

Studium příjmu sinic larvami komárů a jejich stravitelnosti pomocí fluorochromu DAPI

Study on indigestibility and digestibility of cyanophytes by mosquito larvae using fluorochrome DAPI

Vladislav C e p á k ¹⁾ & František R e t t i c h ²⁾

1) *Katedra fyziologie a anatomie rostlin, Přírodovědecká fakulta
MU Brno, Kotlářská 2, CZ – 611 37 Brno*

2) *Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, CZ – 100 42 Praha*

Abstract

DAPI fluorescent staining was used to record cytomorphological changes in cyanophytes during the process of digestion by some mosquito larvae. Control cells were red due to fluorescence of chlorophyll and DNA structures (nucleoids) stained with DAPI emitted strong bluish light. Morphology of *Cyanothece*, *Cyanobacterium*, *Merismopedia*, and all *Synechococcus* strains dramatically changed along the gut. In the foregut, cells did not apparently differ from control. In the hindgut however, no chlorophyll fluorescence was observed, cells exhibited weakly bluish or yellowish fluorescence (typical for dead cells) and no DNA material or polyphosphate granules were observed. However the cells were not apparently broken (except of *Cyanothece*). The sequence of degradation of the material was chlorophyll, polyphosphate granules and DNA structures. In the strains of *Arthrospira*, *Chroococcus*, *Microcystis* and both *Synechocystis* strains no fundamental morphological differences were observed among the cells located in fore- and hindgut.

Úvod:

Kokální transgenní sinice obsahující BTI geny (kódující pro hmyz toxický delta-endotoxin) jsou stále perspektivními organismy pro hubení larev komárů přenášejících v tropických oblastech smrtelnou nemoc – malárii (PORTER et al. 1993). Dobrá stravitelnost sinic pro larvy (uvolnění toxických bílkovin) je základním předpokladem pro dobrou účinnost geneticky pozměněných sinic. Jejich stravitelnost je studována buď mikroskopicky (MARTEN 1986) nebo růstovým testem (THIERY et al. 1991). První metoda je založena na sledování změn fluorescence chlorofylu, druhá pak na množství buněk, které jsou schopny dále růst na agarové plotně.

K odhadu stravitelnosti sinic jsme použili fluorochrom DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), který barví DNA a při vyšších koncentracích polyfosfáty (COLEMAN 1978). Tato metoda umožňuje sledovat změny v obsahu chlorofylu, polyfosfátů a hlavně v morfologii DNA struktur – tzv. nukleoidů (CEPÁK 1996). Sledovali jsme tedy cytomorfologické rozdíly sinic, které se nacházely v přední a zadní části střeva.

Materiál a metody:

Larvy komárů *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* a *Anopheles stephensi* pocházejí ze sbírky Státního zdravotního ústavu v Praze. Původ sinic je uveden v Tabulce 1. Kmeny jsme pěstovali v živném roztoku Z8 (STAUB 1961) při 25°C a intenzitě světla 10 W.m⁻². K 10 ml suspenze sinic (10⁶ buněk na ml) jsme přidali DAPI (konečná koncentrace 10 µg.ml⁻¹) a po dvou hodinách DAPI vymyli. Při takové době barvení proniká DAPI do většiny sinic i bez použití fixace či detergentu. Buňky pak zůstávají živé. 10 komářích larev jsme umístili do kádinky s obarvenými sinicemi. Po 4 hodinách jsme odstranili střevo a pozorovali sinice pocházející z jeho přední či zadní části ve fluorescenčním mikroskopu JENALUMAR (Carl Zeiss Jena, Německo).

Tabulka 1: Původ studovaných kmenů
Table 1: The origin of the investigated strains

Organismus	Kmen	Původ	
<i>Arthrospira</i> sp.	LAPORTE 1963/M-132-2b	CCAO	N
<i>Chroococcus minor</i>	CEPÁK 1993/1	I	N
<i>Cyanothece aeruginosa</i>	B 87.79	SAG	S
<i>Merismopedia tenuissima</i>	CEPÁK 1994/1	I	S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	HINDÁK 1971/1	CCAO	N
<i>Synechococcus cedrorum</i>	B 88.79	SAG	S
<i>Synechococcus bigranulatus</i>	KOVROV 1972/8	CCAO	S
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	KRATZ-ALLEN/UTEX652	CCAO	S
<i>Synechococcus</i> sp.	CEPÁK 1994/3	I	S
<i>Synechocystis aquatilis</i>	VAARA 1978/CB-3	CCAO	N
<i>Synechocystis</i> sp	CEPÁK 1994/2	I	N

I = Izoláty z rýžových polí / Strains isolated from rice fields (Teluk-Dalam, Indonésie)

CCAO = Sbírka autotrofních organismů / Culture Collection of Autotrophic Organisms, Třeboň

SAG = Sbírka řasových kultur / Sammlung von Algenkulturen (Göttingen, Německo)

S –stravitelný / digestible ; **N** – nestravitelný / indigestible

Výsledky a diskuse:

Sledovali jsme cytomorfologii sinic po čtyřech hodinách příjmu čtvrtým instarem larev *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* a *Anopheles stephensi*. Vzhled *Synechocystis* v přední části střeva (začátek trávicího procesu) se nelišil příliš od vzhledu buněk v střední a zadní části. Polyfosfáty sice postupně zmizely a fluorescence chlorofylu nebyla tak jasná, avšak nukleoidy (DNA) neseznanly žádné změny a buňky byly zřetelně nepoškozeny. Buňky v zadní části střeva (před opuštěním larvy) byly životaschopné. Stejný výsledek jsme dostali v pokusech s *Arthrospira* sp., *Chroococcus minor* and *Microcystis aeruginosa*.

Za vhodných růstových podmínek (po opuštění střev) může být chlorofyl stejně jako zásoby fosforu (polyfosfáty) obnoveny. K tomu však nemůže dojít v případě destrukce genetického materiálu.

Změny cytomorfologie ostatních kmenů byly značné. V nejnápadnějším případě *Cyanothece aeruginosa* zmizely polyfosfáty krátce po pozření (na začátku střeva), fluorescence chlorofylu zeslábla a v buňkách středního střeva fluorescence vyhasla úplně. Morfologie nukleoidu se měnila pomaleji, ale v zadní části střeva nebyla viditelná již žádná vlákna DNA. Změny byly završeny rozkladem buněk. Osud ostatních kmenů uvedených v tabulce 1 byl stejný s tím rozdílem, že nedošlo k rozrušení buněk. Rozštěpení DNA bylo tedy nejnápadnější znakem těsně před rozpadem buňky.

Otázka tedy zní: Co můžeme považovat za znak stravitelnosti buněk sinic? Myslíme si, že destrukce genetického materiálu je explicitní znak mrtvé buňky. Buňky, ze které se pak může uvolnit delta-endotoxin, přinášející smrt svému hostiteli.

Další otázkou je, proč některé sinice jsou a jiné nejsou stravitelné? MARTEN (1986) uvádí, že nestravitelnost řas přímo souvisí s přítomností houževnaté sporopoleninové vrstvy. Jak jsme již dříve zjistili, tato vrstva, vyskytující se u některých zelených kokálních řas, obecně brání vstupu velkého množství látek či vnějších podnětů do buňky, včetně např. DAPI. Řasy se sporopoleninem (*Scenedesmus* či *Chlorella*) jsou velice obtížně barvitelné a je nezbytné dramatickými zásahy poškodit stěnu buněk (částečná desintegrace buněčné stěny zmražením, balotinou či hydroxidem). Složení buněčné stěny bude tedy hlavní příčinou toho, zda je či není řasa stravitelná. Sinice mají jiné složení buněčné stěny než výše zmíněné zelené řasy. DREWS & WECKESSER (1982) uvádí, že stavba stěny sinic je více méně totožná pro různé druhy, což je v poslední době stále častěji vyvráceno (GROMOV et al. 1986, ŠMARDÁ et al. 1996).

Zjistili jsme, že buňku může chránit silná slizovitá pochva, jak je tomu v případě vláknité sinice *Arthrospira* či kokální *Chroococcus*. Zbývající dva rody (*Synechocystis* a *Microcystis*) však sliz nevytvářejí a přesto stravitelné nejsou. SCHWIEGER & JONAS (1977) našli u *Synechocystis aquatilis* S-vrstvu (krystalická bílkovinná vrstva), která představuje až 10% podíl (MESSNER & SLEYTER 1988). ŠMARDÁ et al. (1996) uvádějí, že hexagonální S-vrstva (p6) je častá u rodů *Synechocystis* a *Microcystis*. S-vrstva tedy může být tou bariérou, která způsobuje rezistenci proti střevním trávicím enzymům larev komárů. Vedle hexagonální vrstvy ještě existuje tetragonální (p4) a strip-latticed S-vrstva (p2), jejichž struktura je odlišná od hexagonální. Vzhledem k tomu, že *Cyanothece* obsahuje p2 vrstvu je pravděpodobné, že v případě S-vrstvy bude záležet na její struktuře. V literatuře se však objevují kontroverzní údaje. KHAWALED et al. (1989) udávají nestravitelnost jednoho kmene *Synechocystis*, zatímco THIERY et al. (1991) udávají stravitelnost rodu izolovaného z mokřadů. Naši hypotézu bude tedy nutné dále zevrubně zkoumat.

Předběžně se ukazuje, že metoda fluorescenčního barvení pomocí DAPI je perspektivní pro studium stravitelnosti buněk sinic.

Poděkování

Tato práce získala finanční podporu Světové zdravotnické organizace (UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases TDR number ID 9105570).

Literatura

- CEPÁK, V. (1996): Variability of nucleoid morphology of some cyanophytes growing under various growth conditions. - Algological Studies 81: 39-52.
- COLEMAN, A. W. (1978): Vizualization of chloroplast DNA with two fluorochromes. – Exp. Cell. Res. 114: 95-100.
- DREWS, G. & WECKESSER, J. (1982): Function, structure and composition of cell walls and external layers. - In: CARR, N.G. & WHITTON, B.A. (eds.): The biology of cyanobacteria, Botanical Monographs, Vol.19. Blackwell Scientific Publication, p. 333-357.
- GROMOV, B.V., GAVRILOVA, O.V. & KONOVALOV, E.S. (1986): The fine structure of cyanobacterial cells of the *Cyanothece* genus. – Microbiologia 55: 824-825.
- KHAWALED, K., MULLA, M.S. & ZARITSKY, A. (1989): Distribution and abundance of algae in mosquito developmental sites. – Bull.Soc.Vector Ecol. 14: 71-80.
- MARTEN, G.G. (1986): Mosquito control by phytoplankton management: the potential of indigestible green algae. - J.Tropical Med. Hygiene 89: 213-222.
- MESSNER, P. & SLEYTER, V.B. (1988): Evidence for the glycoprotein nature of eubacterial S-layers. - In: SLEYTR, U.B., MESSNER, P., PUM, D. & SÁRA, M. (eds.). Crystalline Bacterial Cell Surface Layers. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NewYork, p. 11-16.
- PORTER, A., DAVIDSON, E.W. & LIU, J.-W. (1993): Mosquitocidal toxins of *Bacilli* and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. - Microbiol.Rev. 57: 838-861.
- SCHIEWER, D. & JONAS, L. (1977): Die Wirkung unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen auf die Ultrastruktur von Blaualgen. - II. *Synechocystis aquatilis*. - Arch.Protistenkd. 119: 146-162.
- STAUB, R. (1961): Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der planktonischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. - Schweiz. Z. Hydrol. 23: 82-198.
- ŠMARDÁ, J., ŠMAJS, D. & KOMRSKA, J. (1996): Advances in cyanobacterial S-layer. - Algological Studies 83: 501-510.
- THIERY, I., NICOLAS, L., RIPPKA, L. & TANDEAU DE MARSAC, N. (1991): Selection of cyanobacteria isolated from mosquito breeding sites as a potential food source for mosquito larvae. - Appl.Environ.Microbiol. 57: 1354-1359.