



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“

Projekto sutarties numeris: ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

BIO 313 BESTUBURIŲ BIOLOGIJA

Laboratorinis darbas

SLIEKUOSE PARAZITUOJANČIŲ GREGARINŲ (TIP. *APICOMPLEXA*, BŪR. *GREGARINEA*, ŠM. *MONOCYSTIDAE*) SURADIMAS

TIP. SPORAGYVIAI (*APICOMPLEXA*)

Dauguma šiam tipui priklausančių pirmuonių yra parazitai. Vieni parazituoja bestuburiuose organizmuose (žieduotosiose kirmėlėse, vėžiagyviuose, moliuskuose), kiti – stuburiniuose, įskaitant ir žmogų. Dauguma sporagyvių turi sporų stadiją, kuri apsaugo nuo nepalankių aplinkos sąlygų infekcijos perdavimo metu. Jei sporas praryja tinkamas gyvūnas, tai iš jų išsilaisvina infekcinės stadijos ir užkrečia jį. Šio tipo infekcinėms formoms būdingi tam tikri morfologiniai požymiai. Svarbiausias – tai **apikalinis kompleksas** priekiniame ląstelės poliuje. Šio komplekso organoidai tai konoidas (sudarytas iš mikrovamzdelių) ir besitęsiantis po pelikule gilyn į ląstelės vidų. Manoma, kad konoidas funkcionuoja kaip ląstelės “burna”. Apikaliniame ląstelės gale yra išvedamieji roprijų latakėliai ir mikronemos. Šios struktūros greičiausiai yra užpildytos virškinamaisiais fermentais. Mikroporos (ląstelės membranos įlinkimai) reikalingos maisto medžiagų įsiurbimui. Gregarinos yra tarpląsteliniai parazitai, todėl šioje grupėje apikalinis kompleksas funkcionuoja kaip bendra virškinimo struktūra, tuo tarpu kituose

sporagyviuose, pvz. kraujiniuose, kurie yra viduląsteliniai parazitai, apikalinis kompleksas naudojamas prisitvirtinimui prie šeimininko eritrocitų ir prasiskverbimui į ląstelės vidų.

Sporagyviams būdingi sudėtingi gyvenimo ciklai. Būdinga lytinio ir nelytinio dauginimosi kaita.

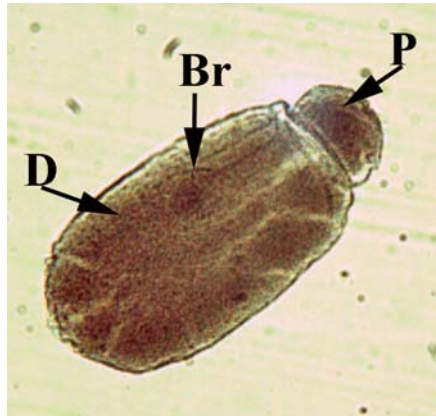
Sporozoitai, išeinantys iš sporos yra infekcinė stadija. Apikalinio komplekso pagalba jie patenka į šeimininko ląstelę ir ten auga. Paprasčiausiu atveju iš jų susidaro gamontai, kurie paskui diferencijuojasi į gametas ir susilieję sudaro zigotą (**gamogonija**). Po to sekančios sporogonijos (dalijantis zigotai) dėka vėl susidaro daug naujų sporozoitų. Kitose sporagyvių rūšyse tarp sporozoitų stadijos ir gamontų įsiterpia dauginimasis šizogonijos būdu. Ir to pasekoje susidaro daug merozoitų (**agamogonija**), kurie morfologiškai labai artimi sporozoitams. Merozoitai po to pereina į gamogonijos fazę – arba iš karto, arba dar po kelių šizogonijos ciklų. Perėjimas nuo agamogonijos prie gamogonijos yra lydimas šeimininkų kaitos. Skirtingos ciklo stadijos pasižymi specialiais citologiniais požymiais. Sporagyviams priklauso gregarinos (*Gregarinina*) ir kokcidiniai (*Coccidiomorpha*).

Būr. Gregarinos (*Gregarinida*)

Žinoma apie 500 rūšių. Parazituoja tarp ląstelių, kūno ertmėse (žarnyno spindyje, dauginimosi organuose) bestuburiuose ir žemesniuosiuose chordiniuose. Stambiausios formos gali siekti 10 mm. Vegetatyvinė forma – **trofozoitas** gali būti pakankamai stambus ir siekti 1 – 6 mm (**Pav. 1**). Maistas įsavinamas visu ląstelės paviršiumi osmoso būdu. Paprastai gregarinos per visą gyvenimą turi tik vieną šeimininką, tačiau nepaisant to, jame vyksta lytinio ir nelytinio dauginimosi kaita. Vystymosi ciklui būdingi ypatumai, kurie aiškiai atskiria gregarinas nuo kokcidijų. Vienas iš pagrindinių bruožų, kad gregarinos yra tarpląsteliniai parazitai, o ne viduląsteliniai, kaip dauguma kokcidinių. Kitas bruožas, kad gregarinose tiek moteriškos lyties tiek vyriškos lyties gametų susidaro daug, kai tuo tarpu kokcidiniuose tik vyriškos lyties gamontai patiria daugybinių dalijimąsi ir susiformuoja daug mikrogametocitų. Abiejų tipų gametos sudarytos gana panašiai (izogametos). Gametos kopuliuoja, sudarydamos zigotas. Zigota apsigaubia apvalkalu

(gametocista, oocista) ir tuomet vyksta jos dalijimasis mejozės būdu. Po dalijimosi susidariusios haploidinės ląstelės diferencijuojasi į sporozoitus.

Gregarina polymorpha ir *Ophryocystis* – parazituoja miltvabalių žarnyne. *Monocystis* – sliiekų sėklinėse pūslelėse.



Pav. 1. *Gregarina* sp. (X 60): **Br** – branduolys; **P** – protomeritas; **D** – deutomeritas. (Fotografuota trinokuliariniu FK mikroskopu MOTIC BA300 su .skaitmenine foto-video kamera MOTICAM 2000).

LABORATORINIS DARBAS NR. 2

Monocystis lumbrici

(Tip. *Apicomplexa*, Būr. *Gregarinaea*, Šm. *Monocystidae*).

Darbo priemonės: gyvi sliiekai (*Lumbricus terrestris*), 5% etanolis (arba chloroformas; eteris), 0.6% fiziologinis tirpalas, metileno mėlynasis dažas (arba neutralus raudonasis) žirklutės, adatėlės, pincetas, preparavimo vonelės, ligninas, objektiniai stikleliai, dengiamieji stikleliai, mokomieji monokuliariniai mikroskopai SFC 100FL H.

Darbo eiga: Gregarinos *Monocystis* dažnai parazituoja suaugusių sliiekų (*Lumbricus terrestris*) sėklinėse pūslelėse, kur maitinasi naujai besiformuojančiais spermatozoidais.

Monocystis lumbrici (= *M. agilis*) yra pakankamai didelė (200 µm) lyginant su dauguma smulkių sporagyvių. Tam, kad surasti gregarinas, slieką reikės išskrosti, todėl rekomenduojama pasirinkti stambesnę individą, nes užsikrėtimo gregarinomis tikimybė tiesiogiai koreliuoja su slieko dydžiu. Sliekas numarinamas patalpinant jį į indą su 5% etanoliu arba chloroformu (eteriu).

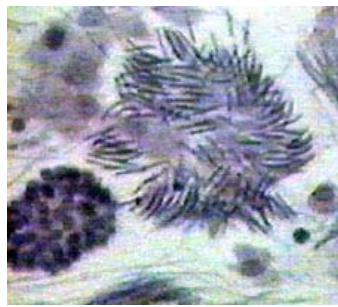
Prieš pradėdant slieko skrodimą, susipažinkite su slieko vidaus sandara (Bestuburių zoologija, 1983 – 162 psl.; Gyvūnų biologijos praktikumas, 2001 – 37 psl.).

Privalote žinoti, kaip atskirti slieko dorsalinę pusę nuo ventralinės ir priekinį kūno galą nuo užpakalinio. Raskite aiškios plačios juostos pavidalo balnelį (jis sudarytas iš sustorėjusio epitelio sluoksnio, kuriame gausu liaukučių) arčiau **priekinio** suaugusio slieko galo. Apžiūrėkite balnelį ir matysite, jog jis iš trijų pusių yra išgaubtas, o vienoje pusėje plokščias – ta pusė ir yra **ventralinė** slieko pusė. Be to, **dorsalinė pusė** dažniausiai yra tamsesnė nei ventralinė.

Paguldę slieką į preparavimo vonelę ir naudodamiesi žirkutėmis, darykite išilginį pjūvį slieko dorsalinėje pusėje nuo balnelio link galvos. Vidinis skysčio spaudimas gali išstumti vieną ar daugiau gelsvų sėklinių pūslelių į išorę ir tokiu atveju daugiau skrosti nebereikia - užtenka tiesiog žirkutėmis nukirpti vieną iš poros sėklinių pūslelių. Padėkite sėklinę pūslelę ant objekcinio stiklelio ir užlašinkite ant jos 0.6% fiziologinio tirpalo. Po to žirkutėmis darydami išilginį pjūvį 9 – 15 segmentuose, suraskite likusias sėklines pūsleles.

Jei sėklinės pūslelės, darant išilginį pjūvį, iškart nepasirodė, tuomet labiau atverskite slieko kūno sieneles pjūvio vietoje ir prisekite jas adatėlėmis prie preparavimo vonelės dugno (putų plasto) tam, kad būtų patogiau surasti sėklines pūsleles. Trys poros sėklinių pūslelių yra pakankamai stambios, rutuliškos, šviesiai gelsvos spalvos ir guli žarnos šonuose 9-15 segmentuose. Išskyrus pačią žarną, sėklinės pūslelės yra stambiausios struktūros kūno ertmėje, tačiau tarpusavyje jos nėra vienodo dydžio. Suradę sėklines pūsleles nukirpkite jų gabalėlį žirkutėmis ir dėkite ant objekcinio stiklelio, užlašindami 0.6% fiziologinio tirpalo.

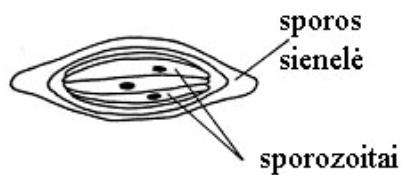
Naudodamiesi žirkutėmis ir adatėlėmis, išspauskite sėklinės pūslelės turinį (balsvos,pieniškos spalvos skystį) o patį audinį pašalinkite. Užlašinkite ant objektinio stiklelio papildomai kelis lašus 0.5% metileno mėlio arba 1% neutralaus raudonojo, ir sumaišykite su išspaustu sėklinės pūslelės turiniu. Uždenkite dengiamuoju stikleliu ir ieškokite gregarinių naudodami šviesinio mikroskopo 100 X arba 400 X padidinimą. Be gregarinių preparate matysite slieko spermatozoidų morules (spermatozoidų sankaupos apie maitinamąją ląstelę) (**Pav. 1**).



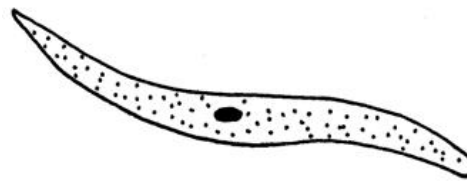
Pav. 1. *Monocystis* trofozoitas pasidengęs slieko spermatozoidų liekanomis, šalia (kairėje) matyti slieko spermatozoidų morulė.

Paruoštame preparate bus matyti daug slieko žiuželiuotų spermatozoidų sankaupų. Tai susitelkę spermatozoidai apie centrinę maitinamąją ląstelę. Jei tiriamas sliekas bus stipriai užsikrėtęs, matysite ir daug įvairių *Monocystis* stadijų. Jei sliekas užsikrėtęs nesunkiai, tai gregarinių teks ieškoti visame preparate ir jei nerasite viename paruoštame preparate, padarykite kitą – su kitos sėklinės pūslelės (ar kito slieko) turiniu.

Sliekai užsikrečia *Monocystis* sporomis maitinimosi metu per dirvožemį. Mažos, verpstiškos formos **sporos** yra storasienės (20 μm) (**Pav.2**), o jų viduje yra **sporozoitai** (**Pav. 3**), kurie išsilaisvina pasiekę slieko gurklį. Sporozoitai juda su žarnos turiniu, kol pasiekia skrandį ir prasiskverbę per jo sienelę, patenka į nugaros kraujagysles. Su krauju yra nunešami į priekį, link stemplės. Čia sporozoitai palieka kraujotakos sistemą ir prasiskverbia į sėklines pūsleles.



Pav.2 *Monocystis* spora.



Pav 3.. *Monocystis* sporozoitas

Sporozoitai maitinasi besivystančiais spermatoцитais sėklinių pūslelių sienelėse. Vėliau, migruoja į sėklinių pūslelių lumeną, kur subręsta į vegetatyvines ląsteles **trofozoitus**. Trofozoitas yra maitinimosi stadija (troph = maistas). **Jaunas trofozoitas** maitinasi besivystančiais spermatozoidais ir jų maitinamosiomis ląstelėmis, auga ir didėja, palaipsniui suardydamas spermatozoidų sandarumą. Trofozoitai pasidengia degeneruojančių spermatozoidų liekanomis ir atrodo tarsi patys būtų su žiuželiais ar šereliais, bet žiuželiai priklauso spermatozoidams, o ne parazitui (**Pav. 1**). Suvartojęs spermatozoidus, jaunas trofozoitas virsta **subrendusiu trofozoitu**. Skirtingai nuo kitų sporagvių, *Monocystis* subrendę trofozoitai, nesidaugina šizogonijos būdu.

Subrendę trofozoitai yra stambios (200 μm), beformės ląstelės ir matomos gana aiškiai jei tik jų yra paruoštame preparate. Šių ląstelių paviršius lygus, ant jo nėra spermatozoidų ar žiuželių liekanų. Turi stambų **branduolį** su didoku **branduolėliu**. Vidinė **endoplazma** yra granuluota. Branduolys geriau matomas, jei iš preparato pašalinama šiek tiek skysčio ir dengiamasis stiklelis labiau prispaudžia trofozoitą.

Du (kartais daugiau) trofozoitai susijungia į porą, vadinamą **sizigiją** ir kartu suformuoja rutulišką **gametocistą**, padengtą **cistos apvalkalu**. Susikabinusios dvi ląstelės išlieka nepriklausomos ir nesilieja. Buvę trofozoitai dabar vadinami **gamontais** (arba gametocitais) ir jie yra priešingų lytinių tipų, t.y. vienas determinuotas kaip moteriškas gametocitas, kitas kaip vyriškas, tačiau išoriškai šių skirtumų nesimato. Gamogonijos metu, kiekvienas iš dviejų gamontų, patiria daugybinį branduolio dalinimąsi, kurio pasekoje susiformuoja daug branduolių. Kiekvienas branduolys apsigaubia citoplazma ir atsiskiria nuo gamonto, tapdamas **gameta**. Gametos, produkuojamos abiejų gamontų yra skirtingų lytinių tipų, priklausomai nuo jų tėvinių gamonto.

Vis dar būdamos cistos apvalkale, priešingų lytinių tipų gametos susilieja suformuodamos diploidinę **zigotą**. Zigota yra vienintelė diploidinė *Monocystis* gyvenimo fazė. Kiekvienoje gametocistoje susiformuoja daug zigotų, kadangi susilieja daug gametų. Kiekviena zigota apie save sekretuoja storą išorinę sporos sienelę ir susiformuoja **spora**. Kiekvienoje gametocistoje susidaro daug sporų. Jos yra infekcinė *Monocystis*, kuria ir užsikrečia sliekai, ir kiti organizmai (paukščiai, gyvūnai), kurie maitinasi sliekais. Tačiau sporos yra nevirškinamos ir iš pastarųjų organizmų žarnyno pasišalina su fekalijomis, kur jas vėl gali praryti sliekai. Sporos dirvožemyje gali išbūti pakankamai ilgai. Parazito daroma žala nėra žymi, kadangi sliekai produkuoja labai daug spermatozoidų ir tas kiekis, kuris sunaikinamas sporagyvių, nėra labai reikšmingas. Savo preparate galite rasti keletą stambių rutuliškų gametocistų, užpildytų šimtais verpstišku storasienių sporų.

Sporos viduje, diploidinė zigota dalinasi mitozės ir mejozės būdu (vyksta **sporogonija**) ir susidaro aštuonios haploidinės dukterinės ląstelės. Kiekviena iš šių ląstelių diferencijuojasi į **sporozoitą**, bet visos išlieka kartu apgaubtos sporos sienele. Iš vienos gametocistos išeina šimtai tokių sporų. Jas taip pat galite matyti išsibarčiusias preparate. Gametocista arba iš jos išėjusios sporos, pasišalina per slieko sėklatakį (*vas deferens*) ir dirvoje laukia, kol bus prarytos kito slieko. Naujajame šeimininke, sporozoitai išeina iš sporos, patenka į hemalinę sistemą ir infekuoja sėklinės pūsleles. Atskirų sporozoitų savo preparatuose nematysite.

LITERATŪRA

1. Kazlauskas R. Bestuburių biologija. – Vilnius: Mokslas, 1988.- 384 p.
2. Mažiulis D. Starodubaitė M. Zoologija. Vilnius : Siveida, 2001. – 296 p.
3. Šatkauskienė I. Gyvūnų biologijos praktikumas. Kaunas : VDU leidykla, 2001 – 84 p.
4. Mader S. Biologija 1,2 T.Vilnius: alma litera,1999.

INTERNETINIAI PUSLAPIAI

<http://comenius.susqu.edu/BI/202/CHROMALVEOLATA/ALVEOLATAE/apicomplexa.htm>

http://faculty.evansville.edu/de3/b43403/PDFs/8_Apicomplexa_L.pdf

ŽODYNĖLIS:

Apikalinis kompleksas – specifinių morfologinių struktūrų kompleksas, padedantis sporagyviams patekti į šeimininko ląstelę, maitintis. Būdingas tik sporagyviams.

Gametocitai – pirminės lytinės ląstelės iš kurių vėliau formuojasi mikrogametocitai ir makrogametocitai.

Gamogonija – gametų formavimosi procesas.

Konoidas – ląstelės priekyje, apikaliniame komplekse, esantys mikrovamzdeliai, funkcionuojantys kaip ląstelės “burna” arba kaip atraminis darinys, patenkant į šeimininko ląstelę.

Kriptozoitai – morfologinė plazmodijaus forma

Merozoitai – sporagyvio forma (stadija), kuri skiriasi nuo šizonto morfologiškai.

Metakriptozoitai – morfologinė plazmodijaus forma.

Sporozoitai – infekcinė plazmodijaus ir kitų sporagyvių stadija.

Roptrijos – vakuoliškos struktūros, kurių viduje yra virškinamieji (proteolitiniai) fermentai arba fermentai, padedantys prasiskverbti pro šeimininko ląstelės membraną.

Šizogonija – nelytinis dauginimosi būdas, kuomet branduolys suskyla į daug dalių ir kiekvieną naują branduolį apgaubia nedidelis citoplazmos kiekis.

Šizontai – morfologinės plazmodijaus formos, susidariusios po šizogonijos.

