



Soubor laboratorních in vitro biotestů pro testování bioaktivních látek z mikrořas

certifikovaná metodika

Autorský kolektiv

Ing. Iva Smýkalová, Ph.D., RNDr. Aleš Soukup, Mgr. Eliška Ondráčková,
RNDr. Radoslava Matúšová, Ph.D., Mgr. Pavel Hrouzek, Ph.D.

Šumperk
AGRITEC
2016

Soubor laboratorních testů pro testování bioaktivních látek z mikrořas

Certifikovaná metodika byla vypracována s podporou grantu MŠMT, č. LD14101.

Autoři:

Iva Smýkalová, Agritec Plant Research s.r.o., Šumperk

(smykalova@agritec.cz)

Aleš Soukup, PřF UK, Praha

Eliška Ondráčková, Agritec Plant Research s.r.o., Šumperk

Radoslava Matúšová, SAV, Nitra

Pavel Hrouzek, ALGATECH MbÚ, Třeboň

Oponenti:

Ing. Jana Šedivá, Ph.D. (sediva@vukoz.cz)

Odbor Fytoenergetiky a biodiverzity, Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví v.v.i., Květnové náměstí 391, Průhonice, 252 43

Ing. Rostislav Václav Němejc, Ph.D. (Rostislav.Nemejc@ukzuz.cz)

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení rostlinolékařské inspekce Brno, Pracoviště kontroly přípravků na ochranu rostlin Vsetín

4. května 287, 755 01 Vsetín

Vydal: Agritec Plant Research s.r.o. v nakladatelství AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk, 2016.

1. vydání.

www.agritec.cz

© AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby s.r.o., Šumperk 2016

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 osobu uvedenou výše.

ISBN 978-80-87360-48-4

OBSAH

1	ÚVOD	4
1.1	Cíl metodiky.....	4
1.2	Srovnání novosti postupů.....	4
1.3	Dedikace	4
1.4	Popis uplatnění certifikované metodiky.....	5
1.5	Ekonomické aspekty.....	5
2	POPIS metodiky	6
2.1	Příprava biomasy a extraktů z mikrořas	6
2.1.1	Kultivace mikrořas v kultivačních systémech, produkce biomasy.....	6
2.1.2	Zpracování biomasy mikrořas a příprava extraktů pro biotesty	7
2.2	Popis <i>in vitro</i> biotestů.....	9
2.2.1	Zásady práce ve sterilních podmínkách	9
2.2.2	<i>In vitro</i> kořenový biotest.....	9
2.2.3	Biotest klíčivosti I	11
2.2.4	Biotest klíčivosti II	12
2.2.5	Diskový biotest.....	13
2.2.6	Vsádkové (batch) testy	15
3	Seznam použité související literatury.....	16
4	Seznam publikací, které předcházely metodice.....	16
5	Přílohy	18

1 ÚVOD

U sinic a řas dosud bylo izolováno a charakterizováno více jak 3000 nových chemických struktur představujících nové biologicky aktivní látky, převážně sekundární metabolity. Zejména řada dobře prozkoumaných a identifikovaných látek ze sinic byla již využita v lékařství a farmaceutickém průmyslu. Některé z mikroskopických řas a sinic vykazují fungicidní aktivitu (Hrouzek a kol. 2011). Přesto sinice bezesporu náleží k dosud neprozkoumaným zdrojům přírodních látek. Z ekonomického hlediska extrakty z řas představují významný potenciál v zemědělství (Smýkalová 2016), ačkoliv je v tomto odvětví tento směr použití značně opomíjen. Jedna z možností, jak využít mikrořasy v zemědělství je nalezení kmene mikrořas s potenciálem inhibovat klíčení parazitických rostlin (Matušová a kol. 2004) v přítomnosti hostitelských rostlin. Navíc aplikací mikrořas do půdy může být vytvořen i druhý vedlejší efekt, a to hnojivý účinek mikrořas na plodiny – zvýšení klíčivosti osiva plodin, zvýšení obsahu chlorofylu v listech, zvýšení objemu kořenů a nadzemních částí, zvýšení nasazení plodů, zvýšení proteinů v semenech (Ördög a kol. 2015) a snížení výskytu patogenů (Ondráčková a kol. 2014).

1.1 Cíl metodiky

Cílem metodiky je charakteristika biotestů, které byly vyvinuty nebo modifikovány pro testování biologicky aktivních látek z mikrořas. Jedná se o soubor laboratorních biotestů, které jsou založeny na vzájemné interakci dvou organismů za definovaných podmínek kultivace, nebo růstu. Získané informace jsou vztaženy na problematiku biologické ochrany rostlin, aplikace proti závažným houbovým patogenům, na získání informací o přítomnosti specifických molekul indukujících klíčení semen parazitických rostlin, na zjištění fytotoxického nebo fytostimulačního účinku na rostliny.

1.2 Srovnání novosti postupů

V rámci řešení projektu byly vypracovány nové postupy přípravy extraktů z biomasy mikrořas za účelem aplikace v biotestech na získání informací o bioaktivitě extraktu. Mikrořasy jsou dosud používány v laboratořích na detekci cytotoxicity testovaných látek nebo neznámých roztoků nebo na stanovení přítomnosti mikrořas a sinic ve vodách. Vypracování souboru biotestů přináší nový pohled využití mikrořas jako zdroj bioaktivních látek a jejich potenciálního využití v jejich přirozených podmínkách nebo v zemědělských systémech.

1.3 Dedikace

Metodika byla vypracována za přispění finančních zdrojů čerpaných z Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České Republiky v rámci projektu

LD14101 (COST Action FA1206) „*Studium strigolaktonů a biologicky aktivních látek mikrořas s využitím v oblastech s invazí plevelných a parazitických rostlin*“ (2014–2017), Slovenskej akadémie vied (podpora MVTS pre COST Action FA1206) a projektu NPUI LO1417 (MŠMT) „*Centrum experimentální biologie rostlin UK*“.

1.4 Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena pro vlastní potřebu testování mikrořas pro potřeby dalších pracovišť zabývajících se biotechnologiemi řas a dále pro širokou veřejnost jako zdroj zkušeností s biogenními faktory v zemědělské krajině. Metodika může sloužit jako obecná metodická příručka při hledání bioaktivních látek pocházejících z rostlinných organismů včetně mikrořas.

1.5 Ekonomické aspekty

Výskyt „zelených stop“ na polích charakterizuje výskyt mikrořas a makrořas v půdním prostředí (**Obrázek 1**). Co to znamená pro zemědělství a jaký význam tyto mikrořasy mohou mít z hlediska aplikace prostředků ochrany rostlin, výskytu ostatních organismů nebo stanovení dávkování živin, lze zatím pouze obtížně odhadovat. Souvislost s přehnojováním pozemků a zastoupení půdních mikrořas v povrchovém profilu půdy je dosud opomíjeným aspektem při optimalizaci agrotechniky z pohledu zlepšení půdní mikroflory a úrodnosti. Mikrořasy a sinice mohou plnit v půdě řadu funkcí:

- mají významnou úlohu při udržení úrodnosti;
- zvyšují množství organického uhlíku v půdě a působí jako agens stmelující půdní částice a omezují tak erozi;
- hygrokopické slizy produkované půdními fotosyntetickými organismy zvyšují retenční kapacitu půdy pro vodu;
- napomáhají zvětrávání hornin a uvolňování minerálních látek;
- produkují bioaktivní látky, u kterých lze očekávat přímý vliv na zemědělsky pěstované plodiny a jejich vývoj.

Stanovení dávkování živin s ohledem na výskyt mikrořas a sinic by mohlo omezit vstup chemických hnojiv do půdního prostředí, které by se mohlo mikrobiálně oživit a stát soběstačnejším při pěstování plodin. Inovativní postupy umožňující efektivní a udržitelnou kultivaci i na jinak neúrodných půdách jsou tudíž velmi potřebné. Významné jsou i neekonomické přínosy, zejména podpora biodiverzity, snížení užívání N a P hnojiv (vedoucí ke snížení ekologické zátěže, eutrofizace vodních toků živinami vymytými z půdy, snížení uhlíkové stopy spojené s výrobou a aplikací chemických hnojiv) a snížení používání chemických biocidních látek, jakož i k záchytu CO₂ a zvýšení půdní kapacity zádrže vody.

2 POPIS metodiky

2.1 Příprava biomasy a extraktů z mikrořas

2.1.1 Kultivace mikrořas v kultivačních systémech, produkce biomasy

Testovaný organismus: jednotlivé druhy ze sbírky kmenů mikrořas (na území ČR <http://ccala.butbn.cas.cz/>; <http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup.html>); a další odkazy na mezinárodní algologická pracoviště a sbírky mikrořas a sinic lze nalézt na stránkách <http://www.sinicearasy.cz>).

Produkce biomasy a biologicky aktivních látek: dosažení dostatečného množství biomasy s maximálním a stabilizovaným obsahem biologicky aktivních látek, vzorek biologického materiálu vhodný pro přípravu extraktů (lyofilizovaný).

Hodnocení růstu – parametry: specifická růstová rychlost $\mu=c.\ln 2$ charakterizující exponenciální fázi růstu, nebo stanovení optické hustoty buněk, proměřením absorbance (optické hustoty, OD) řasové suspenze při vlnové délce 750 nm (SPECOL, EK1, Carl Zeiss Jena).

Materiál a pomůcky:

- kmen mikrořas na agarové půdě;
- sterilní sklo, očkovací tyčinka;
- sterilní živné medium v uzavíratelné nádobě;
- kultivační válec s uzavíratelným vstupem pro směs vzduch s CO₂;
- centrifugační nádoby;
- nádoby nebo uzavíratelné sáčky na uchování vzorků, popisovače.

Postup:

Z algologických sbírek jsou vybrány kmeny k testování jejich biologické aktivity. Kmeny mikrořas jsou udržovány na šikmých agarech za konstantních světelných a tepelných podmínek. Při zakládání kultivace mikrořas lze využít různé druhy kultivátorů a jejich výběr se zakládá na účelu, pro který se mikrořasy pěstují. V případě aplikace mikrořas v níže uvedených biotestech lze využít systém kultivačních trubíc s řízeným režimem optimálního růstu pro daný kmen (**Obrazek 2**). Složení kultivačních medií dle zástupců mikrořas je uvedeno v **Tabulce 1**. Sterilní kultivační medium se připravuje do uzavíratelných nádob a zaočkování řasového inokula probíhá ve flowboxu, ve sterilních podmínkách (viz níže, kapitola 2.2.). Z agarové plotny se buněčná kultura kmene mikrořas převede očkovací tyčinkou do menšího objemu živného media ve válci, a uzavře se speciálním uzávěrem s vývody pro cirkulaci směsi CO₂ ve vzduchu (objemové procento 3,4 %). Takto připravený válec se umístí do vodní lázně, kde je nastaven teplotní režim,

odpovídající produkčnímu optimu. Růst buněk probíhá za konstantních kontinuálních světelných podmínek, opět odpovídajících požadavkům kmene a cíle kultivace. Jedná se o produkční systémy, kde je možné kultivovat několik kmenů paralelně v případě podobných požadavků kmenů na růst. V případě jednoduchých testů lze kmeny dočasně pěstovat v Erlenmayerových baňkách na třepače (cca 80 rpm). Kmeny se často vyznačují rozdílnou růstovou charakteristikou a tím je ovlivněna doba kultivace v kultivatorech. Většina kmenů má v umělých kultivacích definovanou stacionární fázi, kdy je dosaženo maximální produkce biomasy, která může být odlišná od fáze maximální produkce biologicky aktivních látek. Pro biotesty se musí počítat i s těmito důležitými faktory. Optimalizace kultivačních podmínek je nesporně důležitým aspektem, který může ovlivnit celý výsledek biotestu. Sklizeň biomasy probíhá s použitím centrifugace k oddělení biomasy buněk a vyčerpaného kultivačního media. Otáčky se řídí vlastnostmi produkované biomasy, některé kmeny mají vysoký podíl lipidických látek, je nutné zvýšit otáčky z 3000 na 5000 rpm, (5 minut). Pro biotesty se použije biomasa čerstvá, nebo se biomasa zamrazí (−80 °C) a lyofilizuje (př. Lyovac GT2, Leybold Hereaus). Pro biotesty se dá použít rovněž vyčerpané odpadní medium, které je v případě mikrořas bohaté na biologicky aktivní látky a opět se dá zpracovat centrifugací a lyofilizací. Všechny vzorky jsou uchovány do doby jejich dalšího zpracování při teplotě −20 °C.

2.1.2 Zpracování biomasy mikrořas a příprava extraktů pro biotesty

Testovaný materiál: biomasa kmene mikrořas nebo kultivační medium, čerstvé nebo lyofilizované.

Příprava extraktů: použití extrakčních činidel (organická rozpouštědla) a postup extrakce a ředění, hodnocení účinnosti v biotestech.

Materiál a pomůcky:

- organická rozpouštědla (70% metanol, 100% aceton, 100% etyl-acetát);
- třecí skleněná nebo porcelánová miska s tloučkem;
- jemný křemičitý písek (5–15 nm, Silica, Sigma-Aldrich Inc.);
- mikropipety se špičkami (100, 1000 a 5000 µl);
- centrifugační kyvety a skleněné zaklapávací vialky na uchování hrubých extraktů;
- centrifuga, evaporátor nebo vakuová vývěva;
- silikonová kolonka C18 (3 ml) pro zakoncentrování vzorků (př. DSC18, Supelco, Sigma-Aldrich Inc.);
- mikrozkmavky typu Eppendorf (tzv. Eppendorfky) 1.5–2 ml, Erlenmayerovy nádoby;
- sterilní destilovaná voda.

Postup:

Pro získání hrubého extraktu z mikrořas se stanoví navážka nebo objem vzorku. Vzorek se umístí do třecí misky, přidá se malé množství jemného křemičitého písku (na špičku navažovací lžičky), přidá se objem 3 ml organického rozpouštědla a vzorek (cca 200–1000 mg) se tře do získání homogenátu, který se převede do skleněné centrifugační kyvety a nechá se stát 20 minut, poté se použije Vortex k homogenizování vzorku, před centrifugací (3 500–5 000 rpm, 5 min). Supernatant (první část hrubého extraktu) se opatrně převede do čisté skleněné nádoby s uzávěrem (požadovaný celkový objem nádoby je přibližně 10 ml). Na zbylý sediment se nanese opět objem 3 ml organického rozpouštědla, homogenizuje se Vortexem a nechá se opět stát při pokojové teplotě 20 minut. Při reextrakci se postupuje shodně, získá se druhá část hrubého extraktu a oba díly se spojí a uchovají do doby dalšího zpracování ve skleněných uzavíratelných nádobkách při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. V případě získání látek z odpadních medií se přistupuje k zakoncentrování a separaci biologicky aktivních látek na DSC18 kolonkách nebo silikonových náplních s filtry. Získaný eluát (promytí kolonky požadovaným organickým rozpouštědlem a objemu 500 nebo 1000 μl) se uchová ve skleněných zaklapávacích vialkách při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tímto způsobem se může přefiltrovat až 1500 ml odpadního media v závislosti na obsahu odpadních a biologicky aktivních látek.

Vzorky hrubých extraktů se dále upravují v závislosti na aplikovaném biotestu. Obecně se dá postupovat tak, že se odebere objemový aliquot (500, 1 000 μl) do skleněné vialky bez víčka a nechá se odpařit na vakuové vývěvě nebo odparce do odpaření rozpouštědla. Po odpaření se vzorky opět mohou uchovat při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Těsně před aplikací extraktů v biotestech se odparek resuspenduje do požadovaného objemu rozpouštědla, menšího než byl výchozí objem (např. 100 μl), tj. dojde k zakoncentrování vzorku a biologicky aktivních látek obsažených v hrubém extraktu. Takto zakoncentrovaný hrubý extrakt se může přímo použít anebo se může ředit sterilní destilovanou vodou (např. v poměru 1:9, tj. zakoncentrovaný hrubý extrakt: sterilní destilovaná voda a toto ředění se může dále opakovat), zejména u biotestů, kde testovaný materiál může být citlivý na přítomnost organického rozpouštědla a mohl by negativně ovlivnit průběh biotestu.

Obrázek 3. ukazuje postupné kroky přípravy hrubého extraktu a vzhled odpařeného vzorku objemového aliquotu hrubého extraktu. V závislosti na kmenu mikrořasy se mohou vzorky od sebe značně barevně lišit. Dochází k současné extrakci pigmentů.

2.2 Popis *in vitro* biotestů

Tabulka 2 uvádí použité biotesty pro získávání informací o přítomnosti biologicky aktivních látek v mikrořasách. Jedná se o soubor jednoduchých testů s využitím jiných živých organismů a jsou často vyhodnocované pouhým pozorováním, fotodokumentací s následnou analýzou obrazu nebo stanovením základních růstových parametrů jako je stanovení čerstvé a suché hmotnosti. Proto jsou tyto biotesty použitelné pro širší uživatelské prostředí. Jedná se rovněž o biotesty, které vyžadují práci ve sterilních podmínkách.

2.2.1 Zásady práce ve sterilních podmínkách

Pro získání sterilního rostlinného materiálu je nutné dodržovat zásady práce ve sterilních podmínkách, a proto veškerá manipulace probíhá ve sterilních kabinetech (laminární boxy), kde je zaručen sterilní provoz a používají se sterilní nástroje (pinzety, skalpely, nůžky, jehly, špičky a nádoby). Sklo a kovové nástroje jsou sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru (180 °C, 20 min); sklo, plast, media či další pomůcky jsou sterilizovány autoklávováním (15 min, 121 °C, 120 kPa). Pro povrchovou sterilizaci rostlinného materiálu se používají sterilizační činidla (zpravidla na bázi chlornanů) v kombinaci se smáčedly a sterilní destilovaná voda k odstranění zbytků detergentu. K přípravě kultivačního média se používají chemikálie v čistotě p.a. vhodné pro tkáňové kultury (produkty firem Duchefa, Sigma–Aldrich atd.) a destilovaná nebo deionizovaná voda. Agar nebo jiná gelující složka se v destilované vodě rozvaří v mikrovlnné troubě. Připravená media lze krátkodobě uskladnit v chladničce při teplotě 4 °C do doby jejich použití.

2.2.2 *In vitro* kořenový biotest

Testovaný organismus: *Arabidopsis thaliana* (př. ekotyp Columbia-0, Col-0).

Fotodokumentace: Petriho misky s klíčenci *A. thaliana* jsou oskenovány na stolním skeneru (př. Epson perfection V750 pro). Pro snímání je vhodné použít standardizované nastavení skeneru (Gamma, doba expozice, nastavení minima a maxima, doporučené rozlišení 1 200 DPI) po celou dobu skenování všech obrazů, umožňující posléze dávkové zpracování obrazu. Obrazy jsou uloženy ve formátu TIFF, 48 bit, 1 200 DPI.

Vyhodnocení bioaktivity: kvantifikace působení aplikované látky na rozvoj kořenového systému prostřednictvím digitálního vyhodnocení obrazu (př. NIS-ELEMENTS vers. 3.22., 64 bit., LIM Praha).

Parametry hodnocení: délka a počet kořenů různého typu (primární a postranní), celková délka kořenového systému, ošetřená varianta je porovnána s negativní

kontrolou (základní živné medium s přidáním odpovídajícího množství organického rozpouštědla, např. acetonu).

Materiál a pomůcky:

- spotřební plasty (špičky, Eppendorfy), sterilní destilovaná voda, sterilizační roztok;
- sterilní kultivační Petriho misky (př. 120 × 120 mm);
- sterilní jehly a pinzeta;
- kultivační medium v autoklávovatelných lahvích;
- popisovače;
- páska na uzavření Petriho misek (např. Omnipor 3M);
- lednice nebo chladicí box (4–6 °C);
- kultivační místnost (22 ± 1 °C, osvětlení 250 μmol.m⁻².s⁻¹, cirkadiální rytmus 8/16h);
- stojan na Petriho misky.

Postup:

Semena *Arabidopsis thaliana* Col-0 se povrchově vysterilizují 10% roztokem chlornanu sodného s detergentem Tween20 (0,2 % v/v) za občasného promíchání po dobu 3 minut. Zbytky sterilizačního roztoku jsou pečlivě odstraněny sterilní destilovanou vodou (3×). Sterilní semena se ponechají v poslední vodě, při teplotě 4 °C po dobu 2–3 dnů (jarovizace) pro indukci a synchronizaci klíčení. Je rovněž možné semena po sterilizaci rovnou vysít na agarové plotny a jarovizovat.

Dále se připraví kultivační MS medium (Murashige a Skoog, 1962), složení je uvedeno v **Tabulce 3**. Základní složení je pro testované extrakty rozděleno na požadované objemy. Pro každou Petriho misku, kde je možné pěstovat 6–8 rostlin, je připraven objem 70 ml media. Dostatečné a stálé množství media v misce je podmínkou srovnatelného růstu na jednotlivých miskách. Po dosažení dostatečného počtu opakování a následné statistické zpracování je vhodné volit 12–16 rostlin (2 misky na variantu). Medium je sterilizováno autoklávováním (viz výše).

Po zchlazení připraveného media na 60 °C, před nalitím media do Petriho misek, jsou přidány extrakty z mikrořas, které se připraví takto: suchý extrakt ve skleněné zaklapávací vialce (10 ml) se rozpustí ve 200 μl 100% acetonu p.a., z tohoto extraktu se do sterilní Eppendorfy (1,5–2 ml) odebere 100 μl a naředí se sterilní destilovanou vodou na konečný objem 1 000 μl, tento naředěný vzorek se celý přidá k mediu (150 ml), homogenizuje se protřepáním a z tohoto objemu media se nalijí 2 Petriho misky. Kontrolní vzorek je medium s čistým acetonem naředěným ve stejném objemu jako vzorky (100 μl acetonu + 900 μl H₂O na 150 ml

media). Pro výsev semen na připravené plotny je vhodné použít šablonu, aby rostlinky vyrůstaly ve stejné vzdálenosti od sebe. Výsev se provádí mikropipetou s odřezaným koncem špiček (zabraňuje ucpání) v kapce vody. Petriho misky se umístí do stojanů se sklonem cca 45° a přenesou se do kultivačních místností. Vyhodnocení klíčenců probíhá po 8, 12 a 14 dnech.

Vyhodnocení kořenového biotestu ilustruje **Tabulka 4**.

2.2.3 Biotest klíčivosti I

Testovaný organismus: jarní ječmen (*Hordeum vulgare* L.), odrůda př. Pribina, izolát fytopatogenních hub př. *Rhizoctonia solani* nebo *Sclerotinia sclerotiorum*.

Vyhodnocení bioaktivity: inhibice nebo stimulace klíčení, v případě infekčních biotestů i protihoubové aktivity.

Parametry hodnocení: délka nadzemních částí a kořenů (cm); čerstvá a suchá hmotnost (g); vzhled (fotodokumentace), porovnání s kontrolou (destilovaná voda).

Materiál a pomůcky:

- skleněné nebo plastové kultivační Petriho misky (Ø 9 cm);
- výseky z filtračního papíru (Ø 9 cm), destilovaná voda;
- kultivační místnost (22 ± 1 °C);
- kalibrované měřítko;
- laboratorní váhy, psací potřeby, fotoaparát, sušárna.

Postup:

Do čistých v sušárně vysušených skleněných Petriho misek se položí 2 výseky filtračního papíru, na který se aplikuje ředěný extrakt z řas (1 000 µl) a nechá se odpařit při laboratorní teplotě, na filtrační papíry se rovnoměrně rozloží obilky ječmene (10–30 obilek) a přidá se 10 ml destilované vody. Biotest probíhá nesterilně, se zavřenými víčky Petriho misek a ve třech opakováních. Kultivace probíhá za konstantních tepelných a světelných podmínek (19–22 °C), kontroluje se vlhkost, v případě potřeby se přidává destilovaná voda a poznamenává se přidávaný objem.

Příprava extraktu z mikrořas je dána cílem testování, nejlépe opět v ředěné formě 1 : 9 (hrubý extrakt:destilovaná voda, př. 100 µl : 900 µl). Infekce obilky houbovým izolátem (obalení vyzrálým myceliem) ještě před aplikací extraktu probíhá 3 dny ve tmě a vyhodnocení růstových parametrů klíčenců po 7, 10 dnech působení extraktu z mikrořas. Vyhodnocení délky nadzemních částí a kořenů měřením jejich délky (v cm), rozdělení nadzemních částí a kořenů, zvážení čerstvé hmotnosti se provádí odděleně pro každou rostlinu. Získané vzorky se umístí do sušárny (80 °C, 24 h), poté se zváží sušina a experiment se vyhodnotí. Vzhled

klíčenců ječmene po 10 dnech kultivace a výsledky získaných hodnot růstových parametrů jsou uvedeny na **Obrázku 4**. V případě fytoxicity extraktů může docházet k deformacím klíčenců, např. tloustnutí kořenových krčků, inhibice růstu postranních kořenů, tvorba nekrotických a chlorotických pletiv apod.

2.2.4 Biotest klíčivosti II

Testovaný organismus: *Striga* sp., *Phelipanche* sp.

Vyhodnocení bioaktivity: specifická biostimulace klíčení

Parametr hodnocení: stanovení procenta klíčivosti semen z celkového počtu ošetřených semen, porovnání mezi ošetřenou variantou mikrořasami a pozitivní kontrolou (syntetický analog strigolaktonů GR24, Strigolab, Turín, Itálie) a negativní kontrolou (sterilní destilovaná voda a použité organické rozpouštědlo).

Materiál a pomůcky:

- sterilní destilovaná voda, sterilizační chemikálie (viz postup);
- sterilní plastové kultivační Petriho misky (Ø 9 cm);
- sterilní filtrační papíry, kulaté výseky a kruhy;
- sterilní disky ze skleněných mikrovláken (př. MN GF Ø 21 mm, Macherey-Nagel, Düren, Německo);
- mikropipety a sterilní špičky (1 000 a 100 µl);
- nádoba s lihem;
- sterilní pinzety;
- popisovače;
- izolační páska (př. parafilm);
- termostat (21 ±1 °C pro semena rodů *Phelipanche* nebo *Orobancha*, 30 ±1 °C pro semena druhu *Striga hermonthica*);
- stereoskopický mikroskop (binolupa).

Postup:

Pracujeme v laboratoři i ve sterilním flowboxu se semeny parazitických rostlin. Nejprve semena zbavíme případných nečistot pečlivým vyčištěním na čistém bílém papíru. Velikost tmavě hnědých semen je 0,2–0,4 mm v závislosti na druhu parazitické rostliny. Při manipulaci se semeny parazitických rostlin v laboratořích je nutné dodržovat pravidla zacházení s parazitickými organismy, tj. pomůcky a plast, které přišly do styku se semeny, nepotřebovaná semena a semena po vyhodnocení testů je nutné likvidovat autoklávováním. Charakterizujeme zdroj sběru semen, jejich schopnost klíčit v destilované vodě a v přítomnosti GR24 (viz postup níže). Po ověření klíčivosti přistupujeme k vlastnímu experimentu.

Semena se umístí do skleněných nádobek (př. vialky 10ml), ke sterilizaci semen parazitických rostlin se použije promytí 2% vodným roztokem chlornanu

sodného s kapkou 0,02% Tween 20 po dobu 5 minut, roztok se odpipetuje a semena se řádně propláchnou sterilní destilovanou vodou (3 × 5 min). Poté se semena s kapkou vody (100 µl) přenesou na skleněné filtry (disky), po 50–100 semenech na jeden disk. Do Petriho misek se umístí 2 kulaté výseky z filtračního papíru (Ø 9 cm), na kolečka se umístí 12 disků se semeny a do každé Petriho misky se přidá 3 ml sterilní destilované vody. Petriho misky se uzavřou parafilmem a dají se v termostatu předkultivovat ve tmě a při teplotě odpovídající optimu druhu parazitické rostliny.

Předkultivace (předpůsobení) semen trvá 10–12 dnů při teplotě 30 ± 1 °C pro rod *Striga* a 12 dnů při teplotě 21 ± 1 °C pro rody *Phelipanche* a *Orobanchae*. Po této době se přistoupí k aplikaci extraktů z mikrořas. Disky s předpůsobenými semeny jsou vyjmuty z termostatu a ve sterilním boxu jsou přeneseny do čisté Petriho misky na sterilní kruh z filtračního papíru o šířce 1 cm. Disky se semeny jsou vysušeny po dobu 20 minut v otevřených Petriho miskách ve flowboxu. Naředěné vodní extrakty z mikrořas jsou připraveny v ředění 1 : 9 a takto se aplikují se ve třech opakováních (po 40–50 µl na disk). Jako negativní kontroly se používá sterilní destilovaná voda a organické rozpouštědlo v koncentraci shodné s koncentrací v extraktu řas. Pozitivní kontrola představují koncentrace GR24 (např. 0,1; 0,01; 0,001 µM GR24). Potom se přidá 0,9 ml sterilní destilované vody na kruhy z filtračního papíru. Petriho misky se uzavřou parafilmem a nechají se inkubovat opět v termostatu a ve tmě, při stejných teplotních optimech. U rodu *Striga* hodnocení biostimulační aktivity na klíčení semen probíhá po 2 dnech inkubace a u rodů *Orobanchae* a *Phelipanche* po 5–6 dnech. Pod binolupou se hodnotí počet naklíčených semen na disku a procentuálně se vyjádří vzhledem k celkovému počtu semen na disku. Experiment se vždy hodnotí v porovnání s kontrolami.

Biostimulace klíčení semen v přítomnosti extraktů z mikrořas je pozorována v případě, že procento klíčení semen je vyšší než klíčení semen ve vodě (tzv. spontánní klíčivost), v případě hodnocení klíčivosti semen na discích s GR24 se hodnotí citlivost a vitalita semen, tj. schopnost klíčit se standardním stimulantem parazitických semen. **Obrázek 5** dokumentuje založený biotest a klíčení semen parazitických rostlin v přítomnosti biostimulačních látek přítomných v extraktech mikrořas.

2.2.5 Diskový biotest

Testovaný organismus: izolát fytopatogenních hub *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*.

Fotodokumentace: vytváření obrazu Petriho misek s koloniemi fytopatogenních hub vyplňující celou plochu misky (v případě pozitivní inhibice se vytváří

inhibiční zóna) s použitím snímacího zařízení a digitálního obrazového softwaru pro vyhodnocování objektů, pro vícenásobné pořizování snímků je nutná kalibrace na shodné hodnoty po celou dobu skenování všech obrazů, uložení obrazu ve formátu TIFF, 48 bit, 1200 DPI.

Vyhodnocení bioaktivity: inhibiční aktivita vůči fytopatogenním houbám.

Parametr hodnocení: měření velikosti inhibiční zóny v růstové dynamice mycelia fytopatogenní houby, porovnání s pozitivní (fungicid) a negativní kontrolou (voda).

Materiál a pomůcky:

- sterilní destilovaná voda;
- skleněné kultivační Petriho misky (Ø 9 cm);
- komerční živná půda pro kultivaci fytopatogenních hub (Czapek Dox Agar, HiMedia);
- děrovačka, sterilní disky filtračních papírů (5 mm);
- mikropipeta a sterilní špičky (100 µl);
- plynový nebo lihový kahan;
- kovový korkovrt na vyřezávání inokulačních bločků (5mm);
- popisovače;
- termostat (20 ±1 °C).

Postup:

Připraví se stanovený počet Petriho misek se živnou půdou pro růst kolonií fytopatogenních hub. Příprava Czapek Dox media (Tuite, 1969) spočívá v navážení potřebného množství komerčního produktu Czapek Dox Agar (HiMedia, ČR), který obsahuje: sacharózu – 30 g/l, dusičnan sodný – 2 g/l, hydrogenfosforečnan draselný – 1 g/l, síran hořečnatý – 0,5 g/l, chlorid draselný – 0,5 g/l, síran železnatý – 0,01 g/l a agar – 15 g/l. Z jednoho litru media (pH 7,3 ± 0,2) se může připravit 50 nebo 65 agarových ploten při nalití 15 nebo 20 ml kultivačního media na jednu misku.

Ze sbírky izolátů fytopatogenních hub (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*) rostoucích na agarových plotnách se kovovým korkovrtem vyrazí kolečko agaru (zdroj aktivního mycelia) a přenesou se na nové agarové plotny s čerstvým živným médiem 0,5 cm od okraje misky, kde již jsou papírové disky s odpařenými extrakty na opačném konci. Extrakty se aplikují na 3–4 vrstvy papírových disků. Aplikace je 20–30 µl neředěného extraktu z mikrořas. Může se použít extrakt se 70% metanolem, 100% etyl-acetátem, nebo 100% acetonem, viz příprava extraktů (kapitola 2.1.2.). Po odpaření rozpouštědla se misky uzavřou skleněným víkem a nechají se inkubovat v termostatu (20 ±1 °C) po dobu 10–14

dnů, do doby, kdy mycelium u negativní kontroly zaplní celou Petriho misku. Přítomnost inhibičních látek v extraktech je zřejmá, pokud se kolem papírových disků s naneseným extraktem vytvoří inhibiční zóna, která neporůstá myceliem fytopatogenní houby. Petriho misky se vyfotí a biotest se vyhodnotí jako plošná velikost inhibiční zóny vzhledem k celkové ploše Petriho misky. Jako pozitivní kontrola je použita Petriho miska, kde k izolátu hub byl na papírový disk aplikován komerční fungicid (př. Rancona). Na **Obrázku 6** jsou zachyceny Petriho misky s inhibicí mycelia a možnost miniaturizace tohoto biotestu.

2.2.6 Vsádkové (batch) testy

Testovaný organismus: *Lecanicillium muscarium*

Vyhodnocení bioaktivity: biostimulační vliv odpadních medií po kultivaci mikrořas na rozvoj mycelia užitečných hub.

Parametr hodnocení: suchá hmotnost mycelia, porovnání s kontrolou (základní živné medium).

Materiál a pomůcky:

- sterilní Erlenmayerovy baňky (100 nebo 300 ml), nálevky;
- živné medium pro kultivaci mycelia hub (viz postup);
- sterilní destilovaná voda, flowbox;
- mikropipety a sterilní špičky (100 µl);
- sterilní nádoba s lihem;
- popisovače;
- kovový korkovrt na vyřezávání inokulačních bločků (5mm);
- kolečka z filtračních papírů;
- termostat (20 ± 1 °C);
- laboratorní váhy.

Postup:

Pro batch statické testy (bez třepání) je využito izolátů užitečných hub, jako jsou *Lecanicillium* sp., *Clonostachys* sp., *Trichoderma* sp., *Isaria* sp., jejichž mycelium vytváří na povrchu media souvislou vrstvu. Intenzita růstu se hodnotí stanovením konečného výtěžku biomasy v porovnání se základním živným médiem. Pro test se může použít organické medium, kde jsou základem pivovarské kvasnice (48 % N-látek): 6 g/l pivovarských kvasnic, 5 g/l glukózy, 5 g/l sacharózy nebo standardní medium: NaNO₃ (0,311 g/l); KNO₃ (0,12 g/l); MgSO₄ (0,1 g/l); KH₂PO₄ (0,075 g/l); Ca(H₂PO₄) (0,118 g/l). Sterilní medium se připraví do uzavíratelných nádob. Do prázdných sterilních Erlenmayerových baněk (300 ml) se použije 50 ml standardního media a 50 ml tekutého odpadního media z kultivace

mikrořas. Toto medium se získá šetrným odstředěním řasových buněk (centrifugace, viz kapitola 2.1.2). Batch kultivace probíhá při pokojové teplotě v laboratorních podmínkách (termostat, 20 ± 1 °C) po dobu 3–4 týdnů. **Obrázek 7.** dokumentuje sadu testovaných odpadních medií mikrořas (7 kmenů) a testování živného media obohaceného o resuspendovaný vodný lyofilizát (sušina) odpadního media vybraného kmene mikrořasy. Získaná biomasa mycelia houby se postupně přefiltruje přes filtrační papíry, které byly před tím zváženy. Biomasa se vysuší (80 °C, 24 h) a stanoví se hmotnost sušiny (g) a porovná se s kontrolní variantou, kde bylo použito základní medium bez přídavku produktů z mikrořas.

3 Seznam použité související literatury

MURASHIGE T., SKOOG F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473, 1962.

BISCHOFF H.W., BOLD H.C.: Phycological Studies. IV. Some soil algae from enchanted rock and related algal species. *Univ. Texas Publ.* 318:1–95, 1963.

ALLEN M.M.: Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae. *J.Gen.Microbiol.* 51:199–202, 1968.

ÖRDÖG V., BÁLINT P., STIRK W., LOVÁSZ Cs., VAN STADEN J.: Changes in growth characteristics, lipid, protein and pigment content of nitrogen-stressed *Chlorella* and *Scenedesmus* strains. 7th International Symposium on Microalgae and Seaweed Products in Plant/Soil Systems. Mosonmagyaróvár, Hungary, June 29–30, 2015, str. 34.

TUITE J.: Plant pathological methods: fungi and bacteria. Burgess Pub. Co., Minneapolis 1969.

4 Seznam publikací, které předcházely metodice

HROUZEK P., TOMEK P., LUKESOVA A., URBAN J., VOLOSHKO L., PUSHPARAJ B., LUKAVSKY J., STYS D., KOPECKY J.: Cytotoxicity and Secondary Metabolites Production in Terrestrial Nostoc Strains, Originating From Different Climatic/Geographic Regions and Habitats: Is Their Cytotoxicity Environmentally Dependent? *Environmental Toxicology* 26, 345–358, 2011.

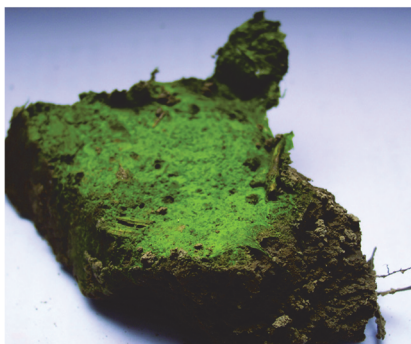
MATÚŠOVÁ R., VAN MOURIK T., BOUWEESTER H.J.: Changes in the sensitivity of parasitic weed seeds to germination stimulants. In *Seed Science Research*, 14: 335–344, 2004.

SMÝKALOVÁ I.: Je možné mikroskopické řasy uplatnit v zemědělství? *Úroda*. 2016, 64(2), 62–64. ISSN 0139-6013.

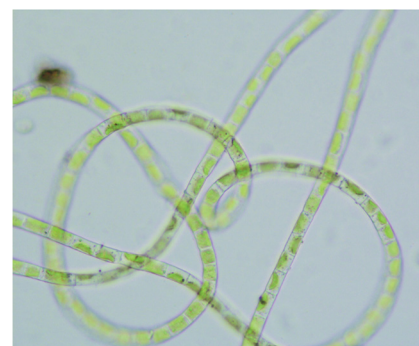
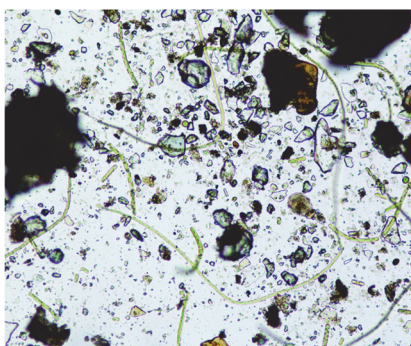
ONDRÁČKOVÁ E., ONDŘEJ M., BOTH O., NESRSTA M., PROKINOVÁ E.:
Metodika biologické ochrany rostlin s využitím hub rodu *Clonostachys*: certifikovaná metodika. 1. vydání Šumperk: Agritec, 2014. 23 s. ISBN 978-80-87360-32-3.

5 Přílohy

Kde se berou zelené stopy na polích?

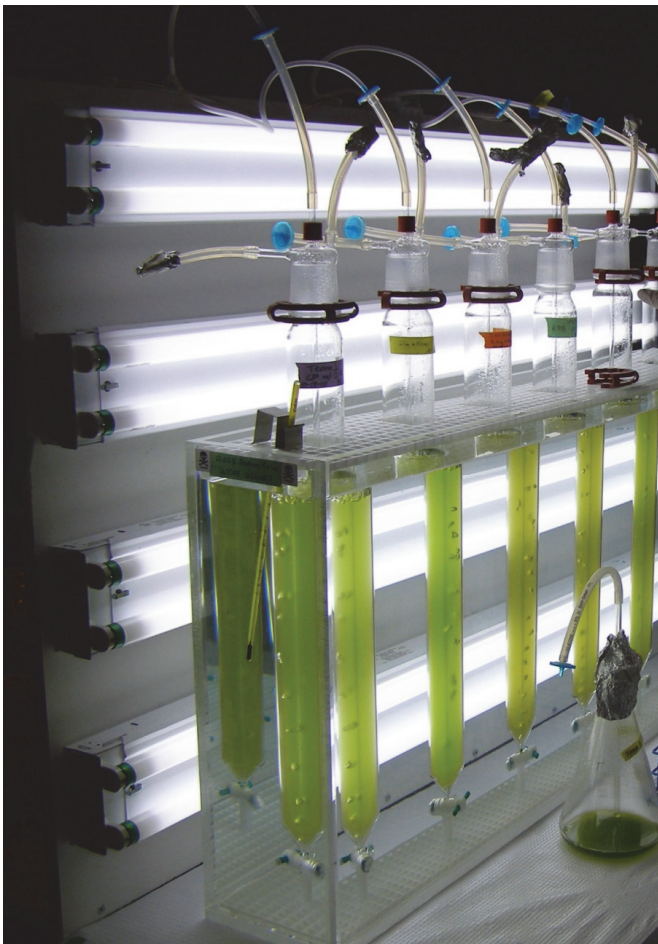


Horní povrchová vrstva *Vaucheria* sp.

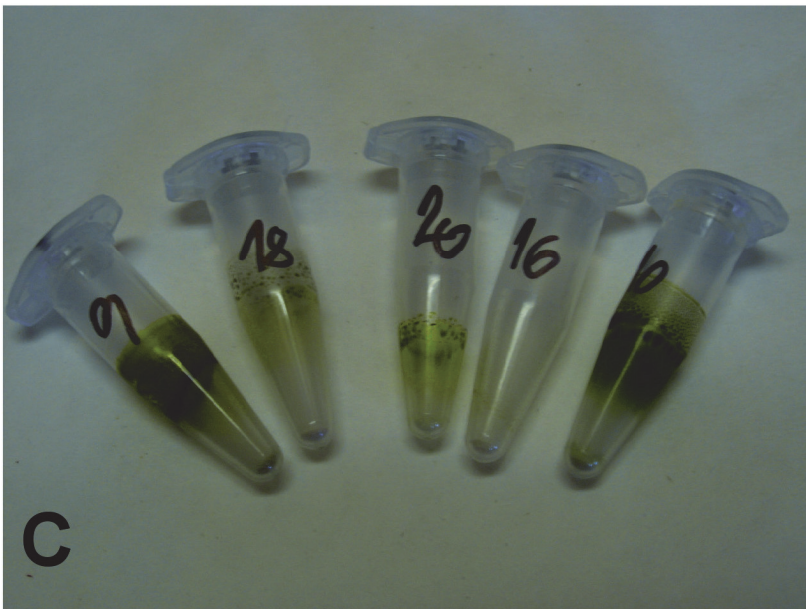
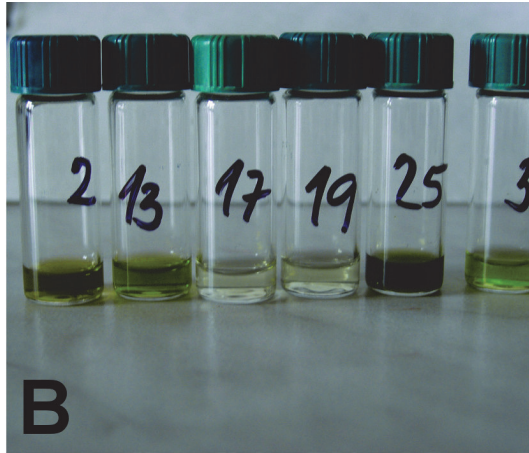
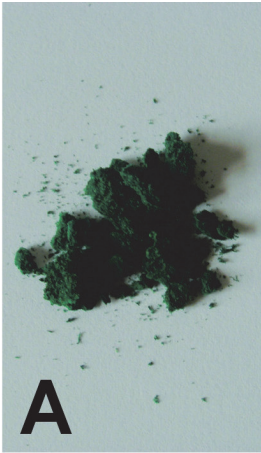


Půdní profil na polích do 2 cm, nejčastější mikrořasa je *Klebsormidium* sp.

Obrázek 1. Výskyt a zastoupení druhů mikrořas v polních podmínkách, na polích s intenzivní zemědělskou činností.



Obrázek 2. Kultivace kmenů mikrořas v trubicových kultivačních systémech pro biotechnologickou produkci biomasy mikrořas a ke stanovení její bioaktivity.



Obrázek 3. Příprava extraktů z biomasy mikrořas. Lyofilizovaná biomasa mikrořas (obrázek A); hrubé extrakty pocházející z různých kmenů mikrořas se liší zabarvením (obrázek B), odpařené sedimenty extraktů (obrázek C).

Tabulka 1. Složení kultivačních medií pro kultivaci mikrořas. Medium BBM (Bold-Basal/Bristol medium, Bischoff a Bold, 1963) pro kultivaci terestrických řas a sinic a BG11 medium (Allen 1968) pro kultivaci sladkovodních, půdních, termálních a mořských sinic.

Typ živiny	mg/ l media	
	BBM (pH 7,0)	BG11 (pH 7,4)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	25	35
NaNO ₃	250	1500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75	75
KH ₂ PO ₄	175	
K ₂ HPO ₄	75	40
KOH	31	
NaCl	25	
Na ₂ CO ₃		20
Na-EDTA	50	1
Mikroelementy		
FeNH ₄ citrát		6,00
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,98	
MnCl ₂ ·7H ₂ O	1,44	1,81
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,49	0,05
MoO ₃	0,71	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57	0,08
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O		0,39
H ₃ BO ₃	11,42	2,86
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,82	0,22


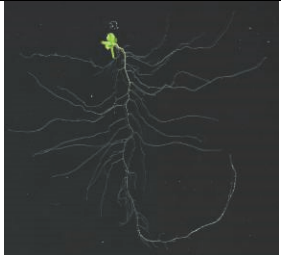

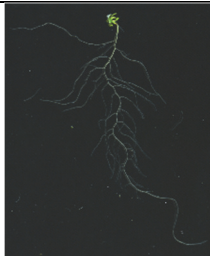
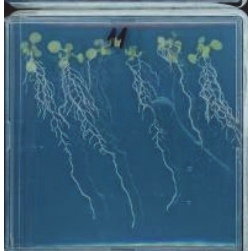

Tabulka 2. Seznam a stručný popis *in vitro* biotestů, uvedených v této metodice, vhodných pro vyhledávání biologicky aktivních látek z mikrořas.

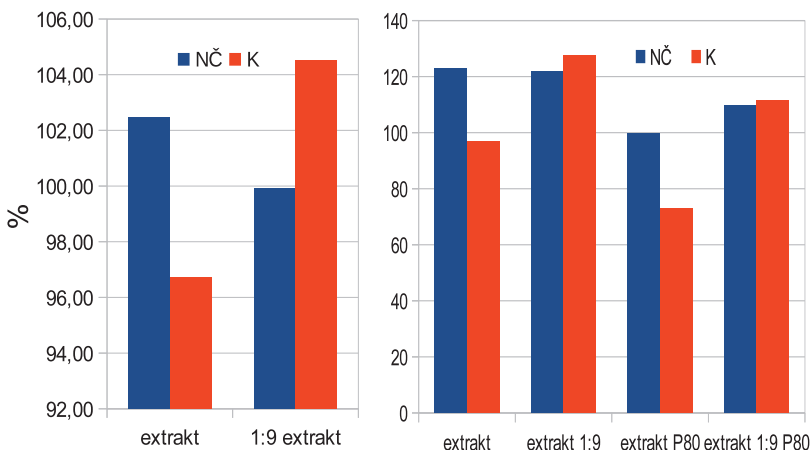
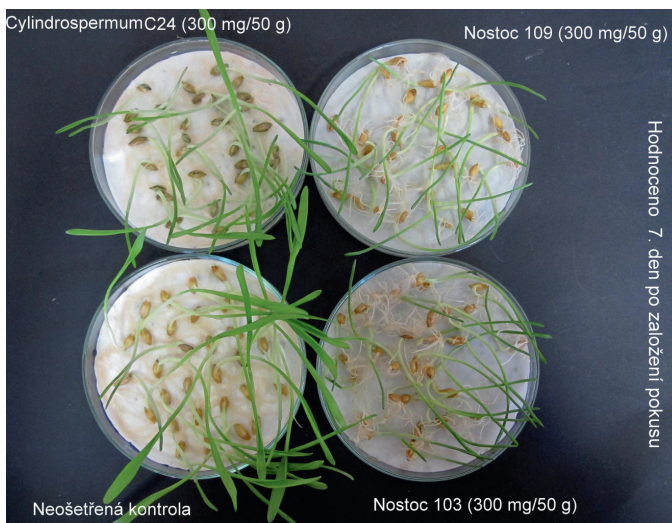
<i>In vitro</i> biotesty	Testovaný organismus	Vyhodnocení bioaktivity	Parametr hodnocení
Kořenový biotest	husejníček rolní <i>Arabidopsis thaliana</i>	pozitivní nebo negativní působení na rozvoj kořenového systému husejníčku	délka a počet kořenů, porovnání s kontrolou (základní živné medium s organickým rozpouštědlem)
Biotest klíčivosti I	ječmen setý <i>Hordeum vulgare</i> L.	inhibice nebo stimulace klíčení a růstu klíčenců ječmene	délka nadzemních částí a kořenů; čerstvá a suchá hmotnost; vzhled, porovnání s kontrolou (voda)
Biotest klíčivosti II	striga, zářaza <i>Striga sp.</i> , <i>Phelipanche sp.</i>	specifická stimulace klíčení semen parazitických rostlin	procento klíčivosti, porovnání s pozitivní (GR24) a negativní kontrolou (voda)
Diskový biotest	hlízenka hlíznatá, kořenomorka bramborová <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	potlačení rozvoje fytopatogenních hub	měření velikosti inhibiční zóny, porovnání s pozitivní (fungicid) a negativní kontrolou (voda).
Vsádkové (batch) testy	<i>Lecanicillium muscarium</i>	stimulační vliv odpadních medií po kultivaci mikrořas na růst mycelia	suchá hmotnost, porovnání s kontrolou (základní živné medium)

Tabulka 3. Pevné MS medium (Murashige and Skoog, 1962) – makro- a mikroprvky. Postupné přidávání komponent je dle sledu uvedeného v tabulce. Úprava pH roztoku se provede ještě před přidáním agaru a titrací pomocí KOH se upravuje na hodnotu 6,0 (důvodem je skutečnost, že po přidání agaru a po autoklávování hodnota pH klesne o 0,2 na požadovaných 5,8).

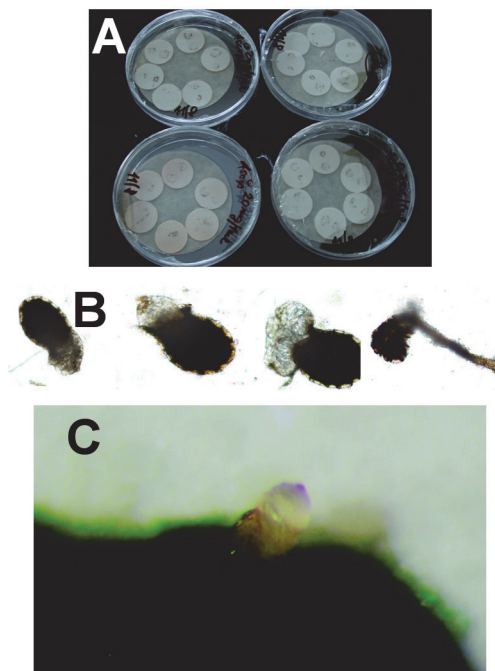
Makroelementy	mg/ l media	zásobní roztok g/l	příprava; odpipetovaný objem
CaCl ₂	332,02	6,64	Všechny komponenty postupně navažovat do kádinky, a rozpouštět v destilované vodě, do konečného objemu 1 l; aplikace 25 ml
KNO ₃	1900,00	38	
MgSO ₄	180,54	3,61	
KH ₂ PO ₄	170,00	3,4	
NH ₄ NO ₃	1 650,00	33	
Mikroelementy	mg/l media	zásobní roztok g/l	příprava; odpipetovaný objem
Roztok železa			
Na ₂ EDTA	37,25	7,45	Rozpustit zvlášť, smíchat a zahřát až roztok zežloutne; aplikace 2,5 ml
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	5,57	
Roztok A			
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	2,5 mg	Navážit a postupně přidávat do destilované vody, celkový objem 100 ml; aplikace 0,5 ml
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	2,5 mg	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	25 mg	
KI	0,83	83 mg	
Roztok B			
H ₃ BO ₃	6,20	62 mg	Navážit a postupně přidávat do destilované vody, celkový objem 100 ml; aplikace 5 ml
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	169 mg	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	86 mg	
sacharoza	10g		
MES buffer	0,5g		
pH	6,0	měření a úprava pH (za stálého míchání) pomocí 2M roztoku KOH	
agar	10g	Př. KOBE I	

Tabulka 4. Kořenový biotest. Růst klíčenců *Arabidopsis thaliana* v kořenovém *in vitro* biotestu. Příklad obrazu vytvořeného skenováním jednotlivých klíčenců – pro aplikaci vyhodnocení kořenové soustavy. Testovací varianty (vzorek č. 9 - odpadní medium z kultivace mikrořas, vzorek č. 11 - 70% metanolový extrakt z kmene mikrořas) jsou porovnány s kontrolní variantou (vzorek Kontrola). Vyhodnocení parametrů z obrazové analýzy (software pro vyhodnocení kořenové soustavy): TL – celková délka kořenového systému v mm; PL – délka primárního kořene; LL- délka postranních kořenů; T# - počet kořenových špiček; L PLwpw - délka nevětvené části primárního kořene; L#I – počet postranních kořenů prvního řádu; LL/TL - poměr délky postranních kořenů a celkové délky.

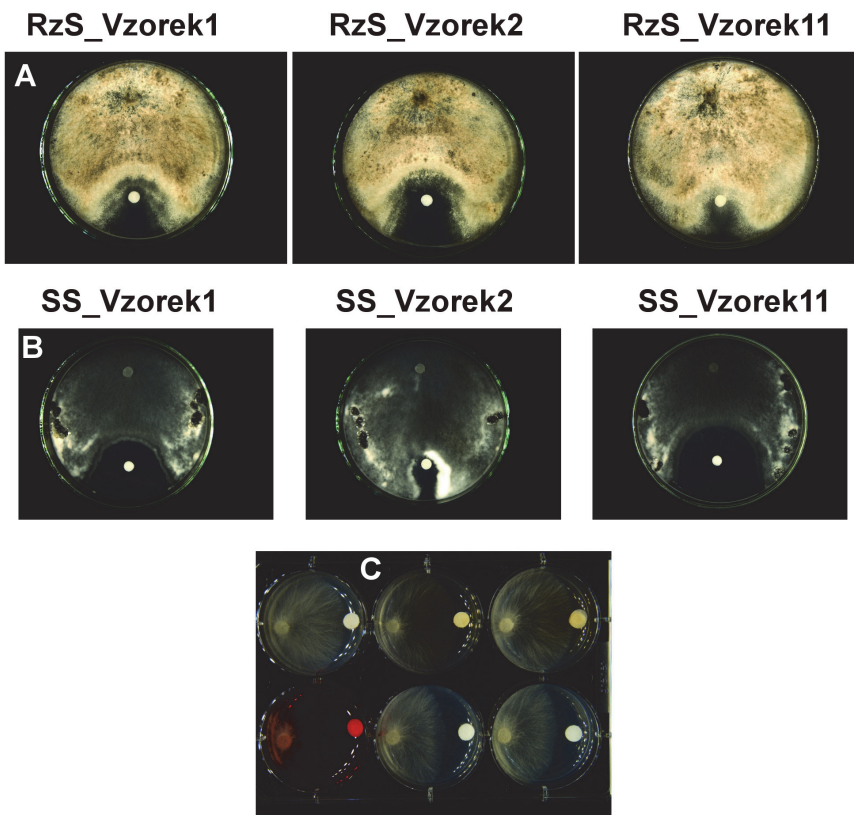
Kontrola	Skenovaná rostlina	Výsledky měření DOA
		TL[mm] 584,87±74,93 PL[mm] 78,86±1,26 LL[mm] 506,01±74,10 T# 51,33±7,87 L#I 49,33±7,30 LL/TL 0.865 PLwpw[mm] 24,30±8,45
Vzorek 9		
		TL[mm] 407,52±104,82 PL[mm] 71,58±7,46 LL[mm] 335,94±98,40 T# 41,50±8,26 L#I 38,38±7,05 LL/TL 0.824 PLwpw[mm] 18,73±9,20
Vzorek 11		
		TL[mm] 366,88±120,10 PL[mm] 76,37±10,39 LL[mm] 290,51±110,76 T# 44,33±17,35 L#I 35,89±9,23 LL/TL 0.792 PLwpw[mm] 24,14±4,09



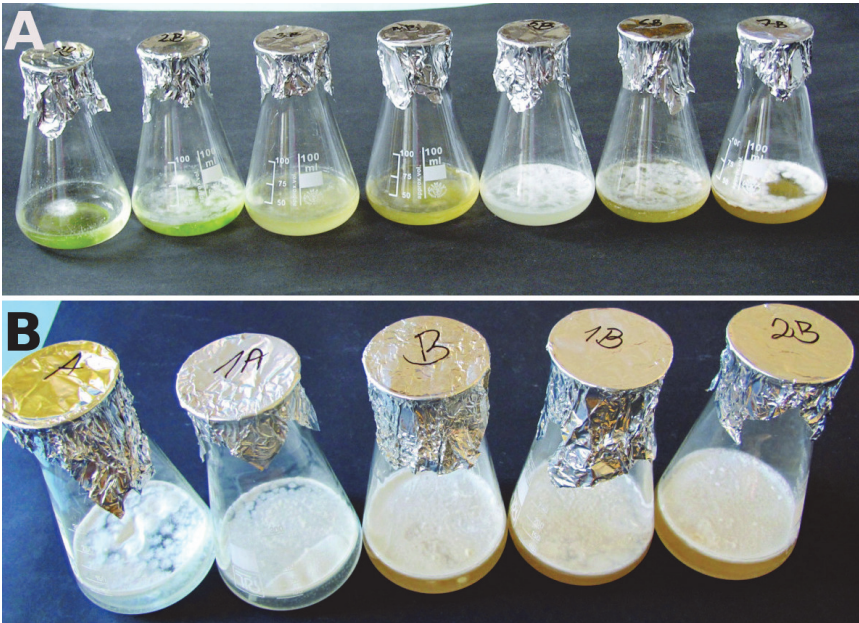
Obrázek 4A-C Biotest klíčivosti I. A. Porovnání vzhledu klíčenců po aplikaci obalení obilky ječmene jarního (odrůda Pribina) lyofilizovanou biomasou sinic v koncentracích uvedených na obrázku. **B.** Hodnocení (% kontroly) délky nadzemních částí (NČ) a kořenů (K) klíčenců ječmene ošetřených hrubým extraktem ze sinice bez ředění a v ředění 1:9. **C.** Obilky použité k testování pocházejí z polních experimentů neošetřených nebo ošetřených biomasou sinic P80.



Obrázek 5A-C Biotest klíčivosti II. A. Aplikace hrubého extraktu na mikrofiltry ze skleněných vláken spolu se semeny parazitických rostlin jako jsou rody *Striga*, *Phelipanche*, *Orobancha*. B. Reakce na specifický chemický stimul iniciací klíčení. Potvrzení přítomnosti biostimulačních látek klíčení u parazitických rostlin. C. Účinný biotest na zjišťování přítomnosti těchto biologicky aktivních látek u mikrořas se vyhodnocuje procentem klíčivosti semen.



Obrázek 6A-C. Diskový biotest. A,B. Aplikace hrubého extraktu mikrořasy na terčíky/disky z filtračního papíru v přítomnosti izolátu fytopatogenní houby *Rhizoctonia solani* (RzS) a *Sclerotinia sclerotiorum* (SS) s použitím skleněných Petriho misek (Ø 9cm). Vzorek1 = extrakce živé biomasy mikrořasy 70% metanolem; vzorek2 = extrakce živé biomasy mikrořasy 100% etyl-acetátem, odpaření, resuspendace 70% metanolem; vzorek11 = extrakce lyofilizované biomasy (navážka 200 mg) 70% metanolem. C. Miniaturizace testu se šestijamkovými kultivačními plastovými deskami. Červené zbarvení media je dáno aplikací fungicidu př. RANCONA (pozitivní kontrola).



Obrázek 7A,B *Vsádkové (batch) testy*. Aplikace odpadních medií po kultivaci a odstředění biomasy 7 různých kmenů mikrořas a odpadního media z bioaktivního kmene mikrořas k obohacení minerálního (A) nebo organického media (B) k založení biotestů pro kultivaci a stanovení růstu mycelia užitečné mykoparazitické houby *Lecanicillium muscarium*.