66 million hectares (160 million acres) and the number of pest species with resistance causing reducing efficacy of Bt crops climbed to five. The asterisk indicates the number of resistant pests could be underestimated for 2011 because reports of field-evolved resistance typically are published two or more years after resistance is first detected. Image courtesy of *Nature Biotechnology*

Read more at: <https://phys.org/news/2013-06-pests-resistant-gm-crops.html#jCp>

Nutnost dodržování bezpečnostních agronomických postupů - tzv. **refugia** – kolem GMO plodin se pěstují nemodifikované rostliny – hmyz s odolností vůči toxinu se kříží s hmyzem z těchto refugií, čímž odolnost zanikne (recesivní znak)






Herbucid tolerantní plodiny



Roundup System




Herbicid tolerantní plodiny

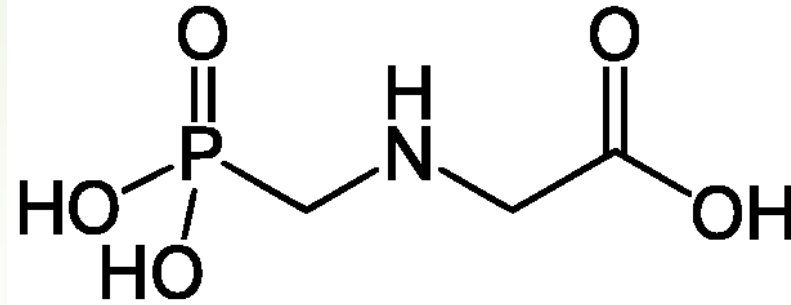
- 
- ▶ transgenní plodiny tolerující **nespecifické herbicidy** (HTP)
 - ▶ jejich použití je z hlediska ochrany rostlin složitější - umožňují získat prakticky čistou monokulturu = kritika z hlediska biologické rozmanitosti
 - ▶ rizikem je **vznik plevelů tolerujících herbicid** podobně jako transgenní plodina - mohou vznikat jak přirozenými mutacemi, tak přímým přenosem transgenu podmiňujícího necitlivost (v případě křížitelnosti a vzniku plodného potomstva) – u nás je rizikem řepka



Herbicid tolerantní plodiny

- Roundup Ready sója pěstovaná od roku 1996
 - Roundup Ready 2 Yields - výnosy významně vyšší
= povolena v 10 zemích: USA, Austrálii, Kanadě,
Číně, Japonsku, Mexiku, Novém Zélandu,
Filipínách, Tchajwanu
 - od 2008 i v Evropské unii
- 

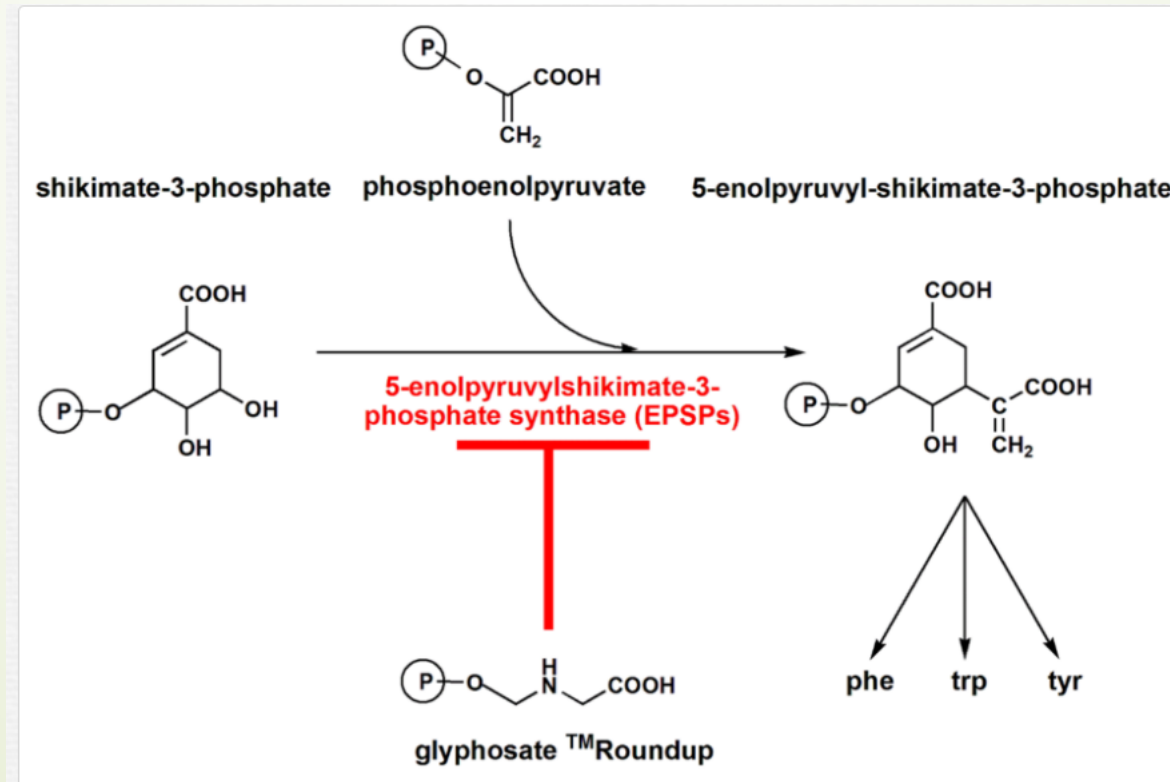
Roundup



- širokospektrý herbicid, firma Monsanto
- účinnou látkou je glyfosát (analog glycinu)
- je absorbován listy a přenášen do rostoucích pletiv (meristémů)
- funguje jako inhibitor enzymů, které fungují v syntéze aromatických aminokyselin (tyrosin, tryptofan, fenylalanin)

Roundup

- ▶ Glyfosát působí na vazebném místě fosfoenol-pyruvátu
- ▶ „RoundupReady“ systém představuje stabilní gen, který zabraňuje vazbu glyfosátu a tak umožňuje tvorbu esenciálních aromatických aminokyselin





Roundup

- ▶ tato chemická cesta není u zvířat (musí aromatické aminokyseliny získávat z jídla)
- ▶ ovlivňuje některé živočišné enzymy
- ▶ hodnocen jako velmi málo toxický, nekarcinogenní, neteratogenní
- ▶ ale evidovány případy kontaktního popálení u pracovníků na farmách



Degradace v prostředí

- ▶ při kontaktu s půdou se glyfosát váže na půdní částice a je inaktivován
- ▶ nevázaný glyfosát může být degradován bakteriemi
- ▶ absorpce glyfosátu závisí na typu půdy
 - ▶ poločas rozpadu může být 3 dny (Texas) až 141 dnů (Iowa)
 - ▶ metabolit vzniklý rozpadem glyfosátu byl nalezen v půdě ve Švédsku až po dobu 2 let

Zvýšení spotřeby glyfosátu po zavedení Roundup Ready plodin od r. 1996

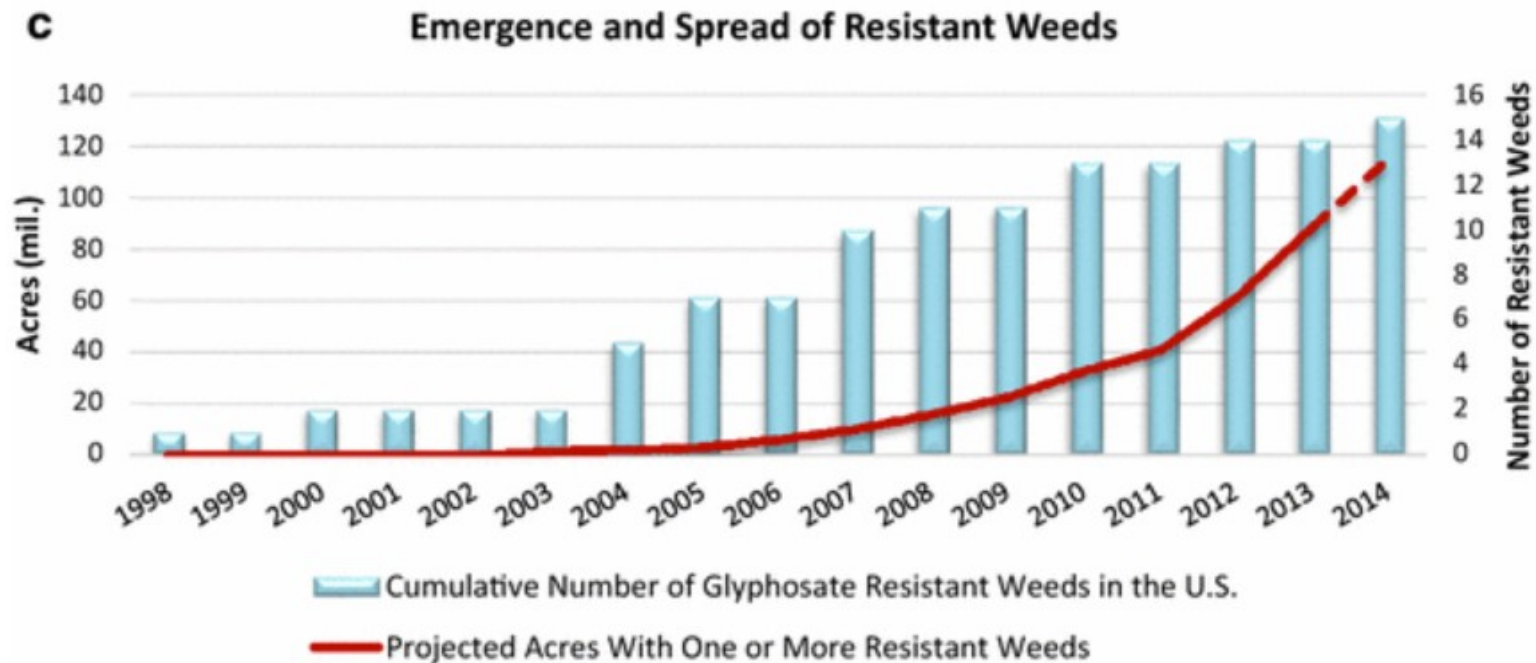
Glyphosate active ingredient use in the United States: 1974–2014

	1974	1982	1990	1995	2000	2005	2010	2012	2014
Glyphosate Use (1000 kg)	635	3538	5761	18,144	44,679	81,506	118,298	118,753	125,384
Agricultural	363	2268	3357	12,474	35,720	71,441	106,963	107,192	113,356
Non-agricultural	272	1270	2404	5670	8958	10,065	11,335	11,562	12,029
Glyphosate use (1000 lb)	1400	7800	12,700	40,000	98,500	179,690	260,804	261,807	276,425
Agricultural	800	5000	7400	27,500	78,750	157,500	235,814	236,318	249,906
Non-agricultural	600	2800	5300	12,500	19,750	22,190	24,989	25,489	26,519
Share agricultural (%)	57.1	64.1	58.3	68.8	79.9	87.7	90.4	90.3	90.4
Share non-agricultural (%)	42.9	35.9	41.7	31.3	20.1	12.3	9.6	9.7	9.6

Data in thousands of kilograms or pounds of glyphosate active ingredient. From the National Agriculture Statistical Service pesticide use data and the Environmental Protection Agency pesticide industry and use reports (1995, 1997, 1999, 2001, 2007). See Additional file 1: Table S18 for details

Source - <http://enveurope.springeropen.com/articles/10.1186/s12302-016-0070-0>


Zvyšování počtu rezistentních plevelů



As of March 2017, there are now 37 weeds that have developed resistance to glyphosate (6). The team



Stav v EU, ČR a světě (2017)

- ▶ **EU:** Odrůda GA21 (Monsanto) – obch. název **Roundup Ready™ Maize, Agrisure™GT** a někteří hybridy (např. **Bt11 x GA21**)
 - ▶ **V ČR oprávnění zaniklo 2011**
- 

HT plodiny 2017

Plodina	Země
Alfalfa	<i>Argentina, Australia, Canada, Japan, Mexico, New Zealand, Philippines, Singapore, South Korea, USA</i>
Argentine Canola	<i>Australia, Canada, Chile, China, EU, Japan, Malaysia, Mexico, New Zealand, Philippines, Singapore, South Africa, South Korea, Taiwan, USA</i>
Carnation	<i>Australia, Colombia, EU, Malaysia</i>
Chicory	<i>USA</i>
Cotton	<i>Argentina, Australia, Brazil, Canada, China, Colombia, Costa Rica, EU, Japan, Malaysia, Mexico, New Zealand, Paraguay, Philippines, Singapore, South Africa, South Korea, Taiwan, USA</i>
Creeping bentgrass	<i>USA</i>
Flax, Linseed	<i>Canada, Colombia, USA</i>
Maize	<i>Argentina, Australia, Brazil, Canada, China, Colombia, Cuba, EU, Honduras, Indonesia, Japan, Malaysia, Mexico, New Zealand, Pakistan, Panama, Paraguay, Philippines, Russian Federation, Singapore, South Africa, South Korea, Switzerland, Taiwan, Thailand, Turkey, USA, Uruguay, Vietnam, Zambia</i>
Polish Canola	<i>Canada</i>
Potato	<i>Australia, Canada, Japan, Mexico, New Zealand, Philippines, South Korea, USA</i>
Rice	<i>Australia, Canada, Colombia, Honduras, Mexico, New Zealand, Philippines, Russian Federation, South Africa, USA</i>
Soybean	<i>Argentina, Australia, Bolivia, Brazil, Canada, Chile, China, Colombia, Costa Rica, EU, India, Indonesia, Japan, Malaysia, Mexico, New Zealand, Paraguay, Philippines, Russian Federation, Singapore, South Africa, South Korea, Switzerland, Taiwan, Thailand, Turkey, USA, Uruguay, Vietnam</i>
Sugar beet	<i>Australia, Canada, China, Colombia, EU, Japan, Mexico, New Zealand, Philippines, Russian Federation, Singapore, South Korea, Taiwan, USA</i>
Tobacco	<i>EU</i>
Wheat	<i>Australia, Colombia, New Zealand, USA</i>

From 1996 to 2017, HT crops consistently occupied the largest planting area of biotech crops. In 2017 alone, HT crops occupied 88.7 million hectares or **47% of the 189.8 million hectares of biotech crops planted globally**. The most common are the glyphosate and glufosinate tolerant varieties. The following table shows countries that have approved major HT (with single and stacked genes) crops for food, feed, and/or cultivation.