

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Urban BOGATAJ

**TVORBA KUTIKULE V PREBAVNEM SISTEMU MED  
EMBRIONALNIM RAZVOJEM RAKA *Porcellio scaber***

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Urban BOGATAJ

**TVORBA KUTIKULE V PREBAVNEM SISTEMU MED  
EMBRIONALNIM RAZVOJEM RAKA *Porcellio scaber***

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

**FORMATION OF THE DIGESTIVE TRACT CUTICULAR LINING  
DURING EMBRYONIC DEVELOPMENT OF CRUSTACEAN *Porcellio  
scaber***

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študija Strukturne in funkcionalne biologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje in Senat Oddelka za biologijo sta dne 6. 2. 2013 odobrila naslov magistrskega dela in za mentorico imenovala doc. dr. Nado Žnidaršič in za recenzentko prof. dr. Jasno Štrus.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Boris Bulog  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Nada Žnidaršič  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Jasna Štrus  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 13. 8. 2014

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete, ko bo članek z vsebino te naloge objavljen v znanstveni reviji. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Urban Bogataj

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
DK 59:595.3(043.2)=163.6  
KG raki enakonožci/prebavni sistem/kutikula/*Porcellio scaber*/embrionalni razvoj  
AV BOGATAJ, Urban diplomirani biolog (UN)  
SA ŽNIDARŠIČ, Nada (mentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2014  
IN TVORBA KUTIKULE V PREBAVNEM SISTEMU MED EMBRIONALNIM RAZVOJEM RAKA *Porcellio scaber*  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)  
OP X, 50 str., 1 pregl., 33 sl., 1 pril., 37 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Namen magistrskega dela je bila ultrastrukturalna analiza kutikule in črevesnih celic med embrionalnim razvojem in pri marzupijskih ličinkah raka enakonožca *Porcellio scaber* ter razlaga diferenciacije črevesne kutikule s strukturnega vidika. Ultrastrukturo kutikule in histološko zgradbo prebavnega sistema smo analizirali s svetlobno in elektronsko mikroskopijo. Analizirali smo vzorce treh faz poznega embrija, dveh faz marzupijskih ličink in vzorce izoliranih čreves odraslih živali. Ugotovili smo, da je pri poznih embrijih v fazi S16 vidna zasnova za tiflosolis in da diferenciacija tiflosolisa poteka v posteriorno-anteriorni smeri. To je eden od morfoloških znakov razdelitve zadnjega črevesa v anteriorno komoro in papilatno regijo. Pri marzupijskih ličinkah sta anteriorna komora in papilatna regija že jasno razločni, tiflosolis je že oblikovan vzdolž celotne anteriorne komore. Na ultrastrukturnem nivoju je razvidno, da črevesne epitelne celice poznih embrijev v fazah S16 in S18 prekriva homogen zunajcelični matriks. Strukturno je podoben matriksom, ki so jih opisali pri drugih členonožcih pred oblikovanjem diferencirane eksoskeletne kutikule. Površina tega matriksa je močno nagubana, sestoji pa iz tankega distalnega sloja, ki je elektronsko gost in debelega notranjega sloja, ki je elektronsko svetel. V fazi S18 je pod tem matriksom viden dodatni novonastajajoči matriks, apikalna membrana epitelnih celic pa je oblikovana v izrastke z elektronsko gostimi konicami. Pri poznem embriju v fazi S19, ki je tik pred izvalitvijo iz vitelinske membrane, je apikalni matriks iz zunanega trilamelarnega sloja, elektronsko goste plasti pod njim in notranjega debelejšega svetlega sloja. Črevesna kutikula še ni očitno podobna kutikuli odraslih živali, kot je že značilno za kutikulo eksoskeleta v tej razvojni fazi. Pri marzupijskih ličinkah črevesna kutikula sestoji iz elektronsko goste epikutikule in notranje debelejše elektronsko svetle prokutikule. V primerjavi z odraslimi je črevesna kutikula bistveno tanjša, epikutikula vsebuje manj elektronsko gostega materiala, podsloji prokutikule v anteriorni komori niso vidni. Pri odraslih je epikutikula v papilatni regiji bistveno debelejša kot v anteriorni komori, kar pri marzupijskih ličinkah ni opazno. Pri nekaterih poznih marzupijskih ličinkah stara kutikula že odstopa od črevesnega epitela, pod njo pa je prisotna nova kutikula.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2  
DC 59:595.3(043.2)=163.6  
CX isopods/digestive system/cuticle/*Porcellio scaber*/embryonic development  
AU BOGATAJ, Urban  
AA ŽNIDARŠIČ, Nada (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2014  
TI FORMATION OF THE DIGESTIVE TRACT CUTICULAR LINING DURING EMBRYONIC DEVELOPMENT OF CRUSTACEAN *Porcellio scaber*  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)  
NO X, 50 p., 1 tab., 33 fig., 1 ann., 37 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of this work was ultrastructural analysis of the cuticle and gut cells during the embryonic and marsupial mancae development of the isopod *Porcellio scaber*. We examined the cuticle ultrastructure and histology of digestive system by light and electron microscopy. Specimens of three stages of late embryos, two stages of marsupial mancae and adult animals were analyzed. We observed that in the S16 stage of late embryo the typhlosole origin is visible and that typhlosole differentiation displays postero-anterior direction. Typhlosole formation is one of the morphological signs of hindgut specialization into anterior chamber and papillate region. The hindgut of marsupial mancae is already differentiated into the anterior chamber and the papillate region, typhlosole is formed throughout the anterior chamber. On ultrastructural level it is evident that gut cells of S16 and S18 late embryos are lined by a homogenous extracellular matrix. This matrix structurally resembles matrices that precede exoskeletal cuticle in arthropods and consists of an outer thin electron-dense layer, which is intensely ruffled, and inner thick lucid layer. At stage S18 an additional, newly forming matrix is visible on the apical membrane of epithelial cells that forms membrane protrusions with electron-dense tips. In the stage S19, right before hatching from vitelline membrane, the matrix consists of the outer trilamellar layer, electron dense material underneath and the inner thicker electron-lucid layer. The gut cuticle in this stage is not very similar to the cuticle of adult animals, whereas the exoskeletal cuticle at this stage resembles the adult one. Marsupial mancae gut cuticle consists of electron dense epicuticle and inner thick electron lucent procuticle. Cuticle in mancae is evidently thinner in comparison to cuticle in adults, epicuticle contains less dense material and procuticular sublayers are not visible. Epicuticle in papillate region is evidently thicker than in anterior chamber in adults, which is not the case in marsupial mancae. In some late marsupial mancae we observed detachment of the old cuticle from gut epithelium and formation of a new cuticle underneath.

## KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	X
<b>1 UVOD</b>	1
1.1 EMBRIONALNI RAZVOJ VRSTE <i>Porcellio scaber</i>	1
1.2 ZGRADBA IN RAZVOJ PREBAVILA PRI RAKIH ENAKONOŽCIH	4
1.3 DIFERENCIACIJA EKSOSKELETNE KUTIKULE MED EMBRIONALNIM RAZVOJEM PRI ČLENONOŽCIH	7
1.4 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	9
<b>2 MATERIAL IN METODE</b>	10
2.1 POSKUSNE ŽIVALI	10
2.2 PRIPRAVA VZORCEV ZA SVETLOBNO IN ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO	11
2.3 MIKROSKOPIRANJE	12
<b>3 REZULTATI</b>	14
3.1 HISTOLOŠKA ZGRADBA ZADNJEGA ČREVESA IN ULTRAŠTRUKTURA ČREVESNE KUTIKULE PRI ODRASLIH ŽIVALIH	14
3.1.1 Struktura anteriorne komore črevesa	14
3.1.2 Struktura papilatne regije črevesa	16
3.1.3 Struktura črevesa v predelu sfinktra za papilatno regijo	19
3.2 HISTOLOŠKA ZGRADBA ZADNJEGA ČREVESA IN ULTRAŠTRUKTURA ČREVESNE KUTIKULE PRI POZNIH EMBRIJIH	20
3.2.1 Zgradba črevesa poznih embrijev v fazi S16	20
3.2.2 Zgradba črevesa poznih embrijev v fazi S18	22
3.2.3 Zgradba črevesa poznega embrija tik pred izvalitvijo iz vitelinske membrane v fazi S19	25
3.3 HISTOLOŠKA ZGRADBA ZADNJEGA ČREVESA IN ULTRAŠTRUKTURA ČREVESNE KUTIKULE PRI ZGODNJIH MARZUPIJSKIH MANKAH	28
3.3.1 Struktura anteriorne komore črevesa	28
3.3.2 Struktura papilatne regije črevesa	30
3.3.3 Struktura črevesa v predelu sfinktra	31
3.4 HISTOLOŠKA ZGRADBA ZADNJEGA ČREVESA IN ULTRAŠTRUKTURA ČREVESNE KUTIKULE PRI POZNIH MARZUPIJSKIH MANKAH	33
3.4.1 Struktura anteriorne komore črevesa	33
3.4.2 Struktura papilatne regije črevesa	36
3.4.3 Struktura črevesa v predelu sfinktra	39
<b>4 RAZPRAVA</b>	40
4.1 HISTOLOŠKA ZGRADBA ZADNJEGA ČREVESA	40

4.2	ULTRASTRUKTURA IN DIFERENCIACIJA ČREVESNE KUTIKULE	41
<b>5</b>	<b>SKLEPI</b>	44
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	44
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	48

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Pregl. 1:</b> Analizirani vzorci odraslih živali, embrijev in marzupijskih mank.....	13
---	----



## KAZALO SLIK

<b>Sl. 1:</b> Samica z valilnikom (marzupijem).....	1
<b>Sl. 2:</b> Anatomija prebavila pri rakah enakonožcih.....	4
<b>Sl. 3:</b> Eksoskeletna kutikula odraslega raka enakonožca <i>Porcellio scaber</i> .....	8
<b>Sl. 4:</b> Izbrane faze embrijev in marzupijskih mank.....	11
<b>Sl. 5:</b> Histološka zgradba črevesa odraslih živali v predelu anteriorne komore.....	14
<b>Sl. 6:</b> Ultrastruktura kutikule v anteriorni komori odraslih živali.....	15
<b>Sl. 7:</b> Apikalni labirint epitelnih črevesnih celic v predelu anteriorne komore.....	16
<b>Sl. 8:</b> Histološka zgradba črevesa odraslih živali v predelu papilatne regije.....	17
<b>Sl. 9:</b> Ultrastruktura kutikule v papilatni regiji odraslih živali.....	18
<b>Sl. 10:</b> Histološka zgradba črevesa odraslih živali v predelu sfinktra.....	19
<b>Sl. 11:</b> Ultrastruktura kutikule v predelu sfinktra pri odraslih živalih.....	20
<b>Sl. 12:</b> Histološka zgradba zadnjega črevesa pri poznih embrijih v fazi S16.....	21
<b>Sl. 13:</b> Ultrastruktura zunajceličnega matriksa epitelnih celic zadnjega črevesa..... pri poznih embrijih v fazi S16	22
<b>Sl. 14:</b> Histološka zgradba zadnjega črevesa pri poznih embrijih v fazi S18.....	23
<b>Sl. 15:</b> Ultrastruktura zunajceličnega matriksa epitelnih celic zadnjega črevesa..... pri poznih embrijih v fazi S18	24
<b>Sl. 16:</b> Histološka zgradba anteriornega dela zadnjega črevesa pri poznih..... embrijih v fazi S19	25
<b>Sl. 17:</b> Ultrastruktura apikalnega matriksa v anteriornem delu zadnjega črevesa..... pri poznih embrijih v fazi S19	26
<b>Sl. 18:</b> Histološka zgradba posteriornega dela zadnjega črevesa pri poznih..... embrijih v fazi S19	27
<b>Sl. 19:</b> Ultrastruktura apikalnega matriksa v posteriornem delu zadnjega črevesa..... pri poznih embrijih v fazi S19	27
<b>Sl. 20:</b> Histološka zgradba črevesa zgodnjih marzupijskih mank v predelu..... anteriorne komore	28
<b>Sl. 21:</b> Ultrastruktura kutikule v anteriorni komori pri zgodnjih marzupijskih..... mankah	29
<b>Sl. 22:</b> Histološka zgradba črevesa v predelu papilatne regije pri..... zgodnjih marzupijskih mankah	30
<b>Sl. 23:</b> Ultrastruktura kutikule v papilatni regiji pri zgodnjih marzupijskih..... mankah	31
<b>Sl. 24:</b> Histološka zgradba črevesa v predelu sfinktra pri zgodnjih..... marzupijskih mankah	32
<b>Sl. 25:</b> Ultrastruktura kutikule v predelu sfinktra pri zgodnjih marzupijskih..... mankah	33
<b>Sl. 26:</b> Histološka zgradba črevesa poznih marzupijskih mank v predelu..... anteriorne komore	34
<b>Sl. 27:</b> Ultrastruktura kutikule v predelu anteriorne komore pri poznih..... marzupijskih mankah	35
<b>Sl. 28:</b> Ultrastruktura kutikule v predelu anteriorne komore poznih..... marzupijskih mank, pri katerih poteka nastajanje nove kutikule	36
<b>Sl. 29:</b> Histološka zgradba črevesa v predelu papilatne regije pri poznih..... marzupijskih mankah	37

<b>Sl. 30:</b> Ultrastruktura kutikule v predelu papilatne regije pri poznih marzupijskih mankah.....	38
<b>Sl. 31:</b> Ultrastruktura kutikule v predelu papilatne regije pri poznih marzupijskih mankah, pri katerih poteka nastajanje nove kutikule.....	39
<b>Sl. 32:</b> Histološka zgradba prebavila v predelu sfinktra pri poznih marzupijskih mankah.....	39
<b>Sl. 33:</b> Ultrastruktura kutikule v predelu sfinktra pri poznih marzupijskih mankah.....	40

## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Prispevek na konferenci MC 2013

## 1 UVOD

### 1.1 EMBRIONALNI RAZVOJ VRSTE *Porcellio scaber*

Vrsto *Porcellio scaber* skupaj z ostalimi raki enakonožci uvrščamo v nadred Peracarida. Skupna značilnost perakaridnih rakov je, da njihov embrionalni razvoj poteka v marzupiju oziroma valilniku na ventralni strani telesa samice (Slika 1). Valilnik gradijo oostegiti, ki so ploščati izrastki bazalnega člena prvih petih parov pereopodov, dorzalno pa ga pokrivajo sterniti. Valilnik je napolnjen z marzupijsko tekočino. Za stalno osmotsko in ionsko regulacijo marzupijske tekočine so pomembni kotiledoni, ki izraščajo iz sternitov (Surbida in Wright, 2001). Pri kopenskih raki enakonožci ima valilnik vlogo mikro-akvarija, ki omogoča razvoj embrijev v vodnem okolju. Razvoj v valilniku je pomembna prilagoditev te skupine rakov na kopenski način življenja. Poleg tega marzupijska tekočina zagotavlja embrijem oskrbo s kisikom, ioni in hranili (Hornung, 2011). Izjema je red Thermosbaenacea, pri katerih poteka razvoj embrijev pod karapaksom samic (Brusca in Brusca, 2003). Med raki enakonožci je posebnost vrsta *Paragnathia formica*, pri kateri embrionalni razvoj poteka v ovarijih (Manship in sod., 2011).



Slika 1: Samica z valilnikom (marzupijem) (arhiv Skupine za funkcionalno morfološke in ekotoksikološke raziskave nevretenčarjev, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani).

Razvoj v marzupiju pri vrsti *Porcellio scaber* poteka od oplojene jajčne celice do sprostitve ličinke manke iz marzupija samice (Wolff, 2009; Milatovič in sod., 2010). V grobem lahko razvoj razdelimo na štiri razvojne stadije: zgodnji embrij, srednji embrij, pozni embrij in ličinka manka. Pri zgodnjem embriju še ni vidnih zasnov za okončine. Stadij srednjega embrija traja od pojava zasnov za okončine do izleganja iz horiona in dorzoventralne rotacije embrija znotraj vitelinske membrane. Stadij poznega embrija pa traja od dorzoventralne rotacije do izleganja iz vitelinske membrane. Stadij po izleganju iz vitelinske membrane je marzupijska manka (Milatovič in sod., 2010). Natančneje so razvoj v marzupiju razdelili na 20 stadijev na osnovi morfoloških značilnosti glede na stopnjo razvitosti embrijev (Wolff,

2009; Milatovič in sod., 2010). Razvoj embrijev *P. scaber* v marzupiju do izleganja iz vitelinske membrane traja v laboratorijskih razmerah približno 25 dni. Po izleganju se manke razvijajo v marzupiju še približno 10 dni (Milatovič in sod., 2010) in se nato sprostijo v zunanje okolje.

Jajčne celice rakov enakonožcev so makro- in centrolecitalne. Jedro je nameščeno centralno, obdaja pa ga z rumenjacom napolnjena citoplazma (Nair, 1956; Strömberg, 1965; Strömberg, 1967). Embrije v marzupiju obdajata dve jajčni ovojnici, zunanja ovojnica, horion, in notranja ovojnica, vitelinska membrana (Strömberg, 1967). Pri vrsti *P. scaber* je v oplojeni jajčni celici zaradi velike količine rumenjaka jedro težko opazno in je vidno kot temnejša regija v središču jajčeca. Premer jajčec je med 400 in 600  $\mu\text{m}$ . Od ovojnic je jasno viden horion, ki ohlapno obdaja jajčno celico, vitelinska membrana pa se nahaja tesno ob celični membrani in je zato težko opazna (Wolff, 2009; Milatovič s sod., 2010).

Brazdanje je pri večini rakov enakonožcev površinsko (Strömberg, 1965). Enako velja tudi za vrsto *P. scaber* (Wolff, 2009). Pri *P. scaber* prve delitve jedra potečejo intravitelino, torej znotraj rumenjaka v središču jajčeca. Po tretji delitvi se 8 jeder pomakne na celično periferijo. Prvih pet delitev do 32 jedrnega stadija je sinhronih (Wolff, 2009). Večina jeder se pomakne na en pol jajčne celice in tam tvori zarodni disk. Med temi zgodnjimi delitvami se delijo le jedra. Celične membrane pričnejo nastajati šele ob nastanku zarodnega diska (Wolff, 2009; Milatovič in sod., 2010). Podoben potek brazdanja, kjer najprej poteče brazdanje znotraj rumenjaka, sledi pa migracija jeder/celic na celično periferijo, kjer nastaja zarodni disk, je prisoten tudi pri drugih enakonožcih (Nair, 1956; Strömberg, 1965; Strömberg 1967; Manship in sod., 2011). Ne velja pa tak vzorec za vse perakaridne rake. Pri postranicah je brazdanje popolno in ne pride do nastanka sincicija (Scholtz in Wolff, 2002; Browne in sod., 2005).

Po izoblikovanju zarodnega diska se prične proces gastrulacije. Gastrulacijski center se pri *P. scaber* oblikuje približno na sredini zarodnega diska, kjer pričnejo posamezne celice potovati v notranjost embrija. Na tem mestu pride do tvorbe blastopora (Wolff, 2009). Gastrulacija v glavnem poteka z ingresijo, pozneje tudi z invaginacijo in delaminacijo (Milatovič in sod., 2010). Plast celic, ki ostane na površini, predstavlja ektoderm, v notranjosti pa nastane večplastni mezendoderm. Nekatero izmed celic, ki so se pomaknile v notranjost, se oddelijo od mezendoderma in pričnejo z migracijo v anteriorni smeri. Iz mezodermalnih celic nastane navplijski mezoderm (Wolff, 2009). Te celice se pozneje skupaj z ektodermom glavine regije razporedijo v tri skupine in tako predstavljajo zametke za tri navplijske segmente (1. in 2. antenalni segment in mandibularni segment) (Strömberg, 1967). Proces gastrulacije se zaključi, ko se na sprednjem delu gastrulacijskega centra pojavijo teloblasti, ki so razporejeni v obliki polmeseca (Milatovič in sod., 2010).

Pojavita se dva tipa teloblastov, ektoteloblasti in pod njimi ležeči mezoteloblasti. Pri raku enakonožcu iz rodu *Irona* se najprej pojavijo mezoteloblasti, ki se diferencirajo iz mezodermalnih celic. Za tem pa se nad njimi iz ektodermalnih celic diferencirajo še ektoteloblasti (Nair, 1956). Podoben nastanek teloblastov je prisoten tudi pri enakonožcu iz rodu *Idotea* in kaže na to, da mezoteloblasti inducirajo nastanek ektoteloblastov nad njimi (Strömberg, 1965). Ektoteloblasti z delitvami omogočijo nastanek post-navplijskega ektoderma, mezoteloblasti pa post-navplijskega mezoderma. Z delitvami obeh skupin teloblastov poteka podaljševanje zarodnega pasu v posteriorni smeri (Wolff, 2009; Milatovič in sod., 2010).

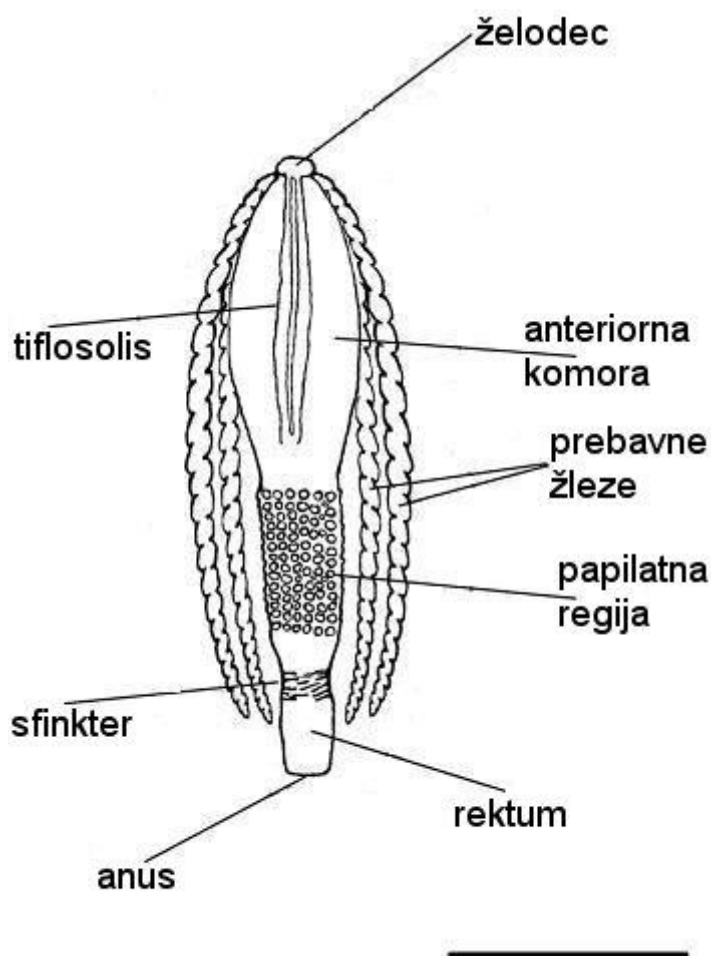
Ko se zaključi podaljševanje zarodnega pasu, se začnejo pojavljati zasnove za okončine. Nastajanje zasnov za okončine poteka v smeri od anteriornega proti posteriornemu delu embrija. V tej fazi se med antenami pojavi invaginacija stomodeuma, med 6. pleomero in telzonom pa invaginacija proktodeuma. Embrionalno tkivo prerašča rumenjaka v dorzalni smeri in pri tem izpodriva izven-embrionalno tkivo, ki je na dorzalni strani embrija prekrivalo rumenjaka. Iz tega izven-embrionalnega tkiva se formira dorzalni organ (Milatovič in sod., 2010). V nadaljevanju se embrij, ki je še vedno znotraj horiona in vitelinske membrane, dorzalno ukrivi. Pojavijo se zasnove prebavnih žlez srednjega črevesa oziroma hepatopankreasa (Milatovič in sod., 2010). Celice teh zasnov izvirajo iz navplijskega endoderma, ki se je oddelil od navplijskega mezendoderma (Wolff, 2009). Zasnove hepatopankreasa se med nadaljnjim razvojem povečujejo predvsem v posteriorni smeri in pri tem v lumen vključujejo vse več rumenjaka. Obenem poteka tudi podaljševanje zadnjega črevesa v anteriorni smeri. Do izleganja embrija iz horiona je celoten rumenjaka vključen v žleze hepatopankreasa in razvije se še drugi par prebavnih žlez. Zadnje črevo pride v stik s sprednjim črevesom in tako se izoblikuje prebavna cev, ki je v celoti ektodermalnega izvora (Wolff, 2009; Milatovič in sod., 2010). Pred izleganjem iz horiona se pojavi tudi pigmentacija oči, hemitergiti segmentov pa se dorzalno združijo v enotne tergite (Milatovič in sod., 2010).

Hkrati z izleganjem iz horiona pride do dorzoventralne rotacije embrija znotraj vitelinske membrane, pri čemer se prekine povezava med embrijem in dorzalnim organom, ki se po dorzoventralni rotaciji nahaja na ventralni strani embrija (Milatovič in sod., 2010). Embrij postaja ventralno ukrivljen (Wolff, 2009; Milatovič in sod., 2010). Z nadaljnjim razvojem se dorzalni organ reducira (Milatovič in sod., 2010). V stadiju poznega embrija so opazili tudi apolizo oziroma odstop epidermalnega zunajceličnega matriksa od epidermisa na konicah okončin (Milatovič in sod., 2010). Pred izleganjem iz vitelinske membrane se tvorijo sete in trni na okončinah, kutikularne luske eksoskeleta ter kutikularni filtri in strukture za drobljenje hrane v želodcu. Vzpostavi se povezava med žlezami hepatopankreasa in želodcem, zadnje črevo pa se razdeli v anteriorno komoro in papilatno regijo (Milatovič in sod., 2010).

Embrije po izleganju iz vitelinske membrane imenujemo marzupijske manke. Njihova telesna zgradba je podobna odraslim živalim, njihova značilnost pa je, da imajo samo šest parov pereopodov in ne sedem, kot odrasle živali. V anteriorni komori zadnjega črevesa je že izoblikovana dorzalna črevesna guba tiflosolis. Žleze hepatopankreasa se ožijo zaradi porabe rumenjaka, ki ga vsebujejo (Wolff, 2009; Milatovič in sod., 2010). Razvoj marzupijske manke na podlagi morfoloških značilnosti lahko razdelimo v tri stadije: zgodnja, srednja in pozna marzupijska manka. Zgodnje marzupijske manke merijo v dolžino 1.5 do 1.6 mm, se ne premikajo veliko, kromatofore v integumentu so redke, rumenjaka v prebavnih žlezah pa sega v pleon. Pri srednjih marzupijskih mankah je dolžina telesa med 1.7 do 1.8 mm, integument je temneje pigmentiran, rumenjaka v prebavnih žlezah le delno sega v pleon. Pozne marzupijske manke merijo v dolžino 1.9 do 2.0 mm, se intenzivno premikajo, rumenjaka v prebavnih žlezah pa sega le do konca pereona (Mrak in sod., 2012).

## 1.2 ZGRADBA IN RAZVOJ PREBAVILA PRI RAKIH ENAKONOŽCIH

Prebavni sistem rakov enakonožcev je sestavljen iz sprednjega in zadnjega črevesa ter prebavnih žlez - hepatopankreasa. Sprednje in zadnje črevo sta ektodermalnega izvora, svetlinska površina prebavne cevi, ki jo gradita, pa je v celoti prekrita s hitinsko kutikulo. Sprednje črevo razdelimo na požiralnik in želodec, zadnje črevo pa na anteriorno komoro, papilatno regijo in rektum (Slika 2). Edini endodermalni del prebavila pri večini rakov enakonožcev so žleze hepatopankreasa in predel povezave hepatopankreasa z želodcem (Štrus in sod., 2008). Izjema je amfibijska vrsta *Ligia italica*, pri kateri je na stiku med sprednjim in zadnjim črevesom prisoten ozek obroč celic brez kutikule na njihovi apikalni površini. Te celice so morfološko podobne celicam B hepatopankreasa (Štrus in Drašlar, 1988).



Slika 2: Anatomija prebavila pri rakah enakonožcih (Povzeto po Kostanjšek in sod., 2002: 172). Merilo: 5 mm.

Kutikulo prebavila raki enakonožci levijo podobno kot kutikulo eksoskeleta. Levitev je dvodelna, kar pomeni, da poteka levitev kutikule posteriornega dela telesa pred levitvijo kutikule anteriornega dela telesa. Levitev kutikule požiralnika in želodca poteka skupaj z levitvijo anteriornega dela eksoskeleta. Po apolizi se že v fazi predlevitve prične nalaganje nove kutikule pod staro kutikulo. Pri tem vzorec nalaganja nove kutikule določajo apikalni

izrastki in mikrovili celic črevesnega epitela, ki imajo pomembno vlogo predvsem pri formiranju kutikularnih struktur in filtrov v želodcu (Štrus in Storch, 1990).

Hepatopankreas rakov enakonožcev je iz dveh, treh ali štirih parov spiralno zavrtih cevok. Pri vrsti *P. scaber* sestoji iz dveh parov cevok. Posteriorni deli cevok hepatopankreasa so slepo zaprti, anteriorno pa se vsak par cevok preko skupnega voda povezuje z atrijem želodca (Hames in Hopkin, 1989). Cevke hepatopankreasa so iz enoslojnega epitela iz dveh tipov celic: velikih celic B z mikrovilarno apikalno površino in elektronsko gosto citoplazmo, ki vsebuje veliko lipidnih kapelj ter majhnih celic S (Žnidaršič, 2003; Štrus in sod., 2008). Najbolj anteriorni del prebavne cevi predstavlja požiralnik, ki povezuje obustni aparat z želodcem. Stene požiralnika so nagubane v pet vzdolžnih grebenov in prekrte s posteriorno usmerjenimi setami. Posteriorni konci grebenov se končajo v želodcu kot anteriorne ampule, ki delujejo kot zaklopke in preprečujejo vračanje hrane iz želodca v požiralnik (Hames in Hopkin, 1989). Kutikula požiralnika je debela in večslojna. Epitel gradijo celice različnih oblik. Apikalne in bazalne celične membrane teh celic večinoma niso nagubane. Jedra so manjša kot jedra celic epitela zadnjega črevesa (Storch in Štrus, 1989). Želodec je pri rakah enakonožcev strukturno najkompleksnejši del prebavne cevi. V želodcu poteka drobljenje, sortiranje in filtriranje hrane, s pomočjo premikanja posameznih sestavnih delov želodca, pri katerem sodelujejo mišice, ki obdajajo želodec (Hames in Hopkin, 1989). Glavne funkcionalne strukture v želodcu so: lateralna ali lateralne ampule, anteromedianum, inferomedianum, dorzalna lamela in atrij želodca. Lateralna so parne izbokline lateralne stene želodca v njegovo notranjost. Gradi jih epitel in debela kutikula. Na površini so številni posteriorno usmerjeni kutikularni trni. Anteromedianum se nahaja v anteriornem ventralnem delu želodca. Na njem so nameščeni primarni filtri, skozi katere se tekoča hrana filtrira do sekundarnih filtrov. Kutikula v predelu primarnih filtrov je debela in večslojna. Sekundarni filtri so nameščeni na inferomedianumu, ki leži v posteriornem ventralnem delu želodca. Skozi sekundarne filtre tekoča hrana vstopi v atrij želodca, ki omogoča izmenjavo tekočin med želodcem in žlezami hepatopankreasa. Tako skozi atrij vstopa tekoča hrana v hepatopankreas oziroma se iz hepatopankreasa v želodec sproščajo prebavni encimi. Atrij želodca prekriva tanka kutikula. Dorzalna lamela omogoča vračanje hrane iz tiflosolnih kanalov anteriorne komore nazaj v želodec. Gradi jo enoslojni epitel in kutikula, na kateri so številni posteriorno usmerjeni zobci (Storch, 1987; Storch in Štrus, 1989; Hames in Hopkin, 1989). Hrana, ki v želodcu ne more prehajati skozi primarne in sekundarne filtre, se ob prehodu iz želodca v zadnje črevo zmeša s prebavnimi encimi iz hepatopankreasa in vstopi v zadnje črevo. Želodec in zadnje črevo sta povezana preko zaklopkam podobnih struktur (Štrus in sod., 2008). Zadnje črevo vzdolž celotne dolžine obdajajo longitudinalno in krožno nameščene mišice, ki tvorijo mišično omrežje. Črevesni epitel je enoslojen, apikalno površino epitelnih celic pa prekriva hitinska kutikula (Hassall in Jennings, 1975; Hames in Hopkin, 1989). V zgodnjih raziskavah navajajo, da je črevesna kutikula 'dvodelna', zgrajena iz epikutikule in endokutikule (Vernon in sod., 1974). Palackal in sod., 1984 poročajo, da sta v predelu rektuma epikutikula in endokutikula približno enake debeline, v preostalih predelih zadnjega črevesa pa je epikutikula precej tanjša od endokutikule. Površina večine regij je prekrita s posteriorno usmerjenimi kutikularnimi trni (Storch in Štrus, 1989). Anteriorna komora zadnjega črevesa ima na dorzalni strani vzdolžno gubo, tiflosolis. To je invaginacija črevesnega epitela v svetlino anteriorne komore (Hassall in Jennings, 1975). Tiflosolis skupaj z dvema lateralnima gubama tvori dva tiflosolna kanala, ki potekata vzdolž dorzalne stene anteriorne komore od želodca do stika med anteriorno komoro in papilarno regijo. Kontraksije krožnih mišic omogočijo zaprtje rež med lateralnima gubama in tiflosolisom in



na ta način ločitev lumnov obeh tiflosolnih kanalov od glavnega lumna anteriorne komore (Hames in Hopkin, 1989). V anteriorni komori v glavnem poteka prebava hrane in delno tudi absorpcija. Poleg tega je tukaj tudi glavno mesto za shranjevanje založnih ogljikovih hidratov v obliki glikogena (Hryniewiecka-Szyfter in Storch, 1986). Tiflosolna kanala omogočata vračanje prebavljene hrane iz posteriornega dela zadnjega črevesa v želodec. Iz želodca hrana skozi filtre potuje v hepatopankreas, kjer poteče glavni del absorpcije (Hames in Hopkin, 1989). Črevesni epitel gradijo velike celice z velikimi jedri. Apikalna in bazalna celična membrana teh celic sta močno nagubani. V apikalnih delih celic so tudi številni mitohondriji (Storch in Štrus, 1989). Anteriorni komori sledi papilatna regija, s številnimi izboklinami na površini. Izbočeni bazalni deli celic segajo v hemocel, in dajejo površini videz papil (Hassall in Jennings, 1975). Ultrastrukturalne značilnosti celic v papilatni regiji in rektumu kažejo na to, da v tem predelu zadnjega črevesa poteka transport ionov in reabsorpcija vode (Hames in Hopkin, 1989). Vse celice črevesnega epitela v papilatni regiji so podobne oblike in imajo velika jedra (Hassall in Jennings, 1975). Papilatna regija in rektum sta ločena z mišičnim sfinktrom. V predelu sfinktra je močno odebeljen sloj krožnih mišic. Črevesni epitel je v tem delu močno naguban. Kutikula je v predelu sfinktra relativno tanka. Ob kontrakciji krožnih mišic gube epitela zaprejo prehod med papilatno regijo in rektumom (Hassall in Jennings, 1975; Storch in Štrus, 1989). Najbolj posteriorni del zadnjega črevesa je rektum. Mišična sloja v tem delu sta enaka kot v anteriorni komori in papilatni regiji. Črevesni epitel je naguban, vendar manj izrazito kot v predelu sfinktra, hitinska kutikula pa je debelejša kot v ostalih predelih zadnjega črevesa (Hassall in Jennings, 1975). Glavna funkcija rektuma skupaj s papilatno regijo naj bi bila stiskanje ostankov prebavljenega materiala. S tem se iz iztrebkov učinkoviteje iztisne voda (Hames in Hopkin, 1989).

Razvoj prebavne cevi se prične z invaginacijama stomodeuma in proktodeuma. Požiralnik in želodec se razvijeta iz invaginacije stomodeuma, zadnje črevo pa nastane s podaljševanjem proktodeuma. Stomodeum in proktodeum med podaljševanjem pred seboj potiskata rumenjaka. Podaljševanje omogoča rast vzdolž celotne dolžine obeh invaginacij (Strömberg, 1967). Med podaljševanjem stomodeuma se njegov sprednji del zoži. Iz tega zoženega dela se v nadaljevanju razvije požiralnik, iz preostalega dela pa želodec (Nair, 1956). Pri rodovih *Idotea* in *Irona* (Nair, 1956; Strömberg, 1967) pride do stika med sprednjim in zadnjim črevesom v drugem torakalnem segmentu. Mišice požiralnika in želodca izvirajo iz predantelnega mezoderma (Strömberg, 1967). Ta nastane z ugreznitvijo nekaj celic blastoderma, ki ležijo med zasnovama za oči in drugim parom anten (Nair, 1956). Mišice zadnjega črevesa pa izvirajo iz dorzalnega mezoderma trupa, ki je nastal s proliferacijo mezoteloblastov (Strömberg, 1967). Edina novejša študija ultrastrukture prebavne cevi med razvojem rakov enakonožcev je objavljena za vrsto *Porcellio scaber* (Štrus in sod., 2008). V zgodnjih razvojnih stadijih je sprednje črevo že diferencirano v požiralnik in želodec. Želodec je še brez kutikularnih filtrov in struktur za drobljenje hrane. Tkiva v zadnjem črevesu so še slabo organizirana, črevesni epitel pa sestoji iz prizmatskih celic prekritih s tanko plastjo kutikule brez izrazitih struktur. Epitel zadnjega črevesa gradita dva različna tipa celic. Celice v dorzalnem delu imajo velika ovalna jedra bogata s heterokromatinom, celice v ventralnem delu pa imajo velika jedra z mrežastim vzorcem (Štrus in sod., 2008). V stadiju poznega embrija se v želodcu že oblikujejo kutikularni filtri in strukture za drobljenje hrane. Celice v filtrirnih regijah ležijo tesno ena ob drugi. Imajo velika ovalna jedra bogata s heterokromatinom in apikalne izrastke, kjer se izloča kutikula filtrov. V želodcu se pojavijo tudi lateralia. V zadnjem črevesu se v predelu anteriorne komore oblikuje tiflosolis (Milatovič in sod., 2010). Razdelitev zadnjega črevesa na anteriorno komoro in papilatno regijo v tem

stadiju poznega embrija še ni jasno vidna (Štrus in sod., 2008). Pri ličinkah mankah je zadnje črevo že jasno razdeljeno na anteriorno komoro in papilatno regijo. Anatomska zgradba zadnjega črevesa pa je v splošnem podobna kot pri odraslih osebkih.

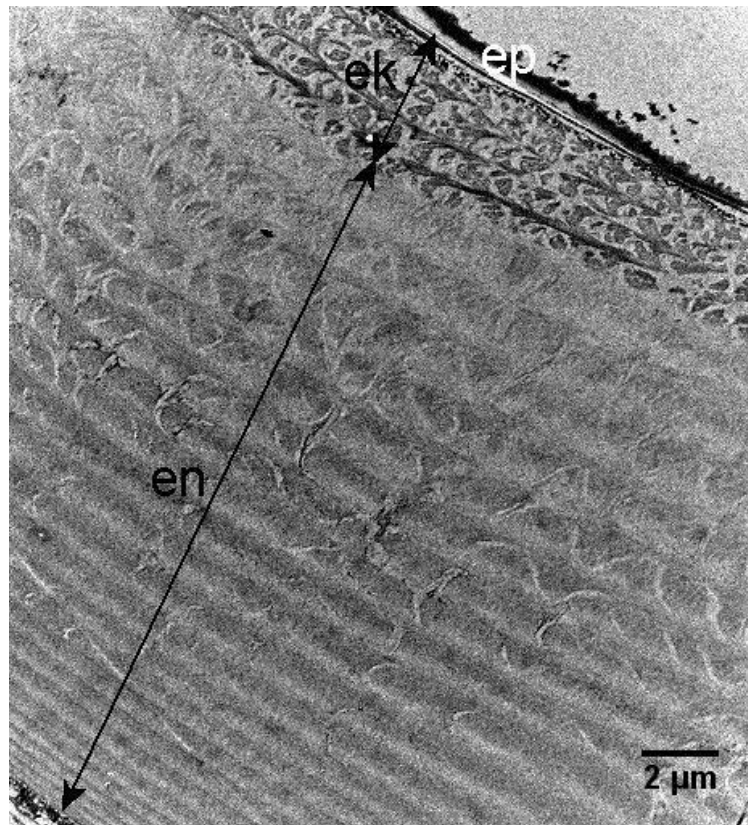
### 1.3 DIFERENCIACIJA EKSOSKELETNE KUTIKULE MED EMBRIONALNIM RAZVOJEM PRI ČLENONOŽCIH

Eksoskeletna kutikula členonožcev je v sloje urejen apikalni zunajcelični matriks epidermisa (Dillaman in sod. 2013). Osnovne strukturne makromolekule v kutikuli so hitin, proteini in lipidi. Trdnost kutikule pri rakih je predvsem posledica kalcifikacije, pri žuželkah pa trdnost zagotovi sklerotizacija. Kutikula zagotavlja oporo telesu živali in skupaj z mišicami omogoča premikanje. Poleg tega zagotavlja tudi zaščito pred vplivi zunanjega okolja in predvsem pri kopenskih členonožcih služi kot zaščita pred izsuševanjem. Nekatere izmed kutikularnih struktur imajo tudi pomembno vlogo pri senzoriki.

Glede na sestavo in strukturo lahko razločimo več slojev kutikule, v osnovi je kutikula razdeljena na tanek površinski sloj – epikutikulo in debelejši notranji sloj - prokutikulo. Epikutikula je sestavljena predvsem iz proteinov, lipoproteinov ter lipidov in jo lahko nadalje razdelimo še na zunanjo in notranjo epikutikulo. Osnovno strukturno omrežje prokutikule je zgrajeno iz hitinsko-proteinskih vlaken. Glede na ultrastrukturne značilnosti prokutikulo delimo na distalno eksokutikulo in proksimalno endokutikulo (Moussian, 2010). Pri rakih sta ekso- in endokutikula kalcificirani. Pomi kanali, ki potekajo skozi kutikulo v vertikalni smeri, imajo pomembno vlogo pri mineralizaciji. Med endokutikulo in epitelnimi celicami je še tanek nemineraliziran membranski sloj (Roer and Dillaman, 1984).

Osnovna zgradba eksoskeletne kutikule rakov enakonožcev je enaka kot pri ostalih rakih (Štrus in Blejec 2001; Hild in sod., 2008; Hild in sod., 2009; Seidl in Ziegler, 2012). (Slika 3). Mineralno komponento kutikule predstavljajo kalcit, amorfni kalcijev karbonat in amorfni kalcijev fosfat. Kalcit se nahaja v eksokutikuli amorfni kalcijev karbonat in amorfni kalcijev fosfat sta prisotna v endokutikuli.

Eksoskeletno kutikulo izločajo celice epidermisa. Tvorba nove kutikule poteka med embriogenezo in ob obnavljanju kutikule med levitvijo. Preučevanje diferenciacije kutikule med embrionalnim razvojem s strukturnega in genetskega vidika je potekalo predvsem na modelnem organizmu vinski mušici (*Drosophila melanogaster*) (Moussian in sod., 2006; Moussian, 2010). Embrionalni epidermis vinske mušice je pred formiranjem prave kutikule prekrit z zunajceličnim matriksom, ki po podatkih iz literature ne vsebuje hitina (Moussian in sod., 2006). Ta matriks je sestavljen iz neurejenega materiala, ki ga prekriva tanek temnejši sloj. V drugi polovici embriogeneze se prične najprej nalagati zunanja epikutikula. Nalaganje poteka na konicah izrastkov apikalne membrane epidermalnih celic. Na ta način nastanejo fragmenti bodoče zunanje epikutikule, ki se potem povežejo v enoten sloj in se nadalje diferencirajo. Nalaganje prokutikule se prične takoj po formaciji enotnega sloja zunanje epikutikule in kasneje poteka hkrati z nalaganjem notranje epikutikule. Helikoidalna ureditev hitinskih lamel postane razvidna šele ob koncu embrionalnega razvoja (Moussian in sod., 2006; Moussian, 2010).



Slika 3: Eksoskeletna kutikula odraslega raka enakonožca *Porcellio scaber* (arhiv Skupine za funkcionalno morfološke in ekotoksikološke raziskave nevretenčarjev, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani). (en) endokutikula, (ek) eksokutikula, (ep) epikutikula.

Tvorba eksoskeletne kutikule med embrionalnim razvojem perakaridnih rakov je bila preučena pri postranici *Parhyale hawaiiensis* (Havemann in sod., 2008). Epidermis je v zgodnejših fazah razvoja prekrit samo s tankim slojem zunajceličnega matriksa. Kasneje se formira debelejši matriks, ki ga gradita tanek, elektronsko gost zunanji sloj in debelejši vlaknast notranji sloj. Ta matriks imenujemo embrionalna kutikula. Morfološko je podoben epidermalnemu matriksu pri vinski mušici, ki je bil opisan kot predhodna stopnja pred tvorbo kutikule in za katerega avtorji navajajo, da je najbrž homologen prvi embrionalni kutikuli opisani pri drugih žuželkah. Tudi pri postranici se pod tem matriksom kasneje izoblikuje kutikula, ki ima ob koncu embriogeneze že značilnosti kutikule odraslih osebkov (Havemann in sod., 2008).

Pri enakonožcu *Porcellio scaber* je epidermis v fazi poznega embrija prekrit s plastjo zunajceličnega matriksa, ki je zgrajen iz tanke, elektronsko goste lamine in spodaj ležečega svetlejšega sloja (Mrak in sod., 2012). Pri poznih embrijih tik pred izleganjem iz vitelinske membrane ima kutikula eksoskeleta že podobno zgradbo kot kutikula odraslih živalih, vendar je tanjša. Epikutikula je vidna kot tanek elektronsko gost sloj na površini. Helikoidalni vzorec hitinsko-proteinskih vlaken v eksokutikuli je še neizrazit, vendar na določenih mestih že razviden. Slojevitost endokutikule je že jasno izražena. Na nekaterih mestih je opazna apoliza. Zgradba kutikule pri marzupijskih mankah je podobna kot pri poznih embrijih pred izvalitvijo. Helikoidalni vzorec hitinsko-proteinskih vlaken v eksokutikuli je bolj izrazit. Skozi kutikulo potekajo tudi porni kanali. Pri nekaterih mankah so vidni znaki obnavljanja

kutikule: ločitev stare kutikule od epidermisa, razgradnja proksimalnih delov stare kutikule, oblikovanje izrastkov na apikalni plazmalemi in nalaganje nove kutikule na površini epidermalnih celic (Mrak in sod., 2012; Mrak in sod., 2014).

#### 1.4 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

V literaturi ni veliko podatkov o diferenciaciji prebavnega sistema rakov enakonožcev med embrionalnim razvojem, še zlasti pa ne o nastanku kutikule v prebavilu. Namen naloge je predvsem ultrastrukturalna analiza kutikule in celic črevesnega epitela v izbranih razvojnih fazah embrijev in ličink pri vrsti *Porcellio scaber* in opis diferenciacije črevesne kutikule s strukturnega vidika. Analizirali smo ultrastrukturo črevesne kutikule pri poznih embrijih, pri zgodnjih in poznih marzupijskih ličinkah ter pri odraslih živalih. Ultrastrukturo kutikule črevesa v navedenih razvojnih fazah smo primerjali s črevesno kutikulo odraslih živali. Diferenciacijo črevesne kutikule pa smo primerjali z diferenciacijo kutikule eksoskeleta pri istih razvojnih fazah embrijev in ličink. Opisali smo tudi strukturne spremembe epitelnih celic, predvsem spremembe apikalne celične membrane ob tvorbi kutikule in morebitne znake levitve v poznejših razvojnih fazah. Z nalogo smo pridobili novo znanje na področju diferenciacije hitinskih matriksov med embrionalnim razvojem kopenskih rakov enakonožcev. Dosedanje vedenje o razvoju kutikule pri členonožcih je izhajalo predvsem iz raziskav diferenciacije kutikule pri žuželkah, zlasti pri vinski mušici (Moussian in sod., 2006; Moussian, 2010).

Delovne hipoteze:

- Predvidevamo, da se tvorba črevesne kutikule v zgodnjih fazah razvoja ne bo bistveno razlikovala od tvorbe eksoskeletne kutikule, ker gre v obeh primerih za sintezo apikalnega hitinskega matriksa *de novo*. Zgodnji apikalni matriks črevesa bo verjetno homogen in neslojevit, podobno kot je opisano za zgodnji epidermalni matriks.
- V poznejših razvojnih fazah pričakujemo večje strukturne razlike med obema matriksoma, zaradi različnih funkcij. Kutikula eksoskeleta ima namreč oporno in zaščitno vlogo, kutikula črevesa pa sodeluje pri predelavi, transportu in absorpciji hrane.
- Glede na ugotovljeno strukturno podobnost eksoskeletne kutikule pri ličinkah in odraslih, pričakujemo, da bo tudi črevesna kutikula marzupijskih ličink že zelo podobna strukturi črevesne kutikule odraslih živali.
- Pričakujemo, da bodo med tvorbo kutikule diferenciacije apikalne membrane črevesnih celic podobne kot pri epidermalnih celicah.
- Pričakujemo, da bodo v poznejših razvojnih fazah prisotni prvi morfološki znaki levitve kutikule črevesa.

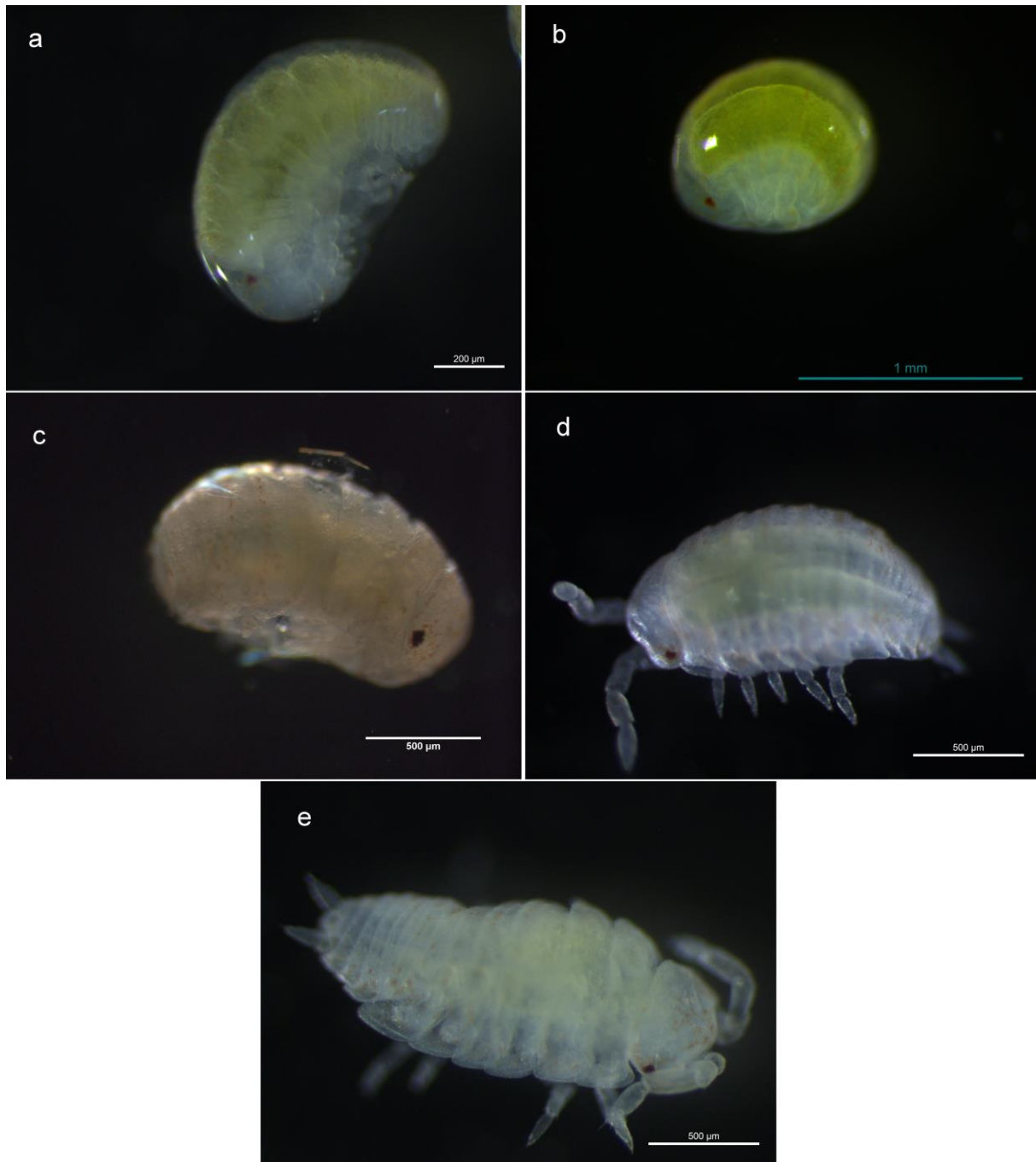
## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 POSKUSNE ŽIVALI

V raziskavo smo vključili kopenske rake enakonožce vrste *Porcellio scaber* Latreille, 1809 (Crustacea: Isopoda). V prvem delu smo analizirali histološko zgradbo zadnjega črevesa in ultrastrukturo črevesne kutikule odraslih živali. V drugem delu smo raziskali histološko zgradbo črevesa in ultrastrukturne značilnosti črevesne kutikule med embrionalnim in larvalnim razvojem v valilniku.

Histološko zgradbo zadnjega črevesa in ultrastrukturo črevesne kutikule smo analizirali pri treh odraslih živalih (enem samcu in dveh samicah) iz laboratorijske kulture. Izbrali smo živali pri katerih ni bilo opaznih znakov levitve. Živali vrste *Porcellio scaber* Latreille, 1809 (Crustacea: Isopoda) so bile nabrane na vrtu v vasi Javorje v občini Gorenja vas – Poljane, Slovenija. Kulturo živali smo vzdrževali v steklenem terariju s tanko plastjo vlažne prsti in gozdne stelje, pri temperaturi 25 °C, visoki relativni vlažnosti in v konstantnih svetlobnih razmerah (cikel 12 ur svetlobe in 12 ur teme). Živali so se prehranjevale s suhim in delno razgrajenim listjem leske.

Za analizo ultrastrukture črevesne kutikule med razvojem v valilniku smo uporabili v smolo vklopljene vzorce embrijev in marzupijskih ličink iz predhodnih raziskav diferenciacije eksoskeletne kutikule pri vrsti *Porcellio scaber* (Mrak in sod., 2012). Razvojni stadiji so bili opredeljeni na osnovi opisa embrionalnega in larvalnega razvoja pri vrsti *P. scaber*, kjer je morfološko opisanih dvajset zaporednih stadijev (Milatovič in sod., 2010). Analizirali smo: dva pozna embrija v fazi S16, dva pozna embrija v fazi S18, en pozni embrij v fazi S19 tik pred izleganjem iz vitelinske membrane, tri zgodnje manke in dve pozni marzupijski manki (Slika 4).



Slika 4: Izbrane faze embrijev in marzupijskih mank. (a) Pozni embrij v fazi S16. (b) Pozni embrij v fazi S18. (c) Pozni embrij v fazi S19. (d) Zgodnja marzupijska manka. (e) Pozna marzupijska manka. Merila: a 200 µm; b 1 mm; c, d, e 500 µm.

## 2.2 PRIPRAVA VZORCEV ZA SVETLOBNO IN ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO

Za analizo čreves odraslih živali smo živali uspavali s podhladitvijo in izolirali črevo. Vsako črevo smo po izolaciji prečno razdelili na tri enake dele in iz njih očistili vsebino. Vzorce smo prenesli v fiziološko raztopino (0,9 % NaCl), da smo preprečili izsuševanje tkiva. Vzorce smo čez noč fiksirali v 2,5 % glutaraldehydu v 0,1 M pufru HEPES (pH 7,2). Po fiksaciji smo vzorce spirali v pufru, trikrat po pol ure na rotorju. Postfiksacija v 1 % OsO<sub>4</sub> je trajala dve uri.

Sledilo je spiranje vzorcev v bi-destilirani vodi, dvakrat po pol ure na rotorju, in dehidracija vzorcev v naraščajoči alkoholni vrsti od 50 % do 100 % etanola. Najprej smo vzorce prenesli v 50 % etanol za 45 minut in nato v 70 % etanol, v katerem so vzorci ostali čez noč. Sledil je prenos vzorcev v 80 % etanol za 20 minut, nato v 90 % etanol dvakrat po 20 minut in na koncu še v 100 % etanol dvakrat po 20 minut. Vzorce smo nato dehidrirali še v acetonu dvakrat po 20 minut. Sledilo je vklapljanje v smolo Agar 100. Vklapljanje vzorcev v smolo je potekalo v mešanicah smole in acetona s postopnim povečevanjem koncentracije smole. Najprej smo vzorce prepajali z mešanico smole in acetona v razmerju 1:2 za 2 uri, nato z mešanico smole in acetona v razmerju 2:1 čez noč in na koncu s čisto smolo za 24 ur. Med vklapljanjem so se vzorci v smoli vrteli na rotorju. Vzorce smo nato prenesli v modelčke za oblikovanje blokcev in jih vklopili v čisto smolo. Polimerizacija smole je potekala 48 ur pri 60 °C. Pri vseh vzorcih smo analizirali anteriorno komoro in papilarno regijo, predel sfinktra pa pri enem vzorcu (Tabela 1).

Embriji in marzupijske manke so bili že predhodno izolirani iz marzupijev, fiksirani v 2,5 % glutaraldehidu v 0,1 M kakodilatnem pufri (pH 7,2) in vklopljeni v smolo Agar 100 ali Spurr (Mrak in sod., 2012). Pri vseh analiziranih razvojnih fazah embrijev in mank smo pregledali anteriorne in posteriorne dele zadnjega črevesa na nivoju svetlobne mikroskopije (Tabela 1). Ultratanke rezine smo pripravili iz vseh vzorcev, pri nekaterih vzorcih iz anteriornega in posteriornega dela črevesa (serijske rezine), pri nekaterih vzorcih pa iz enega od obeh predelov.

Poltanke in ultratanke rezine za svetlobno mikroskopijo in presevno elektronsko mikroskopijo smo pripravili z ultramikrotomom Reichert Ultracut S (Leica). Poltanke rezine debeline 1 µm smo narezali s steklenim nožem. Prenesli smo jih v kapljico destilirane vode na objektnem stekelcu in jih posušili pri 80 °C na termoplošči. Barvali smo jih z barvilom Azur II - metilen modrim (Richardson) na termoplošči in jih nato pokrili s krovnim medijem Ultrakitt in s krovnim stekelcem. Ko smo z rezanjem poltanskih rezin prišli do željenega področja v vzorcu, smo z diamantnim nožem narezali ultratanke rezine debeline 70 nm in jih prenesli na bakrene mrežice, prekrivane s folijo formvar. Kontrastirali smo jih s 4 % uranil acetatom (10 minut) in z 10 % svinčevim citratom (5 minut). Izdelavo ultratanskih rezin in kontrastiranje je izvedla Polona Mrak.

## 2.3 MIKROSKOPIRANJE

Pregledovanje in slikanje poltanskih rezin smo opravili s svetlobnim mikroskopom Axioskop Opton (Zeiss), opremljenim s kamero Leica DFC290HD in programom LAS V4.0 za zajem in obdelavo slik.

Pregledovanje in slikanje ultratanskih rezin je potekalo na presevnem elektronskem mikroskopu CM 100 (Philips), opremljenim z digitalno kamero Bioscan 792 (Gatan) in programom Digital Micrograph.

Preglednica 1: Analizirani vzorci odraslih živali, embrijev in marzupijskih mank

<b>Vzorec</b>	<b>Analiza histološke zgradbe (poltanke rezine / svetlobna mikroskopija)</b>	<b>Analiza ultrastrukture črevesne kutikule (ultratanke rezine / presevna elektronska mikroskopija)</b>
<b>Odrasli - 1</b>	Anteriorna komora Papilatna regija Sfinkter	Anteriorna komora Papilatna regija Sfinkter
<b>Odrasli - 2</b>	Anteriorna komora Papilatna regija Sfinkter	Anteriorna komora Papilatna regija
<b>Odrasli - 3</b>	Anteriorna komora Papilatna regija	Anteriorna komora Papilatna regija
<b>Pozni embrij S16 - 1</b>	Anteriorni del Posteriorni del	Posteriorni del
<b>Pozni embrij S16 - 2</b>	Anteriorni del Posteriorni del	Posteriorni del
<b>Pozni embrij S18 - 1</b>	Posteriorni del	Posteriorni del
<b>Pozni embrij S18 - 2</b>	Anteriorni del Posteriorni del	Anteriorni del
<b>Pozni embrij S19</b>	Anteriorni del Posteriorni del	Anteriorni del Posteriorni del
<b>Zgodnja marzupijska manka - 1</b>	Anteriorna komora Papilatna regija Predel sfinktra in rektuma	Anteriorna komora Papilatna regija Predel sfinktra in rektuma
<b>Zgodnja marzupijska manka - 2</b>	Anteriorna komora	Anteriorna komora
<b>Zgodnja marzupijska manka - 3</b>	Papilatna regija Sfinkter	Papilatna regija
<b>Pozna marzupijska manka - 1</b>	Anteriorna komora Papilatna regija Sfinkter	Anteriorna komora Papilatna regija Sfinkter
<b>Pozna marzupijska manka - 2</b>	Anteriorna komora Papilatna regija	Anteriorna komora Papilatna regija

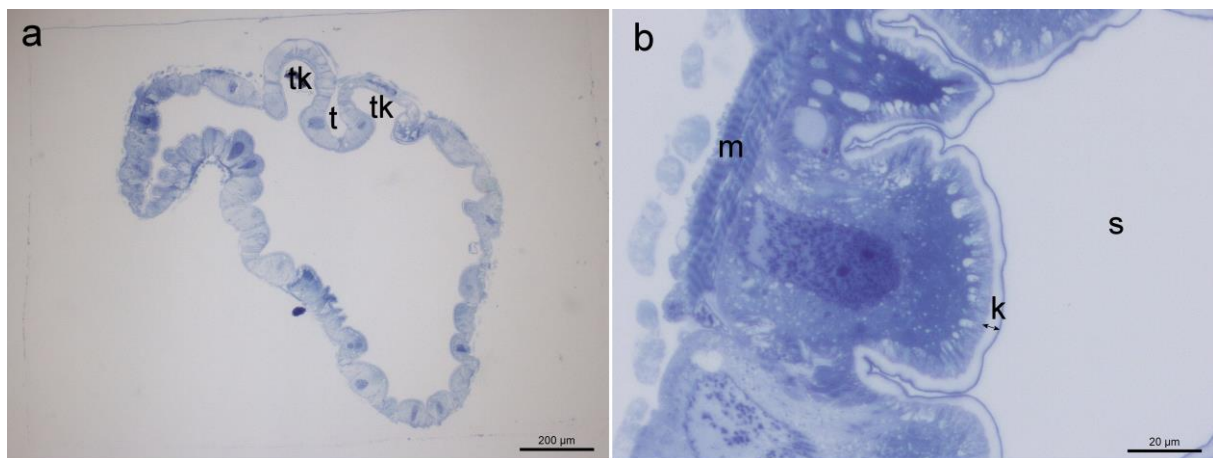


### 3 REZULTATI

#### 3.1 HISTOLOŠKA ZGRADBA ZADNJEGA ČREVEVA IN ULTRAŠTRUKTURA ČREVESNE KUTIKULE PRI ODRASLIH ŽIVALIH

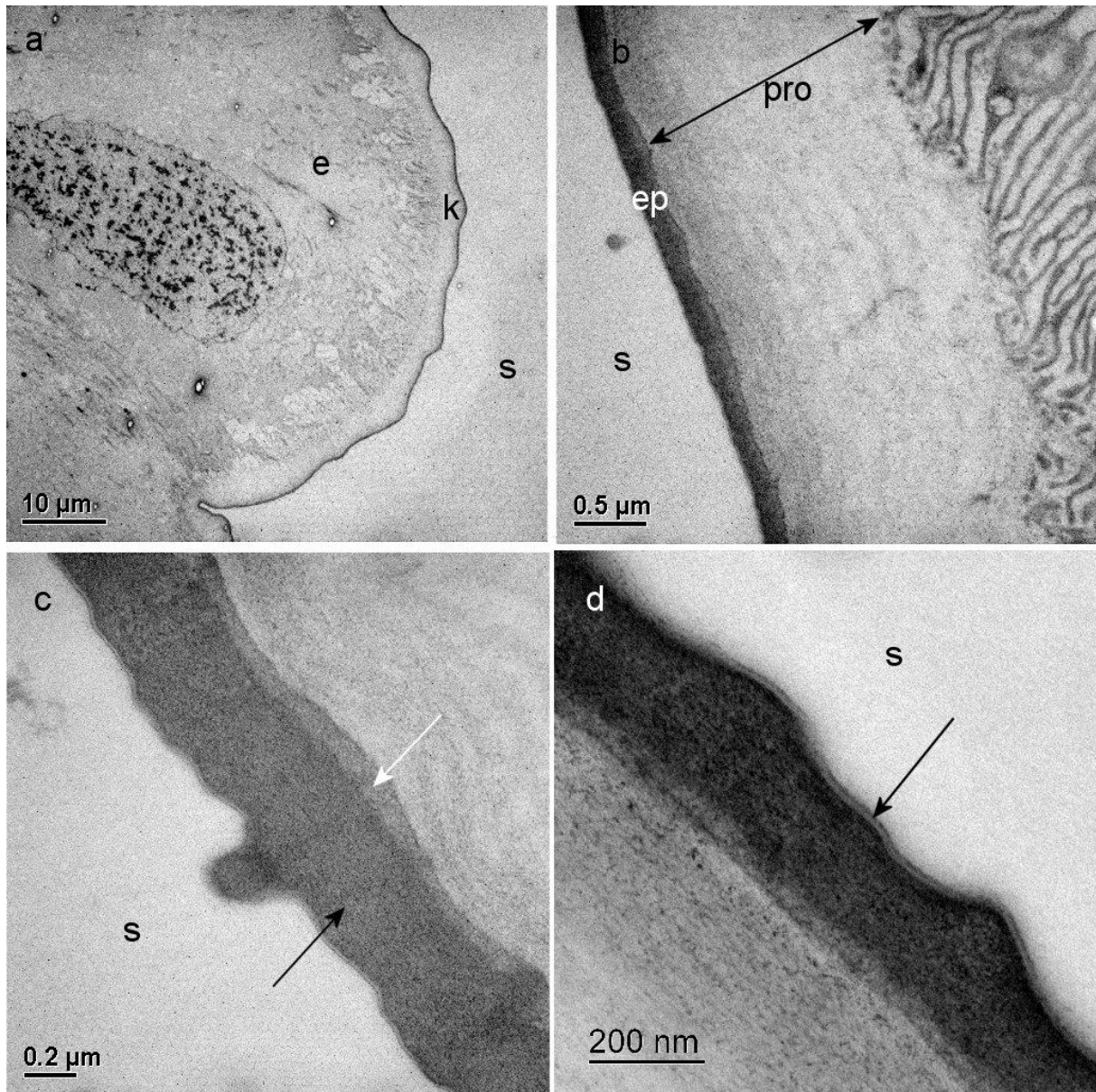
##### 3.1.1 Struktura anteriorne komore črevesa

Sprednji predel zadnjega črevesa se imenuje anteriorna komora. V dorzalni steni črevesa je vidna izrazita guba epitela, tiflosolis in dva tiflosolna kanala (Slika 5a). Enoslojni epitel črevesa gradijo velike celice, njihovi apikalni deli so kupolasto izbočeni v lumen črevesa. Apikalno površino celic črevesnega epitela prekriva kutikula, ki sestoji iz zunanjšega tanjšega, temno obarvanega sloja in notranjega debelejšega, svetlega sloja (Slika 5b). Bazalno ob epitelu so dobro vidne vzdolžne in krožne mišice.



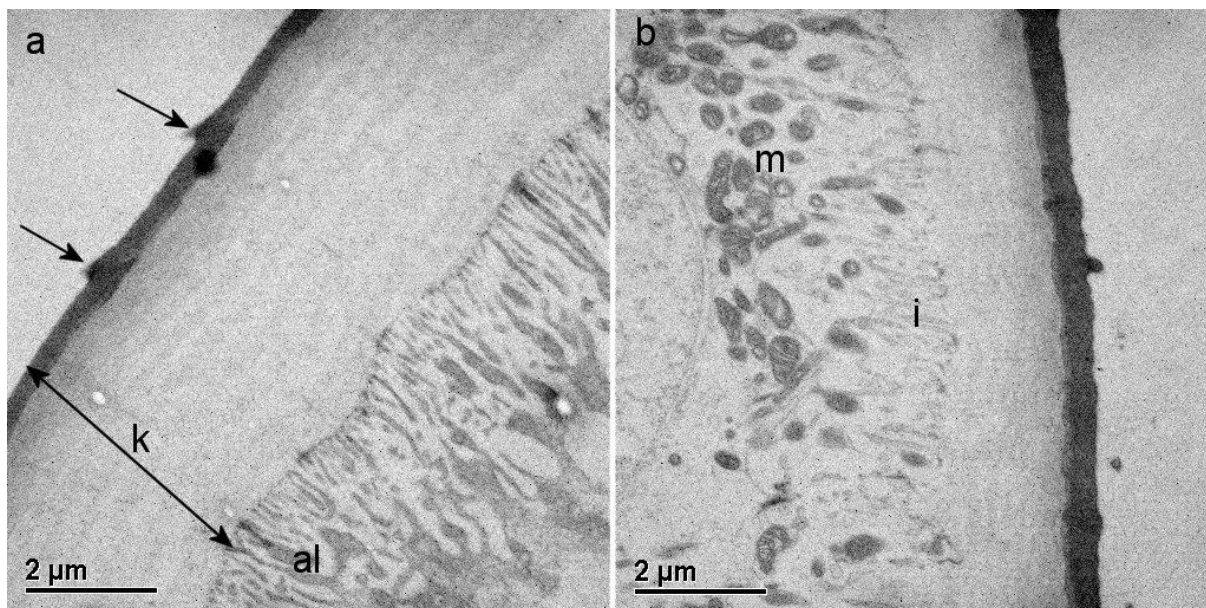
Slika 5: Histološka zgradba črevesa odraslih živali v predelu anteriorne komore. (a) V dorzalnem delu je viden tiflosolis (t) in ob njem potekajoča tiflosolna kanala (tk). (b) Apikalno površino epitelnih celic prekriva kutikula (k), ki sestoji iz temnejše obarvanega zunanjšega sloja in svetlejšega notranjega sloja. Bazalno pod epitelom so vidne mišice (m). (s) svetlina črevesa. Merila: a 200 µm; b 20 µm.

Na ultrastrukturnem nivoju v kutikuli razločimo elektronsko gostejši zunanji sloj in pod njim debelejši in elektronsko svetlejši notranji sloj (Slika 6a, 6b). Debelina kutikule v predelu anteriorne komore je med 1,6 in 4,1 µm. Razmerje med debelinama zunanjšega in notranjega sloja je približno 1 : 5. Glede na ultrastrukturne značilnosti smatramo, da je elektronsko gostejši zunanji sloj epikutikula, notranji debelejši in elektronsko prosojen pa prokutikula. V distalnem delu epikutikule razločimo tanke dva do tri površinske sloje (Slika 6d). Proksimalni del epikutikule je iz dveh homogenih plasti, ki se razlikujeta v elektronski gostoti (Slika 6c). Večinski del kutikule predstavlja notranji elektronsko svetlejši sloj - prokutikula, v kateri so vidne plasti hitinsko-proteinskih vlaken (Slika 6b). Na površini kutikule so kutikularni trni (slika 7a).



Slika 6: Ultrastruktura kutikule v anteriorni komori odraslih živali. **(a)** Kutikulo (k) sestavljata zunanji elektronsko gost sloj - epikutikula in notranji elektronsko svetel sloj – prokutikula. (e) celica črevesnega epitela, (s) svetlina črevesa. **(b)** Znotraj prokutikule (pro) so vidne plasti hitinsko-proteinskih vlaken. (ep) epikutikula, (s) svetlina črevesa. **(c)** V proksimalnem delu epikutikule sta vidni dve homogeni plasti: zunanja je elektronsko gostejša (črna puščica), notranja pa nekoliko svetlejša (bela puščica). **(d)** V distalnem delu epikutikule so vidni dva do trije tanki površinski sloji (→).

Apikalna celična membrana epitelnih celic je močno nagubana v apikalni labirint (Slika 7a). Neposredno ob invaginacijah membrane je pogosto veliko mitohondrijev (Slika 7b).

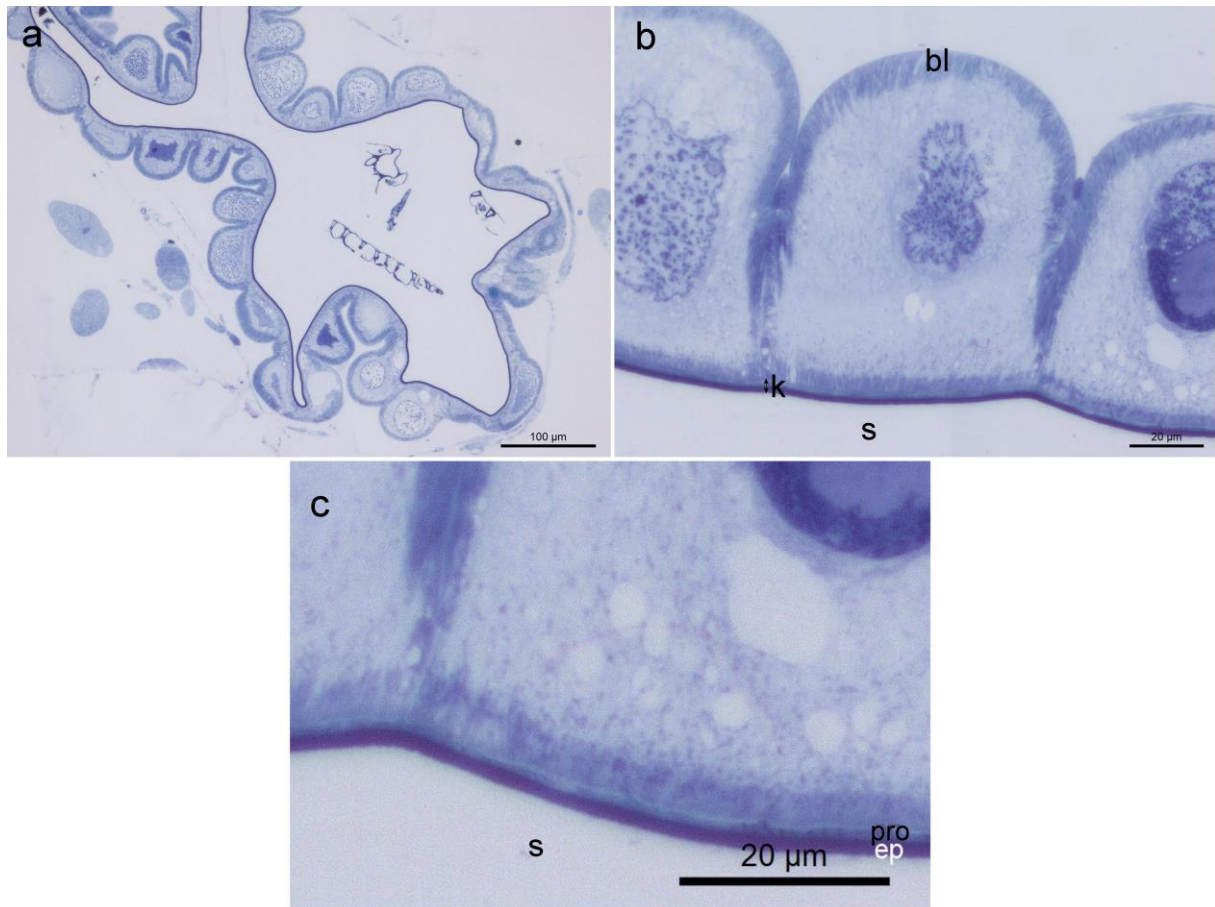


Slika 7: Apikalni labirint epitelnih črevesnih celic v predelu anteriorne komore. (a) Na površini kutikule (k) so kutikularni trni (→). Tik pod kutikulo je apikalni labirint epitelne celice (al). (b) Apikalni labirint: invaginacije apikalne celične membrane (i), mitohondriji (m).

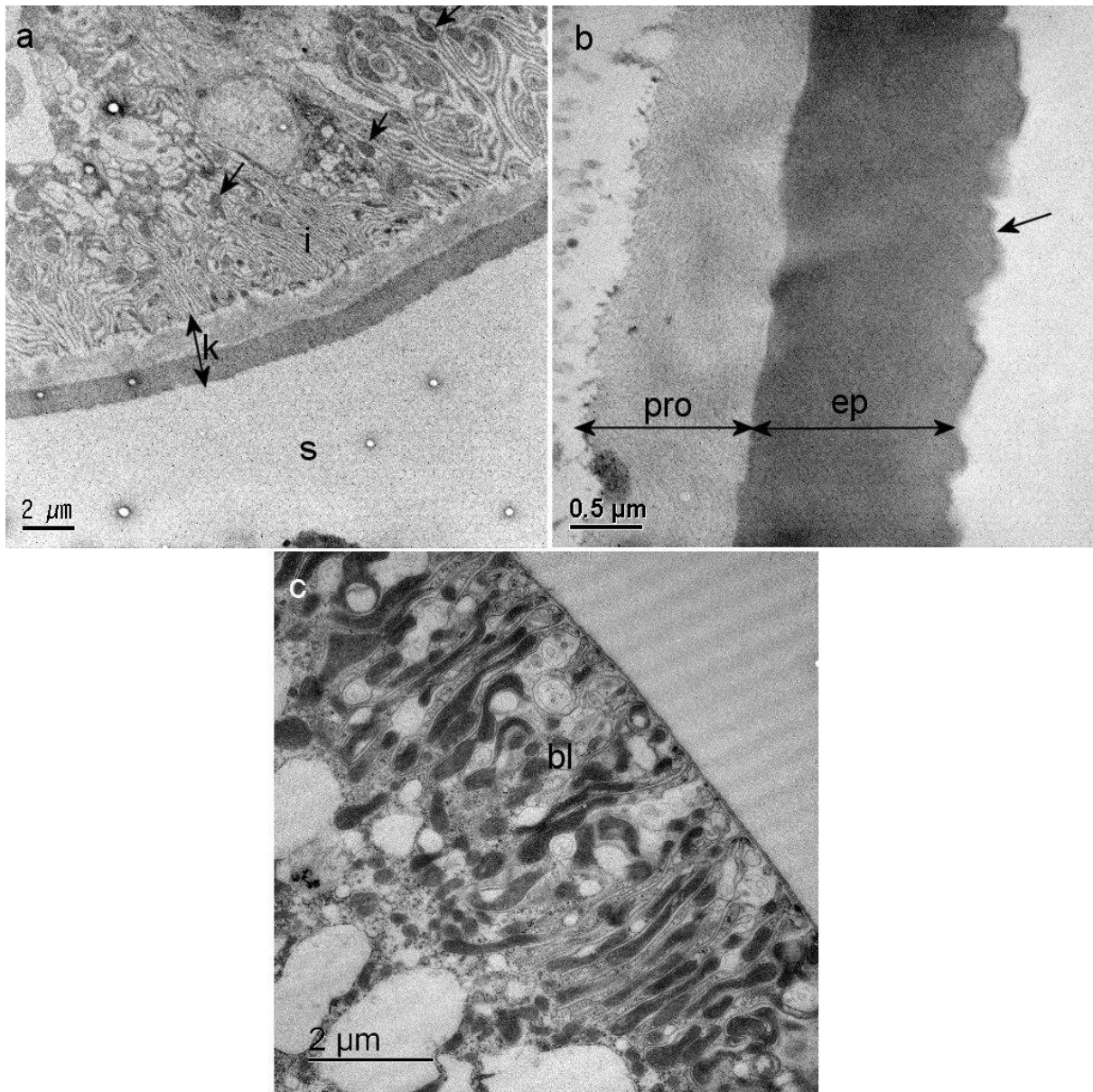
### 3.1.2 Struktura papilatne regije črevesa

Epitel črevesa v papilatni regiji gradi enojni sloj celic, katerih bazalni deli so kupolasto izbočeni v hemocel, apikalni deli celic pa so sploščeni (slika 8a). Torej ravno obratno kot pri črevesnih celicah anteriorne komore. Apikalna celična membrana je tako kot v predelu anteriorne komore močno nagubana v apikalni labirint. Poleg tega je močno nagubana tudi bazalna membrana v bazalni labirint (Slika 8b). Kutikula je tanjša kot v predelu anteriorne komore, debeline med 1,9 in 3,3  $\mu\text{m}$ . Na poltankih rezinah sta vidna dva sloja: zunanji temneje obarvan sloj in notranji sloj, ki je nekoliko svetleje obarvan (Slika 8c). Oba sloja sta približno enake debeline. V primerjavi s kutikulo anteriorne komore je zunanji sloj nekoliko debelejši, notranji pa tanjši.

Na ultrastrukturnem nivoju je notranji sloj (prokutikula) elektronsko svetlejši brez jasno vidnih horizontalnih plasti hitinsko-proteinskih vlaken. Zunanji sloj (epikutikula) je homogen in elektronsko gost, po debelini pa je približno enak prokutikuli (slika 9a). V distalnem delu epikutikule je tudi v papilatni regiji prisotna bi- ali trilamelarna struktura iz dveh elektronsko gostih plasti in vmesne elektronsko svetle plasti (Slika 9b). Površina kutikule je valovita. Apikalna celična membrana je podobno kot v predelu anteriorne komore močno nagubana v apikalni labirint, tik ob invaginacijah celične membrane pa so številni mitohondriji (Slika 9a). V celicah papilatne regije je izjemno izrazit tudi bazalni labirint, ob njem je zelo veliko mitohondrijev (Slika 9c).



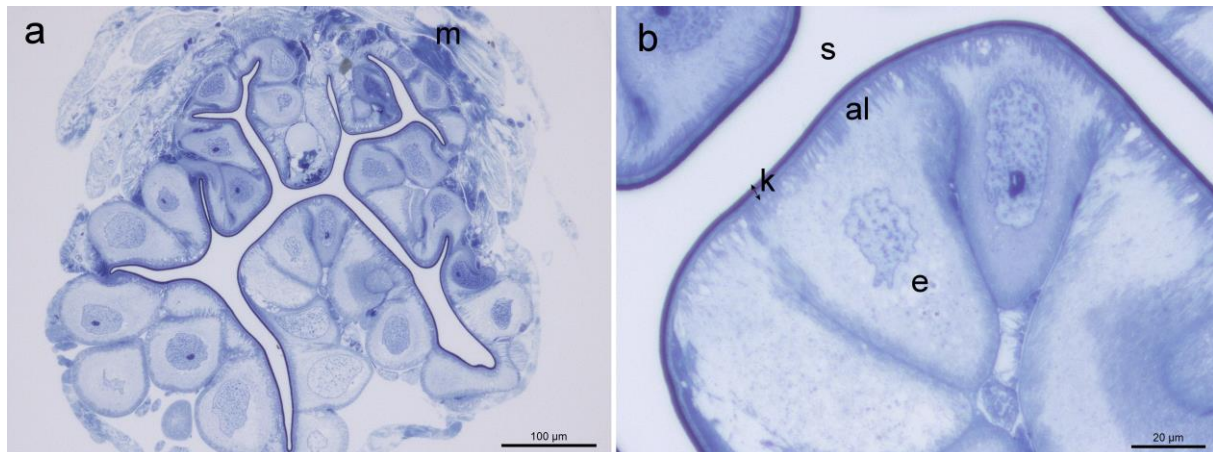
Slika 8: Histološka zgradba črevesa odraslih živali v predelu papilatne regije. **(a)** Vidni so izbočeni bazalni deli celic. **(b)** V bazalnih delih celic je močno izražen bazalni labirint (bl). (k) kutikula, (s) svetlina črevesa. **(c)** Kutikulo sestavljata notranji svetleje obarvan sloj (prokutikula) in temneje obarvan zunanji sloj (epikutikula). (pro) prokutikula, (ep) epikutikula, (s) svetlina črevesa. Merila: **a** 100 µm; **b** 20 µm.



Slika 9: Ultrastruktura kutikule v papilatni regiji odraslih živali. **(a)** Apikalna celična membrana je oblikovana v apikalni labirint s številnimi invaginacijami (i), v bližini katerih se nahajajo mitohondriji (→). (k) kutikula, (s) svetlina črevesa. **(b)** Zunanji (epikutikula) in notranji sloj (prokutikula) imata približno enako debelino. Površina kutikule je nagubana. Distalni del epikutikule je bi / trilamelaren (→). (ep) epikutikula, (pro) prokutikula. **(c)** V bazalnih delih epitelnih celic je izoblikovan izrazit bazalni labirint (bl).

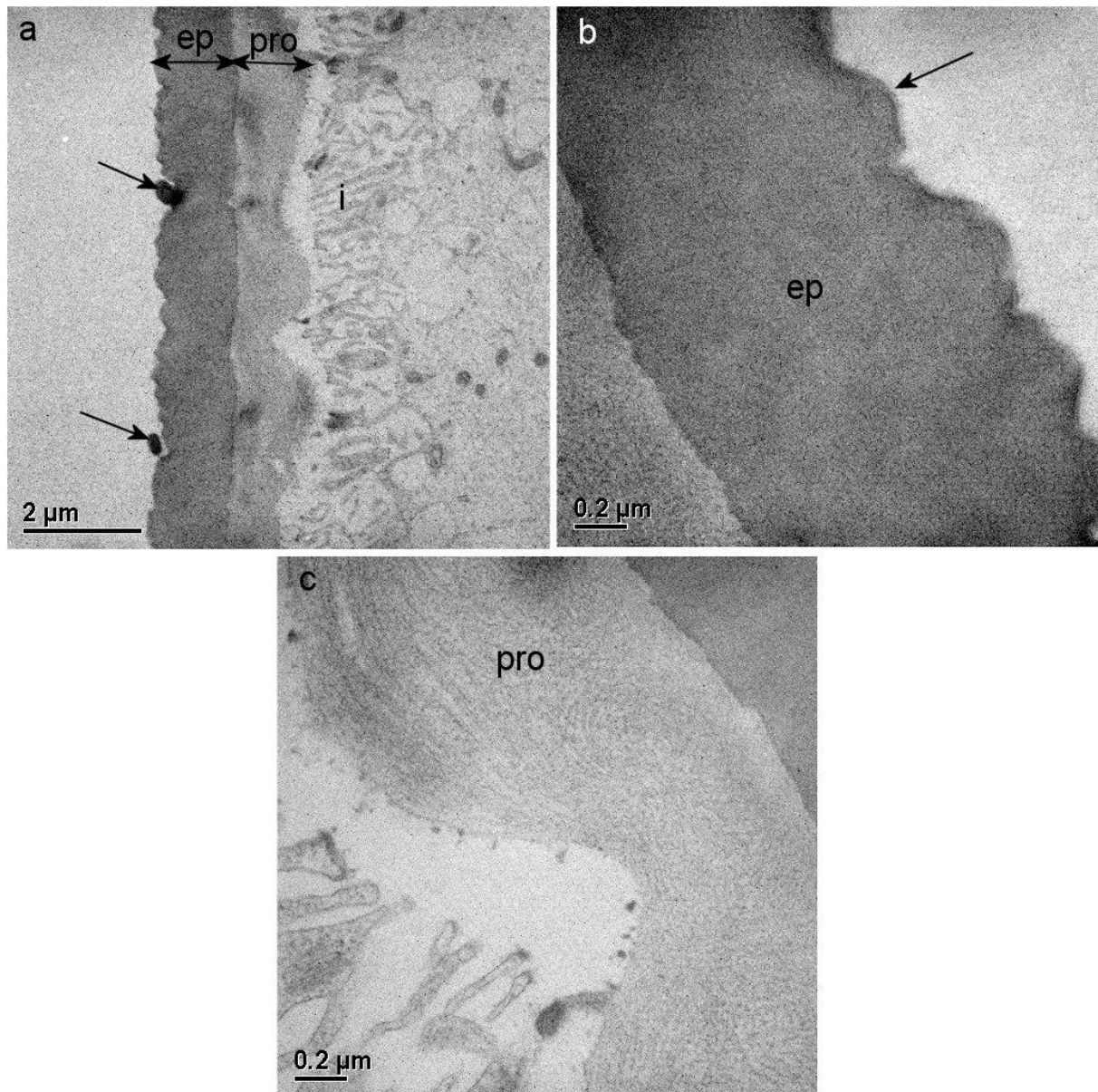
### 3.1.3 Struktura črevesa v predelu sfinktra za papilatno regijo

Črevesni epitel v predelu sfinktra je močno naguban v gube, ki zapirajo lumen črevesa. Na bazalni strani epitel obdajajo debeli sloji mišic (Slika 10a). Celice epitela so po zgradbi podobne celicam črevesnega epitela v papilatni regiji. Podobna je tudi zgradba kutikule, ki sestoji iz dveh približno enako debelih slojev: notranje svetlejše prokutikule in zunanje temneje obarvane epikutikule (Slika 10b). Celotna debelina kutikule v predelu sfinktra je med 1,7 in 3,3  $\mu\text{m}$ .



Slika 10: Histološka zgradba črevesa odraslih živali v predelu sfinktra. **(a)** Črevesni epitel je oblikovan v gube, obdajajo ga debeli sloji mišic (m). **(b)** Kutikulo (k) gradita notranja svetlejša prokutikula in zunanja temneje obarvana epikutikula. (e) epitelna celica, (al) apikalni labirint, (s) svetlina. Merila: **a** 100 $\mu\text{m}$ ; **b** 20  $\mu\text{m}$ .

Tudi na ultrastrukturnem nivoju je kutikula v predelu sfinktra podobna kutikuli v predelu papilatne regije (slika 11a). Sestoji iz elektronsko svetle notranje prokutikule, kjer ni vidnih horizontalnih plasti hitinsko-proteinskih vlaken (Slika 11b) in zunanjega homogenega elektronsko gostega sloja – epikutikule (Slika 11c). Distalni del epikutikule je bi / trilamelaren. Površina kutikule je izrazito valovita, na njej so kutikularni trni (Slika 11a).



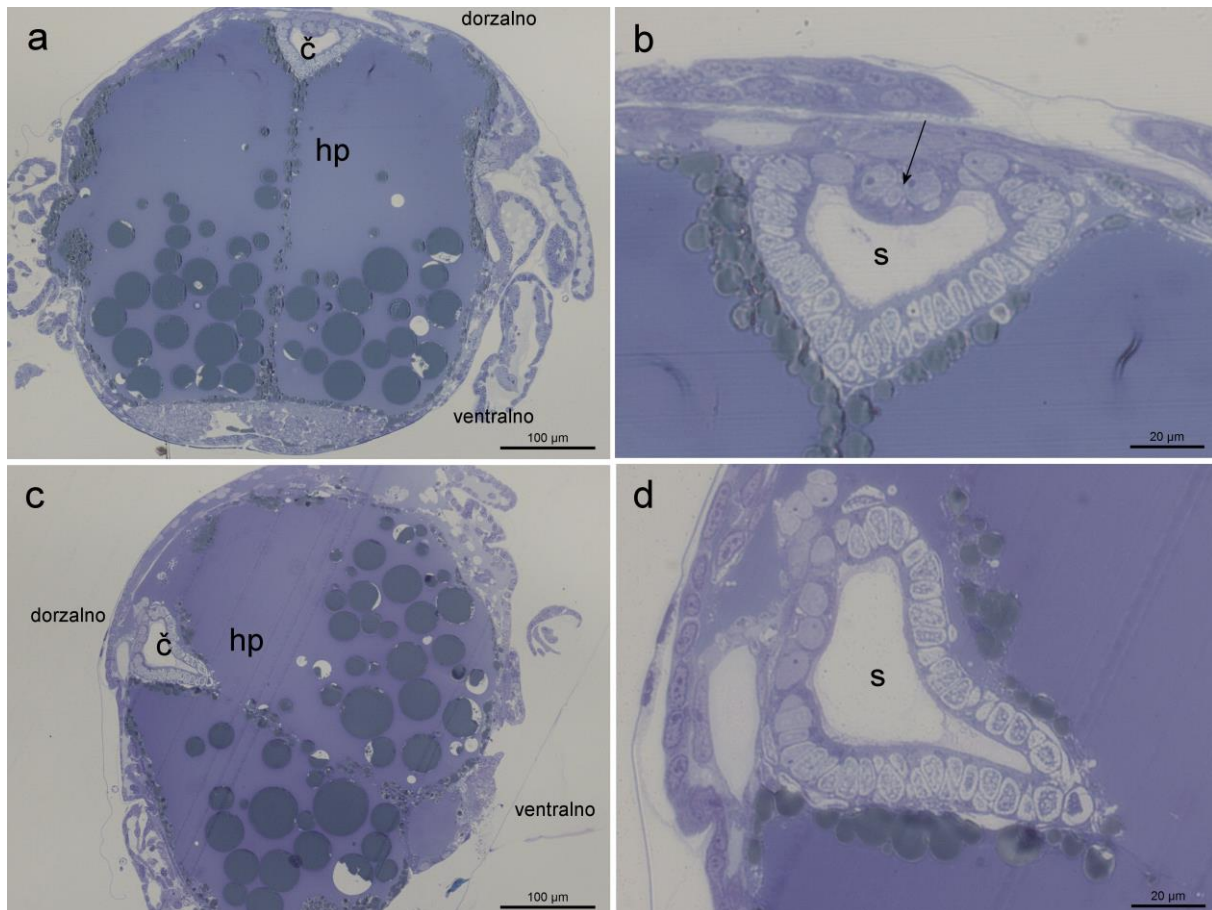
Slika 11: Ultrastruktura kutikule v predelu sfinktra pri odraslih živalih. (a) Kutikulo gradita približno enako debela sloja prokutikule (pro) in epikutikule (ep). Na površini so kutikularni trni (→). Jasno se vidi apikalni labirint epitelne celice z invaginacijami apikalne celične membrane (i). (b) Epikutikula je elektronsko gosta in homogena, v distalnem delu so prisotne lamele (→). (c) Prokutikula ima vlaknasto strukturo.

### 3.2 HISTOLOŠKA ZGRADBA ZADNJEGA ČREVEŠA IN ULTRAŠTRUKTURA ČREVESNE KUTIKULE PRI POZNIH EMBRIJIH

#### 3.2.1 Zgradba črevesa poznih embrijev v fazi S16

Pri poznih embrijih v fazi S16 je viden obsežen hepatopankreas, ki vsebuje rumenjaki, prebavna cev pa je stisnjena v skrajni dorzalni del telesa embrija (Slika 12a, 12c). V prečnem prerezu je zadnje črevo trikotne oblike, črevesni epitel pa gradijo strukturno različne celice. V dorzalni polovici črevesnega epitela so razporejene izodiametrične celice z velikim homogenim jedrom z enim jedrcem ali jedrom, kjer je heterokromatin razporejen v več

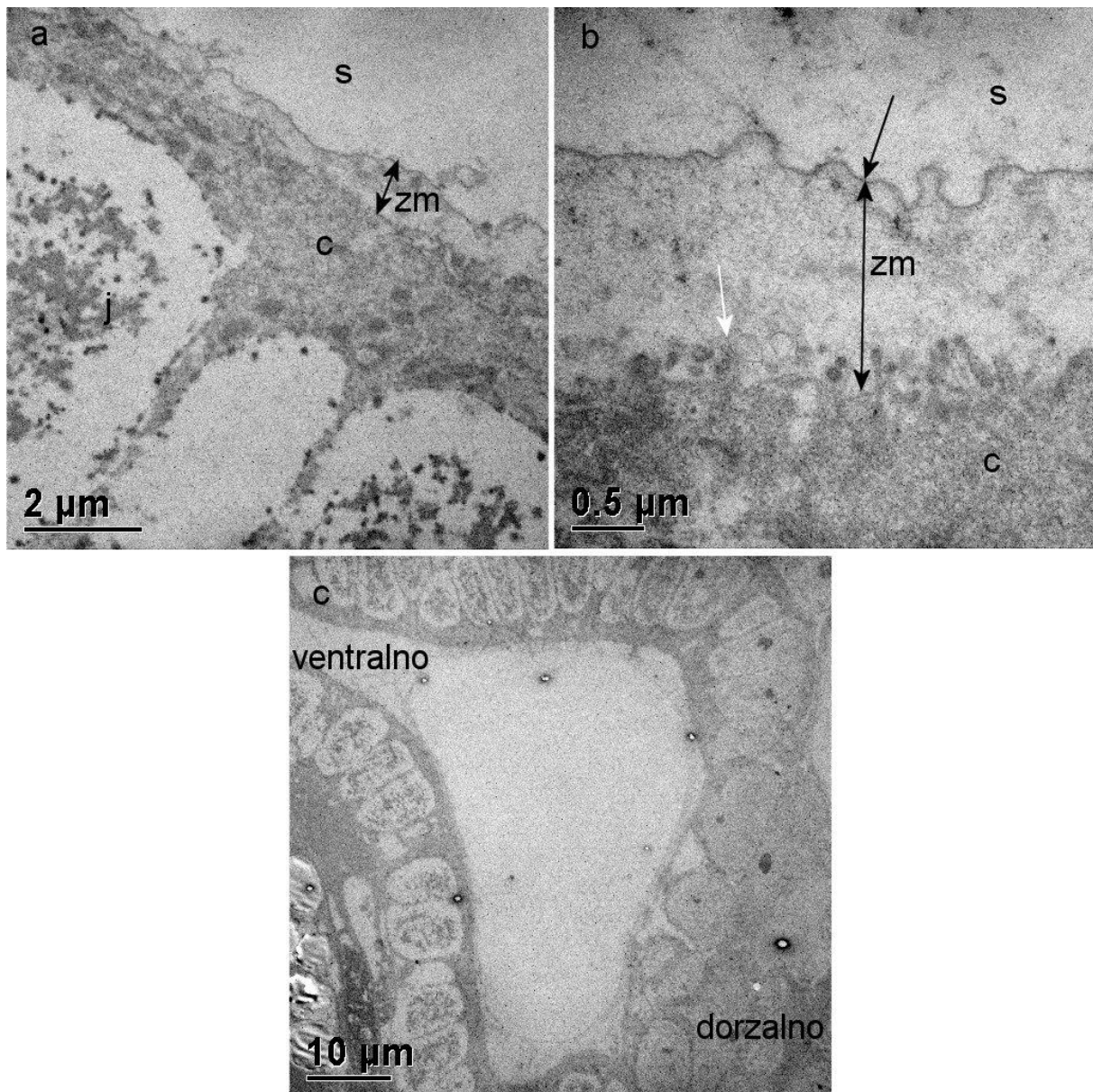
skupkih. Celice bolj prizmatske oblike s svetlim jedrom so najpogosteje razporejene v lateralnem in ventralnem delu črevesne stene (Slike 12b, 12d, 13c). V anteriornem delu zadnjega črevesa je v dorzalni steni opazen greben celic, ki že nekoliko sega v črevesno svetlino. To je zasnova za tiflosolis, ki pa je opazna le v kratkem predelu anteriornega dela črevesa (Slika 12b).



Slika 12: Histološka zgradba zadnjega črevesa pri poznih embrijih v fazi S16. (a) Prečni prerez embrija v predelu anteriornega dela zadnjega črevesa. (č) črevo, (hp) hepatopankreas. (b) V anteriornem delu zadnjega črevesa je v kratkem predelu že razvita zasnova za tiflosolis (→). (s) svetlina črevesa. (c) Prečni prerez embrija v bolj medianem predelu. (č) črevo, (hp) hepatopankreas. (d) Izodiametrične celice z bolj homogenimi jedri (dorzalno) in prizmatske celice s svetlimi jedri (ventralno). (s) svetlina črevesa. Merila: a, c 100  $\mu\text{m}$ ; b, d 20  $\mu\text{m}$ .

Na ultrastrukturnem nivoju je na svetlini površini črevesnih epitelnih celic viden zunajcelični matriks (Slika 13a). Sestavljata ga površinski tanek, elektronsko gost sloj in pod njim ležeči debelejši, elektronsko svetel sloj brez vidnih podslojev. Površina tega zunajceličnega matriksa je izrazito nagubana (Slika 13b). Debelina zunajceličnega matriksa je med 0,2 in 1,2  $\mu\text{m}$ . Apikalna celična membrana je na nekaterih mestih nagubana, vendar ne tako izrazito kot v poznejših razvojnih fazah.





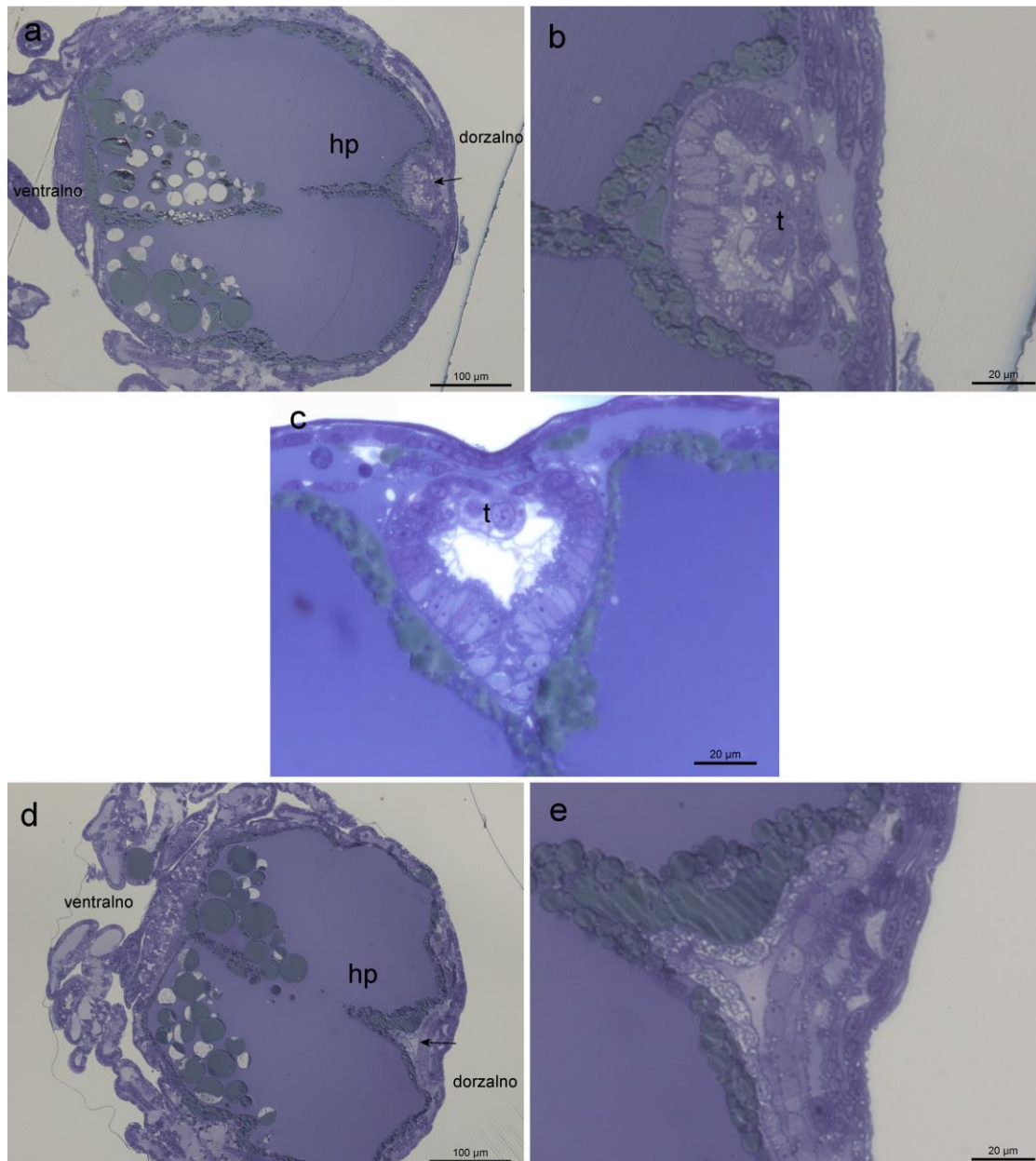
Slika 13: Ultrastruktura zunajceličnega matriksa epitelnih celic zadnjega črevesa pri poznih embrijih v fazi S16. (a) Epitel prekriva plast elektronsko svetlega zunajceličnega matriksa (zm). (s) svetlina črevesa, (c) citoplazma epitelne celice, (j) jedro. (b) Površina zunajceličnega matriksa je izrazito nagubana, na površini je tanek elektronsko gost sloj (črna puščica). Apikalna membrana je ponekod nagubana (bela puščica). (s) svetlina črevesa, (c) citoplazma epitelne celice. (c) Celice v dorzalni steni imajo homogena jedra z enim jedrcem, v ventralni steni pa vidimo celice s svetlimi jedri

### 3.2.2 Zgradba črevesa poznih embrijev v fazi S18

Na prečnem prerezu poznih embrijev v fazi S18 je podobno kot v fazi S16, viden obsežen, z rumenjacom napolnjen hepatopankreas. Prebavna cev je stisnjena v skrajni dorzalni del telesa embrija (Slika 14a, 14d). V primerjavi z embriji v fazi S16 je oblikovanje tiflosolisa razvidno v večjem predelu anteriornega dela zadnjega črevesa. Opazili smo, da je v posteriorni smeri proti bodoči papilarni regiji greben celic precej obsežen in sega globoko v svetlino črevesa

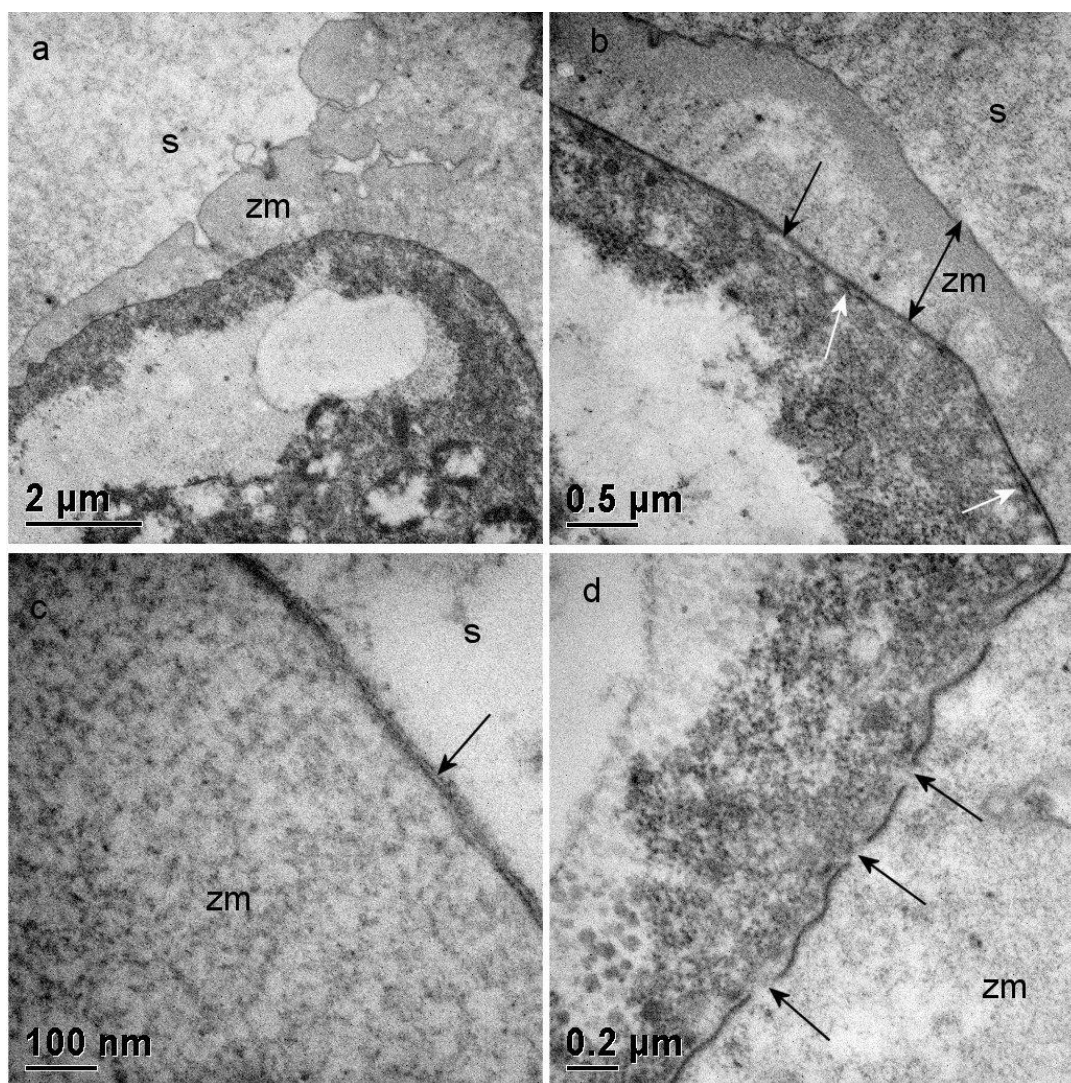
(slika 14b), v anteriorni smeri pa je greben manjši (Slika 14c). Iz tega lahko sklepamo, da se celice tiflosolisa v skrajnem anteriornem delu zadnjega črevesa diferencirajo kasneje kot v predelu proti bodoči papiladni regiji. V posteriornem delu tiflosolisa ni, črevo pa je v prečnem prerezu trikotne oblike (Slika 14e).

Črevesni epitel gradijo strukturno različne celice, podobno kot pri embrijih v fazi S16. Apikalni deli celic v ventralnem delu črevesne stene so izbočeni v svetlino črevesa (Slika 13b).



Slika 14: Histološka zgradba zadnjega črevesa pri poznih embrijih v fazi S18. **(a)** Prečni prerez embrija v predelu anteriornega dela zadnjega črevesa (→). (hp) hepatopankreas. **(b)** V anteriornem delu zadnjega črevesa se že oblikuje tiflosolis (t). **(c)** V sprednji regiji anteriornega dela je tiflosolis (t) manj izrazit. **(d, e)** Prečni prerez embrija v predelu zadnjega črevesa brez tiflosolisa(→). (hp) hepatopankreas. Merila: **a, d** 100 µm; **b, c, e** 20 µm.

Na ultrastrukturnem nivoju je na svetlinski površini celic črevesnega epitela viden homogen, elektronsko svetel zunajcelični matriks, ki v zgornjem predelu vsebuje nekoliko gostejši material (Slika 15a, 15b). Najbolj zunanji sloj matriksa je tanek, elektronsko gost sloj, ki je izrazito naguban. Pri večji povečavi je razvidna zgradba tega sloja iz treh plasti, dve elektronsko gosti lameli in vmesna svetla lamela (Slika 15c). Debelina matriksa je med 0,2 in 1,7  $\mu\text{m}$ . Tik nad apikalno membrano epitelnih celic leži še tanka plast, vidna kot izrazit, elektronsko gost sloj, ki sledi površini epitela in je na redkih mestih še prekinjen (Slika 15b, 15d). To je verjetno novo nastajajoči matriks debeline med 40 in 100 nm. Apikalna celična membrana je diferencirana v izrastke z elektronsko gostimi konicami, kar kaže na to, da poteka nalaganje zunajceličnega matriksa (Slika 15b).

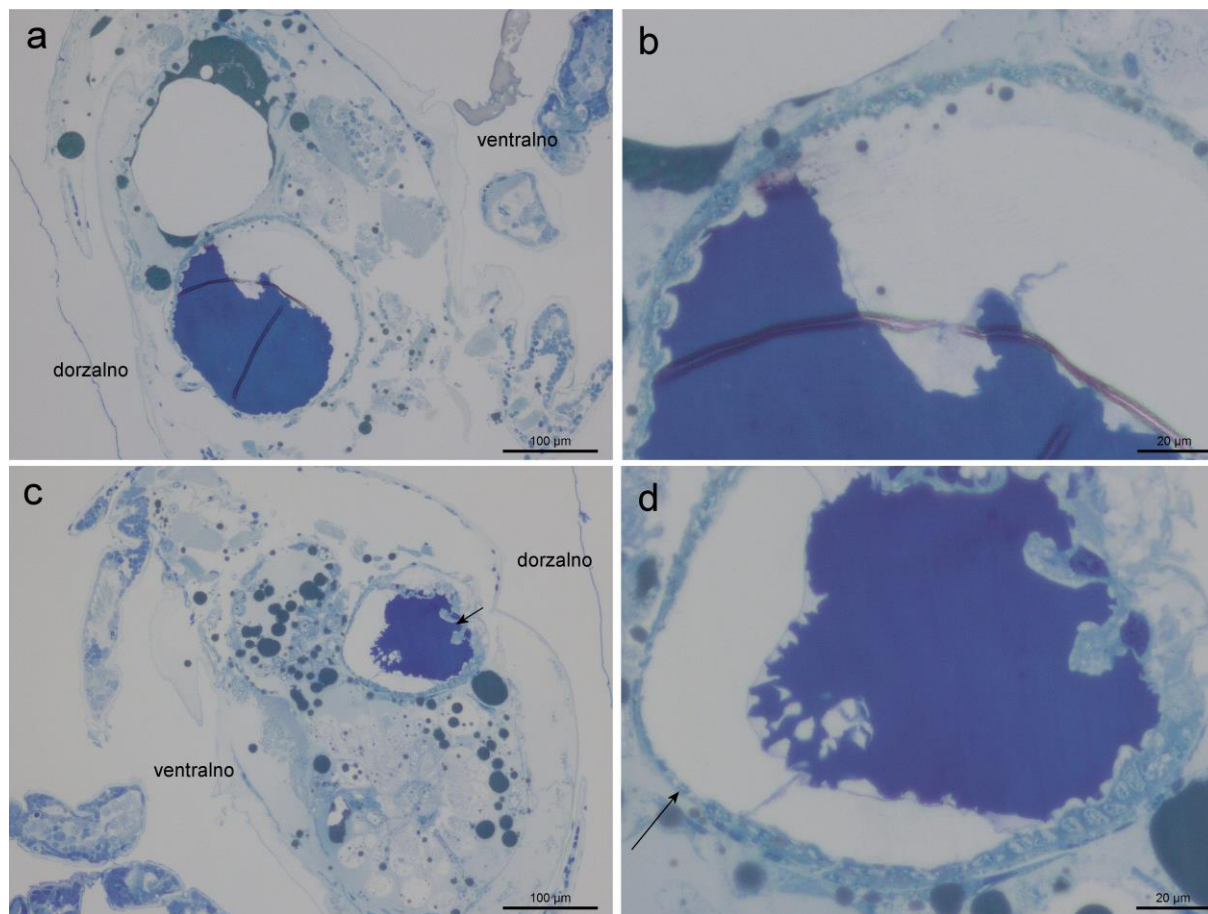


Slika 15: Ultrastruktura zunajceličnega matriksa epitelnih celic zadnjega črevesa pri poznih embrijih v fazi S18.

(a) Epitelne celice prekriva homogen zunajcelični matriks (zm) z izrazito nagubano površino. (s) svetlina črevesa. (b) Pod plastjo homogenega zunajceličnega matriksa je tanek elektronsko gost sloj (črna puščica) novo nastajajočega matriksa. Apikalna membrana epitelnih celic je diferencirana v izrastke z elektronsko gostimi konicami (beli puščici). (c) Zgradba zunanega sloja iz treh lamel ( $\rightarrow$ ). (s) svetlina črevesa, (zm) zunajcelični matriks. (d) Elektronsko gost sloj novo nastajajočega matriksa je na nekaterih mestih še prekinjen ( $\rightarrow$ ). (zm) zunajcelični matriks.

### 3.2.3 Zgradba črevesa poznega embrija tik pred izvalitvijo iz vitelinske membrane v fazi S19

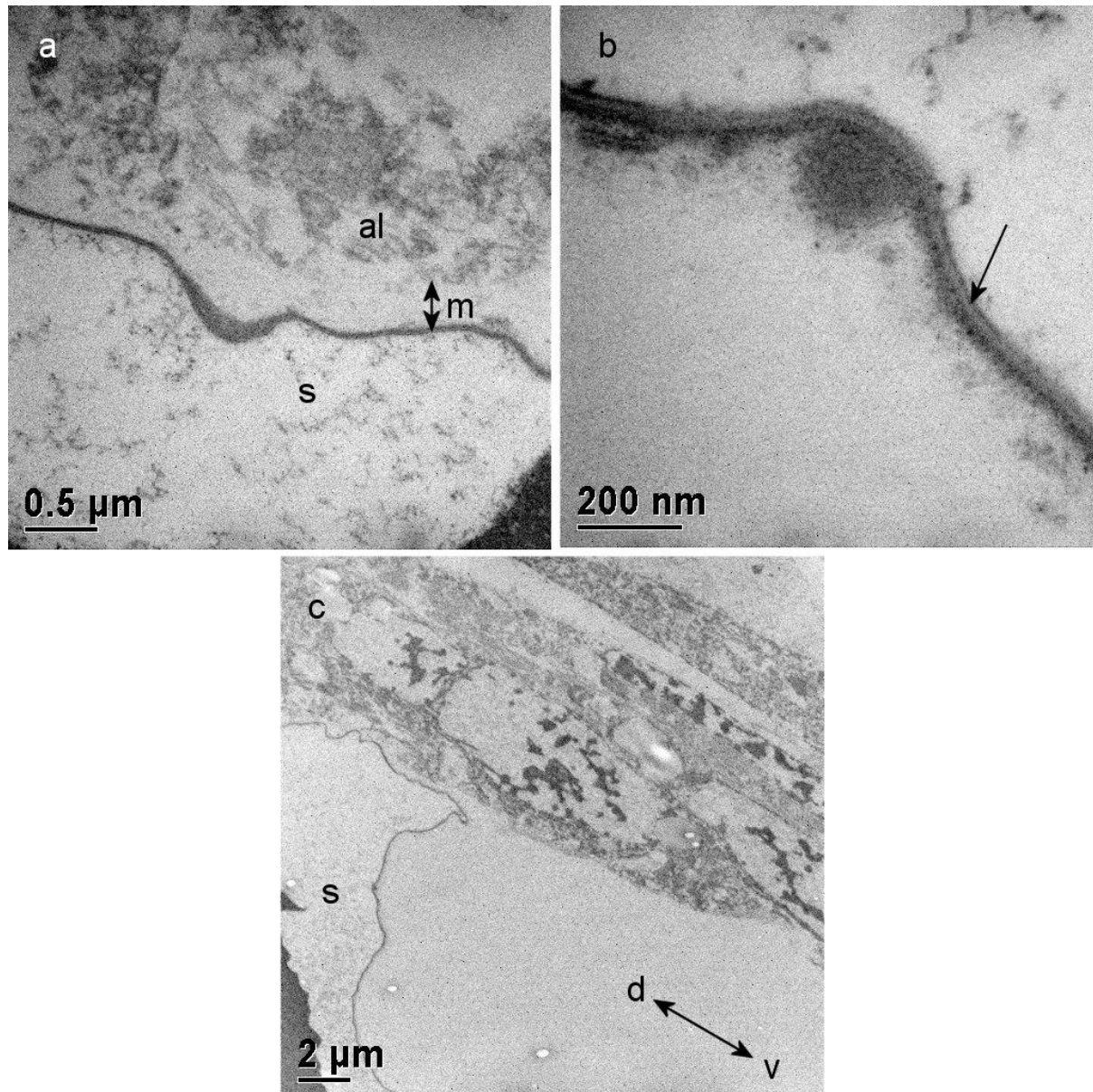
Pri poznem embriju v fazi S19 tiflosolis v anteriornem delu zadnjega črevesa v smeri proti želodcu ni viden (Slika 16a). V smeri proti bodoči papilatni regiji je opazen nastajajoči tiflosolis, oblikovan v dva ozka grebena celic, ki segata v svetlino črevesa (Slika 16c, 16d). Celice, ki gradijo črevesni epitel so v dorzalnem delu izodiametrične ali sploščene, v ventralnem delu pa so večinoma sploščene. Apikalni deli celic so ponekod rahlo izbočeni v svetlino črevesa. (Slika 16b, 16d). Svetlino črevesa napolnjuje temno obarvana vsebina.



Slika 16: Histološka zgradba anteriornega dela zadnjega črevesa pri poznih embrijih v fazi S19. Črevesna svetlina je napolnjena s temno obarvano snovjo (modro). (a, b) Prečni prerez embrija v predelu anteriornega dela zadnjega črevesa v smeri proti želodcu, kjer tiflosolis ni viden. Celice, ki gradijo epitel so sploščene in rahlo izbočene v svetlino. (c, d) Prečni prerez embrija v predelu anteriornega dela zadnjega črevesa v smeri proti bodoči papilatni regiji. Iz dorzalne stene črevesa v svetlino sega tiflosolis (→). (d) Celice v dorzalni steni so bolj izodiametrične, v ventralni steni pa bolj sploščene (→). Merila: a, c 100 µm; b, d 20 µm.

Na ultrastrukturnem nivoju lahko razločimo, da je zunajcelični matriks črevesnega epitela v anteriornem delu zadnjega črevesa sestavljen iz zunanega tankega, elektronsko gostega sloja in notranjega debelejšega, elektronsko svetlega sloja (slika 17a). V zunanem elektronsko gostem sloju so razvidne tri lamele, kjer vmesno svetlo lamelo obdajata elektronsko gosti lameli. Pod njimi je dodaten sloj elektronsko gostega materiala (Slika 17b). Zunajcelični matriks sledi površini črevesnih epitelnih celic, ponekod pa odstopa od epitela (Slika 17c). Debelina matriksa je med 0,3 in 1,5 µm. Apikalna membrana epitelnih celic je nagubana v

apikalni labirint (Slika 17a). Večja debelina zunanje trilaminarnega sloja in prisotnost elektronsko gostega materiala pod njim sta značilnosti, po katerih se opisani matriks razlikuje od matriksov pri zgodnejših razvojnih stopnjah embrijev. Ti dve značilnosti nakazujeta podobnost opisanega matriksa s kutikulo.

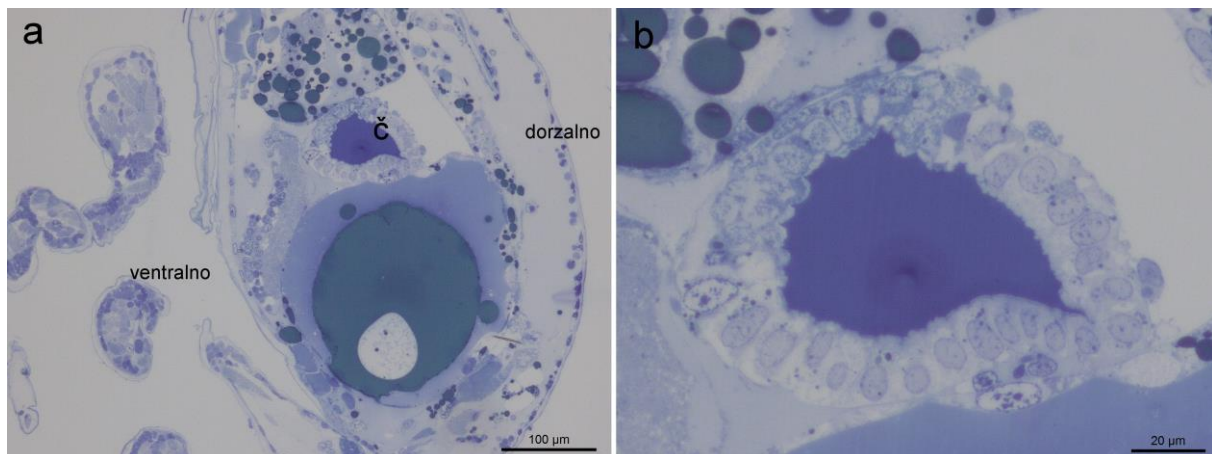


Slika 17: Ultrastruktura apikalnega matriksa v anteriornem delu zadnjega črevesa pri poznih embrijih v fazi S19.

(a) Matriks (m) sestavljata tanek elektronsko gost sloj na površini in debelejši elektronsko svetel sloj pod njim.

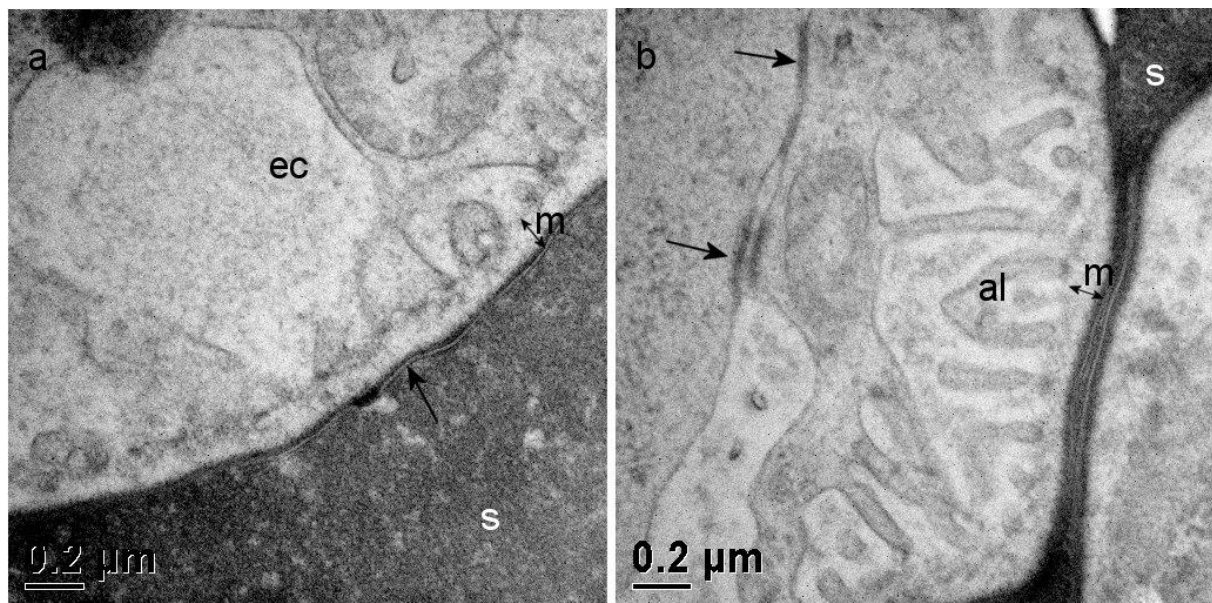
Apikalna membrana epitelnih celic je nagubana v apikalni labirint (al). (s) svetlina črevesa. (b) Površina matriksa je nagubana, izbokline ponekod vsebujejo elektronsko gost material. V distalnem delu elektronsko gostega sloja se nahaja trilamelarni zunanji sloj, pod njim pa dodaten sloj elektronsko gostega materiala (→). (c) Ponekod matriks odstopa od epitela. (d) dorzalno, (v) ventralno, (s) svetlina črevesa.

Prebavna cev v posteriornem delu zadnjega črevesa je ožja v primerjavi z anteriornim delom (Slika 18a). Celice črevesnega epitela so večinoma prizmatske oblike (Slika 18b). Svetlino črevesa zapolnjuje temno obarvana vsebina.



Slika 18: Histološka zgradba posteriornega dela zadnjega črevesa pri poznih embrijih v fazi S19. Svetlino črevesa zapolnjuje temno obarvana vsebina. (a) Prečni prerez embrija v predelu posteriornega dela zadnjega črevesa (č). (b) Črevesni epitel gradijo prizmatske celice. Merila: a 100 μm; b 20μm.

Kot je razvidno na ultrastrukturnem nivoju, je matriks podoben kot v anteriornem predelu zadnjega črevesa, sestavljata ga tanek in elektronsko gost zunanji sloj ter debelejši in elektronsko svetel notranji sloj (Slika 19). Distalni del zunanjšega sloja je trilamelaren, z vmesno svetlo lamelo in zunanjsima elektronsko gostima lamelama (Slika 19a). Debelina matriksa je med 0,1 in 0,2 μm. Apikalna membrana epitelnih celic je nagubana v apikalni labirint (Slika 19b).

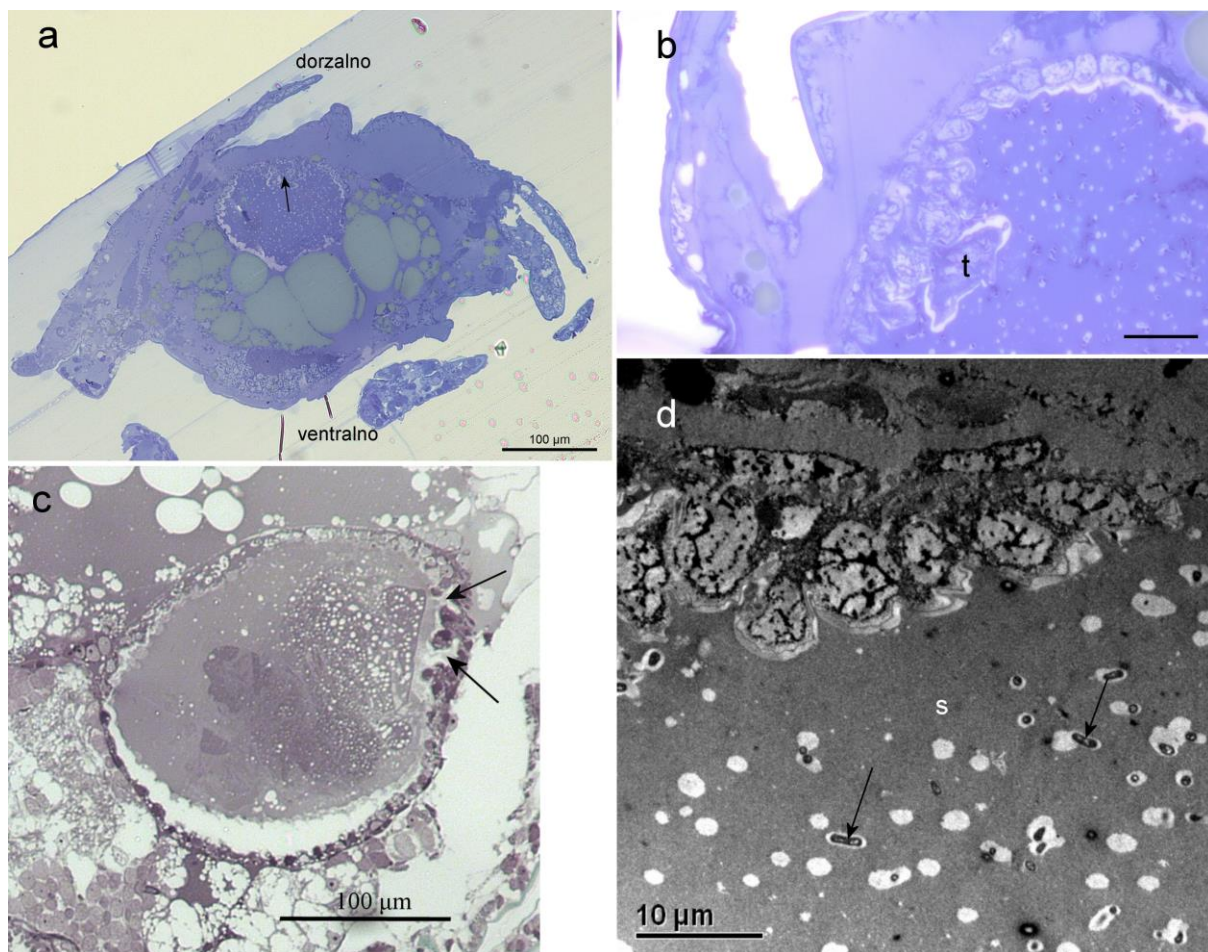


Slika 19: Ultrastruktura apikalnega matriksa v posteriornem delu zadnjega črevesa pri poznih embrijih v fazi S19. (a) Matriks (m) leži nad epitelno celico (ec) in meji na svetlino črevesa (s), ki je napolnjena z gosto vsebino. Distalni del matriksa sestavljajo tri lamele (→). (b) Apikalna membrana epitelnih celic epitelnih celic je nagubana v apikalni labirint (al). Na sliki so jasno razvidni medcelični stiki v subapikalnem plazmalemi črevesnih celic (→). (s) svetlina črevesa.

### 3.3 HISTOLOŠKA ZGRADBA ZADNJEGA ČREVEVA IN ULTRAŠTRUKTURA ČREVESNE KUTIKULE PRI ZGODNJIH MARZUPIJSKIH MANKAH

#### 3.3.1 Struktura anteriorne komore črevesa

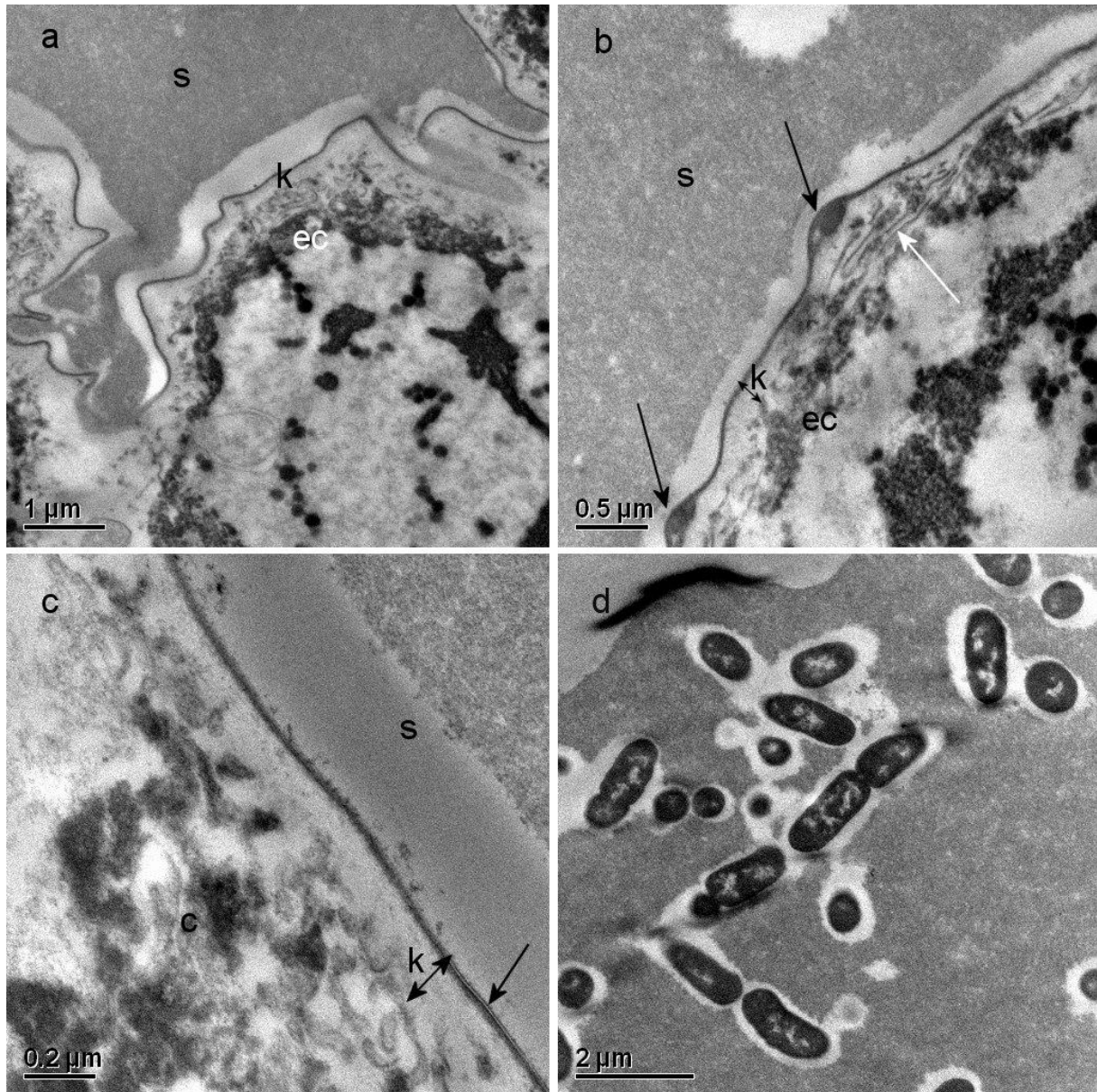
Pri zgodnjih marzupijskih mankah je oblikovanje gube tiflosolisa opazno v celotni dorzalni steni anteriorne komore, delno pa sta oblikovana tudi tiflosolna kanala (Slika 20a, 20b, 20c). Črevesni epitel gradijo celice, ki so približno izodiametrične oblike in so apikalno kupolasto izbočene. Jedra so velika in zapolnjujejo večino celice (Slika 20b, 20d). Pri enem izmed osebkov smo v vsebini črevesa opazili bakterije (Slika 20b, 20d, 21d).



Slika 20: Histološka zgradba črevesa zgodnjih marzupijskih mank v predelu anteriorne komore. **(a)** Prečni prerez manke v predelu anteriorne komore črevesa. V dorzalni steni črevesa je viden nastajajoči tiflosolis (→). **(b)** Celice črevesnega epitela so apikalno izbočene. V vsebini črevesa so opazne bakterije. (t) nastajajoči tiflosolis. **(c)** Ob tiflosolisu sta vidna tiflosolna kanala (→). **(d)** Celice epitela imajo velika jedra. V svetlini (s) so bakterije (→). Merila: **a** 100 µm; **b** 20 µm.

Na ultrastrukturnem nivoju je razvidno, da črevesni epitel v anteriorni komori apikalno prekriva kutikula, ki leži tesno ob epitelnih celicah (Slika 21a). Kutikulo gradita tanek in elektronsko gost površinski sloj ter debelejši, homogen in elektronsko svetel sloj pod njim. Kutikula je na večih mestih izbočena, izbokline pa pod površinskih slojem pogosto vsebujejo elektronsko gost material (Slika 21b). Površinski sloj je trilamelaren, kjer je med dvema

elektronsko gostima lamelama razvidna vmesna svetla lamela (Slika 21c). Pod njim je plast elektronsko gostega materiala. Debelina kutikule je med 0,1 in 0,6  $\mu\text{m}$ . Apikalna membrana epitelnih celic je močno nagubana (Slika 21b).

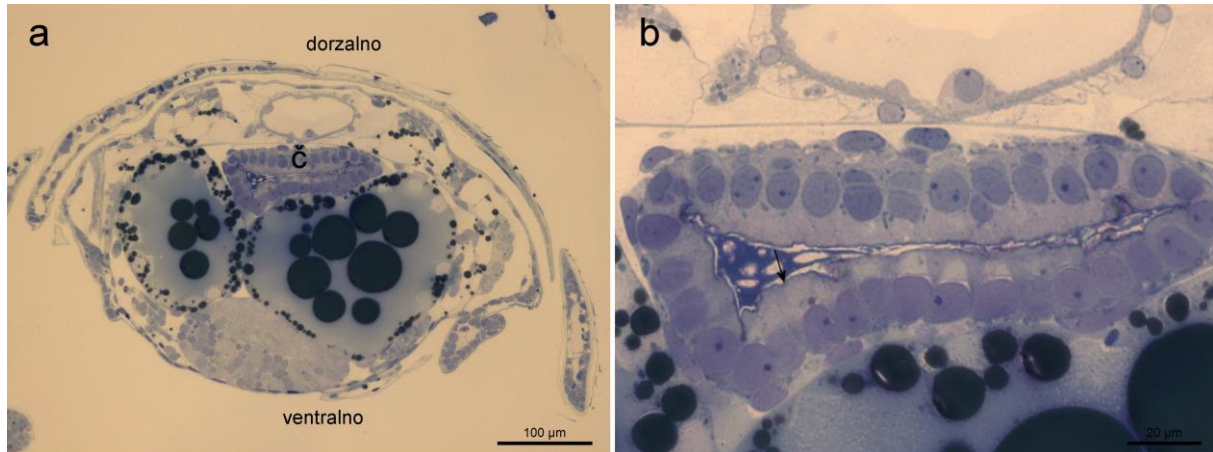


Slika 21: Ultrastruktura kutikule v anteriorni komori pri zgodnjih marzupijskih mankah. **(a)** Kutikula (k) leži tesno ob epitelu. (s) svetlina črevesa, (ec) epitelna celica. **(b)** Na kutikuli (k) so pogoste izbokline, ki pod površinskim slojem vsebujejo elektronsko gost material (črni puščici). Apikalna celična membrana epitelnih celic je močno nagubana (bela puščica). (s) svetlina črevesa, (ec) epitelna celica. **(c)** Kutikula (k) sestoji iz tankega elektronsko gostega površinskega sloja in debelejšega elektronsko svetlega notranjega sloja. Distalni del kutikule je trilamelaren ( $\rightarrow$ ). Pod njim je plast elektronsko gostega materiala. (s) svetlina črevesa, (c) citoplazma celice. **(d)** Bakterije v svetlini črevesa enega izmed osebkov.



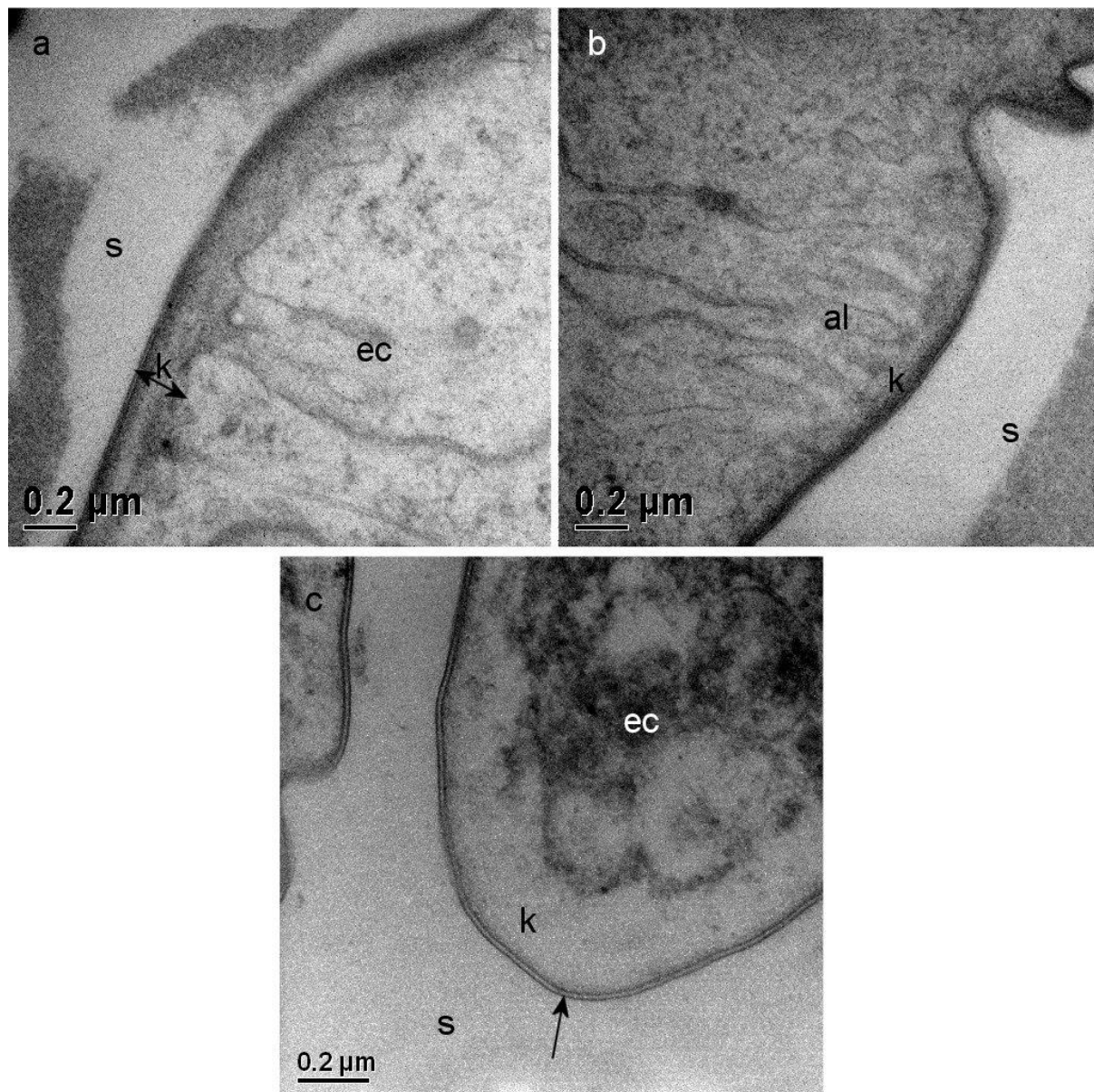
### 3.3.2 Struktura papilatne regije črevesa

V predelu papilatne regije črevesni epitel gradijo celice prizmatske oblike (Slika 22). Epitelne celice ležijo tesno ena ob drugi, njihova jedra pa so pomaknjena bazalno. Na poltankih rezinah je kutikula videti kot tanek, nekoliko temneje obarvan sloj na apikalni površini epitelnih celic (Slika 22b).



Slika 22: Histološka zgradba črevesa v predelu papilatne regije pri zgodnjih marzupijskih mankah. (a) Prečni prerez manke v predelu papilatne regije črevesa (č). Celice črevesnega epitela ležijo tesno ena ob drugi. (b) Celice so prizmatske oblike, z bazalno pomaknjnim jedrom. Na apikalni površini celic je tanka kutikula (→).  
Merila: a 100  $\mu\text{m}$ ; b 20  $\mu\text{m}$ .

Na ultrastrukturnem nivoju je razvidno, da kutikula v papilatni regiji sestoji iz tankega, elektronsko gostega zunanega sloja in debelejšega, homogenega, elektronsko svetlejšega notranjega sloja (Slika 23). Podobno kot v anteriorni komori kutikula leži tesno ob celicah črevesnega epitela (Slika 23a). Kutikula je debela med 0,1 in 0,3  $\mu\text{m}$ . Apikalna membrana epitelnih celic je močno nagubana v apikalni labirint (Slika 23b). Distalni del zunanega sloja kutikule je trilamelaren, podobno kot v anteriorni komori (Slika 23c).



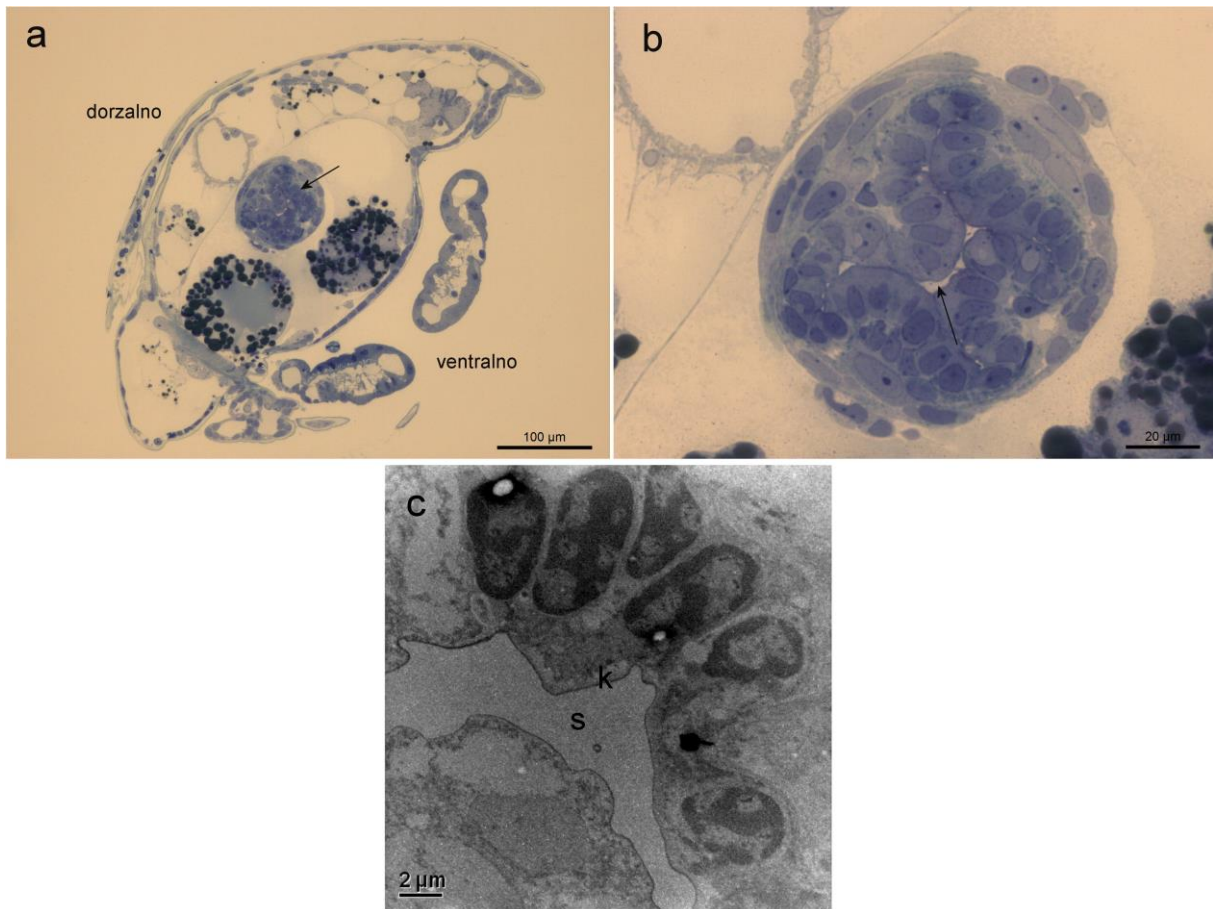
Slika 23: Ultrastruktura kutikule v papiladni regiji pri zgodnjih marzupijskih mankah. (a) Kutikula (k) leži tesno ob epitelni celici (ec). (s) svetlina črevesa. (b) Apikalna celična membrana epitelnih celic je nagubana v apikalni labirint (al). (k) kutikula, (s) svetlina črevesa. (c) Distalni del zunanjega sloja kutikule je trilamelaren (→). (s) svetlina črevesa, (k) kutikula, (ec) epitelna celica.

### 3.3.3 Struktura črevesa v predelu sfinktra

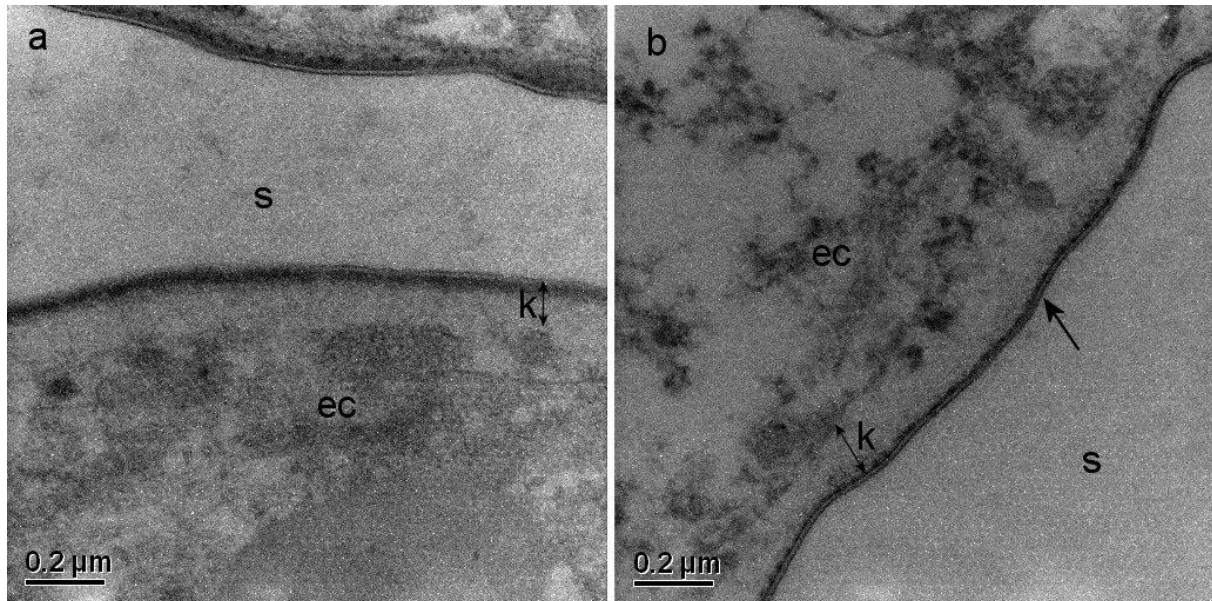
Pri zgodnjih marzupijskih mankah ima črevo v predelu sfinktra zelo ozko svetlino, ki jo obdaja močno naguban epitel (Slika 24a, 24b). Epitelne celice so prizmatske oblike. Mišični sloji okrog sfinktra črevesa niso tako izraziti kot je to značilno za pozne marzupijske manke in odrasle živali. Tanko kutikula leži tesno ob črevesnem epitelu (Slika 24c).

Na ultrastrukturnem nivoju je razvidno, da kutikulo v predelu sfinktra gradita tanek in elektronsko gost zunanji sloj ter debelejši, homogen in elektronsko svetel notranji sloj (Slika

25a). V distalnem delu zunanjskega sloja so, podobno kot v ostalih delih zadnjega črevesa, razvidne tri lamele (Slika 25b). Debelina kutikule je med 0,1 in 0,8  $\mu\text{m}$ .



Slika 24: Histološka zgradba črevesa v predelu sfinktra pri zgodnjih marzupijskih mankah. (a) Lega črevesa ( $\rightarrow$ ) v prečnem prerezu manke v predelu sfinktra. (b) Naguban epitel obdaja ozko svetlino črevesa ( $\rightarrow$ ). (c) Epitel gradijo večinoma prizmatske celice. Kutikula (k) leži tesno ob epitelu. (s) svetlina črevesa. Merila: a 100  $\mu\text{m}$ ; b 20  $\mu\text{m}$ .

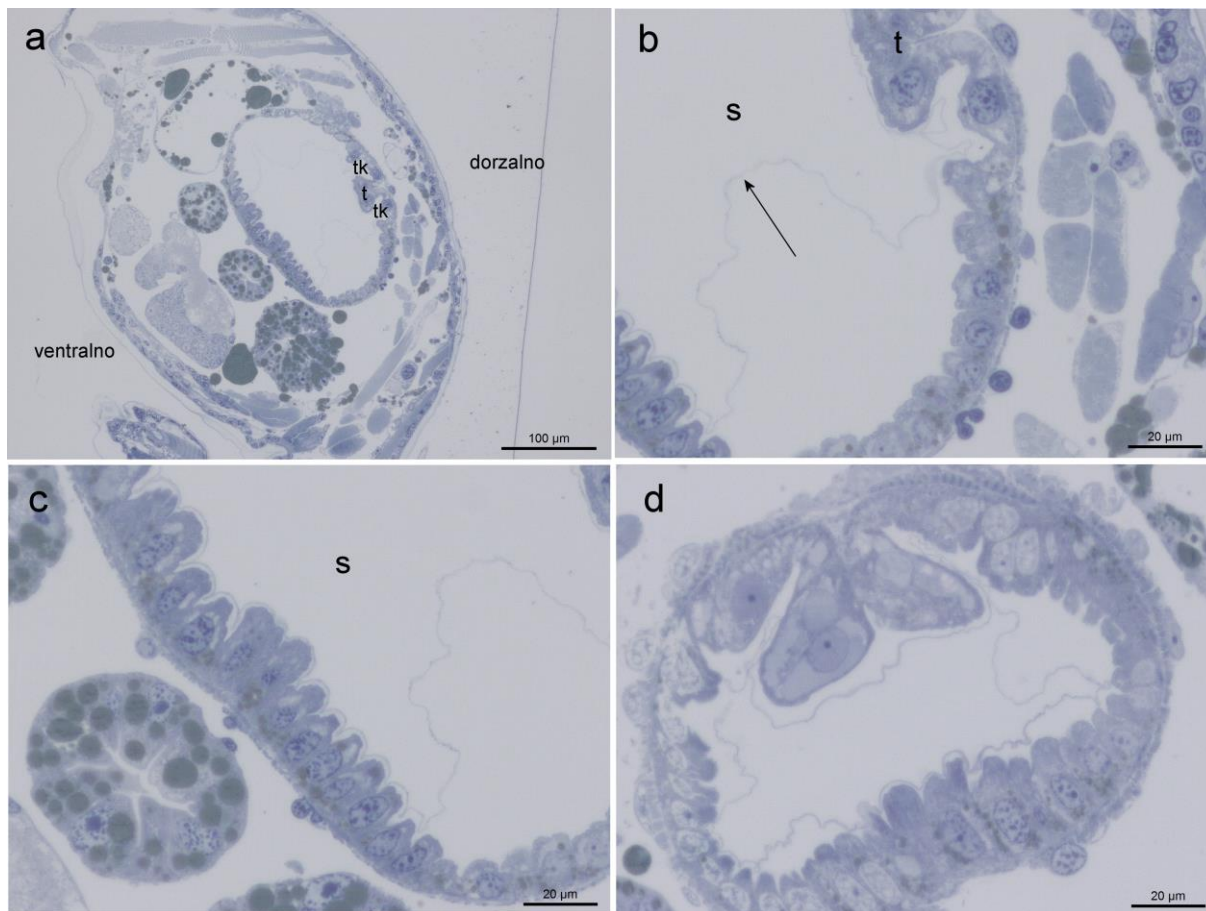


Slika 25: Ultrastruktura kutikule v predelu sfinktra pri zgodnjih marzupijskih mankah. (a) Kutikulo (k) sestavljata tanek, elektronsko gost površinski sloj in pod njim ležeči debelejši, elektronsko svetel sloj. (s) svetlina črevesa, (ec) epitelna celica. (b) Distalni del površinskega sloja kutikule je trilamelaren (→). (k) kutikula, (s) svetlina, (ec) epitelna celica.

### 3.4 HISTOLOŠKA ZGRADBA ZADNJEGA ČREVEŠA IN ULTRAŠTRUKTURA ČREVESNE KUTIKULE PRI POZNIH MARZUPIJSKIH MANKAH

#### 3.4.1 Struktura anteriorne komore črevesa

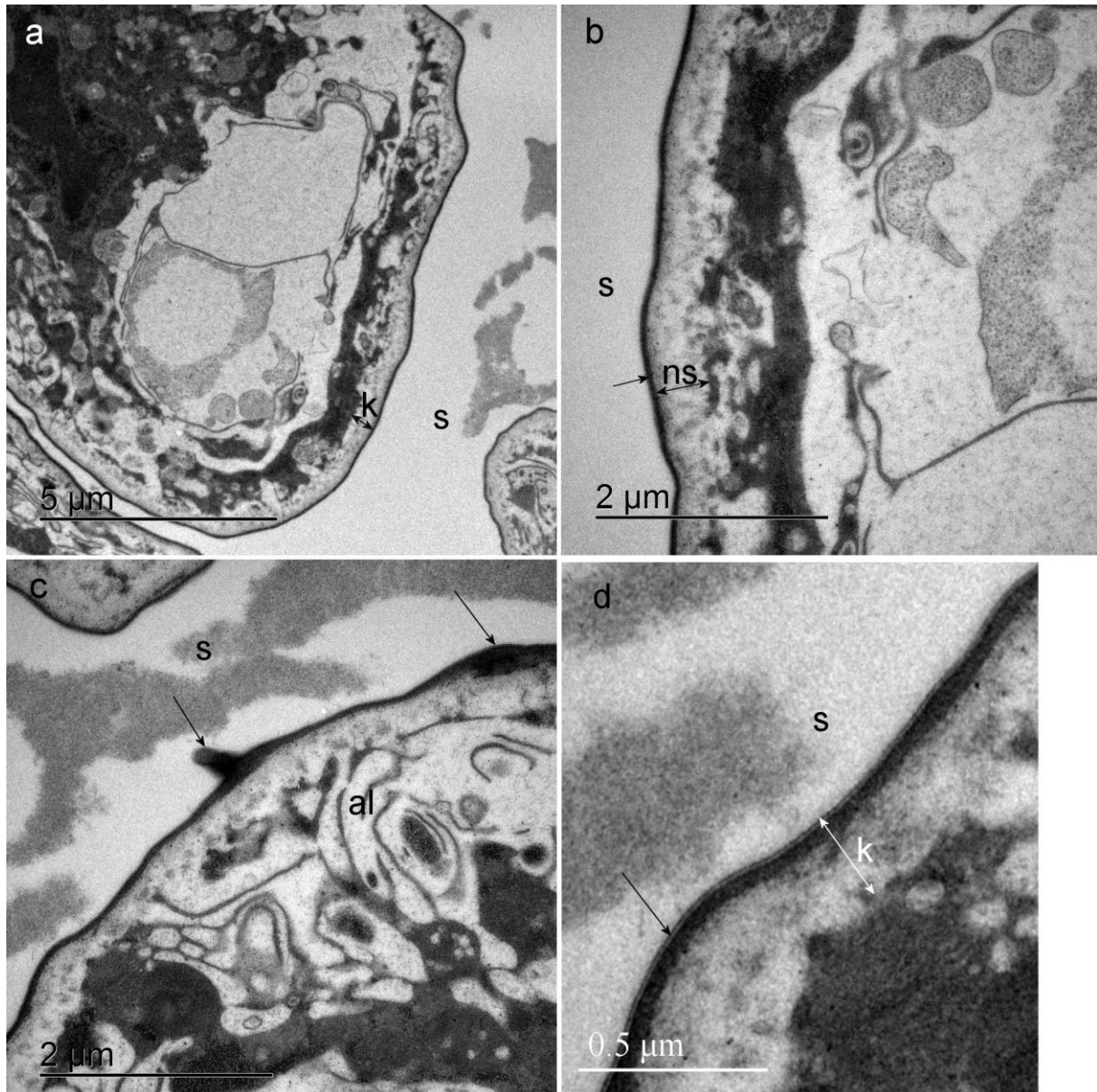
Pri poznih marzupijskih mankah so dorzalni tiflosolis in ob njem ležeča tiflosolna kanala že izoblikovani po celotni dolžini anteriorne komore (Slika 26a, 26d). Črevesni epitel gradijo celice, ki so v ventralnem delu črevesa prizmatske in izrazito apikalno izbočene v svetlino črevesa (Slika 26c), v dorzalnem delu ob tiflosolisu pa so celice bolj izodiametrične. Črevesne celice vsebujejo lipidne kapljice, več jih je v celicah ventralnega dela črevesne stene. Lipidne kapljice so predvsem v bazalni polovici celične citoplazme. Pri nekaterih osebkih so že vidni znaki obnavljanja kutikule, saj ta ponekod že precej odstopa od črevesnega epitela (Slika 26b, 26d).



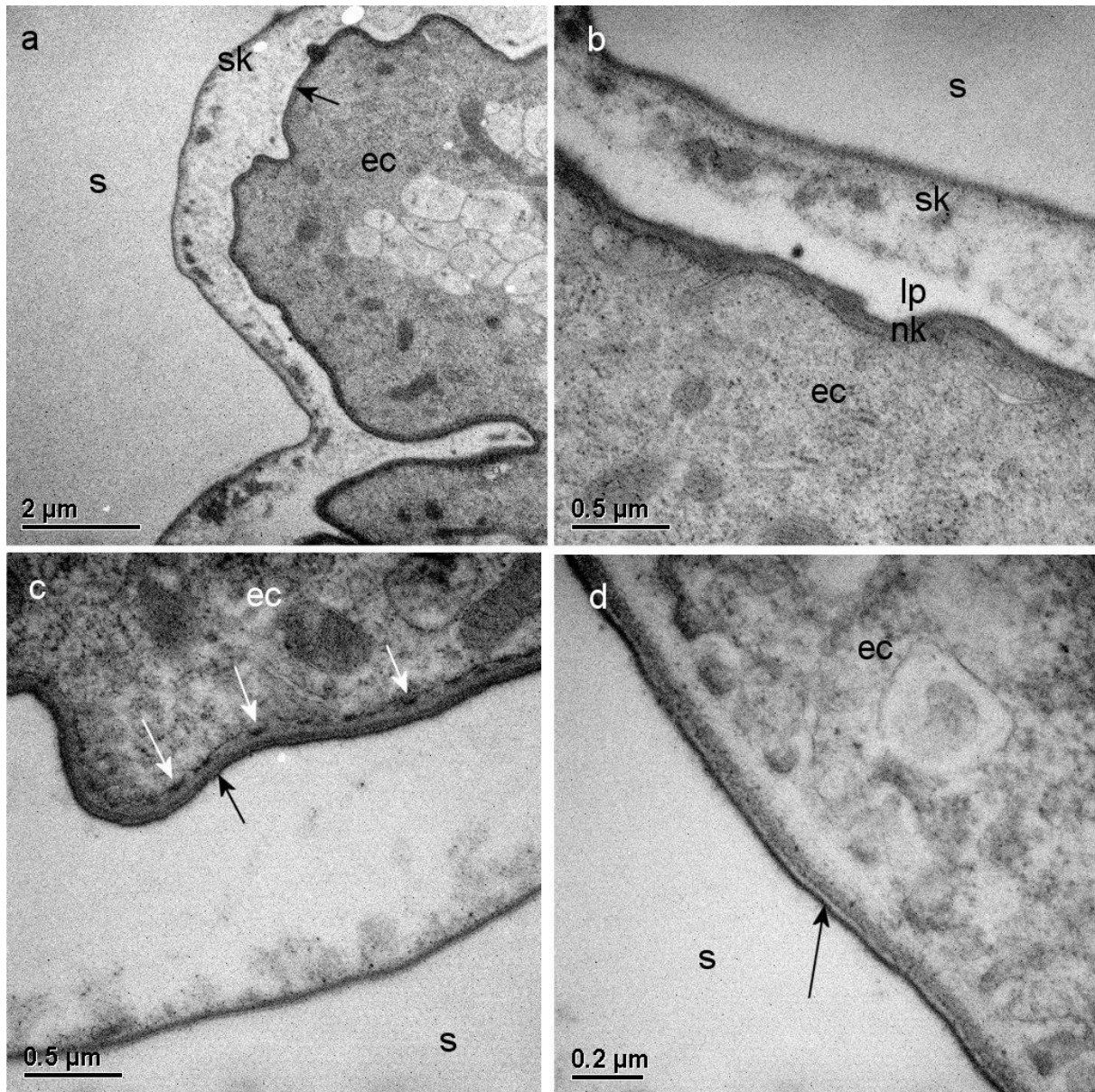
Slika 26: Histološka zgradba črevesa poznih marzupijskih mank v predelu anteriorne komore. **(a)** Prečni prerez manke v predelu anteriorne komore črevesa. V dorzalnem delu anteriorne komore so vidni tiflosolis (t) in tiflosolna kanala (tk). **(b)** Epitelne celice v dorzalni steni anteriorne komore ob tiflosolisu (t) so bolj izodiametrične oblike. Kutikula na določenih mestih odstopa od epitela (→). (s) svetlina črevesa. **(c)** Epitelne celice v ventralni steni anteriorne komore so prizmatske oblike in apikalno izbočene v svetlino črevesa (s). **(d)** Posteriorni del anteriorne komore. Merila: **a** 100 µm; **b, c, d** 20 µm.

Na ultrastrukturnem nivoju je razvidno, da kutikulo anteriorne komore sestavljata tanjši in elektronsko gost zunanji sloj ter debelejši in elektronsko svetlejši notranji sloj (Slika 27a, 27b). Zunanji sloj je trilamelaren, z dodatno plastjo elektronsko gostega materiala (Slika 27d). Na površini kutikule so ponekod kutikularni trni in izbokline, ki vsebujejo elektronsko gost material (Slika 27c). Apikalna membrana epitelnih celic je nagubana v apikalni labirint (Slika 27c). Debelina kutikule je med 0,3 in 0,5 µm.

Pri nekaterih osebkih je razvidno, da v anteriorni komori poznih marzupijskih mank pod odstopljeno staro kutikulo že nastaja nova (Slika 28a). Med njima je levitveni prostor (Slika 28b). Staro kutikulo gradi tanek, elektronsko gost sloj na površini in debelejši, elektronsko svetlejši sloj pod njim, ki vsebuje elektronsko goste skupke. Na določenih delih že poteka razgradnja proksimalnih delov stare kutikule (Slika 28c). Nova kutikula je tanka, sestavljata pa jo dva približno enako debela sloja, zunanji elektronsko gost sloj in notranji elektronsko svetel sloj. (Slika 28c, 28d). Notranji sloj je homogen in leži na apikalni celični membrani epitelnih celic. Ta je oblikovana v izbokline z elektronsko gostimi konicami, ki sodelujejo pri sintezi nove kutikule (Slika 28c). Debelina stare kutikule je med 0,3 in 0,6 µm, kjer poteka razgradnja lahko tudi manj kot 0,1 µm, debelina nove pa je med 0,1 in 0,3 µm.



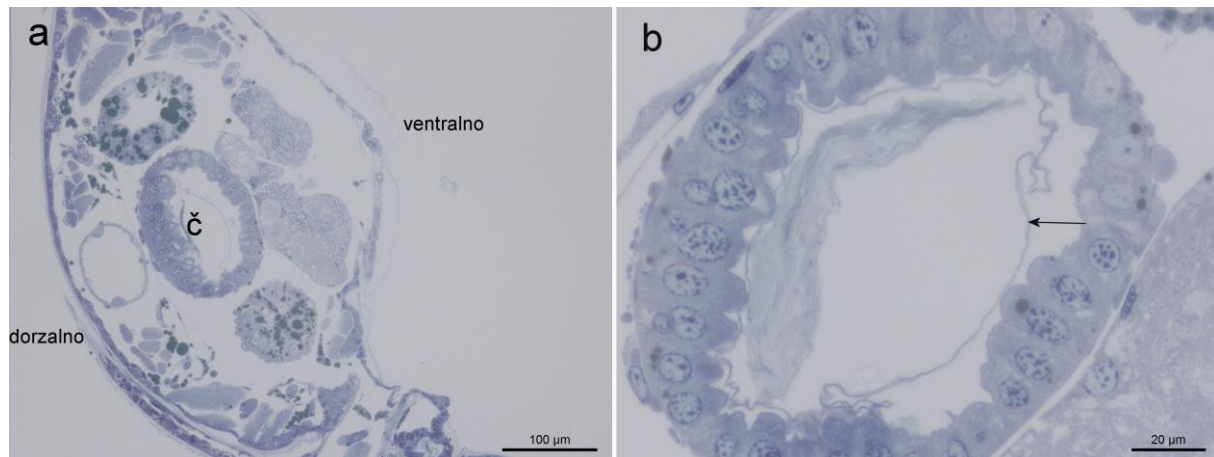
Slika 27: Ultrastruktura kutikule v predelu anteriorne komore pri poznih marzupijskih mankah. **(a)** Celice črevesnega epitela prekriva kutikula (k). (s) svetlina črevesa. **(b)** Kutikula sestoji iz zunanega tanjšega trilamelarnega sloja in sloja elektronsko gostega materiala (→) ter notranjega debelejšega elektronsko svetlega sloja (ns). (s) svetlina črevesa. **(c)** Na površini kutikule so kutikularni trni in izbokline, ki vsebujejo elektronsko gost material (→). Apikalna membrana je oblikovana v apikalni labirint (al). (s) svetlina črevesa. **(d)** Distalni del zunanega sloja kutikule (k) je trilamelaren (→). (s) svetlina črevesa.



Slika 28: Ultrastruktura kutikule v predelu anteriorne komore pri poznih marzupijskih mankah, pri katerih poteka nastajanje nove kutikule. **(a)** Pod staro kutikulo (sk), ki je odstopljena od epitela, je tanka nova kutikula (→). (s) svetlina črevesa, (ec) epitelna celica. **(b)** Med staro kutikulo (sk) in novo kutikulo (nk) je viden levitveni prostor (lp). (s) svetlina črevesa, (ec) epitelna celica. **(c)** Zunanji sloj nove kutikule je elektronsko gost (črna puščica), notranji sloj pa elektronsko svetlejši. Apikalna celična membrana epitelnih celic (ec) je oblikovana v izbokline z elektronsko gostimi konicami (bele puščice). (s) svetlina črevesa. **(d)** V novi kutikuli je ponekod pod distalno temno lamelo vidna še svetlejša lamela (→). (s) svetlina črevesa, (ec) epitelna celica.

### 3.4.2 Struktura papilatne regije črevesa

Svetlina črevesa v papilatni regiji je pri poznih marzupijskih mankah ožja kot v anteriorni komori (Slika 29a). Črevesni epitel gradijo prizmatske celice, ki so apikalno izbočene v svetlino. Celice ležijo kompaktno ena ob drugi. Njihovi bazalni deli niso kupolasto izbočeni v hemocel, kot je to značilno za odrasle živali. Podobno kot v anteriorni komori je kutikula pri nekaterih osebkih odmaknjena od črevesnega epitela (Slika 29b).

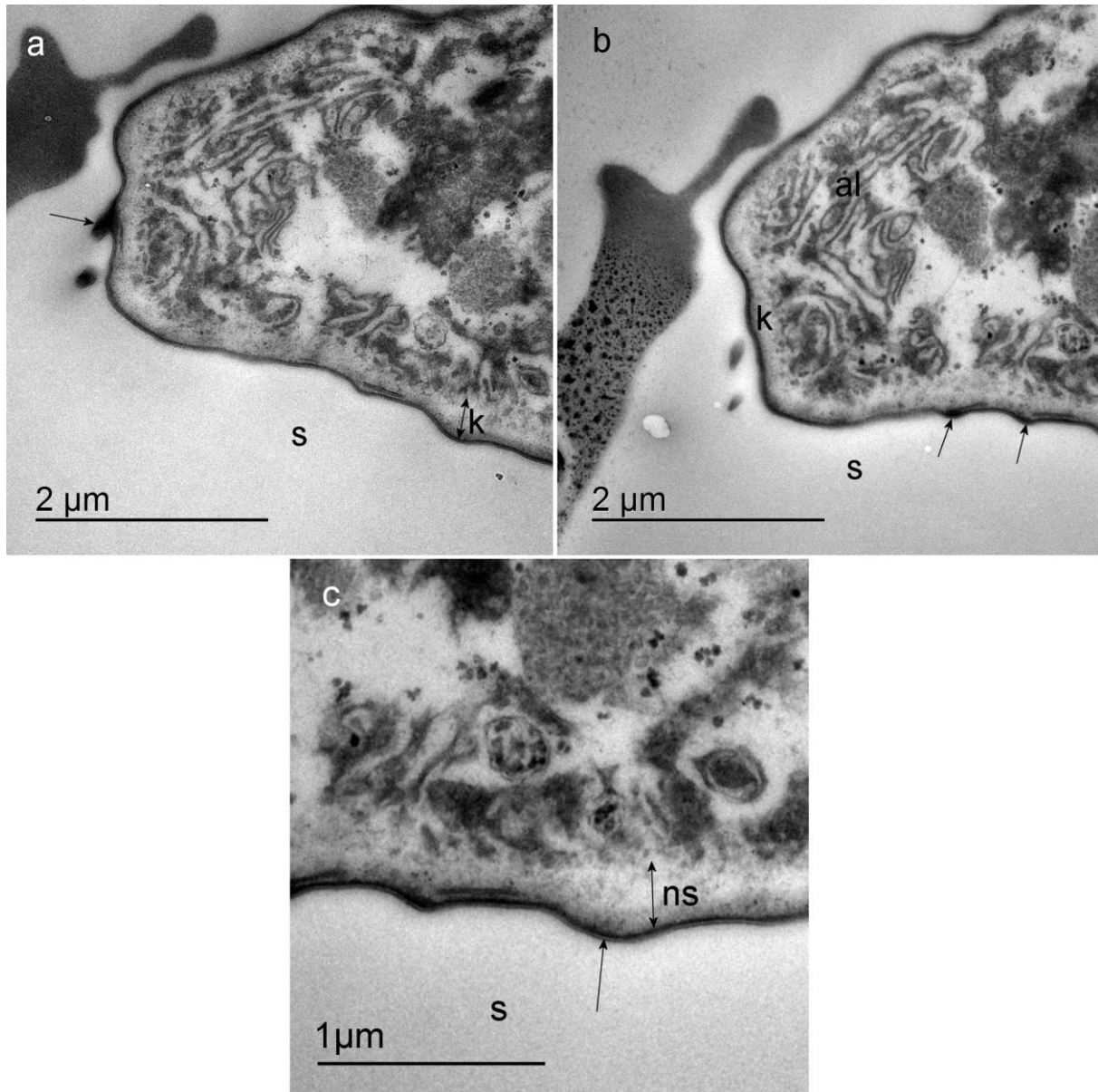


Slika 29: Histološka zgradba črevesa v predelu papilatne regije pri poznih marzupijskih mankah. **(a)** Prečni prerez manke. Črevo (č) je v papilatni regiji ožje kot v anteriorni komori. **(b)** Črevesni epitel gradijo prizmatske celice. Kutikula je odstopljena od črevesnega epitela (→). Merila: **a** 100  $\mu\text{m}$ ; **b** 20  $\mu\text{m}$ .

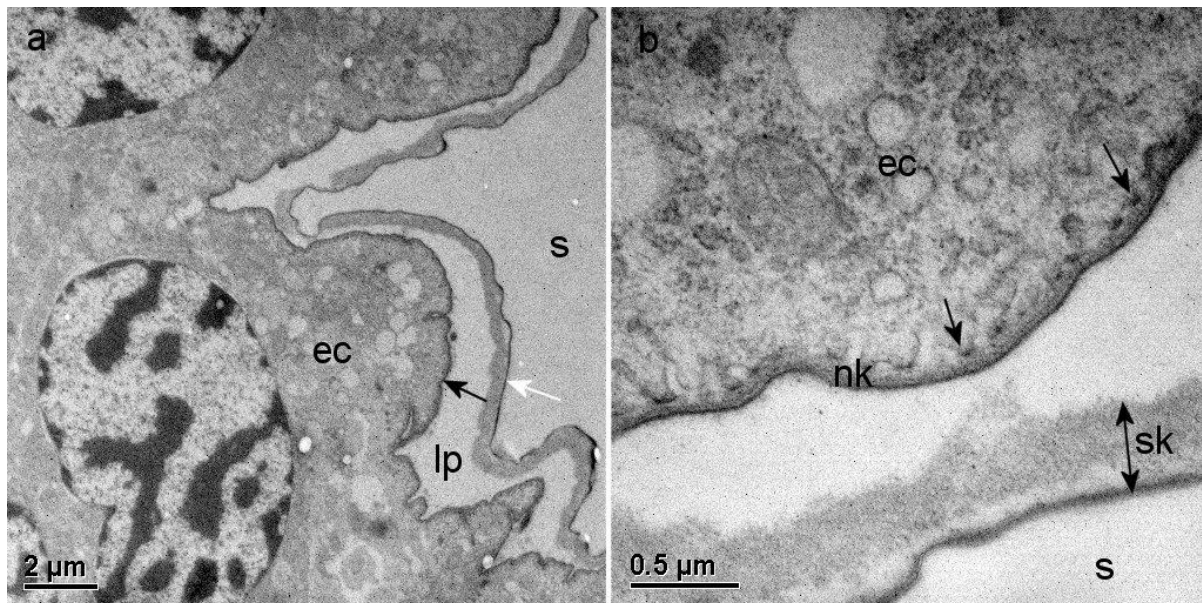
Na ultrastrukturnem nivoju vidimo, da kutikulo v papilatni regiji gradita zunanji tanjši in elektronsko gostejši sloj ter notranji debeljši in elektronsko svetlejši sloj (Slika 30). Distalni del zunanjšega sloja je trilamelaren (Slika 30c). Tako kot v anteriorni komori so tudi v papilatni regiji na površini črevesne kutikule ponekod prisotni kutikularni trni in izbokline, ki vsebujejo elektronsko gost material (Slika 30a, 30b). Apikalna membrana epitelnih celic je diferencirana v izrazit apikalni labirint (Slika 30b). Debelina kutikule je med 0,3 in 0,4  $\mu\text{m}$ .

Podobno kot v anteriorni komori, je pri nekaterih osebkih na svetlini površini epitelnih celic že prisotna tanka nova kutikula, stara kutikula pa je odmaknjena od epitela (Slika 31). Med staro in novo kutikulo je levitveni prostor (Slika 31a). Staro kutikulo gradita tanek, elektronsko gost zunanji sloj in debelejši, elektronsko svetlejši notranji sloj. Na nekaterih delih stare kutikule je že opazna razgradnja njenih proksimalnih delov. Debelina stare kutikule je med 0,3 in 0,8  $\mu\text{m}$ , kjer poteka njena razgradnja lahko tudi manj kot 0,1  $\mu\text{m}$ . Nova kutikula sestoji iz površinskega elektronsko gostega sloja ter pod njim ležečega elektronsko svetlejšega sloja (Slika 31b). Debelina nove kutikule je med 0,1 in 0,2  $\mu\text{m}$ . Apikalna celična membrana je diferencirana v izbokline z elektronsko gostimi konicami (Slika 31b).





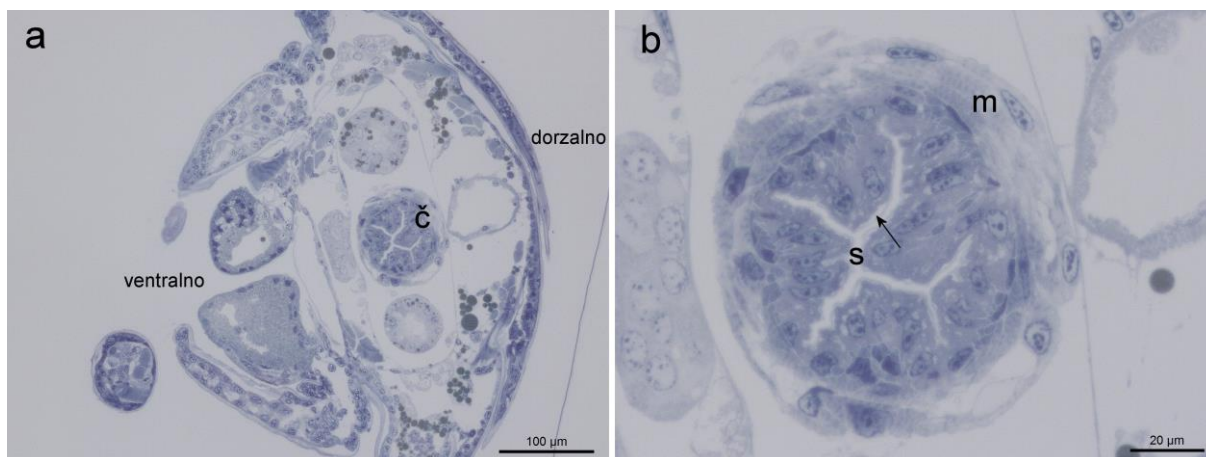
Slika 30: Ultrastruktura kutikule v predelu papilatne regije pri poznih marzupijskih mankah. **(a)** Na površini kutikule (k) so kutikularni trni (→). (s) svetlina črevesa. **(b)** Poleg trnov so na površini kutikule (k) tudi izbokline (→). Celična membrana je v apikalnih delih celic oblikovana v apikalni labirint (al). (s) svetlina črevesa. **(c)** Kutikulo sestavljata notranji sloj (ns), ki je debeljši in elektronsko svetlejši, ter zunanji sloj, ki je tanjši in elektronsko gostejši. Apikalni del zunanjega sloja je trilamelaren (→). (s) svetlina črevesa.



Slika 31: Ultrastruktura kutikule v predelu papilatne regije pri poznih marzupijskih mankah, pri katerih poteka nastajanje nove kutikule. (a) Stara kutikula (bela puščica), je odstopljena od epitela. Pod njo nastaja nova kutikula (črna puščica). Med obema je levitveni prostor (lp). (s) svetlina črevesa, (ec) epitelna celica. (b) Apikalna celična membrana epitelnih celic je diferencirana v izbokline z elektronsko gostimi konicami (→). (s) svetlina, (ec) epitelna celica, (sk) stara kutikula, (nk) nova kutikula.

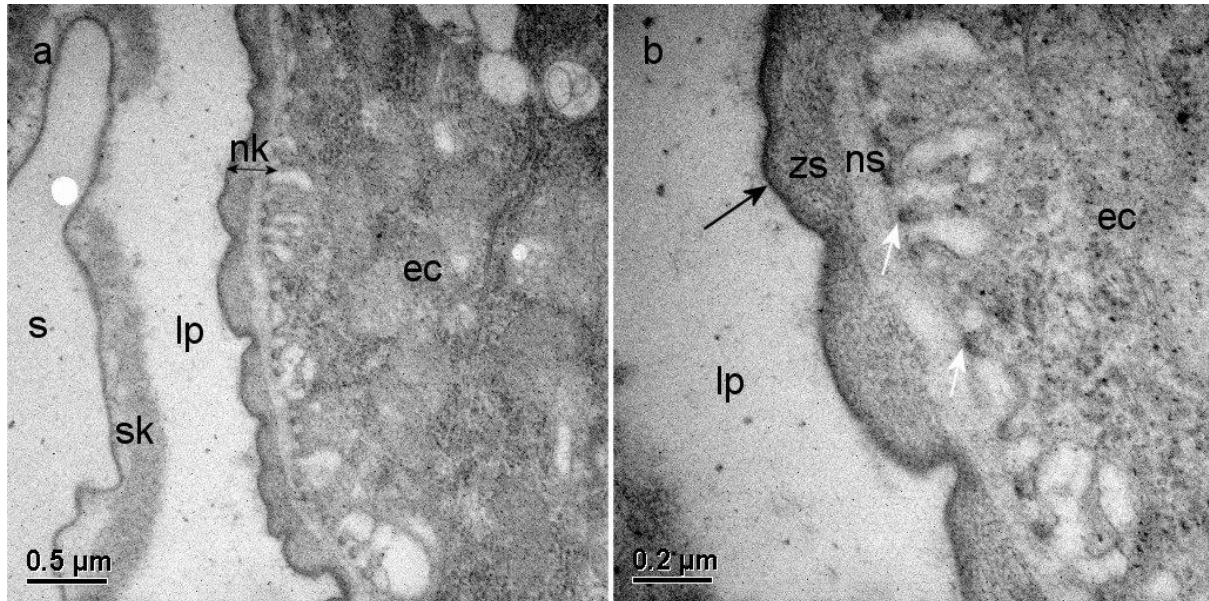
### 3.4.3 Struktura črevesa v predelu sfinktra

Zgradba črevesa v predelu sfinktra pri poznih marzupijskih mankah je podobna kot pri odraslih živalih. Črevesni epitel je naguban v gube, ki močno zožijo svetlino črevesa (Slika 32). Celice epitela so nepravilnih oblik. Črevo na zunanji strani obdajajo debeli sloji mišic. Pri nekaterih osebkih je kutikula, enako kot v ostalih predelih zadnjega črevesa, odmaknjena od epitela (Slika 32b).



Slika 32: Histološka zgradba prebavila v predelu sfinktra pri poznih marzupijskih mankah. (a) Prečni prerez manke v predelu sfinktra črevesa (č). (d) dorzalno, (v) ventralno. (b) Svetlino črevesa (s) močno zožijo gube črevesnega epitela. Na zunanji strani črevesa so prisotni debeli sloji mišic (m). Kutikula je odstopljena od epitela (→). Merila: a 100  $\mu$ m; b 20  $\mu$ m.

Na ultrastrukturnem nivoju je pri osebkih v levitvi med staro in novo kutikulo viden levitveni prostor (Slika 33). Stara kutikula je v proksimalnem delu deloma razgrajena in sestoji iz tankega in elektronsko gostega zunanega sloja ter debelejšega in elektronsko svetlejšega notranjega sloja (Slika 33a). Novo kutikulo gradita dva sloja. Zunanji sloj je elektronsko gostejši in na različnih mestih različno debel, sestavljen iz distalne tanke, temnejše in nagubane lamine ter elektronsko goste plasti pod njo. Notranji, elektronsko svetel sloj, je enakomerne debeline. Apikalna celična membrana je diferencirana v izrastke z elektronsko gostimi konicami (Slika 33b). Debelina stare kutikule je med 0,3 in 0,9  $\mu\text{m}$ , ponekod na mestih razgradnje lahko tudi manj od 0,1  $\mu\text{m}$ . Nova kutikule je debela med 0,1 in 0,4  $\mu\text{m}$ .



Slika 33: Ultrastruktura kutikule v predelu sfinktra pri poznih marzupijskih mankah. (a) Med staro kutikulo (sk) in novo kutikulo (nk) je levitveni prostor (lp). (s) svetlina, (ec) epitelna celica. (b) Nova kutikula je zgrajena iz nagubanega zunanega sloja (zs) z distalno tanko in elektronsko gosto lamino (črna puščica) in iz notranjega elektronsko svetlega sloja (ns). (lp) levitveni prostor, (ec) epitelna celica.

## 4 RAZPRAVA

V nalogi smo opisali histološko zgradbo zadnjega črevesa in tvorbo črevesne kutikule med embrionalnim razvojem in larvalnim razvojem v marzupiju pri raku enakonožcu *Porcellio scaber*, ki do sedaj nista bili raziskani. Znanje o sintezi kutikule izvira pretežno iz raziskav eksoskeletne kutikule pri žuželkah, predvsem pri vinski mušici (Moussian in sod., 2006; Moussian, 2010).

### 4.1 HISTOLOŠKA ZGRADBA ZADNJEGA ČREVESA

Na nivoju histološke zgradbe je razvidno, da so pri odraslih živalih v predelu anteriorne komore v dorzalni steni črevesa prisotni izrazit tiflosolis in tiflosolna kanala, apikalni deli epitelnih celic pa so kupolasto izbočeni v svetlino črevesa. V bazalnih in apikalnih delih celic je celična membrana oblikovana v bazalni in apikalni labirint. V papilatni regiji so apikalni deli celic sploščeni, bazalni deli pa kupolasto izbočeni v hemocel. V bazalnih delih epitelnih celic je izoblikovan zelo naguban bazalni labirint. To skupaj z drugimi značilnostmi teh celic, kot je izrazit apikalni labirint in prisotnost mitohondrijev ob invaginacijah celične membrane,

kaže na funkcijo, ki jo ima papilatna regija pri transportu ionov in reabsorpciji vode (Hames in Hopkin, 1989). V predelu sfinktra je epitel močno naguban, črevo pa obdajajo debeli sloji mišic.

Tiflosolis pri poznih embrijih v fazi S16 še ni izoblikovan. V kratkem predelu anteriornega dela zadnjega črevesa je prisoten le neizrazit greben celic, ki predstavlja zasnovo za tiflosolis. V fazi S18 je greben celic razvit v daljšem predelu anteriornega dela zadnjega črevesa. Greben tiflosolisa je v smeri proti bodoči papilatni regiji bolj izrazit, kot v anteriorni smeri. V fazi S19 še vedno poteka diferenciacija črevesa v anteriorno komoro in papilatno regijo. Tiflosolis v anteriornem delu zadnjega črevesa je viden kot dva ozka grebena celic, ki segata v svetlino črevesa. Tiflosolis smo opazili samo v predelu bližje bodoči papilatni regiji. Naši rezultati dopolnjujejo ugotovitve predhodnih raziskav, da se pri poznih embrijih že prične oblikovanje tiflosolisa, ni pa še jasno razvidna razdelitev na anteriorno komoro in papilatno regijo (Štrus in sod., 2008). Pokazali smo, da diferenciacija tiflosolisa poteka v posteriorno – anteriorni smeri. Na takšen razvoj tiflosolisa lahko sklepamo tudi iz uvihavanja proktodeuma, ki se prične v posteriornem delu embrija in se nato podaljšuje proti anteriornemu delu, dokler se ne poveže s stomodeumom v enotno prebavno cev (Milatovič in sod., 2010)

Pri zgodnjih marzupijskih mankah je oblikovanje gube tiflosolisa vidno vzdolž celotne anteriorne komore, ob njej sta že tudi delno oblikovana tiflosolna kanala. Epitelne celice v anteriorni komori so izodiametrične s kupolasto izbočenimi apikalnimi deli celic. Črevesni epitel v papilatni regiji gradijo celice prizmatske oblike, ki imajo jedra pomaknjena bazalno. Epitelne celice v predelu sfinktra so tudi prizmatske, prebavno cev pa obdajajo sloji mišic, ki so nekoliko manj izraziti kot pri odraslih živalih in poznih marzupijskih mankah. Tiflosolis in tiflosolna kanala poznih marzupijskih mank so že izoblikovani vzdolž celotne dolžine anteriorne komore, kar se sklada z ugotovitvami predhodnih raziskav, da je pri poznih marzupijskih mankah zadnje črevo že diferencirano v anteriorno komoro in papilatno regijo (Štrus in sod., 2008; Milatovič in sod., 2010). Celice črevesnega epitela v anteriorni komori so v ventralnem delu črevesa prizmatske oblike in apikalno izbočene v svetlino, v dorzalnem delu črevesa pa so bolj izodiametrične. Celice črevesnega epitela v papilatni regiji so prizmatske oblike in apikalno izbočene v svetlino, v predelu sfinktra pa so različnih oblik. Črevesne epitelne celice v papilatni regiji, tako še nimajo značilne oblike, z bazalnimi deli izbočenimi v hemocel, kot je prisotna pri odraslih živalih.

#### 4.2 ULTRAŠTRUKTURA IN DIFERENCIACIJA ČREVESNE KUTIKULE

Na ultrastrukturnem nivoju sta v kutikuli zadnjega črevesa odraslih živali vidna dva osnovna sloja: zunanji, elektronsko gostejši sloj - epikutikula, in notranji, elektronsko prosojnejši sloj - prokutikula. V literaturi je zunanji sloj imenovan epikutikula, notranji sloj pa endokutikula (Palackal in sod., 1984). Distalni del epikutikule je dvo do trislojen, proksimalni del pa bolj homogen in elektronsko gost. V anteriorni komori je prokutikula nekajkrat debelejša od epikutikule in v njej so vidne lamele hitinsko-proteinskih vlaken. V papilatni regiji in predelu sfinktra je epikutikula približno trikrat debelejša v primerjavi z epikutikulo v anteriorni komori. Poleg tega sta epikutikula in prokutikula približno enake debeline – predstavljata vsaka približno polovico celotne kutikule. Prokutikula je fibrilarne strukture in brez vidnih lamel hitinsko-proteinskih vlaken. Apikalna celična membrana je tako v predelu anteriorne komore, kot papilatne regije in sfinktra za njo, oblikovana v izrazit apikalni labirint. Črevesna kutikula rakov enakonožcev je skupaj s črevesnim epitelom vključena v transportno funkcijo.

Skozi njo poteka transport vode in sestavin prebavljene hrane (Hryniewiecka-Szyfter in Storch, 1986; Hames in Hopkin, 1989). Zaradi tega verjetno obstajajo določene podobnosti z drugimi kutikulami členonožcev, ki so ravno tako vključene v transportno funkcijo. Eden izmed takih primerov je kutikula v trahejah žuželk skozi katero poteka transport dihalnih plinov. V tem primeru, podobno kot v primeru črevesne kutikule v papilatni regiji vrste *Porcellio scaber*, hitinsko-proteinska vlakna v prokutikuli ne tvorijo značilnih lamel urejenih v helikoidalnem vzorcu, ampak je hitin amorfnega izgleda. Znotraj kutikule so razvidni trije sloji: zunanji ovoj, tanka epikutikula in prokutikula (Moussian, 2013). Drug primer kutikule vključene v transportno funkcijo je kutikula škrj pri raku enakonožcu vrste *Jaera nordmanni*. V tem primeru sta škržni epitel in kutikula vključena v izmenjavo dihalnih plinov in osmoregulacijo. Distalni del kutikule je troslojen, sestavljajo ga zunanji elektronsko gost sloj epikutikule, notranji elektronsko gost sloj in vmesni elektronsko svetel sloj. Pod distalnim troslojnim delom se nahaja še sloj amorfnega izgleda, ki verjetno predstavlja endokutikulo (Bubel in Jones, 1974).

Pri poznih embrijih v fazah S16 in S18 epitelne celice zadnjega črevesa prekriva homogen zunajcelični matriks, podoben zunajceličnemu matriksu, ki prekriva epidermalne celice (Mrak in sod., 2012). Matriks je morfološko podoben zunajceličnemu matriksu, ki je med embrionalnim razvojem prisoten tudi pri drugih členonožcih pred razvojem kutikule (Moussian in sod., 2006). Površina tega matriksa je izrazito nagubana, sestoji pa iz homogenega debelega elektronsko svetlega sloja in distalnega elektronsko gostega sloja, ki je iz dveh elektronsko gostih lamel in vmesne elektronsko svetle lamele. V fazi S18 je poleg tega viden novo nastajajoči matriks kot tanek elektronsko gost sloj tik nad apikalno plazmalemo. Večinoma je to kontinuiran sloj, na določenih mestih pa je prekinjen. Apikalna celična membrana črevesnih epitelnih celic je diferencirana v izrastke z elektronsko gostimi konicami, kar kaže na proces sekrecije sestavin kutikule.

Pri poznem embriju tik pred izvalitvijo iz vitelinske membrane (S19) je apikalni matriks sestavljen iz trilamelarnega distalnega sloja, elektronsko goste plasti pod njim in notranjega debelejšega elektronsko svetlega sloja. Debelejši trilamelarni sloj in elektronsko gost material pod njim sta značilnosti, ki nakazujeta podobnost tega črevesnega matriksa s kutikulo. Za razliko od ultrastrukture kutikule eksoskeleta, ki je v tej razvojni fazi že podobna kutikuli odraslih živali (Mrak in sod., 2012), ultrastruktura črevesne kutikule še ni podobna diferencirani črevesni kutikuli pri odraslih osebkih. Poleg tega je črevesna kutikula tudi bistveno tanjša od kutikule eksoskeleta. Debelina črevesne kutikule v anteriornem delu zadnjega črevesa je med 0,1 in 1,5  $\mu\text{m}$ . Debelina kutikule eksoskeleta je med 2 in 3  $\mu\text{m}$  (Mrak in sod., 2012). Apikalna celična membrana črevesnih epitelnih celic je tako v anteriornem kot posteriornem delu zadnjega črevesa nagubana v apikalni labirint.

Pri zgodnjih mazupijskih mankah je ultrastruktura kutikule v anteriorni komori, papilatni regiji ter predelu sfinktra in rektuma podobna. Kutikulo sestavljata tanek elektronsko gost zunanji sloj in debelejši homogen ter elektronsko svetel sloj pod njim. Distalni del zunanjega sloja je podobno kot pri embrijih v fazi S19 trilamelaren. Kutikula leži tesno ob epitelu. Znaki obnavljanja kutikule niso prisotni. Pri epidermalnih celicah teh manjk je apikalna membrana diferencirana v izrastke z elektronsko gostimi konicami, ki so vključeni v nalaganje kutikule (Mrak in sod., 2012). Debelina črevesne kutikule je med 0,1 in 0,8  $\mu\text{m}$ , najtanjša je v papilatni regiji, najdebelejša pa v predelu sfinktra in rektuma, debelina kutikule eksoskeleta pa je v tej fazi razvoja do 3  $\mu\text{m}$  (Mrak in sod., 2012). V primerjavi s črevesno kutikulo odraslih živali, je

črevesna kutikula zgodnjih marzupijskih mank bistveno tanjša. Izrazito tanjša je predvsem epikutikula, ki vsebuje manj elektronsko gostega materiala, kot epikutikula odraslih. Poleg tega v anteriorni komori ni vidnih podslojev v prokutikuli, ki so pri odraslih jasno vidni. Pri odraslih je razmerje med debelinama epikutikule in prokutikule v anteriorni komori in papilatni regiji različno. V anteriorni komori je to razmerje približno 1:5, v papilatni regiji pa 1:1. Pri marzupijskih mankah je debelina obeh kutikularnih slojev tako v anteriorni komori kot v papilatni regiji enaka. Apikalna celična membrana epitelnih celic je nagubana in vsaj v papilatni regiji oblikovana v apikalni labirint, ki pa je bistveno manj izrazit kot pri odraslih živalih. Pri srednjih marzupijskih mankah je stanje podobno. Kutikulo gradita zunanji tanek elektronsko gost sloj s trilamelarno strukturo v distalnem delu in debelejši elektronsko svetel notranji sloj. Apikalna membrana črevesnih epitelnih celic pa je oblikovana v apikalni labirint. Pri eni izmed zgodnjih marzupijskih mank smo v lumnu črevesa opazili bakterije. Kolonizacija zadnjega črevesa z bakterijami, med katerimi so tudi potencialni simbioti, je opisana za odrasle osebkke (Kostanjšek in sod., 2002). Pri embrijih in marzupijskih mankah pa je kolonizacija prebavnega sistema z mikroorganizmi še slabo raziskana. Podatki obstajajo za kolonizacijo hepatopankreasa, v katerem se simbiotske bakterije pojavijo šele en teden po sprostitvi mank iz marzupija (Wang in sod., 2007).

Pri nekaterih poznih marzupijskih mankah so že vidni morfološki znaki levitve črevesne kutikule. Vendar ti niso prisotni pri vseh osebkih, tako da verjetno do pričetka levitve črevesne kutikule pride ob koncu faze pozne marzupijske manke. Pri večini osebkov je črevesna kutikula v splošnem podobna kot v fazi zgodnje marzupijske manke. Torej jo sestavljata zunanja elektronsko gosta epikutikula in notranja elektronsko svetla prokutikula, ki je debelejša. Distalni del epikutikule je prav tako trilamelaren, elektronsko gosta plast pod njim pa je pri poznih mankah debelejša kot pri zgodnjih mankah, a še vedno znatno tanjša kot pri odraslih osebkih. Za razliko od zgodnjih mank, so pri poznih mankah ponekod že diferencirani kutikularni trni. Tudi pri poznih marzupijskih mankah v predelu anteriorne komore še niso vidni podsloji v prokutikuli, kot je značilno za odrasle osebkke. Apikalna membrana črevesnih epitelnih celic je oblikovana v apikalni labirint, ki je bolj intenzivno diferenciran kot pri zgodnjih mankah in manj kot pri odraslih. Pri mankah pri katerih črevesna kutikula odstopa od epitela, se pod njo že sintetizira nova. Apikalna membrana črevesnih epitelnih celic je pri teh mankah diferencirana v izbokline z elektronsko gostimi konicami, ki so vključeni v nalaganje nove kutikule. Staro kutikulo gradita zunanji tanek in elektronsko gost sloj ter notranji debelejši in elektronsko svetel sloj. V predelu anteriorne komore notranji svetlejši sloj vsebuje elektronsko goste skupke. Poteka tudi razgradnja proksimalnih delov stare kutikule. Nova kutikula je tanka in jo ravno tako gradita dva sloja: zunanji elektronsko gost in notranji elektronsko svetlejši sloj. V anteriorni komori sta oba sloja približno enake debeline. V distalnem delu zunanjega sloja je vidna temna lamela in na nekaterih mestih pod njo še svetla. V papilatni regiji je zgradba nove kutikule podobna, v predelu sfinktra za papilatno regijo pa je zunanji elektronsko gost sloj na različnih mestih različno debel, notranji elektronsko svetel sloj pa je enakomerne debeline. Debelina črevesne kutikule je tudi pri poznih mankah bistveno tanjša od kutikule eksoskeleta. Pri mankah katerih kutikula še ne odstopa od črevesnega epitela je debelina le te med 0,3 in 0,5  $\mu\text{m}$ . Pri osebkih z znaki levitve črevesne kutikule pa je debelina stare kutikule med 0,3 in 0,9  $\mu\text{m}$ , debelina nove pa med 0,1 in 0,4  $\mu\text{m}$ . Obe sta v predelu sfinktra nekoliko debelejši kot v anteriorni komori in papilatni regiji. Debelina eksoskeletne kutikule je do 3  $\mu\text{m}$  (Mrak in sod., 2012).

## 5 SKLEPI

Glede na dobljene rezultate lahko prvi dve delovni hipotezi potrdimo. V zgodnejših fazah tvorbe črevesnega apikalnega matriksa (pri poznih embrijih S16 in S18) je namreč na površini epitelnih celic prisoten homogen zunajcelični matriks, ki je strukturno podoben zgodnjemu zunajceličnemu matriksu epidermalnih celic. Pri marzupijskih ličinkah pa se črevesna kutikula in kutikula eksoskeleta strukturno že precej razlikujeta.

Potrebno je zavrnilo tretjo delovno hipotezo, saj smo opazili, da črevesna kutikula poznih marzupijskih ličink še ni podobna črevesni kutikuli odraslih živali, medtem ko je eksoskeletna kutikula strukturno že zelo podobna eksoskeletu odraslih. V anteriorni komori, v sloju prokutikule, ni razvidnih podslojev hitinsko-proteinskih vlaken, kot je to značilno za odrasle živali. V papilatni regiji pa še ni razvit debel elektronsko gost proksimalni sloj epikutikule.

Potrdimo pa lahko četrto in peto delovno hipotezo. Opazili smo, da se med nalaganjem nove kutikule apikalna celična membrana črevesnih epitelnih celic diferencira v izrastke z elektronsko gostimi konicami, kot je značilno tudi za epidermalne celice. V fazi pozne marzupijske manke pa so prisotni tudi morfološki znaki levitve črevesne kutikule. Vidna je apoliza, razgradnja proksimalnih delov stare črevesne kutikule in nalaganje nove kutikule tik nad apikalno plazmalemo črevesnih celic. V tej isti razvojni fazi ličink je bilo opisano tudi obnavljanje eksoskeletne kutikule.

Poleg tega smo pri delu pridobili podatke o vsebinah, ki jih predhodno nismo predvideli v hipotezah in načrtovanju dela. Pomembna ugotovitev je, da diferenciacija tiflosolisa poteka v posteriorno-anteriorni smeri. Že pri embrijih v fazi S16 je zasnova za tiflosolis vidna kot neizrazit greben celic, ki se pri zgodnjih marzupijskih ličinkah razvije v tiflosolis vzdolž celotne anteriorne komore in pri poznih marzupijskih ličinkah že oblikuje tudi tiflosolna kanala. Z dodatnim delom bi bilo smiselno pridobiti podatke o morebitnem posteriorno-anteriornem gradientu diferenciacije črevesa tudi v zvezi z drugimi strukturnimi značilnostmi. Zanimivo opažanje te naloge je tudi prisotnost bakterij v črevesni vsebini pri zgodnjih marzupijskih ličinkah.

## 6 POVZETEK

Embrionalni razvoj in delno larvalni razvoj vrste *Porcellio scaber* podobno kot pri drugih perakaridnih rakih poteka v marzupiju na ventralni strani telesa samice, ki je napolnjen z marzupijsko tekočino. Pri vrsti *P. scaber* in drugih kopenskih rakih enakonožcih ima marzupij vlogo mikro-akvarija in predstavlja eno izmed prilagoditev na kopenski način življenja. Razvoj v marzupiju poteka do sprostitve ličinke manke iz marzupija samice. V grobem lahko razvoj razdelimo na štiri razvojne stadije: zgodnji embrij, srednji embrij, pozni embrij in ličinka manka. Na osnovi morfoloških značilnosti pa je razvoj natančneje razdeljen na 20 stadijev. Jajčne celice obdajata dve ovojnici: zunanji horion in notranja vitelinska membrana. Za zgodnje embrije je značilno, da pri njih še ni vidnih zasnov za okončine. V tej fazi poteče brazdanje, izoblikovanje zarodnega diska, gastrulacija ter nastanek in podaljševanje zarodnega pasu. Faza srednjega embrija se prične s pojavom nastanka zasnov za okončine. V tej fazi se pojavita invaginaciji stomodeuma in proktodeuma, ki se nato podaljšujeta, združita in tvorita enotno prebavno cev. Formirajo se še dorzalni organ in zasnove hepatopankreasa,

embrij pa se dorzalno ukrivi. Faza srednjega embrija se zaključi z izleganjem iz horiona in dorzoventralno rotacijo znotraj vitelinske membrane. Faza poznega embrija se prične z dorzoventralno rotacijo, pri tem se prekine povezava z dorzalnim organom, embrij pa postane ventralno ukrivljen. V tej fazi je ponekod že viden odstop eksoskeletne kutikule od epidermisa, diferencirajo se kutikularne strukture eksoskeleta ter kutikularni filtri in strukture želodca. Vzpostavi se tudi povezava hepatopankreasa z želodcem, zadnje črevo pa se razdeli v anteriorno komoro in papilatno regijo. Faza poznega embrija se zaključi z izleganjem iz vitelinske membrane. Telesna zgradba marzupijskih mank je podobna odraslim živalim, njihova značilnost pa je manjkajoč sedmi par pereopodov. V anteriorni komori zadnjega črevesa je že izoblikovan tiflosolis, nekatere manke pa se v marzupiju že prvič levijo. Za pozne marzupijske manke je značilno, da se že intenzivno premikajo.

Prebavni sistem rakov enakonožcev sestavljajo sprednje in zadnje črevo ter prebavne žleze ali hepatopankreas. Sprednje in zadnje črevo sta ektodermalnega izvora, njuna svetlinska površina pa je v celoti prekrita s hitinsko kutikulo, ki jo živali enako kot kutikulo eksoskeleta levijo. Edini endodermalni del prebavila predstavlja hepatopankreas in celice na stiku želodca in hepatopankreasa. Sprednje črevo razdelimo na požiralnik in želodec. Požiralnik povezuje obustni aparat z želodcem, prekriva pa ga debela večslojna kutikula. V želodcu poteka drobljenje in filtriranje hrane, zato so v njem razvite kutikularne strukture za drobljenje hrane in kutikularni filtri. Zadnje črevo sestavljajo anteriorna komora, papilatna regija in rektum, ki je od papilatne regije ločen s sfinktom. V zadnje črevo vstopa hrana iz želodca in se na prehodu v anteriorno komoro pomeša s prebavnimi encimi iz hepatopankreasa. Glavna morfološka značilnost anteriorne komore je dorzalni tiflosolis, ki vzdolž dorzalne stene oblikuje dva tiflosolna kanala, ki omogočata vračanje sestavin prebavljene hrane v anteriorni del. V anteriorni komori poteka prebava hrane in delno njena absorpcija. V papilatni regiji v glavnem poteka transport ionov in reabsorpcija vode. Rektum od papilatne regije ločuje sfinkter, ki ga obdaja debel sloj krožnih mišic. Glavna funkcija rektuma naj bi bila stiskanje ostankov hrane, s čimer se iz iztrebkov učinkoviteje iztisne voda. Zadnje črevo prekriva kutikula, ki jo sestavljata epikutikula in prokutikula. V predelu rektuma sta oba sloja približno enake debeline, v ostalih predelih pa je epikutikula bistveno tanjša od prokutikule. Površino kutikule prekrivajo posteriorno usmerjeni kutikularni trni. V zgodnejših razvojnih fazah je sprednje črevo že razdeljeno na požiralnik in želodec, tkiva zadnjega črevesa pa so še slabo diferencirana. V fazi poznega embrija se v želodcu razvijejo kutikularni filtri in strukture za drobljenje hrane, v zadnjem črevesu pa se v predelu anteriorne komore pojavi tiflosolis. Pri ličinkah mankah je zadnje črevo jasno difencirano v anteriorno komoro in papilatno regijo.

Namen naloge je bil ultrastrukturalna analiza kutikule in celic črevesnega epitela v treh zaporednih fazah poznega embrija ter v fazah zgodnje in pozne marzupijske manke. Na osnovi teh podatkov smo želeli razložiti diferenciacijo črevesne kutikule s strukturnega vidika. Ultrastrukturo kutikule črevesa embrijev in mank smo primerjali z ultrastrukturo črevesne kutikule odraslih živali in z ultrastrukturo kutikule eksoskeleta v istih fazah razvoja. Eksoskeletna kutikula je v sloje urejen apikalni zunajcelični matriks epidermisa. Sestavljata jo površinska epikutikula iz proteinov, lipoproteidov in lipidov ter pod njo ležeča prokutikula iz hitinsko-proteinskih vlaken. Glede na ultrastrukturne značilnosti lahko prokutikulo razdelimo na eksokutikulo in izrazito slojevito endokutikulo. Med embrionalnim razvojem raka *P. scaber* je epidermis v zgodnjih razvojnih fazah prekrit z zunajceličnim matriksom, ki ga sestavljata tanka elektronsko gosta ovojnica in debelejši proksimalni sloj. Pri poznih embrijih tik pred izleganjem iz vitelinske membrane in marzupijskih mankah ima kutikula eksoskeleta



že podobno zgradbo kot kutikula odraslih. Glede ultrastrukture epitelnih celic črevesa so nas zanimalo predvsem spremembe apikalne celične membrane ob tvorbi kutikule. Pričakovali smo, da se bodo oblikovali izrastki apikalne membrane na vrhovih katerih poteka nalaganje nove kutikule, kot je značilno za epidermalne celice med tvorbo eksoskeletne kutikule. Spremljali smo tudi morebitne znake levitve v poznejših razvojnih fazah.

Za ultrastrukturno analizo črevesne kutikule odraslih živali smo pripravili vzorce zadnjega črevesa, ki smo jih izolirali iz uspavanih živali. Za analizo ultrastrukture kutikule črevesa embrijev in marzupijskih mank pa smo uporabili že pripravljene vzorce. Izolirana črevesa odraslih živali smo najprej fiksirali, sledila je dehidracija v naraščajoči alkoholni vrsti in acetonu, na koncu pa smo vzorce vklopili v smolo. Poltanke in ultratanke rezine za svetlobno in presevno elektronsko mikroskopijo smo pripravili z ultramikrotomom. Pregledovanje in slikanje poltankih rezin smo opravili na svetlobnem mikroskopu opremljenim s kamero. Ultratanke rezine pa smo pregledovali in slikali na presevnem elektronskem mikroskopu ravno tako opremljenim s kamero.

Na nivoju histološke zgradbe zadnjega črevesa odraslih živali je razvidno, da je v predelu anteriorne komore v dorzalni steni črevesa prisoten izrazit tiflosolis in tiflosolna kanala. Apikalni deli celic so kupolasto izbočeni v svetlino črevesa, v njihovih apikalnih in bazalnih delih pa sta apikalni in bazalni labirint. V papilatni regiji so bazalni deli epitelnih celic kupolasto izbočeni v hemocel. Celična membrana v bazalnih delih celic pa je nagubana v izrazit bazalni labirint, kar je verjetno povezano s transportno funkcijo teh celic. V predelu sfinktra je črevesni epitel močno naguban, črevo pa obdajajo debeli sloji mišic. Pri poznih embrijih v fazi S16 tiflosolis še ni izoblikovan, v kratkem predelu anteriornega dela zadnjega črevesa smo opazili greben celic, ki so zasnova tiflosolisa. V fazi S18 je greben celic, ki predstavlja zasnovo za tiflosolis daljši kot v fazi S16 in bolj diferenciran v smeri proti bodoči papilatni regiji. To kaže na verjeten razvoj tiflosolisa v posteriorno – anteriorni smeri. V fazi S19 še vedno poteka diferenciacija zadnjega črevesa v anteriorno komoro in papilatno regijo. Tiflosolis je viden kot dva ozka grebena celic, ki segata v svetlino črevesa. V predelu proti želodcu tiflosolisa nismo opazili. Pri poznih embrijih se tako že prične diferenciacija tiflosolisa, ni pa še jasne razdelitve zadnjega črevesa na anteriorno komoro in papilatno regijo. V fazi zgodnje marzupijske manke je tiflosolis razvit vzdolž celotne anteriorne komore, ob njem pa sta opazna delno oblikovana tiflosolna kanala. Pri poznih marzupijskih mankah so tiflosolis in tiflosolna kanala izoblikovani vzdolž celotne dolžine anteriorne komore. S tem je zadnje črevo poznih marzupijskih mank jasno diferencirano v anteriorno komoro in papilatno regijo.

Na ultrastrukturnem nivoju črevesno kutikulo odraslih živali sestavljata dva osnovna sloja. Zunanji sloj je elektronsko gosta epikutikula. Distalni del epikutikule je trilamelaren in sestoji iz dveh elektronsko gostih lamel in vmesne elektronsko svetle lamele. Notranji sloj je elektronsko svetla prokutikula. V predelu anteriorne komore je prokutikula približno petkrat debelejša od epikutikule. V prokutikuli so vidne lamele hitinsko-proteinskih vlaken podobno kot v endokutikuli eksoskeleta. V papilatni regiji in predelu sfinktra sta epikutikula in prokutikula približno enake debeline. Epikutikula je debelejša kot v anteriorni komori, v prokutikuli pa ni vidnih lamel hitinsko-proteinskih vlaken. V literaturi je zunanji sloj imenovan epikutikula, notranji pa endokutikula. Črevesne epitelne celice embrijev v fazah S16 in S18 prekriva homogen zunajcelični matriks. Površina tega matriksa je močno nagubana. Matriks sestavljata debel elektronsko svetel sloj in distalni tanek elektronsko gost

sloj. Znotraj distalnega sloja so razvidne tri lamele. V fazi S18 je pod tem zunajceličnim matriksom viden novonastajajoči gost sloj tik nad apikalno membrano, ki je oblikovana v izrastke z elektronsko gostimi konicami. Pri poznem embriju v fazi S19, oziroma tik pred izvalitvijo iz vitelinske membrane, je apikalni matriks sestavljen iz trilamelarnega distalnega sloja, elektronsko goste plasti pod njim in notranjega debelejšega svetlega sloja. Ultrastruktura črevesne kutikule še ni izrazito podobna ultrastrukturi pri odraslih živalih, kot je že značilno za ultrastrukturo eksoskeletne kutikule v tej razvojni fazi. Pri zgodnjih marzupijskih mankah je ultrastruktura kutikule podobna vzdolž celotnega zadnjega črevesa. Sestavljata jo zunanji tanek elektronsko gost sloj in notranji debelejši elektronsko svetel sloj. Distalni del zunanjega sloja je trilamelaren. V primerjavi z odraslimi je črevesna kutikula zgodnjih marzupijskih mank bistveno tanjša, epikutikula vsebuje manj elektronsko gostega materiala, podsloji prokutikule v anteriorni komori niso vidni. Pri odraslih je poleg tega kutikula v papilatni regiji bistveno debelejša kot v anteriorni komori, kar pri zgodnjih marzupijskih mankah ni opazno. Znaki obnavljanja črevesne kutikule v tej razvojni fazi še niso prisotni. Pri večini poznih marzupijskih mank je ultrastruktura črevesne kutikule podobna kot pri zgodnjih marzupijskih mankah. V primerjavi z zgodnjimi marzupijskimi mankami epikutikula poznih marzupijskih mank vsebuje že nekoliko več elektronsko gostega materiala, vendar še vedno bistveno manj kot epikutikula odraslih. Za odrasle značilni podsloji prokutikule v anteriorni komori pri poznih marzupijskih mankah niso vidni. Ravno tako ni opaznih razlik v debelini kutikule med anteriorno komoro in papilatno regijo. Kutikulo gradita zunanji tanjši elektronsko gost sloj in notranji debelejši elektronsko svetel sloj. Distalni del zunanjega sloja je trilamelaren. Ravno tako niso vidne lamele hitinsko-proteinskih vlaken. Pri nekaterih osebkih stara kutikula že odstopa od črevesnega epitela, pod njo pa se že tvori tanka nova kutikula. Pri teh osebkih je apikalna membrana črevesnih epitelnih celic oblikovana v izrastke z elektronsko gostimi konicami.

Z nalogo smo ugotovili, da je črevesni apikalni matriks pri poznih embrijih (S16, S18) strukturno podoben zgodnjemu zunajceličnemu matriksu epidermalnih celic, črevesna kutikula in kutikula eksoskeleta marzupijskih mank pa se strukturno že precej razlikujeta. Črevesna kutikula poznih marzupijskih mank še vedno ni podobna črevesni kutikuli odraslih živali, kot je značilno za kutikulo eksoskeleta v tej razvojni fazi. Med tvorbo kutikule se apikalna celična membrana črevesnih celic kot pri epidermalnih celicah diferencira v izrastke z elektronsko gostimi konicami. V fazi pozne marzupijske manke so že prisotni morfološki znaki levitve. Poleg podatkov o tvorbi kutikule, smo pridobili tudi nekaj podatkov, da diferenciacija tiflosolisa verjetno poteka v posteriorno-anteriorni smeri.

## 7 VIRI

- Browne W.E., Price A.L., Gerberding M., Patel N.H. 2005. Stages of embryonic development in the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis*. *Genesis*, 42: 124-149
- Brusca R.C., Brusca G.J. 2003. *Invertebrates*. 2nd Ed. Sunderland, Sinauer Associates: 895 str.
- Bubel A., Jones M.B. 1974. Fine structure of the gills of *Jaera nordmanni* (Rathke) [Crustacea, Isopoda]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 54: 737-743
- Dillaman R.M., Roer R., Shafer T., Modla S. 2013. The crustacean integument: Structure and function. *Functional morphology and diversity (The natural history of the Crustacea. Vol. 1)*. Watling L., Thiel M. (eds.). New York, Oxford University Press: 140-166
- Hames C.A.C., Hopkin S.P. 1989. The structure and function of the digestive system of terrestrial isopods. *Journal of Zoology*, 217: 599-627
- Hassall M., Jennings J.B. 1975. Adaptive features of the gut structure and digestive physiology in the terrestrial isopod *Philoscia muscorum* (Scopoli) 1763. *Biological Bulletin*, 149: 348-364
- Havemann J., Müller U., Berger J., Schwarz H., Gerberding M., Moussian B. 2008. Cuticle differentiation in the embryo of the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis*. *Cell and Tissue Research*, 332: 359-370
- Hild S., Marti O., Ziegler A. 2008. Spatial distribution of calcite and amorphous calcium carbonate in the cuticle of the terrestrial crustaceans *Porcellio scaber* and *Armadillidium vulgare*. *Journal of Structural Biology*, 163: 100-108
- Hild S., Neues F., Žnidaršič N., Štrus J., Epple M., Marti O., Ziegler A. 2009. Ultrastructure and mineral distribution in the tergal cuticle of the terrestrial isopod *Titanethes albus*. Adaptations to a karst cave biotope. *Journal of Structural Biology*, 168: 426-436
- Hornung E. 2011. Evolutionary adaptation of oniscidean isopods to terrestrial life: Structure physiology and behaviour. *Terrestrial Arthropod Reviews*, 4: 95-130
- Hryniewiecka-Szyfter Z., Storch V. 1986. The influence of starvation and different diets on the hindgut of Isopoda (*Mesidotea entomon*, *Oniscus asellus*, *Porcellio scaber*). *Protoplasma*, 134: 53-59
- Kostanjšek R., Štrus J., Avguštin G. 2002. Genetic diversity of bacteria associated with the hindgut of the terrestrial crustacean *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *FEMS Microbiology Ecology*, 40: 171-179
- Manship B.M., Walker A.J., Davies A.J. 2011. Brooding and embryonic development in the crustacean *Paragnathia formica* (Hesse, 1864) (Peracarida: Isopoda: Gnathiidae). *Arthropod Structure & Development*, 40: 135-145
- Milatovič M., Kostanjšek R., Štrus J. 2010. Ontogenetic development of *Porcellio scaber*: Staging based on microscopic anatomy. *Journal of crustacean biology*, 30: 225-235
- Moussian B., Seifarth C., Müller U., Berger J., Schwarz H. 2006. Cuticle differentiation during *Drosophila* embryogenesis. *Arthropod Structure & Development*, 35: 137-152
- Moussian B. 2010. Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 363-375
- Moussian B. 2013. The arthropod cuticle. *Arthropod biology and evolution: Molecules, development, morphology*. Minelli A., Boxshall G., Fusco G. (eds.). Heidelberg, Springer: 171-196

- Mrak P., Žnidaršič N., Tušek-Žnidarič M., Klepal W., Gruber D., Štrus J. 2012. Egg envelopes and cuticle renewal in *Porcellio* embryos and marsupial manca. *ZooKeys*, 176: 55-72
- Mrak P., Žnidaršič N., Žagar K., Čeh M., Štrus J. 2014. Exoskeletal cuticle differentiation during intramarsupial development of *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Arthropod Structure and Development*, DOI: 10.1016/j.asd.2014.07.002
- Nair S.G. 1956. On the embryology of the isopod *Irona*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 4: 1-33
- Palackal T., Faso L., Zung J.L., Vernon G., Witkus R. 1984. The ultrastructure of the hindgut epithelium of terrestrial isopods and its role in osmoregulation. *Symposia of the Zoological Society of London*, 53: 185-198
- Roer R., Dillaman R. 1984. The structure and calcification of the crustacean cuticle. *American Zoologist*, 24: 893-909
- Scholtz G., Wolff C. 2002. Cleavage, gastrulation and germ disc formation of the amphipod *Orchestia cavimana* (Crustacea, Malacostraca, Peracarida). *Contributions to Zoology*, 71: 9-28
- Seidl B.H.M., Ziegler A. 2012. Electron microscopic and preparative methods for the analysis of isopod cuticle. *ZooKeys*, 176: 73-85
- Storch V. 1987. Microscopic anatomy and ultrastructure of the stomach of *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda). *Zoomorphology*, 106: 301-311
- Storch V., Štrus J. 1989. Microscopic anatomy and ultrastructure of the alimentary canal in terrestrial isopods. *Monitore Zoologico Italiano (N.S.) Monogr.* 4: 105-126
- Strömberg J-O. 1965. On the embryology of the isopod *Idotea*. *Arkiv for Zoologi*, 17: 421-473
- Strömberg J-O. 1967. Segmentation and organogenesis in *Limnoria lignorum* (Rathke) (Isopoda). *Arkiv for Zoologi*, 20: 91-139
- Surbida K.L., Wright J.C. 2001. Embryo tolerance and maternal control of the marsupial environment in *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscidea). *Physiological and Biochemical Zoology*, 74: 894-906
- Štrus J., Drašlar K. 1988. Ultrastructural evidence of the midgut cells in the isopod *Ligia italica* (Isopoda, Crustacea). *Institute of Physics Conference Series 93*, Institute of Physics, Bristol and Philadelphia 3: 149-150
- Štrus J., Storch V. (1990) Moulting of the alimentary canal in *Ligia italica* Fab. and *Porcellio scaber* L. (Crustacea, Oniscoidea). *Proceedings of the Third International Symposium on the Biology of Terrestrial Isopods*: 189-194
- Štrus J., Blejec A. 2001. Microscopic anatomy of the integument and digestive system during the molt cycle in *Ligia italica* (Oniscidea). *Crustacean Issues 13*, "Isopod systematics and evolution". Vol. 304. Kensley B., Brusca R.C. (eds.). Rotterdam, A.A.Balkema Publishers: 343-352
- Štrus J., Klepal W., Repina J., Tušek-Žnidarič M., Milatovič M., Pipan Ž. 2008. Ultrastructure of the digestive system and the fate of midgut during embryonic development in *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Arthropod Structure & Development*, 37: 287-298
- Vernon G.M., Herold L., Witkus E.R. 1974. Fine structure of the digestive tract epithelium in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Journal of Morphology*, 144: 337-359
- Wang Y., Brune A., Zimmer M. 2007. Bacterial symbionts in the hepatopancreas of isopods: diversity and environmental transmission. *FEMS Microbiology Ecology*, 61: 141-152

- Wolff C. 2009. The embryonic development of the malacostracan crustacean *Porcellio scaber* (Isopoda, Oniscidea). *Development Genes and Evolution*, 219: 545-564
- Žnidaršič N. 2003. Dinamika bakrovih in cinkovih zvrsti ter z njo povezani celični mehanizmi v prebavilu raka enakonožca *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 88 str.

## STOMACH AND HINDGUT CUTICLE DIFFERENTIATION DURING EMBRYOGENESIS OF THE CRUSTACEAN *Porcellio scaber*

Polona Mrak, Nada Žnidaršič, Urban Bogataj, Magda Tušek-Žnidarič, Jasna Štrus

[polona.mrak@bf.uni-lj.si](mailto:polona.mrak@bf.uni-lj.si), [jasna.strus@bf.uni-lj.si](mailto:jasna.strus@bf.uni-lj.si)

Department of Biology, Biotechnical faculty, University of Ljubljana, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

### BACKGROUND

The digestive tract epithelium of terrestrial isopod crustaceans is entirely of ectodermal origin and lined by cuticle. Cuticle is an apical extracellular matrix of epithelial cells, based on the chitin-protein network. Cuticle lining the lumen has specific functions in different gut regions, as grinding, filtering, transporting and absorbing of the food. Detailed studies of *de novo* formation of cuticle during embryogenesis are scarce, mostly referring to exoskeletal cuticle in insects [1], while the gut cuticle was not studied from this aspect before. During *P. scaber* embryogenesis general as well as specific features in gut cuticle formation are expected, with respect to the differentiation of the gut.

### METHODS

Embryos and larvae mancae of *P. scaber* were isolated from the marsupium, fluid-filled brood pouch of the gravid females. Stages were determined according to the staging system with twenty sequential stages [2]. Isolated hindguts of adult *P. scaber*, embryos and mancae were fixed in buffered 2.5% glutaraldehyde, postfixed in 1% OsO<sub>4</sub> and embedded in Agar 100 resin. Semithin and ultrathin sections were cut, stained and inspected with Zeiss Axiomager Z.1 light microscope and Philips CM100 transmission electron microscope, equipped with Bioscan 792 camera (Gatan).

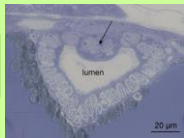
### AIM

Microscopic investigation of gut cuticle differentiation and progressive typhlosole formation during gut development in *P. scaber* embryos and mancae. Study of gut cuticle formation is based on analysis of apical matrix / cuticle architecture and epithelial cells ultrastructure.

### RESULTS

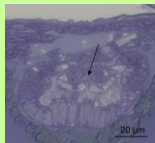
#### TYPHLOSOLE FORMATION

late embryo stage 16



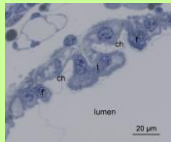
**Figure 1:** Typhlosole formation is evident only in the short part of the hindgut anterior region, appearing as a small ridge of epithelial cells in the dorsal wall (→).

late embryo stage 18



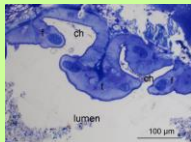
**Figure 4:** Typhlosole formation is evident in larger part of the hindgut anterior region. A ridge of cells in the dorsal wall (arrow) is more pronounced and protrudes into the lumen. The size of the ridge decreases anteriorly towards the stomach region.

marsupial larva manca



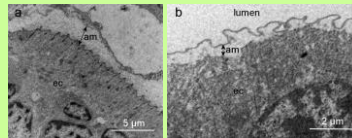
**Figure 7:** Typhlosole formation is evident throughout the whole hindgut anterior region. In late marsupial manca the forming ridges of typhlosole (t) and lateral folds of the hindgut epithelium (f) are developed and constitute typhlosole channels (ch).

adult

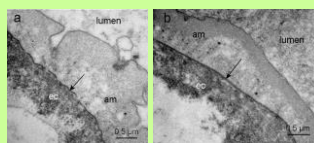


**Figure 10:** In the dorsal wall of the hindgut anterior region the typhlosole ridge (t) and the lateral folds (f) form typhlosole channels (ch).

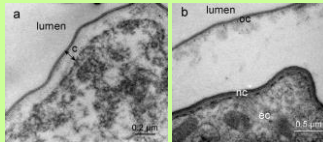
#### APICAL MATRIX / CUTICLE ARCHITECTURE



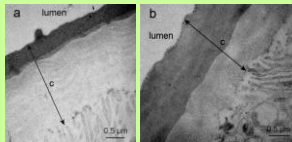
**Figure 2:** A distinctive apical matrix (am) of epithelial cells (ec) is evident in the filtering region of the stomach (a) and in the hindgut region (b). The matrix is intensely ruffled and consists of homogenous lucent material and distal electron dense layer.



**Figure 5:** All along the hindgut cuticle formation is evident, appearing as a conspicuous electron dense lamina (→), apposed to the apical membrane of epithelial cells (ec). The lamina is observed in fragments (a), or is already continuous (b). The apical matrix (am) is still present above the forming cuticle.

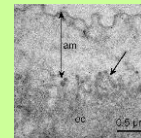


**Figure 8:** (a) Hindgut cuticle (c) of early manca is composed of a thick homogenous lucent layer, lined by a thin trilaminar layer and has similar appearance along the whole hindgut. (b) In late manca cuticle renewal is observed in all regions of the hindgut: the old cuticle (oc) detachment and partial degradation and the new cuticle (nc) formation at the apical surface of epithelial cells (ec).

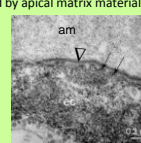


**Figure 11:** The specific structure of hindgut cuticle in different hindgut regions. (a) In the anterior chamber the cuticle (c) consists of a thicker proximal lucent layer with several sublayers and a thinner distal dense layer. (b) In the papillate region cuticle (c) the thickness of the two layers is similar and in the proximal layer no sublayers are discernible.

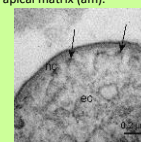
#### APICAL CELL MEMBRANE MORPHOLOGY



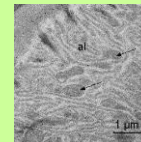
**Figure 3:** The apical surface of epithelial cells (ec) is slightly rough and the irregularly arranged thin membrane protrusions are observed (→), covered by apical matrix material (am).



**Figure 6:** The apical membrane of epithelial cells (ec) forms regularly arranged short protrusions with electron dense plaques on their tips (→). They are covered by the lamina of cuticle (Δ) and the apical matrix (am).



**Figure 9:** The apical membrane protrusions (→) of epithelial cells (ec) are regularly arranged and carry electron dense plaques. The newly forming cuticle (nc) consists of three discernible layers with different electron opacity.



**Figure 12:** In both hindgut regions the apical membrane of epithelial cells is differentiated in a distinctive apical labyrinth (al), with abundant mitochondria apposed to the membranes (→).

### CONCLUSIONS

The results show gradual formation of the typhlosole during intramarsupial development, with fully developed structure before larvae are released from marsupium. In late embryos a substantial apical matrix is secreted by the gut epithelial cells before cuticle formation. It morphologically resembles the epidermal precuticular matrix, observed in late embryogenesis of *P. scaber* [3] and other arthropods [1]. In marsupial manca the two principal layers of the hindgut cuticle, the proximal lucent layer and the distal dense layer, are established, but without sublayered structure. In comparison to adult hindgut cuticle, the cuticle in marsupial manca is thinner and its architecture is not different in the anterior chamber and papillate region.

### REFERENCES

- [1] B. Mousian et al., *Arthropod Struct Dev* 35 (2006), p. 137-152.
- [2] M. Milatović et al., *J Crustacean Biol* 30(2) (2010), p. 225-235.
- [3] P. Mrak et al., *Zookeys* 176 (2012), p. 55-72.



This study is a part of the research of crustacean cuticle differentiation during embryogenesis, presented in oral presentation: "Cuticle formation during marsupial development of the crustacean *Porcellio scaber*: Imaging and analysis" by P. Mrak.

MC 2013  
Regensburg



Participation at the MC2013 is supported by the European Microscopy Society (EMS) scholarship.

Vsebina naloge je bila delno objavljena kot prispevek na konferenci MC 2013 (Microscopy Conference 2013, Regensburg, Nemčija, 25.–30. 8. 2013):

Mrak P., Žnidaršič N., Bogataj U., Tušek-Žnidarič M., Štrus J. 2013. Stomach and hindgut cuticular lining differentiation during embryogenesis of the crustacean *Porcellio scaber*. In: Reinhard R. (Ed.) Proceedings MC 2013, Regensburg, Life Sciences (LS). University of Regensburg, p. 361-362.