

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Maruša ROŠER

**SKELETOKRONOLOŠKA ANALIZA IN
INTERPRETACIJA LINIJ ZAVRTE RASTI V
DOLGIH KOSTEH MOČERILA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Maruša ROŠER

**SKELETOKRONOLOŠKA ANALIZA IN INTERPRETACIJA LINIJ
ZAVRTE RASTI V DOLGIH KOSTEH MOČERILA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**SKELETOCHRONOLOGICAL ANALYSIS AND INTERPRETATION
OF LINES OF ARRESTED GROWTH IN LONG BONES OF
*PROTEUS ANGUINUS ANGUINUS***

M.Sc. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek študijskega programa 2. stopnje, Strukturna in funkcionalna biologija, na Biotehniški fakulteti na Univerzi v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen na Katedri za zoologijo, Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za biologijo ter Senat Oddelka za biologijo sta dne 19. 6. 2015 za mentorico magistrske naloge imenovala doc. dr. Lilijana Bizjak Mali in za somentorja prof. dr. Boris Buloga ter za recenzentko doc. dr. Nado Žnidaršič. Za predsednika Komisije za oceno in zagovor magistrskega dela je bil imenovan doc. dr. Primož Zidar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Primož ZIDAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo

Član: doc. dr. Lilijana BIZJAK MALI
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo

Član: prof. dr. Boris BULOG
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo

Član: doc. dr. Nada ŽNIDARŠIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Maruša Rošer

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 597.92:591.4(043.2)=163.6
KG	skeletokronologija/močeril/linije zavrte rasti/določanje starosti
AV	ROŠER, Maruša, dipl.biol. (UN)
SA	BIZJAK MALI, Lilijana (mentorica)/BULOG, Boris (somentor)/ŽNIDARŠIČ, Nada (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Strukturna in funkcionalna biologija
LI	2016
IN	SKELETOKRONOLOŠKA ANALIZA IN INTERPRETACIJA LINIJ ZAVRTE RASTI V DOLGIH KOSTEH MOČERILA
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2.stopnja)
OP	IX, 61 str, 3 pregl., 40 sl., 7 pril., 30 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AL	Namen raziskave je bila analiza linij zavrte rasti v dolgih kosteh močerila (<i>Proteus anguinus anguinus</i>) in s tem evalvacija uporabnosti skeletokronologije pri tej vrsti. Analiza linij zavrte rasti je bila narejena na obarvanih histoloških prerezihih sprednjih in zadnjih okončin arhiviranih osebkov s poznano starostjo, ki so bili izleženi in vzgojeni v jamskem laboratoriju CNRS Station d'Ecologie Expérimentale v Moulisu, Francija. Pri vseh osebkih v vzorcu so bile vidne linije zavrte rasti (LAG-i), vendar se njihovo število pri večini osebkov ni ujemalo z dejansko starostjo živali. Večina LAG-ov je bila neizrazita, kar pripisujemo konstantnim abiotskim in biotskim pogojem jamskega okolja, kot tudi specifični strukturi in dinamiki rasti kostnine. Na podlagi literature menimo, da so LAG-i v dolgih kosteh močerila preostanek endogenih ciklov nalaganja kostnine zastopanih pri površinskih prednikih, ki so živeli v spreminjajočih se okoljskih pogojih.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ŠD	Du2
DK	UDK 597.92:591.4(043.2)=163.6
KG	skeletochronology/olm/lines of arrested growth/age determination
AV	ROŠER, Maruša, dipl.biol. (UN)
SA	BIZJAK MALI, Lilijana (supervisor)/BULOG, Boris (co-advisor) /ŽNIDARŠIČ, Nada (reviewer)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Structural and functional biology
LI	2016
IN	SKELETOCHRONOLOGICAL ANALYSIS AND INTERPRETATION OF LINES OF ARRESTED GROWTH IN LONG BONES OF <i>PROTEUS</i> <i>ANGUINUS ANGUINUS</i>
TD	M.Sc.Thesis (Master Study Programmes)
OP	IX, 61 p., 3 tab., 40 fig., 7 ann., 30 ref.
IJ	sl
JJ	sl/en
AL	The purpose of this study was to examine the relationship between age and the number of lines of arrested growth (LAGs) in the long bones of the blind cave salamander (<i>Proteus anguinus anguinus</i>). Analysis of LAGs was made from stained histological sections of the front and hind limbs of archived specimens of known age that were hatched and raised in the cave laboratory of the CNRS Station d'Ecologie Expérimentale in Moulis. LAGs were visible in all specimens, but in most cases there was no relationship between the number of LAGs and the actual age of the animals. LAGs were not clearly visible, which is probably attributable to the constant biotic and abiotic conditions of cave environment, as well as the specific structure and growth dynamics of the bone. We think that the visible LAGs in the long bones of <i>Proteus</i> represent an intrinsic mode or cycle of bone growth retained from surface ancestors that lived in changing environmental conditions.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG.....	X
SLOVARČEK.....	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 UGOTAVLJANJE STAROSTI PRI VRETENČARJIH	3
2.1.1 Pomen določanja starosti	3
2.1.2 Dolgoživost dvoživk.....	4
2.2 SKELETOKRONOLOGIJA.....	5
2.2.1 Zgodovina skeletokronologije	7
2.2.2 Uporabnost skeletokronologije	7
2.3 RASTNE LINIJE (RL).....	8
2.3.1 Hitro rastoče plasti.....	9
2.3.2 Počasi rastoče plasti.....	10
2.3.3 Linije zavrte rasti	10
2.3.4 Težave pri določanju starosti z rastnimi linijami.....	11
2.4 RAST IN RAZVOJ DOLGIH KOSTI PRI DVOŽIVKAH	13
2.4.1 Osifikacija kosti.....	13
2.4.2 Nastanek linij zavrte rasti	14
2.5 PRIMERJAVA OSNOVNE ZGRADBE OKONČIN DVOŽIVK.....	15
3 MATERIAL IN METODE	18
3.1 POSKUSNE ŽIVALI	18
3.1.1 Splošni opis močerila (<i>Proteus anguinus</i>).....	18
3.1.2 Osebki v raziskavi in telesne mere.....	20

3.2	PRIPRAVA TKIV	23
3.2.1	Fiksacija	23
3.2.2	Dekalcinacija	23
3.2.3	Dehidracija	24
3.2.4	Bistrenje	25
3.2.5	Vklapljanje v paraplast in priprava rezin	25
3.2.6	Barvanje	26
3.3	MIKROSKOPIRANJE	27
3.4	STATISTIČNA ANALIZA	28
4	REZULTATI	29
4.1	ZGRADBA IN VELIKOST OKONČIN	29
4.3.1	Korelacija med starostjo osebkov in okončinami ter kostmi	31
4.3.2	Korelacija med starostjo osebkov in telesnimi parametri	34
4.2	HISTOLOŠKA ZGRADBA OKONČIN	35
4.3	LINIJE ZAVRTE RASTI V DOLGIH KOSTEH OKONČIN MOČERILA	43
4.3.1	Indetifikacija in razporeditev linij zavrte rasti	43
4.3.2	Linije zavrte rasti in starost osebkov	50
5	RAZPRAVA	53
6	SKLEPI	57
7	POVZETEK	58
8	VIRI	59

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Podatki o poskusnih živalih. (<i>Proteus anguinus anguinus</i>).	21
Pregl. 2: Podatki o poskusnih živalih. Spol in dolžine.....	22
Pregl. 3: Število LAG-ov na zadnji (tibija) in sprednji okončini (radius) pri močerilu (<i>P. a. anguinus</i>)	51

KAZALO SLIK

Sl. 1: Prečni prerez diafize femurja kuščarice (<i>Lacerta viridis</i>).....	6
Sl. 2: Prečni prerez dorzalne plavuti krapa (<i>Cyprinus carpio</i>).....	9
Sl. 3: Diagram spreminjanja splošne histološke zgradbe kostnega tkiva na prečnem prerezu korteksa dolge kosti v predelu diafize s staranjem osebka	10
Sl. 4: Prečni prerez členka prsta žabe v predelu diafize po 4. hibernaciji.	12
Sl. 5: Shema vzdolžnega prereza dolge kosti žabe po prvi hibernaciji.....	14
Sl. 6: Shema osnovne zgradbe okončine tetrapodov.	16
Sl. 7: Primerjava v zgradbi zadnje in sprednje okončine.....	17
Sl. 8: Sprednja okončina žabe (<i>Rana esculenta</i>), dorzalni pogled).	17
Sl. 9: Beli močeril (<i>Proteus anguinus anguinus</i>)	19
Sl.10: Črni močeril (<i>Proteus anguinus parkelj</i>)	19
Sl. 11: Skica močerila (<i>P.a. anguinus</i>) z meritvami posameznih parametrov.	20
Sl. 12: Meritve premerov različnih predelov kosti.....	27
Sl. 13: Kostni zadnje in sprednje okončine močerila (<i>P.a. anguinus</i>).....	29
Sl. 14: Skica skeletne zgradbe zadnje in sprednje okončine močerila (<i>P.a. anguinus</i>).....	30
Sl. 15: Sprednja okončina močerila (<i>P. a. anguinus</i>), presvetlitvena tehnika.....	30
Sl. 16: Primerjava dolžine sprednje in zadnje okončine s starostjo osebkov.....	32
Sl. 17: Primerjava dolžine tibije in radiusa s starostjo osebkov.....	32
Sl. 18: Primerjava premera tibije in radiusa s starostjo osebka.....	33
Sl. 19: Primerjava premera medularne votline tibije in radiusa s starostjo osebka.....	33
Sl. 20: Primerjava dolžine trupa in glave s starostjo.....	34
Sl. 21: Vzdolžni prerez femurja. Barvanje Weigert hematoksilin.....	35
Sl. 22: Vzdolžni prerez tibije in fibule. Barvanje Weigert hematoksilin.....	36
Sl. 23: Vzdolžni prerez stopala. Barvanje Weigert hematoksilin.....	36
Sl. 24: Skica vzdolžnega prereza femurja s slikami prečnih prerezov na različnih predelih kosti. Barvanje Erhlich hematoksilin.....	37
Sl. 25: Skica vzdolžnega prereza humerusa, s slikami prečnih prerezov na različnih predelih kosti. Barvanje Erhlich hematoksilin.....	38
Sl. 26: Skica vzdolžnega prereza tibije in fibule, s slikami prečnih prerezov na različnih predelih kosti. Barvanje Erhlich hematoksilin	39

Sl. 27: Skica vzdolžnega prereza ulne in radiusa, s slikami prečnih prerezov na različnih predelih kosti. Barvanje Erhlich hematoksilin	40
Sl. 28: Skica vzdolžnega prereza dlani, s slikami prečnih prerezov na različnih predelih kosti. Barvanje Erhlich hematoksilin.....	41
Sl. 29: Skica vzdolžnega prereza stopala, s slikami prečnih prerezov na različnih predelih kosti. Barvanje Erhlich hematoksilin.....	42
Sl. 30: Prečni premer femurja, fibule, tibije in členka prstka istega osebk. Erhlich hematoksilin.	44
Sl. 31: Prečni prerez femurja in humerusa. Erhlich hematoksilin.	45
Sl. 32: Prečni prerez tibije in fibule. Erhlich hematoksilin.	45
Sl. 33: Prečni prerez členka prsta zadnje okončine in sprednje okončine. Erhlich hematoksilin.	46
Sl. 34: Prečni prerez radiusa osebk. starosti 8 let in 14 let Erhlich hematoksilin.....	46
Sl. 35: Vzdolžni prerez femurja v predelu diafize. Weighert hematoksilin.....	47
Sl. 36: Primer lepo vidnih LAG-ov preko celotne kostnine.....	48
Sl. 37: Razporeditev LAG-ov na različnih kosteh okončine.....	49
Sl. 38: Primer pojavljanja močnejše obarvanih LAG-ov.....	49
Sl. 39: Primerjava dobro vidnih in slabo vidnih LAG-ov. Erhlich hematoksilin.....	52
Sl. 40: Primerjava dobro in slabo vidnih lagov tibije in radiusa s starostjo osebkov.....	52

KAZALO PRILOG

Pril. A: Protokol za dekalcinacijo z dušikovo kislino in vklapljanje v paraplant

Pril. B: Protokol za barvanje histoloških rezin kosti z Erlich-ovim hematoksilinom

Pril. C: Protokol za barvanje histoloških rezin kosti z Weigert-ovim hematoksilinom

Pril. D: Dolžine zadnjih okončin in posameznih kosti zadnje okončine

Pril. E: Dolžine sprednjih okončin in posameznih kosti sprednje okončine

Pril. F: Premeri posameznih kosti sprednje in zadnje okončine

Pril. G: Premeri medularnih votlin posameznih kosti sprednje in zadnje okončine

SLOVARČEK

SKELETOKRONOLOGIJA: metoda določevanja starosti s pomočjo rastnih linij na kalcificiranih tkivih

LAG: angleška kratica za linijo zavrte rasti (line of arrested growth)

RL: kratica za rastne linije, ki so posledica neenakomerega nalaganja kostnega tkiva v različnih obdobjih rasti živali

LAMELARNA KOST: tip kostnine pri kateri so kolagenska vlakna organizirana paralelno, ta tip kostnine se nalaga zelo počasi

PSEVDO-LAMELARNA KOST: tip kostnine, kjer so kolagenska vlakna organizirana paralelno, vendar dokaj naključno

OSIFIKACIJA: proces nalaganja kostnega tkiva

TL: dolžina repa od kloake do konice

TRL: dolžina trupa od sprednjih nog do kloake

PPL: dolžina glave od konice gobčka do sprednjih nog

DEKALCINACIJA: odstranitev anorganskih kalcijevih ionov iz kostnega tkiva s pomočjo helatorjev ali kislin

ALOMETRIJA: nesorazmerna rast okončin in glave v primerjavi z rastjo telesa

1 UVOD

Ugotavljanje starosti osebkov ima pomembno vlogo pri raziskavah rasti in razvoja živali ter pri študijah dinamike starostne strukture populacij. V ta namen se danes uporablja skeletokronologija, tj. metoda pri kateri se za določevanje starosti uporablja štetje linij zavrte rasti oz. LAG-ov na dolgih kosteh (Eden in sod., 2007). Metoda je uporabna predvsem za oceno starosti plazilcev in dvoživk, saj so ti še posebej podvrženi sezonskim spremembam. Zaradi sezonskih sprememb v intenzivnosti rasti živali, prihaja do neenakomernega nalaganja kostnega materiala. Dejavniki, ki vplivajo na nalaganje kostnega materiala so predvsem klimatski pogoji, trofični viri in presnovne lastnosti živali, kot tudi medvrstna kompeticija. S skeletokronologijo pridobimo podatke o dolgoživosti osebkov, o stopnji rasti živali, prav tako je ta metoda ključna tudi pri demografskih študijah (Miaud in Guillaume, 2005).

Z razliko od širokih plasti kostnega tkiva, ki so odraz ugodnejših abiotskih in biotskih pogojev (spomladansko-poletna perioda), so LAG-i tanjši in nastanejo ob neugodnih pogojih, kot sta npr. zimska ali poletna dormanca. Omogočajo nam določanje starosti s štetjem linij, podobno štetju drevesnih letnic – en LAG naj bi pomenil eno leto življenja (Miaud in Guillaume, 2005). Za analizo se najpogosteje uporabljajo členki prstov, zato za analizo ni potrebno žrtvovati osebka. (cit. v Castanet in sod., 1993). Analiza, ki je bila narejena na dolgih kosteh močerilov iz arhivske zbirke (Roglič, 2007), je potrdila prisotnost LAG-ov pri tej vrsti, čeprav so abiotski dejavniki v jamskem habitatu dokaj konstantni. LAG-i so v kosteh močerila verjetno reliktni preostanek predniških površinskih vrst živečih v spreminjajočih se okoljskih pogojih. Pomemben vpliv pa imajo tudi trofični viri, saj so prostorsko razpršeni in sezonsko pogojeni (Miaud in Guillaume, 2005). Nalaganje kostnega tkiva pri brezrepkih se začne z metamorfozo (Rozenblut in Ogielska, 2005), pri močerilu pa naj bi nastopilo pozno, najverjetneje s spolno zrelostjo (Roglič, 2007).

Namen naše naloge je bil dopolniti predhodno skeletokronološko analizo Rogličeve (2007), z analizo dolgih kosti okončin arhiviranih osebkov z znano starostjo, ki so se izlegli v jamskem laboratoriju CNRS v Moullisu (Francija). Preverili smo korelacijo med starostjo in številom nastalih LAG-ov v dolgih kosteh ter njihovo pojavnost s spolno zrelostjo. Opisali smo tudi zgradbo okončin in razložili histološko zgradbo dolgih kosti

močerila. Preverili smo tudi, če se nalaganje kostnega tkiva pri močerilu začne s spolno zrelostjo.

Naše delovne hipoteze so:

1. Glede na podatke iz literature predvidevamo, da bo število linij zavrte rasti v dolгих kosteh močerila koreliralo s starostjo in velikostjo osebk (starejši/večji osebki imajo večje število linij zavrte rasti, kot mlajši/manjši).
2. Predvidevamo, da se nalaganje kostnega materiala pri močerilu začne s spolno zrelostjo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 UGOTAVLJANJE STAROSTI PRI VRETENČARJIH

Določanje starosti posameznih osebkov je potrebno za mnoge raziskave, v katere so vključeni organizmi. Za določanje starosti so bile predlagane in proučevane različne metode določanja starosti glede na različne morfometrične podatke, kot so npr. velikost osebkov, masa očesne leče, število lobulov testisov ali progresivne spremembe kompaktnih tkiv. Vse našteje metode so nenatančne in netočne, uporabne so le pri približnem določevanju starostnih skupin ali pa le pri ločevanju juvenilnih in odraslih osebkov. Poleg tega je potrebno pri takšnem načinu dela določiti referenčni vzorec na podlagi živali z znano starostjo (Castanet in sod., 1993).

Najboljša metoda za natančno določanje starosti, je metoda ulova in ponovnega ulova, s katero lahko spremljamo živali v naravi od njihove izvalitve naprej (Durham in Bennett, 1963). Na ta način lahko pridobimo zelo natančno oceno starosti osebkov. Vendar je za to metodo potrebno veliko dela in časa. Poleg tega je pri določenih vrstah možnost ponovnega ulova zelo majhna, saj je veliko habitatov težko dostopnih ali celo nedostopnih. (Castanet in sod., 1993).

Še ena dokaj natančna možnost za določanje starosti osebkov je metoda pri kateri se uporabljajo rastne linije na trdih tkivih, ki so posledica periodičnih letnih sprememb v okolju. Ta metoda se lahko uporablja na mineraliziranih vretenčarskih in nevretenčarskih tkivih, kot so kosti, zobovje, lupine ali pa na trdih tkivih, ki niso mineralizirana npr. rogovje (cit.v Castanet in sod., 1993). Na splošno lahko to metodo poimenujemo sklerokronologija, če govorimo le o mineraliziranem skeletnem tkivu, pa uporabimo izraz skeletokronologija (Castanet in sod., 1993).

2.1.1 Pomen določanja starosti

Poznavanje starosti proučevanih živali ima velik pomen pri raziskavah na vseh področjih zoologije – morfoloških in fizioloških raziskavah, pri raziskovanju ekologije vrst ali populacijskih in demografskih študijah. Poznavanje dinamike sestave starosti določenih populacij je pri okoljskem biomonitoringu, zaradi velikega vpliva antropogenega stresa, zelo pomembno (Smirina, 1994). Še posebej pomembno je pri raziskavah biologije dvoživk, saj so te zaradi svojega načina življenja in fiziologije še posebej podvržene

antropogenim dejavnikom v okolju (Ento in Matsui, 2002). Starostna sestava populacije lahko zaradi močne odvisnosti od okolja služi kot indikator onesnaženosti okolja. V onesnaženih okoljih se starostna sestava močno spremeni, opazen je upad mlajših in starejših kategorij osebkov (Smirina, 1994). Poleg tega lahko s poznavanjem točnih starosti posameznih osebkov znotraj populacije pridobimo informacije o mnogih pomembnih vidikih življenjskega cikla določene populacije (Ento in Matsui, 2002). Poznavanje točne starosti je osnova temeljnih raziskav razvoja in dolgoživosti živali ter ugotavljanja stopnje rasti. Po spolni zrelosti stopnja rasti upada, najverjetneje zaradi preusmeritve energije v spolno reprodukcijo (cit. v Ento in Matsui, 2002). Linije zavrte rasti so s staranjem, zaradi upočasnjene rasti nameščene vedno bolj nagosto. Na podlagi trenda medsebojne oddaljenosti linij lahko določimo nastop spolne zrelosti za posamezno vrsto (Smirina, 1994).

2.1.2 Dolgoživost dvoživk

Dvoživke so v primerjavi z drugimi živalskimi razredi podobnih velikosti, dolgožive živali (Smirina, 1994). V primerjavi z žabami je maksimalna starost repatih dvoživk višja. Najvišja znana starost žabe ulovljene v divjini je 14 let, medtem ko je maksimalna starost repatcev lahko višja tudi za več 10 let (močeril lahko živi tudi več kot 60 let). Dolgoživost dvoživk je močno odvisna od okolja in od geografske lege habitata. Čeprav je o vplivu okolja na starostno sestavo zelo malo podatkov, vseeno nekatere severne in gorske populacije izkazujejo večjo dolgoživost od južnih oz. nižje živečih populacij (Smirina, 1994). Življenje na višjih nadmorskih višinah in zemljepisnih širinah lahko zviša dolgoživost dvoživk in nastop spolne dozoritve. Njihovo dolgoživost poveča tudi življenje v ujetništvu, saj je bila ocenjena starost pri teh osebkih za tretjino višja od starosti populacij živečih v naravnem okolju (Sinsch, 2015). Vzrok za nižjo dolgoživost v naravnem okolju od potencialne dolgoživosti je močan predatorski pritisk in ni toliko odvisna od dostopnosti in količine hrane (cit. v Sinsch, 2015).

2.2 SKELETOKRONOLOGIJA

Skeletokronologija se bistveno razlikuje od ostalih metod za določanje starosti, ki temeljijo predvsem na morfometričnih podatkih. Pri tej metodi se za določanje starosti uporabljajo rastne linije v trdih tkivih, ki so posledica zunanjih ritmov in so neodvisne od individualnih variacij osebkov ali populacij. Zaradi tega pri tej metodi ne potrebujemo referenčnega vzorca za vsako študijo posebej, saj lahko že samo s štetjem rastnih linij (vsaj v praksi), določimo starost individualnega osebk. Številni avtorji so z mnogimi študijami ugotovili, da je skeletna rast pogosto periodičen pojav. Rastni cikel predstavlja cona hitre rasti in območje upočasnjene rasti kostnega tkiva. Vsako leto naj bi se naložila plast enega ravnega cikla, zaradi česa se starost odraža v številu območij zavrte rasti – LAG-i (Castanet in sod., 1993).

Za preverjanje ustreznosti skeletokronologije, kot metode za ugotavljanje starosti osebkov, obstaja nekaj eksperimentalnih pristopov:

1. Uporaba živali znanih starosti:

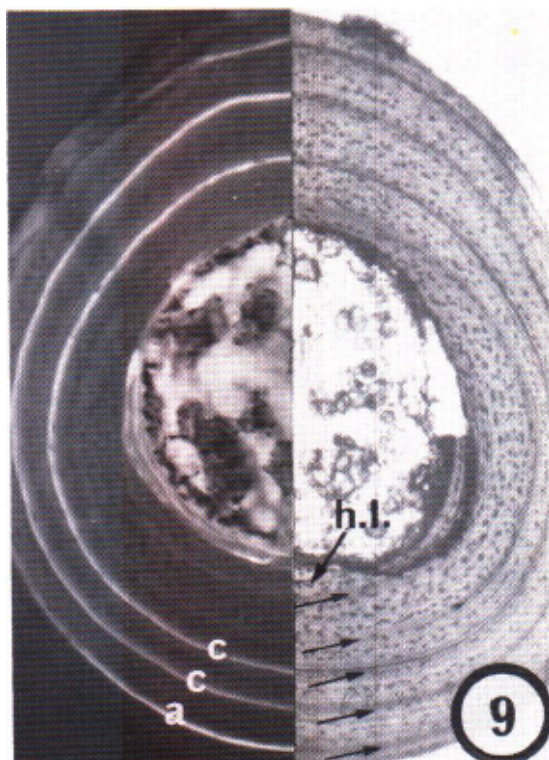
To metodo sta leta 1968 uporabila Schroeder in Baskett (cit v Castanet in sod., 1993). Postavila sta hipotezo, da so ozki pasovi v kostnem tkivu posledica upočasnjene rasti med zimo in da široki, svetlejši pasovi predstavljajo rast med bolj ugodnimi obdobji. Njuna domneva je bila potrjena s preučevanjem živali, ki so bile gojene v ujetništvu in znanih starosti. Osebk, ki po metamorfozi niso hibernirali, niso imeli nobenega LAG-a, tisti, ki pa so preživeli dve hibernaciji pa so imeli dva LAG-a (Castanet in sod., 1993).

2. Metoda ulova in ponovnega ulova:

S to metodo so številni avtorji dokazali, da se je število LAG-ov pri ponovno ulovljenem osebku povečalo za število, ki je enako številu let, ki so minila od prvega ujetja oz. prvega štetja LAG-ov. Hemelaar in Van Gelder (cit v Castanet in sod., 1993) sta izvedla metodo ulova in ponovnega ulova na navadni krastači (*Bufo bufo*). Ujetim osebkom sta vzorčila členke prstov, osebk označila ter izpustila. Na izbranih členkih prstov sta preštela število LAG-ov, ki sta jih čez nekaj let primerjala s številom LAG-ov, ponovno ulovljenih označenih osebkov. Podobna študija je bila narejena še na dveh vrstah pupkov (*Triturus marmoratus* in *T. boscai*), ki so bili po ulovu v ujetništvu gojeni v podobnih pogojih njihovega naravnemu habitatu (cit. v Castanet in sod., 1993).

3. Fluorescenčno označevanje

Fluorescenčno označevanje je v kombinaciji z metodo ulova in ponovnega ulova najboljši eksperimentalni pristop za potrditev starosti osebkov. Z vbrizgavanjem vitalnih fluorescenčnih barvil v različnih delih leta, lahko primerjamo fluorescenčne linije z različnimi rastnimi linijami (predvsem z LAG-i) in s tem določimo točen nastanek posameznih linij (sl. 1). Metodo so preizkusili na žabah, plazilcih in tudi na ribah, kjer so dokazali, da LAG-i nastanejo med vsako zimo (cit. v Castanet in sod., 1993).



Slika 1: Prečni prerez diafize femurja kuščarice (*Lacerta viridis*). Leva stran slike je nedekalcifirana rezina označena s fluorescenčnimi barvili na injiciranih na začetku vsake pomladi (c = kalcein in a = alizarin). Desna stran slike, je ista rezina po dekalifikaciji pobarvana s hematoksilinom. Vidno je ujemanje med LAG-i in fluorescenčnimi črtami, kar pomeni, da LAG-i nastanejo med zimskim obdobjem (Castanet in sod., 1993: 254)

2.2.1 Zgodovina skeletokronologije

Pri zgodnjih raziskavah starosti dvoživk s pomočjo skeletokronologije so bile uporabljene ploščate kosti lobanje, ki so bile proučevane pod presevno svetlobo. Pasovi aktivne rasti so bili vidni kot široke temnejše cone, LAG-i pa kot ozki svetlejši pasovi. Prvo uspešno raziskavo je leta 1940 na kosteh lobanje pri blatnem kužku *Necturus maculosus* opravil Senning (cit v Castanet in sod., 1993) in s tem dokazal, da je določanje starosti na podlagi rastnih linij natančna metoda. Metoda pa ni najbolj primerna za ugotavljanje starosti starejših osebkov pri katerih so LAG-i za natančno štetje preblizu skupaj (Smirina, 1994). Kasnejše raziskave so temeljile na dolgih kosteh okončin z modificirano tehniko (Sinsch, 2015), pri kateri so uporabili tanke rezine dekalciniranih dolgih kosti obarvanih z Ehrlich-ovim hematoksilinom. Pri tej modificirani tehniki so bili široki pasovi hitre rasti svetlejši, kot LAG-i, ti so bili intenzivneje obarvani (Smirina, 1994). Smirina (1972) (cit. v Castanet in sod., 1993) je dokazala, da analize členkov prstov zagotavljajo enako dobre rezultate, kot analize preostalih kosti. S to ugotovitvijo je skeletokronologija postala nedestruktivna metoda. Do danes je bilo narejenih ogromno raziskav osredotočenih na populacijsko ekologijo dvoživk v zmernih klimatih, medtem ko je število raziskav tropsko živečih osebkov mnogo manjše (Sinsch, 2015) in za jamske skorajda nepoznano (Miaud in Guillaume, 2005).

2.2.2 Uporabnost skeletokronologije

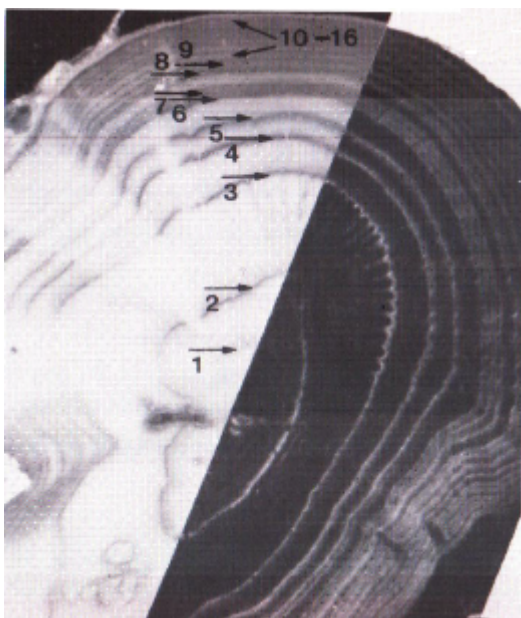
Poleg določanja starosti, lahko s histološkimi študijami kosti pri eni vrsti živali ali med vrstami ali med populacijami določimo čas spolne dozoritve, stopnjo rasti, spolne in medpopulacijske dimorfizme, cikle aktivnosti, okoljske pogoje v katerih organizem živi oz. je živel ter tudi obdobje smrti (cit. v Castanet in sod., 1993). Analize kostnega tkiva so izjemno pomembno kronološko orodje za raziskave populacijske biologije, evlucijskih mehanizmov, taksonomije in klimatologije za danes živeče živali, kot tudi za izumrle. Npr. študija danes živečih kuščarjev rodu *Gallotia* in izumrlega predstavnika *G.goliatah* je pokazala, da je bila velikost teles slednjih posledica visoke dolgoživosti in ne hitre rasti (Castanet in sod., 1993).

2.3 RASTNE LINIJE (RL)

Rastne linije (RL) so že dolgo poznan pojav v vretenčarskih kosteh. Opisane so bile že pri ribah kostnicah, pri sesalcih, plazilcih ter pri dvoživkah (cit. v Castanet in sod. 1993). Lahko jih definiramo kot histološko izražene, časovno odvisne spremembe v rasti kostnega tkiva (Castanet in sod. 1993). Znano je, da so RL povezane z endogenimi ritmi in močno sinhronizirane in ojačane z okoljskimi sezonskimi cikli (cit. v Jakob, 2002). Ta razlaga nastanka RL pojasni, zakaj se te pojavljajo tudi pri vretenčarjih, ki živijo v razmeroma konstantnih klimatskih pogojih in ne samo pri tistih, ki so podvrženi sezonskim spremembam. Pri organizmih, ki živijo pod močnimi sezonskimi spremembami so zasledili močnejšo izraženost rastnih linij (Castanet in sod., 1993). Določene RL so lahko povezane tudi z reproduktivnimi cikli, druge pa z neperiodničnimi, močno stresnimi dogodki, kot so npr. metamorfoza, nenormalne klimatske spremembe, bolezni ali individualna obdobja stradanja (cit. v Castanet in sod., 1993).

RL se na vretenčarskem skeletu pojavljajo na vseh delih primarnega periostalnega kompaktnega kostnega tkiva, večinoma v lamelarni kosti, redkeje v fibrozni kostnini (cit. v Castanet in sod., 1993). Zaradi strukture kosti so RL manj izrazite pri predstavnikih družine brezpljučarjev (*Plethodontidae*), saj so kosti grajene predvsem iz kostnine, ki jo gradijo paralelno organizirana kolagenska vlakna (Wake in Castanet, 1995). Tak tip kostnine imenujemo psevdo-lamelarna kost, kjer je malo osteocitov, ki so veliki in naključno razporejeni (Ontañón in sod. 2000). Taka sestava kostnine lahko zelo spominja na LAG-e in se lahko hitro zamenja za le-te. Poleg tega je stopnja osteogeneze pri lamelarni kostnini nižja, kot pa pri psevdo-lamelarni kostnini (cit. v Castanet in sod., 1996). Stopnja osteogeneze in tip kostnine določata izrazitost RL in sta značilnost posameznih družin dvoživk. Prav ta korelacija, med nizko stopnjo osteogeneze in lamelarno strukturo kosti, naj bi bila vzrok za pojav alometrije (Castanet in sod. 1996). Okončine so pri takšnih osebkih relativno majhne v primerjavi s preostalim telesom. Odsotnost RL lahko pojasnimo tudi s preoblikovanjem kosti, ki lahko sekundarno odstrani primarno kost in RL. RL lahko opazujemo direktno na površini ploskih kosti pod reflektivno svetlobo ali pa z uporabo obarvanih, tankih histoloških rezin (10 – 100 µm) demineraliziranih dolгих kosti pod svetlobnim mikroskopom (sl. 2.). Pri dvoživkah in plazilcih najboljše rezultate zagotavljajo dolge kosti, medtem ko pri sesalcih pride bolj v poštev zobovje. RL lahko zaradi strukture in morfogeneze kosti, variirajo tudi na različnih

predelih iste kosti, med kostmi istega osebk in se spreminjajo od izvalitve do smrti. Pred spolno zrelostjo so RL ločene s širokim pasom kostnega tkiva, ki se s starostjo zmanjšuje (sl. 2). Z zaustavitvijo skeletne rasti se ustavi tudi nastanek linij, zato je pri takšnih osebkih nemogoče določati starost na podlagi RL. (Castanet in sod., 1993).



Slika 2: Prečni prerez dorzalne plavuti krapa (*Cyprinus carpio*). Z naraščanjem starosti so RL razporejene vedno bolj na gosto. Leva polovica je posneta pod reflektivno svetlobo s črnim ozadjem, desna pa pod presevno svetlobo (Castanet in sod., 1993: 250).

Pas enega rastnega cikla lahko razdelimo na tri regije: hitro rastoče ali neprosojne plasti, počasi rastoče plasti ali »annule« in LAG-e (sl. 3).

2.3.1 Hitro rastoče plasti

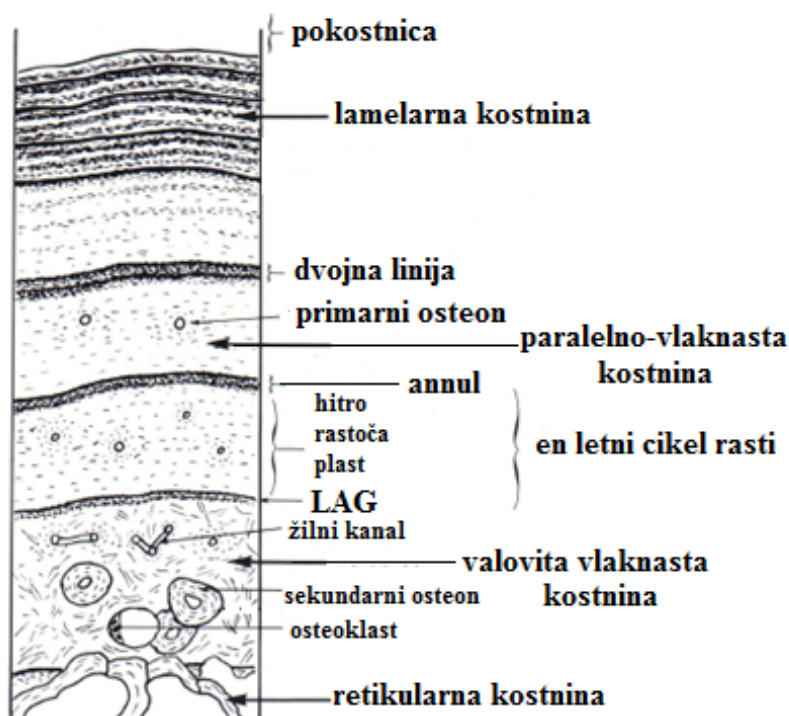
Ta območja so posledica hitre rasti kostnega tkiva med aktivno osteogenezo in so najširše linije v kostnem tkivu. V mladih, hitro rastočih posameznikih so sestavljene iz valovite vlaknaste kosti s številnimi naključno razporejenimi okroglimi osteociti. Pri starejših, počasneje rastočih pa iz paralelne vlaknaste kosti ali lamelarne kosti z manj celicami, ki so bolj sploščene oblike. Zaradi posebne strukture je ta cona bolj kompaktna in je pod presevno svetlobo vidna kot temno območje, pod reflektivno pa kot svetli pasovi.

2.3.2 Počasi rastoče plasti

To so ožji pasovi kostnega tkiva, ki so posledica počasnejše rasti in zgrajeni iz lamelnarnega kostnega tkiva. Zaradi svoje prosojnosti so pod presevno svetlobo vidne kot svetlejše plasti, pod reflektivno pa temnejše.

2.3.3 Linije zavrte rasti

Te RL nakazujejo začasno ustavitev rasti za nekaj tednov. Te so najbolj prosojne in se pod polarizirano svetlobo kažejo kot nekaj mikrometrov debele svetle linije na kosti. Zaradi hipermineraliziranosti (Castanet in sod., 1993) in hematoksilinofilčnosti (Sinsch, 2015) se pri barvanju s temi barvili obarvajo bolj, kot preostalo tkivo. Lahko se pojavljajo znotraj annul-ov ali na njihovem robu ali pa samostojno.



Slika 3: Diagram spreminjanja splošne histološke zgradbe kostnega tkiva na prečnem prerezu korteksa dolge kosti v predelu diafize s staranjem osebkā (prirejeno po Castanet in sod., 1993: 252). Lamelarna kost (lamellar bone) se nalaga počasi, kjer so kolagenska vlakna organizirana v plasti, katere izgled spominja na zgradbo lesene vezane plošče. Valovita vlaknasta kostnina (woven bone) je hitro nalagajoča plast, za katero je značilna organizacija vlaken v različnih smereh. Paralelno-vlaknasta kost (parallel fibered bone) je po hitrosti nalaganja med lamelarno in valovito vlaknasto kostnino, kjer so vlakna organizirna paralelno druga na drugo, vendar bolj kot ne naključno (Boef in Larsson, 2007)

2.3.4 Težave pri določanju starosti z rastnimi linijami

Največji problem natančnega določanja starosti s pomočjo skeletokronologije je erozija periostalne kosti na meji z medularno votlino (cit. v Jakob in sod., 2002). Kost je živo tkivo, zato prihaja do resorpcije primarnega kostnega tkiva in nato do sekundarne osteogeneze z nalaganjem novega tkiva. To ima pomembno vlogo pri ohranjanju normalne funkcionalnosti kosti, preprečevanju njene atrofije oz. izgube mineralov in je pogojena s stresom iz okolja (Ontañón in sod. 2000). Do resorpcije kostnine lahko prihaja zaradi pomanjkanja kalcija v okolju, ki je pomemben za številne presnovne procese (cit. v Eden in sod, 2007). Z resorpcijo kostnine, pride do uničenja LAG-ov, lahko v celoti ali pa le do delnega uničenja zaradi lokalne omejenosti remodelacije. V primeru popolne resorpcije, pride do podcenitve dejanske starosti osebkov (Castanet in sod., 1993). Smirina (cit. v Jakob in sod, 2002) je predlagala, da naj bi bila stopnja resorpcije tkiva povezana s klimatskimi pogoji. Ta naj bi bila pri osebkih, ki živijo na višji nadmorski višini manjša, v primerjavi s tistimi, ki živijo na nižji nadmorski višini.

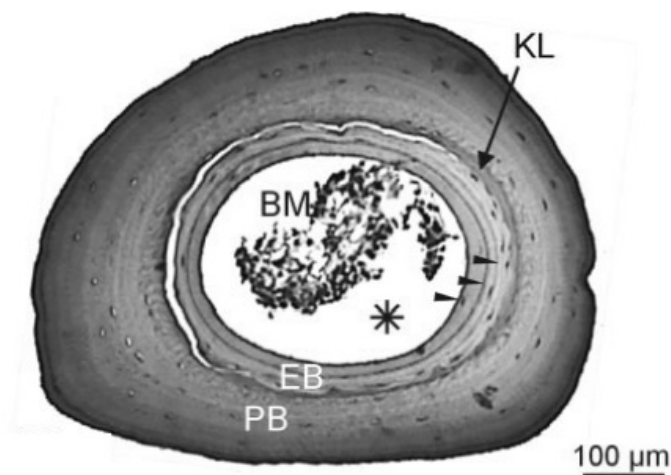
Poleg LAG-ov, se večinoma pri žabah pojavljajo še druge neperiodične linije, ki jih moramo izvesti pri določanju starosti. Neperiodične linije so:

Kastschenko-va linija, plast hrustančnega tkiva, ki ločuje periostalno in endostealno kostno tkivo ter je pogosto vidna kot vrzel med dvema vrstama kostnine (sl. 4). Njena vloga ni točno znana. Kastschenko (cit v Rozenblut in Ogielska, 2005) je predlagal, da ima vlogo ločevanja medularne votline od periostalne kosti in tvorbe endostealne kosti. Je nekakšen ostanek hrustančne zasnove ličink brezrepcev.

Linija metamorfoze nastane z upočasnjeno rastjo znotraj prve rastne cone ob zaključku metamorfe (Rozenblut in Ogielska, 2005). Pogosto je lahko le-ta pri repatih dvoživkah odsotna ali pa je združena s prvim LAG-om (Jakob in sod. 2002).

Dvojni LAG-i se pojavljajo, kot dve sosednji liniji, ki sta zelo blizu skupaj. Če so take linije prisotne v celotnem vzorcu in pri različnih starostnih razredih, lahko štejemo take dvojne linije, kot posledico le ene hibernacije. Dvojni LAG-i se pogosteje pojavljajo pri populacijah, ki živijo na višjih nadmorskih višinah (Castanet in sod., 1993). Lahko pa so

posledica prekinjene hibernacije zaradi višjih okoljskih temperatur ali zmanjšane rasti med estivacijo (cit. v Sinsch, 2015).



Slika 4: Prečni prerez členka prsta žabe v predelu diafize po 4. hibernaciji. Puščice označujejo tri sloje endostealne kosti. BM – kostni mozeg, * - medularna votlina, KL – Kastschenkova linija, PB – periostalna kost, EB – endostealna kost (Rotezenbult in Ogielska, 2005)

2.4 RAST IN RAZVOJ DOLGIH KOSTI PRI DVOŽIVKAH

2.4.1 Osifikacija kosti

Kastschenko (cit. v Rozenblut in Ogielska, 2005) je prvi, ki je opazil razliko v strukturi dolgih kosti med dvoživkami in sesalci, prav tako je med prvimi, ki so proučevali razvoj dolgih kosti pri dvoživkah. Pri dvoživkah se osifikacija hrustančnih osnov dolgih kosti začne ob koncu premetamorfoze in je zaključena med metamorfoznim klimaksom (Čiçek in sod., 2011). Hitrost osteogeneze je vrstno specifična, vendar je zaporedje osifikacije pri vseh vrstah enako (Rozenblut in Ogielska, 2005). Osifikacija prične v proksimalnih delih okončin in napreduje proti distalnemu delu. Najprej začnejo osificirati femur, tibija in fibula, nato tarzalni ter metatarzalni elementi in nazadnje še členki prstov. Pri sprednji okončini je zaporedje enako, z izjemo karpalnih elementov, ki osificirajo zadnji, načeloma šele po metamorfozi (Kemp in Hoyt, 1969).

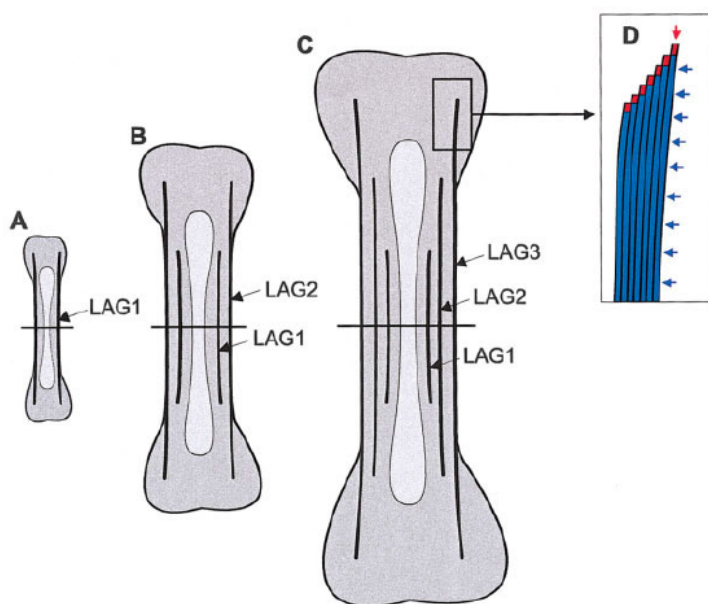
Pri dvoživkah, za razliko od drugih skupin, prevladuje perihondralna osifikacija (Čiçek in sod., 2011). Zunanji sloji hrustančnih celičnih zasnov za kosti se diferencirajo v pokostnico, ki nalaga kostnino. Kostno tkivo se najprej začne nalagati na centralnih delih diafiz, nato nalaganje tekom razvoja počasi napreduje proti epifizam. Epifize mineralizirajo šele po četrti hibernaciji (Rozenblut in Ogielska, 2005). Ob formaciji periostalne kosti, postanejo hondrociti hipertrofirani ter nepravilnih oblik (Čiçek in sod., 2011). Spremenjene hrustančne celice degenerirajo v mezigovno votlino v kateri začne pri anurih nastajati kostni mozeg skupaj s tvorbo prehranjevalnih kanalov in krvnih žil v kostnem tkivu. Degeneracija celic napreduje proti obema koncema epifiz in se ustavi, ko medularna votlina doseže epifizi in nastopi metamorfozni klimaks. Po prvi hibernaciji je mezigovna votlina že zelo dobro razvita v obliko peščene ure – najožja v diafizi in najširša v epifizah (sl. 5). Diafize rastejo z longitudinalno rastjo, ki je posledica aktivnosti posebnega dela pokostnice v epifizah (sl. 5D), ki nalaga kostno tkivo na terminalnih delih pokostnice. Istočasno poteka rast v širino z nalaganjem kostnega tkiva z robnega dela pokostnice vzdolž celotne dolžine periostalne kosti (sl. 5D) (Rozenblut in Ogielska, 2005).

Epifize so s koncem metamorfoznega klimaksa dobro diferencirane pri vseh kosteh in sestavljene iz epifiznega hrustanca. Le-tega periostalna kost deli na zunanji – sklepní in notranji – metafizni hrustanec. Metafizni hrustanec se tekom prvega leta sorazmerno večja z diametrom periostalne kosti. Kasneje začnejo celice degenerirati, medularna votlina se

podaljša, rob med njo in metafiznim hrustancem pokosteni. Sklepni hrustanec popolnoma pokosteni šele s četrto hibernacijo ali pa ostane popolnoma hrustančen (cit. v Rozenblut in Ogielska, 2005).

2.4.2 Nastanek linij zavrte rasti

Med prvo hibernacijo se rast živali začasno ustavi, in tako nastane prvi LAG, ki leži pod periostom in se razteza preko celotne dolžine diafize vse do začetkov epifiz (sl. 5A). V drugem letu življenja se povečata debelina in dolžina kostnega tkiva, medtem ko se dolžina prvega LAG-a ne spremeni in ostane konstanta. Med drugo hibernacijo pride do tvorbe drugega LAG-a, ki je daljši od prvega (sl. 5B). Med naslednjimi hibernacijami pride do tvorbe preostalih LAG-ov, ki so daljši od prvega in drugega LAG-a, vendar so med seboj podobnih dolžin, saj se po tretjem letu rast dvoživk občutno upočasni. Dolžine LAG-ov so konstantne in se s starostjo ne spreminjajo. Npr. dolžina prvega LAG-a je enaka dolžini diafize v prvem letu življenja (sl. 5A), dolžina drugega LAG-a pa ustreza dolžini diafize v drugem letu življenja (sl. 5B) (cit. v Rozenblut in Ogielska, 2005).



Slika 5: Shema vzdolžnega prereza dolge kosti žabe po prvi hibernaciji (A), drugi hibernaciji (B) in tretji hibernaciji (C). D: Periost pod večjo povečavo, modro obarvani predeli označujejo zaporedno nalaganje kostnega tkiva (rast kosti v širino), rdeči obarvani predeli periosta pa rast kosti v dolžino (Rozenblut in Ogielska, 2005).

2.5 PRIMERJAVA OSNOVNE ZGRADBE OKONČIN DVOŽIVK

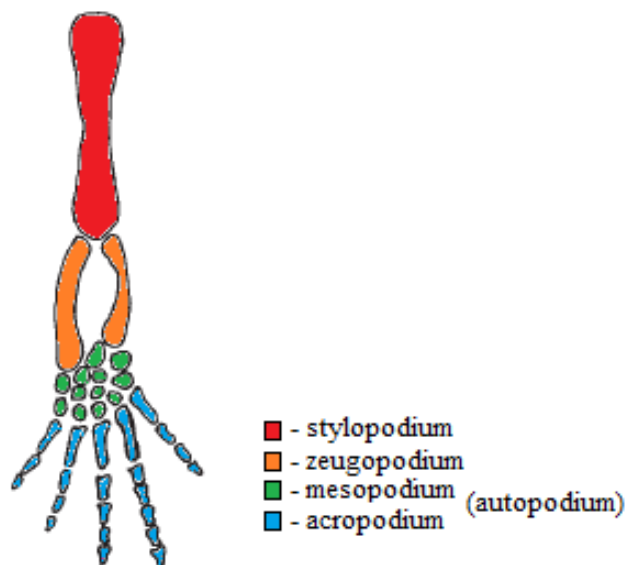
Okončine tetrapodov gradijo trije osnovni elementi: a) stilopodium ali zgornji del okončine, b) zeugopodium ali spodnji del okončine in c) autopodium ali dlan/stopalo (sl. 6). Zgornji del okončine gradi humerus ali nadlahtnica oz. femur ali stegnenica, spodnji del gradita tibija ali golenica in fibula ali mečnica oz. radius ali koželjnica in ulna ali podlahtnica (Wagner in Chiu, 2001). Radius in tibija sta na notranji strani okončine (Duellman in Trueb, 1994). Tretji segment (autopodium) je sestavljen iz dveh podsegmentov: a) proksimalnega mesopodiuma, ki ga gradijo majhne, kratke kosti (karpalni elementi ali zapestnice in tarzalni elementi ali klini) in b) akropoduma – majhne dolge kosti (metakarpalni elementi ali dlančnice ter metatarzalni elementi ali stopalnice in phalanges ali členki prstov) (Wagner in Chiu, 2001). Prihaja lahko do redukcije števila prstov, z izgubo elementov lateralno nameščenih prstov (Duellman in Trueb, 1994).

Okončine se med skupinami dvoživk razlikujejo predvsem v formuli prstnih členkov in številu prstov (sl. 7). Predstavniki repatih dvoživk imajo na sprednji okončini štiri metakarpalne elemente s štirimi prsti. Najpogostejša formula prstnih členkov je 1-2-3-2 ali 2-2-3-3. Zadnjo okončino sestavljajo štirje metatarzalni elementi, ki so povezani s petimi prsti, s formulo prstnih členkov 1-2-3-3-2. Pri nekaterih prihaja do redukcije njihovega števila, zaradi izgube členkov. Primer z močno reduciranim številom prstov je človeška ribica iz družine močerilarjev *Proteidae*, ki ima le tri metakarpalne elemente na sprednji in dva metatarzalna elementa na zadnji okončini (sl. 7). Formula prstnih členkov je 1-2-2 za sprednjo nogo in 2-2 za zadnjo. Število mezopodialnih elementov izkazuje reduciranost v številu ali prihaja do združitve več elementov, ki so v večini hrustančni (Duellman in Trueb, 1994).

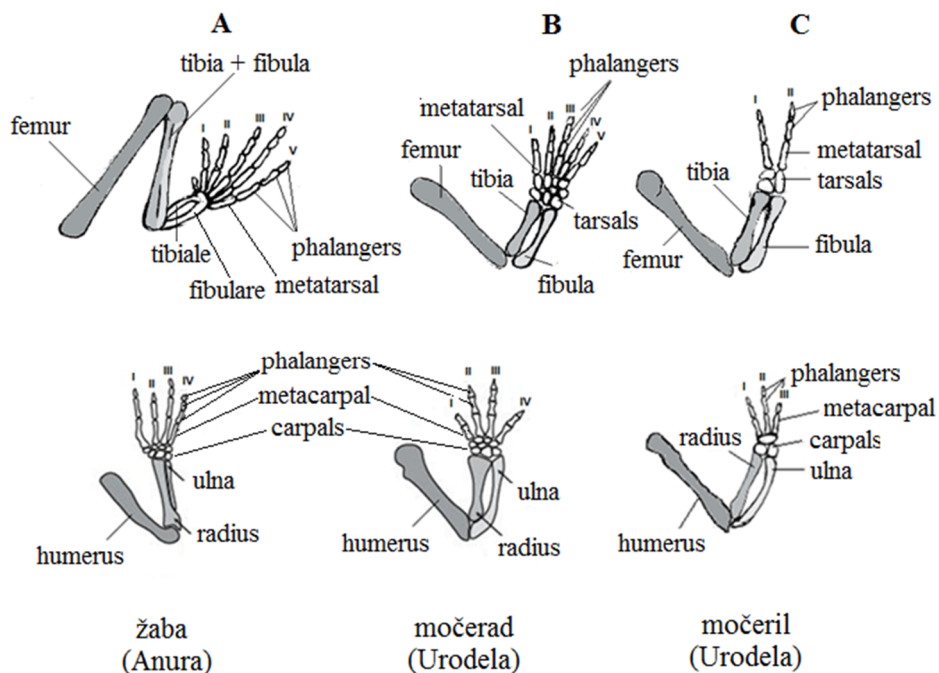
Gibalni skelet brezrepnih dvoživk je zaradi posebnega načina gibanja zelo prilagojen in spremenjen. Radius in ulna sta zlití v eno kost in tvorita kost radio-ulna. Število mesopodialnih elementov močno variira zaradi izgube ali zlitja elementov med saboj. Vsi anuri imajo po štiri prste na sprednjih okončinah s formulo členkov 2-2-3-3. Prihaja lahko do redukcije v dolžini prstov ali izgube členkov. Pri nekaterih vrstah se lahko oblikuje dodatni element v prstih ali pa so prstki pogosto modificirani v različne oblike.

Zadnje okončine so v primerjavi s prednjimi podaljšane. Femurju sledita združeni tibija in fibula v kost tibija-fibula. Tarzalni elementi so pri teh predstavnikih močno diferencirani

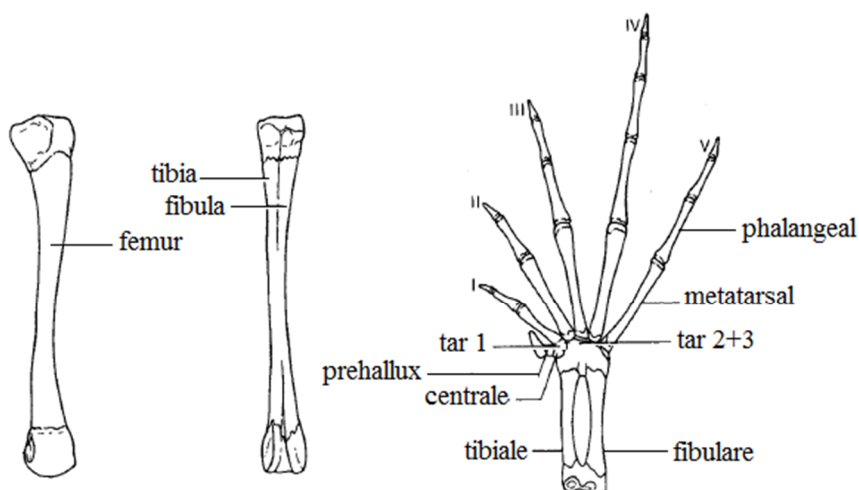
(sl. 8). Dva tarzalna elementa sta podaljšana v fibulare in tibijale, ki sta združena le v proksimalnem in distalnem delu, lahko pa sta združena tudi po celotni dolžini. Preostali trije tarzalni elementi so manjši. Vse žabe, z izjemo dveh vrst, imajo po pet metatarzalnih elementov in prstov s formulo 2-2-3-4-3. (Duellman in Trueb, 1994).



Slika 6: Shema osnovne zgradbe okončine tetrapodov (prirejeno po Wagner in Chiu, 2001).



Slika 7: Primerjava v zgradbi zadnje (zgoraj) in sprednje okončine (spodaj) pri različnih skupinah dvoživk (prirejeno po: Statham, 2012: 10).



Slika 8: Sprednja okončina žabe (*Rana esculenta*), dorzalni pogled (Duellman in Trueb, 1994: 357).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POSKUSNE ŽIVALI

3.1.1 Splošni opis močerila (*Proteus anguinus*)

Močeril ali človeška ribica je edini predstavnik evropskih vretenčarjev, ki živi v jamskem ekosistemu in je najpomembnejša biološka znamenitost podzemeljskih voda slovenskega krasa. Je dinarski endemit, saj je omejen le na območje Dinarskega krasa, od reke Soče v Italiji do reke Trebišnjice v Hercegovini (Sket, 1997). Prva omemba sega že v čas baroka, ko ga je leta 1689 v Slavi vojvodine Kranjske omenil Janez Vajkard Valvazor. Šele sto let kasneje, leta 1768, ga je znanstveno opisal in poimenoval avstrijski zoolog Laurenti (cit. v Bulog, 2013). Ime rodu *Proteus* izvira iz imena grškega mitološkega boga morij in rek – Proteusa, vrstni pridevek *anguinus* pa iz njegove poldogovate, kačaste oblike (*anguinus* – kačast) (Bulog, 2013).

Močeril se je najverjetneje razvil iz predstavnikov, ki so spominjali na današnjega črnega močerila in so živeli v površinskih vodah. Na podlagi genetskih raziskav menijo, da naj bi različne rase ali celo vrste nastale v času pliocena. Severnejše populacije so se v podzemlje preselile pred manj kot 10.000 leti, medtem ko so njihovi površinski sorodniki izumrli (cit. v Bulog, 2013).

Je neotenična dvoživka, kar pomeni, da se zaradi upočasnjene telesnega razvoja ne preobrazi popolnoma in obdrži nekatere karakteristike, ki so značilne le za stadij ličink (Bulog, 2013). Najverjetnejši vzrok je v neodzivnosti tkiv na ščitnične hormone (cit. v Bulog in sod. 2000). Bela podvrsta močerila (*Proteus anguinus anguinus*) ima troglomorfne značilnosti – pokrnele oči, nesorazmerno rast glave in okončin glede na telo in kožo brez pigmentov (sl. 9). Črna podvrsta močerila (*Proteus anguinus parkelj*) ima dokaj normalno razvite oči in temno pigmentirano kožo, čeprav enako kot beli, živi le v jamskem okolju (sl. 10) (Bulog, 2013). Obe podvrsti sta prilagojeni na pomanjkanje hrane, imata upočasnjeno presnovo in razvoj, majhno število potomcev, visoko življenjsko dobo, ter bolj razvita nekatera čutila v primerjavi z drugimi dvoživkami. Imajo tudi sposobnost zaznavanja magnetnega polja (Bulog in sod. 2000). Močeril je predator, ki se pretežno hrani s polži in rakci ter med poletjem tudi z insekti. Brez hrane lahko preživi celo več kot deset let (Bulog in sod. 2000). Svetlobo zaznava preko kože, v kateri je prisoten vidni pigment, na svetlobo pa so občutljive tudi zakrnele oči. S tem se najverjetneje izognejo

izhodom iz jam, saj so v površinskih vodah zelo ogroženi zaradi številnih plenilcev (Bulog, 2013). Močeril diha s škrgami in kožo, v manjšem delu tudi s pljuči, ki prevzamejo večjo vlogo, kadar se količina kisika v vodi zmanjša. Takrat pogosto plavajo na površino, kjer zajemajo zrak (Bulog, 2002).



Slika 9: Beli močeril (*Proteus anguinus anguinus*). (Foto: Domin Dalessi, 2012, Speleološki laboratorij Oddelka za biologijo)



Slika 10: Črni močeril (*Proteus anguinus parkelj*). (Foto: Domin Dalessi, 2012, Speleološki laboratorij Oddelka za biologijo)

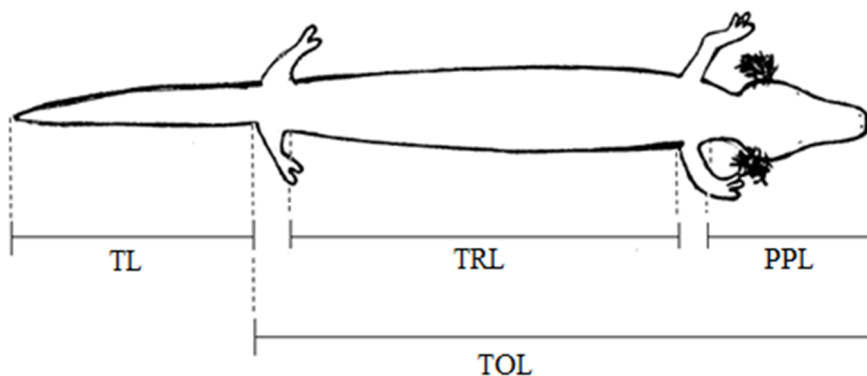
Zaradi majhne čistilne sposobnosti kraškega podzemlja in vedno večjega onesnaževanja je močeril ogrožena živalska vrsta. V zadnjih letih so znanstveniki ugotovili, da prihaja do povečanega kopičenja nekaterih težkih kovin (arzena in cinka) v tkivih močerilov. Poleg tega pa veliko grožnjo predstavljajo razni nitrati v gnojilih, ki imajo negativen vpliv na larvalne stadije in lahko povzročijo upad številčnosti populacij. V Sloveniji je močeril zaščitena vrsta in uvrščena na rdeči seznam ogroženih živalskih in rastlinskih vrst (Bulog, 2013).

3.1.2 Osebkki v raziskavi in telesne mere

V našo raziskavo smo vključili 32 arhiviranih osebkov, ki so se izlegli in bili vzgojeni v v jamskem laboratoriju v Moulisu v Franciji. Jamski laboratorij je bil ustanovljen v zgodnjih 60-tih letih, odrasli osebkki močerila pa so bili prinešeni iz Slovenije. Vsi osebkki so bili znanih starosti od 8 do 40 let in arhivirani v 70 % alkoholu (pregl. 1).

Osebkkom smo z milimetrskim papirjem izmerili dolžino telesa, glave, trupa in repa (sl. 11). Velikost osebkkov od gobčka do kloake so bile med 8,6 cm in 19 cm. Vsem osebkkom smo določili spol; 18 osebkkov je bilo moškega spola in 14 ženskega (pregl. 2).

Za skeletokronološko analizo smo uporabili sprednje in zadnje okončine desnega dela telesa. Opisali smo zgradbo okončin in izoliranih kosti, ter s pomočjo milimetrskega papirja in lupe izmerili njihovo dolžino. Poslikali smo jih s stereolupo Leica MZFLIII s kamero Leica DFC290 HD in shranili s programom Leica LAS 4.



Slika 11: Skica močerila (*P.a. anguinus*) z meritvami posameznih parametrov. TOL – dolžina od gobčka do kloake, PPL – dolžina glave (od konice gobca do sprednjih okončin), TRL – dolžina trupa med okončinama in TL – dolžina repa (od kloake do konice repa) (Rošer, 2015; prirejeno po Kranjec Neda, Razširjenost in variabilnost močerila, dip.delo, 1981).

Preglednica 1: Podatki o poskusnih živalih, *Proteus anguinus anguinus*.

Oznaka osebka	Leto skotitve	Leto pogina	Starost (leta)
Pa 8-1	1997	2005	8
Pa 9-1	1998	2007	9
Pa 9-2	1999	2008	9
Pa 10-1	1994	2004	10
Pa 12-1	1997	2009	12
Pa 12-2	1997	2009	12
Pa 13-1	1996	2009	13
Pa 13-2	1997	2010	13
Pa 14-1	1994	2008	14
Pa 14-2	1990	2004	14
Pa 15-1	1993	2008	15
Pa 15-2	1993	2008	15
Pa 16-1	1993	2009	16
Pa 17-2	1988	2005	17
Pa 18-1	1993	2011	18
Pa 18-2	1992	2010	18
Pa 19-1	1989	2008	19
Pa 23-1	1987	2010	23
Pa 25-1	1978	2003	25
Pa 27-1	1976	2003	27
Pa 27-2	1976	2003	27
Pa 30-1	1974	2004	30
Pa 30-2	1974	2004	30
Pa 31-1	1976	2007	31
Pa 32-1	1976	2008	32
Pa 32-2	1976	2008	32
Pa 34-2	1974	2008	34
Pa 35-1	1976	2011	35
Pa 36-1	1974	2010	36
Pa 36-2	1970	2006	36
Pa 37-1	1974	2011	37
Pa 40-1	1970	2010	40

Preglednica 2: Podatki o spolu in telesnih merah poskusnih živalih, *Proteus anguinus anguinus*.

Oznaka osebk	Spol	TOL [mm]	PPL [mm]	TRL [mm]
Pa 8-1	M	86	20	65
Pa 9-1	M	86	18	56
Pa 9-2	M	94	21	65
Pa 10-1	F	118	35	83
Pa 12-1	F	107	21	71
Pa 12-2	M	116	26	85
Pa 13-1	F	103	22	68
Pa 13-2	M	116	24	83
Pa 14-1	F	129	28	89
Pa 14-2	M	133	28	92
Pa 15-1	M	134	28	87
Pa 15-2	M	105	23	68
Pa 16-1	M	107	25	69
Pa 17-2	F	146	30	95
Pa 18-1	F	120	27	79
Pa 18-2	M	135	28	83
Pa 19-1	F	113	27	76
Pa 23-1	F	129	27	86
Pa 25-1	M	143	31	102
Pa 27-1	M	183	38	135
Pa 27-2	M	163	35	111
Pa 30-1	M	155	35	94
Pa 30-2	M	156	34	101
Pa 31-1	F	146	35	98
Pa 32-1	M	157	32	97
Pa 32-2	F	115	25	78
Pa 34-2	F	170	33	117
Pa 35-1	M	158	36	112
Pa 36-1	M	165	35	112
Pa 36-2	F	155	31	106
Pa 37-1	F	162	31	119
Pa 40-1	F	190	37	133

Legenda: F – ženski spol, M – moški spol, TOL – dolžina od gobčka do kloake, PPL – dolžina glave (od konice gobca do sprednjih okončin), TRL – dolžina trupa med okončinama, TL – dolžina repa (od kloake do konice repa).

3.2 PRIPRAVA TKIV

Vzorci izoliranih kosti smo pripravili za svetlobno mikroskopijo. Kosti smo fiksirali v 10 % formalinu, dekalcinirali, dehidrirali, bistrili v ksilenu, vklopili v paraplast in pripravili histološke rezine. Barvali smo jih bodisi z Weigert-ovim ali pa Ehrlich-ovim hematoksilinom (Gamble, 2008). Dekalcinacijo, dehidracijo in bistenje smo izvedli v mikrovalovni pečici Pelco Biowave, infiltracija in vklapljanje sta potekala po klasični metodi priprave tkiv za histologijo. Z uporabo mikrovalovne pečice skrajšamo čas procesiranja tkiv, prav tako so pogoji postopka kontrolirani. Mikrovalovi povzročijo nihanje molekul znotraj vzorca. Z nihanjem molekul nastaja energija v obliki toplote, kar povzroči segrevanje tkiva. Za razliko od konvencionalnega segrevanja, ki segreje le površino, se tu vzorec segreje enakomerno po celotnem volumnu. Prednost pa je tudi v hitrejšem in enakomernejšem prehajanju snovi v vzorec. Poleg tega omogoča natančno uravnavanje temperature ter spremljanje pogojev med samim postopkom in s tem zagotavlja boljšo ponovljivost postopka (ESB, 2015).

3.2.1 Fiksacija

Osebkci so bili predhodno fiksirani ter shranjeni v 70 % alkoholu. Zaradi ohranitve boljše strukture preparatov, smo jih naknadno fiksirali v 10 % formalinu preko noči. Pred samo dekalcinacijo smo vzorce čez noč sprali v destilirani vodi.

3.2.2 Dekalcinacija

Kostno tkivo je dinamični kompleks, sestavljen iz različnih celic, mineralov in organskega ekstracelularnega matriksa. Skozi življenje se kostno tkivo nenehno remodelira. Z odmiranjem ter nadomeščanjem kostnih celic, nalaganjem in resorpcijo kolagena in mineralov se izmenjujeta depozicija in resorpcija kostnega materiala, kar ohranja konstanto obliko in volumen kosti. Mineraliziran zunaj celični matriks daje kosti njeno značilno trdoto (Callis, 2008).

Zaradi svoje posebne strukture je kostno tkivo trše od vklopnega medija, ki smo ga uporabljali za pripravo rezin, kar onemogoča rezanje. Za uspešno rezanje je potrebno tkivo, pred vklapljanjem v paraplast dekalcinirati.

Dekalcinacija je postopek s katerim iz tkiva odstranimo kalcijeve minerale, s tem tkivo zmehčamo in omogočimo njegovo rezanje. Za odstranjevanje kalcija poznamo dve metodi.

Lahko uporabimo različno močne kisline ali manj agresivne helatorje. Kisline raztopijo kalcijeve soli in jih ionizirajo, helatorji pa jih vežejo nase. Dekalcinacija s kislinami je hitrejša, medtem ko je dekalcinacija s helatorji dolgotrajnejša, vendar pri tej metodi ne prihaja do poškodb tkiv, kot se lahko dogodi pri kislinah, če dekalcinacija ni natančno nadzorovana (Carson in Hladik, 2009).

Za dekalcinacijo smo uporabili 5 % dušikovo kislino. Ta je bila vedno sveže pripravljena, saj s staranjem postane preveč koncentrirana in lahko povzroči resnejše poškodbe tkiv (Callis, 2008). Da smo pospešili dekalcinacijo smo uporabili Pelco mikrovalovni sistem in s tem zmanjšali čas procesiranja tkiva. Postopek smo izvajali pri moči 450 W ter nižji temperaturi (37 °C), saj višja temperatura povzroči nabrekanje in razpadanje tkiva, kar vodi v neuporabnost vzorcev. Dekalcinacijsko tekočino smo menjavali na 15 do 30 minut, saj raztopljeni kalcijevi ioni v kislini zmanjšujejo uspešnost dekalcinacije (Callis, 2008).

Uspešnost dekalcinacije smo preverili z mehanskim »endpoint« testom, tako da smo kostem fizično preverili njihovo trdoto in upogljivost. Ko so bile kosti na otip mehke in smo jih lahko brez težav in poškodb prepognili smo postopek dekalcinacije zaključili. Test je pri dekalcinaciji zelo pomemben, saj lahko prekratka dekalcinacija onemogoči rezanje, predolga pa povzroči poškodbe tkiva, kar ima za rezultat neuporabnost vzorcev za nadaljnje raziskave. Poleg tega pa zaradi raznolikosti materiala (velikost, stopnja mineralizacije in debelina) ne moremo določiti točnih časov, ki so potrebni za posamezen vzorec.

Pred dehidracijo smo dekalcinirane vzorce eno uro spirali z destilirano vodo v mikrovalovni pečici pri moči 250 W in temperaturi 45 °C. Ali pa smo jih spirali čez noč, pri sobni temperaturi, da smo iz vzorca izprali vso dušikovo kislino.

3.2.3 Dehidracija

Dehidracija je postopek pri katerem iz tkiva odstranimo vodo in s tem tkivo pripravimo na vklapljanje v medije, ki se ne mešajo z vodo (Carson in Hladik, 2009). Dehidracijo moramo izvesti postopoma, s serijo alkoholov z naraščajočo koncentracijo, saj lahko prevelik koncentracijski gradient med tekočino zunaj tkiva in znotraj tkiva povzroči poškodbe celic. Čas dehidracije ne sme biti ne prekratek in ne predolg, saj nepopolna dehidracija prepreči prehajanje bistrilnim sredstvom skozi tkivo in s tem neučinkovito

infiltracijo. Predolga dehidracija povzroča trdost, lomljivost in krčenje tkiv (Spencer in Bancroft, 2008).

Uporabili smo naraščajočo alkoholno vrsto etanola (70 %, 96 % in absolutni etanol) in dehidrirali v mikrovalovni pečici 5 minut v 70 % ter 96 % etanolu in 2 x po 5 min v 100 % etanolu, pri moči 250 W in temperaturi 40 °C.

3.2.4 Bistrenje

Pred infiltracijo moramo iz tkiv odstraniti alkohol in ga zamenjati s snovjo, ki omogoči popolno infiltracijo. Za to uporabljamo bistrilna sredstva, kot so ksilen, toluen ali benzen. Ta morajo biti kompatibilna z dehidracijskimi in infiltracijskimi sredstvi, ki jih uporabljamo. Pozorni moramo biti, da bistrenje ni predolgo, saj tkivo lahko postane pretrdo in lomljivo, kar povzroča težave pri rezanju (Carson in Hladik, 2009).

Uporabili smo ksilen, ki je najpogosteje uporabljeno bistrilno sredstvo. Bistrili smo v mikrovalovni pečici, vedno v steklenih stekleničkah pokritih s stekleno petrijevko, brez dovajanja zračnih mehurčkov in temperaturne sonde. Bistrili smo v dveh serijah. Pri prvi seriji smo imeli nižjo moč 250 W, pri drugi smo uporabili višjo moč 650 W. Temperatura je bila pri obeh serijah 40 °C.

3.2.5 Vklapljanje v paraplast in priprava rezin

Po končanem bistrenju smo vzorce prenesli v plastične kasete in jih v paraplastu infiltrirali čez noč. Nato smo jih prenesli v sveži paraplast in jih infiltrirali še 24 ur. Po 48 urnem infiltriranju smo jih vključili v svež paraplast in jih oblikovali v blokce za rezanje. Z mikrotomom (Reichert Jung 2040) smo jih narezali na 8 µm debele rezine in jih raztegovali na grelni plošči pri 52 °C.

3.2.6 Barvanje

Rezine smo barvali z Weigert-ovim ali z Ehrlich-ovim hematoksilinom (Gamble, 2008).

Weigert-ov železov hematoksilin sestavljata komponenti A in B, ki sta zmešani v razmerju 1:1. Komponento A je pred uporabo potrebno starati štiri tedne.

Komponenta A	1 g hematoksilina 100 ml absolutnega alkohola
Komponenta B	2,5 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4,5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 ml HCl 298 ml destilirane H_2O

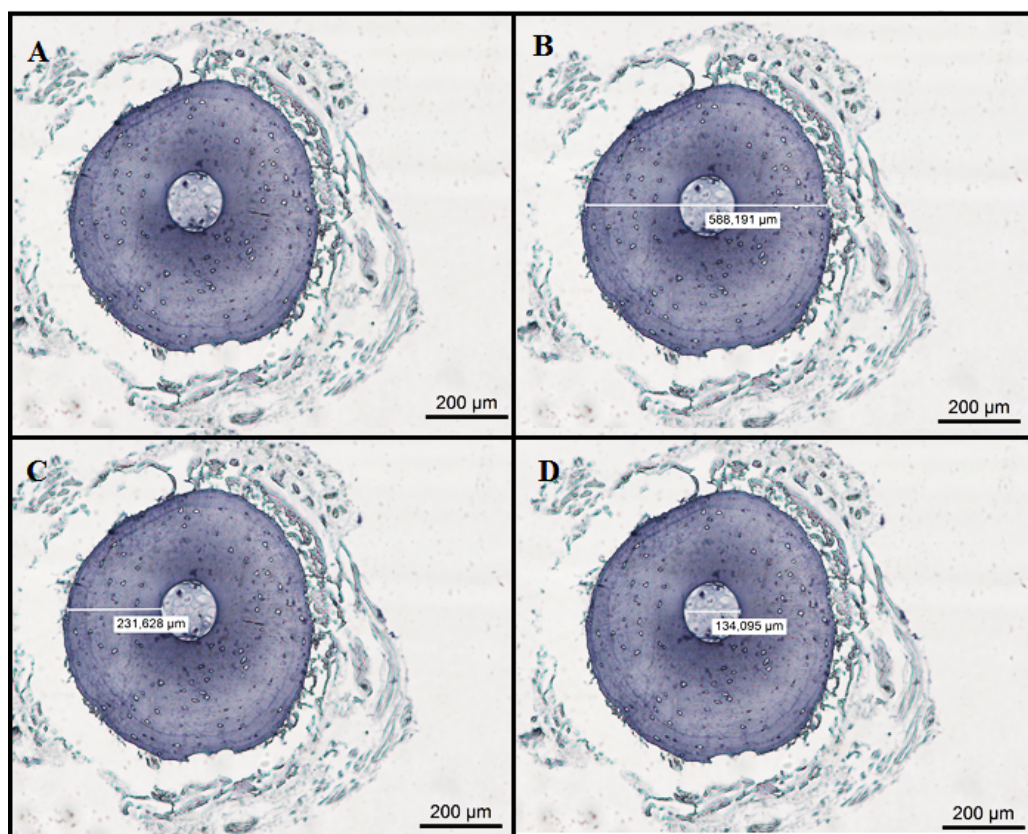
Barvilo smo lahko nepredušno zaprto hranili v hladilniku do tri tedne oz. dokler ni postalo rjave barve. Pred vsakim barvanjem ga je bilo potrebno prefiltrirati.

Za barvanje z Ehrlich-ovim aluminijevim hematoksilinom smo uporabili komercialno barvilo (Carl Roth GmbH + Co. KG, Nemčija).

Pred barvanjem smo v ksilenu (2 x 3 min) odstranili paraplast in rehidrirali v padajoči koncentracijski alkoholni vrsti (2 x 3 min – propanol, 96 % etanol in 70 % etanol) ter sprali v destilirani H_2O . Z Weigert-ovim hematoksilinom smo barvali 2-5 minut, odvisno od starosti barvila. S sveže pripravljenim smo barvali le 2 minuti. Z Ehrlich-ovim hematoksilinom smo barvali 1 h. Po barvanju smo vzorce temeljito sprali pod tekočo vodo, jih s hitrim prehodom preko naraščajoče alkoholne vrste (70 % etanol, 96 % etanol in propanol) dehidrirali in bistrili v ksilenu. Rezine smo prekrili s sintetično smolo (Pertex®, Medite GmbH, Nemčija) in s krovnimi stekelci.

3.3 MIKROSKOPIRANJE

Preparate smo pregledali s svetlobnim mikroskopom OPTON-Axioskop Zeiss, jih dokumentirali z digitalno kamero Leica DFC290 HD in jih shranili z računalniškim programom Leica LAS 4. Slikali smo vse kosti vseh osebkov v predelu diafize (pri enem osebkju smo dokumentirali še predele v epifizah in distalnih diafizah) ter izmerili premer kosti, premer medularne votline in debelino kostnega tkiva (sl. 12). Slikali smo pri 100-kratni in 400-kratni povečavi. Slike smo uredili s pomočjo Slikarja in programa Adobe Photoshop CC 2014. Opisali smo histološko zgradbo kosti in prešteli število LAG-ov. LAG-e smo šteli pri 100-kratni povečavi v predelu diafiz s svetlobnim mikroskopom OPTON-Axioskop Zeiss.



Slika 12: Meritve premerov različnih predelov kosti. Prečni prerezi femurja v predelu diafize (A). Meritev premera kosti (B), meritev debeline kostnega tkiva (C) in meritev medularne votline (D). (Rošer, 2015)

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

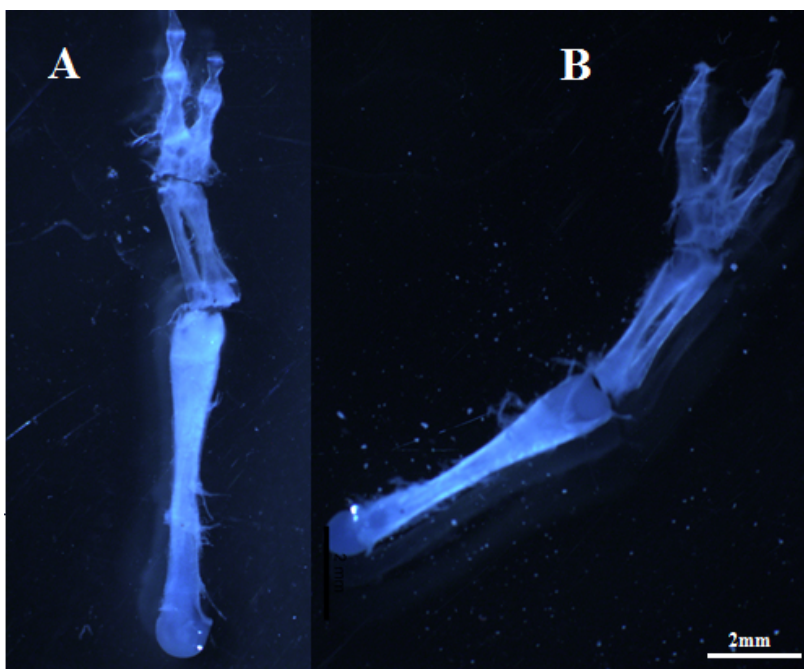
Statistično analizo smo naredili v programu GraphPad Prism 5. Primerjali smo različne telesne parametre (dolžino trupa, okončin, kosti, glave...) s starostjo osebkov ter telesne parametre in starost s preštetimi LAG-i. Za analizo smo uporabili tibijo in radius, saj so bili LAG-i na teh kosteh najlepše vidni. Za ugotavljanje odvisnosti med starostjo in številom LAG-ov smo naredili linearno regresijo, saj smo predvidevali, da število LAG-ov s starostjo linearno narašča. Povezavo med ostalimi parametri, ki s starostjo ne naraščajo linearno smo testirali z uporabo Spearman-ove oz. Pearson-ove metode, odvisno od razporejenosti podatkov.

4 REZULTATI

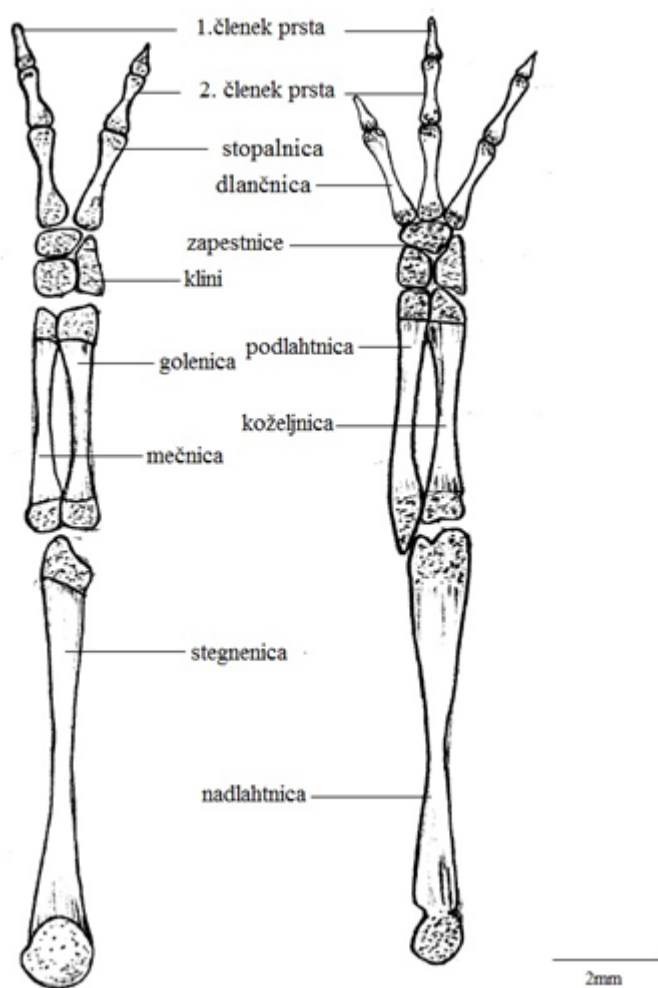
4.1 ZGRADBA IN VELIKOST OKONČIN

Sprednjo okončino sestavljajo humerus, ulna, radius, karpalni elementi zapestja, metakarpalne kosti in členki prstov (sl. 13 in 14). Zadnja noga je grajena iz femurja, tibije, fibule, tarzalnih elementov gležnja, metatarzalnih kosti in členkov prstov (sl. 13 in 14). Zadnja okončina ima dva prsta, z dvema členkoma, medtem ko ima sprednja tri prste od katerih imata dva po dva členka, eden pa le enega (sl. 14).

Kosti so mineralizirane, razen v predelu karpalnih in tarzalnih elementov ter v distalnih in proksimalnih epifizah, kar je razvidno iz vzorcev okončin pripravljenih s presvetlitveno tehniko (sl. 15). Pri tej tehniki se kostno tkivo obarva rdeče, hrustanec modro, ostala tkiva (mišice ter koža) pa postanejo transparentna. V našem primeru barvanje hrustanca ni bilo uspešno, hrustančna področja so ostala neobarvana.



Slika 13: Kosti zadnje (A) in sprednje (B) okončine močerila (*P.a. anguinus*), slikane s stereolupo.



Slika 14: Skica skeletne zgradbe zadnje (levo) in sprednje (desno) okončine močerila (*P.a. anguinus*).



Slika 15: Sprednja okončina močerila (*P. a. anguinus*), prezvetlitvena tehnika. Kostno tkivo je obarvano roza-rdeče, hrustanec ni obarvan.

Okončinam in posameznim kostem smo na milimetrskem papirju izmerili dolžino (prilogi D in E) ter pod mikroskopom debelino kosti (priloga F) in premer medularne votline (priloga G).

4.3.1 Korelacija med starostjo osebkov in okončinami ter kostmi

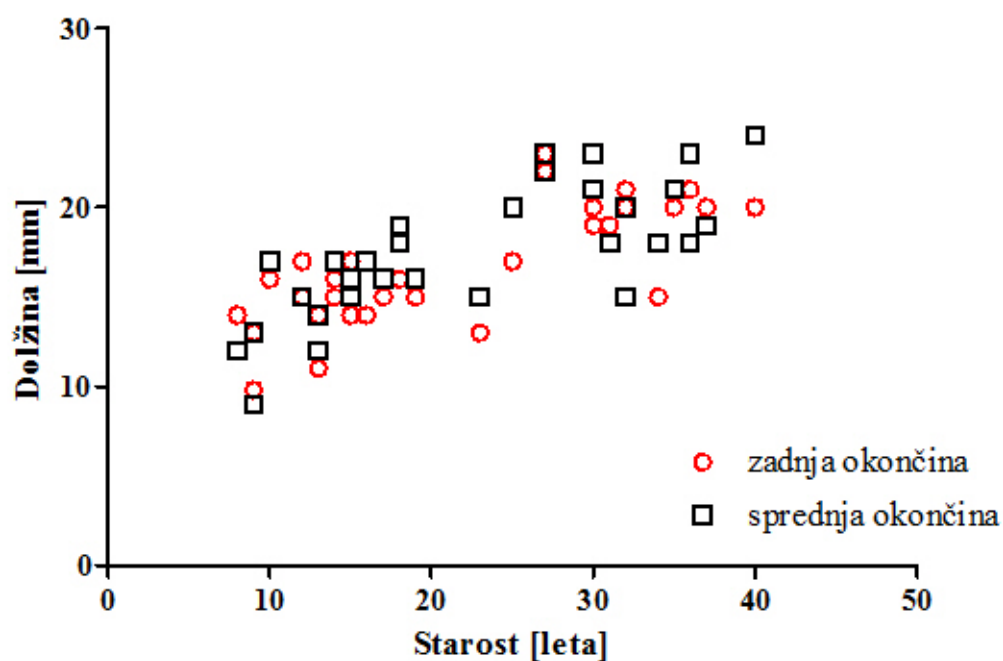
Okončine se s starostjo statistično značilno podaljšujejo (sl. 16). Med starostjo osebkov in dolžino okončin se pojavlja statistično značilna korelacija tako pri zadnji okončini ($r^2 = 0,6$ in $p < 0,0001$) kot pri sprednji okončini ($r^2 = 0,56$ in $p < 0,0001$). Sprednja okončina se s starostjo podaljšuje nekoliko hitreje, kot zadnja (sl. 16). Razpon v dolžini okončin med najmlajšim osebkom in najstarejšim je pri sprednji okončini med 9,0 in 24,0 mm ter pri zadnji med 9,8 in 23,0 mm.

Statistično analizo smo zaradi najboljše vidnosti LAG-ov naredili na kosteh spodnjega dela okončin. Uporabili smo radius sprednje okončine in tibijo zadnje okončine .

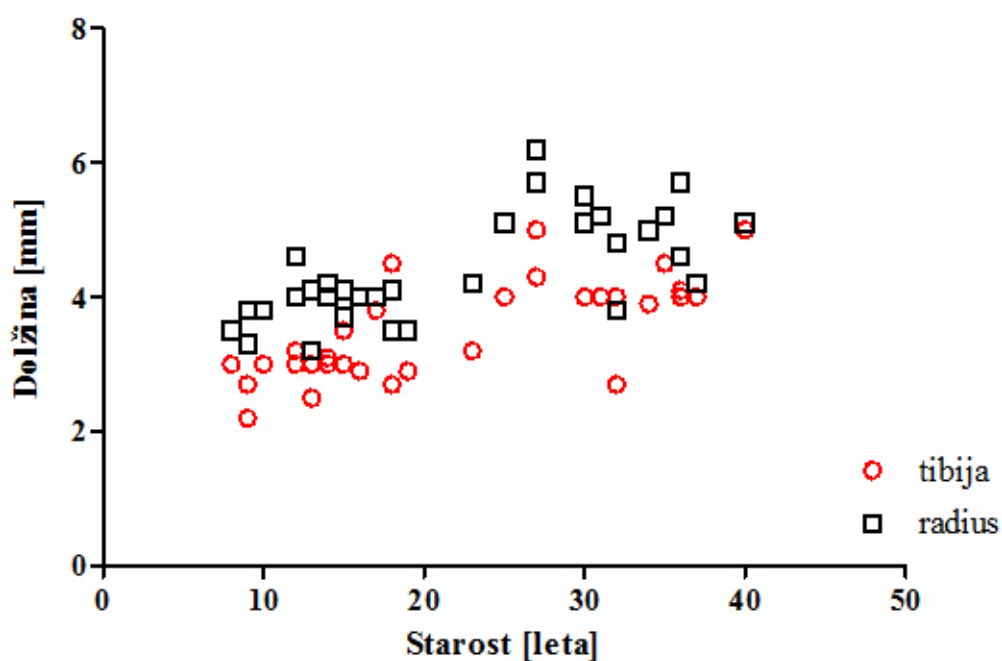
Kosti se s starostjo živali podaljšujejo (sl.17). Med starostjo in tibijo oz. radiusom je statistično značilna korelacija ($r^2 = 0,53$ in $p < 0,0001$ oz. $r^2 = 0,47$ in $p < 0,0001$). Dolžina tibije se giblje od 2,2 mm do 5,0 mm. Najkrajša izmerjena dolžina radiusa je bila 3,2 mm, najdaljša pa 5,7 mm.

Kosti se s starostjo debelijo, radius hitreje kot tibija (sl.18). Med njima je šibka linearna odvisnost ($r^2 < 0,3$). Debelino kosti smo vedno merili v predelu diafize. Debelina tibije se giba med 119,7 in 379,3 μm , debelina radiusa pa med 127,7 in 436,3 μm

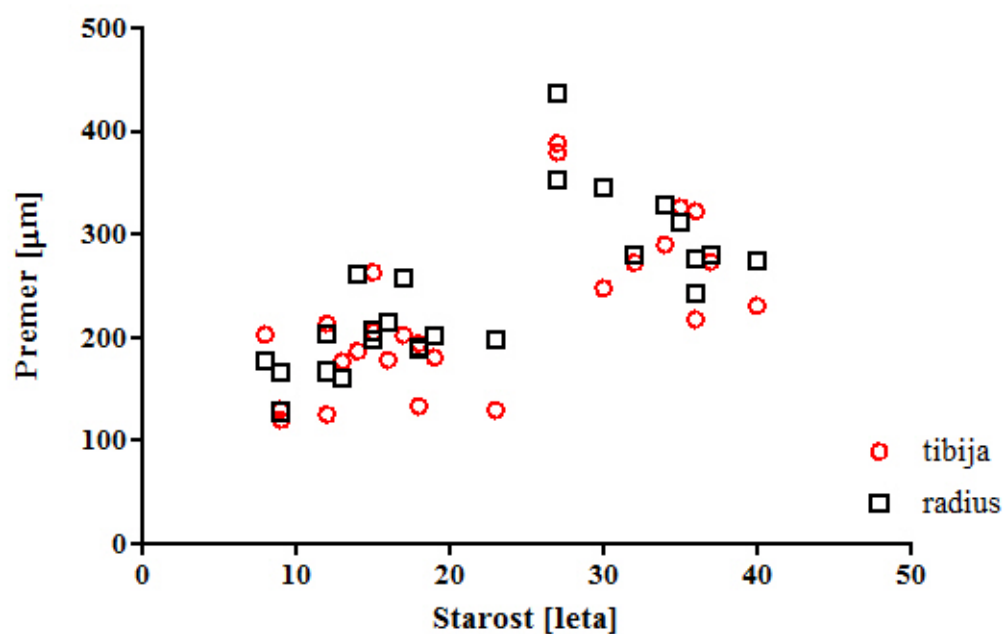
S starostjo se premer medularne votline skoraj ne spreminja (sl. 19). Starost ne vpliva na velikost medularne votline, saj je r^2 pri obeh kosteh manjši od 0,1. Najmanjši izmerjen premer medularne votline tibije je bil 45,0 μm in največji 160,0 μm . Pri radiusu pa najmanjši 66,0 μm ter največji 110 μm . Premer medularne votline se glede na celotno debelino kosti linearno zmanjšuje, vendar ne prihaja do statistično značilnih razlik ($r^2 < 0,1$).



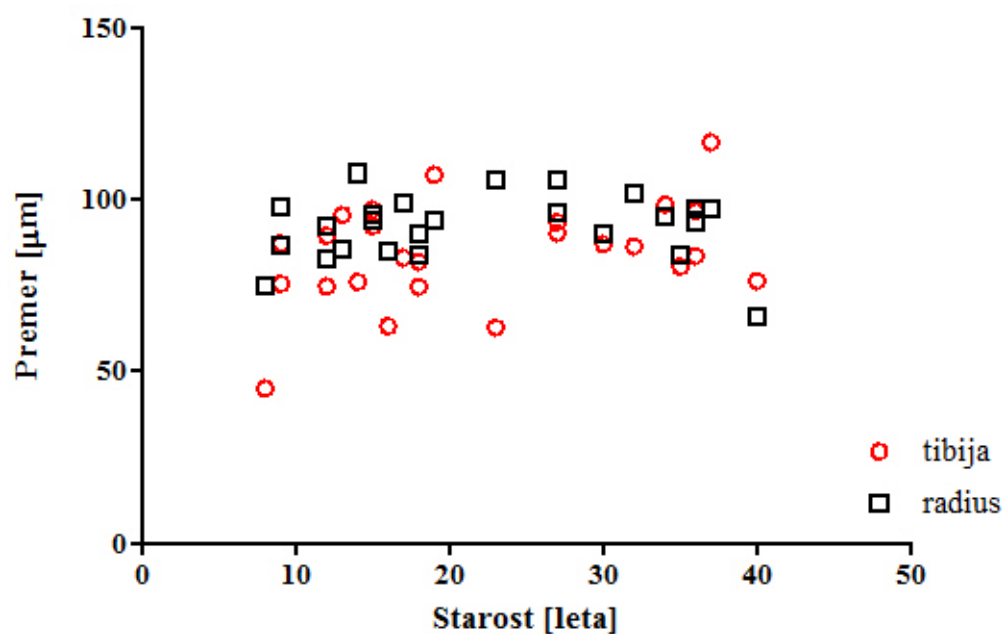
Slika 16: Primerjava dolžine sprednje in zadnje okončine s starostjo osebkov.



Slika 17: Primerjava dolžine tibije in radiusa s starostjo osebkov.



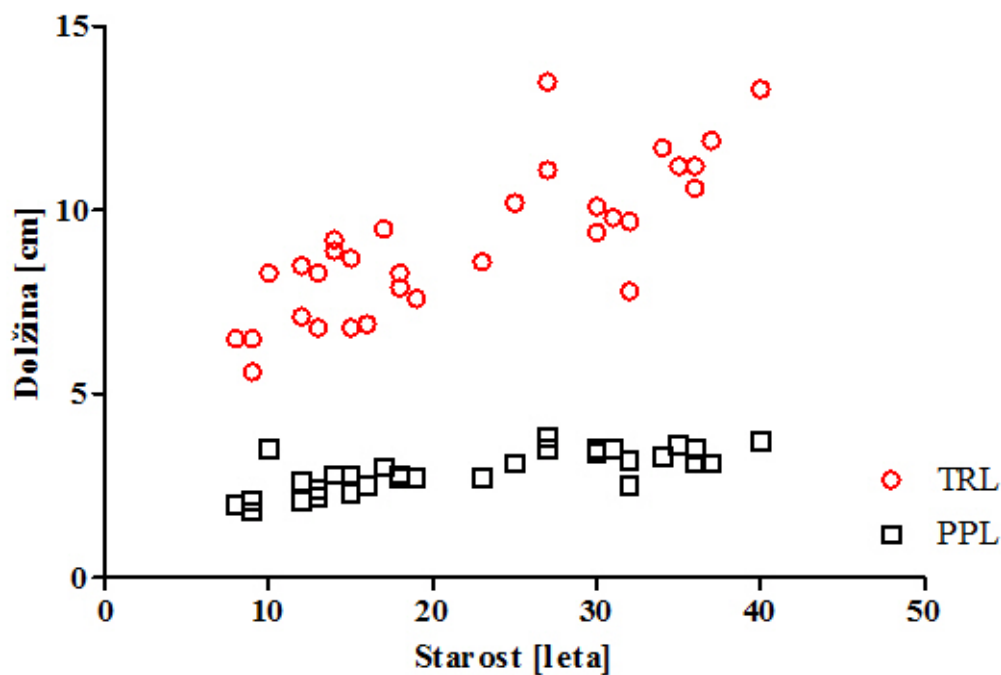
Slika 18: Primerjava premera tibije in radiusa s starostjo osebk



Slika 19: Primerjava premera medularne votline tibije in radiusa s starostjo osebk.

4.3.2 Korelacija med starostjo osebkov in telesnimi parametri

Preverili smo tudi, če obstaja korelacija med starostjo in telesnimi parametri – dolžino trupa in glave (sl. 20). Med njimi je statistično značilna korelacija ($r^2 = 0,64$ in $p < 0,0001$ za dolžino trupa ter $r^2 = 0,55$ in $p < 0,0001$ za dolžino glave).

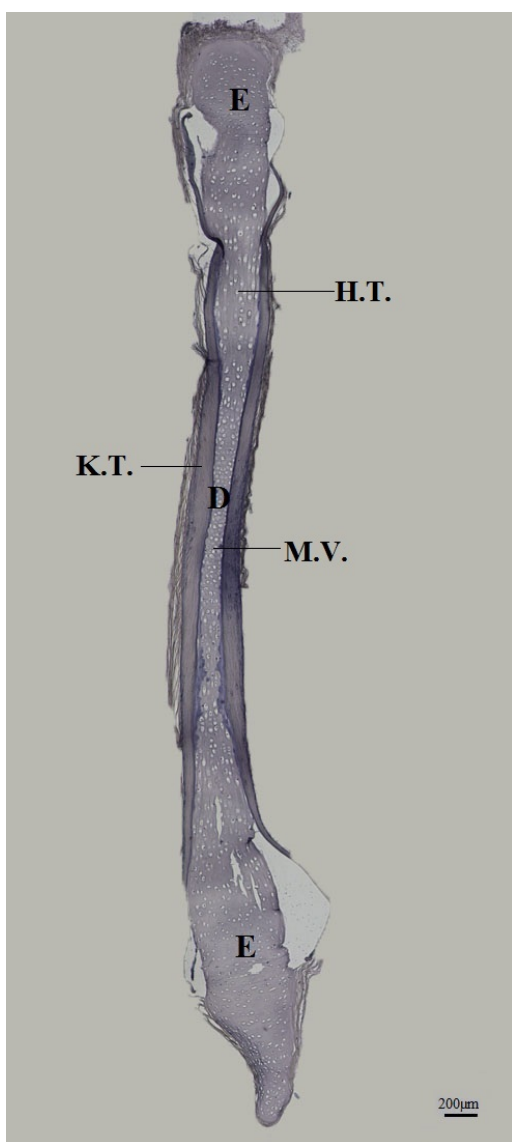


Slika 20: Primerjava dolžine trupa in glave s starostjo.

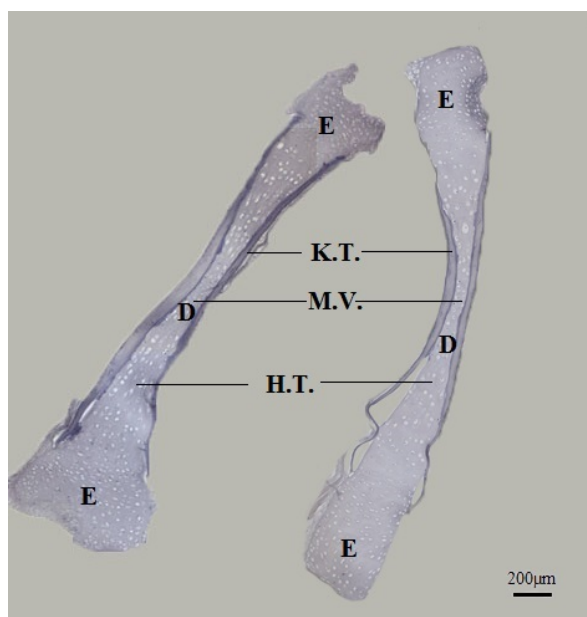
4.2 HISTOLOŠKA ZGRADBA OKONČIN

Vse kosti smo rezali prečno, razen kosti zadnjih okončin dveh osebkov (Pa 8-1, Pa 12-2) smo rezali vzdolžno.

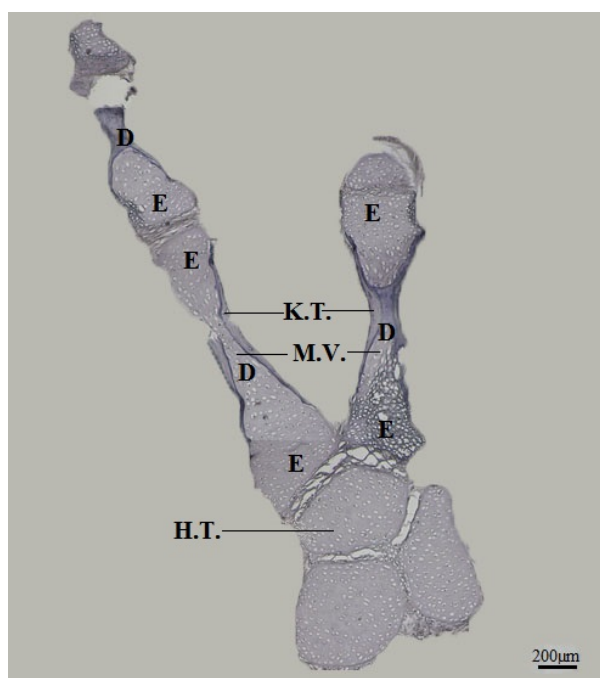
Dolge kosti sprednjih in zadnjih okončin so osificirane, le skrajni deli epifiz so hrustančni (sl. 21 in 22). Osificirani so tudi predeli diafiz vseh členkov sprednjih ter zadnjih prstov in tudi metakarpalni ter metatarzalni elementi. Karpalne kosti zapestja in tarzalne kosti gležnja so neosificirane in grajene le iz hrustanca (sl. 23).



Slika 21: Vzdolžni prerez femurja. Barvanje Weigert hematoksilin. E - epifiza, D – diafiza, K.T. – kostno tkivo, H.T. – hrustančno tkivo, M.V. – medularna votlina.

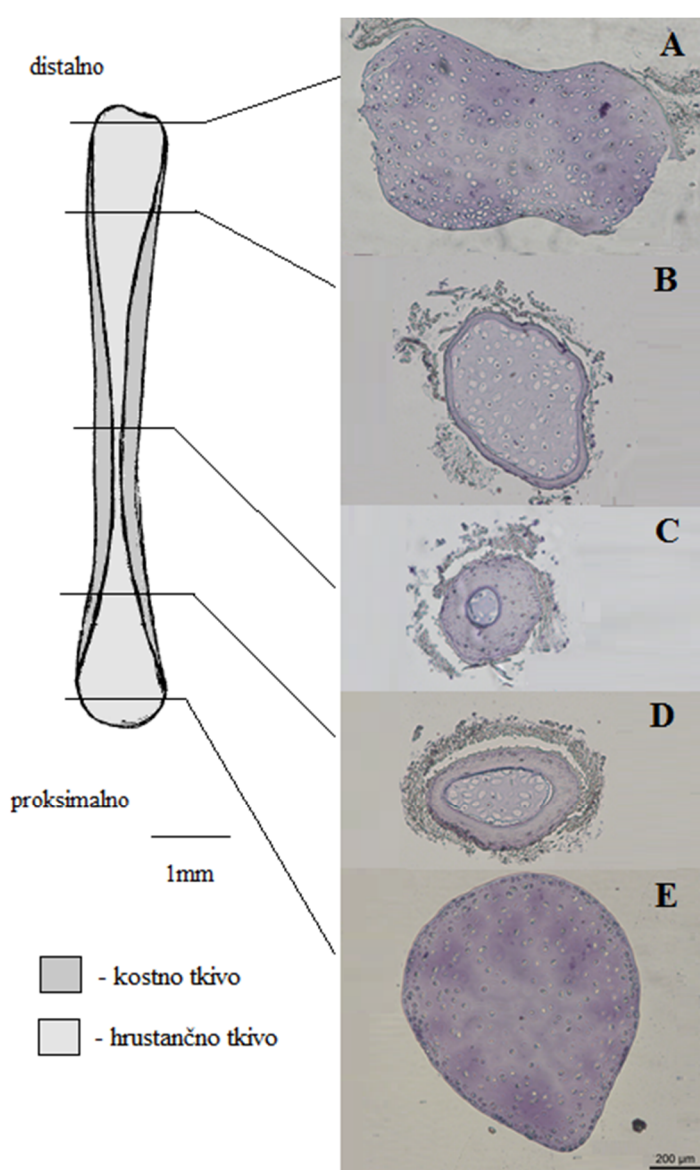


Slika 22: Vzdolžni prerez tibije (levo) in fibule (desno). Barvanje Weigert hematoksilin. E - epifiza, D – diafiza, K.T. – kostno tkivo, H.T. – hrustančno tkivo, M.V. – medularna votlina.

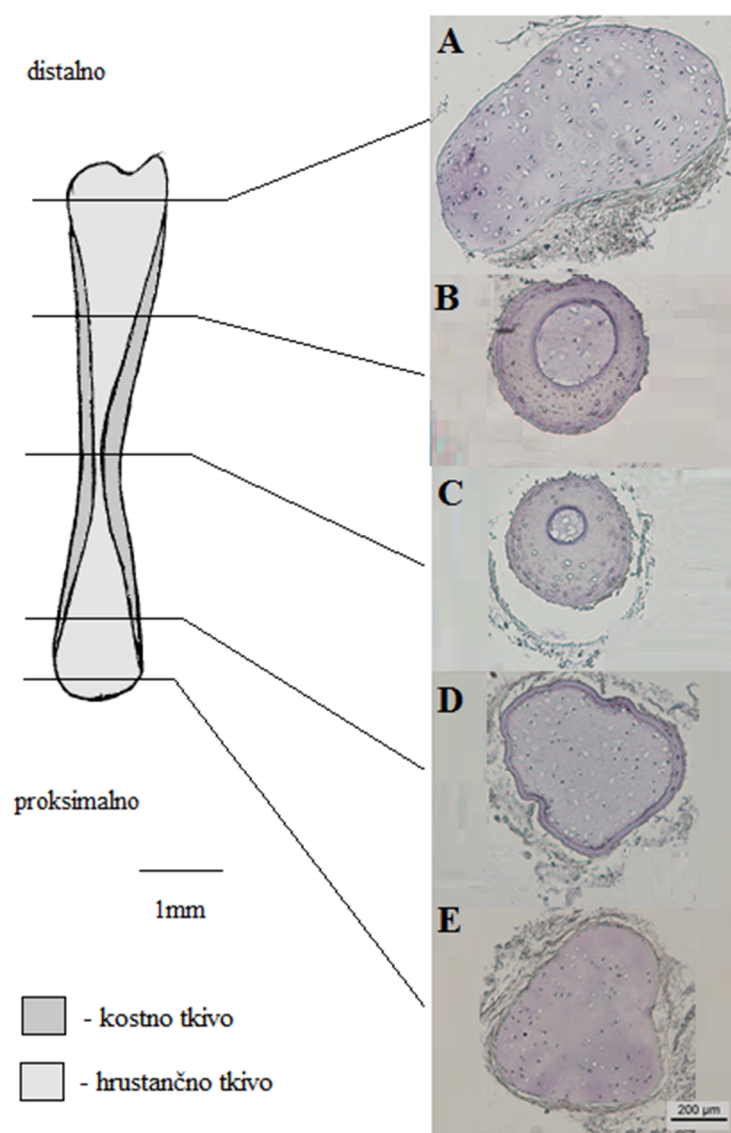


Slika 23: Vzdolžni prerez stopala. Barvanje Weigert hematoksilin. E - epifiza, D – diafiza, K.T. – kostno tkivo, H.T. – hrustančno tkivo, M.V. – medularna votlina.

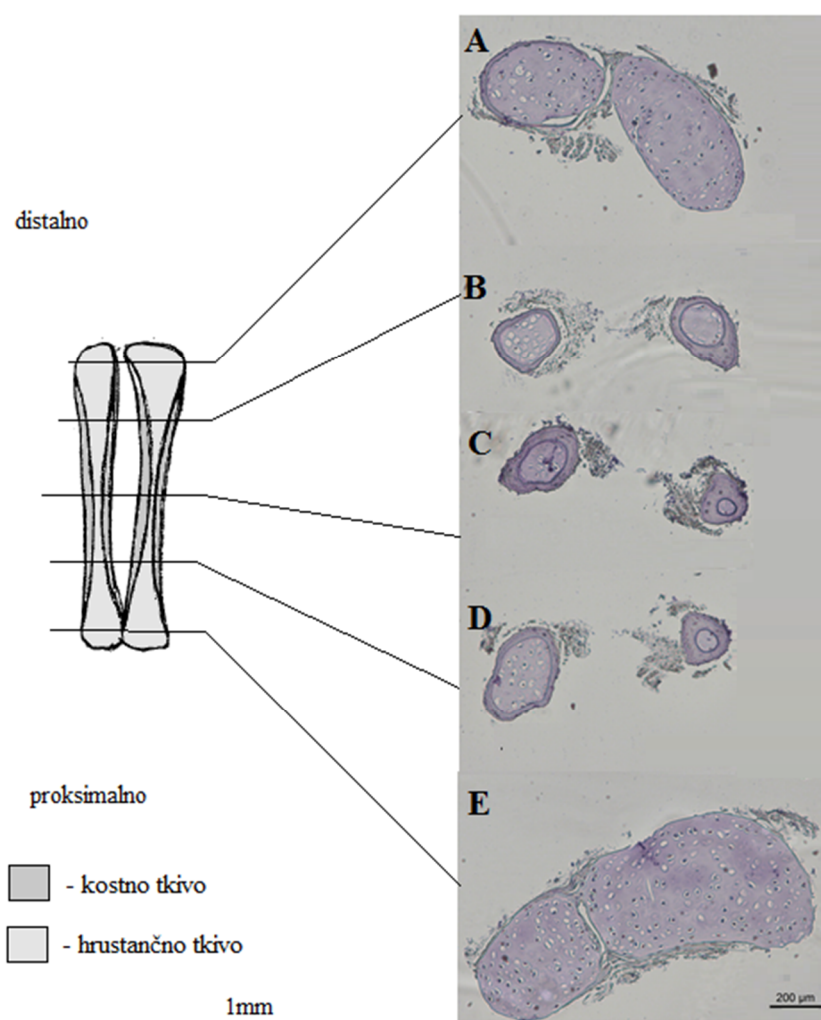
Največja debelina kostnega tkiva je v predelu diafize, tukaj je premer medularne votline najmanjši (sl. 24 – 27C). Debelina kostnega tkiva se od centralnega dela proti epifizam tanjša, medtem ko se medularna votlina večja. Prav tako se premer same kosti proti centralnemu delu zmanjšuje in je v diafizi manjši, kot v predelih epifiz (sl. 24 – 27). Epifize so v celoti hrustančne. (sl. 24 – 27A in E). Medularno votlino zapolnjuje hrustančno tkivo, za razliko od drugih dvoživk, pri katerih medularno votlino zapolnjuje kostni mozeg (Rozenblut in Ogielska, 2005).



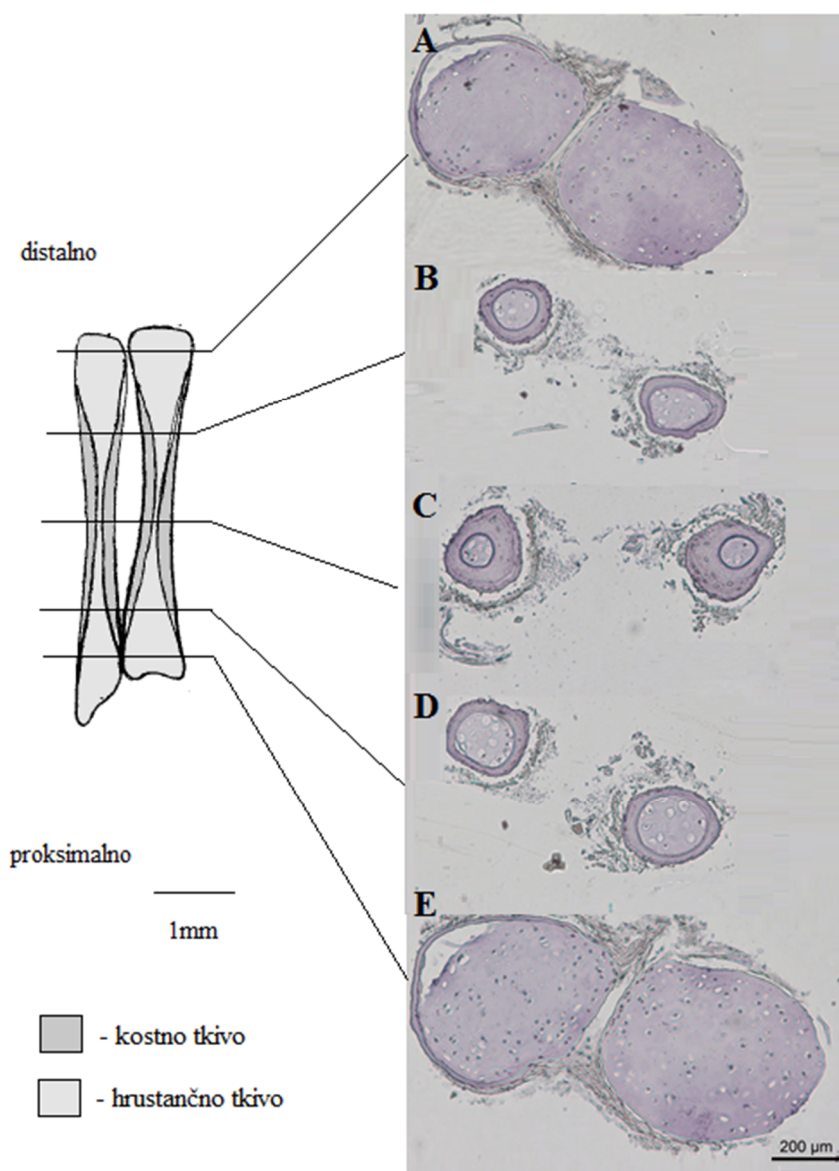
Slika 24: Skica vzdolžnega prereza femurja s slikami prečnih prerezov na različnih predelih kosti. Barvanje Erlich hematoksilin. A, E – prerez v skrajnih delih epifiz, B, D – prerez v epifiz, C – prerez v diafizi.



Slika 25: Skica vzdolžnega prereza humerusa, s slikami prečnih prerezov na različnih predelih kosti. Barvanje Erlich hematoksilin. A, E – prerez v skrajnih delih epifiz, B, D – prerez v epifiz, C – prerez v diafizi.

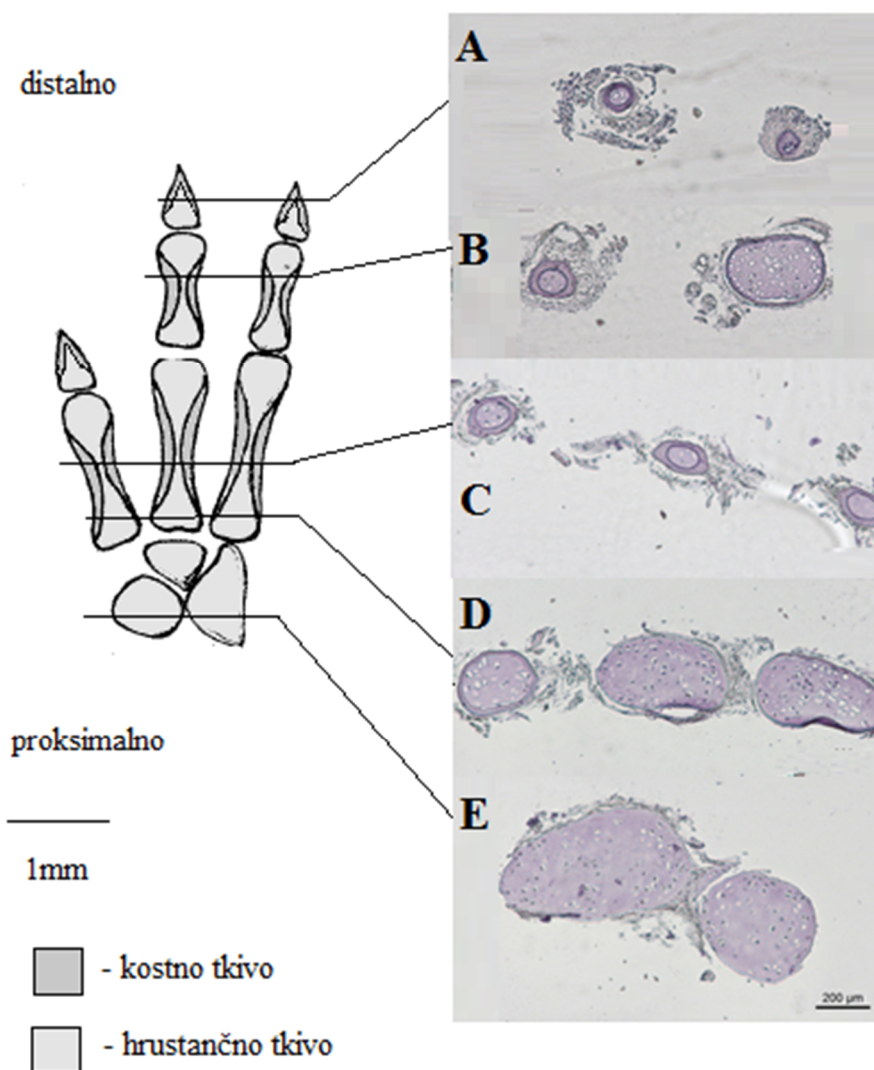


Slika 26: Skica vzdolžnega prereza tibije in fibule, s slikami prečnih prerezov na različnih predelih kosti. Barvanje Erhlich hematoksilin. A, E – prerez v skrajnih delih epifiz, B, D – prerez v epifiz, C – prerez v diafizi.

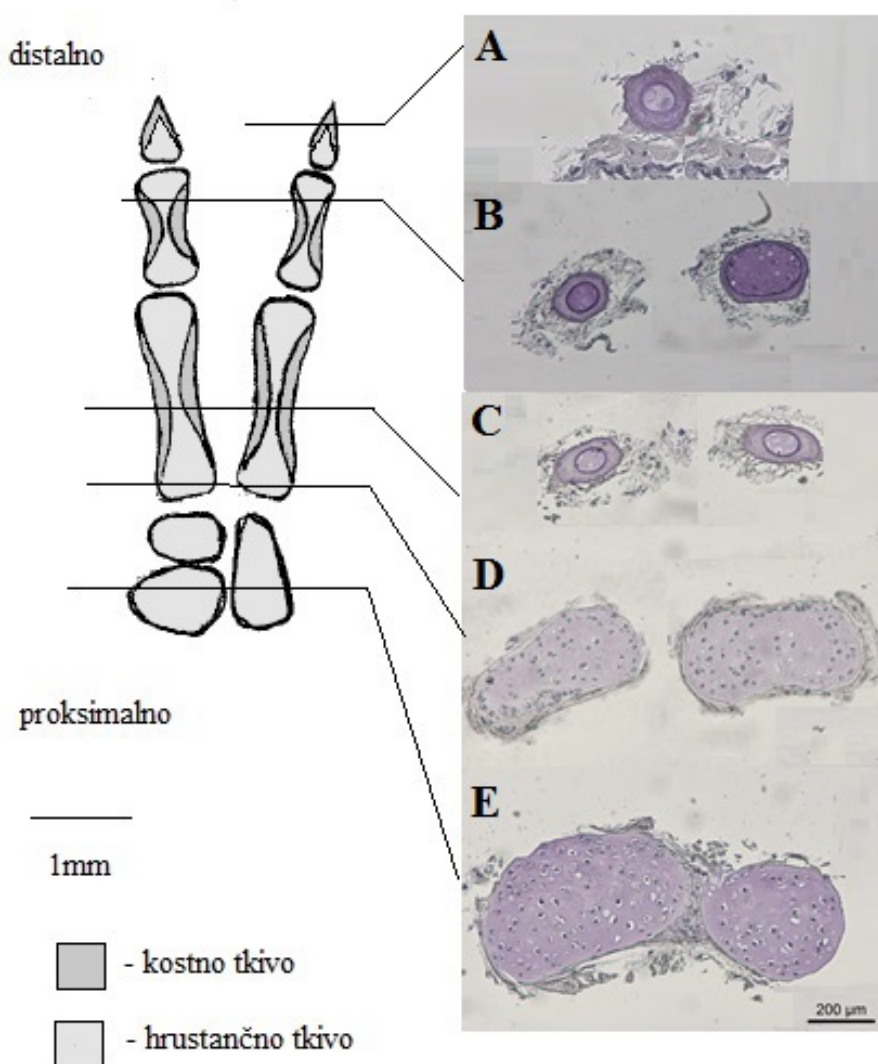


Slika 27: Skica vzdolžnega prereza ulne in radiusa, s slikami prečnih prerezov na različnih predelih kosti. Barvanje Erlich hematoksilin. A, E – prerez v skrajnih delih epifiz, B, D – prerez v epifiz, C – prerez v diafizi.

Stopala in dlani imajo popolnoma hrustančne tarzalne oz. karpalne kosti (sl. 28E in 29E). Metatarzalne in metakarpalne ter drugi členek prstov imajo enako zgradbo kot preostale dolge kosti; diafizni deli so osificirani, epifize so hrustančne (sl. 28B-D in 29B-D). Prvi členek prstov pa ima hrustančen proksimalni del in osificiran distalni del, medularna votlina se v distalni smeri zmanjšuje (sl. 28A in 29A).



Slika 28: Skica vzdolžnega prereza dlani, s slikami prečnih prerezov na različnih predelih kosti. Barvanje Erlich hematoksilin. A – prerez v predelu prvega členka prsta, B – prerez v predelu drugega členka prsta, C – prerez v diafizi dlančnic, D – prerez v proksimalnih epifizah dlančnic, E – prerez v predelu zapestnic.



Slika 29: Skica vzdolžnega prereza stopala, s slikami prečnih prerezov na različnih predelih kosti. Barvanje Erlich hematoksilin. A – prerez v predelu prvega členka prsta, B – prerez v predelu drugega členka prsta, C – prerez v diafizi stopalnic, D – prerez v proksimalnih epifizah stopalnic, E – prerez v predelu elementov gležnja.

4.3 LINIJE ZAVRTE RASTI V DOLGIH KOSTEH OKONČIN MOČERILA

4.3.1. Indetifikacija in razporeditev linij zavrte rasti

Vse kosti okončin, vključno s členki prstov so izkazovale LAG-e, vendar so bili le ti pri večini osebkov zelo slabo in nejasno vidni (sl. 30). Prav tako so bili LAG-i pri starejših osebkih ob periferiji razporejeni zelo na gosto skupaj, kar je še dodatno oteževalo natančno štetje.

Pri femurju in humerusu so LAG-i večinoma dobro vidni le ob medularni votlini in na periferiji kosti. V centralnem delu kostnine so slabo obarvani, pogosto le nakazani ali pa sploh niso vidni (sl. 31). LAG-i so najlepše vidni pri epipodialnih elementih (tibija, fibula, radius in ulna), kjer so LAG-i vidni tudi v centralnem delu kostnine in ne samo ob medularni votlini in na periferiji, kot pri femurju in humerusu (sl. 32). V prstkih je malo kostnega tkiva, zato niso uporabni za interpretacijo starosti, saj so LAG-i zelo gosto skupaj in jih ni mogoče natančno prešteti (sl. 33).

Pri mlajših osebkih so LAG-i neenakomerno razporejeni čez vso kostno tkivo (sl. 34), pri starejših od 20 let pa so v centralen predelu kostnine slabo vidni in dobro vidni ob meduli in na periferiji kosti (sl. 31).

Na vzdolžnih prerezih so LAG-i slabše pregledni v primerjavi s prečnimi prerezi (sl. 35).

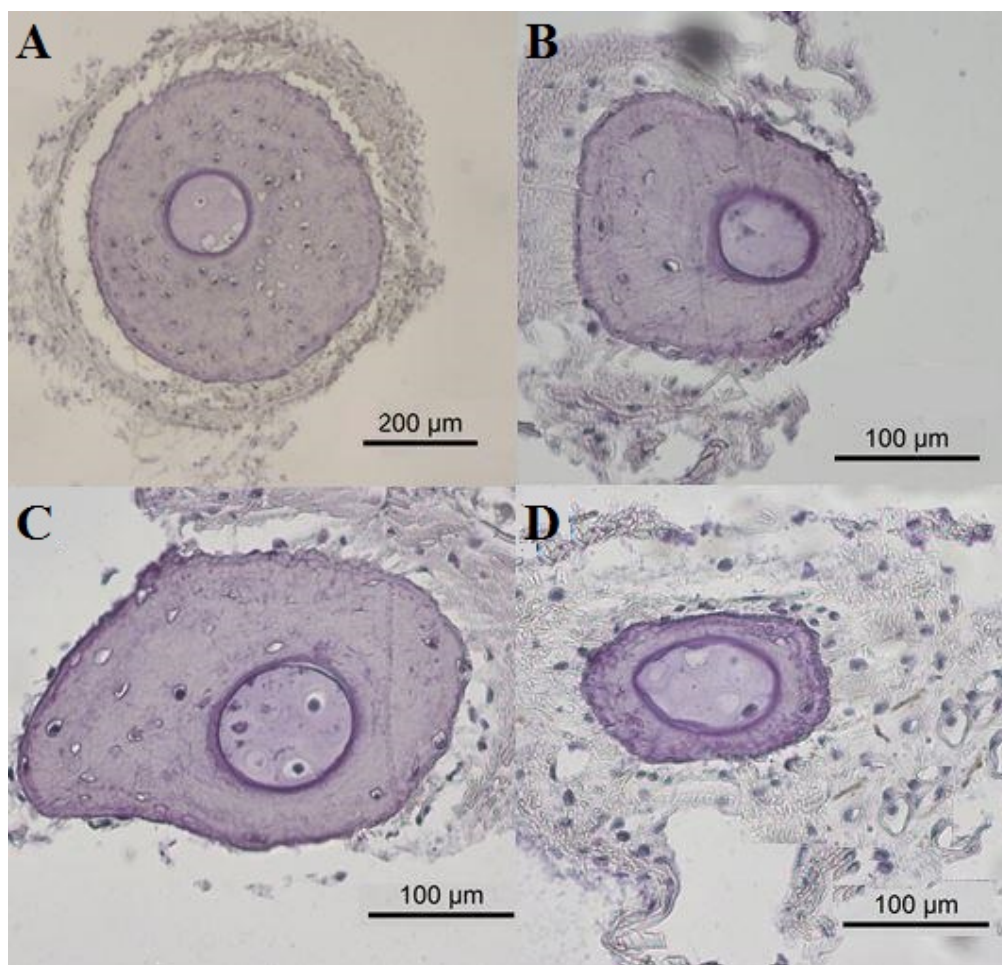
LAG-i v večini primerov niso jasni, pogosto so vijugasti, se združujejo v eno linijo oz. cepijo v več linij, na nekaterih predelih so samo nakazani in niso vidni kot krožna linija (sl. 32).

Močne in jasno vidne LAG-e smo zasledili le pri dveh starejših osebkih, starih 27 in 40 let (sl. 36). LAG-i so koncentrično razporejeni po celotnem prerezu kosti in vidni že pri manjši povečavi.

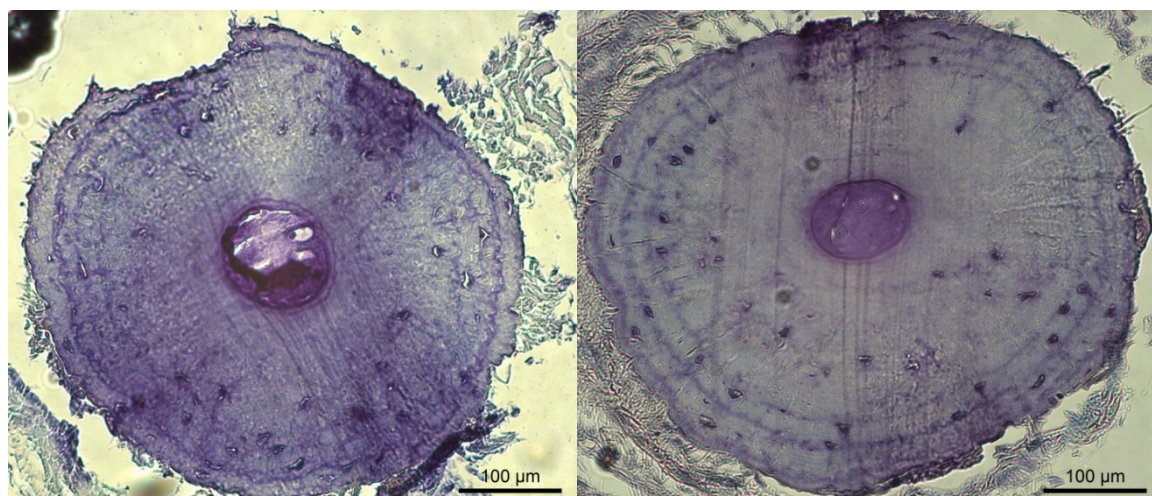
Zanimal nas je trend izkazovanja števila LAG-ov oz. razlike med pojavljanjem le teh med zadnjo in sprednjo okončino, kot tudi med posameznimi kostmi iste noge. Vidnost LAG-ov je bila tako pri sprednji, kot pri zadnji nogi in med kostmi iste noge podobna (sl. 31 – 33). Če so bili slabo oz. dobro vidni na zadnji nogi, so bili prav tako slabo oz. dobro vidni na sprednji. Tudi kosti posamezne okončine so imele podobno vidne LAG-e. Če so bile le te

vidne le proti periferiji pri femurju, so bile tudi pri ostalih kosteh zadnje noge vidne le tam (sl. 37). Enako velja za sprednjo nogo.

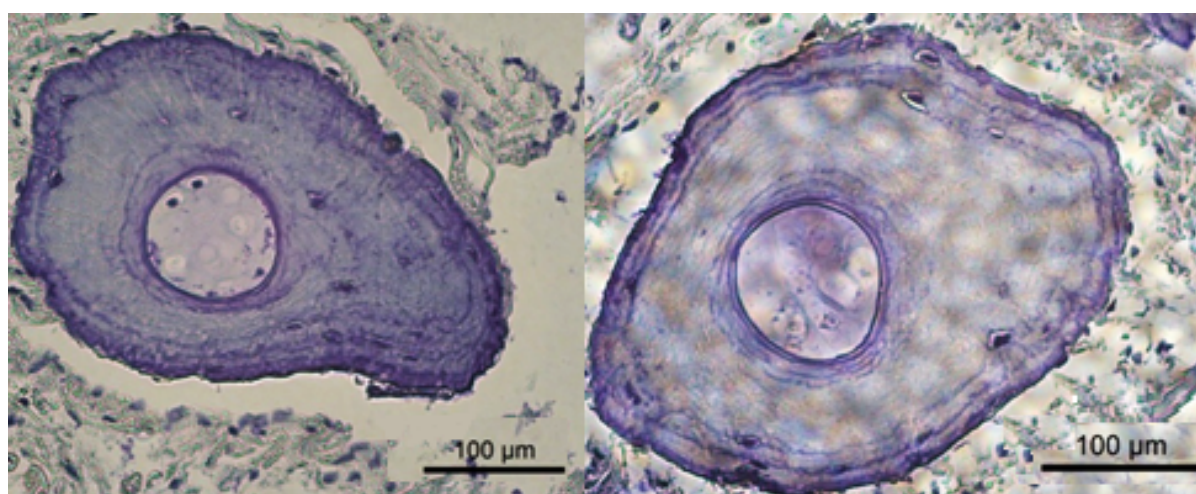
Pri nekaterih osebkih so v kosteh vidni LAG-i, ki so močnejše obarvani in jasneje vidni. Tudi v teh primerih so bili ti LAG-i prisotni pri vseh kosteh istega osebka v enakem predelu kosti (sl. 38).



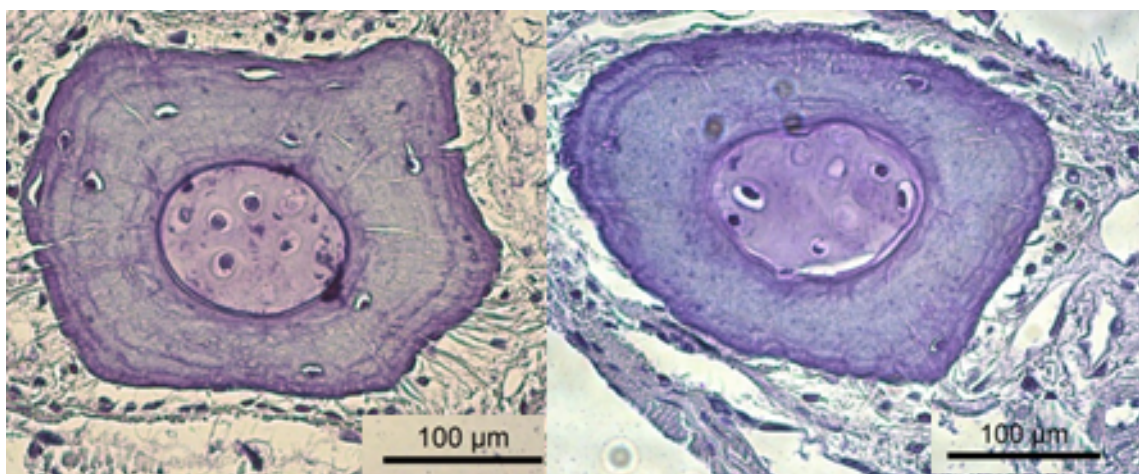
Slika 30: Prečni premer femurja (A), fibule (B), tibije (C) in členka prstka (D) osebka Pa 17-2. Erlich hematoksilin.



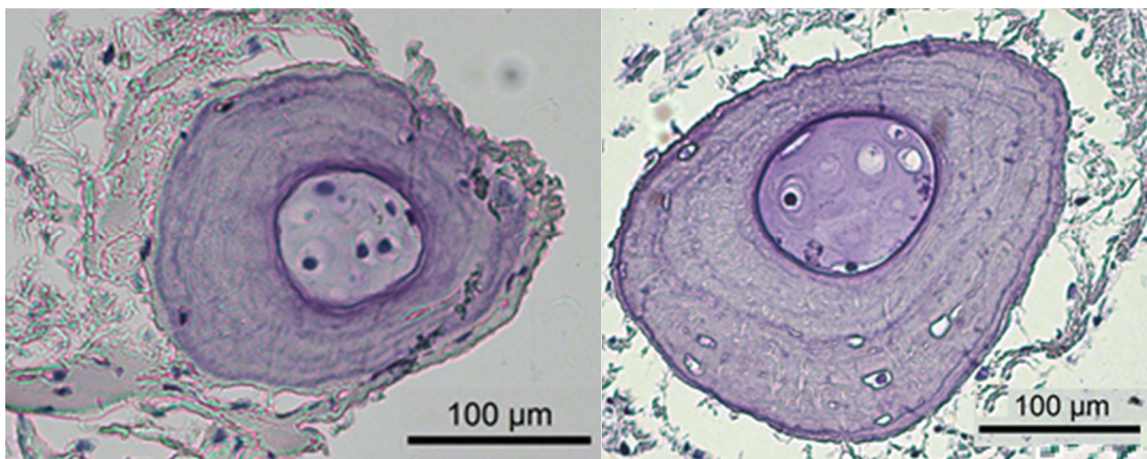
Slika 31: Prečni prerez femurja (desno) in humerusa (levo) (osebek Pa 30-1). Erlich hematoksilin.



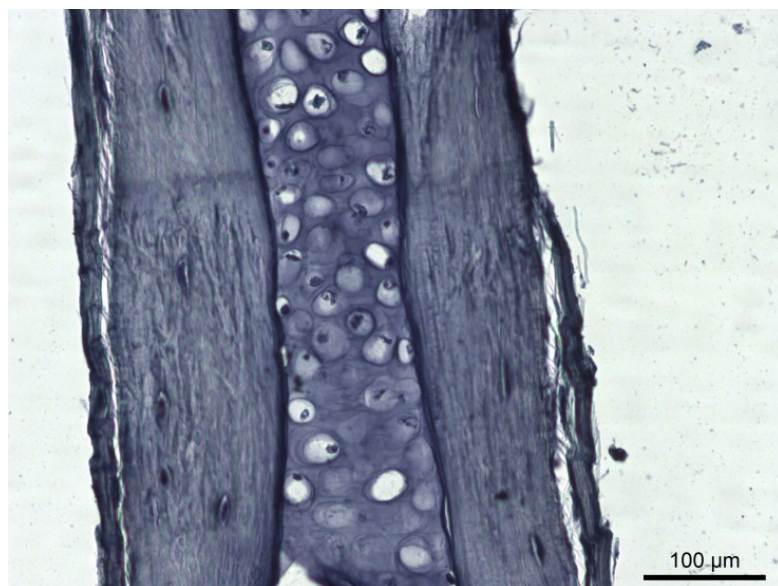
Slika 32: Prečni prerez tibije (levo) in radiusa (desno) (osebek Pa 30-1). Erlich hematoksilin.



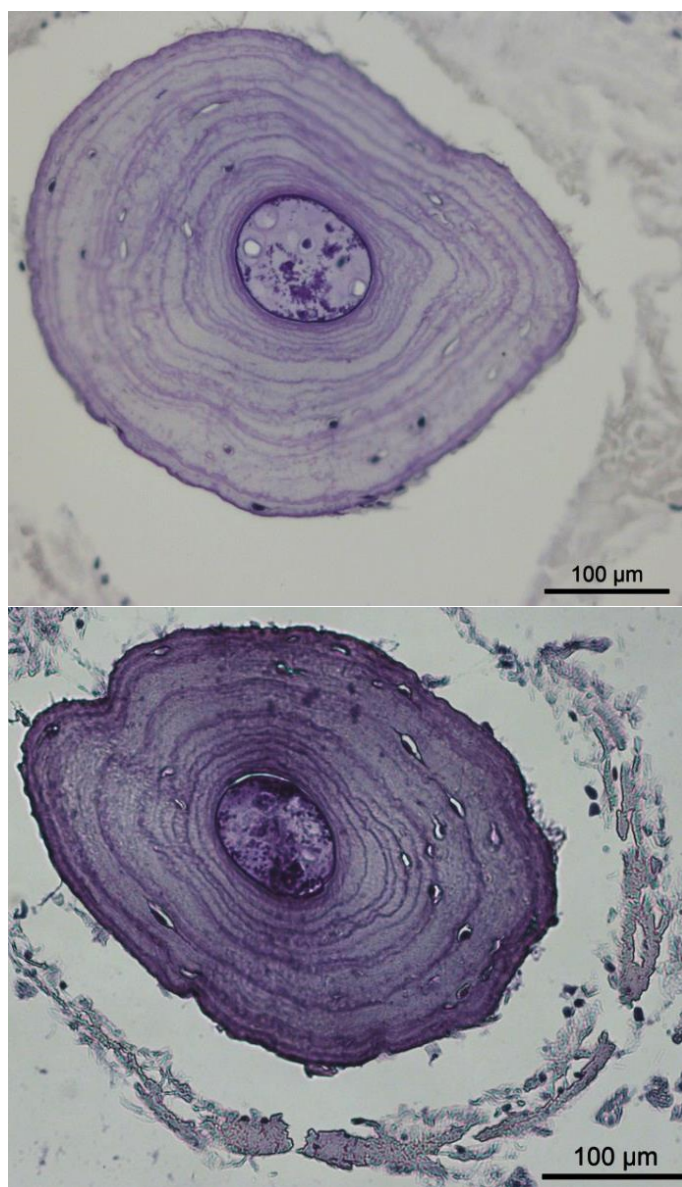
Slika 33: Prečni prerez členka prsta zadnje okončine (levo) in sprednje okončine (desno) (osebek Pa 30-1). Erlich hematoksilin.



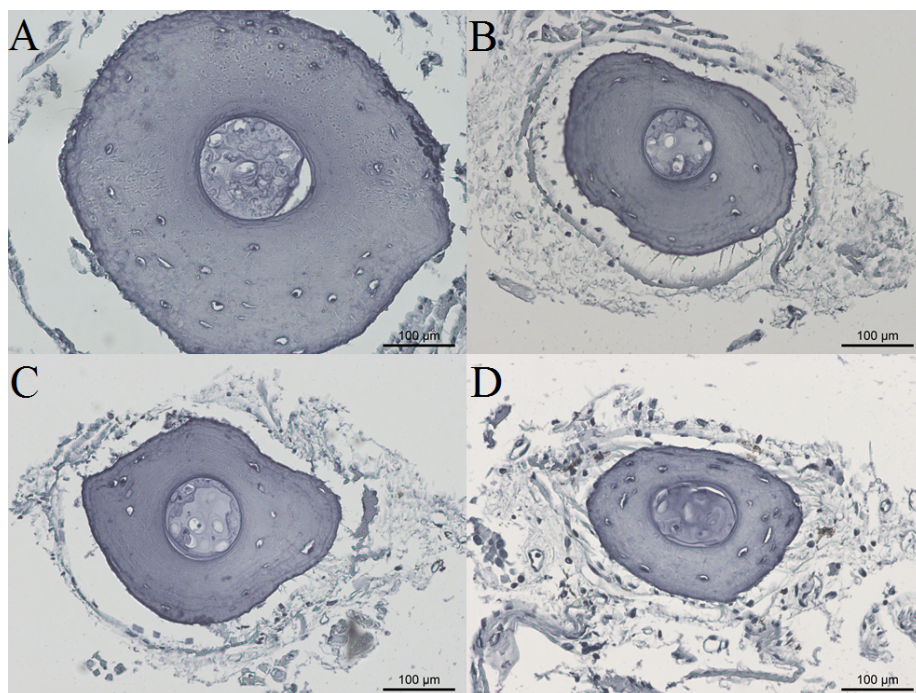
Slika 34: Prečni prerez radiusa osebkov starosti 8 let (levo) in 14 let (desno). Erlich hematoksilin.



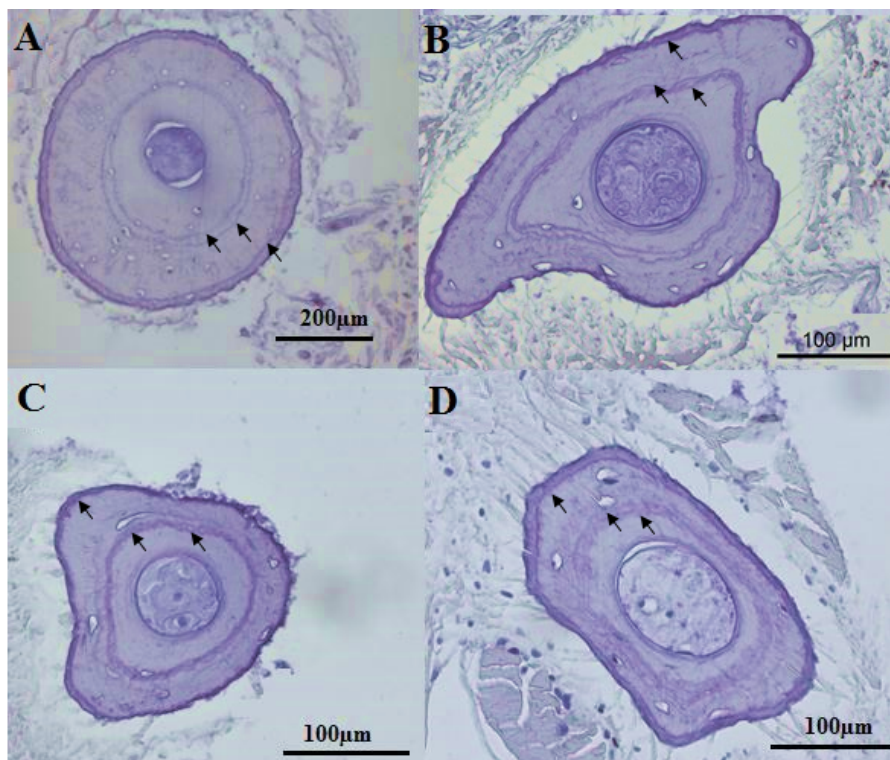
Slika 35: Vzdolžni prerez femurja v predelu diafize, vidnost linij zavrte rasti je zelo slaba (osebek Pa 8-1).
Weighert hematoksilin.



Slika 36: Primer lepo vidnih LAG-ov preko celotne kostnine. Prečni prerez radiusa dveh osebkov različnih starosti, 27 let (zgoraj, osebek Pa 27-1) in 40 let (spodaj, osebek Pa 40-1) Erlich hematoksilin.



Slika 37: Razporeditev LAG-ov na različnih kosteh okončine je podobna. Prečni prerez femurja (A), fibule (B), tibie (C) in členka zadnjega prstka (D) (osebek 37-1). Weighert hematoksilin.



Slika 38: Primer pojavljanja močnejše obarvanih LAG-ov. Močnejše obarvani LAG-i se označeni s črnimi puščicami. Prečni prerezi: femur (A), fibula (B), tibija (C) in členek zadnjega prstka (D) (osebek 36-2). Erhlich hematoksilin.

4.3.2 Linije zavrte rasti in starost osebkov

Na kosteh šestindvajsetih osebkov različne starosti, smo pod mikroskopom pri 100-kratni povečavi prešteli število LAG-ov (preg. 3). LAG-i so bili najlepše vidne na spodnjih kosteh okončin (tibija, fibula in radius, ulna), zato smo za interpretacijo števila LAG-ov uporabili radius sprednje okončine in tibijo zadnje okončine

Ker LAG-i niso bili razločni nismo mogli narediti zanesljive statistične analize za korelacijo med številom LAG-ov in starostjo živali. Za vsak osebek smo LAG-e šteli dvakrat: najprej smo prešteli samo dobro vidne LAG-e, nato pa smo upoštevali še slabše vidne in prešteli oboje, dobro in slabše vidne (sl. 39, pregl. 3).

Število dobro vidnih LAG-ov, se pri mlajših osebkih starih do 15 let ujema s starostjo osebkov z napako $\pm$ dve leti oz. pri enem osebkju z napako štirih let. Število, dobro in slabo vidnih LAG-ov, pa je presegalo starost osebkov za več kot dve leti. Pri osebkih od 15 do 27 let se število dobro in slabo vidnih LAG-ov ujema s starostjo z odstopanjem $\pm$ dve leti, medtem ko je število dobro vidnih LAG-ov manjše od starosti osebkov. Pri osebkih starih nad 27 let se število LAG-ov v nobenem primeru ne ujema s starostjo osebkov. Pri dobro vidnih LAG-ih je korelacijski koeficient zelo nizek ($r^2 = 0,09$ in $p > 0,005$ za tibijo ter $r^2 = 0,06$ in $p > 0,005$ za radius) in med starostjo in dobro vidnimi LAG-i ni signifikantne linearne odvisnosti ($p > 0,005$) (sl. 40). Med dobro in slabo vidnimi LAG-i ter starostjo je zmerna pozitivna linearna odvisnost ($r^2 = 0,61$ in $p < 0,0001$ za tibijo ter $r^2 = 0,68$ in $p < 0,0001$ za radius) (sl. 40).

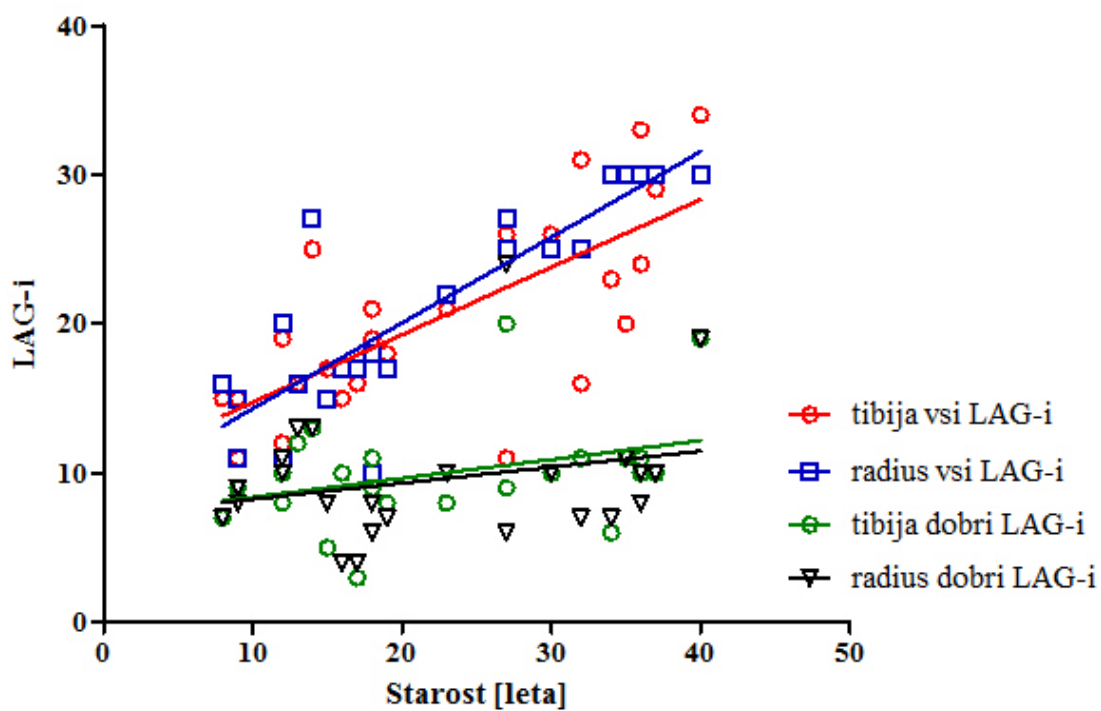
Preglednica 3: Število LAG-ov na zadnji (tibija) in sprednji okončini (radius) pri močerilu (*P. a. anguinus*)

Starost	LAG-i zadnja okončina	LAG-i sprednja okončina
8	15 (7*)	16(7*)
9	11 (9*)	15 (8*)
9	15 (9*)	11 (9*)
12	12 (8*)	11 (10*)
12	19 (10 *)	20 (11*)
13	16(12*)	16 (13*)
14	25 (13*)	27 (13*)
15	17 (5*)	15 (8*)
16	15 (10*)	17(4*)
17	16(3*)	17(4*)
18	19 (11*)	18 (6*)
18	20 (9*)	10 (8*)
19	18 (8*)	17(7*)
23	21(9*)	22(10*)
27	26(20*)	27(24*)
27	26 (10*)	25(6*)
30	26 (9*)	31(10*)
31	26(8*)	30(9*)
32	31(11*)	26(7*)
32	16(11*)	/
34	23(6*)	30(7*)
35	20 (11*)	21(11*)
36	33 (11*)	31(8*)
36	24 (10*)	28(10*)
37	29(11*)	27(10*)
40	34 (16*)	36(19*)

* Dobro vidni LAG-i,



Slika 39: Primerjava dobro vidnih in slabo vidnih LAG-ov. Z večjimi puščicami je označenih 9 dobro vidnih LAG-ov, z manjšimi puščicami so še dodatno označeni slabše vidni LAG-i. Prečni prerez radiusa, Pa 30-1. Erlich hematoksilin.



Slika 40: Primerjava dobro in slabo vidnih lagov tibije in radiusa s starostjo osebkov.

5 RAZPRAVA

V naši raziskavi smo raziskali histološko zgradbo okončin in naredili skeletokronološko analizo dolгих kosti arhiviranih osebkov močerila. Namen naloge je bil preveriti pojavljanje LAG-ov pri tej vrsti in ugotoviti, ali obstaja povezava med številom LAG-ov in starostjo osebkov, dolžino telesa/okončin/kosti in premerom kosti.

Okončine močerila imajo tipično sestavo okončin vretenčarjev. Od ostalih skupin dvoživk se razlikujejo po redukciji števila prstov in hrustančnih mezopodialnih elementih. Prav tako okončine niso sorazmerno velike v primerjavi z velikostjo telesa, njihova rast je alometrična. Kosti so sestavljene samo iz periostalne kosti. Endostealna kost, ki je značilna za preostale dvoživke, predvsem za žabe (Rozenblut in Ogielska, 2005), ni zastopana. Prav tako v medularni votlini ni kostnega mozga, kot je značilno za brezrepce (Rozenblut in Ogielska, 2005), temveč je zapolnjena s hrustančnim tkivom. Opazili smo, da prihaja pri starejših osebkih (po 25 letu) do degeneracije hrustanca, saj so opazne celice nepravilnih oblik. Pojavljanje hrustančnega tkiva v meduli opisujejo tudi pri nekaterih drugih repatcih, npr. pri pirenejskem pupku *Euproctus asper* (Miaud in Guillaume, 2005).

Na vseh kosteh osebkov iz vzorca so opazni LAG-i, ki so bili v večini primerov neizraziti, kar je oteževalo štetje. LAG-i, ki so bili debelejši in dobro opazni že pri 100-kratni povečavi je bilo, razen v dveh primerih, malo. Na večjih povečavah (400-kratni) so bile opazne tudi tanjše, svetlejše linije, ki pa niso potekale koncentrično po kostnem tkivu. Linijam je bilo težko slediti, saj so se na nekaterih predelih razcepile v več linij, se prepletale med seboj ali se združile v eno oz. so izginile. Podobno deljenost linij so zasledili pri nekaterih vrstah mediteranskih pupkov, ki jih razlagajo kot posledico kratke aktivnosti med samo periodo zaustavitve rasti (cit. v Jakob in sod., 2002). Opazili smo, da so LAG-i pri mlajših osebkih prisotni čez celotno kostno tkivo, pri starejših pa so ti dobro vidni le ob meduli in na periferiji kosti. Proti periferiji so bili LAG-i vedno bolj na gosto skupaj, kar je še dodatno oteževalo natančno štetje. Težave s štetjem, zaradi gosto nameščenih LAG-ov, so imeli tudi pri nekaterih drugih predstavnikih dvoživk (Sagor in sod. 1998). Ker ni predpisanega standardnega postopka za določanje LAG-ov in ker so bili ti slabo vidni, nismo točno vedeli, kako jih naj natančno definiramo, da bi bilo naše štetje čim bolj objektivno. Slaba vidnost LAG-ov bi lahko bila posledica metode za pripravo tkiv oz. slabe priprave vzorcev. Vendar slednje lahko izključimo, saj smo pri dveh primerih

dobili preparate, kjer so LAG-i zelo lepo vidni. Ta dva osebka sta bila pripravljena z isto metodo in v isti seriji še z dvema osebkom pri katerih LAG-i niso bili tako lepo vidni. Naslednji vzrok bi lahko bil v predolgi fiksaciji oz. dolžini shrambe v fiksativu, kar bi lahko poškodovalo kostno tkivo ali v uporabi neustreznega fiksativa, ki ne ohrani dovolj dobre strukture tkiva. Tudi ta v vzrok lahko izključimo, saj sta bila vzorca, kjer so bili LAG-i lepo vidni shranjeni v istem fiksativu, različno dolgo in veliko dlje od drugih, kjer LAG-i niso bili tako izraziti.

Navkljub dejstvu, da je močeril jamska dvoživka in živi v dokaj konstantnih pogojih in ne hibernira, so LAG-i v dolgih kosteh vseeno razvidni. Vseeno pa LAG-i pri osebkih vzgojenih v jamskem laboratoriju niso bili zelo izraziti, kot opisuje Roglič (2007) za osebkke iz narave. Težave pri interpretaciji LAG-ov so imeli tudi pri tropskih in mediteranskih vrstah dvoživk, ki živijo v okolju z dokaj konstantnimi pogoji. (Jakob, 2002). Prisotnost šibkih linij pri teh vrstah razlagajo z endogenimi ritmi, ki so genetski preostanek prednikov živečih na površju (cit. v Jakob, 2002). LAG-i pa se pri dvoživkah lahko pojavljajo tudi zaradi občasnih obdobj stradanja (Castanet in sod, 1993) oz. slabšega hranjenja v zimskem obdobju (Miaud in Guillaume, 2005). Osebki, ki smo jih uporabili za analizo, so bili vzgojeni v podzemnem laboratoriju v Moullisu in so bili hranjeni enkrat na teden, torej prehranjenost naj ne bi imela vpliva. Slabšo vidnost LAG-ov oz. njihovo slabo izraženost opisujejo tudi pri brezpljučarjih (*Plethodontidae*). Pri njih LAG-e lahko nadomeščajo širše linije, ki jih povezujejo z začasno zmanjšano osteogenezo in ne s popolno zaustavitvijo le te (Bruce in Castanet, 2006). Za brezplučarje je značilna tudi nizka stopnja periostalne osteogeneze in psevdo-lamelarna kostnina, katere struktura sicer lahko spominja na LAG-e (Castanet in sod. 1996). Nizka stopnja osteogeneze naj bi bila povezana s počasno letno rastjo v hladnih, temperaturno stabilnih mikrohabitatih (Bruce in Castanet, 2006). Podobno histološko zgradbo kostnine, kot jo opisujejo za brezplučarje, smo opazili tudi pri močerilu, kar lahko razloži neizrazitost LAG-ov. Možno je tudi, da ima močeril specifične cikle nalaganja kostnega tkiva, ki niso povezani z letnimi periodami.

Ker je za močerila značilna alometrija, so njegove okončine v primerjavi z drugimi dvoživkami krajše. V našem primeru so bile kosti zelo majhne in tanke (niso bile daljše od 1,5 cm in debelejšje od 2,0 mm). Te živali rastejo počasi, opazili pa smo tudi, da so naši

primerki v primerjavi s tistimi, ki so bili ulovljeni iz naravnega okolja precej manjši (Roglič, 2007). Zaradi majhnih kosti in počasne rasti kostno tkivo ni zelo obsežno, prav tako so LAG-i zelo na gosto skupaj, kar je še dodatno oteževalo štetje.

Predpostavljamo, da so debelejša in bolj obarvana linija lahko multipli LAG-i, slabše vidne pa enojni. Po drugi strani, pa so dobro vidne linije pri močerilu lahko navsezadnje enojni LAG-i, medtem ko so ostale vmesne slabše vidne linije posledica psevdo-lamelarne kostnine in torej gre lahko le za navidezne linije. Bolj smiselna je interpretacija, da so slabo vidne linije posledica psevdo-lamelarne kostnine. Namreč, dvojni LAG-i v dolgih kosteh dvoživk lahko nastanejo zaradi prekinjene hibernacije oz. zmanjšane rasti med estivacijo (cit. v Sinsch, 2015), močeril pa ne hibernira ali estivira. Poleg tega je število slabo vidnih linij pri mlajših osebkih večje od starosti, kar pomeni, da niso vse linije nastale zaradi začasne zaustavitve rasti. Pri starejših osebkih, se število slabo vidnih linij še nekako ujema z dejansko starostjo, po drugi strani pa je dobro vidnih linij občutno manj, kot pa je dejanska starost živali. LAG-i so pri močerilu lahko le reliktni ostanki endogenih ritmov prednikov, vendar zaradi konstantnih življenjskih pogojev niso dodatno ojačani in so zaradi tega manj izraženi, kot pri predstavnikih živečih v spreminjajočih se razmerah (cit. v Jakob, 2002).

Čeprav je skeletokronologija splošno razširjena metoda za določanje starosti dvoživk, je pri nekaterih repatih dvoživkah in brezrepcih (Wake in Castanet, 1995; Ento in Matsui, 2002) interpretacija LAG-ov zaradi slabe izraženosti linij ter goste nameščenosti otežena. Zagotovo je močeril, ena iz med vrst, kjer skeletokronologija ni najbolj zanesljiva metoda za določanje starosti, zaradi kombinacije dolgoživosti in majhnosti kosti. Slednje še dodatno otežuje štetje linij pri starejših osebkih, saj so LAG-i nameščeni preblizu drug drugega. Poleg tega, prstki zaradi svoje majhnosti, navkljub izkazovanju LAG-ov niso primerni za analizo. Zaradi tega skeletokronologija za določanje starosti močerila ni nedestruktivna metoda.

Glede na naše rezultate lahko hipotezo, da se kostno tkivo začne nalagati šele s spolno zrelostjo, zavrnilo, saj je kostno tkivo prisotno že pri mlajših, spolno nezrelih osebkih. Kostno tkivo se začne nalagati najverjetneje že s prvim letom življenja in ne šele s spolno zrelostjo, kot smo predvidevali. Naše hipoteze, da število LAG-ov korelira s starostjo, ne moremo potrditi saj je bilo štetje le-teh oteženo in nezanesljivo, poleg tega pa smo imeli

podatke s preveč variacije. Število LAG-ov sicer izkazuje trend spreminjanja s starostjo, ki pa ga statistično ne moremo potrditi.

6 SKLEPI

1. Močeril ima tipično zgradbo okončin vretenčarjev. Od ostalih skupin se razlikujejo po redukciji števila prstov in karpalnih oz. tarzalnih elementov ter po tem, da mezopodialni elementi ostajajo hrustančni.
2. Vse dolge kosti sprednje in zadnje okončine vključno s prsti so v predelu diafiz in metafiz kalcificirane, hrustančne ostajajo epifize kot tudi omenjeni mezopodialni elementi.
- 3 Okončine gradi le periostalna kost, endostealna kost ni zastopana, prav tako ni endostealne reabsorpcije, ki je značilna za večino dvoživk.
4. Vse dolge kosti izkazujejo prisotnost LAG-ov. Število in vzorec pojavljanja LAG-ov se med sprednjo in zadnjo nogo ne razlikujeta, prav tako se ne razlikujeta med različnimi dolgimi kostmi iste noge.
5. LAG-i so večinoma slabo izraziti, kar pripisujemo konstantnim življenjskim pogojem v jamskem laboratoriju, kot tudi tipu kostnine (psevdo-lamelarna kost).
6. Kostni pričnejo osificirati že pred spolno zrelostjo in ne šele po njej, kot smo sprva predvidevali. Namreč število LAG-ov pri mlajših osebkih nakazuje na to, da osifikacija prične že zelo zgodaj, najverjetneje tekom prvega leta življenja.
7. Skeletokronologija pri vrsti *Proteus anguinus anguinus* ni najbolj uporabna metoda, saj je interpretacija LAG-ov težavna, prav tako tudi ni nedestruktivna, saj členki prstov, zaradi majhnosti in gostote LAG-ov, niso uporabni.

7 POVZETEK

Skeletokronologija je splošno razširjena metoda za določanje starosti različnih skupin vretenčarjev. Poznavanje starosti osebkov ima velik pomen pri določanju starostne dinamike v populaciji in tudi pri okoljskih in ekoloških študijah. Skeletokronologija je ena izmed natančnejših metod za določevanje starosti, saj lahko na podlagi LAG-ov določimo starost posameznega osebk. LAG-i nastanejo v obdobju zaustavitve rasti, v večini primerov ta nastopi le 1 x letno. Poleg tega skeletokronologija velja za nedestruktivno metodo, osebkov za analizo ni potrebno žrtvovati, saj lahko za štetje linij uporabimo členke prstkov.

V naši raziskavi smo s skeletokronološko metodo preverili pojavljanje LAG-ov pri osebkih močerila (*Proteus anguinus anguinus*) vzgojenih v laboratorijskih pogojih in rezultate primerjali s predhodno skeletokronološko analizo močerilov iz narave. Ta vrsta kljub življenju v konstantnih pogojih izkazuje prisotnost LAG-ov. Ti so najverjetneje posledica endogenih ritmov nalaganja kostnine in reliktni preostanki prednikov živečih na površju. Lahko, da so LAG-i posledica občasnih obdobji stradanj, ki nastopijo zaradi sezonskih nihanj hrane v naravnem okolju.

LAG-i so bili prisotni na vseh dolgih kosteh, vendar za analizo zaradi premalo kostnega tkiva niso bili primerni členki prstov. LAG-i so pri prstkih starejših osebkov na periferiji kosti za štetje nameščeni preblizu skupaj. S to težavo so se soočali tudi pri drugih skupinah dvoživk. Lepo vidnih LAG-ov je bilo v našem primeru večinoma zelo malo. Pri mlajših osebkih se je njihovo število še ujemalo z dejansko starostjo, medtem ko je bilo pri starejših osebkih število precej nižje od dejanske starosti živali. LAG-i so najverjetneje slabo vidni zaradi konstantnih življenjskih pogojev močerila, saj so pri dvoživkah poleg genetske pogojenosti, še dodatno ojačani s sezonskimi cikli okolja. Drug možen vzrok za neizrazite linije je v tipu kostnine, najverjetneje gre za psevdo-lamelarno kost, za katero je značilna slabša in težja vidnost linij.

Skeletokronologija za določanje starosti pri močerilu, navkljub prisotnosti linij zavrte rasti, ni najprimernejša metoda, saj je njihova interpretacija nezanesljiva.

8 LITERATURA

- Boef M., Larsson H.C.E., 2007. Bone microstructure: quantifying bone vascular orientation. NRC research press Web site
<http://cjz.nrc.ca> (25. marec, 2016)
- Bruce R.C. in Castanet J., 2006. Application of skeletochronology in aging larvae of the Salamanders *Gyrinophilus porphyriticus* and *Pseudotriton ruber*. Journal of Herpetology, 40, 1: 85-90
- Bulog B., 2013. Človeška ribica. V: Narava Bele krajine. Štangelj M. in Ivanovič M. (ur.). 1st ed. Ljubljana, Metlika: Belokranjski muzej: 175-184
- Bulog B., Bizjak Mali L., Kos M., Mihajl K., Prelovšek P.M., Aljančič G., 2000. Biology and functional morphology of *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata). ACTA Biologica Slovenica, 43, 3: 85-102
- Callis G.M., 2008. Bone. V: Theory and practice of histological techniques. Bancroft J.D., Gamble M. (eds.). 6th ed. London, Churchill livingstone: 333-361
- Carson F.L., Hladik C., 2009. Histotechnology (A self-instructional text). 3rd ed. Chicago, American Society for Clinical Pathology: 2-64 str.
- Castanet J., Francillon-Vieillot H., Meunier F.J., De Ricqlès A., 1993. Bone and Individual Aging. V: Bone Volume VII: Bone Growth. Hall.B.K. (eds). 2nd ed. Boca Raton, CRC Press: 245 – 283
- Castanet J., Francillon-Vieillot H., Bruce R.C., 1996. Age estimation in desmognathine salamanders assessed by skeletochronology. Herpetologica, 52, 2: 160-171
- Çiçek K., Kumaş M. in Ayaz D., 2011. Differentiation of bone tissue and long bone development in the Uludağ frog, *Rana macrocnemis* tadpoles. Biharean biologist, 5, 2: 123-126
- Deullman W.E., Treub L. 1994. Biology of amphibians. Maryland, The Johns Hopkins University Press: 677 str.
- Durham L., Bennett G.W., 1963. Age, growth, and homing in the bullfrog. The journal of wildlife management, 27, 2: 107-123

- Eden J.C., Whiteman H.H., Duobinis-Gray L., Wissinger S.A., 2007. Accuracy assessment of skeletochronology in the Arizona Tiger salamander (*Ambystoma tigrinum nebulosum*). *Copeia*, 2007, 2: 471-477
- EBS. Microwave processing techniques for microscopy. Energy Beam Sciences. http://diyhpl.us/~bryan/irc/protocol-online/protocol-cache/mw_tech.htm (17. maj, 2015)
- Ento K., Matsui M., 2002. Estimation of age structure by skeletochronology of a population of *Hynobius nebulosus* in a breeding season (Amphibia, Urodela). *Zoological science*, 19: 241-247
- Gamble M., 2008. The hematoxylin and eosin. V: Theory and practice of histological techniques. Bancroft J.D., Gamble M. (eds.). 6th ed. London, Churchill livingstone: 121-133
- Jakob C., Seitz A., Crivelli A., Miaud C., 2002. Growth cycle of the marbled newt (*Triturus marmoratus*) in the Mediterranean region assessed by skeletochronology. *Amphibia-Reptilia*, 23: 407-418
- Kemp N.E., Hoyt J.A., 1969. Sequence of ossification in skeleton of growing and metamorphosing tadpoles of *Rana pipiens*. *Journal of Morphology*, 129: 415-444
- Kranjec N., 1981. Razširjenost in variabilnost močerila. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana: 69 str.
- Miaud C., Guillaume O., 2005. Variation in age, body size and growth among surface and cave – dwelling populations of the pyrenean newt, *Euproctus asper* (Amphibia; Urodela). *Herpetologica*, 61, 3: 24- 249
- Ontañón M., Aparicio C., Ginebra M.P., Planell J. 2000. Structure and mechanical properties of bone. V: Structural Biological Materials. Elice M. (eds.). 1st ed. Oxford, Elsevier Science Ltd.: 31-72
- Roglič P., 2007. Uporabnost skeletokronološke metode za oceno starosti pri močerilarjih (Amphibia: *Proteidae*). Dipolomska naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana: 87 str.

- Rozenblut B., Ogielska M., 2005. Development and growth of long bones in european water frogs (Amphibia: Anura: *Ranidae*). With remarks on age determination. Journal of Morphology, 265: 304-317
- Sagor E.S., Ouellet M., Barten E., Green D.M., 1998. Skeletochronology and geographic variation in age structure in the wood frog, *Rana sylvatica*. Journal of Herpetology, 32, 4: 469-474
- Sinsch U., 2015. Review: Skeletochronological assessment of demographic life-history traits in amphibians. British Herpetological Society, 25: 5-13
- Sket B., 1997. Distribution of *Proteus* (Amphibia: Urodela: *Proteidae*) and its possible explanation. Journal of Biogeography, 24, 3: 263-280
- Smirina E.M., 1994. Age determination and longevity in amphibians. Gerontology, 40: 133-146
- Spencer L.T., Bancroft J.D., 2008. Tissue processing. V: Theory and practice of histological techniques. Bancroft J.D., Gamble M. (eds.). 6th ed. London, Churchill livingstone; 83-92
- Statham D. 2012. Problems with the evolutionary interpretation of limb design. Journal of Creation, 26, 2: 10
- Wagner G.P. in Chiu C., 2001. The tetrapod limb: A hypothesis on its origin. Journal of experimental zoology (mol dev evol), 291: 226-240
- Wake D.B., Castanet J., 1995. A Skeletochronological study of growth and age in relation to adult size in *Batrachoseps attenuatus*. Journal of Herpetology, 29, 1: 60-65

ZAHVALA

Lilijani Bizjak Mali se zahvaljujem
za vso pomoč, podporo, usmerjanje in nasvete
pri praktičnem in teoretičnem nastanku moje magistrske naloge.

Katji Zdešar Kotnik se zahvaljujem za vso pomoč
pri uvajanju v praktično delo ter za pomoč pri statistiki.

Katedri za Zoologijo se zahvaljujem za prostore in opremo,
ki so mi omogočili izvesti praktični del naloge
ter za prijetno delovno vzdušje.

Alešu Kladniku se zahvaljujem
za pomoč in razlago statistične analize
mojih rezultatov.

Zahvaljujem se vsem sošolcem,
ki so naredili moj študij še bolj zanimiv
in zabaven.

Svojim prijateljem se zahvaljujem,
za vse nepozabne zabavne trenutke,
za podporo in pomoč tekom študija.

Na koncu se zahvaljujem svoji družini,
ki mi je omogočila študij
me podpirala in verjela vame.

PRILOGA A

PROTOKOL ZA DEKALCINACIJO Z DUŠIKOVO KISLINO IN VKLAPLJANJE V PARAPLAST

1. IZOLACIJA TKIV

2. FISKACIJA: 10 % FORMALIN – čez noč

3. SPIRANJE: destilirana H₂O – čez noč

4. DEKLACINACIJA: 5 % DUŠIKOVA KISLINA*; MW; 450 W; 37 °C; 45 min-2 h

5. SPIRANJE: destilirana H₂O; MW; 550 W; 40 °C, 60 min

6. DEHIDRACIJA: MW; 250 W; 40 °C

1. 1x 70 % EtOH – 5 min,
2. 1x 96 % EtOH – 5 min,
3. 2x 100 % EtOH – 5 min,

7. BISTRENJE: KSILEN;

1. MW; 250 W; 40 °C – 10 min
2. MW; 650 W; 40 °C – 10 min

8. INFILTRACIJA:

- PARAPLAST 1 – nekaj ur
- PARAPLAST 2 – 24 ur

*Priprava 50 ml 5 % dušikove kisline:

- 46 ml destilirane H₂O
- 4 ml 65 % dušikove kisline*

Opomba: vedno dodajamo bolj koncentrirano tekočino v manj koncentrirano tekočino

PRILOGA B

PROTOKOL ZA BARVANJE HISTOLOŠKIH REZIN KOSTI Z EHRLICH-ovim HEMATOKSILINOM

(prirejeno po: J.D. Bancroft; Theory and Practice of histological Techniques; 6.edition, p.122)

1. DEPARAFINACIJA: 2x 3 min v ksilenu
2. REHIDRACIJA: padajoča alkoholna vrsta 2x 3 min (propanol, 96 % etanol, 70 % etanol)
3. Spiranje v destilirani H₂O, 3 min
4. BARVANJE: 60 min, spiranje z H₂O (5 min), diferenciacija s solno kislim alkoholom (3 s), spiranje s tekočo vodo (10-15 min)
5. DEHIDRACIJA: hiter prehod preko alkoholne vrste (70 % etanol, 96 % etanol, propanol)
7. BISTRENJE: 2x ksilen, 2 min
8. POKRIVANJE s sintetičnim krovnim medijem in krovniki

PRILOGA C

PROTOKOL ZA BARVANJE HISTOLOŠKIH REZIN KOSTI Z WEIGERT-ovim HEMATOKSILINOM

(prirejeno po: J.D. Bancroft; Theory and Practice of histological Techniques; 6.edition, p.128)

1. DEPARAFINACIJA: 2x 3 min ksilen
2. REHIDRACIJA: alkoholna vrsta 2x 3 min (propanol, 96 % etanol, 70 % etanol)
3. spiranje v destilirani H₂O, 3 min
4. BARVANJE: 2-3 min, spiranje pod tekočo H₂O (5 min), spiranje s solno kislim alkoholom (3 s), spiranje z destilirano H₂O
5. DEHIDRACIJA: hiter prehod preko alkoholne vrste (70 % etanol, 96 % etanol, propanol)
7. BISTRENJE: 2x ksilen, 2 min
8. POKRIVANJE s sintetičnim krovnim medijem in krovniki

PRILOGA D

Preglednica 4: Podatki o dolžini zadnje okončine in posameznih kosti čine. Meritve so podane v mm.

oznaka	zadnja noga	femur	tibija	fibula	stopalo	prstki
Pa 8-1	14	6	3	3	4	2,9
Pa 9-1	9,8	5,1	2,2	2,2	3,5	2,2
Pa 9-2	13	7,5	2,7	2,7	4	3
Pa 10-1	16	8,2	3	3	4	3
Pa 12-1	15	7,5	3	3	4	3
Pa 12-2	17	8,5	3,2	3,2	5	4
Pa 13-1	11	6,3	2,5	2,5	3	2,2
Pa 13-2	14	8	3	3	4	3
Pa 14-1	15	8	3	3	5	4
Pa 14-2	16	8	3,1	3,1	4	3
Pa 15-1	17	8,5	3,5	3,5	5,1	4
Pa 15-2	14	7,5	3	3	3,9	3,1
Pa 16-1	14	7	2,9	3	3,5	2,5
Pa 17-2	15	8	3,8	3,8	6	5
Pa 18-1	16	7,5	2,7	3	4,8	4
Pa 18-2	16	8	4,5	4	5	4
Pa 19-1	15	8	2,9	2,9	4,1	4
Pa 23-1	13	7,1	3,2	3,2	4,6	3,7
Pa 25-1	17	9	4	3,7	5	4
Pa 27-1	22	13,4	5	5	6	5
Pa 27-2	23	11	4,3	4,3	6,2	5,1
Pa 30-1	19	9,1	4	3,7	5,1	3,9
Pa 30-2	20	11	4	4,2	6	4,5
Pa 31-1	19	9,9	4	4	5,1	4,1
Pa 32-1	21	10,1	4	4	5,2	4,2
Pa 32-2	20	7,5	2,7	3	4	3
Pa 34-2	15	9,2	3,9	3,9	5,7	4,5
Pa 35-1	20	10	4,5	4,5	5,2	4
Pa 36-1	21	11	4,1	4,1	6,1	5,5
Pa 36-2	21	10	4	4	5	4
Pa 37-1	20	10	4	4	5,1	5,1
Pa 40-1	20	13	5	5	6,6	5,6

PRILOGA E

Preglednica 5: Podatki o dolžinah sprednje okončine in posameznih kosti. Podatki so podani v mm.

oznaka	sprednja noga	humerus	ulna	radius	stopalo	prstki
Pa 8-1	12	5,9	4,00	3,5	3,9	3
Pa 9-1	9	5,5	3,9	3,8	4,4	4
Pa 9-2	13	6,8	4	3,3	4,7	3,7
Pa 10-1	17	7,1	4	3,8	4	2,8
Pa 12-1	15	7,5	4	4	4,1	3
Pa 12-2	15	8	4,8	4,6	2	1
Pa 13-1	12	6,5	4	3,2	4,2	3,2
Pa 13-2	14	7,1	4,8	4,1	4,8	4
Pa 14-1	17	7	4	4	5	4
Pa 14-2	17	8,1	4,2	4,2	5	4
Pa 15-1	16	8,1	5	4,1	5	4
Pa 15-2	15	7,2	4	3,7	4,1	3,1
Pa 16-1	17	7,6	4,7	4	4,7	3,7
Pa 17-2	16	7	5	4	6	5
Pa 18-1	19	7,5	4,5	3,5	5	4
Pa 18-2	18	7,5	4,15	4,1	5	4
Pa 19-1	16	7,2	4	3,5	4,7	4
Pa 23-1	15	8	4,2	4,2	5	3,9
Pa 25-1	20	9,5	5,1	5,1	5,7	4,1
Pa 27-1	23	11	7,1	6,2	6,2	5,1
Pa 27-2	22	10,5	6	5,7	6,2	5,3
Pa 30-1	21	10,5	6,1	5,1	5,2	3,8
Pa 30-2	23	10,5	5,5	5,5	6	4
Pa 31-1	18	10	6,1	5,2	6	4
Pa 32-1	20	9,8	5	4,8	6	4,2
Pa 32-2	15	7	3,9	3,8	4,1	3,1
Pa 34-2	18	9,3	5,2	5	7,3	6,1
Pa 35-1	21	10	6,2	5,2	6	4,2
Pa 36-1	23	10,8	6,8	5,7	6,1	4,5
Pa 36-2	18	8,7	5,3	4,6	5	4
Pa 37-1	19	9,7	5	4,2	5,4	4,3
Pa 40-1	24	11,5	5,1	5,1	7	5,6

PRILOGA F

Preglednica 6: Podatki o debelini posameznih kosti sprednje in zadnje noge. Meritve so podane v μm .

oznaka	femur	fibula	tibija	zadnji prstki	humerus	ulna	radius	sprednji prstki
Pa 8-1	359	109,3	202,4	/	368,5	158,6	176,5	111,3
Pa 9-1	250,1	114,1	119,7	97,3	229,8	162,2	165,4	114,3
Pa 9-2	248,4	106,1	129,3	101,3	213,5	143,1	127,7	146,5
Pa 10-1	/	/	/	/	/	/	/	/
Pa 12-1	281,4	126	124,9	103,4	236,3	136,3	166,6	110,9
Pa 12-2	331,5	161,8	212,9	149,1	402,3	221,4	202,4	/
Pa 13-1	/	/	/	/	/	/	/	/
Pa 13-2	304,1	139,1	176,5	131,2	347,9	174,5	159,4	126,4
Pa 14-1	/	/	/	/	/	/	/	/
Pa 14-2	421	140,7	186,6	66	108,5	194,4	261,6	136
Pa 15-1	361,3	170,6	204,7	160,2	258,2	191,2	205,6	163,8
Pa 15-2	300,3	140,6	262,7	113,7	334,8	150,3	197,1	110,1
Pa 16-1	375,6	188,8	177,7	129,1	459,7	218,3	214	185,1
Pa 17-2	505	159,4	202,3	98,2	704	211,9	256,4	124,8
Pa 18-1	321	137,8	132,7	95,2	353	208,1	187,6	128,4
Pa 18-2	382	163,6	194	130,9	430	204,2	190,2	147,1
Pa 19-1	347,8	183,3	180,2	/	363,9	147,1	200,6	130,8
Pa 23-1	286,6	196,9	128,8	105,5	328,3	184,9	196,8	139,5
Pa 25-1	/	/	/	/	/	/	/	/
Pa 27-1	/	258,4	379,3	264,3	/	314,2	352,7	208,4
Pa 27-2	588,2	280,5	388	204,8	668,4	346,3	436,3	192,4
Pa 30-1	448,4	200,3	247,3	219,8	480,7	219,4	345,3	206,3
Pa 30-2	/	/	/	/	/	285,4	282	190,1
Pa 31-1	/	/	/	/	/	/	/	/
Pa 32-1	499,7	232,6	272,2	216,3	429,4	260,7	280	178,1
Pa 32-2	301,3	186,4	127,2	118,5	/	/	/	/
Pa 34-2	580,3	228,3	289,8	194,2	447,7	264	327,8	183
Pa 35-1	512,4	261,4	325,7	159,5	567,7	294,2	311,1	180,7
Pa 36-1	542,6	257,7	322,1	182,9	417,4	265	275,5	212,8
Pa 36-2	620,5	186,4	217,2	134,1	551,5	238,5	242,3	158,7
Pa 37-1	519,2	242,7	273,1	207,1	530,7	223,2	279,9	225,1
Pa 40-1	250,3	254,4	230,6	181,2	520,4	234	273,4	192,9

/ - ni podatka

PRILOGA G

Preglednica 7: Podatki o premeru medularne votline posameznih kosti sprednje in zadnje noge. Meritve so podane v μm .

oznaka	femur	fibula	tibija	zadnji prstki	humerus	ulna	radius	sprednji prstki
Pa 8-1	103	50,6	45	/	132	72,8	74,7	58,4
Pa 9-1	104,5	76,2	75,5	76	138,6	101	97,8	92,9
Pa 9-2	97,8	59,6	87,3	74,6	106,7	94,5	87	111,2
Pa 10-1	/	/	/	/	/	/	/	/
Pa 12-1	109,3	73,6	74,8	55	106,6	72,2	92,2	79,1
Pa 12-2	92,6	61,7	89,5	76,8	111	72,8	82,7	/
Pa 13-1	/	/	/	/	/	/	/	/
Pa 13-2	104,9	71,6	95,5	96,2	155,4	97,4	85,5	88,3
Pa 14-1	/	/	/	/	/	/	/	/
Pa 14-2	129,7	61,3	76,1	17,5	126,4	79,9	107,7	91,4
Pa 15-1	105,6	71,2	92,2	89,9	137,2	86,7	95,5	100,1
Pa 15-2	121,9	85,8	97,1	65,4	114,9	83,6	93,8	72,7
Pa 16-1	150	92,9	63,1	71,9	116,8	89,4	85,2	93,4
Pa 17-2	140,2	56,8	83,1	63,2	145,3	92,3	99	81,6
Pa 18-1	107,7	22,3	74,6	67,6	127,6	97,1	90,2	75,6
Pa 18-2	123,9	59,4	81,9	75,8	104,3	86,1	83,8	100,6
Pa 19-1	113,7	89,9	107,3	/	123,7	79,5	93,8	98,7
Pa 23-1	101,4	91,1	62,8	52,6	122,8	101,4	105,6	87,5
Pa 25-1	/	/	/	/	/	/	/	/
Pa 27-1	/	75,7	93,4	86,4	/	69,5	96,3	89,9
Pa 27-2	134,1	72,2	90,3	89,8	135,1	83,5	105,5	87,5
Pa 30-1	72,8	70,6	87,1	97	102,2	45,5	90,3	93,8
Pa 30-2	/	/	/	/	/	86,3	74,4	80,4
Pa 31-1	/	/	/	/	/	/	/	/
Pa 32-1	137,5	98,2	86,4	87,9	121,6	109,9	101,6	83,5
Pa 32-2	106,6	85,4	65	83,9	/	/	/	/
Pa 34-2	89,4	72,1	98,6	82,6	143,1	93,4	95	95
Pa 35-1	116,1	70,3	80,5	99,7	135,2	99,8	84,1	88,2
Pa 36-1	73,2	77,1	96,6	87,1	95	90	97,3	108,3
Pa 36-2	199,9	70,8	83,5	83,5	124,8	83,9	93,7	84,4
Pa 37-1	149,1	99,8	116,7	88,7	98,1	99,8	97,5	118,6
Pa 40-1	75,5	61,6	76,3	85,5	95,6	62,5	66,1	84

/ - ni podatka