PRESLIA 1954
26: 105—109

Jan Nečásek, Františka Palečková a Antonín Tesař:

Monosporická isolace hub

(Výzkumný ústav antibiotik, Roztoky u Prahy.)

Dokonalá methoda monosporické isolace má vyhovovat několika obecným požadavkům. V prvé řadě musí být co nejméně komplikovaná, aby dovolovala pořízení i rozsáhlejších serií isolátů v krátkém časovém úseku. Dostatečně velký počet stejně starých isolátů je často podmínkou zdaru prováděného pokusu. Kromě toho jednoduchou methodou jest možno svěřiti k provádění laboratornímu pracovníku již po krátké době zapracování. Dalším předpokladem úspěšné použitelnosti jsou nízké náklady, spojené s obstaráním příslušného zařízení, protože jen takový postup je únosný pro většinu interesentů. Přitom však musí být hlavním a stálým požadavkem záruka spolehlivosti jak po stránce monosporické isolace samé, tak aseptičnosti pracovního postupu. Methoda musí zaručovat, že byla isolována skutečně pouze jediná spora, a že získaný monosporický isolát nebude ztracen vlivem znesterilnění, ke kterému došlo během práce. Posledním požadavkem jest pak snaha, aby methoda byla použitelná pro co nejširší výběr druhů.

Methody pro monosporickou isolaci lze rozdělit (Hildebrand 1938, 1950) do tří skupin, t. j. na methody zřeďovací, methody mikromanipulační a konečně ty methody, které k přenesení vybrané spory používají jiné cesty, než jakou představuje použití mikromanipulátoru. Při jednoduchém postupu zřeďovacím chybí záruka toho, že narostlé kolonie pocházejí skutečně z jediné spory, neboť se lze snadno přesvědčiti, že ve většině případů jsou v suspensích spory zhusta spojeny ve dvou- až mnohočetných shlucích, které dávají vzniknout koloniím makroskopicky totožným s koloniemi, vyrostlými z jednotlivých spor. Tato nesnáz je prakticky stejná při nátěru spor na plotnu kličkou. Methody, užívané obvykle pro zakládání jednobuněčných kultur kvasinek (Lindnerova nebo Hansenova) dávají sice záruku monosporického původu isolátu, jsou však značně pracné a nevhodné pro seriovou práci. Použití mikromanipulátoru skýtá sice bezpečnou záruku toho, že založená kultura je skutečně monosporická, přitom však jsou methody této skupiny vesměs časově značně nákladné a vyžadují speciálního nácviku jak pro provádění isolace samé, tak pro přípravu příslušných mikronástrojů. Kromě toho mikromanipulátor není dostupný každému pracovníku, který potřebuje zakládat monosporické kultury.

Třetí skupina postupů je tvořena těmi methodami, které se zpravidla snaží spojit jednoduchost methody zřeďovací se spolehlivostí method mikromanipulačních. Typickým příkladem takové techniky jest methoda Keittova (1915), která byla jen málo pozměněna Ezekielem (1930) a Sassem (1929). V Keittově methodě jsou spory naočkovány na povrch agarové půdy na Petriho misce, na obrácené misce jest pak vhodná spora vyhledána pomocí mikroskopu za použití slabého objektivu, umístění vybrané isolované spory dostatečně vzdálené od ostatních je poznamenáno na skle misky inkoustem a poté je příslušná část agaru se sporou ručně vykrojena pomocí očkovací jehly, zakončené šikmo připojeným dutým válečkem, upraveným ze zploštělého konce jehly. Po kontrole vykrojené části agaru se tato část živného media přenese na novou živnou půdu lancetou. Další modifikací této methody (La Rue 1930) bylo vypuštěno označování a usnadněno vykrajování agarového válečku se sporou tím, že se tak děje kuželovitým násadcem našroubovaným na revolver mikroskopu vedle objektivu, kterým se provádí vyhledávání vhodné spory. Přitom však vyjímání části agaru z plotny nutno jako při původním postupu provádět ručně. Výhody methody Keittovy a modifikace La Rueho spojuje další úprava (Lambert 1938), kde vykrajování i vyjímání části agaru se sporou z plotny se děje pomocí kovového dutého válečku, připojeného kovovou tyčinkou k objektivu s dostatečně velkou pracovní vzdáleností,

kterým jest vyhledávána vhodná spora k isolaci. Nevýhodou této techniky jest poměrně značná labilita centrování isolátoru, má-li být dosaženo souososti isolátoru s objektivem. Má-li být upuštěno od požadavku souososti, jest nutno používati velmi slabých objektivů se širokým zorným polem. V poslední úpravě Keittovy methody (G e o r g 1947) jest vykrajování agarových válečků prováděno kuželi, zhotovenými ve vhodné velikosti ze skleněné trubky a přitmelených k objektivu plastelinou. Vykrojená část agaru se z kužele odstraní po jeho sejmutí z objektivu. Popis techniky M c L e a n a (1939) nám dosud není dostupný.

Při všech přednostech těchto technik nelze je však označit za vyhovující. Ve větší nebo menší míře se tu shledáváme buď s nepříliš zaručenou spolehlivostí anebo s poměrně značnou pracností a komplikovaností.

Při naší práci, kdy jsme byli nuceni zakládati rozsáhlejší serie monosporických isolátů Penicillií, jsme se pokusili upravit dosavadní modifikace této skupiny method tak, aby výsledná methoda odstranila pokud možno zbývající nevýhody, t. j. aby dávala co nejdokonalejší záruku monosporického původu kultur, a aby časové náklady spojené s jejich přípravou byly podstatně nižší než u postupů dosavadních.



Obr. 1. Kuželový násadec pro monosporickou isolaci. (Foto F. A. Lokvenc.)

Popis isolátoru.

Námi zkonstruovaný isolátor (obr. 1) je zhotoven z nerezavějící ocele. Má tvar dutého kužele, který lze válcovitým zakončením nasunout na objektiv mikroskopu a připevnit šroubkem. Spodní konec kužele vybíhá v trubku, která při isolaci vyřezává váleček tuhé živné půdy se sporou. Spodní konec trubky je od frontální čočky objektivu vzdálen o cca 0,5 mm méně, než kolik činí pracovní vzdálenost objektivu. Vnitřní průměr trubky je volen tak, aby její obvod byl viditelný v zorném poli okuláru. Kuželovitá část isolátoru je prořízknuta, takže vznikají proti sobě dva vejčité otvory, které umožňují přenesení vyříznuté části agaru. Vzhledem k tomu, že jsme isolátor určili výhradně pro isolaci mikroskopem MEOPTA B 36 Bi a objektivem MEOPTA č. 3, zvětšujícím 10× (okulár orthoskopický 15×), je vnější průměr isolátoru 22 mm a jeho celková výška 19,7 mm, při čemž trubka jest dlouhá 2,7 mm při vnitřním průměru 1,1 mm. Její vnější

průměr činí 1,7 mm. Vnitřní průměr válcové části isolátoru jest 16,7 mm a její výška měřena uvnitř 9,0 mm, takže je možno isolátor nasunout na objektiv až ke šroubu, kterým lze z objektivu vyjmout jeho optický systém. Jako další pomocné nástroje potřebujeme k isolaci sondu z ocelového drátu k vysunutí agarového válečku z trubky. Konec sondy jest proto v délce asi 5 mm zahnut v pravém úhlu. K přenášení válečku používáme kovové lancety vhodného tvaru.

Pracovní postup.

Suspensi spor dokonale protřepeme a eventuálně přefiltrujeme pipetou s vatovým uzávěrem. Takto upravenou suspensi ředíme do vhodného stupně a očkujeme na Petriho misky o průměru 10 cm. Vhodnou agarovou půdu, kterou používáme pro očkování suspensí, plníme do Petriho misek tak, aby výška nalité plotny činila cca 2,5 mm. Na plotny nanášíme 0,7—0,8 ml suspense, kterou dokonale roztřepeme po celém povrchu plotny. Naočkované Petriho misky inkubujeme při vhodné teplotě tak dlouho, až spory vyklíčí. Inkubací před prováděním isolace jednak usnadníme vyhledávání vhodných spor, protože v některých případech nevyklíčené spory unikají pozornosti, jednak zhospodárníme pracovní postup tím, že isolujeme spory pouze životaschopné.

Isolátor, sondu a lancetu sterilisujeme před prací horkým vzduchem. Oba nástroje odkládáme během práce do 70% alkoholu a opalujeme. Isolátor, který nasuneme po horkovzdušné sterilisaci na objektiv tak, aby jeho otvory byly po levé a pravé straně, snímáme během práce s objektivu v občasných intervalech a sterilisujeme rovněž ponořením do alkoholu a opatrným opálením.

Petriho misku s naklíčenými sporami položíme na stolek mikroskopu, osvětlíme zpravidla procházejícím světlem (nízkovoltová bodová lampa), zaostříme, vyhledáme vhodnou sporu a krouživým pohybem misky se přesvědčíme, že okolí vyhlédnutého objektu je prosto jiných spor. Poté snížíme tubus mikroskopu tak, až spodní okraj isolační trubky narazí na dno Petriho misky. Pro uvolnění vyříznuté části agaru posuneme miskou ve vodorovném směru a tubus mikroskopu opět zdvihneme. Odstraníme a uzavřeme misku se suspensí a sondou vysuneme vyříznutý váleček agaru do komory isolátoru, kde zůstane přichycen na stěně. Se stěny jej sesuneme lancetou a přeneseme na novou Petriho misku, kde jej postavíme na základnu. Pro kontrolu toho, že na horní základně agarového válečku jest lokalisována jediná spora, prohlédneme bez snímání isolátoru ihned takto založenou kulturu v procházejícím světle, přirozeně za předpokladu průsvitnosti agarové půdy. Protože bylo zjištěno, že pro vývoj kolonie je vhodnější pokládati agarový váleček se sporou na bok, jelikož tak dosáhneme rychlejšího a stejnoměrnějšího vývoje kolonie, položíme jej po kontrole na bok. Další kontrolu pak provedeme po vhodné době inkubace, kdy již dojde k dalšímu růstu naklíčené spory. Výhodné pro tento účel jest osvětlení dopadajícím světlem.

Na Petriho misku, určenou pro kultivaci monosporických isolátů, umisťujeme buď jeden váleček s isolovanou sporou doprostřed, anebo válečků několik v pravidelných rozestupech. V zásadě se zde řídíme povahou materiálu. Je přirozené, že optimálním způsobem jest umístění jednoho isolátu na jednu Petriho misku (vyrůstající kolonie není ovlivňována koloniemi jinými, není nebezpečí vzájemné kontaminace), musíme však přitom uvážit, že tento postup je materiálově nákladnější a proto zpravidla očkujeme na jednu Petriho misku tři až čtyři isoláty. Odočkování kultur takto monosporicky založených provedeme opět podle povahy materiálu po příslušné době inkubace normálním způsobem na šikmý agar vhodného složení.

Zhodnocení methodiky.

Proti methodám dřívějším spatřujeme hlavní výhodu našeho isolačního způsobu v možnosti pořídit dostatečně rozsáhlé soubory isolátů s minimálními náklady jak technickými, tak také časovými. Zjistili jsme, že založení jednoho sta monosporických kultur tímto způsobem trvá zacvičenému pracovníku asi tři hodiny. Přirozeným požadavkem jest ovšem naočkování ploten suspensí vhodně ředěnou, aby vyhledávání isolovaných spor nečinilo potíže. Během zakládání asi 1000 monosporických kultur, kde byla spolehlivost methody pečlivě kontrolována, jsme nezjistili ani jeden případ, kdy by byla s isolovanou sporou přenesena spora další. I když nutno s takovým případem při isolaci počítat, ukazují tyto dosavadní výsledky, že spolehlivost methody je značně vysoká. Při isolacích, které jsme prováděli v normální mikrobiologické laboratoři, neupravené jako aseptický prostor, jsme během desetidenní inkubace vyřazovali asi 5 % ploten, znesterilněných houbami nebo bakteriemi. Nesterilnost, jejímž zdrojem byla isolační technika (nedokonalá sterilisace isolátoru během práce), byla pozorována jedenkrát u pěti isolátů, kde kontaminujícím organismem byly Saccharomycety. Soudíme tedy, že tato methoda vyhovuje jak co do záruky monosporického původu isolátů, tak co do spolehlivosti aseptického provedení isolace. Splňuje předpoklad nekomplikovanosti a lze ji používat s minimálními náklady. Její použití je přirozeně omezeno na isolaci takových útvarů, které jsou dobře rozlišitelné při celkovém zvětšení asi 200×. Nelze ji tedy použít pro monosporickou nebo jednobuněčnou isolaci bakterií, na druhé straně však má široký rozsah použitelnosti pro spory většiny hub, pro kvasinky, pro jednobuněčné řasy a pro zakládání monosporických kultur Bryophyt a Pteridophyt.

Souhrn.

Byla vypracována methoda pro monosporickou isolaci hub, při které jest používáno jako isolátoru kuželovitého násadce, nasunutého na slabý objektiv. Isolátor jest zkonstruován tak, že vzdálenost trubkovitého zakončení isolátoru od frontální čočky objektivu jest o málo kratší, než pracovní vzdálenost objektivu. Tímto způsobem jest umožněno objektivem s nasazeným isolátorem vyhledat vhodnou sporu na agarové plotně, posunutím tubusu mikroskopu ponořit trubkovité zakončení isolátoru do agaru a poté přenést vyříznutou část půdy se sporou na novou živnou půdu. Vyjmutí agarového válečku z isolátoru se děje jeho vysunutím do komory isolátoru. Tato komora jest opatřena dvěma vejčitými otvory, které umožňují přenesení válečku lancetou.

Pomocí této methody lze získat 100 isolátů asi za tři hodiny, při čemž vzhledem k neustálé mikroskopické kontrole pracovního postupu je dokonalá záruka toho, že založená kultura pochází z jediné spory. Praktické provádění isolace je velmi jednoduché, zařízení lze snadno udržovat sterilní a finanční náklady, spojené s jeho pořízením, jsou minimální. Methodu lze použít pro isolaci spor většiny hub, pro isolaci kvasinek, jednobuněčných řas a pro isolaci spor Bryophyt a Pteridophyt.

Literatura:

Ezekiel W. N. (1930): Modified procedure with the Keitt single-spore method. Phytopath. 20 : 583—586.

Georg L. K. (1947): A simple rapid method for obtaining monospore cultures of fungi. Mycologia 39 : 368—371.

Hildebrand E. M. (1938): Techniques for the isolation of single microorganismus. Bot. Rev. 4 : 627—664.

Hildebrand E. M. (1950): Techniques for the isolation of single microorganismus II. Bot. Rev. 16 : 181—207.

Keitt G. W. (1915): Simple technique for isolating single-spore strains of certain types of fungi. Phytopath. 5 : 266—269.

Lambert E. B. (1939): A spore isolator combining some of the advantages of the La Rue and Keitt methods. Phytopath. 29 : 212—214.
La Rue C. D. (1920): Isolating single spores. Bot. Gaz. 70 : 319—320.
McLean R. C. (1939): Isolating fungus spores. Watson's Micr. Rec. 46 : 3—4.
Sass J. E. (1929): The cytological basis for homothallism and heterothallism in the Agaricaceae. Amer. J. Bot. 16 : 663—701.

Я. Нечасек, Ф. Палечкова, А. Тесарж:

Моноспорная изоляция грибов.

Разработан метод моноспорной изоляции грибов, при котором как изолятор применяется конусообразная наставка, надетая на слабый объектив. Изолятор конструирован таким образом, что расстояние от фронтальной линии объектива до трубкообразного окончания изолятора немного меньше, чем рабочее расстояние объектива.

Таким образом, возможно при помощи объектива с изолятором отыскать нужную спору на чашке с агаром, снизив тубус микроскопа погрузить трубкообразное окончание в агар и перенести вырезанную частицу агара со спорой на новую питательную среду. Агаровый цилиндрик вынимается из трубки изолятора в его камеру. Эта камера снабжена двумя овальными отверстиями, благодаря которым возможно перенесение цилиндрика при помощи ланцета.

Этим методом можно провести 100 изоляций в течение приблизительно 3—4 часов, причем благодаря беспрерывному микроскопическому контролю вообще обеспечено, что культура выращена из одной споры. Практическое проведение работы очень простое, оборудование легко удерживается стерильным, а также и расходы на его приобретение минимальны. Метод применим для изоляции спор большинства грибов, для изоляции дрожжей, одноклеточных водорослей и для изоляции спор бриофитов и птеридофитов.

J. Nečásek, F. Palečková u. A. Tesař:

Monosporische Isolierung von Pilzen.

Es wurde eine Methode zur monosporischen Isolierung von Pilzen ausgearbeitet, bei welcher die Isolierung mittels einer auf das Mikroskopobjektiv aufsteckbaren kegelförmigen Vorrichtung durchgeführt wird. Die Isoliervorrichtung ist so konstruiert, dass die Entfernung des unteren Röhrchenendes von der Frontlinse des Objektivs etwas kürzer als der Objektabstand des Objektivs ist. Zur Verwendung gelangt ein Objektiv mit geringer Eigenvergrösserung. Die Isolierung geschieht auf folgende Weise:

Mit dem Objektiv, auf dem die Isoliervorrichtung aufgesetzt ist, wird auf der Oberfläche der Agarplatte eine geeignete keimende Spore aufgesucht, worauf durch Senken des Mikroskoptubus mit dem röhrchenförmigen Ende der Vorrichtung ein walzenförmiges Stück Agar ausgestochen und durch Heben des Tubus herausgehoben wird. Das herausgestochene Agarstück wird mit einem passend zugebogenen Drahtstück von unten her aus dem Röhrchen in die kegelförmige Kammer der Isoliervorrichtung hinaufgeschoben und hierauf mittels einer Lanzette auf eine neue Agarplatte übertragen.

Nach dieser Methode ist es möglich, 100 Isolate in drei Stunden herzustellen, wobei infolge der ständigen mikroskopischen Kontrolle des Arbeitsvorganges die vollständige Sicherheit gegeben ist, dass die so angelegten Kulturen tatsächlich von einer einzigen Spore abstammen. Die praktische Durchführung der Methode ist sehr einfach, die Einrichtung ist leicht steril zu halten und der finanzielle Aufwand ihrer Hertsellung gering. Die Methode ist zur Isolierung von Sporen der meisten Pilze, zur Isolierung von Hefezellen, von einzelligen Algen und auch zur Sporenisolierung von Bryophyten und Pteridophyten geeignet.