

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Maja KOVAČIČ

MORFOLOGIJA MOČERILOVIH TESTISOV

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Maja KOVAČIČ

MORFOLOGIJA MOČERILOVIH TESTISOV

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

MORFOLOGY OF THE TESTES OF THE OLM

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala doc. dr. Lilijano Bizjak Mali in za somentorja prof. dr. Borisa Buloga.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Primož ZIDAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Jasna ŠTRUS

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Boris BULOG

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Lilijana BIZJAK MALI

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 17.9.2013

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Maja Kovačič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 567/569:597.92:591(043.2)=163.6
- KG testis/morfologija/spermatogeneza/jamska dvoživka/*Proteus anguinus*
- AV KOVAČIČ, Maja
- SA BIZJAK MALI, Lilijana (mentor)/BULOG, Boris (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2013
- IN MORFOLOGIJA MOČERILOVIH TESTISOV
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 75 str., 4 pregl., 28 sl., 33 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Raziskali smo anatomijo in morfologijo testisa močerila (*Proteus anguinus*) ter opisali histološke značilnosti zarodnih celic. Testisi so nepigmentirani parni organi z variabilno morfologijo. Pojavljajo se trije tipi testisov: 1) ozki trakasti testisi, ki vključujejo spermatogonije, 2) testisi z eno ali več razširitvami, ki vključujejo spermatogonije in spermatocite ter 3) podolgovati nabrekli testisi z vsemi zrelostnimi fazami spolnih celic med spermatogenezo. Struktura testisa je iz številnih lobulov, znotraj katerih se spolne celice združujejo v skupke ali ciste. Razvoj spolnih celic znotraj cist je sinhron, razvoj cist v lobulih pa je lahko tudi asinhron. Spermalne celice smo glede na stopnjo zrelosti razdelili v šest faz: primarne in sekundarne spermatogonije, primarne in sekundarne spermatocite, spematide in spermatozoje. Spermatogoniji so največje celice z velikim evkromatskim jedrom. Prisotni so predvsem v skupkih cefaličnega dela testisa in v zožitvah testisa. Velikost preostalih zoritvenih faz spolnih celic se med spermatogenezo postopno zmanjšuje vse do spermatid, njihova jedra pa postajajo heterokromatska. Spermatociti so običajno v različnih stadijih profaze mejoze I, spermatide pa v različnih fazah spermiogeneze. Spermatozoji imajo podaljšano glavo s podolgovatim akrosomom, kratek vrat in dolg rep. Akrosom se začne tvoriti med spermiogenezo. Zoritev spolnih celic napreduje v cefalo-kavdalni smeri testisa, prav tako narašča zrelost spermalnih celic v proksimalno-distalni osi glede na notranje zbirne vode. Najbolj zrele zoritvene faze spolnih celic smo zasledili v testisih osebkov iz poletnega in zimskega obdobja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 567/569:597.92:591(043.2)=163.6
- CX testis/morphology/spermatogenesis/cave amphibian/*Proteus anguinus*
- AU KOVAČIČ, Maja
- AA BIZJAK MALI, Lijijana (supervisor)/BULOG, Boris (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2013
- TI Morfology of the testis of the Olm
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XI, 75 p., 4 tab., 28 fig., 33 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The anatomy and morphology of the testis in *Proteus anguinus* was examined by light microscope and histological characteristics of germ cells were determined. Testes are paired, non-pigmented organs with variable external morphology. Three different types of testes were described: 1) narrow ribbon-like testis with early stages of germ cells, 2) testis with one or more lobes containing spermatogonia and spermatocytes and 3) broad elongated testis with all stages of spermatogenesis. Testis consists of abundant lobules, each of them contains group of germ cells or cysts with synchronous development of germ cells. The development of cysts inside the lobule is either synchronous or asynchronous. Spermatogenic cells were classified into 6 stages based on their histological structure: primary and secondary spermatogonia, primary and secondary spermatocytes, spermatids and spermatozoa. Spermatogonia are the biggest cells with large euchromatic nuclei and they are located mostly in the cephalic part of the testis and inside the narrow segments of testis. The remaining spermatogenic germ cells stages were gradually reduced in size and their nuclei progressively become more heterochromatic. Spermatocytes are usually in different stages of meiotic prophase I and spermatids were in different stages of spermiogenesis during which acrosome begins to develop. Spermatozoa have elongated head with narrow and prolonged acrosome, short neck and long tail. Spermatogenesis progresses in cephalo-caudal direction of the testis, as well as in proximal-distal direction in relation to internal collecting ducts. Specimens with the most mature phases of spermatogenesis in testes belonged to summer and winter period.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA	str. III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO SLIK	VII
	KAZALO PREGLEDNIC	X
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1	UVOD	1
1.1	Opredelitev problema	1
1.2	Cilji naloge	2
1.3	Delovne hipoteze	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	Zgradba testisov vretenčarjev med spermatogenezo	3
2.2	Testisi repatih dvoživk	6
2.2.1	Notranja anatomija in histologija testisov	7
2.2.2	Sertolijeve celice in nastanek cist	8
2.2.3	Intersticijsko tkivo	9
2.3	Reproduktivni vodi samcev repatih dvoživk in oploditev	10
2.4	Spermatogeneza pri repatih dvoživkah	11
2.4.1	Morfologija zarodnih celic testisa	12
2.4.1.1	Primarni spermatogoniji	12
2.4.1.2	Sekundarni spermatogoniji	13
2.4.1.3	Primarni in sekundarni spermatociti	13
2.4.1.4	Spermatide in spermatozoi	14
2.4.2	Regulacija spermatogeneze pri dvoživkah	16
2.5	Reproduktivni cikli dvoživk	17
3	MATERIAL IN METODE	19
3.1	Material	19
3.2	Metode	21
3.2.1	Fiksacija in vklapljanje v paraplast	21
3.2.2	Barvanje parafinskih rezin	21
3.2.3	Mikroskopiranje	23
4	REZULTATI	24
4.1	Zunanja morfologija testisov	24
4.1.1	Oblika testisa in zoritvene faze spolnih celic	24
4.2	Anatomija testisov	29
4.2.1	Oblika testisov in anatomija testisa	29
4.3	Histološke značilnosti zoritvenih faz spermalnih celic	36

4.3.1	Spermatogoniji	36
4.3.2	Primarni in sekundarni spermatociti	39
4.3.3	Spermatide	43
4.3.4	Spermatozoi	47
4.3.5	Celice s piknotičnimi jedri	50
4.4	Oociti v testisih	52
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	54
5.1	RAZPRAVA	54
5.1.1	Zunanja morfologija testisov	54
5.1.2	Oblika testisa in zoritvene faze spermatogeneze	55
5.1.3	Anatomija testisov	59
5.1.3.1	Osnovna anatomija	59
5.1.3.2	Intersticijsko tkivo	61
5.1.4	Histološke značilnosti zoritvenih faz spermatogeneze	62
5.1.5	Celice s piknotičnimi jedri	66
5.1.6	Oociti v testisu močerila	67
5.2	SKLEPI	68
6	POVZETEK	70
7	VIRI	72
ZAHVALA		

KAZALO SLIK

- Slika 1. Shematski prikaz nastanka ciste pri anamniotih. A in B: Nastanek ciste. Sertolijeva celica (SC) ovije zarodno celico (PG) in oblikuje steno ciste. C: Z mitotičnimi delitvami primarnih spermatogonijev nastanejo sekundarni spermatogoniji (SG). D: Zarodne celice nato zorijo do spermatozoev in so z glavami orientirani k jedru Sertolijeve celice. E: Z odprtjem ciste se spermatozoji sprostijo. F: Sertolijeva celica po zaključku spermiacije degenerira. (Pudney, 1995: 461)..... 5
- Slika 2. Testisa črnega močerila (*P. anguinus parkelj*) v trebušni votlini. Ležita ob zunajem robu ledvic (Le). Cefalični del testisa je na desni strani slike. Osebek Č012. 24
- Slika 3a-c. Oblike testisov pri močerilu. a. Trakast testis. *P. anguinus parkelj*, Č009. b. Podolgovat in nabrekkel testis. *P. anguinus anguinus*, P141. c. Testis z razširitvijo. *P. anguinus anguinus*, P161. 26
- Slika 4a-b. Testisi z razširitvami (R). a. Testisa z eno razširitvijo. Kavdalni del (na sliki levo) je zožen in daljši od razširitve. *P. anguinus anguinus*, P194. b. Testisa z dvema razširitvama, ki ju povezuje zoženi predel. Kavdalna razširitev (na sliki levo) se zaključi z zožitvijo. *P. anguinus parkelj*, Č015. 27
- Slika 5a-c. Zgradba testisa na vzdolžnem (sl. a) in prečnem (sl. b,c) prerezu. a. Notranjost testisa je razdeljena v številne lobule. *P. anguinus anguinus*, P096. b. V lobulih so spolne celice v skupkih ali cistah, ki jih obdajajo Sertolijeve celice (s). *P. anguinus parkelj*, Č015. m, jedra mezorhija; L, lobul; T, tunica albuginea. c. Cista (C) s spermatogoniji (Sg) in Sertolijevo celico (s). Osebek PXY. Barvanje H&E. 31
- Slika 6a-c. Lobuli in ciste testisa. a. Lobuli s sinhronim razvojem cist. *P. anguinus parkelj*, Č015. b. in c. Lobuli z asinhronim razvojem cist. *P. anguinus anguinus*, P175. C, cista; L, lobul; V, vezivo lobulov. ScI, primarni spermatociti, aScI, spermatociti v anafazi I mejoze, Sd, zgodnje spermatide. a. in b. Barvanje H&E. c. Barvanje Feulgen. 32
- Slika 7a-d. Oblika in velikost lobulov pri podolgovatih in nabreklih testisih variira v smeri od cefaličnega proti kavdalnemu delu testisa. V cefaličnem delu (vrhnji del sl. a, sl. b) so lobuli (L) manjši, okrogle do ovalne oblike in vključujejo zgodnje faze spermatogeneze. V smeri proti kavdalnemu delu (sl. a) postajajo lobuli večji, bolj podolgovati (sl. c). V kavdalnem delu (sl. d) so lobuli največji in vključujejo zrelejše faze zoritve. *P. anguinus anguinus*, P141. Barvanje H&E. 33
- Slika 8a-b. Razporeditev zoritvenih faz v prečni osi testisa. Mlajše faze zoritve so ob vezivu osrednjega dela testisa, starejše pa v perifernem delu testisa. a. Trakasti testis. *P. anguinus anguinus*, P108. b. Podolgovat in razširjen testis. *P. anguinus anguinus*, P141. Sc, spermatociti; SgI, primarni spermatogoniji; SgII, sekundarni spermatogoniji; Ovd, osrednji vezivni del z vodi. Barvanje H&E. . 34

Slika 9a-b. Razporeditev zoritvenih faz v prečni osi testisa z razširitvami. Mlajše faze zoritve so ob vezivu osrednjega dela testisa, starejše pa v perifernem delu testisa. a. in b. Testis z razširitvijo. <i>P. anguinus anguinus</i> , P096. ScI, primarni spermatociti; SgI, primarni spermatogoniji; Ovd, osrednji vezivni del z vodi. Barvanje H&E.....	35
Slika 10. Lobuli z abnormalnimi spermatozoi (Sz) in Sertolijevevimi celicami (s). <i>P. anguinus anguinus</i> , P175. V, jedro vezivnih celic lobula. Barvanje Feulgen. ...	36
Slika 11a-c. Primarni spermatogoniji. a. Skupek primarnih spermatogonijev (SgI) obdajajo Sertolijeve celice (s). <i>P. anguinus parkelj</i> , Č009. Barvanje H&E. b. Jedra so evkromatska. <i>P. anguinus anguinus</i> , P175. Feulgen barvanje. c. Spermatogonij v metafazi mitotične delitve. <i>P. anguinus anguinus</i> , PXX. Barvanje H&E.	37
Slika 12a-c. Sekundarni spermatogoniji (SgII) v lobulih s centralnim lumnom. SgI, primarni spermatogoniji. <i>P. anguinus anguinus</i> , PXY. a in b. Barvanje H&E. c. <i>P. anguinus anguinus</i> , P141. Barvanje Feulgen.	38
Slika 13. Lobuli s primarnimi (ScI) in sekundarnimi spermatociti (ScII). Sd, spermatide. <i>P. anguinus anguinus</i> , P096. Barvanje H&E.	39
Slika 14a-b. Primarni spermatociti v stadiju pahitena (pScI). Jedro je okroglo, kromatin pa skoncentriran v dolge vrvice. <i>P. anguinus anguinus</i> ., P141. a. Barvanje H&E. b. Barvanje Feulgen.	40
Slika 15 a-b. Primarni spermatoci v stadiju diplotena (dScI). Kromatinske vrvice v jedru so gostejše, večje in razporejene po celotnem jedru ali pa pomaknjene ob rob jedra. <i>P. anguinus anguinus</i> , P141. a. Barvanje H&E. b. Barvanje Feulgen.....	41
Slika 16. Primarni spermatociti v anafazi mejoze I (aScI). <i>P. anguinus anguinus</i> , P175. Barvanje Feulgen.	42
Slika 17. Sekundarni spermatociti (ScII). Jedra sekundarnih spermatocitov so manjša, heterokromatin je v skupkih po celotnem jedru. Sd, spermatide. <i>P. anguinus anguinus</i> , P141. Barvanje H&E.....	42
Slika 18. Zgodnje spermatide (Sd) so okrogle, s heterokromatskim, ekscentrično nameščenim jedrom. <i>P. anguinus anguinus</i> , P141. Barvanje H&E.	43
Slika 19. Spermatide (Sd) v različnih fazah spermiogeneze. <i>P. anguinus anguinus</i> , P141. Barvanje H&E.....	44
Slika 20a-b. Zgodnja spermiogeneza z značilno kondenzacijo kromatina na enem polu jedra. <i>P. anguinus anguinus</i> , P141. Sd, spermatida; Kk, kondenziran kromatin. a. Barvanje H&E. b. Barvanje Feulgen.	45
Slika 21a-b. Faza podaljševanja spermatid (Sd). a. Spermatide so podaljšane, vidna je tudi že akrosomska regija (puščica). b. Podaljšana jedra spermatid. <i>P. anguinus anguinus</i> , P141. a. Barvanje H&E. b. Barvanje Feulgen.....	46
Slika 22. Pozne spermatide (Sd) ene ciste s podaljšanimi jedri in izrazitimi akrosomskimi vezikli (av). <i>P. anguinus anguinus</i> , P175. Barvanje H&E.	47

Slika 23a-b. Zgodnji spermatozoji. <i>P. anguinus anguinus</i> , P175. Szg, glavina regija spermatozoja; Szr, repna regija spermatozoja, s, jedro Sertolijeve celice.a. Trikromno barvanje. b. Barvanje Feulgen.	48
Slika 24a-b. Zreli spermatozoji. a. Sprednji konci glav spermatozojev. b. Osrednji deli glav (Szg) spermatozojev ter njihove vratne regije (Szv) in repki (Szr). <i>P. anguinus anguinus</i> , P175. Trikromno barvanje.....	49
Slika 25. Kromatin v jedrih zrelih spermatozojev (Sz). <i>P. anguinus anguinus</i> , P175. Barvanje Feulgen.	50
Slika 26a-c. Celice s piknotičnimi jedri. a. Posamezne celice z izredno heterokromatskimi jedri v lobulih s spermatogoniji (Sg). <i>P. anguinus anguinus</i> , P108. b in c. Ciste s piknotičnimi jedri (Pj) v lobulih s spermatociti (Sc). <i>P. anguinus parkelj</i> , Č015. Barvanje H&E.....	51
Slika 27. Oociti (Oo) so okrogle celice in opazno večje od spermatogonijev. <i>P. anguinus anguinus</i> , PXY. Barvanje H&E.	52
Slika 28a-b. Oocit (Oo) med primarnimi spermatociti (ScI). Sd, spermatide. V jedru oocita so številna jedrca in krtačasti kromosomi (sl. b). <i>P. anguinus anguinus</i> , P096. Barvanje H&E.....	53

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Podatki osebkov bele podvrste močerila (<i>P. anguinus anguinus</i>).....	20
Preglednica 2. Podatki osebkov črne podvrste močerila (<i>P. anguinus parkelj</i>).....	20
Preglednica 3. Oblika testisa in zoritvene faze spermatogenze pri močerilu (<i>Proteus anguinus</i>). Podana je tudi dolžina telesa in sezona žrtvovanja.....	28
Preglednica 4. Gonadosomatski indeks (GSI) in zoritvene faze spermalnih celic pri močerilu (<i>Proteus anguinus</i>). Podana je tudi dolžina telesa, masa telesa in gonad ter oblika testisa.	28

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

av	akrosomski vezikel
C	cista
Kk	kondenziran kromatin
L	lobul
Le	ledvica
m	jedro mezotelija
Oo	oocit
Ovd	osrednji vezivni del z vodi
Pj	piknotično jedro
R	razširitev
s	jedro Sertolijeve celice
Sg	spermatogoniji
SgI	primarni spermatogonij
SgII	sekundarni spermatogonij
Sc	spermatociti
ScI	primarni spermatocit
aScI	primarni spermatocit v anafazi I mejotske delitve
dScI	primarni spermatocit v stadiju diplotena profaze I mejotske delitve
pScI	primarni spermatocit v stadiju pahitena profaze I mejotske delitve
ScII	sekundarni spermatocit
Sd	spermatide
Sz	spermatozoi
Szg	glavina regija spermatozoja
Szr	repna regija spermatozoja
Szv	vratna regija spermatozoja
T	tunica albuginea
V	vezivo lobulov

1 UVOD

1.1 Opredelitev problema

Močeril (*Proteus anguinus*) je neotenična jamska dvoživka, edini evropski predstavnik družine močerilarjev (Proteidae) in edini izključno jamski vretenčar v Evropi. Je endemit podzemnih voda Dinarskega krasa. Posebnost njegovega razvoja je pedomorfnost, saj v larvalnem obdobju ni preobrazbe, značilne za večino dvoživk. Žival spolno dozori, vendar pa vse življenje ohranja nekatere juvenilne znake ličinke. Pri močerilu se pedomorfnost ohranja kot neotenijska, ki je upočasnen somatski razvoj ob normalnem razvoju gonad (Langecker, 2000, cit. po sl.wikipedia.org).

Močerili spolno dozoriijo zelo pozno, in sicer samci prej kot samice. Samci so spolno zreli pri 11 letih, samice pri 15 letih, pri temperaturi vode 11-12 °C (Juberthie in sod., 1996). Pri nižjih temperaturah vode spolno dozoriijo šele pri 17 letih. Močeril ima dolgo življenjsko dobo, 70 let ali več ter dolgo reproduktivno obdobje, ki traja 30 let. Njihov reproduktivni cikel je ekstremno dolg, samice odlagajo jajca vsakih šest let. So oviparne živali, jajca odlagajo kadarkoli tekom leta, največkrat pa med oktobrom in marcem (Jubertie in sod., 1996).

Testis odraslih repatih dvoživk je bodisi preprostega tipa z enim samim režnjem, nekateri pa imajo režnjaste testise, število režnjev se s starostjo povečuje (Uribe, 2009). Vsak reženj je osnovna enota testisa, vsi so si morfološko in funkcionalno podobni. Posamezni režnji imajo pravzaprav strukturno organizacijo miniaturnega testisa. Pod vplivom okoljskih dejavnikov, kot so temperatura, deževna sezona, fotoperioda, se v testisih pojavijo ciklične spremembe, ki so v korelaciji s sezonsko zoritvijo gamet. Reprodukivni cikel samcev dvoživk je razdeljen na dve glavni fazi: na periodo obnove zarodnih celic in diferenciacijo, ki pri večini dvoživk poteka v pomladnem in poletnem obdobju ter periodo spermiogeneze v poletnem in zimskem obdobju.

Morfologija testisa pri močerilu še ni raziskana, z diplomskim delom dopolnjujemo dosedanje poznavanje anatomije in histologije gonad ter zoritve zarodnih celic pri neotenični jamski dvoživki.

1.2 Cilji naloge

Naš namen je preučiti morfologijo testisa močerila (*Proteus anguinus*) in opisati histološke značilnosti zarodnih celic med spermatogenezo.

1.3 Delovne hipoteze

V diplomskem delu smo si zastavili naslednja vprašanja in predpostavke:

- testis močerila je enostaven in cističnega tipa;
- zoritev gamet znotraj cist je verjetno sinhrona, ciste vzdolž testisa pa so v različnih fazah zoritve, z zrelejšimi fazami zoritve v kavdalnem delu testisa;
- večji osebki imajo večje testise z zrelejšimi fazami spermalnih celic;
- zoritev spolnih celic ni odvisna od sezone, ker sezonske razmere v podzemlju niso spremenljive.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Zgradba testisov vretenčarjev med spermatogenezo

Pri večini vretenčarjev so testisi parna struktura, brezčeljjustnice in nekatere vrste rib kostnic pa imajo neparen testis (Pudney, 1995). Testisi ležijo v telesni votlini, povezani z dorzalnimi mezorhijem na dorzalno telesno steno (Pudney, 1995).

Oblike testisov pri vretenčarjih so različne, od ekstremno podaljšanih pri večini hrustančnic in kostnic, do okroglih in ovalnih kot jih imajo dvoživke, plazilci in ptice. Pri nekaterih vrstah repatih dvoživk, sleporilih in ribah kostnicah so testisi sestavljeni iz režnjev (Pudney, 1995; Uribe, 2003; Exbrayat, 2009).

Primarni vlogi gonad samcev sta proliferacija in diferenciacija zarodnih celic (spermatogeneza) ter sinteza in sekrecija hormonalnih steroidogenov (steroidogeneza), ki potekajo v somatskih celicah testisa, kar se odraža tudi v zgradbi testisa (Callard, 1992). Vretenčarski testis je grajen iz intersticijskega tkiva, ki vsebuje krvne žile, limfo in Leydigove celice, ki izločajo moške spolne hormone ali androgene ter iz seminiferne deli, ki vključuje zarodni epitelij, ki ga gradijo bazalna membrana, zarodne celice in Sertolijeve celice (Grier, 1993, cit. po Pudney, 1995). Zarodne celice skupaj s somatskimi Sertolijevimi celicami so evolucijsko konzervativna lastnost vseh vretenčarskih testisov (Pudney, 1995).

Spermatogeneza je pri vretenčarjih evolucijsko konzervativen proces (Pudney, 1995). Spermatogoniji se razvijejo v spermatocite iz katerih po mejozi nastanejo spermatide, ki v procesu spermiogeneze spremenijo svoje morfološke značilnosti in dozoriijo v zrele spermatozoje. Seveda pa obstajajo med vretenčarji razlike glede števila mitotičnih delitev spermatogonijev, različno je trajanje posameznih zoritvenih faz, razlike so v obliki in velikosti zrelih spermijev in v strukturni organizaciji testisa.

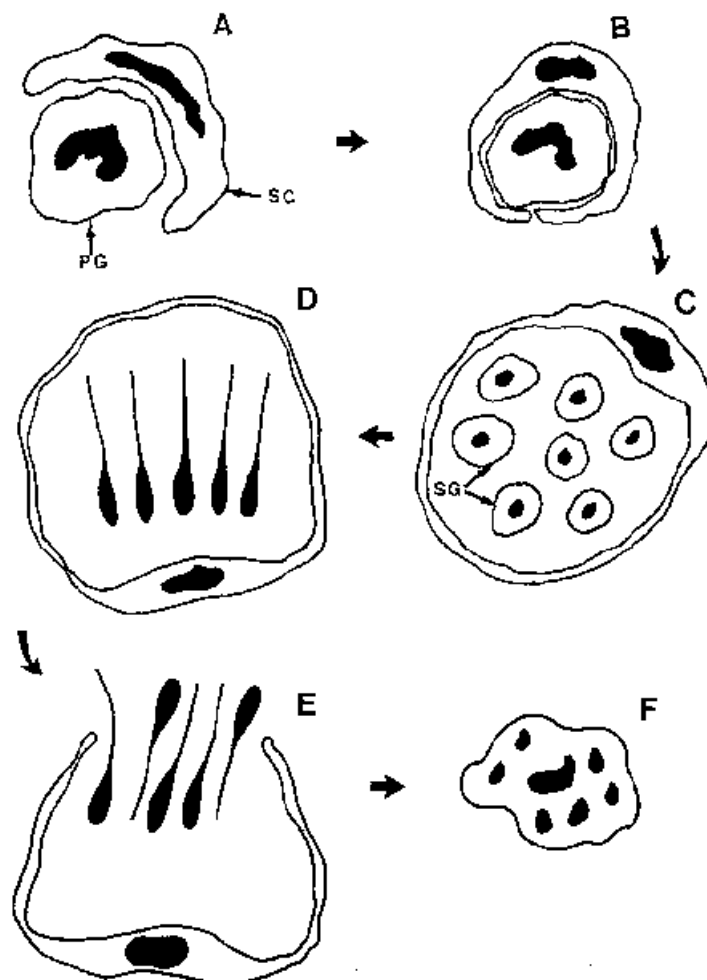
Pri anamniotih (ribah in dvoživkah) poteka spermatogeneza v spermatocistah ali cistah testisa (von La Valette in St. George, 1876, cit. po Pudney, 1995). Ciste so pri večini vrst znotraj semenskih lobulov testisa in jih v literaturi imenujejo tudi tubuli, ampule ali pa folikli (Callard, 1992; Pudney, 1995; Ogielska in Bartmanska, 2009).

Na spodnji sliki (sl. 1) je prikazan shematski nastanek ciste pri anamniotih. Posamezna cista nastane, ko Sertolijeva celica obda primarni spermatogonij in oblikuje steno ciste. Z mitotskimi delitvami primarnih spermatogonijev nastanejo skupki sekundarnih spermatogonijev, ki jih obkroža Sertolijeva celica. V cisti nato zarodne celice zorijo do spermatozoev, ki so z glavami orientirani k jedru Sertolijeve celice. Ob dozoritvi spermernih celic se cista odpre, spermatozoi se sprostijo, Sertolijeva celica pa po zaključku spermiacije degenerira.

Anamnioti nimajo stalnega zarodnega epitelija, saj so Sertolijeve in zarodne celice podvržene ciklični proliferaciji in propadu (Callard, 1992; Pudney, 1995). Stalen zarodni epitelij med anamnioti imajo edino brezrepki (Pudney, 1995).

Pri amniotih (plazilcih, ptičih in sesalcih) poteka spermatogeneza v semenskih kanalčkih, ki imajo stalno populacijo Sertolijevih celic in spermatogonijev, ki služijo kot rezervoar zarodnih celic in so odgovorne za vsakoletno obnovitev spermatogeneze.

Vzorec spermatogeneze pri vretenčarjih variira glede na to ali so vrste poikilotermne (ribe, dvoživke, plazilci) ali homeotermne (ptice, sesalci) in glede na reprodukcijsko sezono (Pudney, 1995). Spermatogeneza poikilotermnih vretenčarjev, ki imajo sezonski reproduktivni cikel, se začne kmalu po zaključku paritvene sezone in kontinuirano poteka vse do naslednje paritvene sezone. Pozimi lahko zoritev preneha in se nadaljuje spomladi. Pri homeotermnih vretenčarjih se spermatogeneza zaključi po sezoni parjenja, ponovno zorenje spermernih celic pa se začne na začetku naslednje paritvene sezone (Pudney, 1995). V splošnem imajo tako vsi vretenčarji sezonski cikel reproduktivne aktivnosti (Pudney, 1995).



Slika 1. Shematski prikaz nastanka ciste pri anamniotih. A in B: Nastanek ciste. Sertolijeva celica (SC) ovije zarodno celico (PG) in oblikuje steno ciste. C: Z mitotičnimi delitvami primarnih spermatogonijev nastanejo sekundarne spermatogonije (SG). D: Zarodne celice nato zoriijo do spermatozoidov in so z glavami orientirani k jedru Sertolijeve celice. E: Z odprtjem ciste se spermatozoidi sprostitjo. F: Sertolijeva celica po zaključku spermiacije degenerira. (Pudney, 1995: 461)

2.2 Testisi repatih dvoživk

Reproduktivni sistem repatih dvoživk je sestavljen iz parnih, podaljšanih testisov, sistema odvodnih vodov in kompleksa žlez kloake (Uribe, 2003). Testisa ležita paralelno z ledvicama, Wolffovima vodoma in rudimentarnima Müllerjevima vodoma ter sta povezana z dorzalno telesno steno z dorzalnim mezorhijem.

Testisi odraslih repatih dvoživk so bodisi iz enega ali pa več režnjev, slednji so si morfološko in funkcionalno podobni (Humphrey, 1922; Pudney, 1995; Uribe, 2003; Exbrayat, 2009, Uribe 2009). Posamezni režnji imajo pravzaprav strukturno organizacijo miniaturnega testisa. Režnji so linearno ali vzdolžno nameščeni in med seboj ločeni z ozkimi mostiči, ki so po dolžini lahko daljši od razširitev (Humphrey, 1922). V ozkih mostičkih so zarodne celice in jih prekriva epitel peritoneja, ki prav tako vključuje zarodne celice (Uribe, 2009).

Humphrey (1922) je pri močeradu *Desmognathus fuscus* opisal nastanek mnogodelnega testisa, ki naj bi nastal zaradi počasnega napredovanja spermatogenega vala vzdolž testisa in zakasnjene regeneracije izpraznjenih lobulov. Lobuli repatih dvoživk ne dozoriijo in sprostijo spermatozoev hkrati. Spermatogeni val se postopoma širi v cefalo-kavdalni smeri testisa, hitrost pa je med vrstami različna.

Pri močeradu *Desmognathus fuscus* (Humphrey, 1922) je testis sprva tanek zarodni filament, ki vključuje primarne spermatogonije, vzdolž testisa pa poteka vzdolžni zbirni vod. Na kavdalnem delu anteriornega zarodnega filamenta se prične delitev spermatogonijev, tvorijo se lobuli. Razvoj se zelo upočasnjeno nadaljuje cefalo-kavdalno in v prvem spolnem ciklu živali spermatogeni val ne sega skozi celotno dolžino testisa. Sekundarni spermatogoniji se razvijejo v primarne spermatocite samo na anteriornem delu testisa. Nato nekaj lobulov, ki vključujejo spermatogonije degenerira, to področje je t.i. »mejno področje«, kavdalno od njega pa se razvijejo spermatozoi. Takrat je testis sestavljen iz enega režnja. Anteriorno od mejnega področja so zarodne celice, ki se razvijejo naprej šele naslednjo paritveno sezono. Po sprostitvi spermatozoev v zbirne vode je regeneracija lobulov zakasnjena. Nekaj rezidualnih spermatogonijev, ki se nahajajo v

apeksu vsakega lobula, miruje nekaj mesecev. Med zimo izpraznjeni lobuli degenerirajo, celice vezivnega dela hipertrofirajo in tvorijo intersticijsko tkivo. Naslednje poletje se regija anteriorno od mejnega področja ponovno razvije v funkcionalni testis, spermatogeni val pa se nadaljuje počasi, dokler se ponovno ne vzpostavi novo »mejno področje«. Regija s propadlimi lobuli in intersticijskimi celicami izgine in ponovno ostanejo le rezidualni spermatogoniji.

Na kavdalnem delu testisa hkrati poteka podoben proces kot na anteriornem delu, kjer se nahaja kavdalni zarodni filament. Rezidualni spermatogoniji najbolj posteriornega dela kavdalnega filameta se delijo. Njihova delitev vodi do nastanka lobulov s sekundarnimi spermatogoniji, ki se razvijejo v primarne spermatocite in dozoriijo v spermatozoje. Spermatogeni val se počasi pomika cefalno vzdolž kavdalnega filameta, na enak način kot pri tvorbi prvega režnja na anteriornem zarodnem filamentu. Mejna področja nastajajo vsako sezono, na enak način. Anteriorno od mejnih področij vedno zorijo spermatogoniji v primarne spermatocite. Sekundarni reženj se tvori kavdalno od prvega, vmes pa je področje mirujočih zarodnih celic. Ponavljajoči proces pomeni, da se novi režnji tvorijo naprej od prvega oz. vsako leto najbolj anteriorni reženj napreduje cefalno za razdaljo, ki ustreza velikosti regije zorečih in zrelih spermatozoev.

2.2.1 Notranja anatomija in histologija testisov

Znotraj vsakega testisa so številni vzdolžni lobuli, ki so nameščeni v cefalo-kavdalni osi testisa. Lobuli komunicirajo s sistemom vodov znotraj testisa, ki vodijo zrele spermatozoje med spermiacijo iz testisa preko odvodnih vodov v kloako. Testis obkroža tanek površinski mezorhij in tanka vezivna ovojnica ali tunica albuginea, ki vključuje vezivne celice, vlakna, krvne žile in pri nekaterih vrstah tudi pigmentne celice ali melanocite (Uribe, 2003). Lobuli so med seboj pregrajeni s tankim vezivnim tkivom, ki je po zgradbi podobno vezivni ovojnici, vendar vključuje tudi limfne kapilare (Uribe, 2003).

Vsak lobul testisa vsebuje veliko število cist z različnimi stopnjami spermatogeneze, v vsaki cisti pa so sinhrono zoreče zarodne celice (Pudney, 1995; Uribe, 2009).

Razporeditev zoritvenih faz znotraj testisa je v cefalo-kavdalni smeri testisa (Moore, 1975, Tso in Lofts, 1977, Trauth 1983, Pratt 1988, Bergmann 1994, Uribe in sod., 1994, cit. v Uribe, 2003; Pudney, 1995). V cefalični regiji testisa so spermatogoniji in lobuli s cistami primarnih in sekundarnih spermatocitov. V kavdalni regiji testisa so lobuli s cistami zrelejših faz zoritve, kot so spermatide in spermatozoi. Taki ureditvi zoritvenih faz vzdolž testisa pravijo tudi zonalna razporeditev in je značilna tudi za ribe (Grier, 1981, Selman in Wallace, 1986, Lofts, 1987, cit. po Uribe, 2003; Pudney, 1995). Spermatogeneza se prične na kavdalnem delu testisa in napreduje v cefalični del testisa (Pudney, 1995). Tako so lobuli vzdolž testisa v zaporednih fazah zoritve, z najmanj zreliimi lobuli v cefaličnem delu testisa.

2.2.2 Sertolijeve celice in nastanek cist

Ciste znotraj lobulov testisa nastanejo, ko Sertolijeva celica obda primarni spermatogonij in oblikuje steno ciste (Pudney, 1995; Uribe, 2003). Med spermiacijo, ko se ciste odpro in se spermatozoi sprostijo v odvodne vode (eferentne dukte), Sertolijeve celice začasno ostajajo v lobulih in vršijo fagocitozo abnormalnih spermatozoev, imajo tudi začasno sekrecijsko vlogo, nato pa degenerirajo (Uribe, 2003). Nadomestijo jih intersticijske Leydigove celice, ki se diferencirajo v žlezno tkivo.

Razvoj zarodnih celic znotraj vsake posamezne ciste je sinhron, kar pomeni, da so celice znotraj ciste v isti fazi spermatogeneze. Sinhronost razvoja zarodnih celic znotraj posamezne ciste tekom spermatogeneze je rezultat medceličnih povezav med njimi, kot tudi posledica interakcij med zarodnimi celicami in Sertolijevimi celicami (Uribe, 2009). Oblikuje se selektivno prepustna pregrada do zarodnih celic med spermatogenezo, ki omogoča endokrino aktivnost, fagocitozo degenerajočih zarodnih celic in abnormalnih spermatozoev med spermiacijo ter rezidualnih teles in omogoča tvorbo specifičnih antigenov (Pudney, 1995; Uribe, 2003). Stik med spermatogoniji in Sertolijevimi celicami se pojavi že ob nastanku cist (Pudney, 1995). Spermatogoniji oblikujejo na svoji periferiji številne citoplazemske podaljške, ki uvihajo citoplazmo obdajajoče Sertolijeve celice. V kasnejših fazah razvoja zarodne celice izgubijo fizični kontakt s Sertolijevimi celicami (Pudney, 1995).

2.2.3 Intersticijsko tkivo

Intersticijsko žlezno tkivo ni diferencirano v vseh fazah spermatogeneze, tvori se le med spermiacijo, ko Sertolijeve celice degenerirajo. Intersticijsko tkivo tvorijo steroidogene Leydigove celice, ki so mesto sinteze androgenov (testosterona in 5α -dihidrotestosterona) (Moore in sod., 1979, cit. po Uribe, 2003).

Morfološke spremembe intersticijskega tkiva so v tesni korelaciji s sezonskimi cikli spermatogeneze in s tem tudi reproduktivnimi cikli. Intersticijske celice, ki obkrožajo lobule so sprva majhne celice in po obliki podobne fibroblastom (Fraile in sod., 1989). Po koncu zoritvenega cikla spermalnih celic, tik pred sprostitvijo spermatozoev, se celice intersticijskega tkiva povečajo in oblikujejo žlezno tkivo (Fraile in sod., 1989; Humphrey 1921, Pudney in Callard 1984, cit. po Uribe, 2003). Ko je spermiacija zaključena, žlezno tkivo hitro uplahne, celice so manjše in nepravilnih oblik s piknotičnimi jedri in amorfnostjo ter svetlo citoplazmo.

2.3 Reproktivni vodi samcev repatih dvoživk in oploditev

Sistem odvodnih vodov testisa vključuje odvodne vode znotraj testisa (rete testis), prečne odvodne vode (vassa eferentia), paren Wolffov vod in paren rudimentaren Müllerjev vod. Paren Wolffov vod dvoživk ima funkcijo sečnega voda, kot tudi vlogo transporta spermatozoev do kloake (Norris, 1987, cit. po Uribe 2003).

Odvodni vodi reproduktivnega sistema imajo značilno zgradbo, ki se spreminja skladno s sezonskim ciklom testisov. Vodi so izrazito povečani med spermiacijo, ko so spermatozoi številni (Norris in sod., 1985, cit. po Uribe, 2009).

Odvodni vodi, ki so znotraj testisa (rete testis) so v vezivnem tkivu med lobuli. Epitelij je enoslojen kubični, v svetlini lobula je ponavadi nekaj spermatozoev.

Prečni odvodni vodi, ki potekajo od testisa do anteriorne regije nefronov ledvice, so zgrajeni iz kubičnega epitelija z mikrovili, v citoplazmi so številne vakuole, ki kažejo na sekrecijsko aktivnost (Uribe, 2003).

Paren Wolffov vod je največji odvodni vod. Zgornja regija kanala ima nepravilen stebričast epitelij, srednja regija pa kubični epitelij. Spodnji del kanala, ki ima sekrecijski stebričast epitelij, se pred sezono parjenja poveča zaradi skladiščenja spermatozoev (Williams in sod., 1984, Norris in sod., 1985, Norris, 1987, Zalisko in Larsen 1988, cit. po Uribe, 2003). Prav tako se v tem času izrazi sekrecijska aktivnost spodnjega dela Wolffovega voda, ki zagotovi primerno okolje za skladiščenje spermatozoev, ki se v tem delu voda zadržijo do sezone paritve.

Večina repatih dvoživk ima posredno notranjo oploditev. Samci odlagajo spermatofore, želatinaste vrečke s spermatozoi, ki jih samice ob paritvi poberejo v kloako, v spermateki pa ostajajo vse do ovulacije. Spermatofore odlaga večina repatih dvoživk, izjema so nekatere vrste iz družine kotnozobcev (Hynobiide) in orjaških močeradov (Cryptobranchidae), ki imajo zunanjo oploditev in nekatere vrste iz družine dvonožk (Sirenidae) (Lofts, 1984 cit. po Uribe, 2009).

Z odkritjem spermatofor v gojitvenem bazenu z močerili, je Briegleb leta 1961 potrdil notranjo oploditev močerila (cit. po Aljančič, 1961). Opisal je tudi zgradbo spermatofora, ki sestoji iz podstavka, krajšega držaja in votle glavice, s katere kot laski štrle spermiji. Podstavek sestavljajo galertaste kroglice, glavica je iz sluzi, ki jo prekrivajo spermiji.

2.4 Spermatoogeneza pri repatih dvoživkah

Pri večini repatih dvoživk je spermatoogeneza ciklična, tesno povezana z menjanjem letnih časov (Moore 1975, Sever 1975, Miltner in Armstrong 1983, Lofts 1984, Norris in sod., 1985, Uribe in sod., 1991, cit. po Uribe, 2003), zato se velikost testisov in histološke značilnosti skozi leto spreminjajo. Med sezono parjenja se testisi, odvodni vodi in kloaka povečajo ter uplahnejo po spermiaciji, s tem pa se spreminja tudi histološka zgradba teh organov skozi leto (Uribe, 2009).

Obnova zarodnega tkiva poteka spomladi, ko poteka proliferacija ali pomnoževanje spermatogonijev in zgodnja diferenciacija spermatogenih faz. Med poletjem v testisu prevladujejo zrelejše faze zoritve. V jeseni in pozimi pa so najštevilčnejši spermatozoi in zapolnjujejo večino lobulov testisa, pojavi se spermiacija, ki je sprostitvev spermatozoev v sistem odvodnih vodov (Sever, 1975, Miltner in Armstrong, 1983, Lofts, 1984, Uribe in sod., 1991, Norris, 1997; cit. po Uribe, 2003, Uribe, 2009).

Pri marmornatem pupku *Triturus marmoratus marmoratus* (Ricote in sod., 2002, cit. po Uribe, 2003) so spermatoogenezo glede na sezonske spremembe testisa razdelili v a) obdobje proliferacije, ki vključuje proliferacijo spermatogonijev in formiranje spermatid (april-junij), b) obdobje spermiogeneze, ko se spermatide preobrazijo v spermatozoe (julij-september) in c) obdobje regresije, ko Sertolijeve celice in Leydigove celice postanejo žlezno tkivo (oktober-april). To žlezno tkivo degenerira ob koncu spermiogeneze.

Na podlagi morfoloških značilnosti zarodnih celic lahko spermatoogenezo razdelimo v 1) fazo proliferacije v kateri potekajo mitotične delitve, 2) fazo mejoze, ki vključuje podvojevanje DNA in genske rekombinacije ter 3) fazo diferenciacije, v kateri se spermatide transformirajo v spermatozoe (Pudney, 1995; Clermont, 1972, Russel in sod. 1990, cit po Segatelli in sod., 2009).

Časovno obdobje spermatogeneze je pri različnih vrstah dvoživk različno in je za posamezno vrsto konstantno, ni pa filogenetsko določeno in je pod kontrolo genotipa zarodnih celic (Segatelli in sod., 2009). Tako na primer pri močeradu *Plethodon cinereus* poteka mejoza 26 dni, spermiogeneza pa 10 dni (Morgan, 1979, cit. po Segatelli in sod., 2009). V splošnem je spermiogeneza pri nižjih vretenčarjih kratka faza (Segatelli in sod., 2009).

2.4.1 Morfologija zarodnih celic testisa

Med spermatogenezo in spermiogenezo vretenčarjev se kromatin molekularno reorganizira in kondenzira, da postane bolj kompakten in metabolno inerten. Tako je starševska DNA v jedru zaščitena pred fizičnimi poškodbami in kemijskimi mutageni med transportom do mesta fertilizacije (Manochantr in sod., 2003).

Uribe (2003) je na podlagi morfoloških in histoloških značilnosti opisala razvojne stopnje zarodnih celic in njihovo diferenciacijo med procesom spermatogeneze pri dveh vrstah aksolotlov *Ambystoma dumeriili* in *A. mexicanum*.

2.4.1.1 Primarni spermatogoniji

Primarni spermatogoniji so bodisi posamezno v vezivnem tkivu cefalične regije testisa ali pa tvorijo majhne skupke. Zastopani so tudi v vezivnem tkivu okoli lobulov, ki vključujejo pozne faze zoritve zarodnih celic. Primarni spermatogoniji se delijo z mitozo spomladi, ko je aktivna spermatogena sezona, njihovo število raste in obnavljajo zarodno linijo. So največje zarodne celice, od 40 do 50 μm v premeru in so okrogle oblike. Jedro je nepravilne do okrogle oblike z zrnatim kromatinom in enim ali dvema jedrcema. Citoplazma je rahlo zrnata. Vsak spermatogonij postopoma obda Sertolijeva celica, s katero tvori cisto (Uribe, 2003).

2.4.1.2 Sekundarni spermatogoniji

Sekundarni spermatogoniji so manjši, merijo od 35 do 45 μm in imajo jedro okrogle oblike, ki je podobnega videza kot pri primarnih spermatogonijih. Sekundarni spermatogoniji so v skupkih, znotraj katerih se postopno oblikuje centralni lumen. Z večkratnimi, zaporednimi delitvami se njihovo število povečuje. Nato preidejo v mejozo, katere rezultat so štiri haploidne gamete iz vsake celice. Mejoza vključuje dve zaporedni celični delitvi, vendar se samo pri prvi kromosomi podvojijo. Sekundarni spermatogonij se preoblikujejo v primarni spermatocit brez celične delitve (Weather in sod. 1988, cit. po Uribe, 2003).

2.4.1.3 Primarni in sekundarni spermatociti

Primarni spermatociti so okrogle celice, po velikosti podobne sekundarnim spermatogonijem (od 35 do 45 μm). V jedrih vključujejo podvojeno garnituro kromosomov v različnih stadijih profaze I mejotske delitve: leptoten (fino mrežast kromatin); zigoten (fino vlaknast vzorec homolognih podvojenih kromosomov v sinaptonemi); pahiten (podvojeni kromosomi v prekrižanju); diploten (razhajanje homolognih diploidnih kromosomov, z značilnostmi mejotskega prekrižanja ali kiazme). Pahiten faza traja najdlje, leptoten in zigoten fazi sta krajši, najkrajša pa je diploten faza. Pri številnih vrstah repatih dvoživk traja pahiten faza od 20 do 21 dni, leptoten in zigoten faza od 5 do 8 dni ter diploten le od 1 do 2 dni (Armstrong, 1989, cit. po Uribe, 2003). Primarni spermatociti nato nadaljujejo v metafazo I (homologni kromosomi so nameščeni v ekvatorju), anafazo I (razdvojevanje homolognih kromosomov na nasprotni poldrogi) ter telofazo I (prva mejotična delitev) s katero nastajajo sekundarni spermatociti (Uribe, 2003).

Sekundarni spermatociti imajo polovico podvojenih kromosomov, torej en podvojen kromosom, ki izhaja iz enega homolognega para. So okrogle celice in bistveno manjše od predhodnih zoritvenih faz (17 μm v premeru). Jedro ima vlaknast kromatin. V drugi celični delitvi mejoze se sestrške kromatide ločijo, kar vodi v nastanek štirih haploidnih spermatid. Sekundarni spermatociti so v testisu redkeje videni, ker je celoten proces zelo hiter (Uribe, 2003).

2.4.1.4 Spermicide in spermatozoji

Spermicide so haploidne celice, ki nastanejo po dveh zaporednih fazah mejotične delitve. Zgodnje spermicide so okrogle in velike v povprečju 15 μm (Uribe, 2003).

Spermatida I ima prisotno okroglo ali ovalno jedro, velikosti 4-5 μm . Kromatin je bolj enakomerno porazdeljen kot pri sekundarnih spermatocitih, ker pa je velikost jedra zmanjšana, večji del zavzema citoplazma (Manochantr in sod., 2003).

Jedro se pri spermaticdah II še nekoliko zmanjša in postane ovalno in ni več centralno nameščeno v celici. Nastajati prične akrosom, kot kratek, debel, vendar ploščat segment ob jedrni ovojnici, kjer je Golgijev aparat (Manochantr in sod., 2003).

Jedro spermatid III je podaljšano, kromatin pa je enakomerno gosto porazdeljen. Akrosom je viden kot povečana, debela plošča na enem polu jedra. Citoplazma se pomakne na kavdalni del jedra ter se podaljša. Na kavdalnem delu jedra sta centriola, ki ju obdaja fibrilaren plašč in tvorita bazo aksoneme repa (Manochantr in sod., 2003).

Spermicide IV so običajno ob lumnu semenskih cevk, z glavami vpete na Sertolijeve celice. Jedro je izraziteje podaljšano, kromatin pa zgoščen. Citoplazma je porinjena na nasprotno stran od pozicije akrosoma. Akrosom je viden kot kapa nad anteriornim delom jedra (Manochantr in sod., 2003).

Spermicide se postopno preoblikujejo v spermatozoje, brez delitve, v procesu spermiogeneze. V tem času se spermicide postopno podaljšujejo. Pozne spermicide imajo podaljšano glavo (povprečna dolžina je 25 μm) z jedrom in bazalno telo z bičkom (Uribe, 2003).

Morfologija spermatozojev je pri repatih dvoživkah relativno uniformna, razen pri rodovih iz družine dvonožk (Sirenidae). Spermatozoje sestavljajo podaljšana velika glava, ki vključuje akrosom in jedro, povezovalni del ali vrat ter rep, ki vsebuje aksonemo, valovito membrano in aksilarno vlakno (Pudney, 1995; Wortham in sod, 1977, 1982, cit. po Uribe, 2005; Scheltinga in Jameson, 2003). Akrosomski kompleks je nameščen na apikalnem delu

jedra (Fewcett, 1970, cit. po Uribe, 2009), sestavljata ga akrosomski vezikel in perforatum, ki vsebujeta proteolitske encime za prehod spermatozoev med oploditvijo skozi želatinozne plasti in vitelinsko ovojnico, ki obdajajo jajčece (Uribe, 2005). Akrosom je lahko koničast, v obliki okroglega gumba, pri nekaterih vrstah pa je v obliki kljukaste bodice (Pudney, 1995). Akrosomski kompleks in njegovi prekursorji izvirajo iz Golgijevega aparata. Golgijevi vezikli v spermatidah se združijo v en akrosomski vezikel (Scheltinga in Jamieson, 2003), ki nastane na nasprotni strani Golgijevega aparata kot sta centriola (Rastogi in sod. 1988, cit. po Scheltinga in Jamieson, 2003).

Rep je povezan s kavdalnim delom vratu in je sestavljen iz podpornega aksialnega vlakna, pripetega na lateralno aksonemo z valovito membrano (Brandon in sod., 1974, cit. po Uribe, 2009). V anteriorno-posteriorni smeri je rep sestavljen iz treh regij: srednjega, glavnega in končnega dela. Srednji del vsebuje mitohondrije, aksonemo, valovito membrano in aksialno vlakno. Glavni del vsebuje enake sestavine, le da ni mitohondrijev, konec aksialnega vlakna in valovita membrana sta na kavdalnem delu glavnega dela. Kratek končni del pa vsebuje samo aksonemo (Scheltinga in Jameson, 2003; Uribe, 2009).

Zreli spermatozoji so v cisti vrtinčasto urejeni ter z glavami poravnanimi in orientiranimi v enaki smeri (Uribe, 2003).

Kromatin spermatid in spermatozoev je tesno kondenziran in je tako v obliki, ki omogoča transport genetskega materiala spermatozoev brez izgub genske informacije (Burlibaša in Gavrilă, 2005).

Med spermiacijo se ciste odpro, spermatozoji se sprostijo, Sertolijeve celice pa postopno degenerirajo (Carrick, 1934, Pudney in sod., 1983, cit po Uribe, 2003). V nekaterih praznih cistah ostajajo acidofilni ostanki Sertolijevih celic, kot tudi spermatozoji abnormalnih oblik in velikosti, ki jih kasneje Sertolijeve celice fagocitirajo (Schindelmeise in sod., 1985, cit. po Uribe, 2003). Po sprostitvi zrelih spermatozoev iz cist se le-ti zberejo v odvodnih cevkah testisa. Posledično so te cevke v tem času izrazito nabrekle (Williams in sod., 1984, Norris in sod., 1985, Armstrong, 1989, cit. po Uribe, 2003).

2.4.2 Regulacija spermatogeneze pri dvoživkah

Spermatogeneza dvoživk je tako kot pri drugih vretenčarjih pod kontrolo neuroendokrinega sistema (Callard, 1992; Uribe, 2003), izzovejo pa jo dejavniki, kot so temperatura, deževna obdobja in fotoperioda. Neuroendokrini sistem vključuje hipotalamično-hipofizno os, ki skupaj z gonadotropnimi hormoni regulira proces zoritve zarodnih celic in sekrecijo moških steroidnih hormonov. Steroidni hormoni določajo razvoj in funkcionalne spremembe odvodnih vodov in žlez kloake med reproduktivnim ciklom, kot tudi razvoj sekundarnih spolnih znakov in paritveno vedenje, kot so migracije živali v vodo za dvorjenje in parjenje (Uribe, 2003).

Različne študije so pokazale, da sta dva najpomembnejša okoljska faktorja, ki vplivata na cikel v testisih pri dvoživkah, fotoperioda in temperatura (Lofts, 1974, Fraile in sod. 1988, cit. po Fraile, 1989). Študija pri pupku *Triturus marmoratus* je pokazala, da fotoperida pravzaprav nima direktnega vpliva na steroidogenezo, saj se žlezno tkivo oblikuje tudi v popolni temi, takoj po zaključku mejoze (Fraile in sod., 1989). Pomembnejšo vlogo ima temperatura, saj temperature večje od 30 °C ovirajo spermatogenezo in zmanjšujejo tvorbo žleznega tkiva (Fraile in sod., 1989). Spermatogeneza pa naj bi imela tudi spodnjo temperaturno mejo, s čimer bi lahko razložili, zakaj v hladnejših mesecih (januar-februar) žlezno tkivo miruje in je aktivno ponovno v toplejših pomladnih mesecih (Fraile in sod., 1989).

Proliferacijo in diferenciacijo primarnih spermatogonijev v testisih repatih dvoživk stimulira folikel-stimulirajoči hormon hipofize, ki je odvisen od delovanja aktivina β A, ki ga proizvajajo Sertolijeve celice (Callard, 1992; Pierantoni, 2002).

Glavni hormon, ki se sintetizira v celicah žleznega tkiva je testosteron (Lupo di Prisco in sod., 1972, Bouhvard in sod., 1983, Teravainen in sod., 1984, cit. po Fraile in sod, 1989). Najvišja koncentracija testosterona v plazmi repatih dvoživk je spomladi in jeseni (Specker in Moore, 1980, Tanaka in Takikawa, 1983, Imai in sod., 1985, Garnier, 1985, cit. po Fraile in sod, 1989). Povečan nivo testosterona, ki sledi nastanku žleznega tkiva v jeseni, ima vlogo pri zorenju sperme v odvodnih vodih kot tudi pri razvoju sekundarnih spolnih znakov (Specker in Moore, 1980, Tanaka in Takikawa, 1983, Imai in sod., 1985, Garnier, 1985, cit. po Fraile, 1989). Spomladi, ko je nivo testosterona tudi povečan pa najverjetneje vpliva na obnovitev spolnih znakov, ki so delno nazadovali med zimo ter ima vlogo pri parjenju in pri začetku novega spermatogenega vala (Fraile in sod., 1989).

2.5 Reproductivni cikli dvoživk

Reproductivni cikli vretenčarjev so glede na usklajenost gametogeneze samcev in samic lahko povezani ali pa nepovezani. Potekajo lahko sezonsko ali pa kontinuirano oziroma nesezonsko, in so lahko letni, dvoletni, ali neredni (Whitter in Crews 1987, Jorgensen 1992, cit. po Bruce, 2003).

Povezani in nepovezani cikli se pojavljajo pri močeradih iz zmernih območij, ki imajo sezonsko reprodukcijo. Pri povezanih ciklih sta spermatogeneza in oogeneza sinhroni, dvorjenju sledi sproščanje sperme in oploditev. Povezan cikel imajo močeradi, ki imajo zunanjo oploditev (Hynobiidae, Cryptobranchidae, Sirenidae) in tiste vrste repatih dvoživk z notranjo oploditvijo, ki so vezane na kratkotrajne ugodne vremenske razmere, npr. aksolotli *Ambystoma*. Pri nepovezanih ciklih, spermatogeneza in oogeneza nista nujno sinhroni. Dvorjenje in prenos sperme v samico lahko potekata tedne ali mesce pred odlaganjem jajčec. Po privzemu sperme se le-ta shrani v spermateki samice vse do odlaganja jajčec. Nepovezan reproductivni cikel je značilen za močerade iz družine brezpljučarjev (Plethodontidae). Kontinuirani ali nesezonski cikli, pa potekajo celo leto in so pri repatih neobičajni, take cikle najdemo pri nekaterih neotropskih bolitoglossinah, ki živijo v okoljih brez sezonskih nihanj (Bruce, 2003).

Repate dvoživke se večinoma pariyo sredi poletja ali na začetku jeseni, nekatere tudi spomladi. Pri večini vrst se prične spermatogeneza poleti takoj po parjenju, tako da spermatozoji ostajajo v testisu in vodih čez zimo (Oslund, 1928). Za nektura je poznano, da se lahko pariyo bodisi spomladi ali pa jeseni. To je značilno tudi za rodove *Plethodon*, *Desmognathus*, *Spelerpes* in druge repate dvoživke (Humphrey, 1921, 1922, 1925, cit. po Oslund, 1928).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Material

Raziskava je bila narejena na testisih enajstih osebkov bele podvrste močerila *Proteus anguinus anguinus* in štirih osebkov črne podvrste močerila *Proteus anguinus parkelj* (Preglednici 1 in 2). Osebkki so bili žrtvovani v preteklih obdobjih za namene raziskav skupine za Funkcionalno morfologijo vretenčarjev Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete. Njihove gonade so bile arhivirane v formalinu ali pa vklopljene v parafin.

Pet osebkov bele podvrste močerila je bilo izlovljenih v Planinski jami, dva v Otoškem bregu, eden v izviru reke Krupe in eden v Grčarskih Ravnah, za en osebek lokaliteta ni bila zabeležena (Preglednica 1). Lokaliteta osebkov črne podvrste močerila je Jelševnik.

Telesne dolžine osebkov bele podvrste močerila so bile od 210 mm do 282 mm, njihove telesne mase pa od 11,39 g do 33,9 g (Preglednica 1). Za en osebek podatki niso poznani. Telesne dolžine črne podvrste močerila so bile od 211 mm do 360 mm ter mase od 21,45 do 76,90 g (Preglednica 2). V preglednicah 1 in 2 so navedene tudi mase gonad pri štirih osebkih bele podvrste in dveh osebkih črne podvrste močerila. Podatki o masi gonad ostalih osebkov niso bili zabeleženi.

Živali so bile do žrtvovanja vzdrževane v speleološkem laboratoriju na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete, v akvarijih z vodnimi črpalkami in filtri, v stalni temi pri temperaturi 10 °C.

Preglednica 1. Podatki osebkov bele podvrste močerila (*P. anguinus anguinus*)

Evidenčna številka	Datum fiksacije	Lokaliteta	Smer rezanja testisa	Dolžina telesa (mm)	Masa osebka (g)	Masa gonad (g)
P108	22. 07. 1993	Planinska jama	vzdolžno	246	/	/
P141	16. 08. 1999	Otoški breg	vzdolžno prečno	280	33,60	/
P161	21. 03. 2008	Otoški breg	vzdolžno prečno	265	27,30	/
P173	06. 12. 2004	Planinska jama	vzdolžno	210	11,39	0,051
P175	20. 12. 2004	Planinska jama	vzdolžno	255	21,70	0,48
P179	18. 11. 2005	Grčarske Ravne	vzdolžno	240	19,13	/
P186	06. 11. 2006	Izvir reke Krupe	vzdolžno	241	25,85	0,016
P194	29. 03. 2010	Planinska jama	vzdolžno prečno	282	33,90	0,215
P096	04. 09. 1987	Planinska jama	vzdolžno	250	/	/
PXX	18. 09. 1989	Otoški breg	vzdolžno prečno	210	/	/
PXX	/	/	prečno	/	/	/

Preglednica 2. Podatki osebkov črne podvrste močerila (*P. anguinus parkelj*)

Evidenčna številka	Datum fiksacije	Lokaliteta	Smer rezanja testisa	Dolžina telesa (mm)	Masa osebka (g)	Masa gonad (g)
Č009	19. 01. 1998	Jelševnik	prečno	211	/	/
Č012	23. 09. 2003	Jelševnik	vzdolžno	247	21,45	0,097
Č013	03. 12. 2003	Jelševnik	vzdolžno	253	23,62	0,079
Č015	10. 01. 2008	Jelševnik	vzdolžno prečno	360	76,90	/

3.2 Metode

3.2.1 Fiksacija in vklapljanje v paraplast

Večina vzorcev testisov je bila že vklopljena v paraplast, testisi sedmih osebkov (P194, P161, P141, PXX, PXY, Č009, Č015) pa so bili shranjeni v formalinu ali pa dehidrirani in shranjeni v 75 % etanolu.

Fiksirane vzorce testisov smo dehidrirali v rastoči alkoholni vrsti, bistrili v ksilenu, vklopili v paraplast in pritrdili na nosilce.

Parafinske blokce smo rezali na 5 µm debele rezine z mikrotomom znamke Reichert Jung 2040. Pri petih osebkih (P194, P161, PXX, P141, Č15) sta bila izolirana oba testisa, enega smo rezali vzdolžno in drugega prečno. Testise ostalih osebkov smo rezali vzdolžno.

3.2.2 Barvanje parafinskih rezin

Preprate smo barvali z vodotopnimi barvili, zato je bilo potrebno najprej odstraniti hidrofobni parafin s ksilenom in ponovno hidrirati skozi padajočo alkoholno vrsto do destilirane vode. Tako so bile rezine pripravljene za barvanje. Barvanju je sledila dehidracija (slednja je bila različna, odvisno od metode barvanja) in bistrenje v ksilenu. Rezine smo prekrili s sintetično smolo (Pertex ®, Medite GmbH, Nemčija) in s krovnimi stekli.

Barvanje hematoksilin – eozin

Hematoksilin – eozin barvanje je splošna tehnika histološkega barvanja. Rezultat barvanja so modro vijolična jedra, ki jih obarva bazični hematoksilin ter roza citoplazma, ki jo obarva kisli eozin.

Z Weigertovim hematoksilinom smo barvali 20 ali 40 sekund (odvisno od vzorca) in nato sprali z vodo. Rezine smo diferencirali s solno kislim alkoholom in sprali z destilirano vodo. Sledilo je barvanje z eozinom za 7 minut, dehidracija v 70 % in 96 % etanolu, nato v izopropanolu ter bistrenje v ksilenu in prekrivanje.

Trikromno barvanje po Massonu

Trikromno barvanje je selektivno barvanje za kolagen, razkrije drobna kolagenska in retikularna vlakna ter bazalno lamino (Kiernan, 1990). Kolagen se obravna modro, jedra modro-črno, citoplazma opečnato do rožnato rdeče ter mišična vlakna rdeče.

Po rehidraciji smo vzorce za 20 sekund potopili v Weigertov hematoksilin, sprali z vodo, diferenciarali z 1 % očetno kislino, da smo razbarvali vezivna vlakna in temeljito sprali z vodo. Sledilo je barvanje z mešanico komponente A (vsebuje kisli fuksin) in komponente B (vsebuje ponceau de xyloidine), v razmerju 1:2, za 4 minute, spiranje z destilirano vodo in prelivanje steklc z 1 % fosfomolibdensko kislino. Steklca smo nato potopili v raztopino C (vsebuje anilinsko modrilo), stresali približno 30 sekund, da sta se raztopina C in fosfomolibdenska kislina zmešali ter sprali z destilirano vodo. Na koncu smo prelili še z 1 % očetno kislino in dehidrirali z 96 % etanolom, zbistrili s ksilenom ter prekrili s krovniki.

Barvanje po Feulgenu

Barvanje po Feulgenu je tehnika barvanja, ki se uporablja za indentifikacijo kromosomske DNA v celici in je uporabna predvsem za študije celičnega cikla. Osnova tega barvanja temelji na dveh kemijskih reakcijah. Prva je hidroliza, v drugi pa sledijo reakcije nastalih aldehydov s Feulgnovo raztopino (Presnell in Schreiber, 1997).

Rezultat je vijolično obarvanje DNA ali jeder. Intenziteta dobljene barve je sorazmerna količini DNA v jedru (Kiernan, 1990).

Po rehidraciji smo histološke rezine tretirali s 5M HCl, pokrili in pustili 60 minut na sobni temperaturi. Nato smo prestavili preparate v destilirano vodo na ledu (4 °C) za 5 minut. Sledilo je barvanje s Shiffovimi reagenti za 2 uri in nato spiranje v SO₂-vodi; trikrat po 2 min, dvakrat po 10 min in v zadnji stopnji 20 min. Vzorce smo dehidrirali v 70 % in 96 % etanolu, nato v izopropanolu do ksilena in prekrili s krovnimi stekli.

3.2.3 Mikroskopiranje

Vzorci testisov, ki so bili shranjeni v fiksativu, smo pred vklopom v parafin pregledali pod stereomikroskopom *Olympus SZX9*. Zajem slike je bil narejen s kamero *Olympus Color view III* in programom *Cell B*.

Histološke preprate smo pregledovali s svetlobnim mikroskopom OPTON – Axioskop Zeiss in jih fotografirali z digitalnim fotoaparatom Nikon Coolpix 4500.

Fotografije smo opremili v računalniškem programu Adobe Photo Shop 7.0.

4 REZULTATI

4.1 Zunanja morfologija testisov

Testisi so parna struktura, ležijo ob zunanjem robu ledvic, v kavdalnem delu trebušne votline na katero so pripeti z dorzalnim mezorhijem (sl. 2). So nepigmentirani, blede bele do rumene barve. Testisa sta po obliki enaka in zamaknjena, tako da je desni testis višje od levega (sl. 2, 4b).



Slika 2. Testisa črnega močerila (*P. anguinus parkelj*) v trebušni votlini. Ležita ob zunanjem robu ledvic (Le). Cefalični del testisa je na desni strani slike. Osebek Č012.

4.1.1 Oblika testisa in zoritvene faze spolnih celic

Oblika testisov je med osebki raznolika. Pojavljajo se tri oblike testisov:

- a) trakast testis (sl. 3a),
- b) podolgovat in nabrekel testis (sl. 3b),
- c) testis z eno ali več razširitvami (sl. 2, 3c, 4a, b).

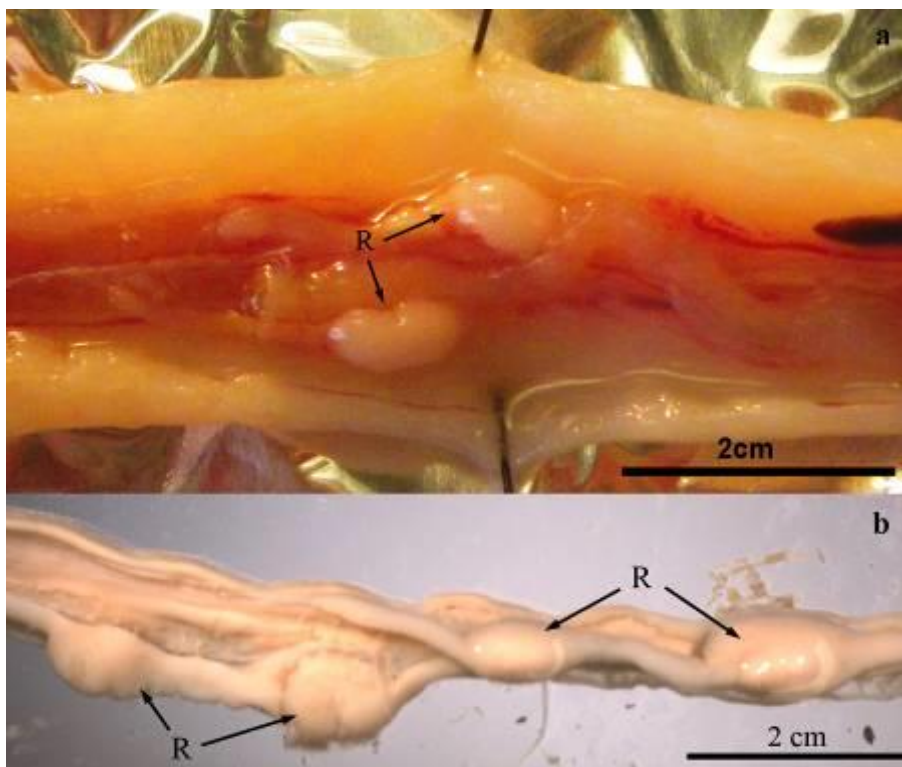
Trakasti testisi so najmanjši in enakomerno široki (sl. 3a). Kavdalni del je lahko nekoliko razširjen. Povprečna dolžina trakastih testisov je 15 mm. Trakasti testis je imelo sedem osebkov s telesno dolžino od 210 do 253 mm (Preglednica 3). Osebki so bili žrtvovani v različnih sezonah tekom leta. Testisi vključujejo primarne in sekundarne spermatogonije ter v enem primeru tudi primarne spermatocite (Preglednica 3). Tudi gonadosomatski indeks je najnižji (Preglednica 4).

Podolgovati in nabrekli testisi merijo v dolžino 15,7 mm, v širino pa 5,4 mm. So enakomerno razširjeni in opazno širši v primerjavi s trakastimi testisi (sl. 3b), na cefalnem in kavdalnem delu testisa so krajše zožitve. V podolgovatih in nabreklih testisih so vse zrelostne faze spermatogeneze, vključno s fazami spermiogeneze (Preglednica 3). Tudi gonadosomatski indeks je pri tem tipu testisa najvišji (Preglednica 4). Ta tip testisa so imeli trije osebki veliki od 250 do 280 mm. Osebki so bili žrtvovani v poletnem in zimskem obdobju. Osebek iz zimskega obdobja je imel v testisih zrele spermije, ostala dva pa spermatide v zgodnji ali pa pozni fazi spermiogeneze (Preglednica 3).

Testisi z razširitvami imajo eno do dve razširitvi ali režnja (sl. 2, 4a-b). Razširitve ležijo linearno vzdolž telesa, njihova dolžina pa je v povprečju 21,3 mm. Med razširitvami so ozke zožitve, ki so po dolžini lahko tudi daljše od razširitev. Najširši del gonad v predelu razširitev ima 3,68 mm v premeru, najožji del pa 0,52 mm. Zožitve so tudi na cefaličnem in kavdalnem delu testisa. V razširitvah so predvsem spermatociti, v zožitvah pa spermatogoniji (Preglednica 3). Spermatid in spermatozoev pri tej obliki testisa nismo zasledili. Gonadosomatski indeks je nekoliko višji od trakastega tipa testisa in bistveno nižji od podolgovatega in nabreklega testisa (Preglednica 4). Testise z razširitvami je imelo pet osebkov, štirje osebki so bili med večjimi (247 do 360 mm), vendar pa je imel ta tip testisa tudi osebek, ki je bil med manjšimi (210 mm) (Preglednica 3). Osebki so bili žrtvovani v poletnem in zimskem obdobju.



Slika 3a-c. Oblike testisov pri močerilu. a. Trakast testis. *P. anguinus parkelj*, Č009. b. Podolgovat in nabrekel testis. *P. anguinus anguinus*, P141. c. Testis z razširitvijo. *P. anguinus anguinus*, P161.



Slika 4a-b. Testisi z razširitvami (R). a. Testisa z eno razširitvijo. Kavdalni del (na sliki levo) je zožen in daljši od razširitve. *P. anguinus anguinu*, P194. b. Testisa z dvema razširitvama, ki ju povezuje zoženi predel. Kavdalna razširitev (na sliki levo) se zaključuje z zožitvijo. *P. anguinus parkelj*, Č015.

Preglednica 3. Oblika testisa in zoritvene faze spermatogenze pri močerilu (*Proteus anguinus*). Podana je tudi dolžina telesa in sezona žrtvovanja.

Evidenčna številka osebk	Dolžina telesa (mm)	Sezona	Oblika testisa	Sg 1	Sg 2	Sc	Sd	Sz
PXY	/	/	a	√	√			
PXX	210	avgust	a	√	√			
Č009	211	januar	a	√	√			
P179	240	november	a	√	√	√		
P186	241	november	a	√	√			
P108	246	julij	a	√	√			
Č013	253	december	a	√	√	√		
P096	250	september	b	√	√	√	√*	
P175	255	december	b	√	√	√	√	√
P141	280	avgust	b	√	√	√	√**	
P173	210	december	c1	√	√	√		
P161	265	marec	c1	√	√	√		
P194	282	marec	c1	√	√	√		
Č012	247	september	c2	√	√	√		
Č015	360	januar	c2	√	√	√		

Opomba k preglednici: Sg1 – primarni spermatogonij, Sg2 – sekundarni spermatogonij, Sc – spermatocit, Sd – spermatida, Sz - spermatozoi. Znak√ pomeni prisotnost, *- zgodnja spermioogeneza, **- pozna spermioogeneza. a – trakast testis, b – podolgovat testis, c1 – testis z eno razširitvijo, c2- testis z dvema razširitvama.

Preglednica 4. Gonadosomatski indeks (GSI) in zoritvene faze spermalnih celic pri močerilu (*Proteus anguinus*). Podana je tudi dolžina telesa, masa telesa in gonad ter oblika testisa.

Evidenčna številka osebk	Dolžina telesa (mm)	Masa telesa (g)	Masa gonad (g)	GSI	Oblika testisa	Sg 1	Sg 2	Sc	Sd	Sz
P175	255	21,70	0,480	2,21	b	√	√	√	√	√
P194	282	33,90	0,215	0,63	c	√	√	√		
P173	210	11,39	0,051	0,45	c	√	√	√		
Č012	247	21,45	0,097	0,45	c	√	√	√		
Č013	253	23,62	0,079	0,33	a	√	√	√		
P186	241	25,85	0,016	0,06	a	√	√			

Opomba k preglednici: GSI = masa gonad*100/masa telesa

4.2 Anatomija testisov

Testisi so obdani s tanko vezivno ovojnico tunico albuginea, ki jo prekriva tanek mezorhij (sl. 5b). Notranjost testisa je razdeljena v številne lobule (sl. 5a, 7a). Le-ti so med seboj ločeni s tankim vezivnim tkivom (sl. 5b). Znotraj posameznih lobulov se spolne celice združujejo v skupke ali ciste, ki jih obdajajo Sertolijeve celice (sl. 5b, c, 6a, b). Spolne celice znotraj cist so v isti fazi spermatogeneze, razvoj spolnih celic je sinhron (sl. 6a). Znotraj lobula pa so lahko ciste bodisi v isti fazi zoritve (sl. 6a) ali pa so lahko v različnih fazah razvoja (sl. 6b, c).

4.2.1 Oblika testisov in anatomija testisa

Pri podolgovatih in nabreklih testisih oblika in velikost lobulov, kot tudi zastopanost zrelostnih faz spermalnih celic, variira v smeri od cefaličnega proti kavdalnemu delu testisa (sl. 7a). V cefaličnem delu testisa so lobuli okrogle do ovalne oblike in razporejeni tesno eden zraven drugega (sl. 7a, b). V lobulih so primarni in sekundarni spermatogoniji. Proti kavdalnemu delu testisa se velikost lobulov povečuje, povečuje se tudi število spolnih celic v cistah, ciste pa postajajo večje (sl. 7a, c). V kavdalnem delu testisa so v lobulih ciste z zrelejšimi fazami spolnih celic; spermatociti ter faze zgodnje in tudi pozne spermogeneze (sl. 7b). Lobuli so obširnejši, stene cist s spermatozoi pa nerazpoznavne (sl. 7a, d).

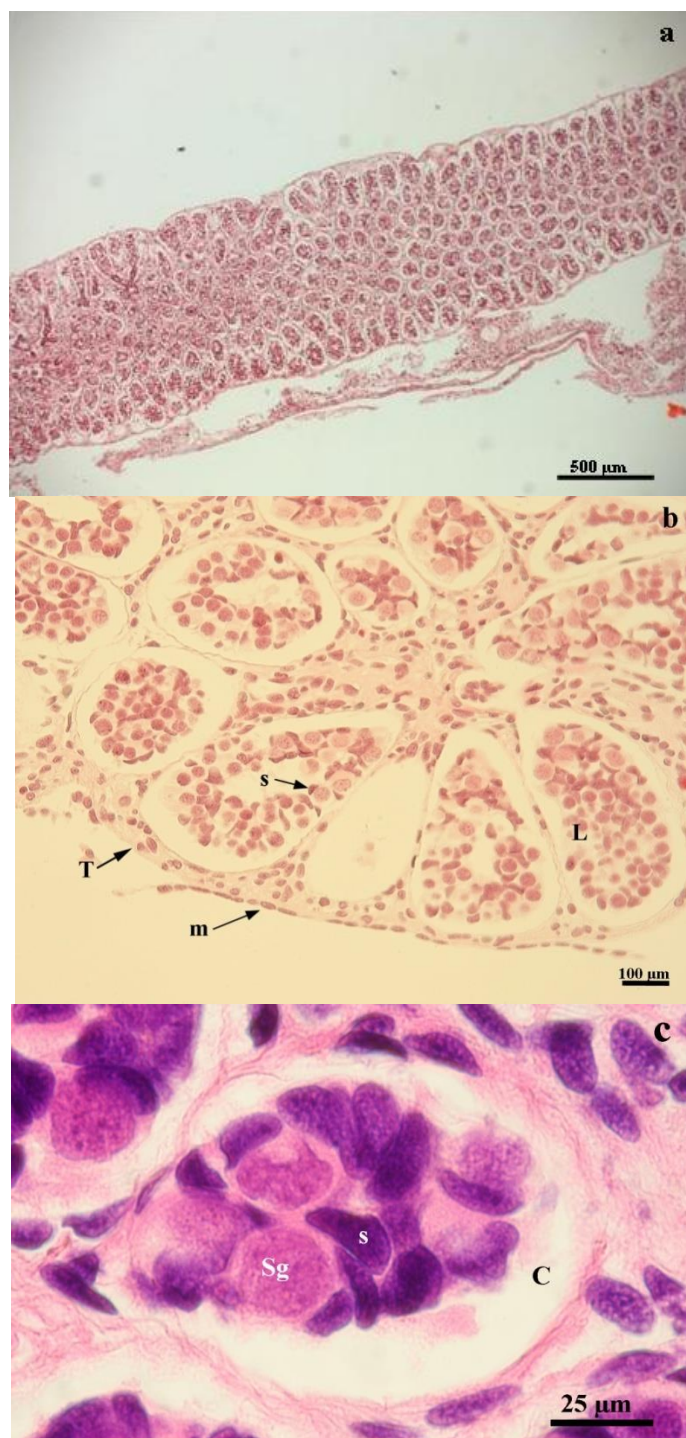
Med lobuli testisa, ki vključujejo faze spermogeneze, so tudi izpraznjeni lobuli z ostanki abnormalnih spermatozoev in Sertolijeve celice (sl. 10).

Drugače je pri trakastih testisih, ki so skozi celotno dolžino enakomerno široki, lobuli so tesno razporejeni eden zraven drugega. Lobuli so majhni, bolj okrogle oblike in enakih velikosti, v perifernem delu so nekoliko večji (sl. 5a). Napolnjeni so z zgodnejšimi fazami spermatogeneze; spermatogoniji in primarnimi spermatociti (sl. 5a).

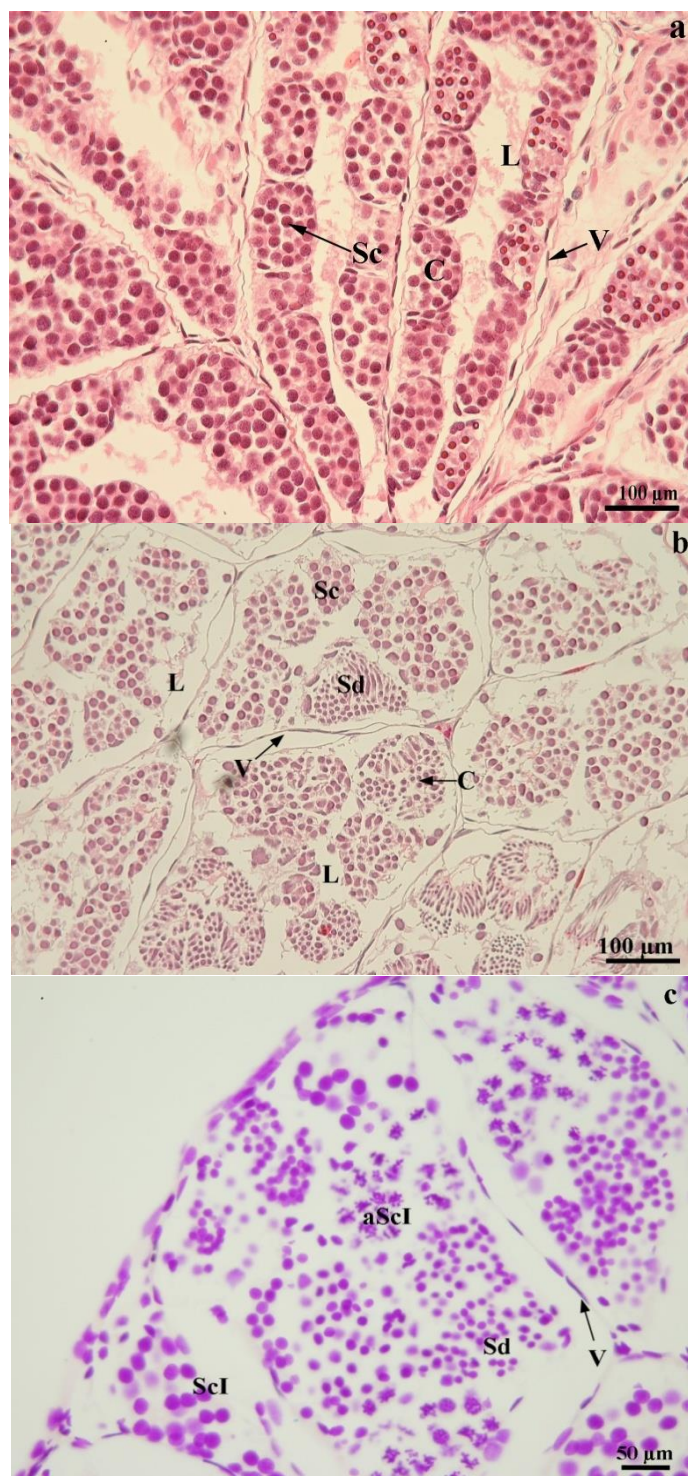
Razporejenost in velikost lobulov se pri testisih z razširitvami spreminja glede na lego v testisu, kar pomeni, da so lobuli v razširitvah večji in podolgovatejše oblike (sl. 5b, 9b). V zožitvah so lobuli manjši, okrogeljši (sl. 9a). Različno je tudi pojavljanje faz

spermatogeneze. V razširitvah se pojavljajo spermatogoniji in primarne spermatocite (sl. 9b), medtem ko so v zožitvah izključno spermatogoniji (sl. 9a).

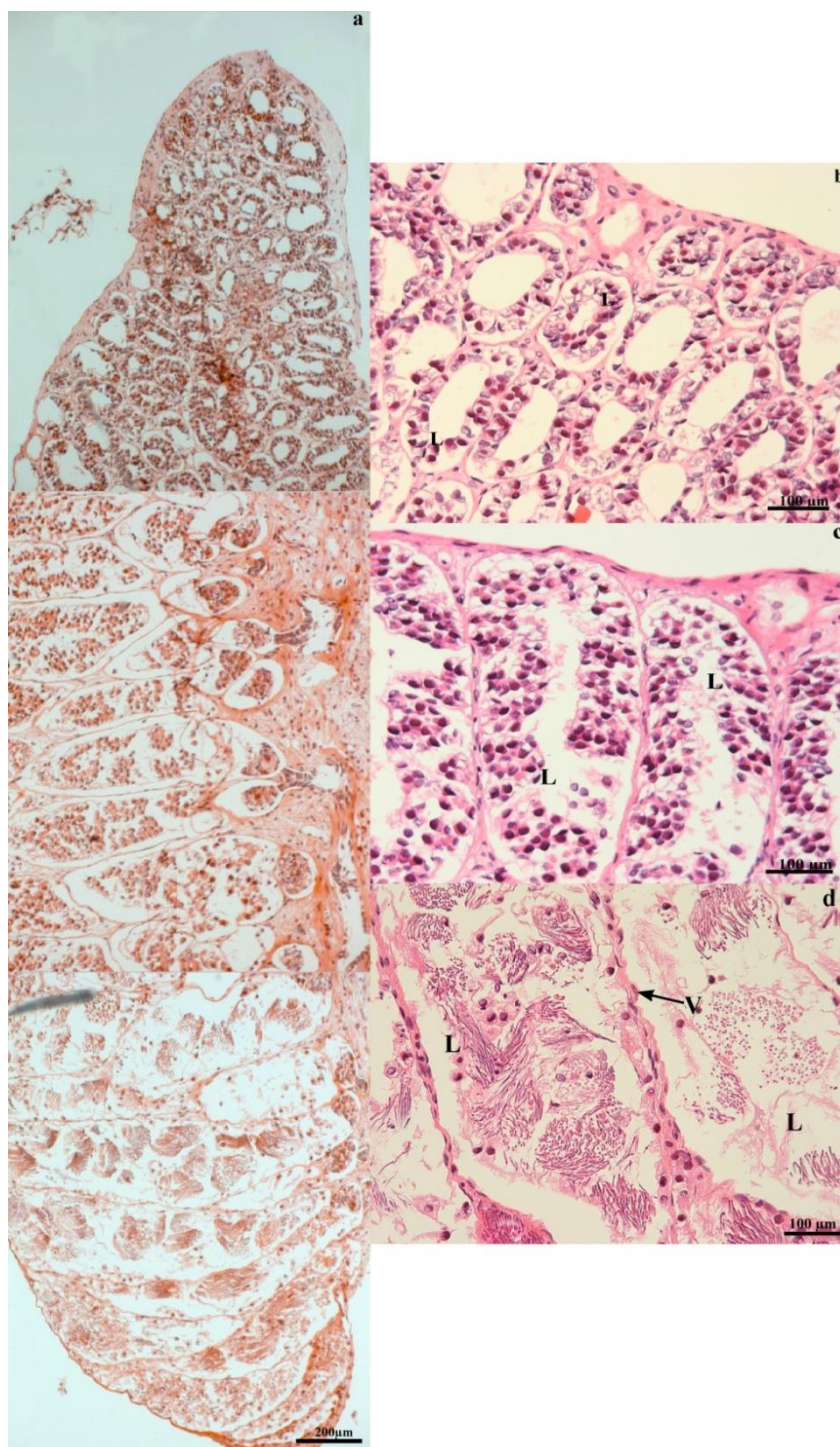
Pri vseh tipih testisov so spermatogoniji vzdolž testisa v osrednjem delu testisa, kjer je vezivo z zbirnimi vodi, v perifernem delu testisa so zrelejše faze spermalnih celic (sl. 5b, 8a, b).



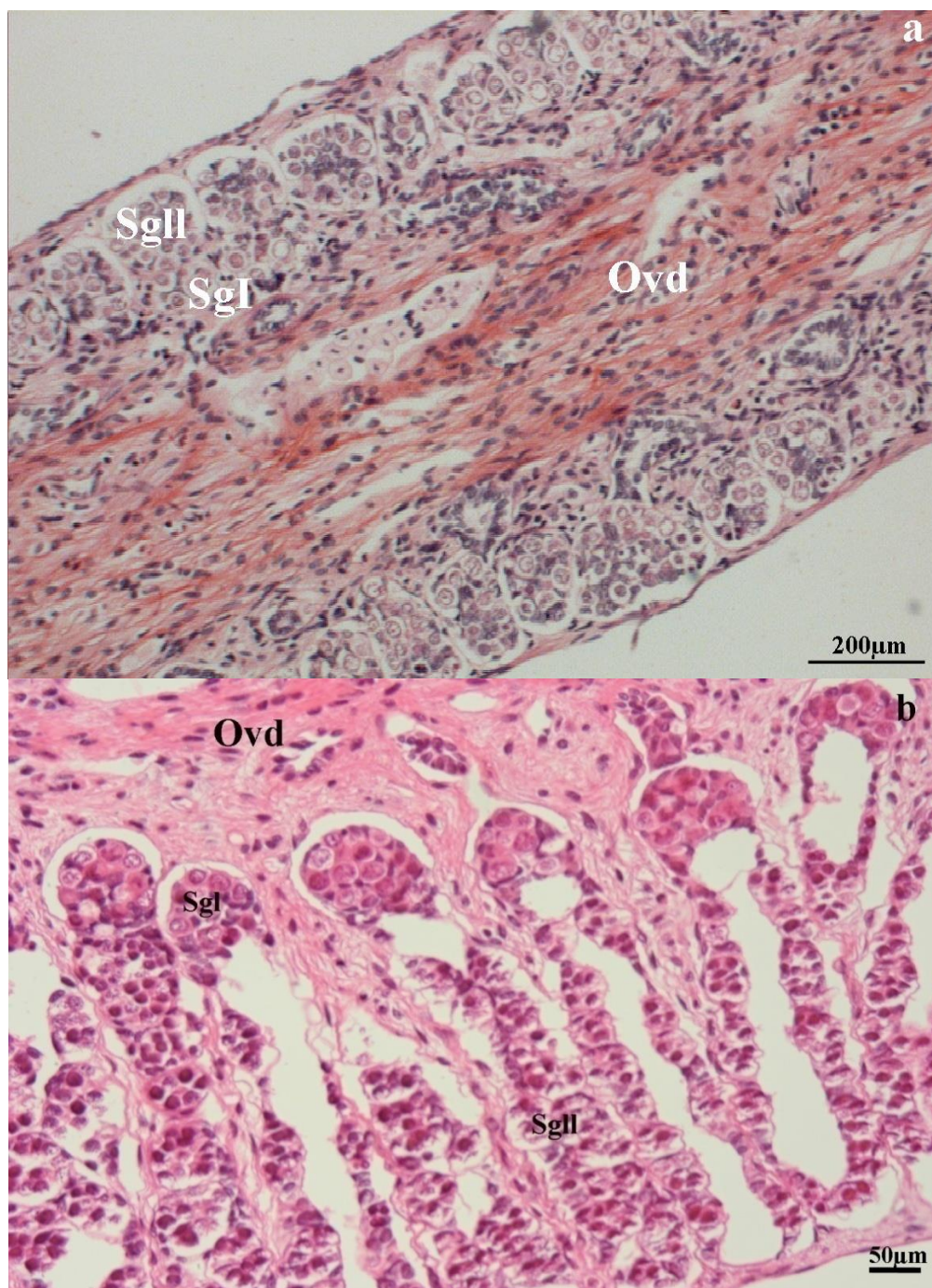
Slika 5a-c. Zgradba testisa na vzdolžnem (sl. a) in prečnem (sl. b,c) prerezu. a. Notranjost testisa je razdeljena v številne lobule. *P. anguinus anguinus*, P096. b. V lobulih so spolne celice v skupkih ali cistah, ki jih obdajajo Sertolijeve celice (s). *P. anguinus parkelj*, Č015. m, jedra mezorhija; L, lobul; T, tunica albuginea. c. Cista (C) s spermatogoniji (Sg) in Sertolijevo celico (s). Osebek PXY. Barvanje H&E.



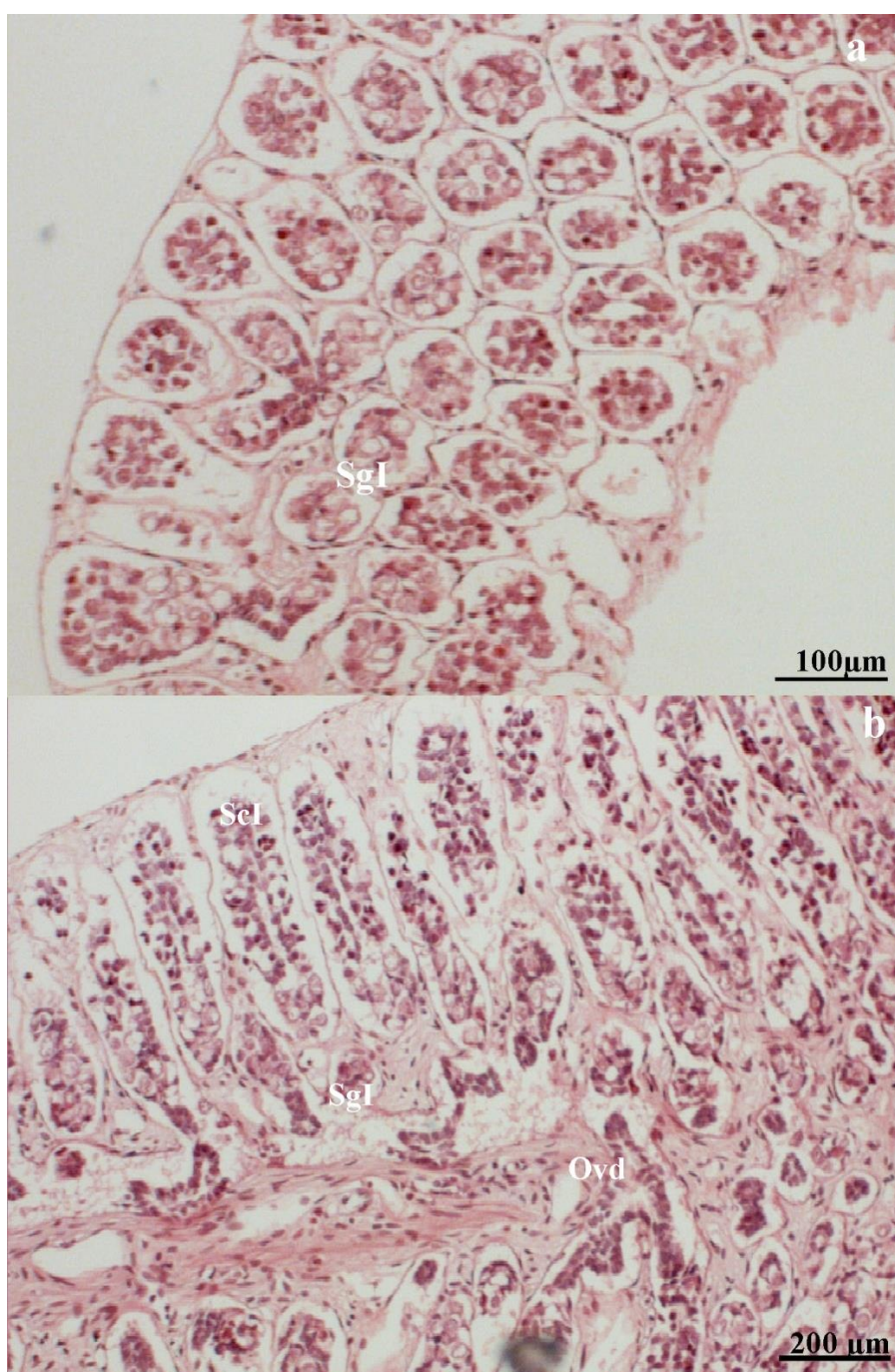
Slika 6a-c. Lobuli in ciste testisa. a. Lobuli s sinhronim razvojem cist. *P. anguinus parkelj*, Č015. b. in c. Lobuli z asinhronim razvojem cist. *P. anguinus anguinus*, P175. C, cista; L, lobul; V, vezivo lobulov. ScI, primarni spermatociti, aScI, spermatociti v anafazi I mejoze, Sd, zgodnje spermatide. a. in b. Barvanje H&E. c. Barvanje Feulgen.



Slika 7a-d. Oblika in velikost lobulov pri podolgovatih in nabreklih testisih variira v smeri od cefaličnega proti kavdalnemu delu testisa. V cefaličnem delu (vrhni del sl. a, sl. b) so lobuli (L) manjši, okrogle do ovalne oblike in vključujejo zgodnje faze spermatogeneze. V smeri proti kavdalnemu delu (sl. a) postajajo lobuli večji, bolj podolgovati (sl. c). V kavdalnem delu (sl. d) so lobuli največji in vključujejo zrelejše faze zoritve. *P. anguinus anguinus*, P141. Barvanje H&E.

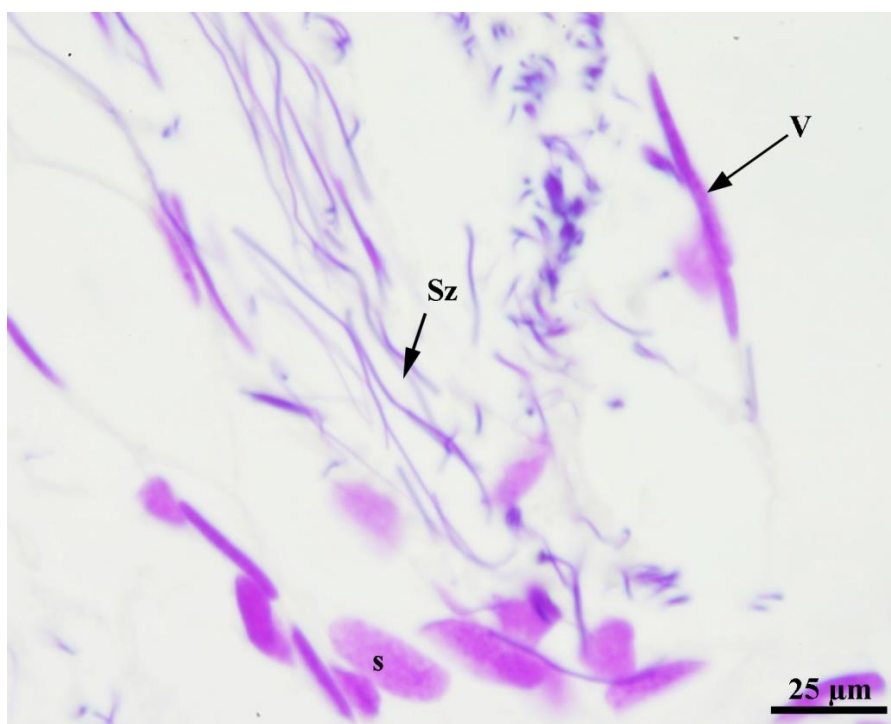


Slika 8a-b. Razporeditev zoritvenih faz v prečni osi testisa. Mlajše faze zoritve so ob vezivu osrednjega dela testisa, starejše pa v perifernem delu testisa. a. Trakasti testis. *P. anguinus anguinus*, P108. b. Podolgovat in razširjen testis. *P. anguinus anguinus*, P141. Sc, spermatoцитi; SgI, primarni spermatogoniji; SgII, sekundarni spermatogoniji; Ovd, osrednji vezivni del z vodi. Barvanje H&E.



Slika 9a-b. Razporeditev zoritvenih faz v prečni osi testisa z razširitvami. Mlajše faze zoritve so ob vezivu osrednjega dela testisa, starejše pa v perifernem delu testisa. a. in b. Testis z razširitvijo. *P. anguinus anguinus*, P096. ScI, primarni spermatociti; SgI, primarni spermatogoniji; Ovd, osrednji vezivni del z vodi.

Barvanje H&E.



Slika 10. Lobuli z abnormalnimi spermatozoi (Sz) in Sertolijevevimi celicami (s). *P. anguinus anguinus*, P175. V, jedro vezivnih celic lobula. Barvanje Feulgen.

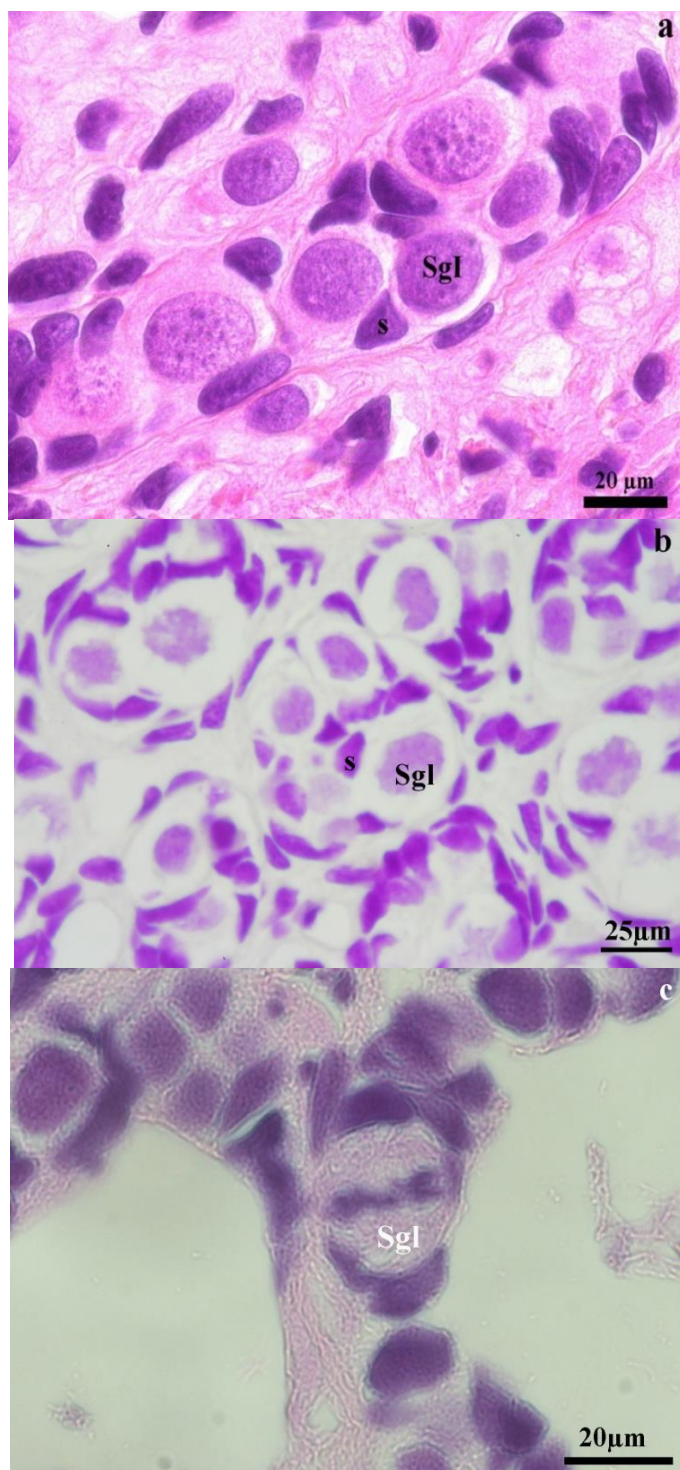
4.3 Histološke značilnosti zoritvenih faz spermalnih celic

Zoritvene faze spermalnih celic smo določili glede na velikosti in obliko jeder ter razporeditev kromatina. Zgledovali smo se po Uribe (2003), ki je opisala zoritvene faze pri dveh vrstah aksolotlov, in sicer pri *Ambystoma dumeriili* in *A. mexicanum*.

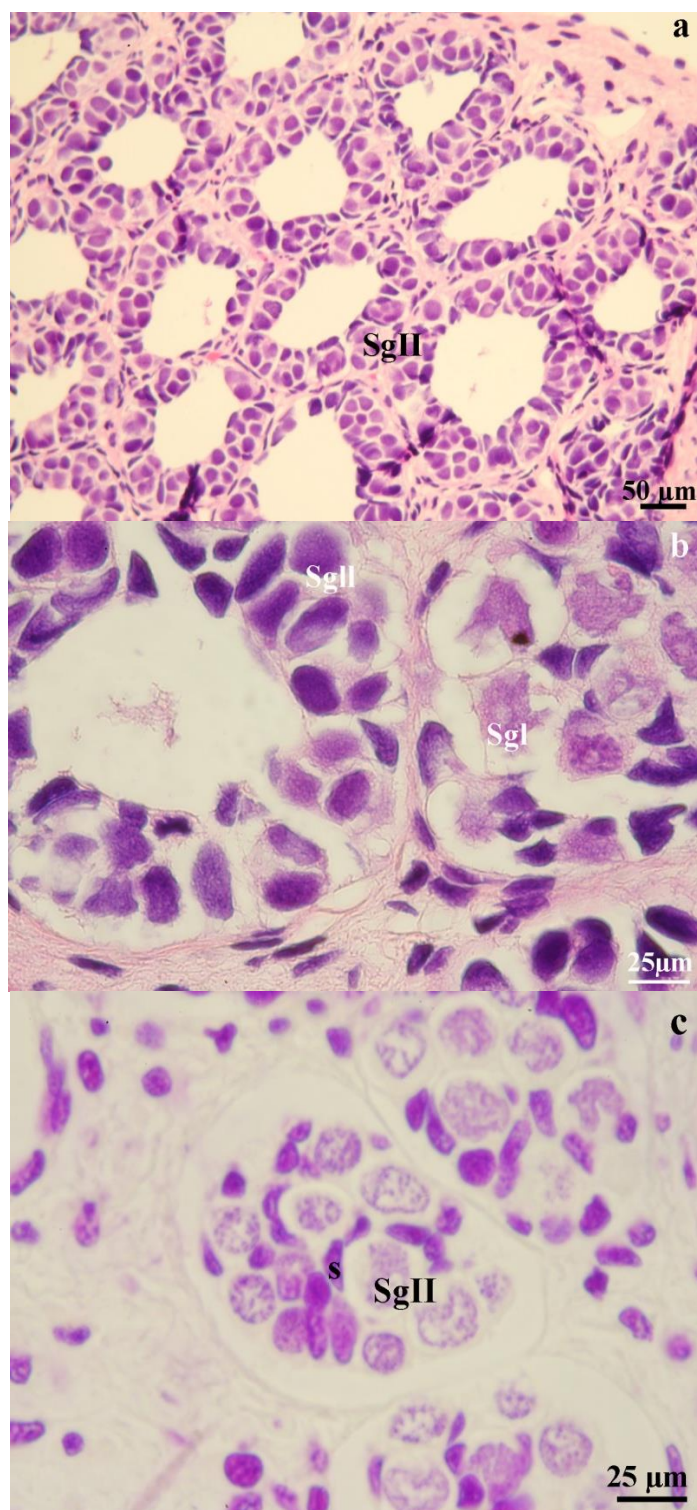
4.3.1 Spermatogoniji

Primarni spermatogoniji so največje celice, okrogle oblike, s svetlejšo citoplazmo (sl. 11a, b). Jedra so okroglih ali pa tudi nepravilnih oblik, evkromatska, z enim do dvema jedrcema in velika od 22 do 25 µm. Spermatogoniji so v skupkih ali pa posamično v vezivnem tkivu. Opazimo lahko mitotične delitve (sl. 11c).

Sekundarni spermatogoniji so manjši od primarnih in oblikujejo skupke znotraj lobulov, ki že imajo formiran lumen (sl. 12a, b). Jedro je v primerjavi s primarnimi spermatogoniji bolj heterokromatsko.



Slika 11a-c. Primarni spermatogoniji. a. Skupek primarnih spermatogonijev (SgI) obdajajo Sertolijeve celice (s). *P. anguinus parkelj*, Č009. Barvanje H&E. b. Jedra so evkromatska. *P. anguinus anguinus*, P175. Feulgen barvanje. c. Spermatogonij v metafazi mitotične delitve. *P. anguinus anguinus*, PXX. Barvanje H&E.

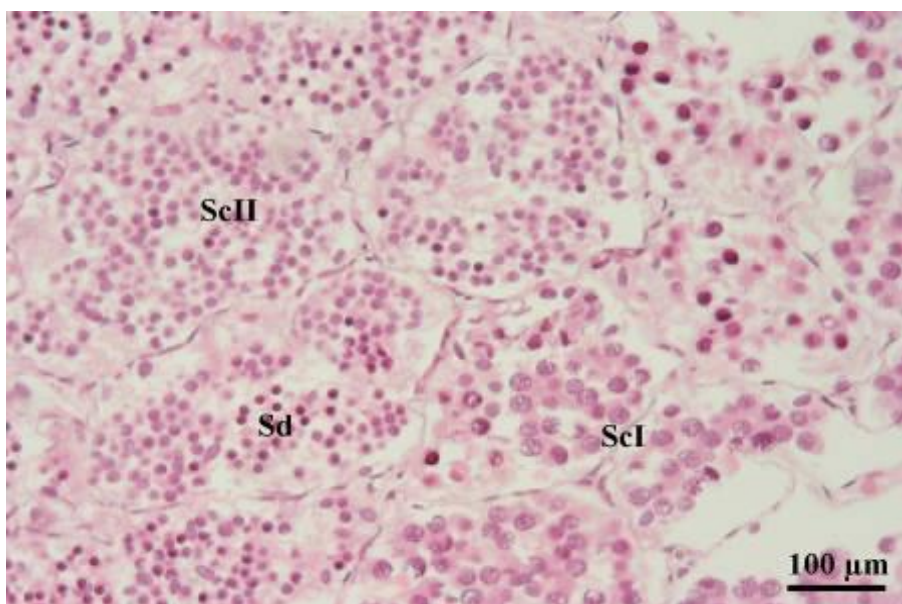


Slika 12a-c. Sekundarni spermatogoniji (SgII) v lobulih s centralnim lumnom. SgI, primarni spermatogoniji. *P. anguinus anguinus*, PXY. a in b. Barvanje H&E. c. *P. anguinus anguinus*, P141. Barvanje Feulgen.

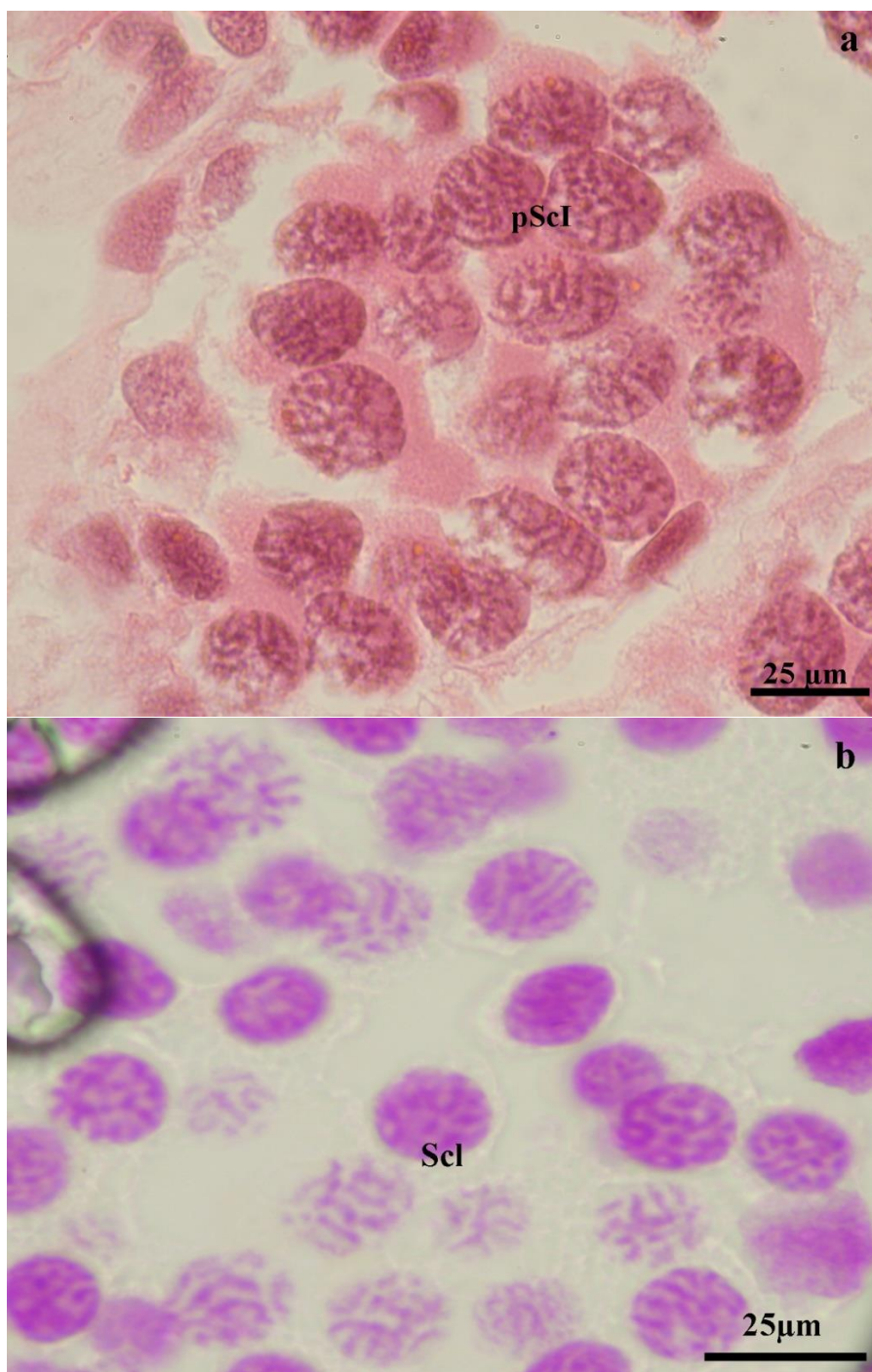
4.3.2 Primarni in sekundarni spermatociti

Primarni in sekundarni spermatociti se razlikujejo v velikosti jedra in kondenzaciji kromatina (sl. 13). Jedra primarnih spermatocitov so velika od 16 do 17 μm in so v različnih stadijih profaze mejoze I (sl. 14-16). Jedra sekundarnih spermatocitov so manjša, merijo od 12 do 13 μm , heterokromatin pa je bolj enakomerno razporejen v primerjavi s primarnim spermatociti in v manjših skupkih, ki so na obrobju in v sredini jedra (sl. 17).

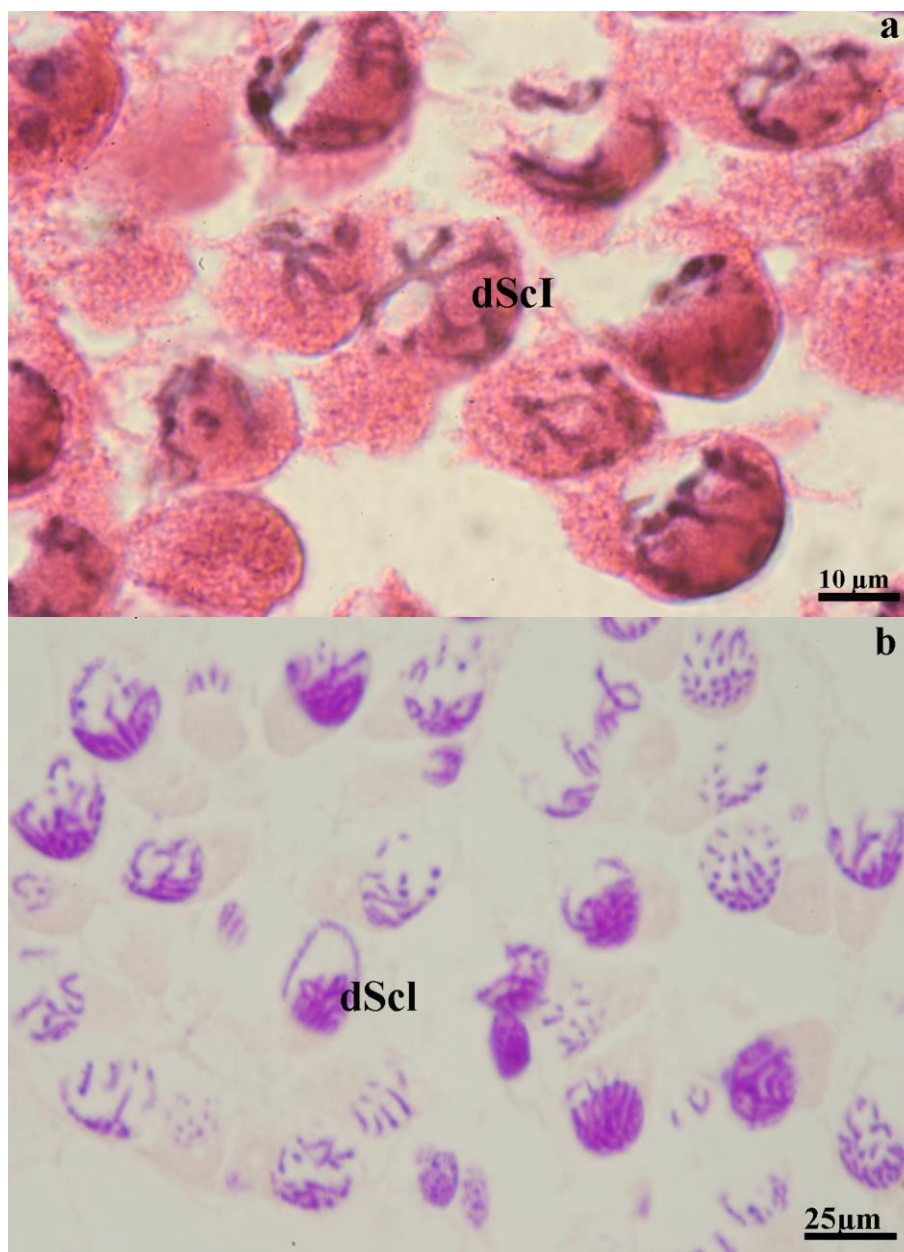
Jedra primarnih spermatocitov v stadiju pahitena so okrogla, kromatin je skondenziran v dolge vrvice (sl. 14a, b). V stadiju diplotena so kromatinske vrvice še gostejše, večje in razporejene po celotnem jedru in včasih pomaknjene ob rob jedra (sl. 15a, b). Drugi stadiji profaze mejoze I potekajo hitreje, zato jih je na preparatih težje zaslediti. V anafaznem jedru mejoze I je vidna ločitev homolognih kromosomov na nasprotnih polih (sl. 16).



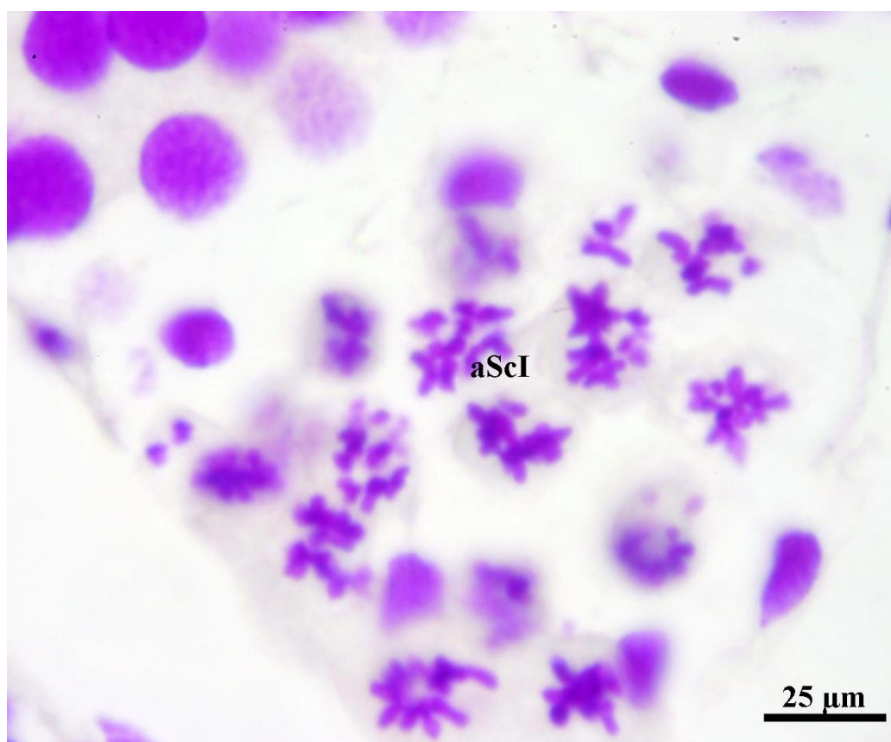
Slika 13. Lobuli s primarnimi (ScI) in sekundarnimi spermatociti (ScII). Sd, spermatide. *P. anguinus anguinus*, P096. Barvanje H&E.



Slika 14a-b. Primarni spermatociti v stadiju pahitena (pScl). Jedro je okroglo, kromatin pa skoncentriran v dolge vrvice. *P. anguinus anguinus.*, P141. a. Barvanje H&E. b. Barvanje Feulgen.



Slika 15 a-b. Primarni spermatoci v stadiju diplotena (dScI). Kromatinske vrvice v jedru so gostejše, večje in razporejene po celotnem jedru ali pa pomaknjene ob rob jedra. *P. anguinus anguinus*, P141. a. Barvanje H&E. b. Barvanje Feulgen.



Slika 16. Primarni spermatociti v anafazi mejoze I (aScI). *P. anguinus anguinus*, P175. Barvanje Feulgen.

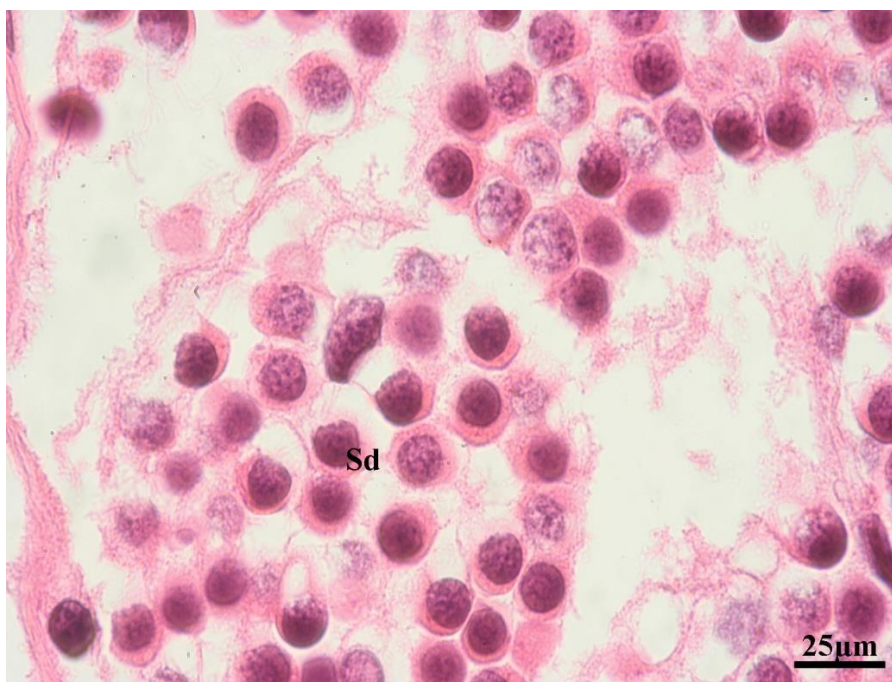


Slika 17. Sekundarni spermatociti (ScII). Jedra sekundarnih spermatocitov so manjša, heterokromatin je v skupkih po celotnem jedru. Sd, spermatide. *P. anguinus anguinus*, P141. Barvanje H&E.

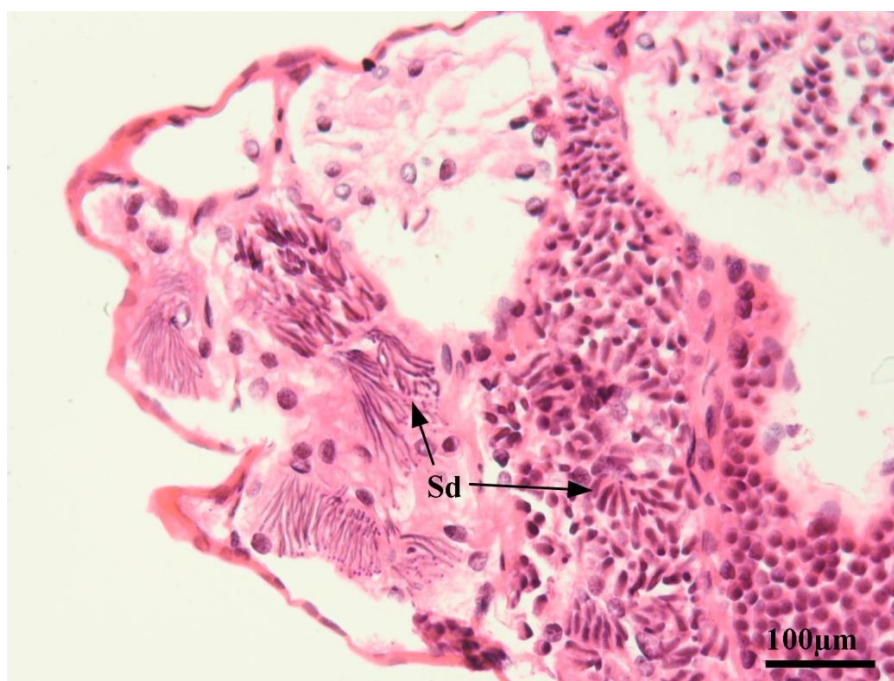
4.3.3 Spermotide

Zgodnje spermotide so okrogle celice in manjše od spermatocitov (sl. 18). Jedro je okroglo, heterokromatsko, nameščeno ekscentrično in veliko od 10 do 11 μm .

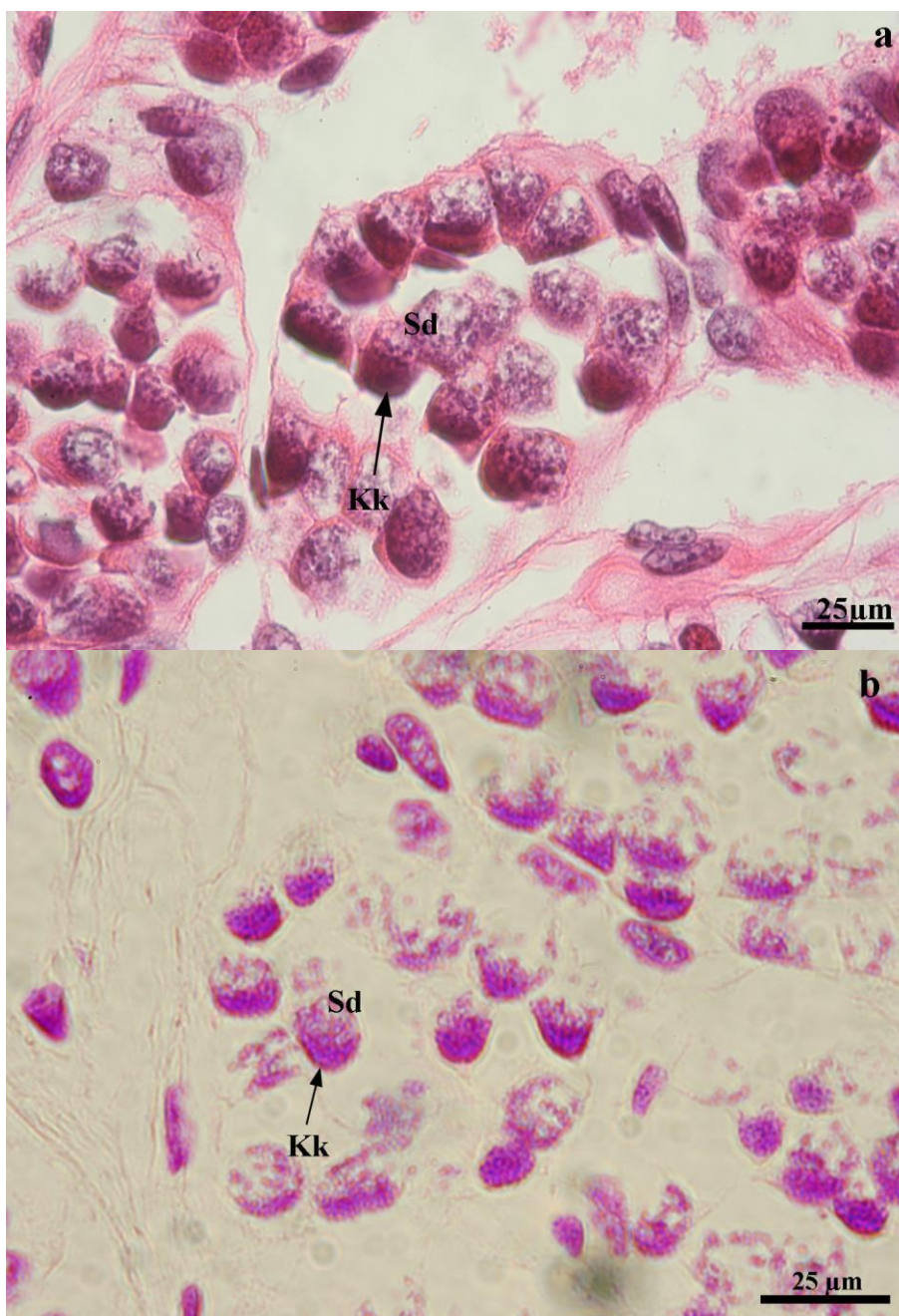
V procesu spermiogeneze se spermotide postopno preoblikujejo v spermatozoje. V vzorcih smo zasledili različne faze spermiogeneze (sl. 19). Spermotide v zgodnji fazi spermiogeneze so rahlo jajčaste oblike, kromatin je kondenziran na enem polu jedra (sl. 20a, b). Nato se jedro podaljšuje, na anteriornem koncu je oblikovan manjši akrosomski vezikel (sl. 21a, b). Pozne spermotide imajo že izrazito podaljšano jedro, akrosomski vezikel pa je večji (sl. 22).



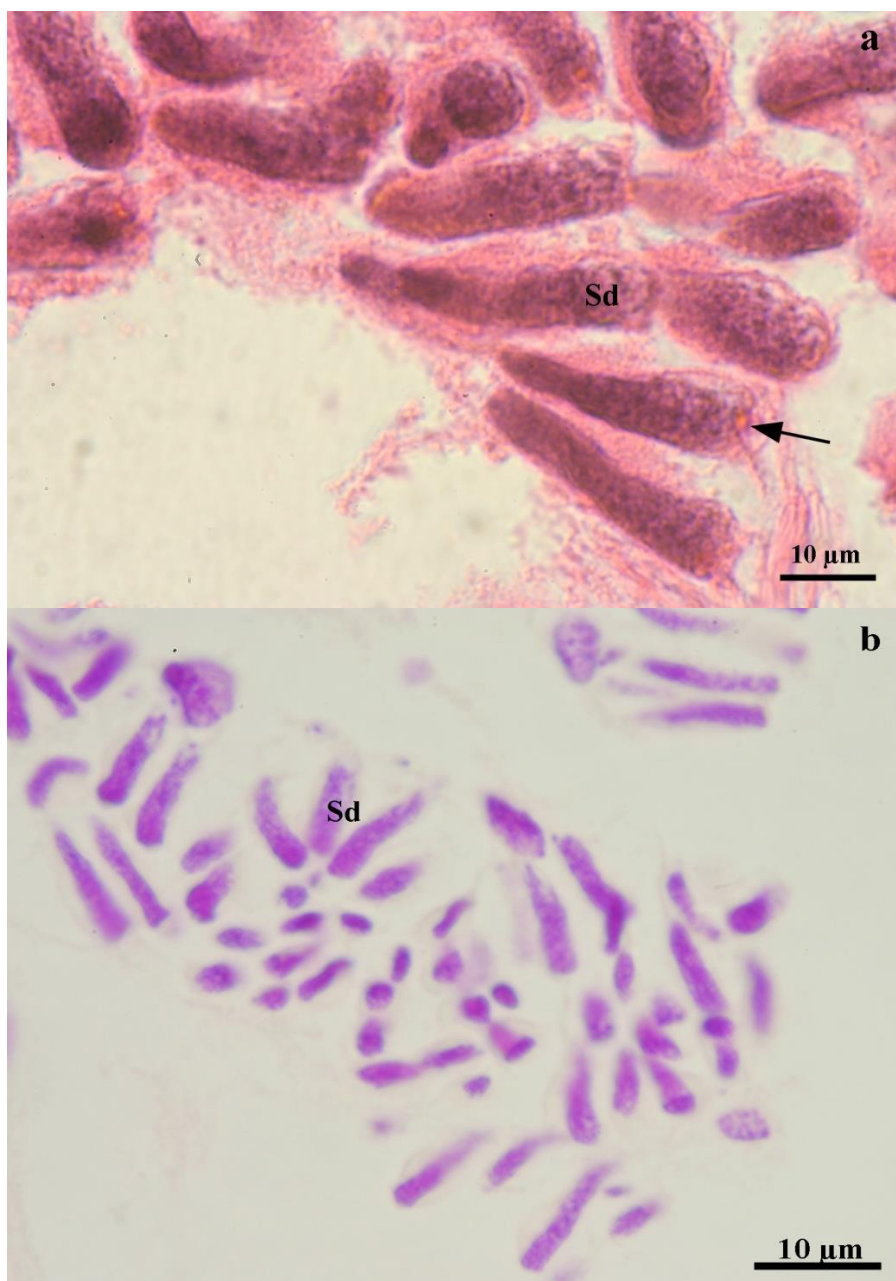
Slika 18. Zgodnje spermotide (Sd) so okrogle, s heterokromatskim, ekscentrično nameščenim jedrom. *P. anguinus anguinus*, P141. Barvanje H&E.



Slika 19. Spermatide (Sd) v različnih fazah spermiogeneze. *P. anguinus anguinus*, P141. Barvanje H&E.



Slika 20a-b. Zgodnja spermiogeneza z značilno kondenzacijo kromatina na enem polu jedra. *P. anguinus anguinus*, P141. Sd, spermatida; Kk, kondenziran kromatin. a. Barvanje H&E. b. Barvanje Feulgen.



Slika 21a-b. Faza podaljševanja spermatid (Sd). a. Spermatide so podaljšane, vidna je tudi že akrosomska regija (puščica). b. Podaljšana jedra spermatid. *P. anguinus anguinus*, P141. a. Barvanje H&E. b. Barvanje Feulgen.

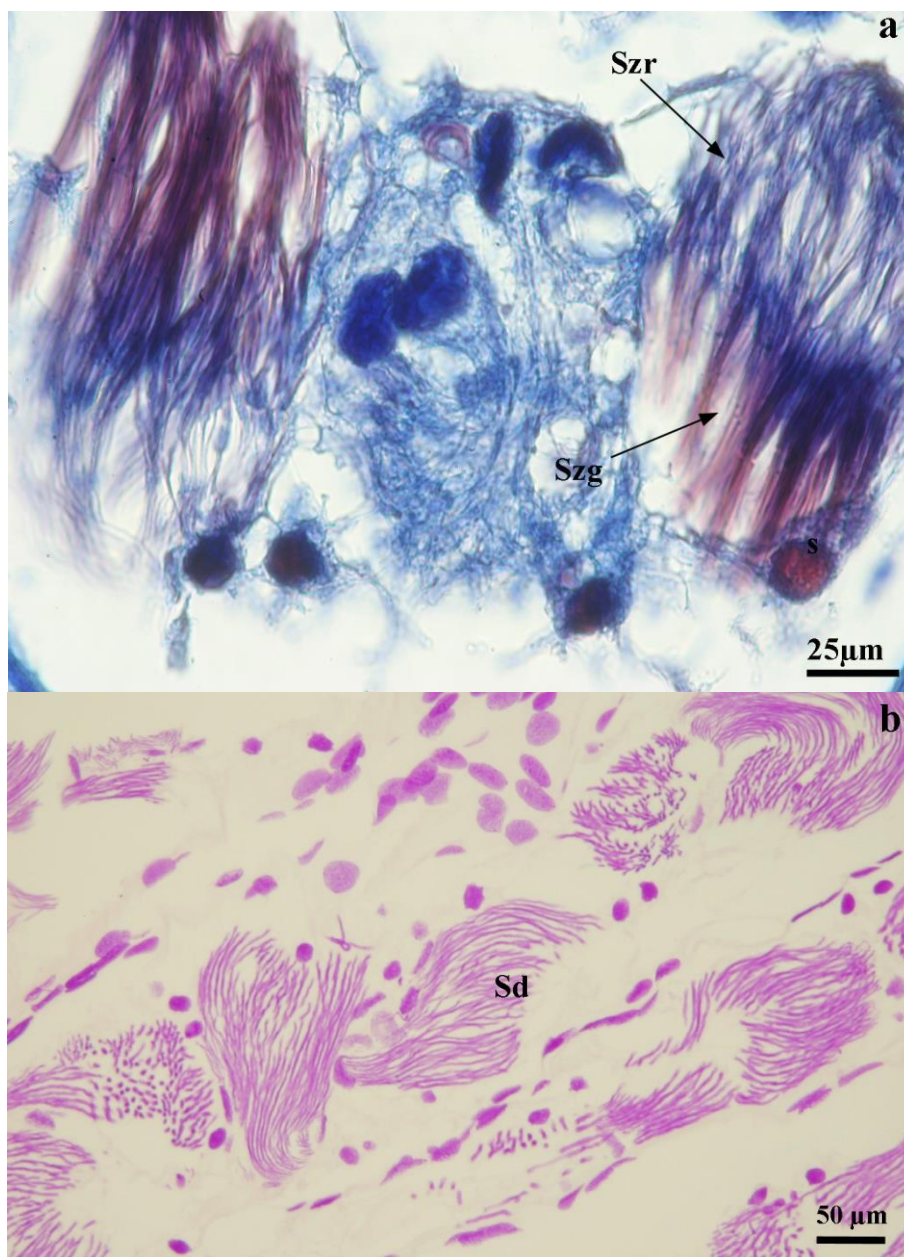


Slika 22. Pozne spermatide (Sd) ene ciste s podaljšanimi jedri in izrazitimi akrosomskimi vezikli (av). *P. anguinus anguinus*, P175. Barvanje H&E.

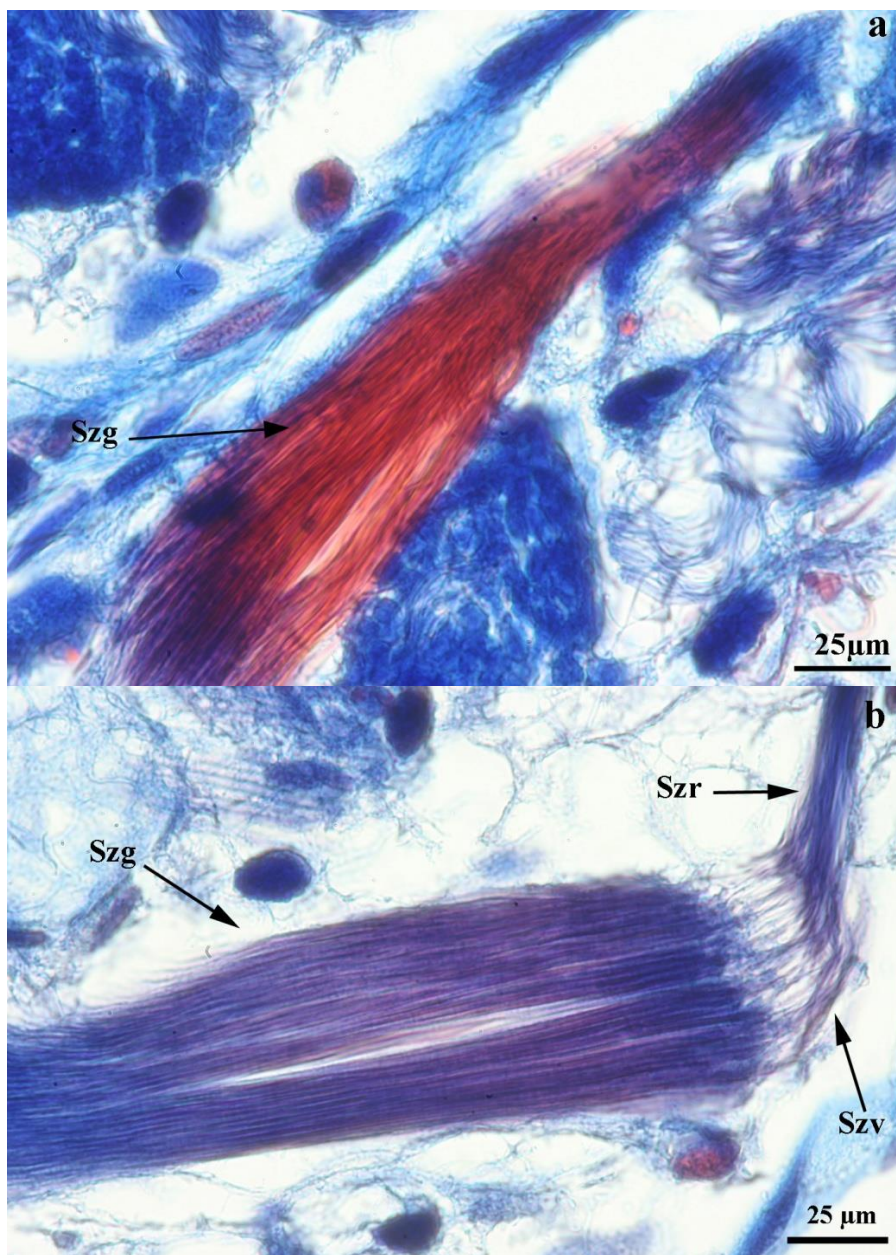
4.3.4 Spermatozoji

Zgodnji spermatozoji imajo že razpoznavno glavino in repno regijo (sl. 23a, b). Jedro je podaljšano in heterokromatsko, pred jedrom je podaljšana akrosomska regija. Repna regija je svetlejša. Spermatozoji, ki pripadajo eni cisti, so z glavami orientirani v enaki smeri proti Sertolijevi celici (sl. 23a, b).

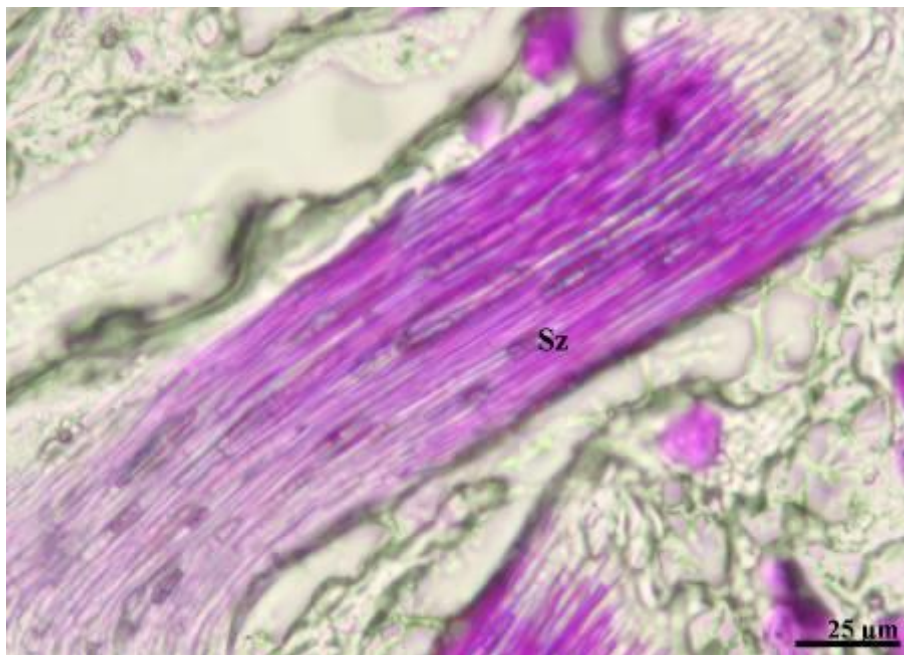
Zreli spermatozoji imajo dolgo glavo s podaljšanim jedrom, kratek vratni del in dolg rep (sl. 24a, b). V apikalnem delu glave, pred jedrom, je podaljšan akrosomski vezikel, ki se s Trikromnim barvanjem obarva rdeče (sl. 24a). Kromatin je v predelu proti vratni regiji gosteje pakiran in se intenzivneje obarva po Feulgnu (sl. 25).



Slika 23a-b. Zgodnji spermatozoji. *P. anguinus anguinus*, P175. Szg, glavina regija spermatozoja; Szr, repna regija spermatozoja, s, jedro Sertolijeve celice. a. Trikromno barvanje. b. Barvanje Feulgen.



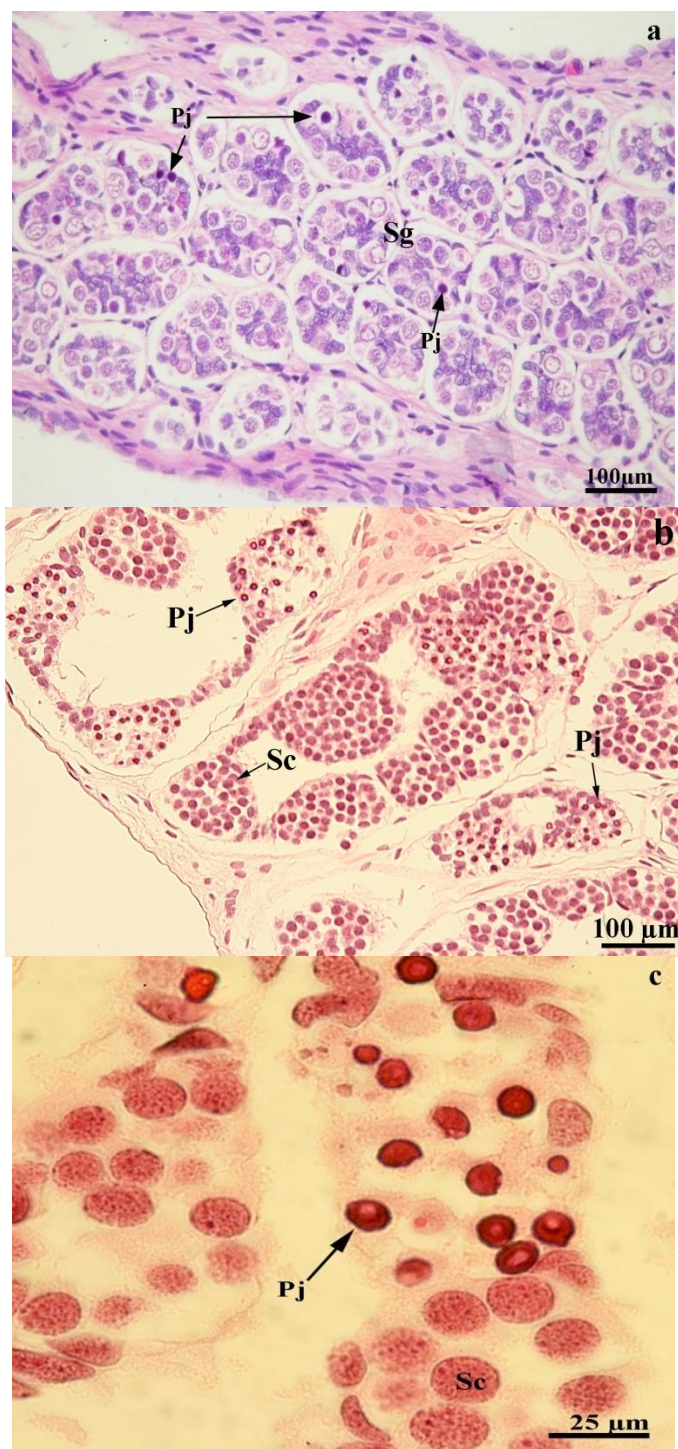
Slika 24a-b. Zreli spermatozoji. a. Sprednji konci glav spermatozoev. b. Osrednji deli glav (Szg) spermatozoev ter njihove vratne regije (Szv) in repki (Szt). *P. anguinus anguinus*, P175. Trikromno barvanje.



Slika 25. Kromatin v jedrih zrelih spermatozojev (Sz). *P. anguinus anguinus*, P175. Barvanje Feulgen.

4.3.5 Celice s piknotičnimi jedri

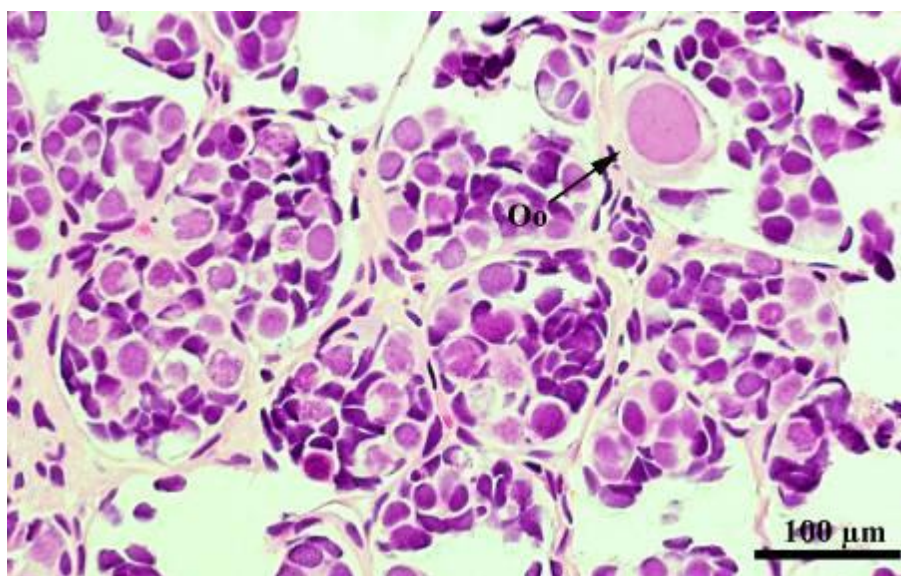
Pri manjšem številu osebkov smo zasledili celice z izrazito heterokromatskimi, piknotičnimi jedri. Prisotne so bile tako med zgodnjimi kot tudi poznimi fazami spermatogeneze. Celice so naključno razporejene med spermalnimi celicami (sl. 26a), lahko pa zapolnjujejo celotno cisto (sl. 26b, c).



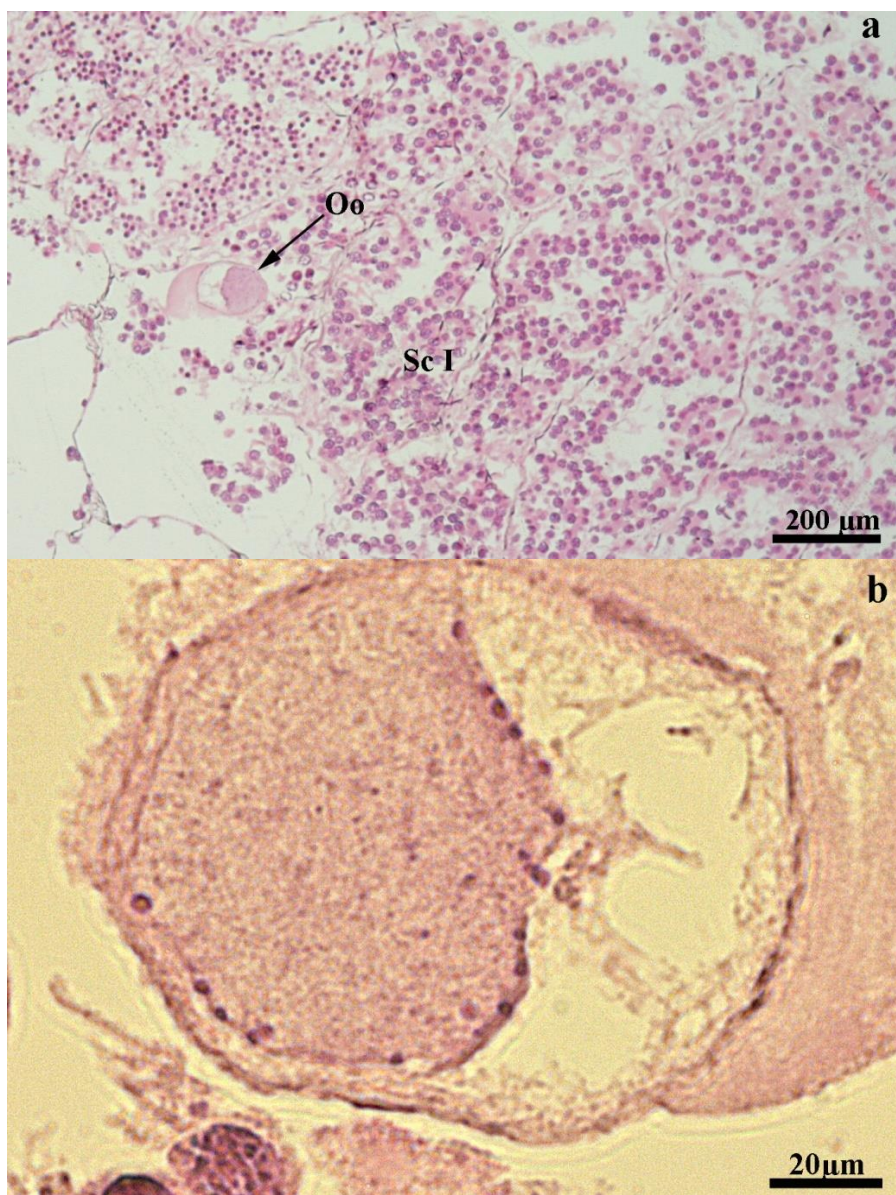
Slika 26a-c. Celice s piknotičnimi jedri. a. Posamezne celice z izredno heterokromatskimi jedri v lobulih s spermatogoniji (Sg). *P. anguinus anguinus*, P108. b in c. Ciste s piknotičnimi jedri (Pj) v lobulih s spermatociti (Sc). *P. anguinus parkelj*, Č015. Barvanje H&E.

4.4 Oociti v testisih

V testisih treh osebkov smo našli oocite, ki so naključno razporejeni med sekundarnimi spermatogoniji ali pa primarnimi spermatociti (sl. 27, 28a) in so opazno večji od spermalnih celic. Merijo od 80 do 170 μm . Jedro oocitov je okroglo, vključuje številna jedrca in krtačaste kromosome (sl. 28b).



Slika 27. Oociti (Oo) so okrogle celice in opazno večje od spermatogonijev. *P. anguinus anguinus*, PXY.
Barvanje H&E.



Slika 28a-b. Oocit (Oo) med primarnimi spermatociti (ScI). Sd, spermatide. V jedru oocita so številna jedra in krtačasti kromosomi (sl. b). *P. anguinus anguinus*, P096. Barvanje H&E.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Zunanja morfologija testisov

Moški spolni organi močerila *Proteus anguinus* so parna struktura, homogeno belih ali rumenkastih barvnih odtenkov. Medtem ko so ovariji pri močerilu pigmentirani (Talaber, 2008; Žibert, 2010), so testisi popolnoma nepigmentirani. Pigmentiranost testisov je značilna za mnoge dvoživke (Zieri in sod., 2007). V splošnem je za ektotermne vretenčarje značilno, da imajo v številnih organih in tkivih, tudi v testisih, pigmentne celice, ki so podobne melanoforam v koži in vsebujejo običajno eumelanin (Zieri in sod., 2007).

Zunanja oblika testisov je pri vretenčarjih različna in so opisani kot ekstremno podaljšani pri večini hrustančnic in kostnic ter okrogle in ovalne oblike pri dvoživkah, plazilcih in pticah (Pudney, 1995). Pri nekaterih repatih dvoživkah in kostnicah so testisi lahko sestavljenih iz izrazitih režnjev in so mnogodelni (Pudney, 1995). Pri močerilu je oblika testisov med osebki zelo variabilna. Testisi so bodisi ozki in trakaste oblike, lahko so podolgovati in nabrekli ali pa imajo eno ali več razširitev.

Trakasti testisi močerila so najmanjši in po vsej dolžini bodisi enakomerno široki ali nekoliko širši v kavdalni regiji. Podolgovati testisi so več centimeterskih velikosti in v premeru bistveno širši od trakastih testisov. Testisi z razširitvami imajo enega do dva režnja, ki jih povezujejo ožji predeli, ki so lahko daljši od ovalno oblikovanih režnjev. Humphrey (1922) takšne testise opisuje pri močeradu *Desmognathus fuscus* in jih imenuje mnogodelni testisi.

Število režnjev mnogodelnega testisa dvoživk je odvisno od starosti živali (Humphrey, 1922; Lofts, 1984, 1987, Bergman, 1994, cit. po Uribe, 2009; Uribe, 2009). Spolno nezreli osebki imajo enostavne testise, sestavljene iz enega režnja, spolno zreli osebki pa naj bi imeli tudi po več režnjev, ki nastajajo z diferenciranjem novih režnjev po spolni dozoritvi osebka (Humphrey, 1922). Spolna zrelost samcev močerila nastopi pri 11 letih pri

temperaturi 11-12 °C (Durand in Dupuy, 1996), oziroma ko osebki doseže velikost od 140 do 180 mm, reproducirati pa se prično pri dolžini od 200 do 240 mm (Durand in Delay, 1981). Osebki v naši raziskavi so dosegali velikosti od 210 do 360 mm, torej bi naj bili spolno zreli in reprodukcijsko sposobni, vendar pa smo opisali tako trakaste testise, ki jih pri repatih opisujejo za spolno nezrele osebke, kot tudi mnogodelne, in nenazadnje tudi enodelne nabrekle, ki so vključevali tudi najbolj zrele faze spermatogeneze. Omenjeni tipi testisov močerila se pojavljajo neodvisno od telesne velikosti osebkov.

Mnogodelne testise z največ dvema režnjema so sicer imeli največji osebki, vendar pa je imel mnogodelni testis, sicer z enim režnjem, tudi osebki, ki je bil po velikosti najmanjši. Različni avtorji navajajo različno število režnjev, ki naj bi jih imele repate dvoživke (Humphrey, 1922; Joly, 1971, cit. po Flament in sod., 2009; Sever, 1974). Pri odraslih osebkih iz rodu *Salamandra* je testis lahko sestavljen tudi iz 6 režnjev. Prvi reženj se oblikuje že ob koncu metamorfoze, spermatogeneza pa se prične v tretjem letu njegovega življenja (Joly, 1971, cit. po Flament in sod., 2009).

Da število režnjev znotraj istega rodu ni enotno in da ni nujno, da imajo osebki znotraj iste vrste vsi režnjate testise, četudi so približno enakih velikosti, opisuje Sever (1974) za tri vrste pupkov iz rodu *Eurycea*. Tudi pri močerilu se je izkazalo, da so znotraj iste vrste, navkljub enakim telesnim velikostim, testisi različne oblike.

5.1.2 Oblika testisa in zoritvene faze spermatogeneze

Pojavljanje zoritvenih faz spermalnih celic v testisih preučevanih osebkov močerila je različno. Trakasti testisi so imeli samo mlajše zoritvene faze (primarne in sekundarne spermatogonije, primarne spermatocite) vzdolž celotnega testisa. Gonadosomatski indeks trakastih testisov je bil najnižji.

Podolgovati in nabrekli testisi so imeli vse zrelostne faze, vključno z zreliimi spermatozoi. Tudi gonadosomatski indeks je pri tem tipu testisa najvišji. Osebki so bili žrtvovani v poznem poletnem in v zimskem obdobju, kar bi lahko kazalo na dozorevanje spermalnih celic v zimskem obdobju. Namreč osebka poletnega obdobja (avgust) sta v testisih imela zgodnje ali pa pozne spermatide, decemberski osebek pa zrele spermatozoje. Žal je bil vzorec osebkov premajhen, da bi lahko zrelost testisov kakorkoli povezovali z velikostjo osebkov in določeno sezono leta.

V testisih z razširitvami so spermatociti najzrelejša zoritvena faza, ki so se pojavljali v razširitvah, medtem ko so zožitve vključevale le spermatogonije. Sprva je prevladovalo mnenje, da so ozki deli sterilni, torej da ne vsebujejo reproduktivnih celic, vendar je Humphrey (1992) te trditve ovrgel, saj je našel spermatogonije tudi v zožitvah. Gonadosomatski indeks pri teh testisih je bil bistveno nižji od podolgovatih in nabreklih testisov, vendar višji od trakastih testisov.

Testis z razširitvami oz. mnogodelni testis, katerega je pri močeradu *Desmognathus fuscus* opisal Humphrey (1922), nastane zaradi počasnega napredovanja spermatogenega vala in zakasnjene regeneracije izpraznjenih lobulov. Kot je znano za repate dvoživke, vsi lobuli ne dozoriijo in sprostijo spermatozoev hkrati, spermatogeni val pa se širi v cefalo-kavdalni smeri testisa (Humphrey, 1922), kar je bilo moč opaziti tudi pri močerilu.

Pojavljanje zoritvenih faz spolnih celic je različno tako v vzdolžni osi testisa (cefalo-kavdalno), kot tudi v prečni osi. Glede na vzdolžno os testisa so zgodnejše faze spermatogeneze (spermatogoniji, primarni spermatociti) predvsem v cefaličnem delu testisa, zrelejše faze (sekundarni spermatociti, spermatide, spermatozoi) pa v kavdalnem delu.

V vseh tipih testisov močerila so spermatogoniji tudi v vezivu osrednjega dela testisa ob spermalnih vodih in so zaloga za prihodnje spermatogenetske valove (Pudney, 1995).

Ker so klimatske razmere v podzemlju relativno konstantne, smo pričakovali, da pogostejšega pojavljanja zrelejših faz spolnih celic v določenih letnih časih ne bo, čeprav je sezonsko spreminjanje morfologije testisov značilno za dvoživke (Chavadej in sod.,

2000). Zunanji dejavniki, kot so padavine, temperatura in fotoperioda vplivajo na ciklične spremembe anatomije in zunanje morfologije testisov dvoživk (Rastogi, 1976). Pri žabi *Rana catesbeiana*, ki živi v okolju z izrazitimi sušnimi in deževnimi obdobji, je sezonsko spreminjanje morfologije testisov izrazito in je vezano na potek spermatogeneze in reproduktivno sposobnost osebka (Chavadej in sod., 2000). Med sezono parjenja je produkcija spermatid in spermatozoev velika, medtem ko v neparitvenem obdobju večji del tubulov zavzemajo zgodnejše faze spolnih celic.

V testisih repatcev obnavljanje zarodnih celic poteka v večji meri spomladi, ko je intenzivna proliferacija spermatogonijev in diferenciacija zgodnjih spermatogenih faz (Uribe, 2009). Starejše faze spermatogeneze pa dominirajo skozi poletje. Spermiacija se pojavi v jeseni in pozimi, ko je spermatozoev največ. Reprodukivni cikel repatcev torej vključuje dve fazi: obdobje spermatogeneze spomladi in poleti ter obdobje spermiacije in regresije v jeseni in pozimi.

V testisih dvoživk, ki se parijo sezonsko, je med paritveno sezono veliko spermatozoev in zgodnjih spermatid. Med neparitveno sezono pa je teh celic manj, največ pa je spermatogonijev in primarnih spermatocitov (Chavadej in sod., 2000).

Pri brezrepcih, ki živijo v zmernih območjih in imajo sezonski reprodukivni cikel, je spermatogeneza sinhrona v večini semenskih tubulov testisa (Lofts, 1974, cit. po Ogielska in Bartmanska, 2009).

Za dvoživke, ki živijo v okolju s konstantno temperaturo je značilna asinhrona kontinuirana spermatogeneza (Jürgensen, 1992, Ogielska in Bartmanska, 2009). Produkcija spermatogonijev in spermatocitov je konstantna, spermatozoi pa so v lobulih skozi celo leto (van Oordt, 1960, Lofts, 1974, Sasso-Cerri in sod. 2004, cit. po Sasso-Cerri, 2006). Glede na to, da so v testisu močerila vse faze spermatogeneze, vključno s spermatozoi, bi lahko spermatogenezo močerila opredelili kot kontinuirano, kar bi bilo potrebno preveriti na večjem vzorcu.

Pri dvoživkah, ki imajo kontinuirano spermatogenezo ostaja gonadosomatski indeks (GSI) konstanten skozi celoletni reproduktivni cikel (Leicht in sod, 1983, Sasso-Cerri in sod. 2004, cit. po Sasso-Cerri, 2006). GSI se ohranja vsled kompenzacije volumnov dveh kompartmentov testisa, in sicer intersticijskega žleznega tkiva in odvodnih vodov ter semenskih cevk. Sočasno z upadom volumenske gostote semenskih cevk testisa se volumenska gostota intersticijskega tkiva poveča (Sasso-Cerri in sod, 2004, cit. po Sasso-Cerri, 2006).

Pri vrstah s sezonskim reproduktivnim ciklom gonadosomatski indeks narašča med hibernacijo in pred paritveno sezono, njegov maksimum je v paritveni sezoni (Kao in sod., 1993). V poznem paritvenem obdobju in v post paritvenem obdobju je GSI nižji (Chavadej in sod., 2000). Enako velja za maso testisov. Po paritveni sezoni se masa testisa zmanjša, v testisu pa so posamezni skupki spermatogonijev ali celična gnezda. Masa testisov se začne povečevati postopoma v neparitvenem obdobju, ko začnejo spermatogoniji obnavljati zarodno linijo. V paritvenem obdobju se masa testisov vidno poveča, hkrati pa se povečuje število celičnih gnezd. Večina teh gnezd se v paritveni sezoni razvije v spermatozoje (Chavadej in sod., 2000).

Glede na zgoraj opisane spremembe oblike testisa, mase in GSI pri dvoživkah, bi lahko trakasti testisi močerila, ki imajo samo spermatogonije, predstavljali nezrele testise, kar bi pomenilo, da se je spermatogeneza pri teh osebkih šele začela, vendar pa lahko takšni testisi predstavljajo tudi testise po paritveni sezoni, saj so osebki, glede na podatke Durand in Delay (1981) spolno zreli in reproduktivno sposobni.

Odsotnost svetlobe (in posledično fotoperiode) in večjih temperaturnih sprememb v podzemnem biotopu pomeni, da ni sinhronizacije dnevnih ritmov. Namreč cirkadiane dogodke kontrolirajo dnevne okoljske spremembe (Hervant in sod., 2000). Dvoživke, ki so izpostavljene dnevno nočnemu ritmu, imajo dnevne cikle spontane aktivnosti in (ali) mirujoč metabolizem. Pri podzemeljskih žuželkah, hroščih in ribah pride do izgube ali redukcije cirkadianih ritmov (Lamprecht in Weber (1985, cit. po Hervant in sod., 2000). Tudi pri močerilu sta dnevna periodična aktivnost in metabolizem reducirana (Hervant in sod., 2000). Redukcija cirkadianih ritmov pri podzemeljskih živalih je rezultat regresivne

evolucije (Lamprecht in Weber, 1985, cit. po Hervant in sod., 2000). Na podlagi tega, lahko predvidevamo, da pomanjkanje svetlobe in reducirani cirkadiani ritmi pri močerilu lahko vplivajo na periodične aktivnosti kot je razmnoževanje in njegov cikel.

5.1.3 Anatomija testisov

5.1.3.1 Osnovna anatomija

Osnovna anatomija testisa pri močerilu je podobna kot jo opisujejo za druge repate dvoživke (Humphrey, 1922; Callard, 1992; Uribe, 2003; Flament in sod., 2009). Testis obdaja tanka vezivna tunica albuginea, notranjost testisa pa je razdeljena v številne lobule, ki jih razmejuje tanko vezivno tkivo. Zoritev spolnih celic poteka znotraj posameznih cist, ki jih lobuli vključujejo. Posamezna cista je primarna zarodna enota in nastane, ko Sertolijeva celica ovije ali obda primarni spermatogonij (Callard, 1992).

Prednost cističnega tipa spermatogeneze pri ribah in dvoživkah je večje število gamet in je prilagoditev na zunanjo oploditev (Manochantr in sod., 2003)

Lobuli v testisih dvoživk so slepo zaprte vrečke in vsako leto ponovno nastanejo sočasno s spermatogeno dejavnostjo (Pudney in sod., 1983, Pudney in Callard, 1984, cit. po Callard 1992). Velikost lobulov in njihova oblika vzdolž testisa variira in je odvisna od zoritvenih faz, ki jih ciste posameznih lobulov vključujejo (Pudney, 1995). Lobuli v podolgovatem in nabreklem testisu močerila so na cefalnem delu manjši in tesno nameščeni eden poleg drugega. V njih so predvsem zgodnje faze spolnih celic (spermatogoniji in spermatociti), znotraj posameznega lobula je izrazit lumen. Velikost lobulov se povečuje v kavdalni smeri, ciste pa postajajo bolj ovalnih oblik, število celic znotraj cist se povečuje, kar vodi v povečanje lobulov. Zrele faze zarodnih celic so v kavdalnem delu testisa, lobuli tega dela testisa so razrahljani in v predelih, ki vključujejo spermatozoje, tudi popolnoma brez stene cist. Razporeditev zoritvenih faz spolnih celic v cefalo-kavdalni osi testisa je značilna za repate dvoživke (Uribe, 2003). Zgodnejše faze prevladujejo v cefaličnem delu testisa, zrelejše faze pa v kavdalnem delu. Tako razporeditev imenujejo zonalna razporeditev (Pierantoni in sod., 2002).

V trakastih testisih so lobuli majhni in okroglejši, saj so v njih samo zgodnejše faze spermalnih celic in so ravno tako tesno razporejeni po vsej dolžini testisa. Enak opis lobulov drži za končne zožitve razširjenih testisov. V zoženih predelih so samo spermatogoniji, zato so lobuli tesno razporejeni in okroglih oblik. V razširitvah se lobuli povečajo in postanejo podaljšani ali bolj ovalnih oblik, saj se spolne celice razvijejo v spermatocite, na račun delitve in naraslega števila celic v cisti pa se lobuli povečajo.

Razvoj zarodnih celic znotraj cist je sinhron, znotraj lobula pa je lahko razvoj cist sinhron ali asinhron. Pri slednjem so ciste znotraj lobula v različnih fazah razvoja, katerega posledica je spermatogeni val (Uribe, 2003). Sinhron razvoj celic znotraj ciste omogoča interakcija med Sertolijevimi celicami in spermalnimi celicami, ki je zastopana med celotno spermatogenezo (Billard, 1970, cit. po Santos in sod., 2001). Spermatogoniji znotraj ciste tvorijo citoplazemske projekcije na periferiji, ki se uvihajo v citoplazmo obdajajoče Sertolijeve celice (Pudney, 1995). Povezave med njimi vzdržujejo prepustno pregrado z zarodnimi celicami med spermatogenezo, omogočajo endokrino aktivnost, fagocitozo degenerirajočih zarodnih celic in rezidualnih teles (Grier 1993, cit. po Uribe, 2003). Prav tako so vse hčerinske celice ene ciste med seboj povezane s citoplazemskimi mostički, ki obstajajo do dokončane diferenciacije spermatid v spermije. Značilnost spermatogeneze je namreč, da pri razvijajočih zarodnih celicah v času med mitozo in mejozo ne poteče popolna citokineza (Gilbert, 2008).

Spermatogeneza znotraj lobula poteka v proksimalno-distalni smeri glede na notranje odvodne vode testisa. Lobuli bližje odvodnih vodov testisa (torej proksimalni lobuli) vključujejo primarne spermatogonije, ki so zaloga za bodoče valove spermatogeneze.

5.1.3.2 Intersticijsko tkivo

Žleznega tkiva, ki ga v testisih tvorijo intersticijske Leydigove celice (Pudney in sod. 1983, Pudney in Callard, 1984, cit. po Callard, 1992), pri močerilu nismo zasledili. Intersticijske celice namreč niso diferencirane v vseh fazah spermatogeneze, povečajo se le med spermiacijo in degeneracijo Sertolijevih celic (Uribe, 2003). Nediferencirane Leydigove celice so po morfologiji podobne vezivnim celicam in zato tudi težje prepoznavne (Pudney in sod. 1983, Pudney in Callard, 1984, cit. po Callard, 1992). Pri repatih je intersticijsko tkivo hipertrofirano jeseni in pozimi, kar sovпада s številčnostjo spermatozoev v lobulih. Tkivo nato vidno upade spomladi, ko spermatozoev skorajda ni več, prisotne pa so ciste naslednje generacije, torej naslednjega spermatogenetskega vala (Uribe, 2003).

Pierantoni in sod. (2002) so pri nekturu (*Necturus maculosus*) opazili, da na začetku paritvene sezone nezreli del gonad periferno zamenjajo nove zarodne celice in tvorijo subkapsularno področje, torej področje pod vezivno kapsulo testisa, zorečih celic. V oktobru/novembru je subkapsularno tkivo sestavljeno iz zrelih spermatozoev in Sertolijevih celic. Spermiacija in regresija izpraznjenih delov testisa spodbudita hipertrofijo in diferenciacijo Leydigovih celic, ki tvorijo žlezno tkivo. Nekaj mesecev kasneje, po prenehanju aktivne spermatogeneze, žlezno tkivo izgine kot posledica progresivne degeneracije Leydigovih celic.

Diferenciacija in hipertrofija Leydigovih celic je zelo pomembna pri spermiaciji (Humphrey, 1921, Pudney in sod., 1978, Pudney in Callard, 1984, cit. po Callard, 1992). Pri repatih dvoživkah s sezonskim parjenjem je višji nivo testosterona, ki sledi tvorbi žleznega tkiva v jeseni, verjetno povezan z zorjenjem sperme v odvodnih vodih, kot tudi pojavom sekundarnih spolnih znakov (Specker in Moore, 1980, Tanaka in Takikawa, 1983, Imai in sod., 1985, Garnier, 1985, cit. po Fraile in sod., 1989). Porast nivoja testosterona spomladi pa je povezana s ponovnim pojavom spolnih znakov, ki so delno poniknili med zimo (Tanaka in Takikawa, 1983, cit. po Fraile in sod., 1989) ter s paritvijo in začetkom novega spermatogenega cikla (Fraile in sod., 1989).

5.1.4 Histološke značilnosti zoritvenih faz spermatogeneze

Spermatogeneza je proces pri katerem se spermalne zarodne celice delijo in v procesu mejoze diferencirajo v spermatocite, ki se postopno preoblikujejo v spermatide. Slednje se v procesu spermiogeneze preoblikujejo v zrele spermatozoje (Pierantoni in sod., 2002).

Med spermatogenezo in spermiogenezo vretenčarjev je kromatin podvržen velikim molekularnim reorganizacijam in kondenzaciji, zaradi katerih postane bolj kompakten in metabolno inerten (Wanichano in sod, 2001, cit. po Manochantr in sod., 2003).

Glede na razporeditev kromatina in velikost ter obliko jedra smo določili šest zoritvenih faz spolnih celic v testisu močeri, tako kot opisuje Uribe (2003) za aksolotla.

Nekateri avtorji navajajo še podrobnejšo razdelitev razvojnih faz spolnih celic v testisih dvoživk. Manochantr in sod. (2003) so glede na velikost jedra in vzorec ter stopnjo kondenzacije kromatina, in kasneje, formacijo akrosoma in repa, razdelili spolne celice pri *Rana tigrina* v štirinajst stopenj zoritve (primarni spermatogoniji, sekundarni spermatogoniji, primarni spermatociti, spermatociti-leptoten, zigoten, pahiten, diploten, diakineza-metafaza, sekundarni spermatociti, spermatide I, spermatide II, spermatide III, spermatide IV, spermatozoji).

Chavadej in sod. (2000) pa so pri *Rana pipens* razdelil spolne celice v devet stopenj zoritve: (spermatogoniji, spermatociti –leptoten, zigoten, pahiten, diploten, diakineza, sekundarni spermatociti, spermatide in spermatozoji). Fazo spermiogeneze so pri *R. catesbeiana* razdelili v pet faz, glede na lastnosti jedra ter določili 12 stopenj razvoja zarodnih celic (primarni spermatogoniji, sekundarni spermatogoniji, spermatociti –leptoten, zigoten, pahiten, diploten, diakineza in metafazni spermatociti, sekundarni spermatociti, zgodnje spermatide, srednje ali okrogle spermatide, pozne spermatide in spermatozoji).

Spermatogoniji

Spermatogoniji so največje, okrogle do ovalne celice, s svetlejšo, rahlo granulirano citoplazmo. Velikost jedra varira od 22 do 25 μ m in je eukromatsko ter vključuje zelo dobro vidno jedrce, kar kaže na veliko transkripcijsko aktivnost in visoko stopnjo ribosomske sinteze (Manochantr in sod., 2003).

Primarne spermatogonije smo opazili v testisih vseh proučevanih osebkov močeri. Pri nabreklih testisih so spermatogoniji predvsem v cefalični regiji testisa in vzdolž testisa ob vezivu in seminifernih vodih ter žilah v medianem delu testisa. Pri trakasti obliki testisov so v lobulih samo spermatogoniji in zavzemajo celotno prostornino testisa. Spermatogoniji so posamezno v vezivnem tkivu ali pa v skupkih po nekaj celic. Posamični spermatogoniji so lahko tudi med zrejšimi fazami spermatogeneze. Spermatogoniji proliferirajo z mitozo in tako obnavljajo zalogo zarodnih celic, ki ostajajo znotraj iste ciste (Manochantr in sod., 2003). Iz njih nastajajo sekundarni spermatogoniji (Uribe, 2009). Hčerinske celice se sinhrono delijo, njihova rast je enakomerna, tako da so vse celice znotraj posameznih cist na enaki stopnji razvoja (Manochantr in sod., 2003).

V vseh proučevanih testisih so bili zastopani tudi sekundarni spermatogoniji. Za razliko od primarnih so zastopani v manjših skupkih od dveh do štirih celic, ki jih obdaja Sertolijeva celica. Za lobule, ki vključujejo ciste sekundarnih spermatogonijev je značilen tudi lumen (Uribe, 2003). Po tej značilnosti smo sekundarne spermatogonije tudi razlikovali od primarnih, saj se po velikosti od primarnih bistveno ne razlikujejo. Sekundarni spermatogoniji vstopijo v mejozo in se preobrazijo v primarne spermatocite. Mejoza vključuje dve zaporedni celični delitvi, vendar se samo pri prvi kromosomi podvojijo. Sekundarni spermatogoniji se preoblikujejo v primarne spermatocite, brez celične delitve (Weather in sod. 1988, cit. po Uribe, 2003).

Primarni in sekundarni spermatociti

Primarni spermatociti so manjši od spermatogonijev, jedro je okroglo, veliko 17 μ m, kromatin je kondenziran. Imajo tudi podvojeno garnituro kromosomov (Uribe, 2003). V testisih močerala se pojavljajo v različnih stadijih profaze mejoze I. Najpogosteje zastopana je bil stadij pahitena, ki je časovno tudi najdaljša faza mejoze (Uribe, 2003). Druge faze profaze so krajše in jih je v testisih tudi težje zaslediti (Uribe, 2003), kar opisujejo tudi za ostale dvoživke. Npr. pri žabi kremljičarki *Xenopus laevis* so spremljali proces spermatogeneze in vitro, in sicer od začetka mejoze do konca spermatogeneze in ugotovili, da traja predmejotska faza 6-7 dni, stadij leptoten 4 dni, stadij zigoten 6 dni, stadij pahiten 12 dni, stadij diploten 1 dan, prva in druga mejotska delitev 1 dan, spermiogeneza 12 dni. Celotna spermiogeneza torej poteka 42-43 dni ali 6 tednov (Kalt, 1976 cit. po Ogielska in Bartmanska, 2009). Vsak posamezen stadij profaze mejoze I ima značilnosti, na podlagi katerih smo jih tudi pri naših osebkih določili. Tako je za stadij leptotena značilno, da so celice večje od spermatogonijev, imajo okroglo jedro, kromatin pa se začne kondenzirati v skupke, ki so enakomerno razporejeni (Chavadej in sod., 2000). V stadiju zigotena je prisotnega več gostejšega heterokromatina ter sinaptonema, ki jo tvorijo sparjeni homologni kromosomi med prvo mejotsko delitvijo (Santos in sod., 2001). Jedro postane manjše (Manochantr in sod., 2003). Prisotnost dolgih vrvic heterokromatina v jedru je značilna za stadij pahitena. Teh celic je največ in so tudi najbolj opazne. Celice v stadiju diplotena so okrogle ali ovalne, kromatinski bloki pa so večji in povezani z jedrno ovojnico (Manochantr in sod. 2003). Najlepše prepoznavna faza je metafaza, v kateri se kromosomi poravnajo v ekvatorjalni regiji jedra (Manochantr in sod., 2003).

Jedra sekundarnih spermatocitov so manjša od primarnih spermatocitov in so velika med 12-13 μ m. Razlika med primarnimi in sekundarnimi spermatociti pa ni samo v velikosti celic in prepoznavnimi fazami mejoze, ampak tudi v tem, da imajo sekundarni spermatociti v jedru zgoščitve heterokromatina. Sekundarne spermatocite smo našli le pri majhnem številu vzorcev, saj je ta faza kratka in so zato tudi redkeje vidni na preparatih (Ramagosa in sod., 1999; Manochantr in sod., 2003; Uribe, 2003).

Spermatide in spermatozoi

Zgodnje spermatide so manjše celice, z okroglimi heterokromatskimi jedri, ki dosegajo velikosti med 10 in 11 μm in nastanejo po dveh zaporednih mejotskih delitvah sekundarnih spermatocitov.

Tekom spermiogeneze poteka postopno podaljševanje jedra, kondenzacija kromatina, eliminacija citoplazme in oblikovanje flageluma (P de A. Prado in sod., 2004). Pozne spermatide imajo že močno podaljšano glavo s podaljšanim jedrom, volumen citoplazme pa se zmanjša (Ramagosa in sod., 1999). Oblikujejo se spermatozoi. Število cist s spermatozoi je pred spermiacijo večje kot po spermiaciji (Uribe, 2009).

Tako kot pri drugih dvoživkah, med spermiogenzo nastane tudi akrosomski vezikel, ki nastane z združevanjem veziklov Golgijevega aparata (Scheltinga in Jamieson, 2003). Sledi njegovo podaljševanje, akrosomski vezikel prekrije sprednji del jedra.

Spermatozoi v testisu močerila imajo veliko in podaljšano glavo, kratko vratno regijo in dolg rep. Glava vsebuje koničast, podaljšan akrosom in jedro, ki zavzame skoraj celotno glavino regijo. Rep pri dvoživkah vključuje aksialno vlakno, ki sega od vratne regije in valovito membrano z aksonemo (Pudney, 1995).

Različne skupine dvoživk imajo različne oblike in velikosti spermatozoev. Različnih oblik je tudi akrosomski kompleks, ki ga sestavljata akrosomski vezikel in perforatorium, ki je pod akrosomom. Oba vsebujeta proteolitske encime, ki omogočajo prehod spermatozoja med fertalizacijo skozi želatinozne plasti in vitelinsko ovojnico, ki obdajajo jajce (Uribe, 2009).

Pri sleporilih *Gymnophiona* sta zastopana predvsem dva tipa spermatozoev: spermatozoi z dolgo glavo in koničastim akrosomom ali pa s krajšo in širšo glavo z manjšim akrosomom (Wake, 1994). Tudi spermatozoi močeradov rodu *Salamandra* imajo daljšo glavo in rep, vendar pa pri njih ni akrosomske kapice (Austin in Baker, 1964, Wortham in

sod, 1977, cit. po Wake, 1994). Za spermatozoje brezrepcev je značilna akrosomska kapica (Burgos in Fawcett, 1956, Morrisett, 1974, Van der Horst, 1979, cit. po Wake, 1994).

Na kavdalnem koncu podolgovatega in nabrekliga testisa močerila so bile opazne posamezne prazne ciste brez zarodnih celic ali pa so vključevale abnormalne spermatozoje. V testisu aksolotla so take ciste opazili ob sprostitvi zrelih spermijev v odvodne vode testisa (Uribe, 2003). Abnormalne spermatozoje kasneje fagocitirajo Sertolije celice (Schindelmeise et al. 1985, cit. po Uribe 2003). V testisu močerila, ki je vključeval prazne ciste oz. ciste z abnormalnimi spermatozoi, sprostitve spermatozojev v odvodne vode nismo opazili.

5.1.5 Celice s piknotičnimi jedri

V testisih močerila smo zasledili celice z intenzivno heterokromatskimi ali piknotičnimi jedri. Najverjetneje gre za propadanje celic. Pojavljanje apoptoz v testisih opisujejo za ribe in dvoživke in jo povezujejo z omejitvijo števila celične populacije in inhibicijo zorjenja nenormalnih zarodnih celic (Yin in sod., 1998, cit. po Sasso-Cerri, 2006). Propadle zarodne celice nato fagocitirajo Sertolijeve celice (Allan in sod, 1992, Shiratsuchi in sod., 1997, Sasso- Cerri in Miraglia, 2002, cit. po Sasso-Cerri, 2006). Apoptozo lahko sproža pomanjkanje ali pa odsotnost esencialnih faktorjev, kot so hormoni, rastni faktorji citokineze, ki so potrebni za uspešen spermatogeni cikel (Tapainainen in sod. 1993, Blanco-Rodriguez, 1998, cit. po Sasso-Cerri, 2006).

Apoptoza je fiziološki proces celične smrti, ki se pojavi med proliferacijo in diferenciacijo tkiva (Raff, 1998, Cohen, 1999, Lockshin in Zakeri, 2004, cit. po Sasso-Cerri, 2006). Celična smrt zaradi apoptoze vključuje delovanje proteaz (kaspaz), ki povzročijo fragmentacijo DNK (Wyllie in sod., 1980, Raff, 1998, Lockshin in Zakeri, 2004, cit. po Sasso-Cerri, 2006).

Različne študije so potrdile tudi vpliv temperature in endokrinih faktorjev na apoptozo zarodnih celic pri ribah (Prisco in sod., 2003, cit. po Sasso-Cerri, 2006) in repatih dvoživkah (Yazawa in sod. 1999, 2000, 2003, Ricote in sod. 2002, cit. po Sasso-Cerri, 2006). Podaljšana fotoperioda in višja temperatura poleti, zaradi delovanja endokrinih

faktorjev, verjetno vplivata na povišano pogostnost apoptoze (Sasso-Cerri, 2006). Vendar pa vloga apoptoze pri sezonski spermatogenezi pri dvoživkah še ni bila dovolj preučevana.

5.1.6 Oociti v testisu močerila

V testisih nekaterih osebkov močerila so prisotni posamezni oociti, ki so bili naključno razporejeni med sekundarnimi spermatogoniji in primarnimi spermatociti. Po velikosti in značilnostih ustrezajo zgodnjim oocitom I v stadiju diploten (Talaber 2008).

Prisotnost diploidnih oocitov navajajo za razvijajoče juvenilne testise nekaterih vrst dvoživk iz družin pravih žab Ranidae in jadralk Racophoridae (Ogielska in Bartmanska, 2009). Našli so jih pri vrstah žab, kot so *Rhacophorus arboreus* (Tanimura in Iwasawa, 1989, cit. po Ogielska in Bartmanska, 2009), *Rana catesbeiana* (Hsu in sod., 1977, 1979, cit. po Ogielska in Bartmanska, 2009) in občasno tudi pri vrstah *Rana lessonae* in *Rana esculenta* (Ogielska in Bartmanska, 1999, cit. po Ogielska in Bartmanska, 2009). Pri vrsti žabe *R. nigromaculata* so bili oociti najdeni skoraj pri polovici preučevanih samcev (Kobayashi in Iwasawa, 1976, 1988, cit. po Ogielska in Bartmanska, 2009). Tak testis imenujejo tudi ovotestis. Pri močerilu so naključni oociti prisotni tako pri trakastem tipu testisa z zgodnejšimi fazami zoritve zarodnih celic, kot tudi pri enodelnem širokem tipu testisa, ki vključuje faze spermiogeneze. Torej ne gre samo za značilnost juvenilnih testisov.

Diferenciacijo ženskih zarodnih celic znotraj testisa verjetno povzroči motnja v hormonski kontroli, kot naprimer nizka sinteza androgenov ali nezadostna raven receptorjev (Ogielska in Bartmanska, 2009).

Pojavnost oocitov v testisih močerila bo treba še preučiti.

5.2 SKLEPI

- Testisi so nepigmentirana parna struktura, ki ležijo ob zunanjem robu ledvic kavdalnega dela trebušne votline.
- Zunanja morfologija testisov je variabilna. Pojavljajo se trije tipi testisov, neodvisno od telesne velikosti osebkov. Testisi so bodisi trakasti, podolgovati in nabrekli ali pa z eno ali več razširitvami.
- Trakasti tip testisa vključuje le mlajše zoritvene faze spermatogeneze, primarne in sekundarne spermatogonije ter v nekaterih primerih tudi že spermatocite.
- V podolgovatih in nabreklih testisih so vse zrelostne faze spermatogeneze, vključno z zreliimi spermatozoi. Zrelostne faze so razporejene v cefalo-kavdalni osi testisa, z zrelejšimi fazami v kavdalnem delu testisa.
- Pri testisih z razširitvami so spermatociti najzrelejša faza zoritve, nameščeni so v razširitvah testisa, v zožitvah pa so spermatogoniji.
- Osebki z najbolj zreliimi fazami zoritve spolnih celic se pojavljajo v poletnem in zimskem obdobju, druge zoritvene faze pa se pojavljajo v testisih osebkov iz različnih sezon skozi vse leto.
- Notranjost testisa je razdeljena v številne lobule. Spolne celice se znotraj lobulov združujejo v ciste, katerih razvoj je znotraj lobula sinhron ali pa nesinhron, razvoj znotraj cist pa je sinhron.
- Zoritvene faze spolnih celic močeri napredujejo v cefalo-kavdalni osi testisa. Glede na proksimalno-distalno os testisa zrelost spermalnih celic narašča v distalni

smeri; zrelejše faze so v perifernih delih testisa, v osrednjem delu pa so spermatogoniji. Slednji so lahko kot posamezne celice razporejeni med starejšimi fazami spolnih celic.

- Spermatogoniji so največje celice z največjimi jedri, ki so evkromatska. Primarni spermatogoniji so lahko posamezno ali pa v skupkih. Sekundarni spermatogoniji pa so v skupkih znotraj lobulov, ki imajo že oblikovan lumen.
- Primarni spermatociti so v različnih stadijih profaze mejoze I, sekundarni spermatociti pa so manjši, jedro vključuje enakomerno razpršene skupke heterokromatina.
- Spermatide so v različnih fazah spermiogeneze in imajo heterokromatska jedra. Zgodnje spermatide imajo še majhno okroglo jedro, ki se nato postopno podaljšuje. V tem času se oblikuje tudi akrosomski vezikel.
- Spermatozoi imajo dolgo glavo s podaljšanim jedrom in podaljšanim akrosomskim veziklom, kratek vratni del in dol rep. Z glavami so orientirani v isti smeri proti Sertolijevi celici.

6 POVZETEK

Raziskali smo morfologijo testisa pri močerilu *Proteus anguinus*. V naključno izbranih vzorcih testisov smo opisali histološke značilnosti zarodnih celic, pri tem pa nam je bil v pomoč opis zoritvenih faz pri aksolotlu, ki jih je opisala Uribe.

Testisi so bili nepigmentirani in so ležali ob zunanjem robu ledvic na kavdalnem delu trebušne votline. Zunanja morfologija testisov med osebki je bila variabilna in smo jo razdelili v tri tipe testisov: trakasti, podolgovati in nabrekli ter testis z eno ali več razširitvami. Trakast tip testisa je vključeval mlajše zoritvene faze spermatogeneze, podolgovati in nabrekli testisi pa vse zrelostne faze spermatogeneze, vključno z zrelemi spermatozoi, pri čemer je zrelost zarodnih celic napredovala v cefalo-kavdalni osi testisa. Pri testisih z razširitvami so bili spermatociti najzrelejša faza zoritve.

Nasplošno so zoritvene faze spolnih celic močerila napredovale v cefalo-kavdalni smeri testisa. Zoritvene faze zarodnih celic pa so napredovale tudi v proksimalno-distalni smeri testisa. Zrelost spermalnih celic je naraščala v distalni smeri, tako da so se zrelejše faze nahajale v perifernih delih testisa, v osrednjem delu pa spermatogoniji.

Notranjost testisa je bila razdeljena v številne lobule, znotraj lobulov pa so bile spolne celice združene v ciste. Razvoj v posamezni cisti je potekal sinhrono, znotraj lobulov pa sinhrono ali asinhrono.

Stopnjo zrelosti spermalnih celic smo razdelili v 6 faz. Največje celice z največjimi jedri so bili primarni in sekundarni spermatogoniji, ki smo jih našli predvsem v anteriornem delu testisa ali pa so se nahajali kot posamezne celice med zrelejšimi fazami spolnih celic.

Primarni spermatociti so bili v različnih stadijih profaze mejoze I, sekundarni spermatociti so bili videni redkeje, saj ta faza traja zelo kratek čas.

Spermatide nastanejo po dveh zaporednih mitotskih delitvah. Bile so v različnih fazah spermogeneze. Zgodnje spermatide so imele majhno okroglo jedro, ki se je postopno podaljševalo, hkrati pa se je v tem času oblikoval akrosomski vezikel. V procesu

spermiogeneze so se iz poznih spermatid diferencirali spermatozoji, ki so imeli dolgo glavo, kratek vratni del in dolg rep.

Pričakovali smo, da bodo večji osebki imeli večje testise z zrelejšimi fazami spermalnih celic, vendar se je izkazalo, da so bili različni tipi testisov prisotni neodvisno od velikosti osebkov.

Predvidevali smo tudi, da zoritev zarodnih celic ne bo sezonsko odvisna, zaradi nespremenljivih klimatskih razmer v podzemlju, izkazalo pa se je da so bili osebki z najbolj zreliimi fazami zoritve spolnih celic iz poletnega in zimskega obdobja, druge zoritvene faze pa se pojavljajo v testisih osebkov iz različnih sezon skozi celo leto.

7 VIRI

Aljančič M. 1961. Spermatofore človeške ribice. *Proteus*, 24: 119-120

Bruce C.R. 2003. The testes, spermatogenesis and male reproductive ducts. V: *Reproductive biology and phylogeny of Urodela*. Sever D.M. (ur.). 1. Izdaja, USA, Science Publishers, Inc.: 477-525

Burlibaşa L, Gavrilă L. 2005. Chromatin architecture in spermatogenesis of some species of amphibians. *Travaux du Muséum d'Histoire Naturelle Grigore Antipa*, Vol. XLVIII: 531-540

Callard G.V. 1992. Autocrine and paracrine role of steroids during spermatogenesis: Studies in *Squalus acanthias* and *Necturus maculosus*. *The journal of experimental zoology*, 261: 132-142

Chavadej J., Jerareungrattana A., Sretarugsa P., Sobhon P. 2000. Structure and development of the testis of bullfrog *Rana catesbeiana* and their changes during seasonal variation. *ScienceAsia*, 26: 69-80

Durand J., Delay B. 1981. Influence of temperature on the development of *Proteus anguinus* (Caudata: Proteidae) and relation with its habitat in the subterranean world. *Journal of Thermal Biology*, 6, 1: 53-57

Exbrayat J.M. 2009. Oogenesis and female reproductive system in Amphibia – Gymnophiona. V: *Reproduction of Amphibians*. Ogielska M. (ur.). Poland, Zoological Institute University of Wrocław, Science publishers: 305-342

Humphrey R.R. 1922. The multiple testis in Urodeles. *Biological Bulletin*, 4: 45-67

Flament S., Dumond H., Chardard D., Chesnel A. 2009. Lifelong testicular differentiation in *Pleurodeles waltl* (Amphibia, Caudata). *Reproductive biology and endocrinology*, 7: 21

Fraile B., Paniagua R., Rodríguez M.C., Sáez F.J., Jimenez A. 1989. Annual changes in the number, testosterone content and ultrastructure of glandular tissue cells of the testis in the marbled newt *Triturus marmoratus*. *Journal of Anatomy*, 167: 85-94

- Gilbert S.F. 2010. *Developmental biology*. 9. Izdaja. USA, Sinauer Associates, Inc.: 685 str.
- Juberthie C., Durand J., Dupuy M. 1996. La reproduction des protees (*Proteus anguinus*) : Bilan de 35 ans d'elevage dans les grottes-laboratoires de Moulis et D'Aulignac, *Memoires de Beiospeleologie*, Tome XXIII: 53-56
- Kiernan J.A. 1990. *Histological and histochemical methods: Theory and practise*. 2. Izdaja. Oxford, Pergamon press: 96-98
- Langecker. 2000. Wikipedia: Človeška ribica.
http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica (29. dec. 2011)
- Manochantr S., Sretarugsa P., Wanichanon C., Chavadej J., Sabhon P. 2003. Classification of spermatogenic cells in *Rana tigerina* based on ultrastructure. *ScienceAsia*, 29: 241-254
- Ogielska M., Bartmanska J. 2009. Spermatogenesis and male reproductive system in Amphibia – Anura. V: *Reproduction of Amphibians*. Ogielska M. (ur.). Poland, Zoological Institute University of Wrocław, Science publishers: 66-68
- Oslund R.M. 1928. Seasonal modifications in testes of vertebrates. *The quarterly reveiw of biology*, 3, 2: 254-270
- P. de A. Prado C., Camargo- Abdalla F., Z. Silva A.P., Zina J. 2004. Late gametogenesis in *Leptodactylus labyrinthicus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) and some ecological considerations. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 21, 4: 177-184
- Pierantoni R., Cobellis G., Mecceriello R., Palmiero C., Fienga G., Minucci S., Fasano S. 2002. The amphibian testis as model to study germ cell progression during spermatogenesis. *Comperative Biochemistry and physiology part B*, 132: 131-139
- Presnell J.K, Schreibmann M.P. 1997. *Humason's animal tissue tehcniques*. 5. Izdaja, Baltimore in London, The John Hopkins University Press: 187-189

- Pudney J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microscopy research and technique*, 32: 459-497
- Rastogi R. K. 1976. Seasonal cycle in anuran (Amphibia) testis: the endocrine and environmental controls. *Italian Journal of Zoology*, 43, 1: 151-172
- Romagosa E., Narahara M.Y., Borella M.I., Parreira S.F., Fenerich-Verani N. 1999. Ultrastructure of the germ cells in the testis of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae). *Tissue&Cell*, 31, 6: 540-544
- Santos J.E., Bazzoli N., Rizzo E., Santos G.B. 2001, Morphofunctional organisation of the male reproductive system of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue&Cell*, 33, 5: 533-540
- Sasso-Cerri E., Cerri P. S., Freymüller E., Miraglia S. M. 2006. Apoptosis during the seasonal spermatogenic cycle of *Rana catesbeiana*. *Journal of Anatomy*, 209: 21-29
- Scheltinga D.M., Jamieson B.G.M. 2003. Spermatogenesis and the mature spermatozoon: Form, Function and Phylogenetic implications. V: Reproductive biology and phylogeny of Anura. Jamieson B.G.M. (ur.). 2. Izdaja, USA, Science publishers, Inc.: 119-145
- Segatelli T.M., Batlouni S.R., França L.R. 2009. Duration of spermatogenesis in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Theriogenology*, 72: 894-901
- Sever M. 1974. The occurrence of multiple testis in the genus *Eurycea* (Amphibia: Plethodontidae). *Herpetologica*, 30, 2: 187-193
- Talaber I. 2008. Oogeneza pri močerilu (*Proteus anguinus*, Amphibia: Urodela, Proteidae).
Diplomsko delo
- Uribe M.C. A. 2003. The testes, spermatogenesis and male reproductive ducts. V: Reproductive biology and phylogeny of Urodela. Sever D.M. (ur.). 1. Izdaja, USA, Science Publishers, Inc.: 183-202

- Uribe M.C. A. 2009. Spermatogenesis and male reproductive system in Amphibia – Urodela. V: *Reproduction of Amphibians*. Ogielska M. (ur.). Poland, Zoological Institute University of Wrocław, Science publishers: 100-124
- Wake M. H. 1994. Comparative Morphology of caecilian sperm (Amphibia: Gymnophiona). *Journal of morphology*, 221: 261-276
- Zieri R., Taboga S. R., De Oliviera C. 2007. Melanocytes in the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): Histological, stereological, and ultrastructural aspects. *The anatomical record*, 290: 795-800

ZAHVALA

Vsaka pot se nekje konča...

Prav na koncu te poti, pri nastajanju diplomskega dela mi je bila v pomoč Katja Zdešar, kateri se zahvaljujem za vso pomoč v laboratoriju.

Zahvaljujem se mentorici Lilijani Bizjak Mali ter Borisu Bulogu za usmerjanje v pravo smer in predvsem potrpljenje, ki je bilo neizogibno potrebno v času mojega »podaljšanega« študija.

Hvala Milošu Vittoriju za krajšanje ur v času čakanja piskajočih budilk z zmeraj zanimivimi, abstraktnimi pogovori, ki so dali mislim nov zagon.

Hvala mojim najboljšim sošolkam in sošolcem (saj sami vedo kateri so), si so bili zmeraj pozitivni ter dobrovoljno razpoloženi in s katerimi sem preživela najlepša študentska leta in še dlje.

Zahvala pa gre tudi mojim najljubšim prijateljicam in prijateljem, ki so me spodbujali ter eni prav posebni osebi, ki mi je dala nov zagon in voljo.

In ne nazadnje, hvala staršem za vso vero in zaupanje vame vsa ta dooolga leta študija.

A na koncu vsake poti se prične nova pot...