

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Petra ROGLIČ

**UPORABNOST SKELETOKRONOLOŠKE METODE ZA OCENO
STAROSTI PRI MOČERILARJIH (AMPHIBIA: PROTEIDAE)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**APPLICABILITY OF SKELETOCHRONOLOGICAL METHOD FOR
AGE ESTIMATION IN PROTEIDAES (AMPHIBIA: PROTEIDAE)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomska naloga je bila opravljena na Katedri za Zoologijo, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Borisa Buloga in za somentorico dr. Lilijano Bizjak Mali.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Somentor: dr. Lilijana Bizjak Mali
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Predsednik: prof. dr. Marija Štefančič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzent: prof. dr. Vera Ferlan – Marolt
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patologijo

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

Datum zagovora: 1. 6. 2007

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Petra Roglič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD DN

DK 57. 082: 597. 6 (043. 2) = 863

KG Skeletokronologija/Proteidae/Rana temporaria/Linije zavrte rasti/Dekalcinacija

AV ROGLIČ, Petra

SA BULOG, Boris ment. / BIZJAK MALI, Lilijana soment.

KZ 1000 Ljubljana, SLO, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo

LI 2007

IN UPORABNOST SKELETOKRONOLOŠKE METODE ZA OCENO STAROSTI
PRI MOČERILARJIH (AMPHIBIA: PROTEIDAE)

TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)

OP X, 77 str., 3 pregl., 40 sl., 4 pril., 29 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Nameravali smo ugotoviti uporabnost skeletokronološke metode pri dveh vrstah močerilarjev (*Proteidae*), in sicer pri močerilu (*Proteus anguinus*) in blatnem kužku (*Necturus maculosus*). Močeril je še posebej zanimiv, saj živi v konstantnih jamskih pogojih. V raziskavo smo vključili še predstavnika brezrepcev sekuljo (*Rana temporaria*). Pripravili smo tudi ustrezne protokole za pripravo preparatov. Za raziskavo smo uporabljali zadnje eksremitete - prstke, femurje in tibiofibule. Dekalcinirali smo z EDTA, v mikrovalovni pečici. Uporabili pa smo še druga dekalcinacijska sredstva kot je 5% dušikova kislina, ki se je izkazala za zelo dober dekalcinacijski medij. Pri vseh omenjenih vrstah dvoživk smo dobili izrazite linije zavrte rasti (LAG-e). Linije so v perifernem delu najgostejše, zato je pri vrstah, ki dosežejo višje starosti, štetje linij oteženo pri starejših osebkih. Pri močerilih in nekturih smo opazili tudi dvojne linije, vmesne linije pa so bile prisotne pri vseh treh vrstah. Periostalno in endostalno kost smo opazili pri prstih sekulj, medtem, ko pri nekturih in močerilih endostalnega dela nismo opazili. Pri močerilu in nekturu je v centralnem delu dolgih kosti prisotno hrustančno tkivo še v osrednjem diafiznem delu, medtem ko je pri sekuljah hrustanec omejen le na konce epifiz, v osrednjem delu kosti pa je prisotna mozgovna votlina. Prsti močerilov so slabo osificirani, linij je malo in so slabše vidne. Žal niso primerni za ocenjevanje starosti.

KEY WORDS DOKUMENTATION (KWD)

DN Dn

DC 57. 082: 597. 6 (043. 2) = 863

CX Skeletochronology/Proteidae/Rana temporaria/Lines of arrested growth/Decalcination

AU ROGLIČ, Petra

AA BULOG, Boris supervisor / BIZJAK MALI, Lilijana co – advisor

PP 1000, Ljubljana, SLO, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2007

TI APPLICABILITY OF SKELETOCHRONOLOGICAL METHOD FOR AGE ESTIMATION IN PROTEIDAES (AMPHIBIA: PROTEIDAE)

DT Graduation thesis (University studies)

NO X, 77 p., 3 tab., 40 fig., 4 ann., 29 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Our main purpose in this research project was to find out the applicability of skeletochronology in two species of Proteids (*Proteidae*); cave salamander (*Proteus anguinus*) and mud-puppy (*Necturus maculosus*). Cave salamander was especially interesting species because of its constant conditions in their underground aquatic habitats. We also included an anuran species; common frog (*Rana temporaria*) in this research, and prepare corresponding histological protocols. Histomorphological structures of the hind limb – phalanges, femur and tibiofibula were investigated using two different decalcifying agents, EDTA and a 5% solution of nitric acid, which showed to be more suitable. All three species have distinctive resting lines or lines of arrested growth (LAG). Resting lines are thicker in periphery and therefore more difficult to distinguish in older, long-lived animals. Double lines were present only in cave salamanders and mud-puppies, whereas additional intraseasonal (false) lines were present in all three species. Common frogs have periosteal and endosteal bone, whereas in our cave salamander and mud-puppy the endosteal bone is absent. In these two species, the centre of a bone is cartilaginous. In common frogs however, the cartilage is restricted only to the epiphyses, whereas the diaphyse of the bone has marrow cavity. Phalanges of cave salamander are poorly ossified, resting lines are weaker and therefore not useful for age estimation with skeletochronological method.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOKUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO TABEL	X
1 UVOD.....	1
1.1 RASTNE LINIJE PRI DVOŽIVKAH IN PLAZILCIH.....	3
1.2 RAZVOJ IN RAST DOLGIH KOSTI PRI DVOŽIVKAH.....	7
1.2.1 Zgodnja diferenciacija kosti in oblikovanje mozgovne votline.....	7
1.2.2 Diferenciacija in razvoj epifiz	8
1.2.3 Rast periostalne kosti.....	9
1.2.4 Oblikovanje endostalne kosti in resorbcija periostalne kosti.....	10
1.3 RASTNE LINIJE V ČLENKIH PRSTOV	10
1.4 DOLGOŽIVOST IN STAROSTNA STRUKTURA POPULACIJ	11
1.5 POMEN METODE OCENJEVANJA STAROSTI	12
1.6 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI OSEBKOV IZBRANIH VRST	14
1.6.1 Blatni kužek ali nektur (<i>Necturus maculosus maculosus</i>).....	14
1.6.2 Močeril (<i>Proteus anguinus</i>)	15
1.6.3 Sekulja (<i>Rana temporaria</i>).....	16
1.7 NAMEN DELA	18
2 METODE.....	19
2.1 EKSPERIMENTALNE ŽIVALI.....	19
2.2 PRIPRAVA TKIV.....	20
2.2.1 Dekalcinacija.....	20
2.2.1.1 Dekalcinacija z etilendiamintetraocetno kislino – EDTA.....	21
2.2.1.2 Dekalcinacija s 5 % dušikovo kislino	22
2.2.2 Dehidracija, bistrenje in vklapljanje.....	22
2.2.3 Priprava zamrznjenih rezin.....	24
2.2.4 Barvanje	24
2.2.5 Mikroskopiranje	26

3	REZULTATI	27
3.1	PREPARATI MOČERILA (<i>Proteus anguinus</i>)	27
3.1.1	Vzorci dekalcinacije z EDTA.....	30
3.1.2	Vzorci dekalcinacije s 5% dušikovo kislino.....	32
3.2	PREPARATI BLATNEGA KUŽKA (<i>Necturus maculosus</i>)	40
3.2.1	Vzorci dekalcinacije z EDTA.....	43
3.2.2	Vzorci dekalcinacije s 5% dušikovo kislino.....	45
3.3	PREPARATI SEKULJE (<i>Rana temporaria</i>).....	50
3.3.1	Vzorci dekalcinacije z EDTA.....	52
3.3.2	Vzorci dekalcinacije s 5% dušikovo kislino.....	54
4	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	61
4.1	RAZPRAVA	61
4.1.1	Standarizacija protokola	61
4.1.2	Linije zavrte rasti.....	64
4.2	SKLEPI.....	70
5	POVZETEK.....	71
6	VIRI	74
6.1	CITIRANI VIRI.....	74
6.2	DRUGI VIRI	77
7	ZAHVALA	78
8	PRILOGE	79

KAZALO SLIK

Slika 1: Vzorec nastajanja linij zavrte rasti (LAG) na dolgih kosteh žab po prvi (A), drugi (B) in tretji (C) hibernaciji. D: vloga periosta pri longitudinalni in radialni rasti kosti. Periost, ki je paralelen na kostni cilinder, nalaga zaporedne plasti tkiva med aktivno sezono (modro obarvano); del periosta pa se podaljšuje čez rob periostalne kosti in nalaga tkivo na vrh vsake plasti (rdeče obarvano) (Rozenblut in Ogielska, 2005).	9
Slika 2: Blatni kužek ali nektur (<i>Necturus maculosus</i>)	14
Slika 3: Nepigmentirani proteus ali močeril (<i>Proteus anguinus</i>) Foto: A. Hodalič	15
Slika 4: Črni močeril (<i>Proteus anguinus parkelj</i>) Foto: R. Verlinde	16
Slika 5: Sekulja (<i>Rana temporaria</i>)	17
Slika 6a, b: Prečni prerez zadnje ekstremitete močerila (<i>Proteus anguinus</i>) P163 v predelu femurja. Zamrznjene rezine, dekalcinacija z EDTA – 5h , barvano z Weigert- ovim hematoksilinom – 2min.	30
Slika 7a, b, c: Prečni prerezi zadnje ekstremitete močerila (<i>Proteus anguinus</i>) P165. Zamrznjene rezine, dekalcinacija z EDTA– 5h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	31
Slika 8a, b: Prečna prereza zadnje ekstremitete črnega močerila (<i>Proteus anguinus parkelj</i>) Č12. Parafinske rezine, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ , barvano z Weigert - ovim hematoksilinom.	32
Slika 9: Prečni prerez zadnje ekstremitete črnega močerila (<i>Proteus anguinus parkelj</i>) Č13 v predelu femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 6h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom.	33
Slika 10: Prečni prerez zadnje ekstremitete močerila (<i>Proteus anguinus</i>) P151 v predelu femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 5h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom.	33
Slika 11a, b: Prečna prereza zadnje ekstremitete močerila (<i>Proteus anguinus</i>) P150 v predelu femurja. Parafinske rezine, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 5h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom.	34
Slika 12a, b, c: Prečni prerezi zadnje ekstremitete močerila (<i>Proteus anguinus</i>) P163 v predelu femurja. Parafinske rezine, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 4h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom.	35
Slika 13: Prečni prerez zadnje ekstremitete močerila (<i>Proteus anguinus</i>) P168 v predelu diafize femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 7h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom.	36
Slika 14: Prečni prerez zadnje ekstremitete močerila (<i>Proteus anguinus</i>) P176 v predelu diafize femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 7h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom.	36
Slika 15a, b: Prečna prereza zadnje ekstremitete močerila (<i>Proteus anguinus</i>) P173 v predelu femurja. Parafinske rezine, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 5h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom.	37

Slika 16: Prečni prerez zadnje ekstremitete močerila (<i>Proteus anguinus</i>) P175 v predelu femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 4h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom.	38
Slika 17: Prečni prerez zadnje ekstremitete močerila (<i>Proteus anguinus</i>) P179 v predelu femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 6h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom.	38
Slika 18: Prečna prereza zadnje ekstremitete močerila (<i>Proteus anguinus</i>) P183 v predelu femurja. Parafinske rezine, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 6h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom.	39
Slika 19a, b, c: Prečni prerezi zadnje ekstremitete blatnega kužka (<i>Necturus maculosus</i>) N25. Zamrznjene rezine, dekalcinacija z EDTA – 5h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom – 2min.	43
Slika 20a, b: Prečna prereza zadnje ekstremitete blatnega kužka (<i>Necturus maculosus</i>) N27 v predelu tibio - fibule. Zamrznjene rezine, dekalcinacija z EDTA – 5h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom – 2min.	44
Slika 21a, b: Prečni prerez prstkov zadnje ekstremitete blatnega kužka (<i>Necturus maculosus</i>) N1. Parafinske rezine, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 2h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	45
Slika 22a, b: Prečni prerez zadnje ekstremitete blatnega kužka (<i>Necturus maculosus</i>) N27 v predelu femurja. Parafinske rezine, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 7h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	46
Slika 23: Prečni prerez tretjega prstka zadnje ekstremitete blatnega kužka (<i>Necturus maculosus</i>) N34. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 2h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	47
Slika 24: Prečni prerez zadnje ekstremitete blatnega kužka (<i>Necturus maculosus</i>) N38 v predelu femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 7h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	47
Slika 25a, b: Prečni prerez zadnje ekstremitete blatnega kužka (<i>Necturus maculosus</i>) N37. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ , barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	48
Slika 26: Prečni prerez zadnje ekstremitete blatnega kužka (<i>Necturus maculosus</i>) N39 v predelu femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 7h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	49
Slika 27: Prečni prerez zadnje ekstremitete blatnega kužka (<i>Necturus maculosus</i>) N36 v predelu femurja. Zamrznjena rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 7h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	49
Slika 28: Prečni prerez prstka sekulje (<i>Rana temporaria</i>) Ž3. Parafinska rezina, dekalcinacija z EDTA – 5h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	52
Slika 29: Prečni prerez prstka sekulje (<i>Rana temporaria</i>) Ž4. Parafinska rezina, dekalcinacija z EDTA – 5h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	52
Slika 30: Prečni prerez prstka sekulje (<i>Rana temporaria</i>) Ž6. Parafinske rezine, dekalcinacija z EDTA – 5h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	53
Slika 31: Prečni prerez prstka sekulje (<i>Rana temporaria</i>) Ž13. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 1h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	54
Slika 32: Prečni prerez prstka sekulje (<i>Rana temporaria</i>) Ž14. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 1h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	54
Slika 33: Prečni prerez prstka sekulje (<i>Rana temporaria</i>) Ž15. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 2h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	55

Slika 34a, b: Prečna prereza prstka sekulje (<i>Rana temporaria</i>) Ž16. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 2h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	56
Slika 35: Prečni prerez prstka sekulje (<i>Rana temporaria</i>) Ž17. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 2h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	57
Slika 36: Prečni prerez prstka sekulje (<i>Rana temporaria</i>) Ž19. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 3h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	57
Slika 37a, b: Prečna prereza prstka sekulje (<i>Rana temporaria</i>) Ž18. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 2h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	58
Slika 38: Prečni prerez prstka sekulje (<i>Rana temporaria</i>) Ž20. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 3h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	59
Slika 39: Prečni prerez prstka sekulje (<i>Rana temporaria</i>) Ž22. Zamrznjena rezina, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 3h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	59
Slika 40a, b: Prečna prereza prstka sekulje (<i>Rana temporaria</i>) Ž21. Zamrznjene rezine, dekalcinacija s 5 % HNO ₃ – 3h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.	60

KAZALO TABEL

Tabela 1: Podatki o osebkih nepigmentiranega močerila (<i>Proteus anguinus</i>) in črnega močerila (<i>Proteus anguinus parkelj</i>), ki smo jih uporabili pri raziskavi in število linij zavrte rasti (LAG).	29
Tabela 2: Podatki o osebkih blatnega kužka (<i>Necturus maculosus</i>), ki smo jih uporabili pri raziskavi in število linij zavrte rasti (LAG).	42
Tabela 3: Podatki o osebkih sekulje (<i>Rana temporaria</i>), ki smo jih uporabili pri raziskavi in število linij zavrte rasti (LAG).	51

1 UVOD

Večina raziskav s področja zoologije (morfologije, fiziologije, ekologije, študije zgodovine življenja, študije populacij...), vključuje tudi podatke o starosti preučevanih živali. Tudi z vidika biomonitoringa okolja so študije dinamike starostne strukture populacij zelo pomembne, saj so živali, še posebej dvoživke zaradi antropogenih vplivov podvržene različnim kvarnim vplivom in so v mnogih habitatih že resno ogrožene. Natančnejša ocena starosti je tudi temelj za raziskave rasti in razvoja živali.

Za ugotavljanje starosti dvoživk in plazilcev je bilo predlaganih več različnih metod, kot na primer: teža očesne leče, velikost testisov, podatki o velikosti osebkov, metoda označevanja in izpuščanja izlovljenih osebkov in skeletokronologija.

Določanje starosti z dolžino telesa velja za nenatančno, saj je prisotno prekrivanje v dolžini telesa med starostnimi razredi, in celo med nezrelimi osebki. Razlogi za prekrivanje so dolga perioda brejosti, dolžina metamorfoze, individualne variacije v rasti in počasnejša rast po metamorfozi in vpliv okolja. Bell (1977 cit. po Marnell, 1998) je za analizo starosti navadnih pupkov *Triturus vulgaris* uporabljal dolžino telesa, vendar je mnogo avtorjev kasneje dolžino telesa smatralo kot slab indikator starosti (Hagstrom, 1980 cit. po Marnell, 1998; Caetano s sod., 1985 cit. po Marnell, 1998; Verrell in Francillon, 1986 cit. po Marnell, 1998; Wake in Castanet, 1995; Marnell, 1998). Pred spolno dozoritvijo še obstaja korelacija med velikostjo in starostjo živali, po spolni dozoritvi pa je ta korelacija zanemarljiva (Wake in Castanet, 1995; Castanet s sod., 1996; Marnell, 1998).

Za določanje starosti, dolgoživosti osebkov in med populacijskih variacij v rasti dvoživk se uporablja tudi metoda označevanja in izpusta, ki pa ni najbolj zanesljiva za preučevanje dvoživk od metamorfoze do starosti. Težko je etiketirati dvoživke takoj po metamorfozi zaradi njihove majhnosti, migracij in visoke stopnje umrljivosti. Poleg tega pa te študije trajajo vrsto let.

Skeletokronologija je sodobnejša metoda ugotavljanja starosti dvoživk in plazilcev in temelji na štetju plasti, ki nastanejo zaradi različno intenzivno nalaganega kostnega tkiva. Ta metoda je podobna metodi določanja starosti pri ribah, in sicer s štetjem rastnih obročev na luskah, kosteh in otolithih ter pri sesalcih s štetjem plasti v kostnih in zobnih tkivih. Seitz (1907 cit. po Castanet in Smirina, 1990) je bil prvi, ki je opazoval histomorfologijo kosti pri plazilcih in opazil plastovite strukture v kompaktnem delu kosti, ki jih je povezal s periodo rasti. Kasneje sta Wallis (1928 cit. po Castanet in Smirina, 1990) na želvah in Emelianov (1929 cit. po Castanet in Smirina, 1990) na kačah povezala število teh plasti v kosti s starostjo živali. Senning (1940) pa je prvi, ki je poročal o pojavu rastnih plasti v kosteh dvoživk, in sicer pri blatnih kužkih, *Necturus maculosus*. Čeprav je rastne linije pri nekturu našel v različnih kosteh, so bile le te najlepše vidne v parasfenoidni kosti. Avtor je analiziral več osebkov znane starosti in ugotovil, da je določanje starosti pri blatnih kužkih z rastnimi linijami zelo natančno, razen pri zelo starih osebkih, pri katerih so bile zunanje plasti tako blizu skupaj, da jih je bilo nemogoče prešteti. Rastne plasti so našli tudi v zigapofizah vretenc pri vrsti *Rana catesbeiana* (Willis, 1954 cit. po Smirina, 1994). Število plasti je ustrezalo znani starosti teh dvoživk. Na podlagi tega je Willis poudaril korist te metode pri določanju starosti dvoživk. Schroeder in Baskett (1968 cit. po Smirina, 1994) sta rastne plasti štela na pterigoidnih kosteh teh dvoživk. Kasneje so uporabljali prereze dekalciniranih dolgih kosti, kot sta humerus in femur (Smirina in Rocek, 1976 cit. po Marnell, 1998; Francillon, 1979 cit. po Marnell, 1998). Danes pa se uporabljajo predvsem prstni členki pri tistih dvoživkah, kjer je to mogoče (Gittins s sod., 1982 cit. po Marnell, 1998; Gibbons in McCarthy, 1983 cit. po Marnell, 1998; Acker s sod., 1986 cit. po Marnell, 1998; Hemelaar, 1985 cit. po Marnell, 1998; Reading, 1991 cit. po Marnell, 1998; Flageole in Leclair, 1992 cit. po Marnell, 1998; Miaud in Guillaume, 2005). Z uporabo prstnih členkov se izognemo žrtvovanju živali in lahko to metodo združimo še z metodo označevanja in izpusta ter drugimi ekološkimi raziskavami (Marnell, 1998).

Shaldybin (1987 cit. po Smirina, 1994) je za proučevanje linij zavrte rasti v kosteh uporabil zelo preprosto tehniko, kjer je dekalcinirane kosti vstavil med dve plasti kostnega mozga in razrezal z britvico, podobno kot se pripravljajo vzorci pri anatomiji rastlin. Sekcije je pobarval z ročnimi barvili, kot je črnilo. V zadnjem času pa se večinoma uporabljajo

zamrznjene rezine predhodno dekalciniranih kosti. Skeletokronologija je danes splošno uporabna metoda za oceno starosti dvoživk in plazilcev (Marnell, 1998).

1.1 RASTNE LINIJE PRI DVOŽIVKAH IN PLAZILCIH

Letna rastna linija v kosteh dvoživk, kot tudi pri kosteh plazilcev in sesalcev, ki imajo obdobje mirovanja, je sestavljena iz širšega pasu kostnega tkiva, ki meji na »počivajočo« linijo. Nastajanje letnih linij odseva sezonske spremembe v rasti živali. »Počivajoče« linije nastajajo v periodi z neugodnimi rastnimi pogoji, kot je npr. zima ali sušna perioda in nam tako omogočajo dokaj natančno oceno števila preživelih let pri živalih, podobno kot pri dendrologiji štetje letnic v deblu dreves (Marnell, 1998). Pomladno – poletne periode oziroma ugodne rastne periode so zabeležene s širokim pasom kostnega tkiva. Malo drugačne periode kot jih ima večina dvoživk v zmernem pasu so vidne pri kalifornijskem kačastem močeradu *Batrachoseps attenuatus*, saj je aktiven le med zimsko deževno dobo, kjer so temperature relativno nizke, poleti, med sušno dobo pa je neaktiven (Wake in Castanet, 1995). Castanet s sodelavci (1977 cit. po Smirina, 1994) je te letne linije poimenoval z »mark of skeletal growth« (MSG) ali področje skeletne rasti in »line of arrested growth« (LAG) ali linije zavrte rasti. Nekateri avtorji uporabljajo tudi izraz »resting line« (RS) za počivajoče rastne linije (Kusano s sod., 1995). Schroeder in Baskett (1968 cit. po Smirina, 1994) sta opisala še »transformacijsko linijo«, ki nastane tik po metamorfozi. To linijo so kasneje potrdili tudi drugi raziskovalci pri različnih vrstah dvoživk (Smirina, 1974 cit. po Smirina, 1994; Francillon, 1980 cit. po Smirina, 1994; Ishchenko in Ledentsov, 1984 cit. po Smirina, 1994).

Zgodnejši raziskovalci na področju določanja starosti dvoživk so šteli letne linije zavrte rasti na ploskih kosteh ali na prerezih vretenc in dolgih kosti. Ugotovili so tudi, da je pri ploskih kosteh, zaradi tanjšanja kosti s starostjo, težko videti najbolj notranje in najbolj zunanje linije pri starejših živalih (Senning, 1940, Smirina, 1994). Izrazitost linij pa je odvisna od rastnih vzorcev in oblike kosti. Kostni glave pri dvoživkah ponavadi niso najbolj priporočljive za analizo starosti osebka. Na prerezih je težje najti področje, na kateri bi bile

vidne vse rastne linije. Prav tako je sama priprava vzorcev kosti glave težja pri majhnih vrstah in mladih osebkih.

Pri oceni starosti s skeletokronologijo pa moramo biti še posebej previdni tudi na druge vrste linij oziroma dogodke v kostnem tkivu, ki sta jih opisala Castanet in Smirina (1990):

➤ Linija rojstva in metamorfoze ali Kastschenkova linija

Ta linija je posledica fiziološkega dogodka, ki se dogodi le enkrat v posameznikovem zgodnjem življenju. Kastschenkova linija ustreza tankemu ostanku embrionalnega hrustančnega matriksa na meji z medularno votlino, med periostalnim in endostalnim kostnim delom in je najbolj poznana v dolgih kosteh dvoživk (Haines, 1942; Francillon, 1980 cit. po Castanet in Smirina, 1990). Če je prisotna, je to dokaz, da endostalna resorbcija kosti še ni povsem odstranila prve periostalne depozicije in prvih upočasnjenih linij. Štetje linij zavrti rasti v periostalnem delu je tako zanesljivejše. Kastschenkova linija je značilna za dvoživke, ki imajo metamorfozo. Vendar pa so jo našli tudi pri kalifornijskem kačastem močeradu *Batrachoseps attenuatus*, ki nima faze ličinke. Mladiči se razvijajo že znotraj jajčne kapsule (Wake in Castanet, 1995).

➤ Dvojne linije

Prisotnost nespecifičnih (občasnih, lažnih, dodatnih,...) linij lahko onemogoči natančno štetje letnih linij. Te linije je težko odkriti in jih interpretirati. Če se dvojne linije pojavljajo pri večini osebkov v vzorcu, je to lahko posledica dvojnih letnih ciklov, vključno z npr. estivacijo in hibernacijo. Dvojne linije so proučevali pri višinski in nižinski populaciji pupkov *Triturus marmoratus* na Portugalskem (Caetano s sod., 1985 cit. po Castanet in Smirina, 1990). Pri višinski so bile prisotne dvojne linije, nižinska parapatrična populacija pa je imela le eno rastno linijo na leto. Dvojne in trojne linije so opazili tudi pri marmornatih pupkih *Triturus marmoratus*, ki živijo v mediteranskem podnebjju in imajo dva cikla mirovanja – pozimi, ko je mraz in med najbolj vročimi meseci poleti, ko se ribniki osušijo (Jakob s sod., 2002).

➤ Preoblikovanje kosti in odstranitev linij zavrte rasti

Preoblikovanje kostnega korteksa je lahko posledica prekrvljenosti kosti, ki lahko popolnoma uniči rastne linije. To preoblikovanje so opisali za želve, krokodile in nekatere brezrepce (Castanet in Smirina 1990).

Tudi endostalna resorpcija na periferiji medularne votline popolnoma odstrani nekaj linij zavrte rasti, ki so se prve naložile, kar ima lahko za posledico podcenjevanje ocene starosti posameznih osebkov. Stopnjo resorpcije notranje periostalne kosti najlaže ocenimo, če imamo osebek z znano starostjo. Vendar tudi če nam starost ni poznana, lahko stopnjo perimedularne resorpcije ocenimo s primerjavo velikosti medularne votline osebkov starega manj kot eno leto z diametrom prve linije pri enoletnem osebkju, kot tudi velikostjo medularne votline ter prvo linijo opaženo pri starejših osebkjih. To »povratno kalkulacijo« so predlagali in preverili številni avtorji (Smirina, 1974, cit. po Castanet in Smirina, 1990; Castanet in Cheylon, 1979, cit. po Castanet in Smirina, 1990; Gibbons in McCarthy, 1983 cit. po Castanet in Smirina, 1990; Leclair in Castanet, 1987 cit. po Castanet in Smirina, 1990; Smirina in Makarov, 1987 cit. po Castanet in Smirina, 1990; Zug, 1989 cit. po Castanet in Smirina, 1990). Nekatere študije so celo pokazale, da je razlika v intenziteti odstranjevanja endostalne kosti povezana s spolnim dimorfizmom, kot se je izkazalo pri krastači *Bufo bufo* (Smirina, 1983 cit. po Castanet in Smirina, 1990; Hemelaar, 1986 cit. po Castanet in Smirina, 1990). Pri brezrepkih so samice bolj podvržene resorpciji kot samci. Pomemben vpliv pri tem imajo verjetno reproduktivni procesi ter hormoni (Herman, 1992 cit. po Esteban s sod., 1996). Količina resorbirane kosti se prav tako lahko spreminja v sklopu različnih populacij krastače (Hemelaar, 1986 cit. po Castanet in Smirina, 1990) in tako ponuja novo taksonomsko značilnost.

Intenziteta endostalne resorpcije je odvisna tudi od tipa kosti. Ker so prstki manjše kosti je lahko učinek resorpcije linij zavrte rasti večji (Plytyczin s sod., 1995; Wake in Castanet 1995; Esteban s sod., 1996; Pharam s sod., 1996; Marnell 1997; Kumbar in Pancharatna 2001). Nekatere študije poudarjajo uporabo dolgih kosti ekstremitet, kot sta femur in humerus ali radioulna in tibiofibula, za ocenjevanje starosti. Pri ranidih naj bi imela tibiofibula počasnejšo stopnjo resorpcije (Regnier, 1983 cit. po Esteban s sod., 1996;

Esteban 1990 cit. po Esteban s sod., 1996, Esteban s sod., 1996). Endostalna resorpcija je del procesa preoblikovanja kosti in je izraz metabolizma med ontogenezo organizma. Vsi dejavniki, ki so v prid aktivni in povečani rasti, lahko povečajo intenzivnost endostalne resorpcije (Esteban s sod., 1996). Intenziteta resorpcije je odvisna od dnevnih in letnih aktivnosti. Leclair (1990 cit. po Esteban, 1996) je našel najvišjo stopnjo resorpcije pri ameriških žabah, ki živijo v skoraj nemotenih dnevno aktivnih pogojih in so brez dolge periode mirovanja med letom.

➤ Rastne linije v odvisnosti od okoljskih pogojev

Pri večini dvoživk in plazilcev se je izkazalo, da je izrazitost linij zavrte rasti povezana z okoljskimi pogoji. Pri velikih sezonskih razlikah, so LAG - i ponavadi močno izraženi. Linije so lahko manj izrazite pri vrstah, ki živijo v bolj konstantnih pogojih npr. v tropih. Pri kačah (Castanet, 1982 cit. po Castanet in Smirina, 1990) in nekaterih kuščarjih (Patnaik s sod., 1981 cit. po Castanet in Smirina, 1990; Castanet in Gasc, 1985 cit. po Castanet in Smirina, 1990) pa je izrazitost linij zavrte rasti neodvisna od okoljskih pogojev, kar ne velja za krokodile (Castanet, 1982 cit. po Castanet in Smirina, 1990).

➤ Prostorska razporeditev linij zavrte rasti

Presledek med dvema rastnima linijama ni konstanten preko celega življenja osebka, ampak razkrije variacije med kostno in telesno rastjo ter je podatek o posameznikovi rastni krivulji. S starostjo živali so presledki med linijami vedno manjši, kar otežuje štetje linij zavrte rasti pri dolgoživih osebkih. Pri mnogih vrstah se jasna razlika v linijah zavrte rasti (LAG-ih) pojavi šele s spolno zrelostjo osebka.

➤ Periferni LAG - i in ustavitev rasti

Rastne linije, ki so blizu zunanlega roba kosti, so težavne za štetje. To je najbolj izraženo pri dolgoživih vrstah. Pri njih je rastna stopnja v starejših letih zelo nizka in so linije zelo blizu druga drugi, prav tako so tudi zelo tanke. Nekatere študije, zlasti na plazilcih, so pokazale, da se lokalna rast kosti ustavi pred koncem življenja (Castanet s sod., 1988 cit.

po Castanet in Smirina, 1990) in ni nujno, da se to zgodi istočasno v različnih kosteh osebka.

Z reševanjem problemov dodatnih in nejasnih linij se je ukvarjal tudi Klevezal s sodelavci (1981 cit. po Smirina, 1994), ki je delal na sesalcih. Avtor meni, da lahko pravo napako ocene starosti ovrednotimo le z osebkom znane starosti, drugače je prisotna subjektivna napaka. Manjša kot je subjektivna napaka, večja je ponovljivost, ta pa nakazuje, da so linije bolj jasne. Uporabno je vključiti oceno jasnosti linij pri delu z oceno starosti, da si zagotovimo zanesljivost podatkov, prav tako tudi primerjavo ocene med različnimi populacijami. Problem pri štetju zunanjih linij lahko rešimo z analizo perifernih delov pod večjimi mikroskopskimi povečavami, kjer so linije blizu skupaj. Danes je to lahko izvedljivo tudi z računalniškimi programi za obdelavo slik, kot je na primer Adobe Photoshop in ACDSee.

1.2 RAZVOJ IN RAST DOLGIH KOSTI PRI DVOŽIVKAH

Histogeneza dolgih kosti je slabo poznana pri recentnih dvoživkah (*Lissamphibia*). Kastschenko (1881 cit. po Rozenblut in Ogielska, 2005) je bil prvi, ki je proučeval histogenezo in razvoj dolgih kosti pri juvenilnih in odraslih osebkih zelene žabe *Rana esculenta* ter pri larvah zelene krastače *Bufo viridis*. Prvi je opazil razlike v strukturi in histogenezi dolgih kosti med dvoživkami in sesalci.

1.2.1 Zgodnja diferenciacija kosti in oblikovanje mozgovne votline

Osifikacija hondralnega primordija dolgih kosti se pri larvah brezrepcev začne na koncu predmetamorfoze. Proces se zaključi ob metamorfoznem klimaksu. Osifikacija celotne ekstremitete poteka od proksimalnega dela k distalnemu.

V zgodnjih fazah metamorfoze pri žabah, so kosti okončin še v celoti hrustančne. Z razvojem osebka se ustvari tanka plast osificirane periostalne kosti v osrednjem delu diafize. V epifizah, kot tudi na obeh koncih diafize so hondrociti pravilne, okrogle oblike.

V srednjem delu diafize pa so hipertrofični in nepravilne oblike. Celotno dolžino diafize naloži tanka plast mineralizirane periostalne kosti. Ko hipertrofične hondrocite degenerirajo, nastane mozgovna votlina na sredini kosti blizu mest, kjer nastanejo prehranjevalni kanali. Ti vsebujejo žile, ki omogočajo nastanek celic kostnega mozga. Celice kostnega mozga zavzemajo 30% dolžine diafize. Degeneracija hipertrofičnih hondrocitov postopoma narašča proti epifizama. V višku metamorfoze in pred prvo hibernacijo se degeneracija hondrocitov v diafizi konča, mozgovna votlina pa doseže epifizi. Zato je hrustančno tkivo omejeno le na epifizi. Ko mozgovna votlina doseže epifizi, njena celotna oblika spominja na peščeno uro, z najožjim delom v sredini diafize.

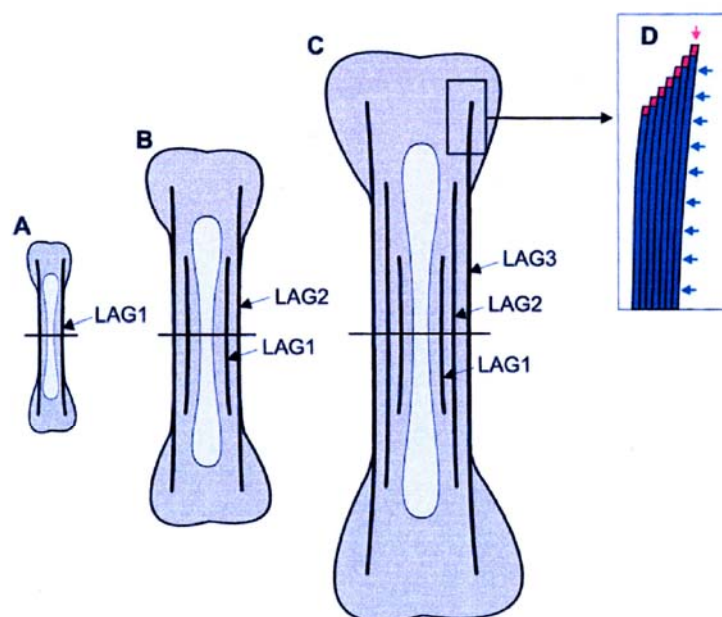
1.2.2 Diferenciacija in razvoj epifiz

V epifizah se prav tako oblikuje tanka plast periostalne kosti in tako ločuje zunanji in notranji del epifiznega hrustanca. Zunanji del tvori sklepni hrustanec, ki je iz dveh delov: pravega sklepnega hrustanca, ki je prisoten na vrhu epifize in lateralnega hrustanca. Oba dela imata podobno histološko strukturo, okrogle hondrocite. Pod pravim sklepnim hrustancem se nahaja hrustanec, ki tvori »čep« v periostalno kost. Ta čep se imenuje metafizni hrustanec. Sestavljen je iz delitvene in hipertrofične cone ter tanke plasti tkiva, ki meji na mozgovno votlino – mejno cono. Pri juvenilnih žabah je pravi sklepni hrustanec rahlo asimetričen, v prstnih členkih bolj kot v femurju.

Pred in po prvi hibernaciji se diameter delitvene cone povečuje, da lahko sledi povečanju periostalne kosti. Po drugi in tretji hibernaciji je delitvena cona iz več plasti celic, hipertrofična cona se debeli, mejna cona pa postane neenakomerna zaradi degeneracije hipertrofičnih celic. Pri žabah, ki doživijo četrto hibernacijo, je pravi sklepni hrustanec mineraliziran. Delitvena cona ostane nespremenjena. Delež periosta, ki pritrja lateralni hrustanec na kost je debelejši kot tisti okoli diafize. Sestavljen je iz dveh plasti periosta, ki tvorita osteohondralni ligament (OHL) (Felisbino in Carvalho, 2000 cit. po Rozenblut in Ogielska, 2005).

1.2.3 Rast periostalne kosti

Periostalna kost raste longitudinalno in radialno. Diafizni periost proizvaja kostno tkivo centripetalno po celi dolžini kosti in tako poveča debelino tkiva. Rast v dolžino poteka v specializiranem delu, osteohondralnem ligamentu (OHL), ki je prisoten v proksimalni in distalni epifizni. V femurju je OHL bolj izrazit in debelejši kot pri prstnih členkih in narti. Periostalna kost se tvori okoli celotne dolžine hrustančne diafize kot tanek cilindar. Med prvo hibernacijo se rast žab ustavi, oblikuje se prva linija zavrte rasti (LAG). Prvi LAG se razteza po celotni dolžini diafize, s konci pa sega tudi v epifizni (sl. 1). Med drugo hibernacijo se rast spet ustavi, naredi se drugi LAG, ki se spet razteza po celotni dolžini diafize in sega v epifizni, vendar je daljši od prvega LAG – a, saj je v tem času, med prvo in drugo hibernacijo, zrasla kost še longitudinalno (sl. 1). Tako je prva linija zavrte rasti prisotna le v sredini 25-35% dolžine diafize.



Slika 1: Vzorec nastajanja linij zavrte rasti (LAG) na dolgih kosteh žab po prvi (A), drugi (B) in tretji (C) hibernaciji. D: vloga periosta pri longitudinalni in radialni rasti kosti. Periost, ki je paralelen na kostni cilindar, nalaga zaporedne plasti tkiva med aktivno sezono (modro obarvano); del periosta pa se podaljšuje čez rob periostalne kosti in nalaga tkivo na vrh vsake plasti (rdeče obarvano) (Rozenblut in Ogielska, 2005).

1.2.4 Oblikovanje endostalne kosti in resorbcija periostalne kosti

Ob koncu metamorfoze kostno tkivo v celoti nadomesti primarno larvalno kost.

Endost je specializirano vezivno tkivo, ki obdaja mozgovno votlino dolgih kosti. Tako kot periost lahko tudi endost tvori kostno tkivo. Endostalno kostno tkivo se tvori centrifugalno, od mozgovne votline navzven in se ponavadi prvič pojavi po drugi hibernaciji.

Najbolj notranja plast periostalne kosti je homogena. Med to plastjo in endostalno kostjo je plast hondroidnega tkiva. Ta kostna struktura pogosto proizvaja artefakt, ki je viden na prečnem prerezu kot razpoka med dvema vrstama kostnih tkiv, znana tudi kot Kastschenkova linija. Po metamorfozi se z resorbcijo periostalne kosti (endostalna resorbcija) poveča obseg mozgovne votline. Pri žabah po prvi hibernaciji resorbcija ponavadi odstrani del prve rastne cone in se ustavi preden doseže prvo linijo zavrte rasti. Tako se le ta ohrani. Pri osebkih po drugi hibernaciji lahko resorbcija odstrani del prve linije zavrte rasti. Pri 3 in 4 letnih živalih je lahko odstranjena celotna prva linija ter včasih še del druge rastne cone (Rozenblut in Ogielska, 2005). Čeprav so rastne linije prisotne tako v endostalnem kot v periostalnem delu, so le-te v periostalnem delu izrazitejše in zanesljivejše za oceno starosti osebka (Smirina, 1994).

1.3 RASTNE LINIJE V ČLENKIH PRSTOV

Rastne linije pri dvoživkah se prav tako kot v dolgih kosteh tvorijo tudi v prstnih členkih. Vendar moramo pri uporabi prstnih členkov odstraniti distalni členek, saj tam letnice niso vidne (Castanet in Smirina, 1990). Kombinirane študije ščipanja prstov ter ulova in ponovnega izlova, ki so bile narejene na naravnih populacijah žab, so potrdile uporabnost prstov za oceno starosti osebkov (Smirina, 1972 cit. po Smirina, 1994). Odraslim sekuljam, *Rana temporaria* so ob ulovu amputirali prst, injicirali bodisi tetraciklin bodisi alizarin za označitev kostnega tkiva ter osebke izpustili. Čez leto ali dve so nekaj osebkov ponovno izlovili. Pri pregledu linij zavrte rasti v dolgih kosteh se je število novo nastalih linij ujemalo s pretečenim časom od izpusta. Pri istih osebkih so primerjali tudi shranjene

vzorci prstnih členkov z vzorci, ki so jih odvzeli po enem letu. Pri osmih od devetih osebkih se je število linij zavrte rasti povečalo za eno.

Danes je štetje linij zavrte rasti v prstnih členkih rutinska metoda za določanje starosti pri dvoživkah, saj nam omogoča določiti starost brez žrtvovanja živali in amputirani prstni členek se lahko regenerira. To je tudi pomemben razlog, zakaj je ta metoda še posebno dragocena pri populacijah dvoživk, ki so redke in ogrožene. Metodo štetja linij zavrte rasti v prstnih členkih so uporabljali predvsem pri proučevanju starosti brezrepcev, vendar so kasneje to metodo začeli uporabljati tudi na repatih dvoživkah (Campolongo s sod., 1989 cit. po Smirina, 1994; Francillon – Viellot s sod., 1990 cit. po Smirina, 1994; Marnell, 1997, Marnell, 1998; Guyetant s sod., 1991 cit. po Marnell, 1997; Miaud in Guillaume, 2005). Vendar moramo biti pri repatih dvoživkah previdni, saj so rastne linije lahko zavajajoče, zaradi sposobnosti regeneracije izgubljenega člena. Zaradi slabe osifikacije in ohranjanja hrustanca pa prstni členki niso primerni pri vseh vrstah dvoživk.

Pri ugotavljanju starosti dvoživk z letnimi rastnimi linijami je pomembna izbira kosti ali njenega dela. Čeprav je splošen vzorec linij v različnih kosteh ene živali ponavadi enak, se lahko različne kosti in tudi različni deli kosti razlikujejo v dolžini periode rasti. Rezultat je lahko različno število linij zavrte rasti v različnih kosteh predvsem pri starejših osebkih. Danes se za ugotavljanje starosti dvoživk uporabljajo tako ploske kot dolge kosti, čeprav so skeletni rastni znaki v ploskih kosteh težje prepoznavni.

1.4 DOLGOŽIVOST IN STAROSTNA STRUKTURA POPULACIJ

O življenjski dobi dvoživk v naravi ni veliko znanega. Na podlagi podatkov o živalih v ujetništvu je razvidno, da lahko ima veliko vrst dvoživk potencialno življenjsko dobo dvajset ali več let (Duellman in Trueb, 1985). Dvoživke so sorazmerno dolgoživeče živali, v primerjavi s sesalci podobnih velikosti (Smirina, 1994). Običajno večjo starost dosežejo večje vodne repate dvoživke. Verjetno so v naravi manjše dvoživke bolj izpostavljene predaciji (Duellman in Trueb, 1986). Bohm (1979 cit. po Duellman in Trueb, 1986) je ugotovil, da lahko navadni močerad *Salamandra salamandra* doživi 50 let. Močeril

Proteus anguinus pa lahko živi vsaj 70 let, saj so toliko časa imeli nekatere osebkke v ujetništvu (Bulog s sod., 2000). Razvidno je znatno protislovje med življenjsko dobo dvoživk v ujetništvu in tistih v naravi. V naravi zelo malo osebkov doseže potencialno maksimalno starost. Na primer: *Bufo bufo* lahko v ujetništvu živi do 36 let v naravi pa le 9-12 let, *Triturus cristatus* do 28 let v naravi pa 14 – 16 let, *Triturus marmoratus* do 25 let v naravi pa do 12, *Triturus vulgaris* do 20 let, v naravi pa 14 - 16, *Bombina bombina* do 29 let v naravi pa le 11, *Rana temporaria* v ujetništvu doživi do 18 let, v naravi pa 11 – 14. Maksimalna starost repatih dvoživk v naravi je večja kot starost brezrepcev (Smirina, 1994).

1.5 POMEN METODE OCENJEVANJA STAROSTI

Z metodo ocenjevanja starosti dobimo podatek o dolgoživosti osebkov v populaciji, lahko delamo demografske študije in proučujemo stopnjo rasti živali. Znano je, da stopnja rasti upade, ko žival doseže spolno zrelost (Smirina, 1994). S primerjavo relativne širine sosednih letnih linij, je v nekaterih primerih možno ugotoviti tudi starost spolne dozoritve osebkke, saj le ti hitreje rastejo do spolne dozoritve, v tem obdobju je tudi velikost bolj zanesljiv podatek kot pa po spolno dozoritvi (Castanet s sod., 1996). Študije nalaganja vzorcev linij zavrte rasti so pokazale, da so najstarejši osebki tisti, ki so rasli bolj počasi v prvem letu starosti. Največji osebki niso tudi najstarejši. Študije so pokazale, da so večinoma odrasli osebki v populaciji zajeti v študije o starostni strukturi populacij. To je verjetno posledica izolacije mlajših osebkov od odraslih, saj naseljujejo različne habitate ali imajo različne vzorce dnevnih aktivnosti. Tako razmerje zrelih in nezrelih osebkov v vzorcu pogosto ne odseva realne situacije v populaciji. Upoštevati pa je potrebno tudi to, da veliko osebkov v larvalnem obdobju pogine zaradi nenaklonjenih okoljskih pogojev. Dolgoročne študije so pomembne tudi za ugotavljanje dinamike starostne strukture populacij.

Veliko avtorjev je odkrilo interpopulacijske variacije v vzorcih linij zavrte rasti. Ugotovljeno je bilo, da se dvojne in celo trojne letne linije pogosteje tvorijo pri osebkkih v gorskih populacijah kot pri nižinskih, še posebej tik pred dozoritvijo (Halliday, 1988 cit. po

Smirina, 1994; Smirina, 1985 cit. po Smirina; Caetano s sod., 1985 cit. po Smirina; Caetano in Castanet, 1987 cit. po Smirina). Zaradi velike odvisnosti dvoživk od okolja lahko starostna sestava populacij služi kot indikator onesnaženosti okolja. Lahko rečemo, da je najboljša metoda ocene starosti dvoživk prav štetje linij zavrtje rasti v kosteh ali skeletokronologija. Uporabimo lahko tudi metodo lova in ponovnega ulova kot dodatek k štetju linij. Najbolj priporočljiva je kombinacija različnih metod.

Skeletna tkiva so zelo uporabno kronološko orodje, predvsem za raziskave v eko – demografiji in populacijski biologiji, sistematiki in morfologiji, prav tako pa tudi v paleontologiji, arheologiji in klimatologiji.

1.6 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI OSEBKOV IZBRANIH VRST

1.6.1 Blatni kužek ali nektur (*Necturus maculosus maculosus*)

Blatni kužek ali nektur (*Necturus maculosus maculosus*) sodi v družino močerilarjev (Proteidae) in je tako najbližji živeči sorodnik močerila (*Proteus anguinus* L.). Naseljujejo površinske vode – reke, ribnike, večja jezera in spodje predele potokov, ki se čez poletje ne izsušijo v jugovzhodnih delih Združenih držav. So neoteni saj ohranijo nekatere larvalne znake, kot so zunanje škrge, koža z mnogimi larvalnimi značilnostmi in visceralni skelet vse življenje. Imajo robustno telo, odrasli merijo od 20 do 33 cm v dolžino, zrastejo pa lahko tudi do 45 cm in so tako največji predstavniki rodu *Necturus*. Koža je rjavo do sivo pigmentirana, imajo majhne oči in tri pare škrge ter po štiri prste na sprednjih in zadnjih okončinah.



Slika 2: Blatni kužek ali nektur (*Necturus maculosus*)

(Vir: www.digimorph.org/.../mudpuppy.phtml)

Blatni kužki so aktivni celo leto in ne hibernirajo. So predvsem nočne živali, ki se podnevi skrivajo na rečnem dnu. Hranijo se z različnimi nevretenčarji in vretenčarji in so ob zimskih mesecih izpostavljeni sezonskim nihanjem hrane. Ker pa imajo že v osnovi počasno presnovo, so pomanjkanju hrane dobro prilagojeni.

Parijo se jeseni, spomladi samice odložijo jajčeca. Po petih letih spolno dozori. Njihova življenjska doba je okoli 20 let.

1.6.2 Močeril (*Proteus anguinus*)

Človeška ribica (*Proteus anguinus*), imenovana tudi močeril ali protej je svetovno znan endemit dinarskega krasa, edini jamski vretenčar v Evropi in hkrati najpomembnejša živa znamenitost podzemeljskih voda dinarskega krasa (Bulog s sod., 2000). Razširjen je v podzemlju dinarskega krasa od reke Soče v Italiji na severozahodu, do reke Trebišnjice v Hercegovini na jugovzhodu. Poznanih je približno 250 nahajališč, največ jih je v Sloveniji. Predstavlja slovenski naravni simbol in svetovno znamenitost med redkimi živalskimi vrstami. Močeril je neotenična žival, kot odrasel in spolno zrel ohrani nekatere juvenilne znake ličinke zaradi upočasnjene telesnega razvoja. Ohrani zunanje škrge, škržne reže in kožo z mnogimi značilnostmi ličinke. Nepigmentirani močeril je tudi troglomorfen, je prilagojen na življenje v jamah, kar se kaže v koži brez pigmenta, zakrnelimi očmi z ostanki očesne leče in s propadajočimi čutilnimi celicami v mrežnici, nesorazmerni rasti glave v dolžino s podaljšanim in prisekanim gobčkom. Je tudi biološko prilagojen na podzemlje, ima majhno potrebo po hrani, upočasnjeno presnovo, počasen osebni razvoj, majhno število potomcev, elektroreptorne ampularne organe in notranje uho ima bolj specifično razvite kot površinske dvoživke. Močeril lahko preživi dolgo obdobje brez hrane, med 18 in 96 mesecev, brez bolezenskih znakov. Močeril spolno dozori šele pri 16. letih starosti in vsekakor lahko živi vsaj 70 let, saj so toliko časa imeli nekatere osebkve v ujetništvu.



Slika 3: Nepigmentirani proteus ali močeril (*Proteus anguinus*) Foto: A. Hodalič

Njegova rasa črni močeril (*Proteus anguinus parkelj*) živi le v Beli krajini, kjer je bil odkrit šele leta 1986, približno 300 let za belim. Tako kot beli, tudi črni močeril živi le v jamskih vodah Belokranjskega plitvega krasa omejen na manj kot 100 m². Vendar ima črni močeril za razliko od belega predvsem zelo temno pigmentirano kožo in dokaj normalno razvite oči. Njegovo oko ima tri do petkrat večji premer, razmeroma dobro razvito lečo in čutilne celice v mrežnici. Glavo ima bolj zaobljeno, sorazmerno daljši trup, a krajše noge. V hrbtenici trupa ima tudi več vretenc. Biokemijske analize (analiza alocimov) so pokazale, da so dolenski beli močerili tesneje sorodni s črnim, kot so med seboj beli močerili z Dolenjske in Notranjske. Črni močeril je tako le populacija iz dolenske skupine, ki je zaostala v prilagajanju na jamsko okolje. Kaže, da črni močeril živi izključno v bližnji okolici Črnomlja, v neposrednem sosedstvu z belim močerilom.



Slika 4: Črni močeril (*Proteus anguinus parkelj*) Foto: R. Verlinde

1.6.3 Sekulja (*Rana temporaria*)

Sekulja (*Rana temporaria*) spada med rjave žabe in jo uvrščamo v družino pravih žab. Pri nas živi podvrsta *Rana temporaria temporaria* in je najbolj razširjena vrsta med vsemi dvoživkami, ki jih lahko najdemo na območju Slovenije.

Na glavi ima, kot tudi vse ostale rjave žabe temno rjavo zaočesno masko. Gobček je top in kratek. Obarvanost telesa je lahko zelo različna. Po hrbtne strani telesa je lahko rumenkaste, sive, olivnozeleno, rdečerjave barve. Je posuta s temnejšimi, večinoma temno rjavimi lisami. Na zadnjih okončinah ima prečne proge, ki so enako obarvane kot po hrbtu.

Trebušna stran je ponavadi siva ali rahlo bež barve. Grlo oziroma vrat je pri samicah rdeče barve z bledo zelenimi pikami. Pri samcih in mladostnih osebkih pa je v barvi trebuha ali bledo zelenosivo oziroma bledo modrosiva. Petni sklep redko kdaj doseže konico gobca. Samci so manjši in lažji kot samice. Samice so velike okrog 90 mm, samci pa 70 mm. Oglašajo se samo samci. Osebki spolno dozori pri treh letih, lahko tudi prej. Življenjska doba je lahko tudi 10 let, vendar zaradi plenilcev običajno ne dosežejo take starosti.

Sekulja se začne pariti že zgodaj, ko se povprečna dnevna temperatura dvigne nad 5°C se odpravijo na mrestišča. Za mrestišča si izberejo mlake, ribnike, jezera, močvirja, barja, večje luže, mrtvice, potoke, izvire. Samci s svojim petjem privabljajo partnerko. Preobrazba iz paglavca v žabo se odvija med junijem in koncem septembra, najpogosteje v juliju in avgustu.

Sekulja se zadržuje predvsem na travnikih, gozdovih, pašnikih. Mladi osebki so aktivni večinoma podnevi. Odrasli pa le ponoči, razen med deževjem, takrat tudi podnevi. Čez dan se zadržujejo pod listjem, drevesnimi koreninami, pod kamni ali med gosto travo.

Prehranjujejo se predvsem s polži, hrošči, pajki, majhnimi rakci, stonogami in črvi. Paglavci jedo tudi odmrle rastlinske in živalske delce, včasih tudi alge.



Slika 5: Sekulja (*Rana temporaria*)

(Vir: bioge.ubbcluj.ro/vivariu/rana.htm)

1.7 NAMEN DELA

Namen dela je bil ugotoviti, če so rastne linije prisotne v kostnem materialu močerila (*Proteus anguinus*) in s tem preveriti ali je pri močerilu skeletokronologija uporabna za oceno starosti posameznega osebka. Poleg tega smo želeli ugotoviti, če so členki prstov pri močerilu osificirani in uporabni za skeletokronologijo, saj je tak način vzorčenja neinvaziven za osebke. Rezultate analize raziskave pri močerilu smo želeli primerjati z nekturom (*Necturus maculosus*), ki je prav tako neotena dvoživka, vendar je za razliko od močerila izpostavljen v svojem okolju sezonskim klimatskim nihanjem. Nameravali smo standardizirati protokol dekalcinacije ter izdelati ustrezne protokole za pripravo preparatov iz skeletnih delov dvoživk za oceno starosti živali. Uspešna dekalcinacija je predpogoj za dober rezultat. Želeli smo tudi ugotoviti prednosti in morebitne slabosti sodobnih mikrovalovnih tehnik pri pripravi preparatov za skeletokronologijo. Poleg klasične, a časovno daljše metode, priprave vzorcev za histologijo smo pripravljali tkiva tudi kot zamrznjene vzorce in jih rezali s kriptomom. Preveriti smo želeli, če je tehnika zamrznjenih rezin primerna za skeletokronološko analizo, saj je priprava vzorcev hitrejša in preprostejša. V raziskave smo vključili tudi sekuljo (*Rana temporaria*) kot primer osebkov, kjer smo rastne linije vsled sezonskih sprememb zagotovo pričakovali ter tudi zato, da smo imeli dovolj materiala za optimizacijo postopka.

2 METODE

2.1 EKSPERIMENTALNE ŽIVALI

Skeletokronološko analizo smo naredili na skeletnih delih nog dveh vrst močerilarjev (*Proteidae*), ki spadata med brezrepce (*Urodela*). To sta naša neotenična jamska dvoživka močeril (*Proteus anguinus*), in sicer beli predstavnik (*Proteus anguinus*) in njegova črna rasa, črni močeril (*Proteus anguinus parkelj*) ter ameriški sorodnik močerila, blatni kužek (*Necturus maculosus*). Ameriška sorodna vrsta je bila vključena v analizo zaradi primerjave s površinsko vrsto, kjer pogoji niso tako stabilni, saj je močeril jamska žival in živi v stabilnem okolju, kjer ni značilnih letnih sprememb temperature in je celo leto aktiven, ne hibernira tako kot ostale dvoživke pri nas. V raziskavo pa smo vključili še predstavnika brezrepcev (*Anura*), in sicer sekuljo (*Rana temporaria*) predstavnico rjavih žab.

Za raziskavo smo uporabili skeletne dele zadnjih ekstremitet in sicer prstne členke, femurje ter pri nekturih še tibiofibule. Vzorci skeletnih delov močerilov in blatnih kužkov so bili načrtovano odvzeti iz predhodnih raziskav skupine za Funkcionalno morfologijo, Oddelka za biologijo. Večina vzorcev je bila shranjena v formalinu, del pa v 70% alkoholu.

Osebkki močerila so bili izlovljeni na različnih lokacijah, pet osebkov v Planinski jami, dva na Otovškem bregu in en na Grčarskih ravnah. Analiza je bila narejena tudi na dveh osebkkih črnega močerila z Jelševnika. Blatni kužki so bili uvoženi iz ZDA preko podjetja Carolina Biological Supply (Burlington, Severna Karolina, ZDA). Skeletni material brezrepcev smo dobili od Katje Pobiljšaj z Inštituta za kartografijo favne in flore in sodi v zbirko Naravoslovnega muzeja v Ljubljani. Vzorčeni so bili prstni členki sekulje iz Vranje jame pri Cerkniškem jezeru. Material je bil nabran aprila leta 1996.

Za skeletokronološko analizo nismo žrtvovali nobene živali.

2.2 PRIPRAVA TKIV

Uporabili smo več različnih tehnik priprave vzorcev, saj smo iskali najbolj primerno metodo pri kateri bi se najlepše videle linije zavrtega nalaganja kostnega materiala (LAG – lines of arrested growth). V člankih, kjer so določali starost dvoživk s skeletokronologijo smo zasledili uporabo zamrznjenih rezin, kot tudi klasično metodo priprave histoloških preparatov. Tudi v naši raziskavi smo izpeljali in primerjali obe metodi.

Vzorci skeletnih delov so bili že fiksirani. Večina vzorcev skeletnih delov močerila je bila shranjena v 10 % nevtralnem pufranem formalinu. Vzorci od blatnega kužka in sekulje pa so bili shranjeni v 70 % alkoholu. V skeletokronoloških raziskavah literatura navaja, da so za shranjevanje vzorcev večinoma uporabljali 70 % etanolu.

2.2.1 Dekalcinacija

Dekalcinacija je postopek, ki ga izvajamo po fiksaciji in pred dehidracijo oziroma vklapljanjem tkiva. Uporabljamo jo za obdelavo kostnih ter drugih kalciniranih tkiv.

Kostno tkivo je čvrsto, trdno in deloma elastično. Te lastnosti mu daje amorfna snov, ki se nahaja v medceličnini skupaj s kolagenimi vlakni. Amorfnost je sestavljena iz organskega in anorganskega dela. Anorganski del predstavljajo kompleksi mineralov iz skupine apatita, apnenca itd.

Prvi pogoj za uspešno dekalcinacijo je dobra fiksacija. Najboljša je formalinska fiksacija, ki med dekalcinacijo delno prepreči razgradnjo kolagena v kislinskih dekalcinacijskih raztopinah, ki povzročajo hidrolizo protein – polisaharidnih kompleksov. Debelina kostnega tkiva ne sme biti večja kot nekaj milimetrov, ker je sicer notranjost koščka dekalcinirana šele potem, ko je površina koščka že poškodovana. Kostno tkivo moramo dobro fiksirati tudi zato, ker fiksativ prodira počasi v medcelični prostor zaradi prisotnosti anorganskih soli. Vse dekalcinacijske tekočine poškodujejo deloma tkivo, zato ta vpliv omilimo z dobro fiksacijo. Po fiksaciji kostno tkivo dobro speremo in razmastimo ter

dekalciniramo. Za dekalcinacijo uporabljamo sredstva, ki jih sestavljajo razne kisline kot so mravljična, dušikova, trikloroocetna, itd. Poleg raztopin, ki vežejo kalcij v vodotopne soli, uporabljamo še sredstva, ki tvorijo s kalcijem vodotopne kelate. Tako sredstvo je etilendiamintetraocetna kislina – EDTA dinatrijeva sol ali tetranatrijeva sol. EDTA je močno kelatno sredstvo za ione zemljoalkalijskih kovin (Ca, Mg, Sr, Ba) in težkih kovin. Postopek je dolgotrajen, zato ga uporabljamo v strogo raziskovalnih nalogah. Ima pa prednost, da zelo malo poškoduje ostalo tkivo.

2.2.1.1 Dekalcinacija z etilendiamintetraocetno kislino – EDTA

EDTA s kalcijem tvori vodotopne kelate. Pri tem poškoduje zelo malo ostalega tkiva.

Vzorci smo dekalcinirali v 0.1 M EDTA v 0,1 M Na – fosfatnem pufru (pH 7.4), ki smo jo pripravili po sledečem postopku:

- ❖ Pripravimo temeljno raztopino I:
 - 1 M Na_2HPO_4
 - 1.75 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ v 100 ml vodeRazredčimo do 0.1 M koncentracije
- ❖ Pripravimo temeljno raztopino II:
 - 0.1 M NaH_2PO_4
 - 1.7 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ v 100 ml vode
- ❖ Zmešamo 16 ml 0.1 M raztopine I in 84 ml 0.1 M raztopine II → dobimo 0.1 M pufer
- ❖ Uravnamo pH na 7.4 z 1 N NaOH ali 1 N HCl
- ❖ 3.72 g EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $M_r = 372$ g/mol) raztopimo v 100 ml 0.1 M pufra

Dekalcinacija z EDTA je potekala v mikrovalovni pečici (PelcoBiowave), ki je skrajšala postopek dekalcinacije. Raztopina ni prekrivala vzorca za več kot 1 cm. Dekalcinirali smo 3 in 5 ur, pri temperaturi 50°C in moči 750 W. Raztopino smo vsako uro zamenjali s svežo.

Tri ure smo dekalcinirali femur in prst močerila P165, ostale vzorce močerilov P163, P15 smo dekalcinirali 5 ur. Pet urna dekalcinacija je bila narejena tudi na vzorcih femurjev, tibiofibul in prstov nekturov N25, N27 ter na prstih sekulj Ž3, Ž4, Ž6 (tabela 1, 2, 3).

Po dekalcinaciji smo tkiva spirali pod tekočo vodo čez noč oziroma 2 uri v primeru zamrznjenih rezin.

2.2.1.2 Dekalcinacija s 5 % dušikovo kislino

Ker so v člankih za dekalcinacijo uporabljali dušikovo kislino in tudi zaradi nezadostne dekalcinacije z EDTA smo vzorce dekalcinirali s 5 % dušikovo kislino. Dekalcinacija je potekala v digestoriju. Čas dekalcinacije je bil odvisen od velikosti tkiv – poskusili smo od 1 do 7 ur. Prstke smo tako dekalcinirali eno do tri ure, večja tkiva kot so npr. femur pri blatnih kužkih pa tudi do sedem ur (tabela 1, 2, 3). Uspešnost dekalcinacije smo preverjali bodisi z natrijevim oksalatom ali pa kar s preparirno iglo. Če je igla prebodla tkivo je bilo le-to dovolj dekalcinirano. Po dekalcinaciji smo tkiva spirali čez noč.

Testiranje uspešnosti dekalcinacije – preverjanje prisotnosti kalcija v raztopini:

5 ml raztopine v kateri je tkivo dodamo 1 ml 5 % natrijevega ali amonijevega oksalata. Pustimo stati 5 min. Če nastanejo precipitanti, dekalcinacija ni potekla do konca; bistra raztopina je znak uspešne dekalcinacije.

2.2.2 **Dehidracija, bistrenje in vklapljanje**

Po dekalcinaciji in spiranju smo vzorce dehidrirali in bistrili na tri različne načine:

- Dehidracija in bistrenje dve uri v JFC v mikrovalovni pečici pri 40 °C in moči 750 W (P165). JFC je patentiran produkt (Milestone medical) in je mešanica etanola, izopropanola in dolgoverižnega ogljikovodika. Narejen je bil tako, da v enem koraku simultano ekstrahira vodo in lipide iz tkiva. Po končani dehidraciji smo

tkiva prestavili v paraplast za 2 uri. Paraplast smo nato zamenjali in pustili čez noč. Na ta način smo pripravili le vzorec močerila P165.

- Dehidracija in bistrenje v 70 in 100 % alkohol ter JFC. Dehidracija v alkoholih je potekala v mikrovalovni pečici pri 30 °C in moči 750 W, v vsakem po 5 minut. Nato smo tkiva prestavili za 3 ure v JFC (vsako uro smo sredstvo zamenjali s svežim) pri 40 °C in moči 750 W. Po končani dehidraciji smo tkiva prestavili v paraplast za 3 uri. Paraplast smo nato zamenjali in pustili čez noč. Na ta način smo pripravili vzorce dveh osebkov močerila (P163, P165), dveh osebkov nektura (N25, N27) ter treh osebkov sekulj (Ž3, Ž4, Ž6).

- Dehidracija po naraščajoči alkoholni vrsti: 70 % etanol, dvakrat po 10 minut; 96 % etanol, dvakrat po 10 min; 100 % etanol, trikrat po 10 min. Dehidracija je potekala v mikrovalovni pečici pri 40°C in moči 450 W. Sledilo je bistrenje s ksilenom, dvakrat po eno uro. Ker je ksilen zelo hlapljiv, smo ta postopek izvajali v digestoriju. Na ta način smo pripravili največ preparatov, in sicer enajst osebkov močerila (P150, P151, P163, P168, P173, P175, P176, P179, P183, Č12, Č13), šest osebkov nektura (N1, N27, N34, N37, N38, N39) ter osem osebkov sekulje (Ž13, Ž14, Ž15, Ž16, Ž17, Ž18, Ž19, Ž20). Po dehidraciji smo tkiva infiltrirali čez noč v paraplastu. Naslednji dan smo paraplast zamenjali in pustili še en dan. Postopek infiltracije smo podaljšali zaradi boljšega rezanja. V vsakem primeru sta potrebni najmanj dve parafinski kopeli, ker prva kopel ponavadi vsebuje bistrilno sredstvo. Ko smo tako pripravljena tkiva nakoličili, smo začeli z rezanjem na mikrotomu.

Za rezanje smo uporabljali standardni drsni mikrotom znamke Reichert Jung , rezali smo rezine debeline 7 µm. Rezine smo raztegovali na grelni plošči, ogreti na 50°C. Rezali smo bodisi celo kost ali pa samo v diafiznem delu kosti.

2.2.3 Priprava zamrznjenih rezin

Vzorci dekalcinirane z EDTA in s 5% dušikovo kislino smo spirali pod tekočo vodo 2 uri, jih prekrili z zamrzovalnim medijem (Jung – Tissue freezing medium for Frozen Tissue specimen) in zamrznili s tekočim dušikom. Vzorci smo shranili na -20°C . Po tem postopku smo pripravili vzorce močerilov (P163, P165), nekturov (N25, N27, N36) ter vzorce sekulj (Ž21, Ž22).

Zamrznjene rezine smo rezali s kriotomom znamke Leica CM 1850 pri -20°C , debeline 10 in 20 μm . Rezine smo polagali na objektna stekelca premazana s kromgalun želatino.

Priprava objektov za zamrznjene rezine

Objektive dobro očistimo s čistilom. Uporabili smo kemax čistilno sredstvo (dve kapljici kanemo v banjico z vodo). Nato objektive spiramo pod tekočo vodo čez noč. Speremo še z destilirano vodo in potopimo v kromgalun želatino. Tako pripravljene objektive odcedimo in posušimo v atmosferi brez prahu.

Priprava kromgalun želatina (adheziv)

0.2 g želatine raztopimo v 160 ml destilirane vode. Segrevamo.

0.02 g $\text{CrK}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ raztopimo v 40 ml destilirane vode.

Obe raztopini zmešamo.

2.2.4 Barvanje

Za barvanje smo uporabili bazično barvilo, in sicer Weigert – ov železov hematoksilin (Kiernan, 1990).

Weigert – ov železni hematoksilin je iz dveh komponent:

Komponenta A: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.5 g

HCl	2 ml
H ₂ O	298 ml

Komponenta B: hematoksilin	1 g
96 % alkohol	100 ml

A in B komponento zmešamo v razmerju 1:1 in filtriramo.

➤ Barvanje klasičnih rezin

Parafinske rezine smo pred barvanjem namakali v ksilenu in s tem odstranili parafin. Ksilen pa smo odstranili s propanolom (PROPANOL 1 → PROPANOL 2), dve menjavi po 3 minute. Nato smo rezine hidrirali tako, da smo jih prenašali skozi padajočo alkoholno vrsto (96 % ETANOL 1 → 96 % ETANOL 2 → 70 % ETANOL), dve menjavi po 3 minute.

Sledilo je barvanje. Preparate z EDTA smo barvali 1 in 2 minuti. Preparate z dušikovo kislino pa 3 in 5 minut. Po koncu barvanja smo preparate spirali z destilirano vodo.

Sledila je dehidracija v naraščajoči alkoholni vrsti (70 % ETANOL 2 → 70 % ETANOL 1 → 96 % ETANOL 2 → 96 % ETANOL 1 → PROPANOL 2 → PROPANOL 1) in bistrenje s ksilenom (KSILEN 2 → KSILEN 1), dve menjavi po 3 minute.

Pripravili smo si kanadski balzam z dodatkom nekaj kapljic ksilena. S tem smo mu zmanjšali viskoznost do željene stopnje. Na preparat smo kanili eno do dve kapljici tako pripravljenega kanadskega balzama in ga počasi pod kotom pokrili s krovnim stekelcem. Pazili smo, da v balzamu ni bilo zračnih mehurčkov in da se je balzam razlezel po celem preparatu. Pri tem smo si pomagali s preparirno iglo. Tako pripravljene preparate smo postavili v sušilnik in jih pustili čez noč. Ti preparati so trajni.

➤ Barvanje zamrznjenih rezin

Zamrznjene rezine smo prelili s 50 % etanolom in nato z destilirano vodo. Barvali smo z Weigert – ovim hematoksilinom, 2 do 3 minute. Nato smo rezine sprali z destilirano vodo. Po barvanju je bil postopek enak kot pri parafinskih rezinah – dehidracija v seriji alkoholov ter bistrenje s ksilenom. Preparate smo pokrili s kanadskim balzomom in krovnikom ter jih posušili.

2.2.5 Mikroskopiranje

Histološke rezine smo pregledali s svetlobnim mikroskopom OPTON – Axioskop Zeiss in fotografirali s fotoaparatom znamke Canon EOS 300D, Digital. Fotografirali smo pod 100 in 400 kratno povečavo.

Fotografije smo uredili in opremili z grafičnimi programi, Adobe Photoshop 8.0 in ACDSee 8. Fotografije smo izostrili in kontrastirali, če je bilo potrebno.

3 REZULTATI

V nalogi smo dokumentirali vse vzorce ne glede na to, ali je bila dekalcinacija uspešna ali ne. Pri večini osebkov smo zrezali celotno kost ter pregledali več zaporednih rezin. Linije zavrte rasti smo šteli samo v diafznem delu kosti. Rezultate predstavljamo v treh sklopih, za vsako vrsto dvoživke posebej.

Vzorce skeletnih delov smo dekalcinirali bodisi z EDTA ali pa s 5 % dušikovo kislino in naredili klasične parafinske ali pa zamrznjene rezine, ki smo jih zamrznili s tekočim dušikom (tabela 1, 2, 3).

S pomočjo grafičnega programa Adobe photoshop smo nekatere posnetke pretvorili v črno – bel format zaradi boljše preglednosti linij zavrte rasti.

3.1 PREPARATI MOČERILA (*Proteus anguinus*)

Pregledali smo skeletne dele zadnjih ekstremitet 11 osebkov belega močerila (*Proteus anguinus*) in 2 osebkov črnega močerila (*Proteus anguinus parkelj*), velikosti od 16, 8 do 25, 7 cm (tabela 1). Skeletne dele smo dekalcinirali bodisi z EDTA ali pa s 5% dušikovo kislino in naredili klasične parafinske ali pa zamrznjene rezine (tabela 1). Pri dekalcinaciji z EDTA so bili femurji slabo dekalcinirani, saj so se slabo rezali, preparati pa so bili razpokani (sl. 6a, b; 7a). Vzorci so bili za štetje linij zavrte rasti neuporabni. Prekratko je bilo tudi barvanje, barvali smo le 1 minuto in pol, in se linije zavrte rasti niso obarvale. Na prstkih je bila dekalcinacija z EDTA za razliko femurjev uspešnejša (sl. 7b).

Zaradi slabih preparatov pri dekalcinaciji z EDTA in slabega rezanja smo ostale vzorce dekalcinirali z dušikovo kislino. Femurje smo dekalcinirali od 4 do 7 ur, prstke pa 2 uri. Težav pri rezanju nismo imeli, tudi letnice so se videle. Od vzorčenih osebkov so bili samo pri enem osebku preparati nekoliko slabši (sl. 14).

Število linij zavrte rasti je bilo pri močerilih zelo raznoliko (tabela 1). V diafiznem delu femurjev različnih osebkov smo našli od 1 do 20 linij zavrte rasti. Večina LAG – ov je izrazitih, razporejeni so v dokaj neenakomernih presledkih (sl. 8, 9, 14, 17). Pri osebkih z manjšim številom linij so razmaki med linijami večji. Pri osebkih z večjim številom linij zavrte rasti pa so linije zgoščene, tako, da je štetje linij oteženo (sl. 12a, 16). Pri nekaterih vzorcih se linij na periferiji ni dalo prešteti (sl. 13, 15).

Pri primerjavah prstkov in femurjev istega osebka smo opazili odstopanja v številu linij zavrte rasti, zato smo pri večini osebkov uporabili le femurje. Na prerezih prstov smo opazili manj linij zavrte rasti kot pa na preparatu femurja (sl. 8a, b). Pri nekaterih osebkih so bile vidne tako dvojne (sl. 8b, 10, 11a, 12a, 13), kot tudi vmesne linije (sl. 11, 16). Dvojne linije so zelo blizu s pravo zavrto linijo – dobimo dve liniji, ki sta zelo blizu skupaj in obe potekata koncentrično po celi kosti. Medtem, ko so vmesne linije zelo šibke in ne potekajo koncentrično okoli cele osi kosti. Dvojne in vmesne linije so bodisi vidne na istem prerezu, kot pri osebku P175 (sl. 16). Lahko pa jih zasledimo ločeno na zaporednih rezih, kot pri osebku P150 (sl. 11a, b).

V večini primerov smo razrezali skoraj celoten femur. Epifizni deli so imeli več hrustančnega tkiva (sl. 12c), kot pa diafizi del, kjer je tudi vidnih več linij zavrte rasti (sl. 12a, b). V osrednjem delu diafize je medularna votlina najmanjša, kostno tkivo pa najdebelejše (sl. 12a). Pomembno je, da za analizo ocene starosti uporabljamo prereze v diafiznem delu, saj se nalaganje prav v tem delu najprej dogodi in je v tem delu prisotnih največ linij zavrte rasti.

Pri osebku z znano starostjo (13 let) je femur v primerjavi z ostalimi močerili skoraj v celoti še hrustančen (sl. 18a, b). Kostnega tkiva je malo, nakazana je ena linija zavrte rasti (sl. 18b). Ta osebek je bil tudi najmanjši (tabela 1).

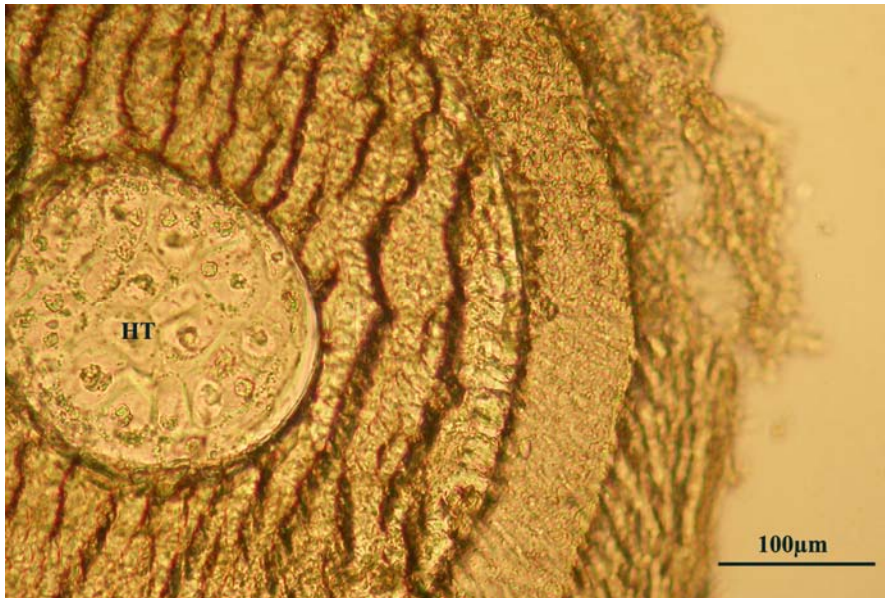
Tabela 1: Podatki o osebkih nepigmentiranega močerila (*Proteus anguinus*) in črnega močerila (*Proteus anguinus parkelj*), ki smo jih uporabili pri raziskavi in število linij zavrte rasti (LAG).

Oznaka močerila	Spol	Št. LAG - ov	Dolžina osebka (cm)	Lokacija	Dekalcinac.	Parafinske (P) ali zamrznjene (R) rezine	Razrezan del – femur (F)/prstek(P)
P150	♀	13	28	Otovški breg	HNO ₃	P	F
P151	♀	10, 12	24	Otovški breg	HNO ₃	P	F
P163	♀	15, 16	24,6	Planinska jama	HNO ₃	P	F
P163	♀	- \$	24,6	Planinska jama	EDTA	Z	F, P
P165	♀	- \$	27	Planinska jama	EDTA	Z	F
P168	♀	13	25,7	Planinska jama	HNO ₃	P	F
P173	?	9, 10	21	Planinska jama	HNO ₃	P	F
P175	♂	20	25,5	Planinska jama	HNO ₃	P	F
P176	♀	10	24,3	Planinska jama	HNO ₃	P	F
P179	♀	9	24	Grčarske ravne	HNO ₃	P	F
P183*	?	0, 1	16,8	V ujetništvu (Tular)	HNO ₃	P	F
Č12	♂	8, 9	24,7	Jelševnik	HNO ₃	P	F, P
Č13	♂	8	25,3	Jelševnik	HNO ₃	P	F

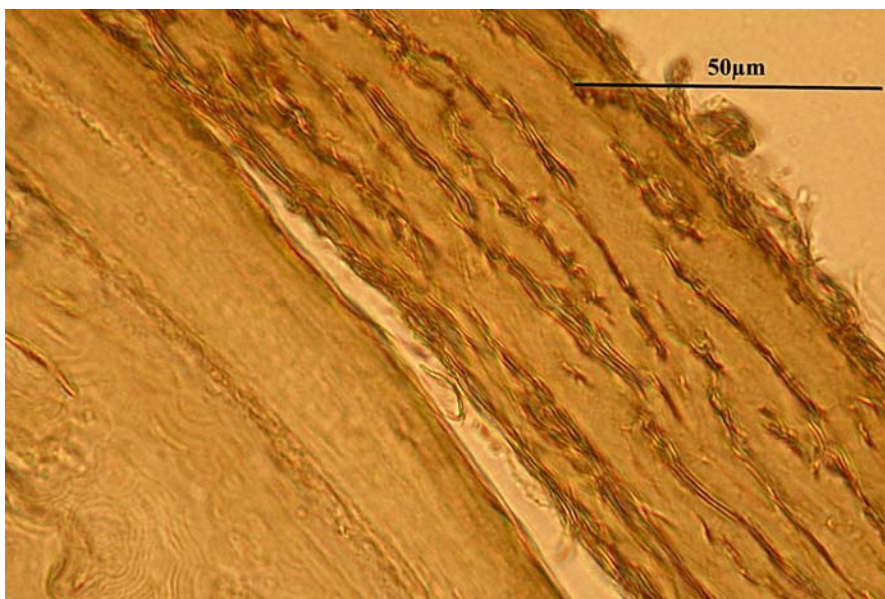
* - poznana starost, 13 let.

\$ - zaradi slabe dekalcinacije se LAG - i ne vidijo oz. je vidnih le nekaj

3.1.1 Vzorci dekalcinacije z EDTA



6a



6b

Slika 6a, b: Prečni prerez zadnje ekstremitete močerila (*Proteus anguinus*) P163 v predelu femurja. Zamrznjene rezine, dekalcinacija z EDTA – 5h , barvano z Weigert- ovim hematoksilinom – 2min. Na sliki **b.** je periferni del pod večjo povečavo. HT, hrustančno tkivo. Na preparatu so vidne razpoke. Linije zavrte rasti zaradi razpok v tkivu in prekratkega barvanja niso vidne. Tkivo je bilo pretrdo in se je slabo rezalo.



7a

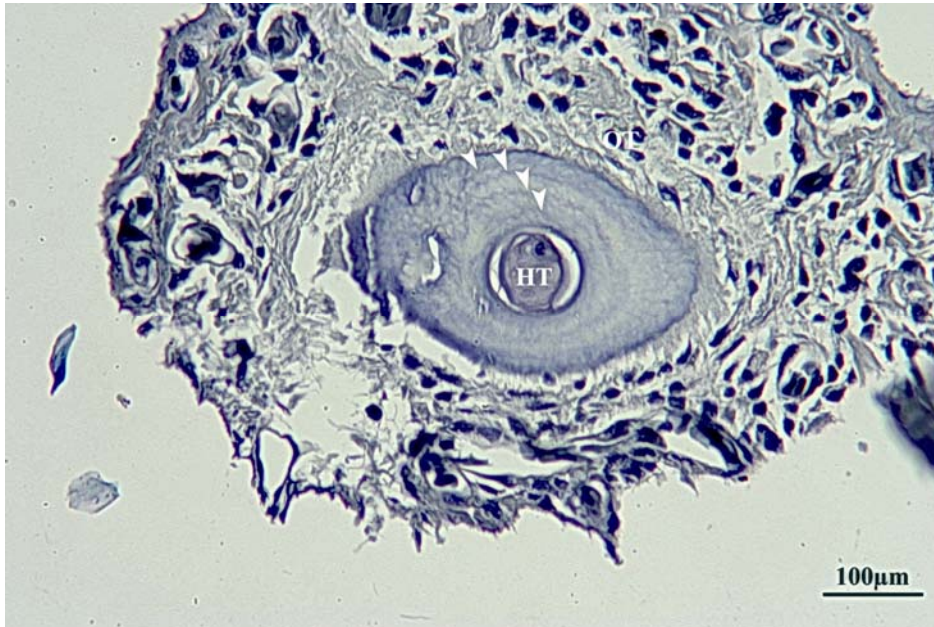


7b

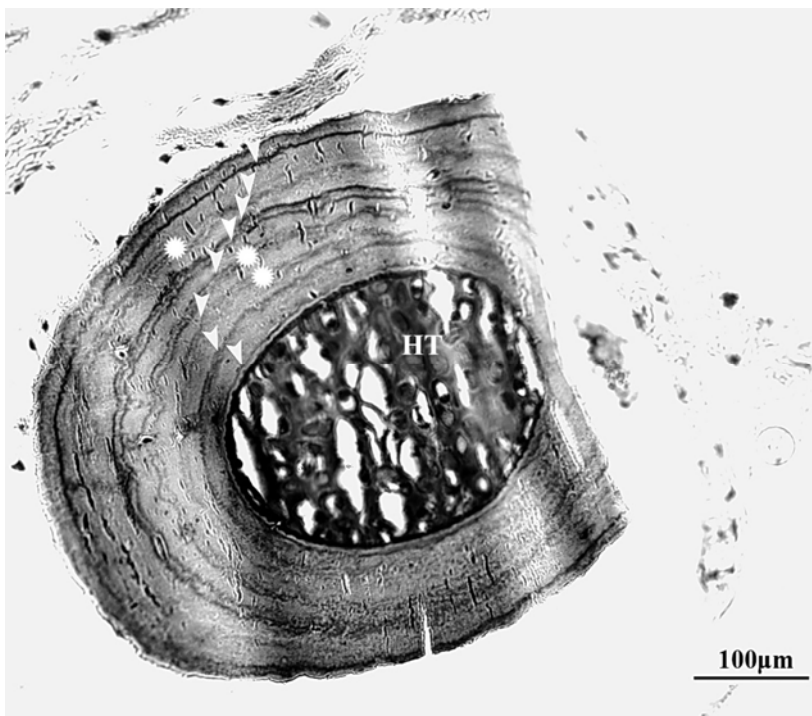
Slika 7a, b, c: Prečni prerezi zadnje ekstremitete močerila (*Proteus anguinus*) P165. Zamrznjene rezine, dekalcinacija z EDTA– 5h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.

a. Prerez femurja. Vidne so razpoke v tkivu in le dve liniji zavrte rasti – LAG (bele puščice). **b.** Prerez prstka močerila. Dekalcinacija je bila uspešnejša kot pri a. Linije zavrte rasti so obarvane temneje (bele puščice). Na sredi je vidno hrustančno tkivo (HT), okoli kosti pa se držijo še mišice in koža –okolna tkiva (OT).

3.1.2 Vzorci dekalcinacije s 5% dušikovo kislino



8a

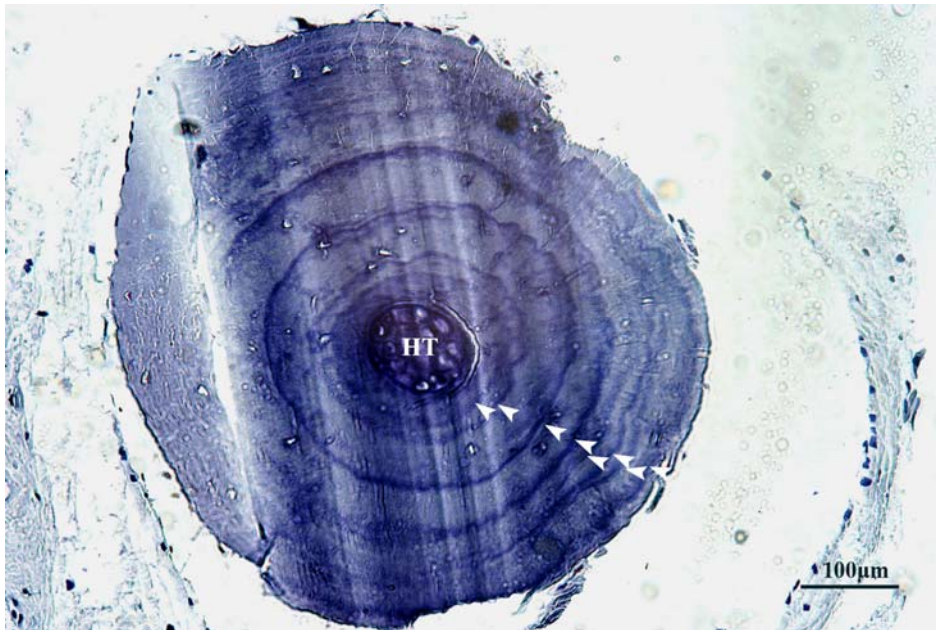


8b

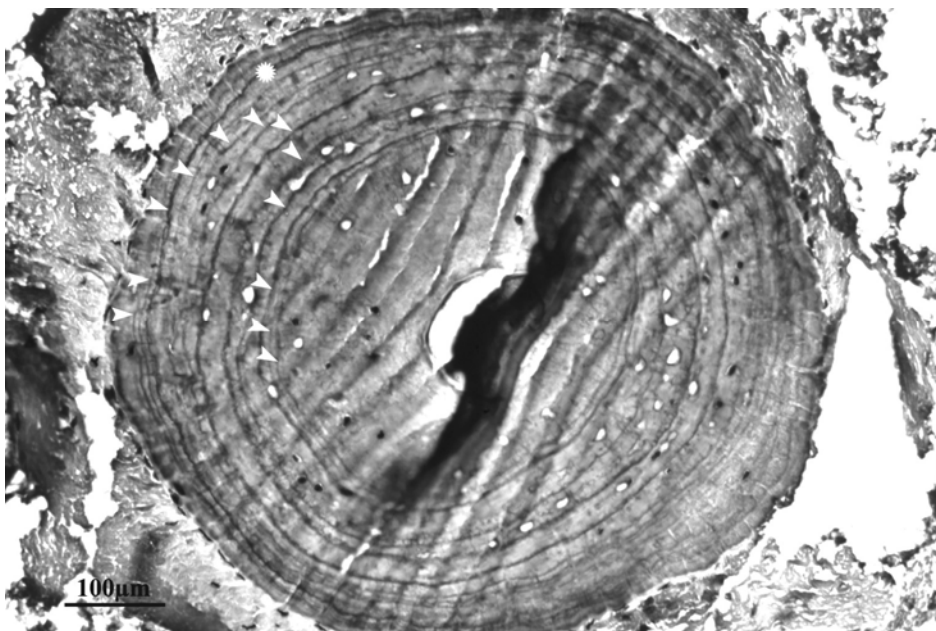
Slika 8a, b: Prečna prereza zadnje ekstremitete črnega močerila (*Proteus anguinus parkelj*) Č12. Parafinske rezine, dekalcinacija s 5 % HNO₃, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom.

Primerjava prsta in femurja. **a.** Prerez prstka, dekalcinacija – 2h. **b.** Prerez femurja, dekalcinacija – 4h.

Vidnih je osem LAG – ov. Na prstu je manj letnic (bele puščice) kot pa na femurju. Vidne so dvojne linije (beli krogi) na 3., 4. in 7. liniji zavrte rasti (bele puščice). HT, hrustančno tkivo; OT, okolna tkiva.



Slika 9: Prečni prerez zadnje ekstremitete črnega močerila (*Proteus anguinus parkelj*) Č13 v predelu femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 6h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom. Našteli smo osem linij zavrte rasti – LAG – ov (bele puščice). HT, hrustančno tkivo.



Slika 10: Prečni prerez zadnje ekstremitete močerila (*Proteus anguinus*) P151 v predelu femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 5h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom. Vidnih je 12 linij zavrte rasti (bele puščice) ter dvojna linija (bel krogec) na 9. rastni liniji.

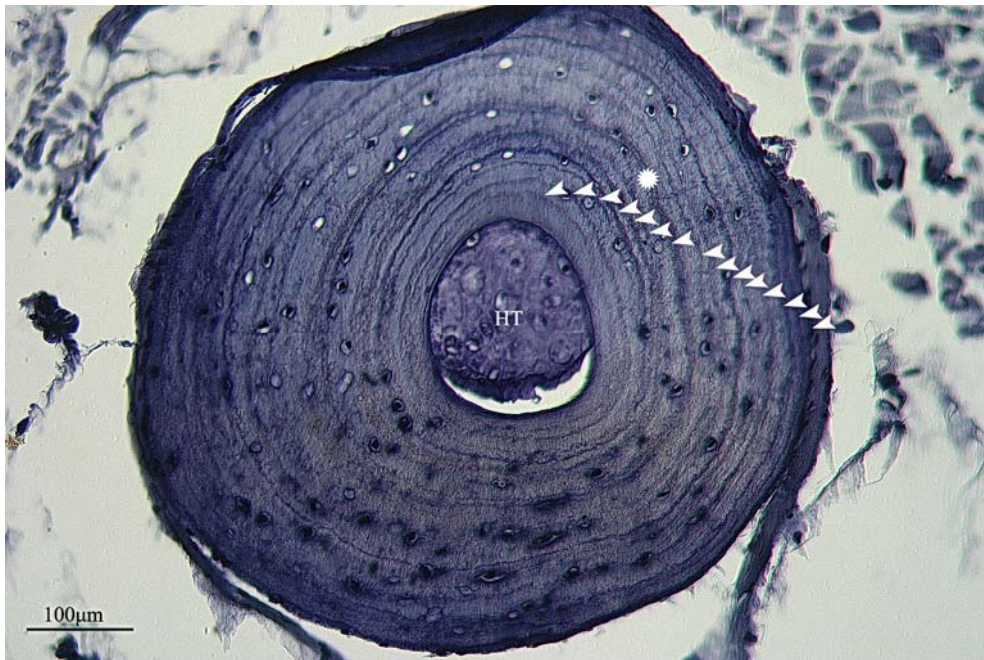


11a



11b

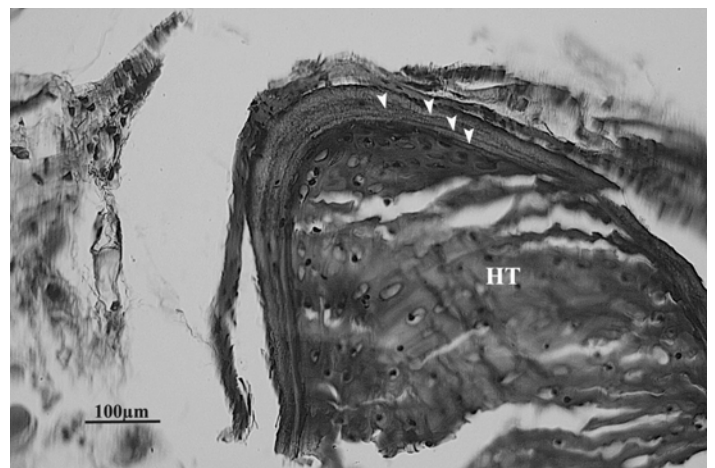
Slika 11a, b: Prečna prereza zadnje ekstremitete močerila (*Proteus anguinus*) P150 v predelu femurja. Parafinske rezine, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 5h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom. Primerjava različnih odsekov diafize. **a.** Vidnih je 13 linij zavrte rasti (bele puščice) ter dve dvojni liniji (beli krogi) na 6. in 7. rastni liniji. HT, hrustančno tkivo. **b.** Vidnih je 13 linij zavrte rasti (bele puščice ▼) in tri vmesne linije (male bele puščice ↓) nastale med letom.



12a



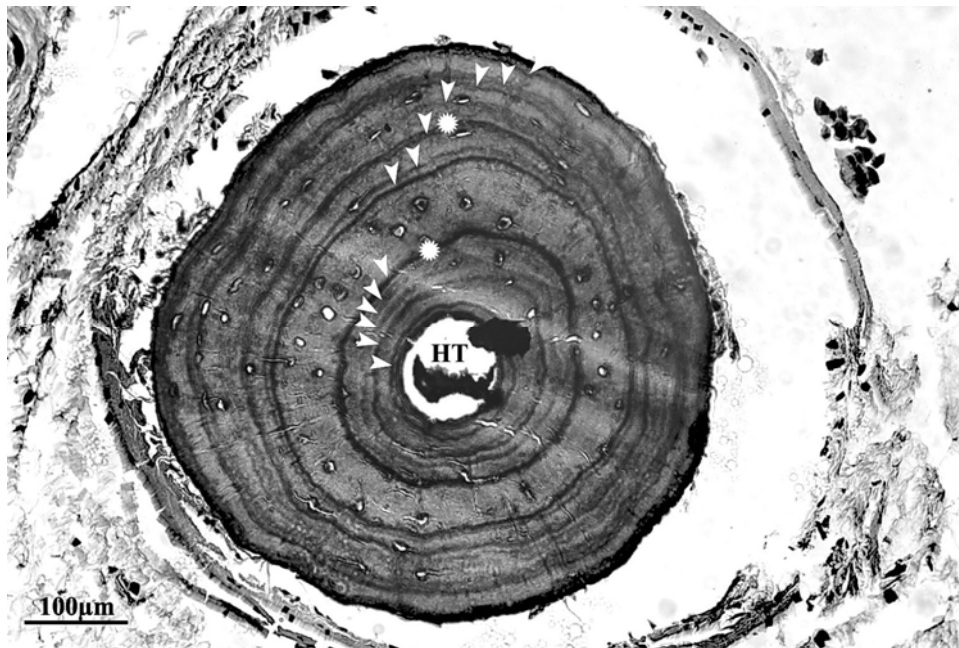
12b



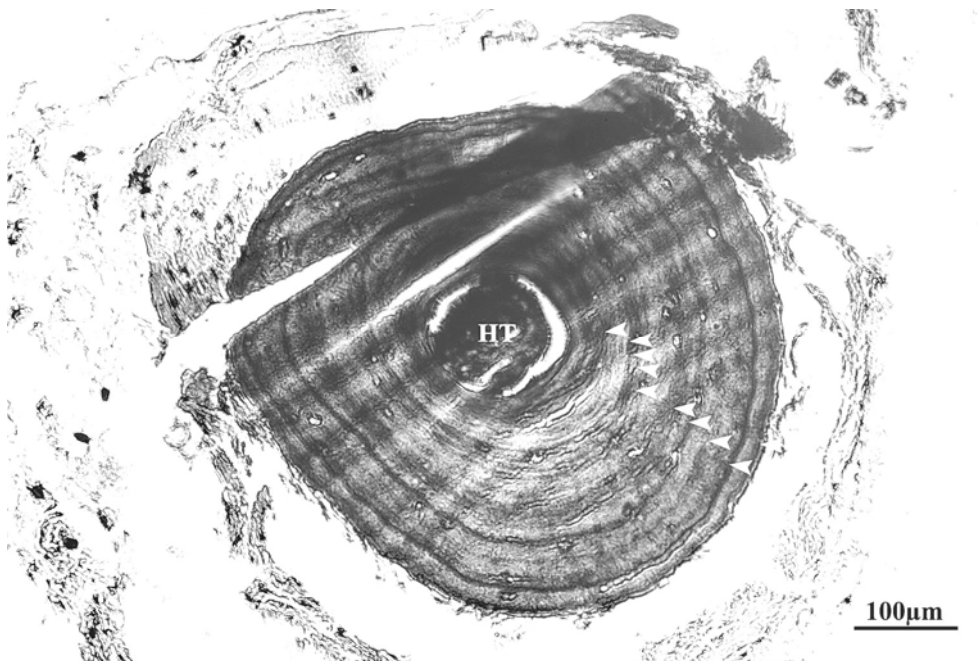
12c

Slika 12a, b, c: Prečni prerezi zadnje ekstremitete močerila (*Proteus anguinus*) P163 v predelu femurja. Parafinske rezine, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 4h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom.

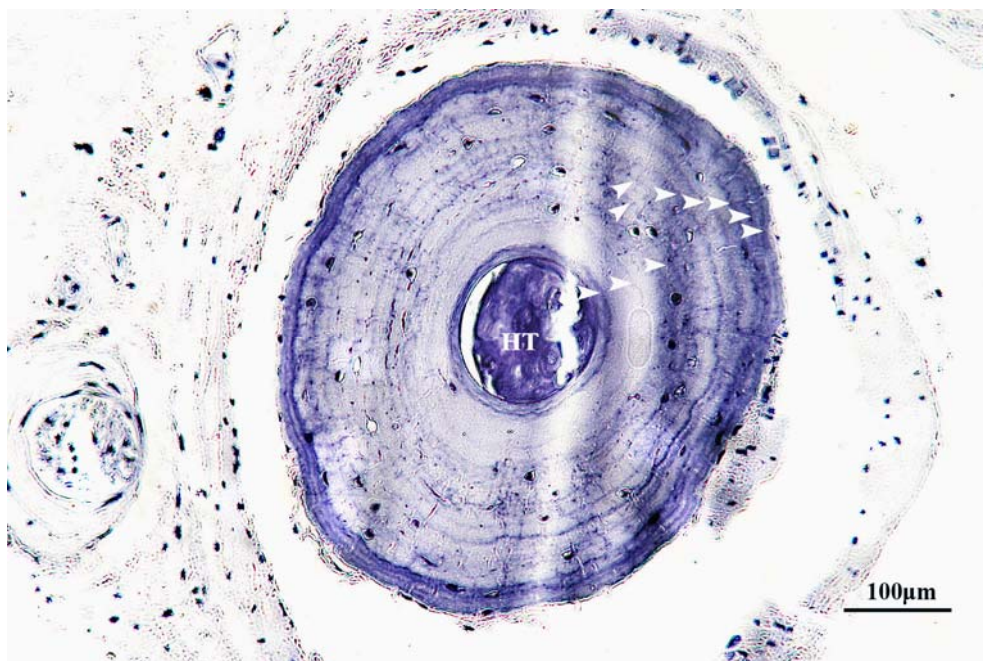
a. Osrednji del diafize. Našteli smo 15 linij zavrte rasti (bele puščice). Viden je dvojni LAG (beli krogec) na 7. rastni liniji. **b.** Vrhnji del diafize. Število linij zavrte rasti se ujema z osrednjim delom več pa je hrustančnega tkiva (HT). **c.** Začetni del epifize. V centru je veliko hrustančnega tkiva (HT), vidne so le 4 linije zavrte rasti.



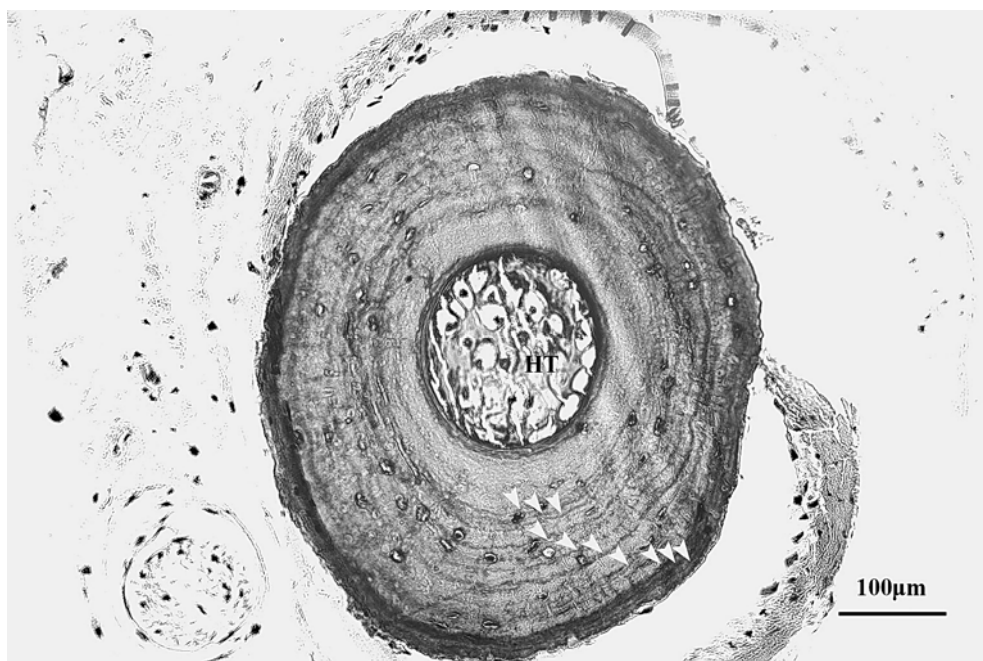
Slika 13: Prečni prerez zadnje ekstremitete močerila (*Proteus anguinus*) P168 v predelu diafize femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 7h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom. Našteli smo 13 LAG – ov (bele puščice). Dve dvojni liniji (beli krogi) – na 6. in 9. liniji zavrti rasti (bele puščice). HT, hrustančno tkivo.



Slika 14: Prečni prerez zadnje ekstremitete močerila (*Proteus anguinus*) P176 v predelu diafize femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 7h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom. Vidnih je 9 linij zavrti rasti – LAG (bele puščice). HT, hrustančno tkivo.

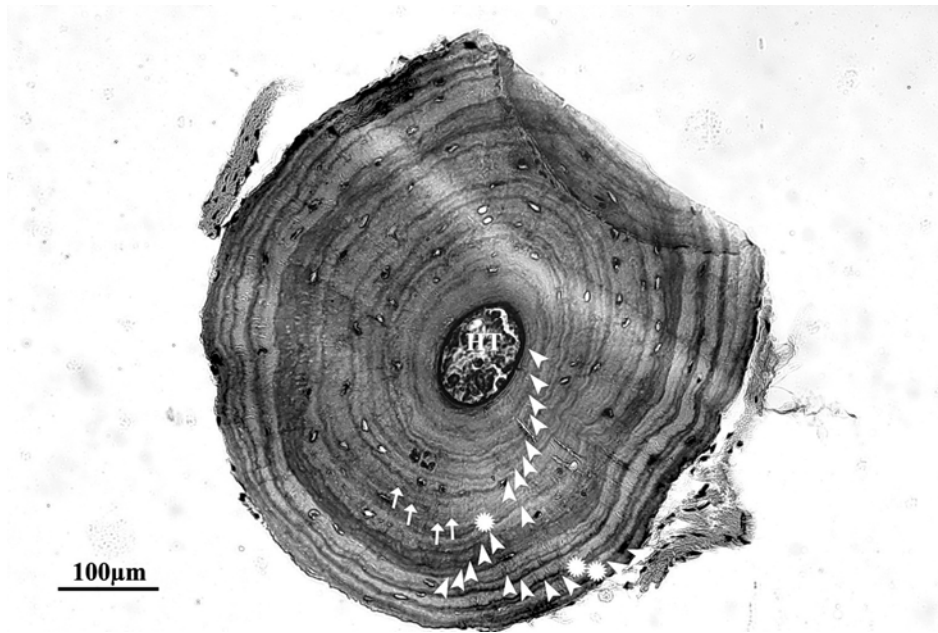


15a

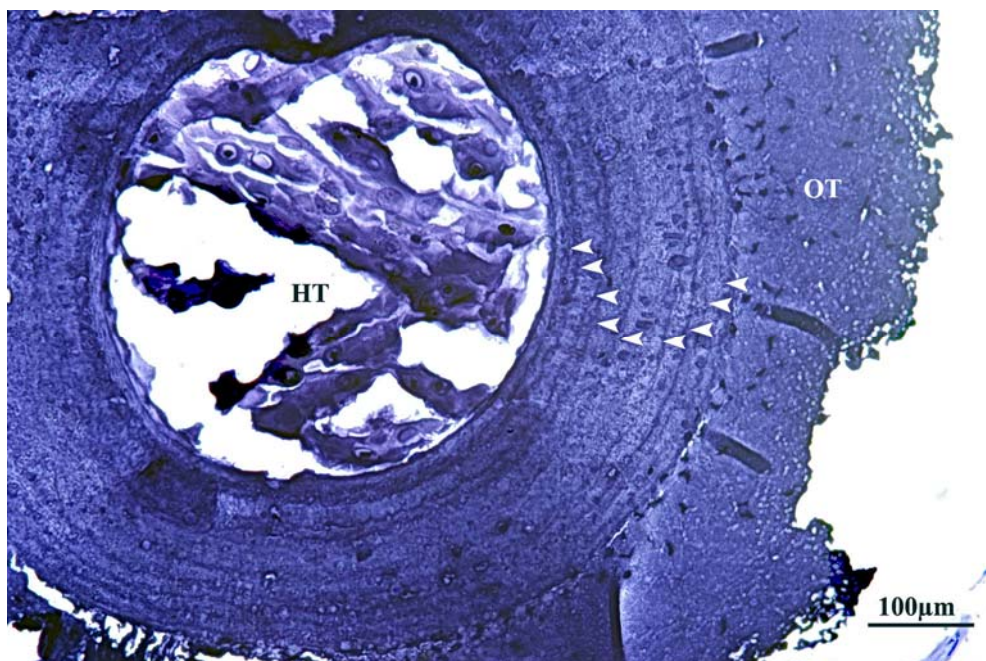


15b

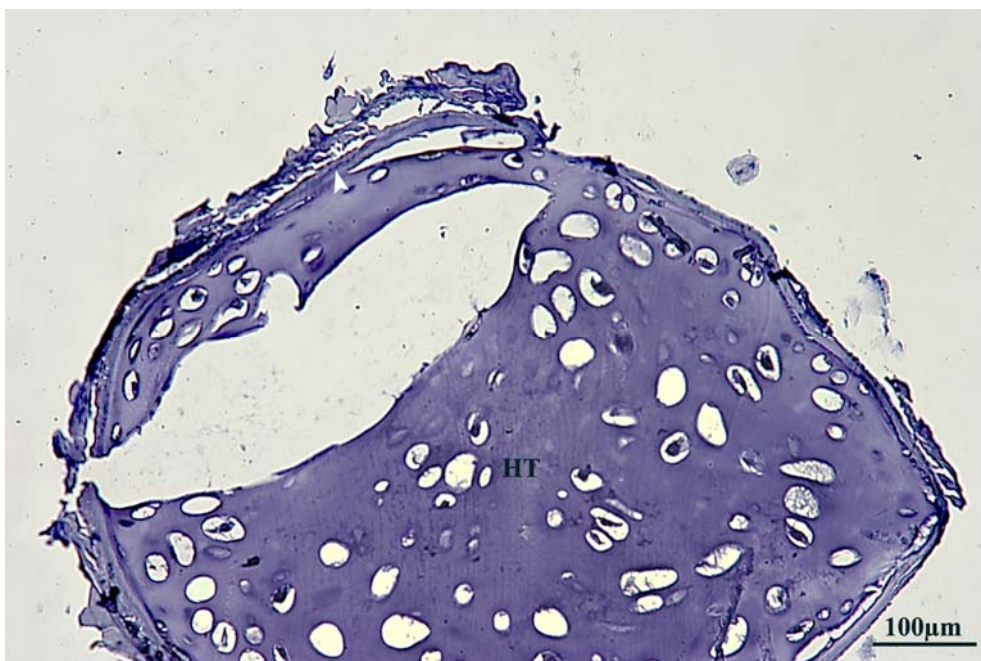
Slika 15a, b: Prečna prereza zadnje ekstremitete močerila (*Proteus anguinus*) P173 v predelu femurja. Parafinske rezine, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 5h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom. Vidnih je 10 LAG - ov (bele puščice). Na črno beli sliki (b) so LAG – i lepše vidni. HT, hrustančno tkivo.



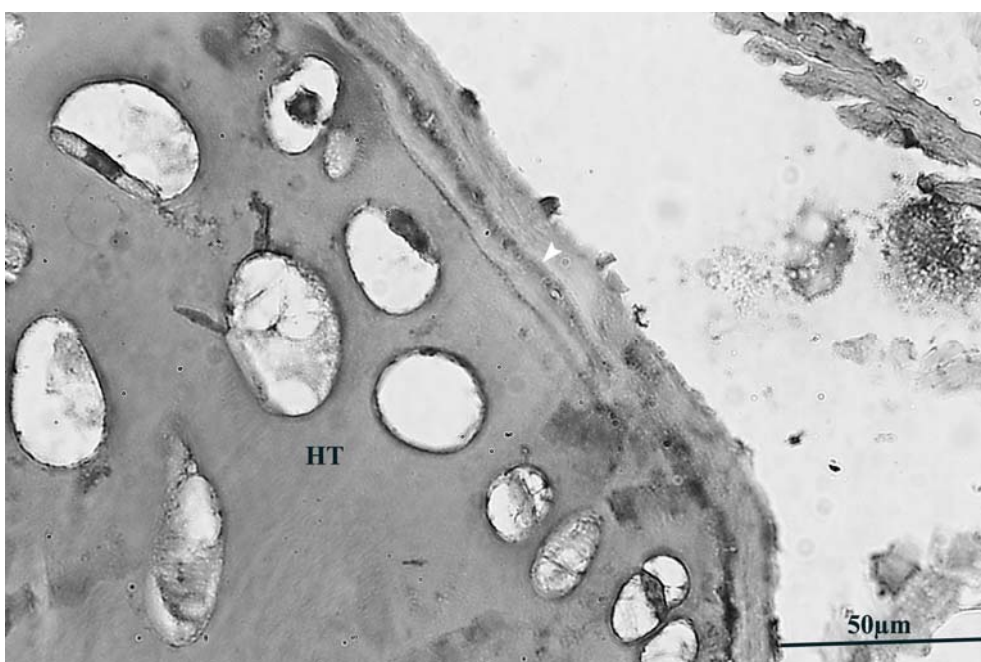
Slika 16: Prečni prerez zadnje ekstremitete močerila (*Proteus anguinus*) P175 v predelu femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 4h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom. Rezano je v diafznem delu. Vidnih je 20 linij zavrte rasti (bele puščice). Vidne so še tri dvojne linije (beli krogi) na 9., 18. in 19. liniji zavrte rasti (bele puščice ▼) ter vmesne linije (male bele puščice ↓). HT, hrustančno tkivo.



Slika 17: Prečni prerez zadnje ekstremitete močerila (*Proteus anguinus*) P179 v predelu femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 6h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom. Vidnih je 9 LAG – ov. HT, hrustančno tkivo; OT, okolna tkiva.



18a



18b

Slika 18: Prečna prereza zadnje ekstremitete močerila (*Proteus anguinus*) P183 v predelu femurja. Parafinske rezine, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 6h, barvano z Weigert - ovim hematoksilinom. Femur je večinoma hrustančen (HT), kostnega tkiva je malo. Vidi se le ena linija zavrte rasti (bela puščica).

3.2 PREPARATI BLATNEGA KUŽKA (*Necturus maculosus*)

Pregledali smo vzorce zadnjih ekstremitet 10 osebkov blatnih kužkov (*Necturus maculosus*). Skeletne dele smo dekalcinirali bodisi z EDTA ali pa s 5% dušikovo kislino in naredili klasične parafinske ali pa zamrznjene rezine (tabela 2). Žal nismo imeli podatkov o velikosti pri vseh živali. Po peturni dekalcinaciji z EDTA so se vzorci slabo rezali, preparati so bili razpokani (sl. 19a, b; 20a, b). Vzorci so bili neuporabni. Preparati prstkov so bili malo boljši (sl. 19c). Pri osebku N19, ki je bil največji, njegov femur in tibiofibula so bili dolgi kar 1 cm, vzorcev sploh nismo mogli razrezati, saj je bil kostni material še trd. Zaradi neuspešne dekalcinacije z EDTA smo ostale vzorce dekalcinirali z dušikovo kislino.

Različne kosti smo s 5% dušikovo kislino dekalcinirali različno dolgo. Sprva smo prstke dekalcinirali 2 uri, tibio – fibulo 3 ure in femur 5 ur. Medtem ko so se prsti dobro rezali (sl. 21a, b, 23), so bili femur in tibiofibula premalo dekalcinirani. Pri naslednji pripravi preparatov smo prstke dekalcinirali 3 ure, femur pa 6 ur. Pred dekalcinacijo pa smo tem preparatom odstanili kosti in mišice, za lažje prehajanje dekalcinirajočega medija. Tako pripravljene vzorci prstkov so se dobro rezali (sl. 25a), pri femurju pa smo imeli nekaj težav pri rezanju (sl. 25b). Čas dekalcinacije femurjev smo podaljšali na 7 ur, težav pri rezanju ni bilo (sl. 22, 24, 26). Pripravili smo tudi zamrznjene rezine, femur smo dekalcinirali 7 ur, ga dve uri spirali in nato zamrznili s tekočim dušikom. Preparat se je lepo rezal, tudi letnice so se dobro videle.

Pri proučevanih osebkih smo našli od 7 do 18 linij zavrte rasti. Razen pri enem osebku (N24) so bile linije zavrte rasti pri ostalih v enakomernih presledkih (sl. 22, 23, 25, 26, 27). Pri osebkih z večjim številom linij zavrte rasti so bile linije zgoščene in je bilo štetje težje (sl. 25, 26). Zgostitev perifernih linij smo zasledili le pri enem osebku (sl. 24). Ponekod so bile vidne dvojne linije (sl. 23, 25a, 26, 27). Samo pri enem osebku so bile na femurju vidne vmesne linije, ki so manj izrazite in prekinjene (sl. 24).

Na prerezih različnih prstov iste ekstremitete smo opazili razlike v številu linij zavrte rasti in velikosti hrustančnega tkiva. Več hrustančnega tkiva in manj LAG-ov smo našli pri

prvem, manjšem prstku (sl. 21a), kot pa pri tretjem, največjem prstku iste ekstremitete. Pri slednjem smo ugotovili boljše pokostenelost in večje število LAG-ov (sl. 21b). V obeh primerih je bil center še hrustančen.

Iz prerezov različnih delov diafiz je razvidno, da je v osrednjem delu diafize kostnega tkiva največ, medularni del pa je manjši in vključuje najmanj hrustančnega tkiva (sl. 22a). Prerezi na začetku diafiznega dela imajo manj linij zavrte rasti kot tisti iz osrednjega dela (sl. 22a, b).

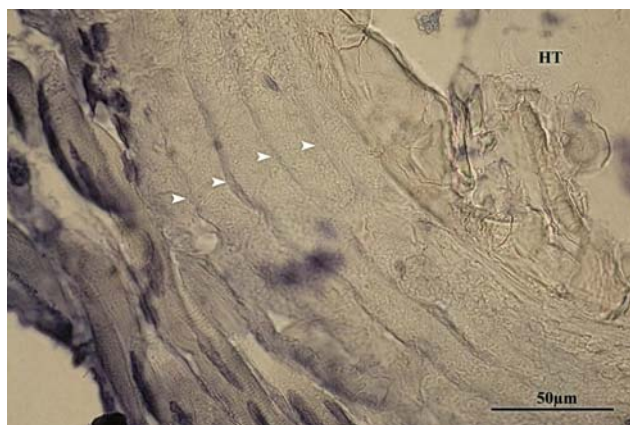
Pri primerjavi femurja in prstka istega osebka smo našli več linij zavrte rasti na prerezu prstka (sl. 25a) kot pa na femurju (sl. 25b). Femur je bil rezan bliže epifiznega dela. Ker se je preparat slabše rezal, žal nimamo primerjave z diafiznim delom femurja. Verjetno ne bi bilo takšne razlike, če bi bil femur rezan v diafiznem delu. Na femurju je v primerjavi s prstom še vedno veliko hrustančnega tkiva.

Tabela 2: Podatki o osebkih blatnega kužka (*Necturus maculosus*), ki smo jih uporabili pri raziskavi in število linij zavrtje rasti (LAG).

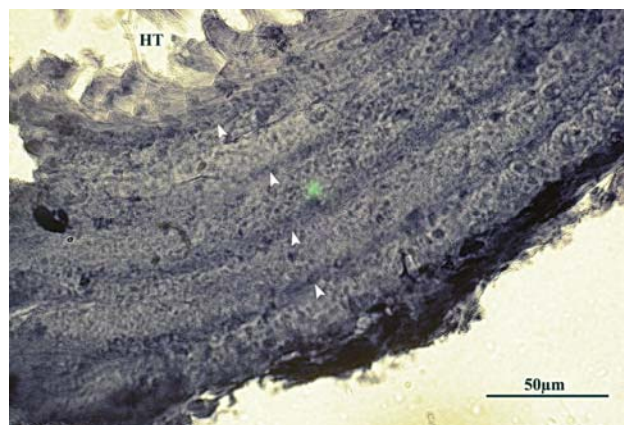
Oznaka nektura	Spol	Št. LAG - ov	Teža osebka (g)	Dolžina telesa (cm)	Dekalcinac.	Parafinske(P) - zamrznjene (Z) rezine	Rezan del – prst (P), femur (F), tibio-fibula (TF)
N1	?	7, 9	-	-	HNO ₃	P	P – 1. in 3.
N25	♂	- \$	72	25	EDTA	Z	P, F, TF
N27	♀	- \$	99,2	29	EDTA	Z	TF
N27	♀	9	99,2	29	HNO ₃	P	F
N34	♀	14	151,9	-	HNO ₃	P	P – 3.
N36	♀	14	115,2	-	HNO ₃	Z	F
N37	♀	12, 18	173,9	-	HNO ₃	P	P, F
N38	♀	10	158,68	-	HNO ₃	P	F
N39	♂	16	108	-	HNO ₃	P	F

\$ - zaradi slabe dekalcinacije se LAG - i ne vidijo oz. je vidnih le nekaj

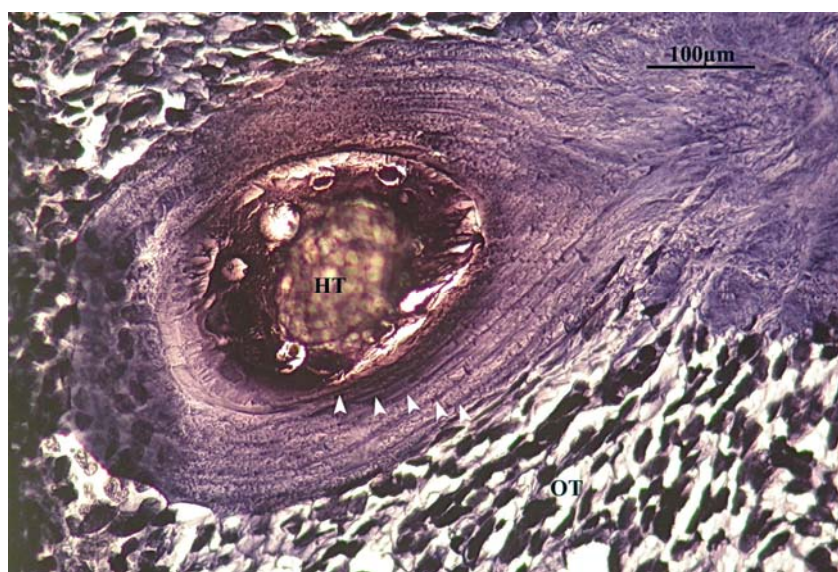
Vzorci dekalcinacije z EDTA



19a



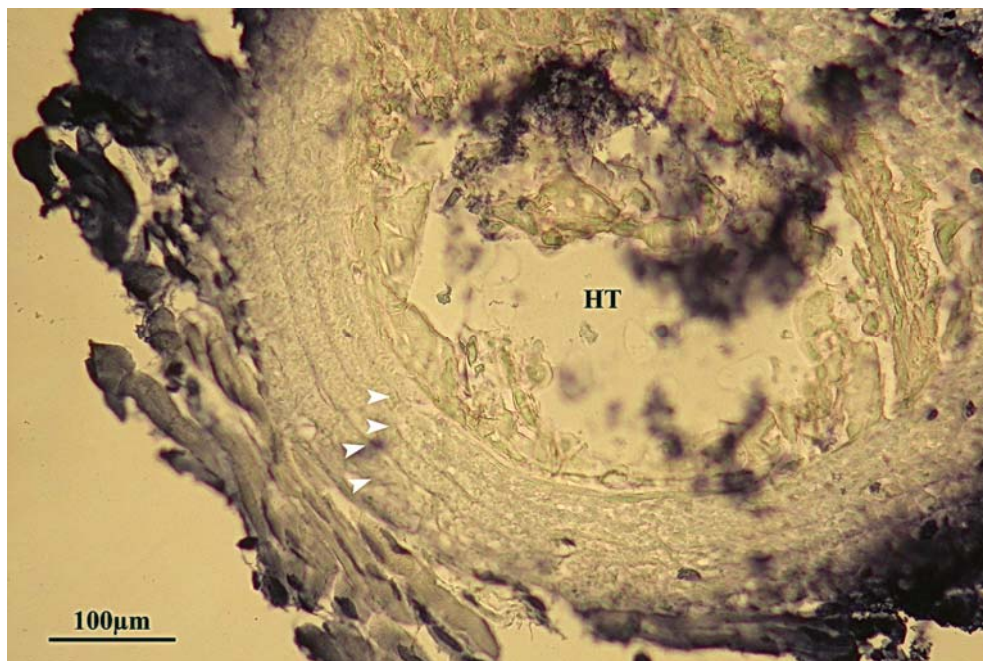
19b



19c

Slika 19a, b, c: Prečni prerezi zadnje ekstremitete blatnega kužka (*Necturus maculosus*) N25. Zamrznjene rezine, dekalcinacija z EDTA – 5h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom – 2min.

a. Prerez tibio –fibule. Preparat se je težje rezal, a se linije zavrte rasti vidijo (bele puščice). **b.** Prerez femurja, linije zavrte rasti so videti temnejše od ostalega tkiva (bele puščice). **c.** Prerez drugega prstka, kjer se linije zavrte rasti še najlepše vidijo (bele puščice). HT, hrustančno tkivo; OT, mišice in koža.



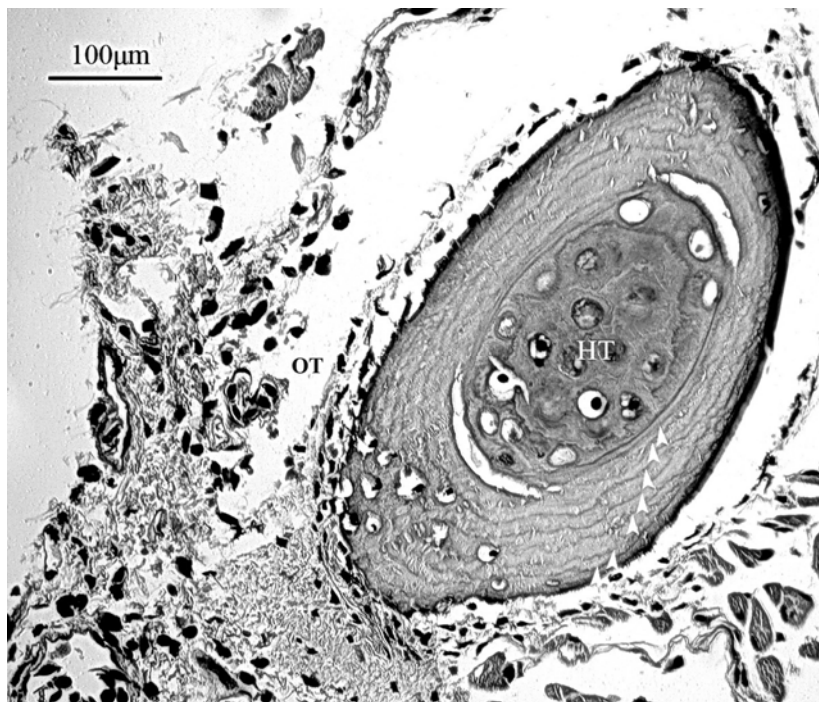
20a



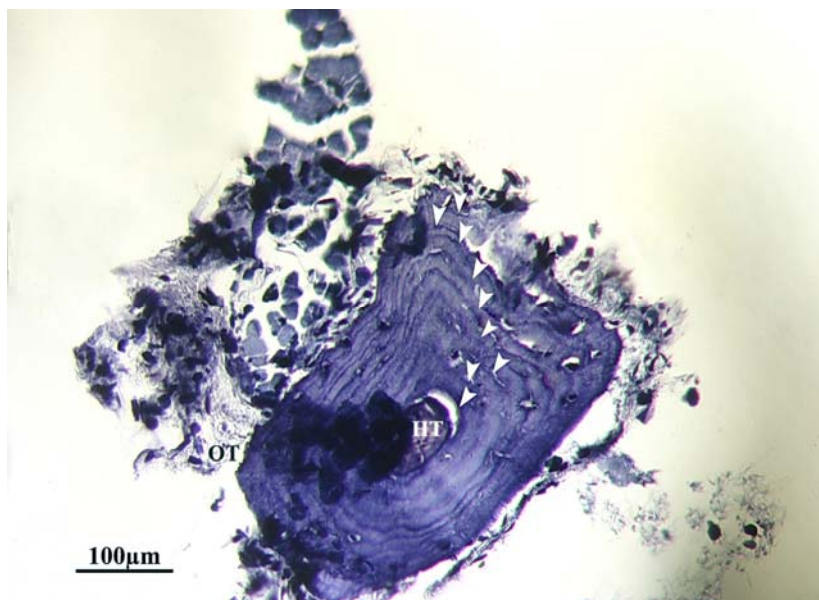
20b

Slika 20a, b: Prečna prereza zadnje ekstremitete blatnega kužka (*Necturus maculosus*) N27 v predelu tibio - fibule. Zamrznjene rezine, dekalcinacija z EDTA – 5h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom – 2min. HT, hrustančno tkivo, linije zavrte rasti so označene z belimi puščicami.

3.2.1 Vzorci dekalcinacije s 5% dušikovo kislino



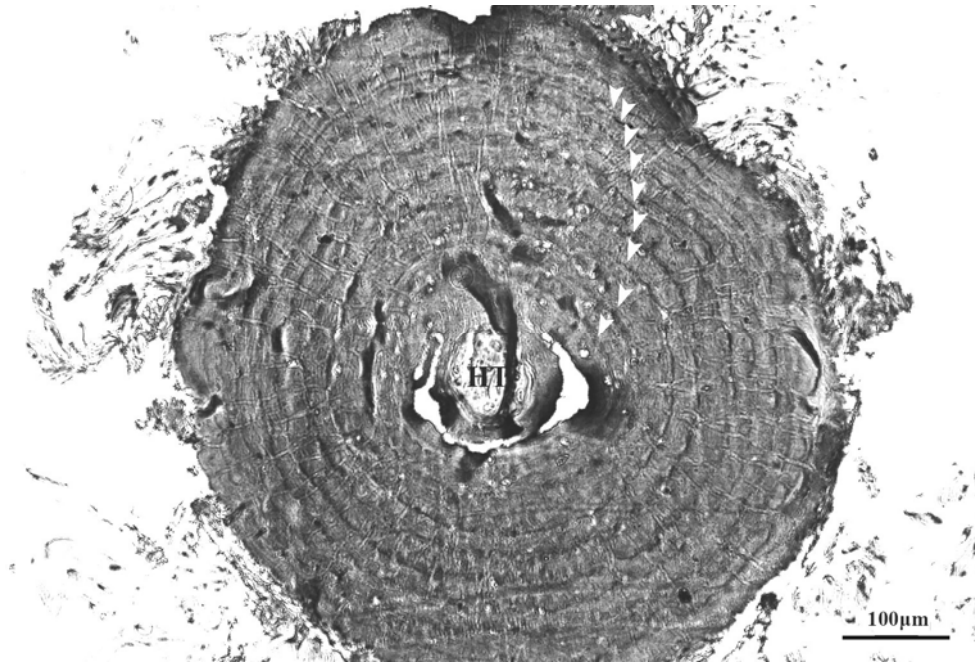
21a



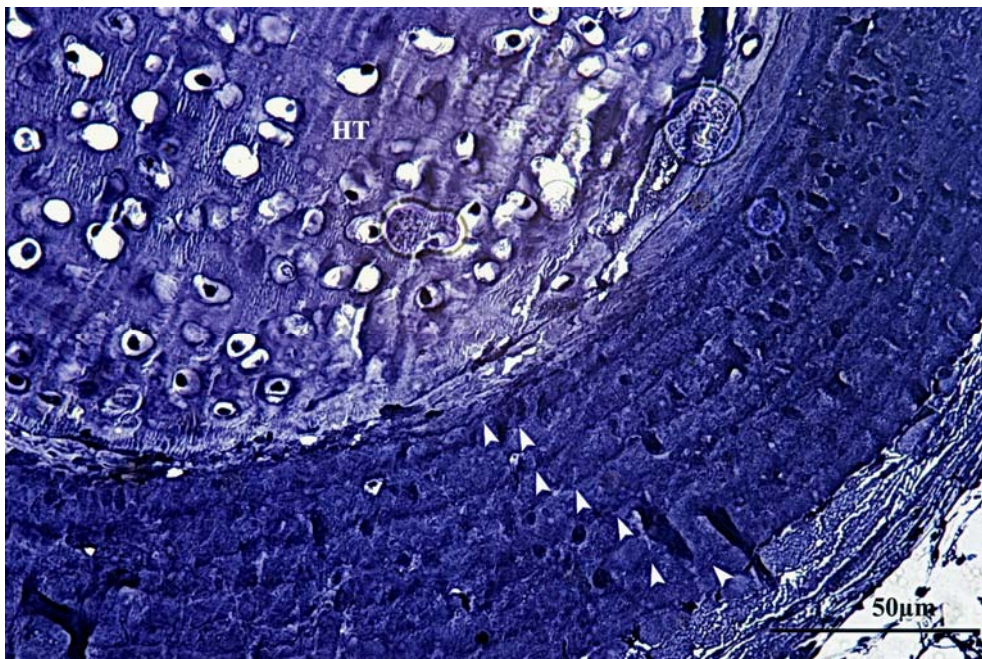
21b

Slika 21a, b: Prečni prerez prstkov zadnje ekstremitete blatnega kužka (*Necturus maculosus*) N1. Parafinske rezine, dekalcinacija s 5 % HNO_3 – 2h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.

a. Prerez prvega prstka. Vidnih je 7 LAG – ov. **b.** Prerez tretjega prstka. Vidnih je 9 LAG – ov. HT, hrustančno tkivo; OT, okolno tkivo – mišice, koža.

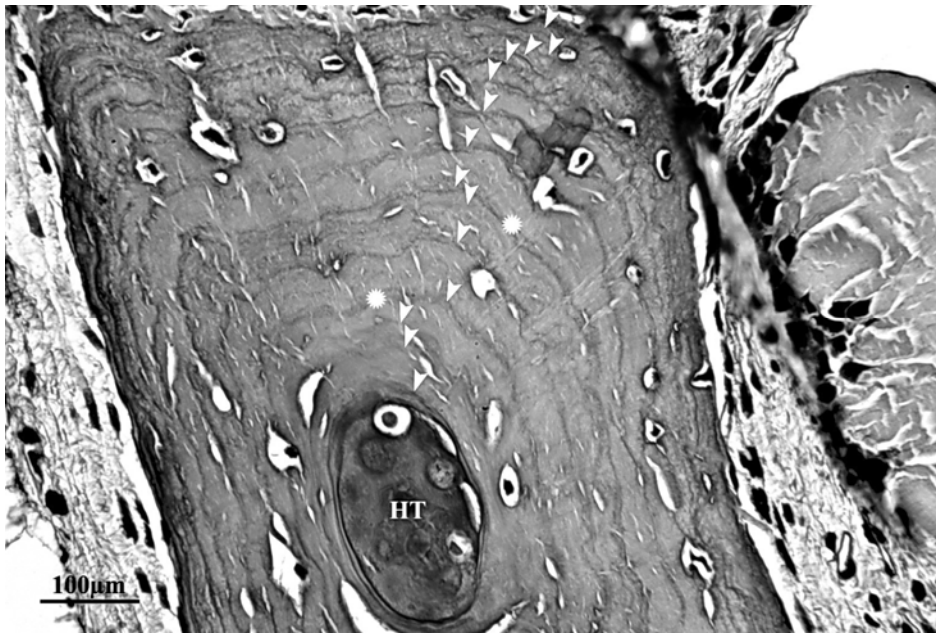


22a

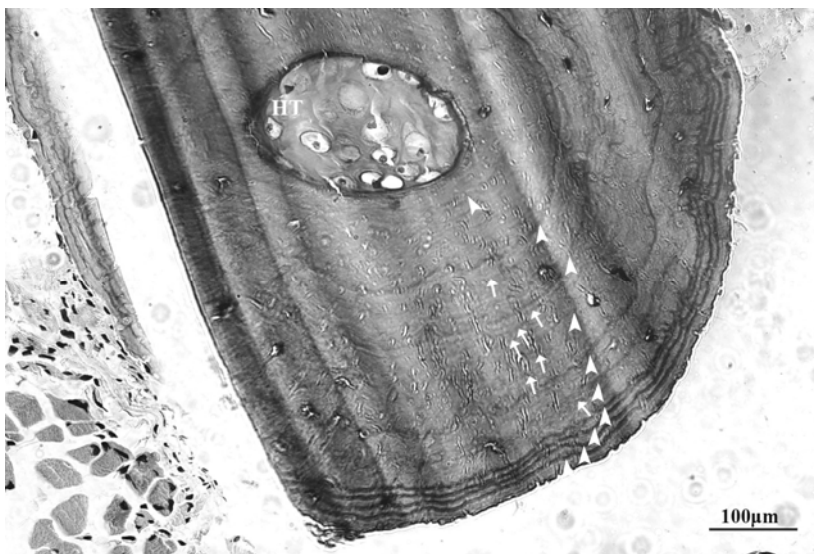


22b

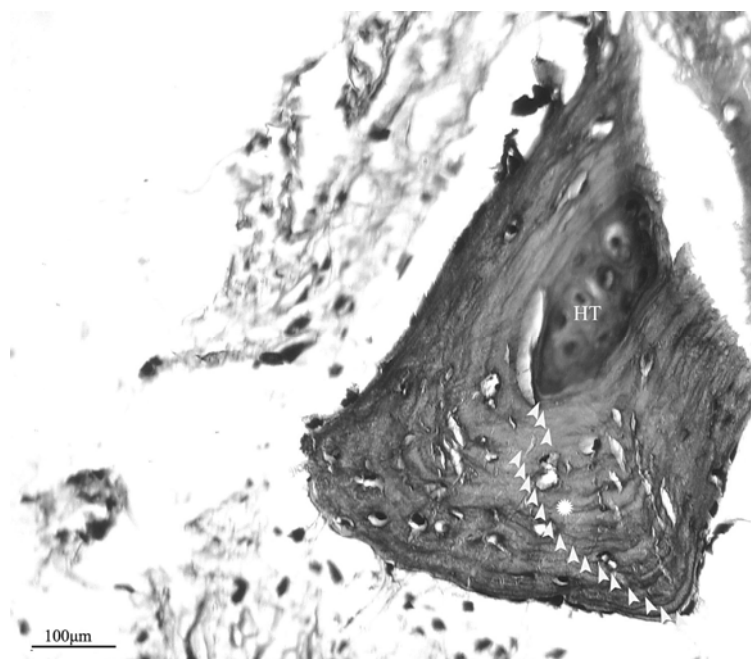
Slika 22a, b: Prečni prerez zadnje ekstremitete blatnega kužka (*Necturus maculosus*) N27 v predelu femurja. Parafinske rezine, dekalcinacija s 5 % HNO_3 – 7h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom. Primerjava različnih delov diafize. **a.** Diafizni centralni del. Vidnih je devet linij zavrtne rasti (bele puščice). **b.** Začetni del diafize, vidi se 7 linij zavrtne rasti. HT, hrustančno tkivo.



Slika 23: Prečni prerez tretjega prstka zadnje ekstremitete blatnega kužka (*Necturus maculosus*) N34. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 2h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom. Vidnih je 14 linij zavrte rasti (bele puščice), 4. in 7. linija pa sta dvojni (beli krogci). HT, hrustančno tkivo.



Slika 24: Prečni prerez zadnje ekstremitete blatnega kužka (*Necturus maculosus*) N38 v predelu femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 7h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom. Vidnih je deset letnih linij zavrte rasti (LAG) (bele puščice ▼), med temi pa so vidne še vmesne linije (manjše puščice ↓), nastale tekom ene sezone. HT, hrustančno tkivo.



25a

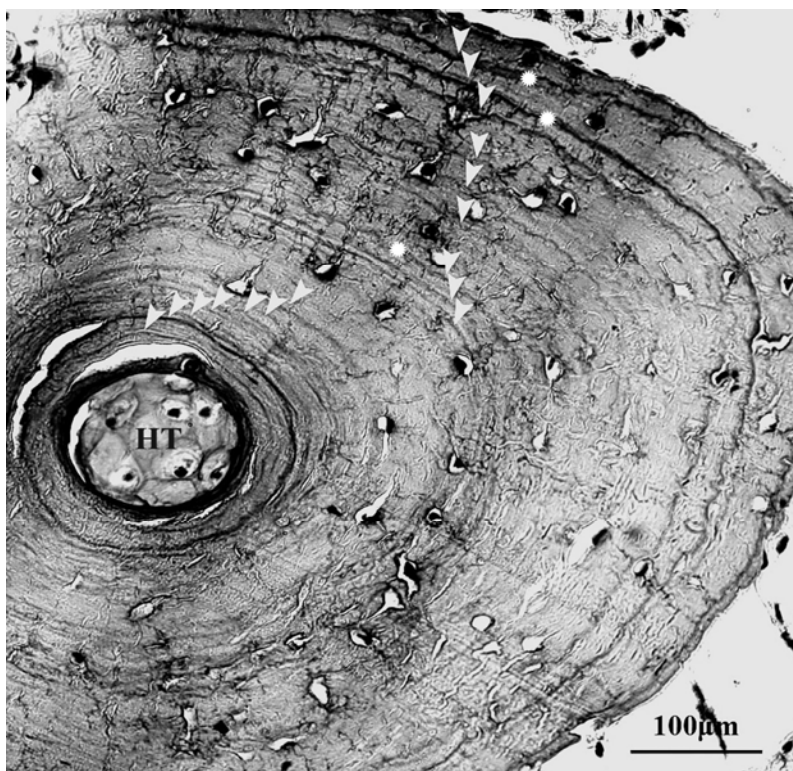


25b

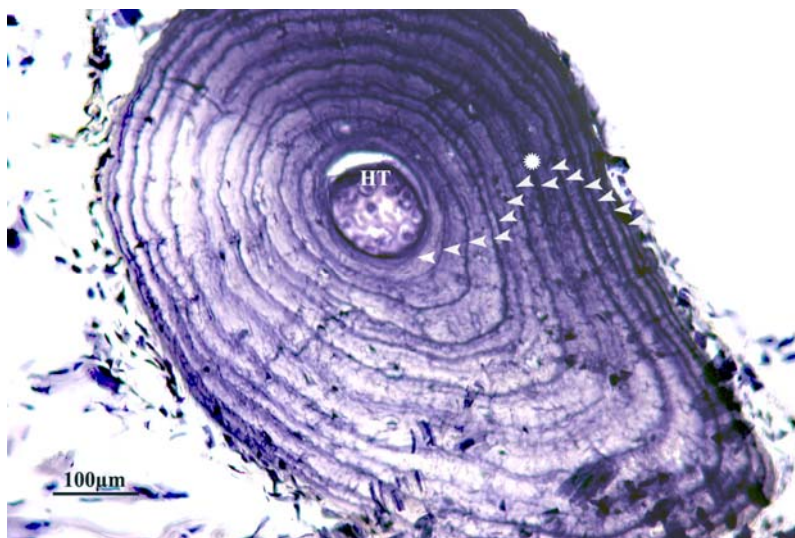
Slika 25a, b: Prečni prerez zadnje ekstremitete blatnega kužka (*Necturus maculosus*) N37. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.

Primerjava prsta in femurja iste noge. **a.** Preparat četrtega prstka, dekalcinacija – 3h. Vidnih 18 linij zavrte rasti (bele puščice). 8. linija je dvojna (bel krogec).

b. Preparat femurja v začetnem delu diafize, dekalcinacija - 6 ur. Vidnih 13 linij zavrte rasti. HT, hrustančno tkivo.



Slika 26: Prečni prerez zadnje ekstremitete blatnega kužka (*Necturus maculosus*) N39 v predelu femurja. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 7h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom. Našteli smo 16 LAG – ov (bele puščice), 10., 15. in 16. so dvojne linije (beli krogeci). HT, hrustančno tkivo.



Slika 27: Prečni prerez zadnje ekstremitete blatnega kužka (*Necturus maculosus*) N36 v predelu femurja. Zamrznjena rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 7h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom. Rezano v diafiznem delu, na sredi kosti, zato je tudi malo hrustančnega tkiva (HT). Našteli smo 14 linij zavrti rasti (bele puščice), 8. linija je dvojna (bel krogec).

3.3 PREPARATI SEKULJE (*Rana temporaria*)

Pregledali smo prstke 16 osebkov, šestih samčkov in desetih samičk, velikosti od 56,8 do 76,2 mm (tabela 3). Skeletne dele smo dekalcinirali bodisi z EDTA ali pa s 5% dušikovo kislino in naredili klasične parafinske ali pa zamrznjene rezine (tabela 3). Z EDTA smo dekalcinirali 5 ur, z dušikovo kislino pa od 1 do 3 ure. Vzorci dekalcinirani z EDTA so se slabše rezali, vendar pa je morfologija osrednjega dela kosti dobro ohranjena (sl. 28, 29). Prav tako sta dobro vidna periostalna in endostalna kost (sl. 28, 29, 30). Enourna dekalcinacija z dušikovo kislino je bila premalo, saj so se vzorci slabše rezali, morfologija kosti je bila slabša (sl. 31, 32). Dve oziroma triurna dekalcinacija je bila ustrežnejša, linije zavrte rasti so bile vidne, jasnejša je bila tudi meja med endostalno in periostalno kostjo (sl. 34, 35, 37, 38). Najboljši so bili tisti vzorci, kjer je bil podaljšan tudi čas infiltracije v paraplastu še za en dan (sl. 35, 37). Tudi pri zamrznjenih rezinah so linije zavrte rasti dobro vidne (sl. 39, 40a, b). Vendar pa je morfologija zamrznjenih rezin v primerjavi s parafinskimi slabša.

Pri večini vzorcev je poleg periostalne kosti vidna še endostalna kost, linije zavrte rasti so vidne v obeh področjih (sl. 32, 34, 35, 37a; 38, 40). Meja med obema deloma kosti je vidna kot vrzel, ki je nastala med fiksacijo, prav tako je endostalni del svetlejši. Linije zavrte rasti smo šteli le v periostalnem delu, in sicer smo pri proučevanih osebkih našli od 2 do 6 linij zavrte rasti (tabela 3). Pri slabše dekalciniranih vzorcih je bila meja med periostalno in endostalno kostjo slabše vidna, (sl. 31, 32, 33). Pri nekaterih osebkih so poleg LAG-ov vidne še vmesne linije, ki so manj izrazite in ne potekajo koncentrično okoli kosti, temveč so prekinjene (sl. 34a, b; 37b, 38).

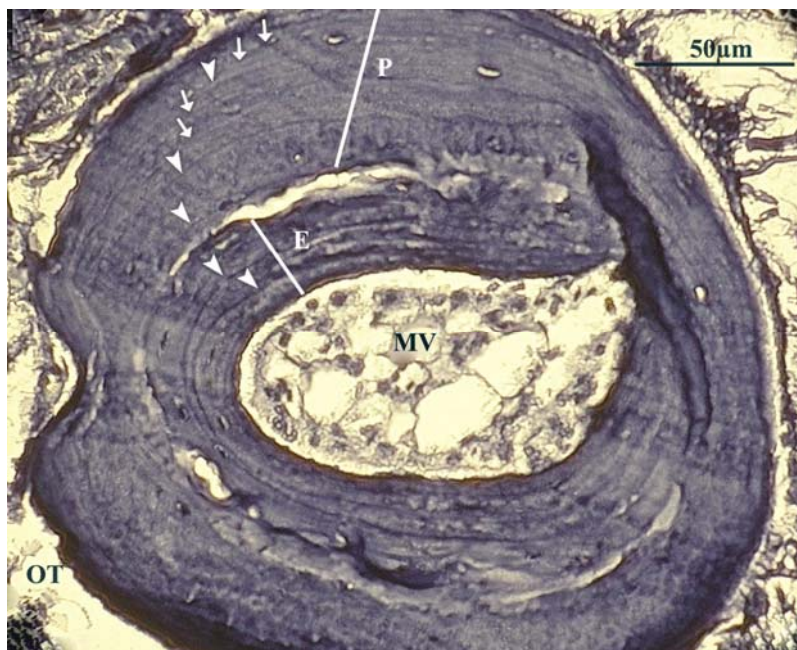
Prstni členki niso več hrustančni, vidna je mozgovna votlina (sl. 28 do 38, 40). Na preparatih dekalciniranih z EDTA je ohranjen tudi kostni mozeg, v katerem so maščobne celice (sl. 28). Samo pri enem osebku (Ž22) smo zasledili v centru članka še hrustančno tkivo (sl. 39). Najverjetneje je bil vzorčen le epifizni del drugega članka prsta, saj je pri žabah hrustančen le epifizni del članka, ostali del pa je v celoti že koščen (Rozenblut in Ogielska, 2005).

Tabela 3: Podatki o osebkih sekulje (*Rana temporaria*), ki smo jih uporabili pri raziskavi in število linij zavrite rasti (LAG).

Oznaka sekulje	Število LAG - ov	Spol	Teža osebka (g)	Dolžin a osebka (mm)	Lokacija	Dekalcinac.	Parafinska (P)/ zamrznjena (Z) rezina
Ž3	3	♀	24	58,3	Vranja jama	EDTA (5h)	P
Ž4	4	♂	-	71,3	Vranja jama	EDTA (5h)	P
Ž6	4	♀	34,5	72,5	Vranja jama	EDTA (5h)	P
Ž13	6	♂	35,5	69,8	Vranja jama	HNO ₃ (1h)	P
Ž14	6	♀	48,0	76,2	Vranja jama	HNO ₃ (1h)	P
Ž15	4	♀	32,5	64,3	Vranja jama	HNO ₃ (2h)	P
Ž16	3	♀	34,5	64,7	Vranja jama	HNO ₃ (2h)	P
Ž17	4	♀*	34,5	61,5	Vranja jama	HNO ₃ (2h)	P
Ž18	5	♂	29,0	62,6	Vranja jama	HNO ₃ (2h)	P
Ž19	3	♀	18,5	56,8	Vranja jama	HNO ₃ (3h)	P
Ž20	3	♂*	21,5	61,4	Vranja jama	HNO ₃ (3h)	P
Ž21	5	♂	31,5	66,4	Vranja jama	HNO ₃ (3h)	Z
Ž22	2	♂	19,5	61,8	Vranja jama	HNO ₃ (3h)	Z

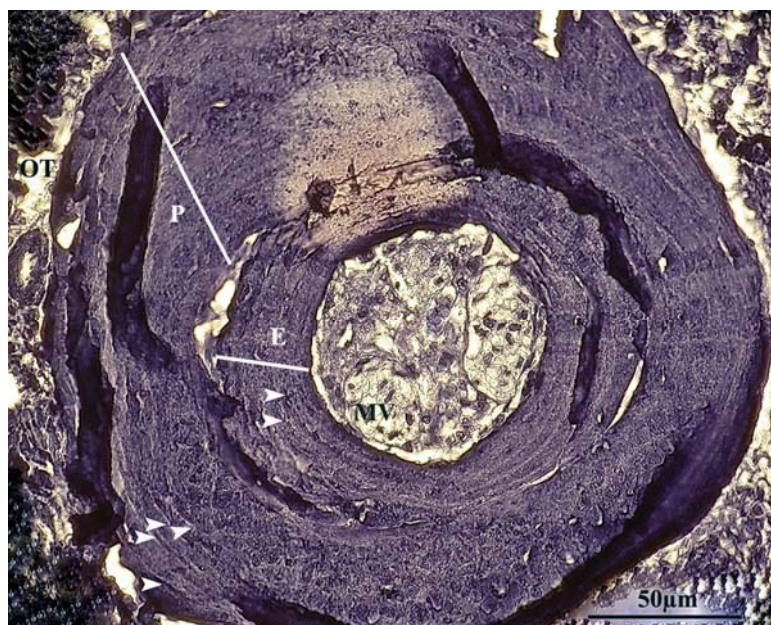
* - osebka sta bila v amplexusu

3.3.1 Vzorci dekalcinacije z EDTA



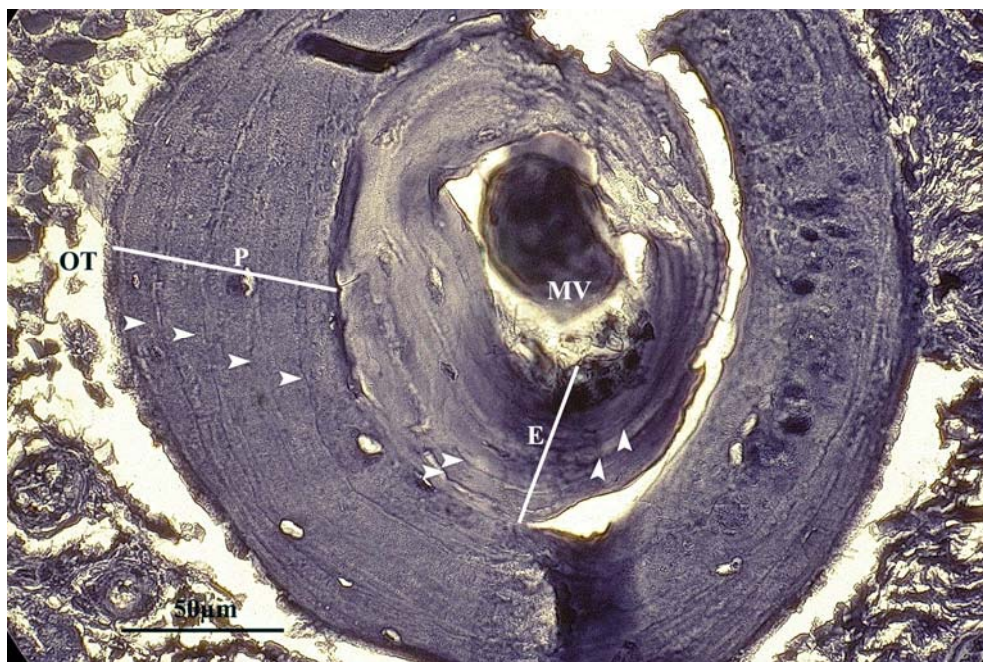
Slika 28: Prečni prerez prstka sekulje (*Rana temporaria*) Ž3. Parafinska rezina, dekalcinacija z EDTA– 5h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.

Našteli smo 3 linije zavrte rasti (bele puščice▼), vmes so označene še linije, ki so nastale znotraj enega leta (↓). Na preparatu je vidna endostalna kost (E), na njem sta vidni 2 liniji zavrte rasti. P, periostalna kost. V mozgovni votlini (MV) so vidne maščobne celice. OT, okolna tkiva.



Slika 29: Prečni prerez prstka sekulje (*Rana temporaria*) Ž4. Parafinska rezina, dekalcinacija z EDTA – 5h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.

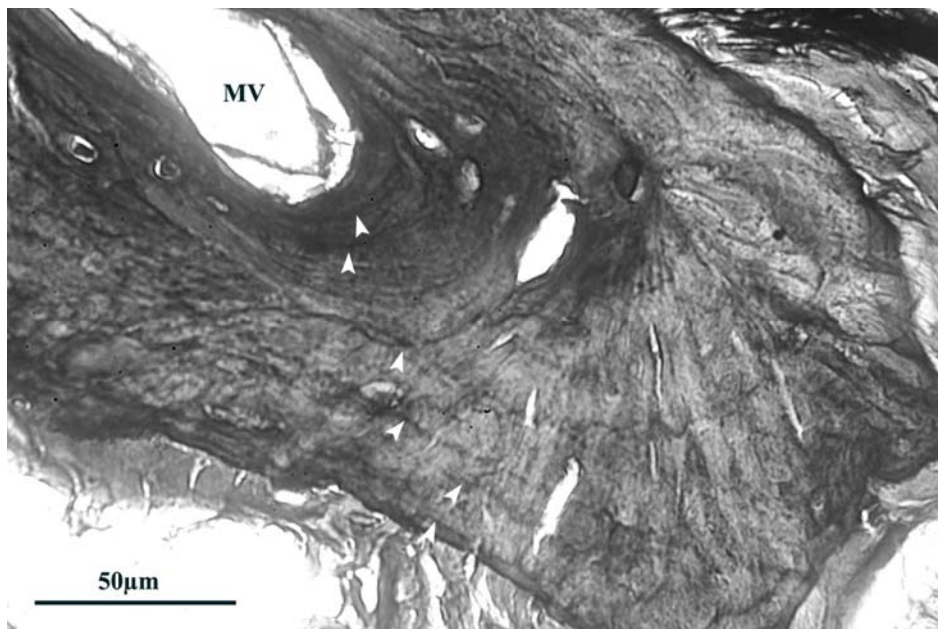
Linije zavrte rasti se slabše vidijo (bele puščice), na preparatu so razpoke. MV, mozgovna votlina; OT, okoliško tkivo – mišice in koža; P, periostalna kost; E, endostalna kost.



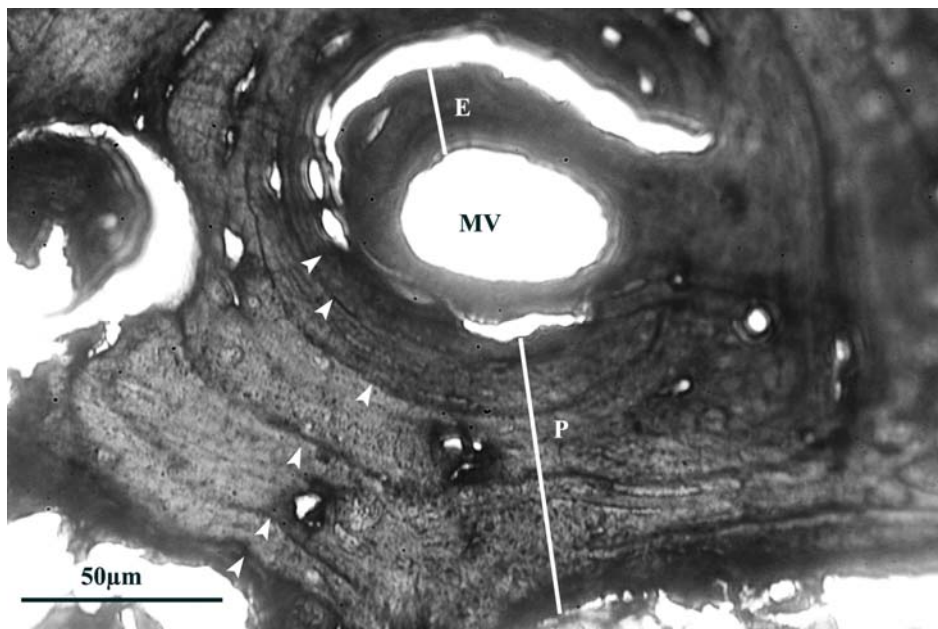
Slika 30: Prečni prerez prstka sekulje (*Rana temporaria*) Ž6. Parafinske rezine, dekalcinacija z EDTA – 5h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.

V endostalni (E) in periostalni kosti (P) se vidijo 4 linije zavrte rasti, LAG – i (bele puščice). MV, mozgovna votlina; OT, mišice in koža.

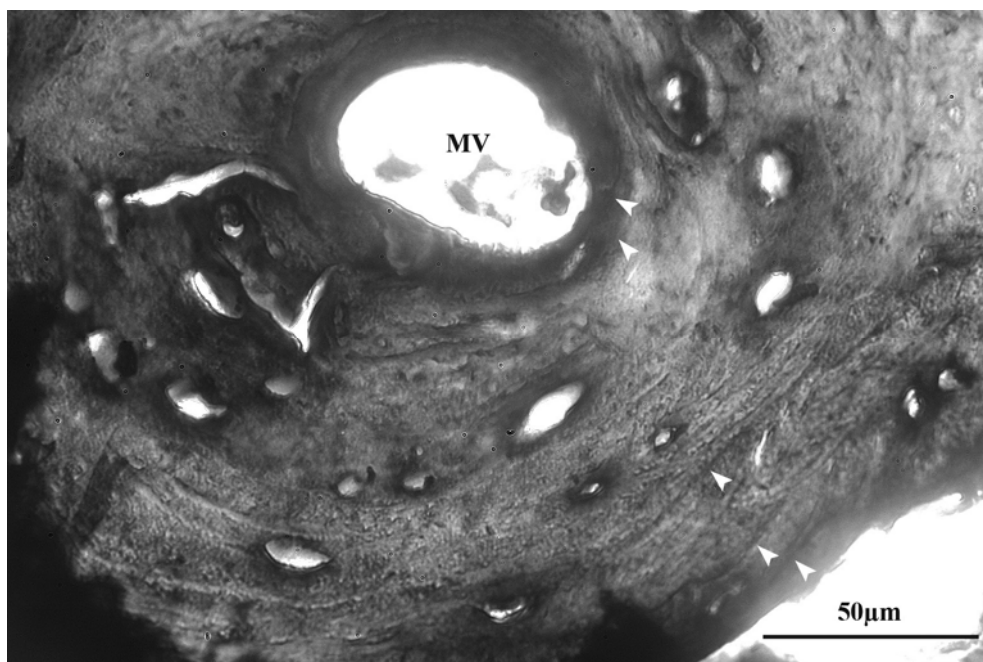
3.3.2 Vzorci dekalcinacije s 5% dušikovo kislino



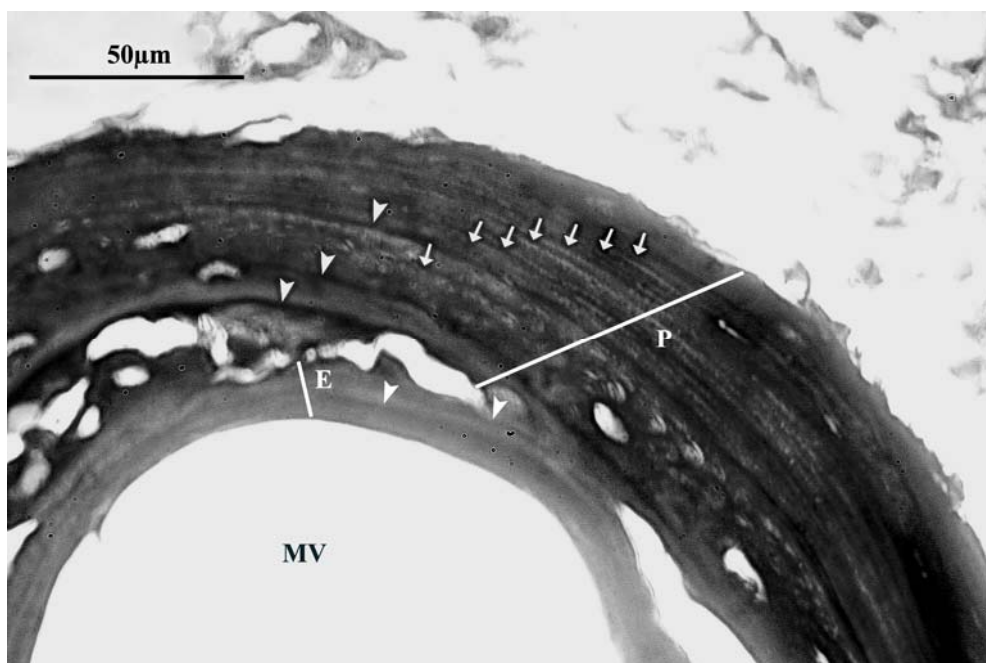
Slika 31: Prečni prerez prstka sekulje (*Rana temporaria*) Ž13. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 1h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom. Vidnih je 6 linij zavrte rasti (bele puščice). Preparati so se zaradi prekratke dekalcinacije težje rezali. MV, mozgovna votlina.



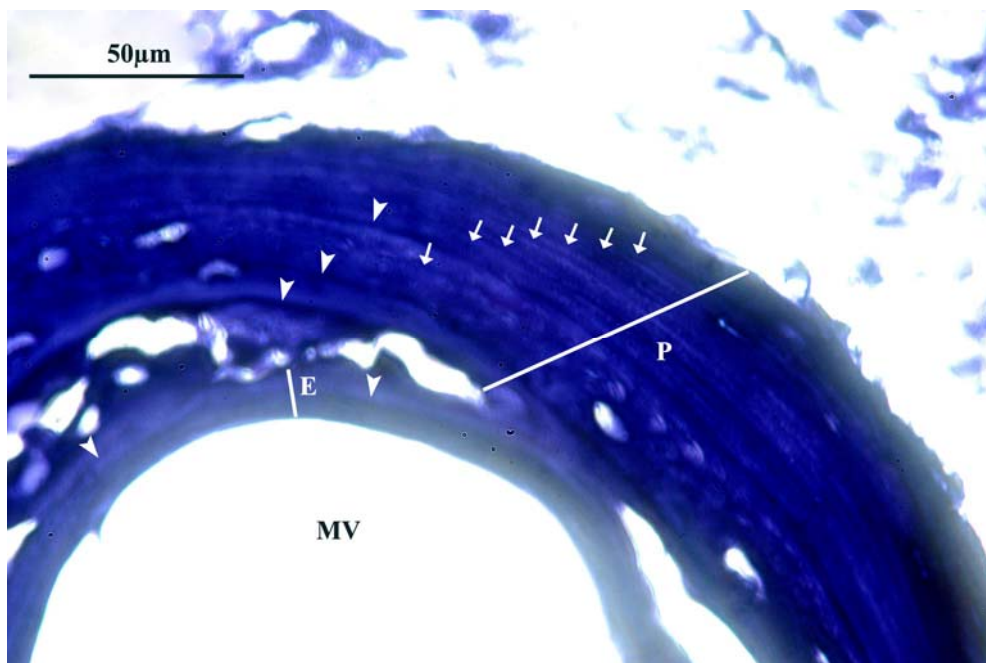
Slika 32: Prečni prerez prstka sekulje (*Rana temporaria*) Ž14. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 1h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom. Vidnih je 6 linij zavrte rasti (bele puščice). Preparati so se zaradi prekratke dekalcinacije težje rezali. E, endostalna kost; P, periostalna kost; MV, mozgovna votlina.



Slika 33: Prečni prerez prstka sekulje (*Rana temporaria*) Ž15. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 2h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom. Linije zavrte rasti (bele puščice) so slabše vidne, razločnejše se vidijo le 4. Meja med endostalno in periostalno kostjo ni vidna. MV, mozgovna votlina.



34a



34b

Slika 34a, b: Prečna prereza prstka sekulje (*Rana temporaria*) Ž16. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO_3 – 2h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.

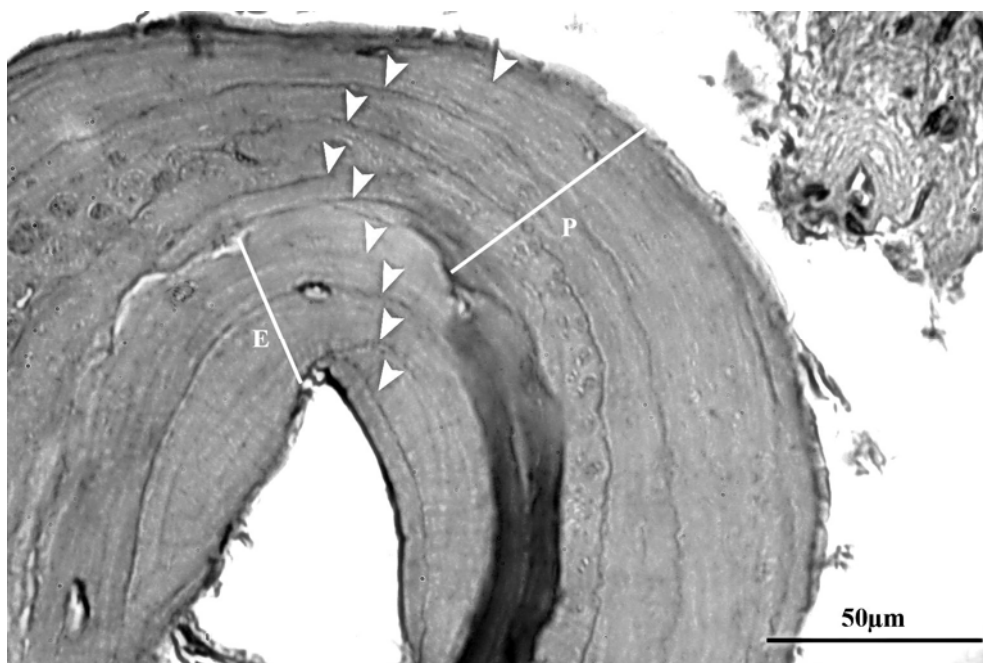
Primerjava črno – bele (**a**) in barvne (**b**) slike. Na črno – beli sliki so linije zavrte rasti razpoznavnejše. Vidna sta endostalna (E) in periostalna kost (P), na endostalni kosti sta vidni 2 liniji zavrte rasti, na periostalni pa tri letne linije zavrte rasti (bele puščice ▼) ter še dodatne linije (manjše puščice ↓). MV, mozgovna votlina.



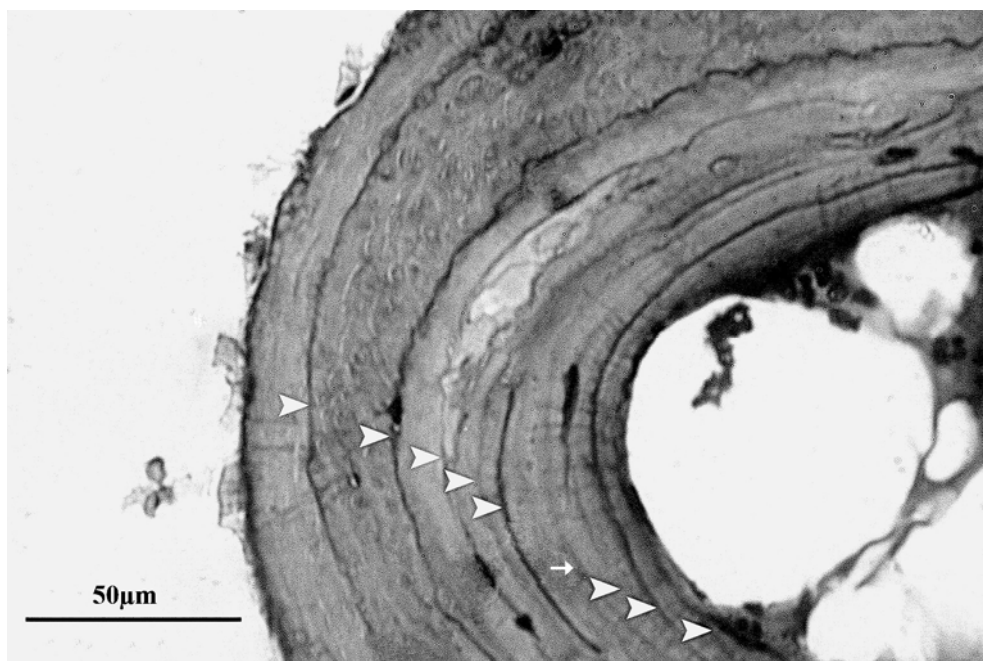
Slika 35: Prečni prerez prstka sekulje (*Rana temporaria*) Ž17. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 2h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.
Vidnih je šest linij zavrte rasti (bele puščice). V endostalni kosti (E) sta vidni 2 liniji, v periostalni (P) pa 4.



Slika 36: Prečni prerez prstka sekulje (*Rana temporaria*) Ž19. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 3h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.
Vidne so tri linije zavrte rasti (bele puščice).



37a

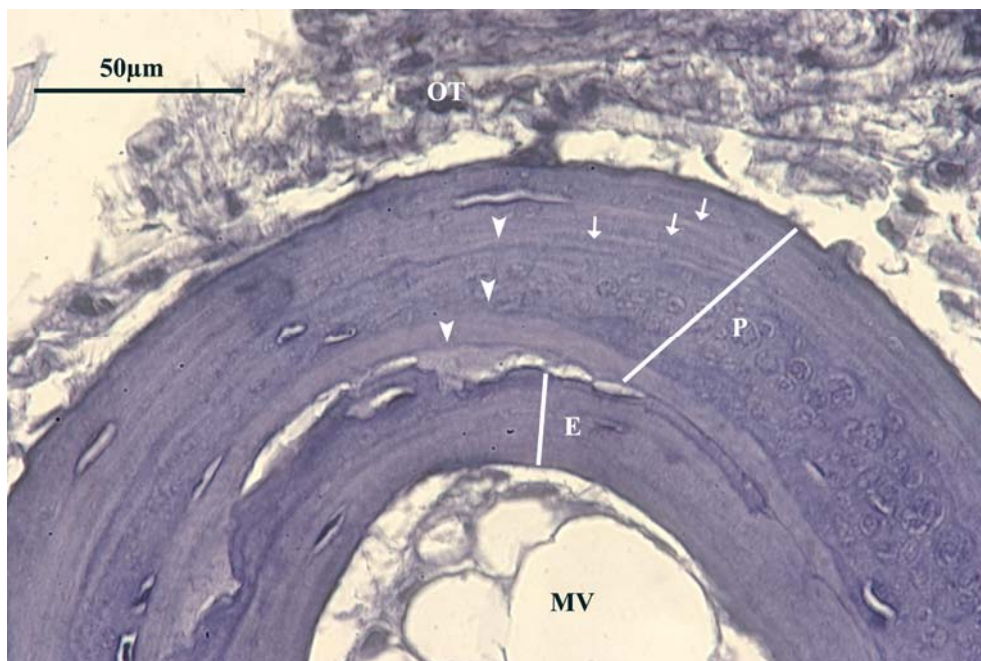


37b

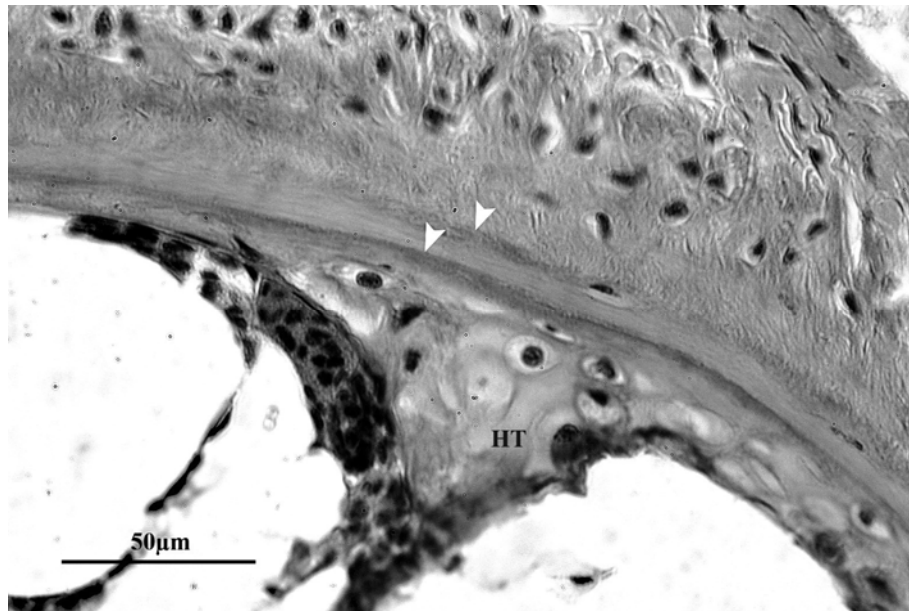
Slika 37a, b: Prečna prereza prstka sekulje (*Rana temporaria*) Ž18. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO_3 – 2h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.

Na posnetku **a.** in **b.** sta prereza različnega dela diafize. Na **a.** se vidi meja med endostalno (E) in periostalno kostjo (P), tako, da smo ocenili starost tega osebek na pet let.

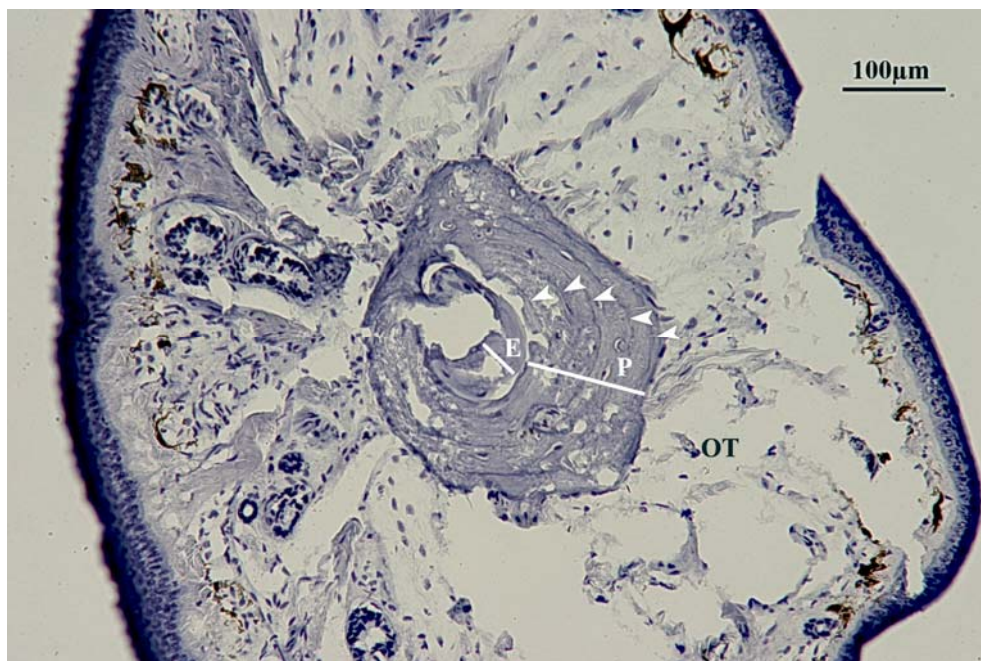
b. vidnih 8 letnih linij zavrte rasti (bele puščice ▼) ter 1 vmesna (manjše puščice ↓). Ni videti jasne meje med endostalno in periostalno kostjo.



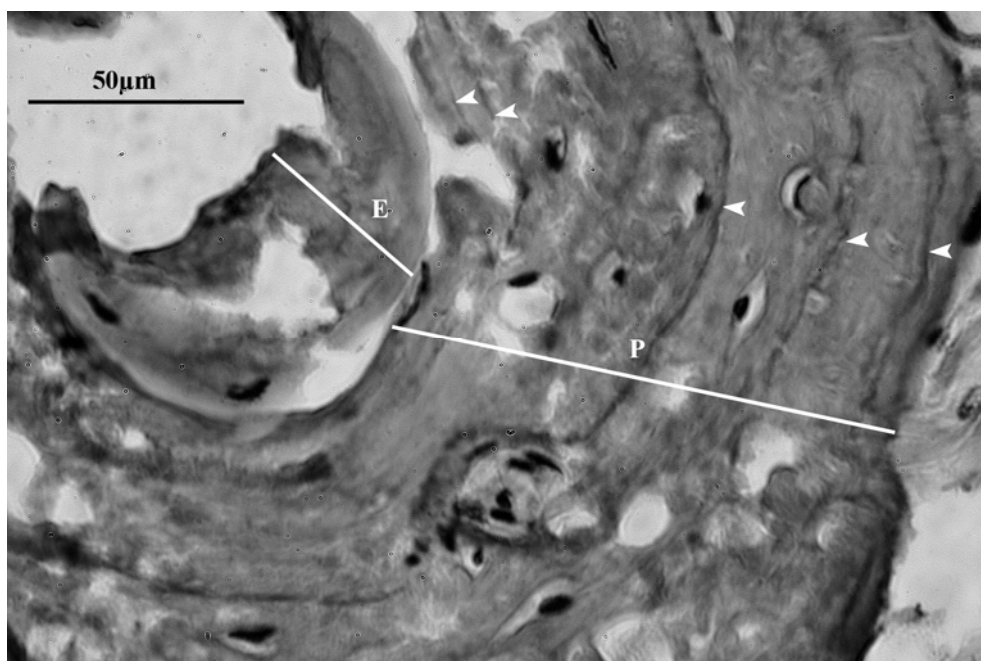
Slika 38: Prečni prerez prstka sekulje (*Rana temporaria*) Ž20. Parafinska rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 3h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.
Vidne so tri letne linije zavrte rasti (bele puščice ▼) ter nekaj vmesnih linij (manjše puščice ↓). E, endostalna kost; P, periostalna kost; MV, mozgovna votlina; OT, mišice in koža.



Slika 39: Prečni prerez prstka sekulje (*Rana temporaria*) Ž22. Zamrznjena rezina, dekalcinacija s 5 % HNO₃ – 3h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom.
Ta del je rezan v distalni epifizi, saj je vidno še veliko hrustančnega tkiva (HT).



40a



40b

Slika 40a, b: Prečna prereza prstka sekulje (*Rana temporaria*) Ž21. Zamrznjene rezine, dekalcinacija s 5 % HNO_3 – 3h, barvano z Weigert- ovim hematoksilinom. Vidnih je pet linij zavrte rasti (bele puščice), ki so na večji povečavi in črno belem posnetku **(b)** razločnejši. P, periostalna kost; E, endostalna kost.

4 RAZPRAVA IN SKLEPI

4.1 RAZPRAVA

4.1.1 Standarizacija protokola

Za pripravo preparatov za skeletokronologijo je ključna uspešna dekalcinacija. V naši nalogi smo želeli ugotoviti, katero dekalcinacijsko sredstvo je najbolj primerno oziroma pri katerem bi najlažje videli linije zavrtega nalaganja kostnega materiala (LAG – lines of arrested growth). Prav zaradi tega smo preizkusili dekalcinirati na dva načina, in sicer z EDTA ter dušikovo kislino. Spreminjali smo čase dekalcinacije in jih prilagodili velikosti vzorca. Želeli smo vključiti tudi mikrovalovno tehnologijo za pospešitev poteka priprave tkiv. Pri tem smo uporabili mikrovalovno pečico (PelcoBiowave). Vendar pa nekatere reagente nismo smeli dajati v mikrovalovno pečico zaradi velike hlapljivosti ali kakšnih drugih neugodnih kemijskih lastnosti.

Za dekalcinacijo smo uporabili 0,1 M etilendiamintetraocetno kislino – EDTA v Na – fosfatnem pufri. Ta deluje kot kelatno sredstvo in je zadnje čase priljubljena v klasičnih histoloških tehnikah kot dekalcinirajoči agens. To sredstvo zelo malo poškoduje tkivo in tako ohrani morfologijo, vendar je njeno delovanje počasno (Gabe, 1976). Za EDTA smo se odločili tudi zato, ker smo dekalcinacijo lahko izvajali v mikrovalovni pečici in na ta način skrajšali postopek.

Ugotovili smo, da je triurna dekalcinacija z EDTA premalo, saj se tkivo ni dovolj dekalciniralo. Vzorci so bili še pretrdi in se niso dobro rezali. Po tem postopku nismo dobili nobenih uporabnih rezultatov.

Čas dekalcinacije z EDTA v mikrovalovnem sistemu smo podaljšali na pet ur, prav tako smo klasično metodo priprave histoloških preparatov nadomestili s pripravo zamrznjenih rezin s pomočjo kriotoma. Postopek priprave zamrznjenih rezin je znatno krajši in

enostavnejši. Tako pripravljene preparate zadnjih ekstremitet močerilov in nekturov smo uspeli zrezati, vendar so se pri rezanju ponovno pojavljale težave. Opazili smo namreč, da preparati femurja in tibiofibule, tudi po petih urah v EDTA, niso bili dovolj dekalcinirani. Prav tako na teh preparatih niso bile vidne linije zavrte rasti oziroma jih je bilo vidnih le nekaj. Osebek nektura, ki je bil največji (N19), njegov femur in tibiofibula so bili dolgi kar 1 cm, sploh nismo mogli razrezati, saj je bil kostni material še trd. Ostali prečni prerezi so bili polni razpok in na večini prerezov linije zavrte rasti sploh niso bile opazne. Opazili pa smo tudi, da se prečni prerezi prstkov bolje režejo. Razlog je v slabši dekalcinaciji masivnejših skeletnih delov v primerjavi s prsti. Na preparatih prsta so lepše vidne linije zavrte rasti, prav tako ti preparati niso imeli razpok. Tudi barvanje je bilo uspešnejše pri prstkih, saj so se linije obarvale temneje. Ugotovili smo, da je barvanje 1 minuto premalo.

Skeletne elemente prstov sekulj smo pripravili po klasični metodi. Za to metodo smo se odločili tudi zato, ker smo mislili, da so razpoke morda nastale pri zamrzovanju tkiv. Dekalcinirali smo na isti način, 5 ur dekalcinacije z EDTA v mikrovalovni pečici pri 50 °C. V tem postopku smo tudi dehidracijo izvajali v mikrovalovni pečici. Vzorci so se slabše rezali, vendar pa je morfologija osrednjega dela kosti dobro ohranjena. V mozgovni votlini so vidne celice kostnega mozga in maščobne celice. Vidne so tudi temnejše linije zavrte rasti, prav tako je vidna meja med periostalnim in endostalnim delom kosti. Vseeno pa bi bila potrebna še daljša dekalcinacija za boljše preparate. Ugotovili smo, da se pri infiltraciji v paraplant bolje režejo tiste rezine, ki so bile dalj časa v paraplantu.

Na osnovi dobrih izkušenj drugih avtorjev (Esteban s sod., 1996; Castanet s sod., 1996; Plytycz in sod., 1995; Castanet s sod., 2000; Measey, 2000; Kumbar in Pancharatna, 2001; Khonsue s sod., 2000; Trenhams sod., 2000; Cogalniceanu in Miaud, 2003; ...) ter zaradi težav z nezadostno dekalciniranimi tkivi z EDTA, smo se odločili za dekalcinacijo z dušikovo kislino. Uporabili smo 5 % dušikovo kislino. Dušikova kislina se za dekalcinacijo uporablja že od konca 19. stoletja in je po mnenju mnogih avtorjev veljala za sredstvo, ki najbolje ohrani mikroskopsko anatomijo tkiv. Poleg tega deluje tudi zelo hitro. Najbolj priporočljiva koncentracija po Schaffer – ju je 5 do 7,5 % dušikova kislina (Gabe, 1976).

Pripravili smo preparate tako po klasični metodi, kot tudi zamrznjene rezine. Zaradi različne velikosti tkiv smo poskušali z različnimi časi dekalcinacije, prstke smo dekalcinirali 1 – 3 ure, večje kosti kot so femurji pa 4 – 7 ur. Ugotovili smo, da je dekalcinacija uspešnejša, če smo predhodno odstranili mišice in kosti, saj je imel tako dekalcinacijski agens lažji dostop do kostnega materiala.

Vzorci, sekulj, ki smo jih dekalcinirali z dušikovo kislino le eno uro, so se slabo rezali, precej bolje so se obnesli vzorci dekalcinirani dve in tri ure. Podaljšali smo tudi čas infiltracije v paraplastu, tako da je medij bolje prepojil dekalcinirano kostno tkivo. Zamrznjene rezine so se po triurni dekalcinaciji lepo rezale. Paziti pa moramo, da vzorec počasi vstavljamo v tekoči dušik, saj lahko drugače prehitro zamrzne in lahko vzorec popoka.

Kosti blatnih kužkov in močerilov smo različno dolgo dekalcinirali. Ker so močerili manjši in imajo tanjše kosti, smo femur sprva dekalcinirali 4 ure, prstke pa 2 uri. Težav pri rezanju femurja nismo imeli, tudi letnice so lepo vidne. Pri nekturu se je izkazalo, da je dveurna dekalcinacija prstkov zadostna pri manjših osebkih, medtem ko je bila triurna dekalcinacija premalo za tibiofibulo ter peturna premalo za femur, saj so bila ta tkiva dosti večja od tkiv pri močerilu. Dekalcinacijo smo tako podaljšali na 7 ur, težav pri rezanju ni bilo. Poskušali pa smo tudi različne čase dekalcinacij pri močerilu, 5, 6 in 7 ur. Vzorci so se dobro rezali tako pri 5 urah kot tudi pri 6 in 7 urah, razen pri enem osebku (P176) so bili preparati slabši. Pri manjših osebkih smo dekalcinirali prstke 2 uri, pri večjih pa 3 ure. Pri močerilih je najboljši čas dekalcinacije od 4 do 5 ur. Pripravili smo tudi zamrznjene rezine nektura, linije zavrtega nalaganja so dobro vidne.

Pri nekturih se je izkazalo, da se letnice lepo vidijo tako pri femurjih kot pri prstkih in bi verjetno lahko uporabljali za oceno starosti pri tej vrsti le skeletne dele prstkov, vendar mi žal nimamo dobre primerjave med temi deli ekstremitet pri istem osebku.

Iz naših rezultatov je razvidno, da so bile najboljše rezine za skeletokronološko analizo, tiste, katerih tkiva so bila dekalcinirana s 5 % dušikovo kislino. Pri uporabi EDTA je bila

dekalcinacija nezadostna pri večini tkiv, še najboljše so se dekalcinirali prstki. Dekalcinacijo z EDTA bi bilo potrebno podaljšati.

Če primerjamo postopke priprave histoloških preparatov za ocenjevanje starosti osebkov, ima postopek priprave zamrznjenih rezin prednosti, saj je enostavnejši in hitrejši. Klasična priprava tkiv do rezanja preparatov je daljša, saj je tkiva potrebno še dehidrirati ter infiltrirati v parafinu, kar traja približno 5 dni. Če upoštevamo še rezanje, barvanje rezin in na koncu mikroskopiranje ter slikanje preparatov je potrebno vsega skupaj 8 dni. Pri pripravi zamrznjenih rezin je postopek krajši, saj po dekalcinaciji vzorce spiramo le dve uri in nato tkivo zamrznemo v tekočem dušiku ter lahko začnemo z rezanjem. Skupaj z barvanjem in fotografiranjem traja celoten postopek 4 do 5 dni. Klasična priprava rezin bolje ohranjeni morfologijo kosti.

Pri pripravi preparatov za štetje linij zavrte rasti (LAG – ov) je prav tako pomembno tudi barvanje. Barvanje 1 minuto je prekratko, saj se preparati skoraj nič ne obarvajo. Prav tako pri predolgem barvanju dobimo pretemne preparate in so linije, še posebej na periferiji, slabše vidne. Ustrezno je barvanje 3 minute.

4.1.2 Linije zavrte rasti

Linije zavrte rasti so rezultat genetsko kontroliranega cikla rasti, ki je močno sezonsko podkrepjen in sinhroniziran (Castanet, 1982 cit. po Esteban s sod., 1996). Pri dvoživkah v zmernih klimatih se linije zavrte rasti v kostnem materialu nalagajo zaradi sezonske dinamike, menjavanja toplih in hladnih temperatur ali deževne in sušne dobe, ki vplivajo na prehranjevanje (Wake in Castanet, 1995; Cogalniceanu in Miaud, 2003). Vendar pa nastajanje LAG – ov ni samo posledica sezonskih sprememb, ampak tudi notranjih bioloških ritmov, na kar lahko naletimo pri tropskih vrstah, ki so aktivne celo leto in ne hibernirajo (Guarino s sod., 1998 cit. po Rozenblut in Ogielska, 2005; Kumbar in Pancharatna, 2001). V primerjavi z vrstami iz zmernih klimatov imajo tiste, ki živijo v bolj konstantnih pogojih, kot so npr. tropi manj jasno izražene linije zavrte rasti (Khonsue s sod., 2000; Hernandez in Seva, 1985 cit. po Esteban s sod., 1996; Esteban s sod., 1996).

V dolgih kosteh močerilov in nekturov smo našli izrazite linije zavrte rasti. Pri nekturu smo LAG-ge pričakovali, saj naseljuje površinske vode in je izpostavljen tako temperaturnim spremembam, kot tudi pomanjkanju hrane v zimskem obdobju. Pri močerilih, ki živijo v dokaj stabilnih jamskih pogojih, temperatura je čez celo leto med 8 do 10 °C izrazitih linij zavrte rasti nismo pričakovali. Dejavnik, ki je v jamskem habitatu dokaj variabilen je hrana. Nalaganje LAG-ov pri močerilu je lahko odraz pomanjkanja hrane v določenem obdobju tekom leta. Dokazano je, da se že tako ali tako značilno počasen metabolizem močerilov med stradanjem še dodatno upočasni (Hervant s sod., 2000), kar bi se torej lahko odražalo tudi v nalaganju kostnega materiala. Pri jamski populaciji pirenejskih evproktov *Euproctus asper*, za katere je poznano, da nimajo zimske dormance in da so aktivni čez celo leto (Clergue – Gazeau, 1971 cit. po Miaud in Guillaume, 2005), razlagajo prisotnost LAG-ov z redukcijo hranjenja v zimskem obdobju (v tem obdobju je nižja aktivnost tako evproktov, kot tudi potencialnega plena) (Miaud in Guillaume, 2005). Navkljub relativno konstantnim temperaturnim pogojem v jamskem okolju je hranjenje z vodnim plenom v zimskem obdobju močno reducirano in vodi v izgubo telesne teže osebkov (Clergue – Gazeau, 1971 cit. po Miaud in Guillaume, 2005). Prisotnost LAG-ov pri ektotermnih živalih, ki živijo v relativno konstantnih naravnih okoljih (Pancharatna s sod., 2000 cit. po Miaud in Guillaume, 2005) ali pa v kontroliranih laboratorijskih pogojih (Castanet, 1985 cit. po Miaud in Guillaume, 2005), kaže na notranjo ritmiko, ki je sinhronizirana in ojačana s sezonskimi cikli. LAG-i pri močerilu bi lahko nastali tudi v obdobju razmnoževanja, saj se osebki med razmnoževanjem nehajo prehranjevati in bi se zato ciklusno pojavile linije zavrtega nalaganja kostnega materiala.

Za razliko od močerilov, kjer so bili prsti v primerjavi s femurji še slabo osificirani, smo pri nekturih v prstnih členkih in femurjih našli dokaj podobno število LAG-ov. Žal ne moremo z gotovostjo trditi, da se število LAG-ov v prstih in femurjih nekturov ujema, saj so bili vzorci femurjev pri tistih osebkih, kjer smo želeli primerjavo narediti, v diafiznem delu slabo pregledni, tako da se vseh linij ni dalo prešteti. Pri večini osebkov smo rezali samo femurje in primerjave s prsti žal nismo imeli. Pri sekuljah smo imeli le skeletne dele prstov, tako, da nismo mogli primerjati različne dele kosti med sabo, vendar so bile linije zavrtega nalaganja lepo vidne in prisotne pri vseh naših vzorcih. Primerjalne študije dolgih

kosti ekstremitet in prstnih členkov brezrepcev so potrdile uporabnost prstnih členkov za skeletokronološke raziskave (Kumbar in Pancharatna, 2001, Khonsue s sod., 2001, Erismis s sod., 2002). Npr. pri vrsti *Microhyla ornata* so primerjali različne kosti ekstremitet vključno s prsti in ugotovili, da se pri 5 od 6 žab število LAG – ov ujema pri vseh kosteh (Kumbar in Pancharatna, 2001). Kar kaže na več kot 90% zanesljivost skeletokronologije pri prstih. Pri študiji *Rana bedriagae* v Turčiji so uporabili femur in drugi prst zadnje ekstremitete ter primerjali med sabo (Erismis s sod., 2002). V obeh primerih so rezali v centralnem diafiznem delu. Ugotovili so, da se histološka struktura obeh, femurja in drugega prsta sorazmerno ujemata in sta tako oba dela uporabna za določanje starosti. Pri primerjavi različnih prstnih členkov vrste *Rana nigromaculata* so ugotovili, da je najbolj ustrezen za skeletokronologijo tretji členek, zaradi okrogle oblike in minimalne stopnje resorbcije (Khonsue s sod., 2001). Pri primerjavi različnih prstov pri istem osebkku nektura smo opazili razlike v številu linij zavrte rasti. Prvi, manjši prst je imel več hrustančnega tkiva in manj linij zavrte rasti kot pa tretji prst, ki je pri nekturih največji.

Prsti močerilov so slabo osificirani in za skeletokronologijo žal niso uporabni. Slabšo osteogenezo in lamelarno strukturiranost prstov navajajo za brezpljučarje *Plethodontidae* vsled relativno majhne velikosti nog v primerjavi s telesom (Castanet s sod., 1996). Pri repatih dvoživkah se stopnja osifikacije, tip kosti in izrazitost linij zavrte rasti razlikuje na nivoju družin (Castanet s sod., 1996). Med vsemi vrstami repatih dvoživk na katerih je bila narejena skeletokronološka analiza, so rastne linije histološko najmanj izražene pri družini brezpljučarjev *Plethodontidae*. Odkrili so tudi razlike v izrazitosti linij med različnimi vrstami rodu *Desmognathus*, kar bi lahko bila posledica genetske komponente tvorbe linij zavrte rasti.

Pri močerilih in tudi nekturih so bile rastne linije v perifernem delu kosti zgoščene. Poznano je, da je začetna rast mlajših osebkov hitrejša, s starostjo pa upade, zato so linije v perifernem delu kost bolj skupaj. Zgostitev linij v perifernem delu je tudi izrazitejša pri vrstah, ki dosežejo večje starosti, s tem pa je štetje linij v perifernem delu pri starejših osebkih oteženo, kar lahko privede do podcenjevanja starosti. (Esteban s sod., 1996). Pri nekturih, kjer smo našli manjše število LAG-ov so se le ti vrstili v večjih in dokaj enakomernih presledkih. Raziskava pri nekturih je pokazala, da je rast nekturov dokaj hitra

prvih osem ali devet sezon, s spolno zrelostjo (dosežejo jo med sedmim in osmim letom) pa se rast upočasni (Senning, 1940). Avtor tudi ugotavlja, da je pri nekturih težko določati starost osebkov starejših od 16 let. Prav tako je tudi mnenja, da med senescenco morda niso zabeležene vse linije upočasnjene rasti.

Tako pri močerilih kot tudi pri nekturih smo opazili dvojne linije, ki so bile pri močerilih pogosteje zastopane. Nastanek dvojnih linij pri dvoživkah razlagajo vsled dvojnih letnih ciklov (Smirina, 1994). Npr. pri marmornatem pupku *Triturus marmoratus*, ki živijo v mediteranskem podnebjju pripisujejo dvojne in celo trojne linije zimskemu mirovanju ter redukciji aktivnost v najbolj vročih poletnih mesecih, ko se ribniki osušijo (Jakob s sod., 2002). Razen dvojnih linij so pri teh pupkih opazili tudi vmesne, dodatne ali lažne linije, ki prav tako nastanejo tekom ene sezone in lahko ovirajo štetje pravih linij zavrte rasti. Lažne, vmesne linije so pogosto prisotne tudi pri kalifornijskih tigrastih aksolotlih *Ambystoma californiense*, te linije so svetlejše od pravih in so pretrgane (Trenham s sod., 2000). Tudi v našem primeru smo pri nekaterih vzorcih močerilov, nekturov in tudi prstov sekulj opazili vmesne linije, ki so šibkejše in slabše vidne od ostalih ter ne potekajo koncentrično okoli celotne kosti. Pri sekuljah so vmesne linije vidne le v periostalnem delu kosti.

Pri primerjavi števila LAG-ov v različnih regijah kosti, smo največ LAG - ov našli v osrednjem delu diafize. V proksimalnem in distalnem delu diafize ter v epifizii je bilo število linij zavrte rasti bistveno manjše. Pri oceni starosti je pomembno, da štejemo linije zavrte rasti na sredini diafize, saj je tam kostnega tkiva največ, prav tako so vidne vse linije zavrte rasti (Marnell, 1997, Rozenblut in Ogielska, 2005). V procesu nalaganja kostnega materiala pri dvoživkah je periost odgovoren za longitudinalno in radialno rast. Tako je prva linija zavrte rasti prisotna le v sredini 25-35% dolžine diafize. Uporabna je torej le sredina diafize za pravilno oceno starosti osebkov (Rozenblut in Ogielska, 2005).

Pri prstih sekulj je prisotna periostalna in endostalna kost, meja med njima je vidna kot vrzel. Vrzel nastane vsled različne kvalitete kostnega tkiva in verjetno ustreza Kastschenkovi liniji (Rozenblut in Ogielska, 2005). Pri nekturih in močerilih endostalnega dela nismo opazili. Tudi v literaturi nismo zasledili podatka o prisotnosti endostalne kosti pri repatih dvoživkah, razen pri alpskem velikem pupku *Triturus cristatus* (Francillon,

1980 cit. po Rozenblut in Ogielska, 2005). Endostejska kost je najverjetneje značilnejša predvsem za brezrepce. Endostalno kostno tkivo se tvori centrifugalno, od mozgovne votline navzven in se ponavadi prvič pojavi po drugi hibernaciji (Rozenblut in Ogielska, 2005). Pri brezrepcih je pomembno, da za oceno starosti, upoštevamo linije zavrte rasti le iz enega dela kostnega tkiva. Ponavadi se uporablja periostalni del, saj je bolj pregleden, endostalni del pa ni vedno prisoten oziroma lahko ima manj linij zavrte rasti, kar je posledica resorpcije kostnega materiala. Pri sekuljah smo linije zavrte rasti šteli v periostalnem delu.

Pri največjem močerilu nismo dobili največ linij zavrte rasti (tabela 1). Prav tako pri približno isto velikih osebkih nismo dobili enakega števila LAG – ov. Pri črnih močerilih smo dobili približno enako število LAG – ov, osebka pa sta bila podobnih velikosti. Žal smo imeli za primerjavo le dva osebka (tabela 1). Pri sekulji smo dobili največ 6 LAG – ov, en izmed teh osebkov je bil tudi največji (tabela 3). Najmanjši osebek ni imel najmanj LAG – ov. Za nekture žal nismo imeli podatkov o velikosti, ampak samo teže osebkov. Pri najtežjem osebku smo našteali največ LAG – ov, najlažji osebek pa je imel najmanjše število LAG – ov (tabela 2). Pri ostalih osebkih je bilo število LAG – ov zelo raznoliko. Rezultati kažejo na zelo individualno rast osebkov. Razlike v individualni rasti ter prekrivanje starostnih razredov je bilo dokazano za nekture (Senning, 1940). Tudi znotraj starostnega razreda rast osebkov močno variira. Včasih je veljalo prepričanje, da sta velikost in starost dvoživk in plazilcev v korelaciji, vendar pa so študije pokazale, da to ne drži (Marnell, 1998; Khonsue s sod., 2000; Wake in Castanet, 1995; Trenham s sod., 2000; Rozenblut in Ogielska 2005). Na stopnjo rasti močno vpliva temperatura. Pri pupkih *Triturus viridescens* so eksperimentalno dokazali, da se kvantiteta zaužite hrane povečuje s temperaturo, kar pa vpliva na samo rast živali (Springer, 1909 cit. po Senning, 1940) Raziskava, ki so jo naredili na krastači *Bufo pardalis* je pokazala, da je velikost zelo slab kazatelj starosti ter da samice rastejo hitreje kot samci (Cherry in Francillon – Vieillot, 1992). Hitrejša rast samic kot samcev je značilna za brezrepce, čeprav so tudi izjeme, kot npr. *Scaphiopus holbrooki* (Pearson, 1955 cit. po Cherry in Francillon – Vieillot, 1992). Pri vrsti *Rana temporaria* so opazili, da se kažejo razlike med populacijami v odvisnosti od okolja – hitrost rasti med spoloma je podobna na Skandinaviji (Loman, 1978 cit. po Cherry in Francillon – Vieillot, 1992), na Irskem pa samice rastejo hitreje kot samci (Gibbons in

McCarthy, 1984 cit. po Cherry in Francillon – Vieillot, 1992). Raziskava ocene starosti pri rodu *Desmognathus* je pokazala, da je velikost osebkov zanesljiva le do spolne dozoritve (Castanet s sod., 1996). Po spolni dozoritvi se starostni razredi široko prekrivajo.

Pri vseh pregledanih vzorcih močerila in nektura je bil osrednji del kosti še hrustančen, medtem ko je pri sekuljah že prisotna mozgovna votlina s kostnim mozgom in posameznimi maščobnimi celicami. Za brezrepce je poznano, da že ob koncu metamorfoze kostno tkivo nadomesti primarno larvalno kost (Rozenblut in Ogielska, 2005).

Pri močerilu poznane starosti, ki se je izlegel v jamskem laboratoriju v Tularju, star je bil 13 let, je bil femur skoraj v celoti hrustančen, kostnega tkiva je bilo malo, nakazan je bil le 1 LAG v diafiznem delu kosti. Osebek je živel v ujetništvu in je bil redno hranjen, torej LAG naj ne bi nastal zaradi pomanjkanja hrane. Rezultati naše raziskave kažejo tudi na to, da se kostno tkivo pri močerilih prične nalagati zelo pozno in morda celo sovпада s spolno zrelostjo živali. Glede na to, da močerili spolno dozoriijo okoli 14 leta, bi lahko rekli, da osifikacija prične tik pred spolno zrelostjo. Pri brezrepcih se pojavijo prvi procesi osifikacije hrustančnega primordija že v larvalnem obdobju. (Rozenblut in Ogielska, 2005). Pri oceni starosti močerilov, bi torej morali upoštevati tudi pozno osifikacijo skeleta.

Zaradi iznajdljivosti in praktične vrednosti se skeletokronologijo uporablja kot rutinsko metodo za oceno starosti dvoživk. Vendar pa je pri interpretaciji nujno poznati osnovne procese nalaganja kostnega materiala, ki variira znotraj različnih vrst dvoživk, prav tako pa je potrebno upoštevati tudi različne okoljske vplive. Napačne rezultate lahko dobimo zaradi nerazumevanja histologije kosti in napačni interpretaciji dinamike rasti oziroma nalaganja kostnega materiala. Še posebej pazljivi moramo biti na linije zavrte rasti v endostalnem delu, ki se pomotoma pogosto dodajo h kronološki sekvenci periostalnega dela kosti in tako dobimo napačno oceno starosti (Castanet in Smirina, 1990).

Pri proteusu bi bilo priporočljivo preizkusiti še kakšno drugo metodo za ocenjevanje starosti kot je npr. aminokislinska racemizacija, kjer bi za oceno potrebovali le zob osebka in ne bi bilo potrebno žrtvovati živali.

4.2 SKLEPI

- Dekalcinacija s 5% dušikovo kislino je primernejša. Najprimernejši čas dekalcinacije za prstne členke je 2 do 3 ure, 4 do 5 ur za femurje močerilov ter 7 ur za femurje nekturov. Postopek priprave zamrznjenih rezin ima prednosti, saj je enostavnejši in hitrejši. Pri dekalcinaciji z EDTA je možna uporaba mikrovalovne tehnike, vendar bi morali dekalcinacijo podaljšati.
- Linije zavrte rasti so prisotne tako pri močerilu kot pri nekturu in so pri obeh izrazite. Pri močerilu so prstni členki slabše osificirani, linije so slabo vidne in jih je manj kot pa v femurju. Prstni členki močerila niso primerni za oceno starosti.
- Za skeletokronološko oceno starosti je ustrezen osrednji diafizni del, saj so vidne vse linije zavrte rasti.
- Pri močerilu in nekturu nismo opazili endostalnega dela kosti, medtem ko sta pri sekulji prisotna tako periostalni kot endostalni del.
- Velikost ni zanesljiv podatek o starosti živali, saj se pojavljajo razlike v individualni rasti, prav tako se pojavljajo razlike med populacijami.
- Linije zavrte rasti so pri močerilih in nekturih na periferiji bolj nagosto, kar kaže na počasnejšo rast s starostjo.
- Pri močerilih in nekturih smo opazili pojavljanje dvojnih linij, kar bi lahko bila posledica dvojnih letnih ciklov. Pri vseh treh predstavnikih pa smo opazili vmesne linije, ki so šibkejšje in ne potekajo okoli celotnega prereza kosti.
- Osifikacija okončin pri močerilu nastopi pozno. Pri osebku znane starosti (13 let) je bilo malo kostnega tkiva, nakazana je bila ena linija zavrte rasti.

5 POVZETEK

Na mnogih področjih zooloških raziskav je znana starost proučevanih osebkov različnih vrst vretenčarjev pomemben podatek, pa najsi gre za morfološke, fiziološke, ekološke študije, študije starostne strukture populacij in druge vrste proučevanj. Natančnejša ocena starosti živali je tudi osnova za raziskave rasti in razvoja živali.

Ena od sodobnejših metod za oceno starosti dvoživk in plazilcev je skeletokronologija, ki sloni na štetju plasti naloženega materiala v kalcificiranih tkivih. Najbolj primerni so skeletni deli sprednjih in zadnjih ekstremitet in sicer osrednji, diafizni deli dolgih kosti, kot tudi prstni členki. Štetje linij zavrte rasti v prstnih členkih se je pri anurih izkazalo za primerno, razen tega pa pomeni neinvazivno metodo za osebke, saj živali pri tem ni potrebo žrtvovati. Predpogoj za uporabnost skeletokronologije za oceno starosti osebkov je dobro pokosteneli skelet.

Pri dvoživkah in plazilcih je letno nalaganje kostnega materiala neenakomerno in odraža sezonske spremembe v intenzivnosti rasti živali. Spomladansko-poletna perioda rasti se izkazuje v širokem pasu novo naloženega kostnega tkiva (MSG – mark of skeletal growth), jesensko-zimski zaostanek rasti izkazuje ozko linijo mirovanja (LAG – line of arrested growth) (Castanet, 1977 cit. po Smirina, 1994; Smirina, 1994).

Nalaganje kostnega materiala v dolgih kosteh in prstnih členkih pri močerilu še ni bilo raziskano. Želeli smo ugotoviti, kako vpliva specifični podzemni vodni habitat na nalaganje kostnega materiala pri močerilu in če je skeletokronologija primerna metoda za oceno njegove starosti.

Pregledali smo skeletne dele dveh vrst močerilarjev (*Proteidae*), neotenične jamske dvoživke močerila (*Proteus anguinus*) ter ameriškega površinskega sorodnika močerila, blatnega kužka (*Necturus maculosus*). V raziskavo pa smo vključili tudi prste predstavnika brezrepcev (*Anura*), in sicer sekuljo (*Rana temporaria*). Osebki močerila so bili izlovljeni na različnih lokacijah (Planinska jama, Otovski breg, Grčarske ravne, Jelševnik). Blatni

kužki so bili uvoženi iz ZDA. Prstni členki sekulje so bili vzorčeni na osebkih iz Vranje jame pri Cerkniškem jezeru. Za raziskavo smo uporabili skeletne dele zadnjih ekstremitet in sicer prstne členke, femurje ter pri nekturih še tibiofibule.

Dekalcinirali smo z EDTA in 5% dušikovo kislino. Dušikova kislina se je izkazala kot boljši dekalcinacijski agens. Najboljši čas dekalcinacije prstnih členkov je 2 do 3 ure, 4 ure za femurje močerilov ter 7 ur za femurje nekturov. Čas dekalcinacije z EDTA bi bilo potrebno podaljšati.

Pri vseh vrstah smo dobili izrazite LAG – e. Prsti močerilov so slabo osificirani, linije so slabše vidne in tako niso primerni za ocenjevanje starosti. Pri oceni starosti je pomembno, da štejemo linije zavrte rasti na sredini diafize, saj je tam kostnega tkiva največ, prav tako so vidne vse linije zavrte rasti (Marnell, 1997; Rozenblut in Ogielska, 2005). Prva linija zavrte rasti je prisotna le v sredini 25-35% dolžine diafize.

Rezultati kažejo na zelo individualno rast osebkov. Pri največjem močerilu nismo dobili največ linij zavrte rasti. Razlike v individualni rasti ter prekrivanje starostnih razredov je bilo dokazano za nekture (Senning, 1940). Tudi znotraj starostnega razreda rast osebkov močno variira.

Začetna rast mlajših osebkov je večja, s starostjo pa upade, zato so linije v perifernem delu bolj skupaj. Pri vrstah, ki dosežejo večje starosti, je zato štetje linij oteženo pri starejših osebkih (Esteban s sod., 1996). Pri nas se je to pokazalo predvsem pri močerilu.

Pri močerilih in tudi nekturih smo opazili dvojne linije, ki so bile pri močerilih pogostejše. Nastanek dvojnih linij pri dvoživkah razlagajo v povezavi z dvojnimi letnimi cikli (Smirina, 1994). Pri nekaterih vzorcih močerilov, nekturov in sekulj so bile vidne tudi vmesne linije, ki so šibkejše in slabše vidne od ostalih ter ne potekajo koncentrično okoli celotne kosti.

Pri določanju ocene starosti je pomembno, da upoštevamo linije zavrte rasti le iz enega dela kostnega tkiva. Ponavadi se uporablja periostalni del, saj je bolj pregleden, endostalni

del pa ni vedno prisoten oziroma lahko ima manj linij zavrte rasti, kar je posledica resorpcije kostnega materiala. Endostalno kostno tkivo se tvori centrifugalno, od mozgovne votline navzven in se ponavadi prvič pojavi po drugi hibernaciji (Rozenblut in Ogielska, 2005). Periostalno in endostalno kost smo opazili pri prstih sekulj, medtem, ko pri nekturih in močerilih endostalnega dela ni. Pri sekulji smo linije zavrte rasti šteli le v periostalnem delu kosti. Pri močerilih in nekturih je osrednji del nog še hrustančen. Prstni členki močerilov so slabo osificirani. Pri sekuljah pa so prstni členki v celoti koščeni, na sredi je tudi že mozgovna votlina.

Osifikacija okončin pri močerilu nastopi pozno, morda celo sovpada s spolno zrelostjo živali. Pri osebku znane starosti (13 let) je bilo malo kostnega tkiva, nakazana je bila ena linija zavrte rasti.

Prstni členki za skeletokronološko oceno starosti niso primerni, saj so slabo osificirani. Predlagamo, da se za oceno starosti preveri še metoda aminokislinske racemizacije. Pri tej metodi živali ni potrebno žrtvovati, analiza se opravi na zobnem materialu.

6 VIRI

6.1 CITIRANI VIRI

1. Bulog B., Bijak Mali L., Kos M., Mihajl K., Prelovšek P. M., Aljančič G. 2000. Biologija in funkcionalna morfolologija človeške ribice (*Proteus anguinus*, Amphibia, Caudata). ABS, Acta biologica Slovenica , 43, 3: 85 – 102.
2. Castanet J., Smirina E. 1990. Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. Annales des Sciences Naturelles, Zoologie 13, 11: 191 – 196.
3. Castanet J., Francillon – Vieillot H., Bruce R. C. 1996. Age estimation in desmognathine salamanders assessed by skeletochronology. Herpetologica, 52 (2): 160 – 171.
4. Cherry M. I., Francillon – Vieillot H. 1992. Body size, age and reproduction in the leopard toad, *Bufo pardalis*. J. Zool., Lond. 228: 41 – 50.
5. Cogălniceanu D., Miaud C. 2003. Population age structure and growth in four syntopic amphibian species inhabiting a large river floodplain. Can. J. Zool. 81: 1096 – 1106.
6. Duellman W. E., Trueb L. 1986. Biology of Amphibians. McGraw Hill Book Company. New York. 264 – 265.
7. Erismis U. C., Kaya U., Arıkan H. 2002. Observations on the Histomorphological Structure of Some Long Bones of the Water Frog (*Rana bedrigae*) from the Izmir Area. Turk. J. Zool. 26: 213 – 216.
8. Esteban M., Garcia – Paris M., Castanet J. 1996. Use of bone histology in estimating the age of frogs (*Rana perezi*) from a warm temperate climate area. Can. J. Zool. 74: 1914 – 1921.
9. Gabe M. 1976. Histological techniques. Springer – Verlag (New York Heidelberg Berlin). Translated by R. E. Blackith. Department of Zoology, Trinity College, University of Dublin, Ireland: 1106str.

10. Hervant F., Mathieu J., Durand J. P. 2000. Metabolism and circadian rhythms of the European blind cave salamander *Proteus anguinus* and a facultative cave dweller, the Pyrenean newt (*Euproctus asper*). *Can. J. Zool.* 78: 1427 – 1432.
11. Jakob C., Seitz A., Crivelli A. J., Miaud C. 2002. Growth cycle of the marbled newt (*Triturus marmoratus*) in the Mediterranean region assessed by skeletochronology. *Amphibia – Reptilia* 23: 407 – 418.
12. Khonsue W., Matsui M., Misawa Y. 2000. Age Determination by Skeletochronology of *Rana nigrovittata*, a Frog from Tropical Forest of Thailand. *Zoological Science* 17: 253 – 257.
13. Khonsue W., Matsui M., Hirai T., Misawa Y. 2001. A Comparison of Age Structures in Two Populations of a Pond Frog *Rana nigromaculata* (Amphibia: Anura). *Zoological Science* 18: 597 – 603.
14. Kiernan J. A. 1990. *Histological & histochemical Methods: Theory & Practice*. 2nd edition. Pergamon press.
15. Kumbar S. M. K., Pancharatna K. A. 2001. Determination of age, longevity and age at reproduction of the frog *Microhyla ornata* by skeletochronology. *J. Biosci.* 26, 2: 265 – 270.
16. Kusano T., Fukuyama K., Miyashita N. 1995. Age determination of the Stream Frog, *Rana sakuraii*, by Skeletochronology. *Journal of Herpetology* 29, 4: 625 – 628.
17. Marnell F. 1997. The use of phalanges for age determination in the smooth newt, *Triturus vulgaris* L. *Herpetological Journal* 7: 28 – 30.
18. Marnell F. 1998. A Skeletochronological Investigation of the Population Biology of Smooth Newts *Triturus vulgaris* L. at a Pond in Dublin, Ireland. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy* 98B, 1: 31 – 36.
19. Measey G. J. 2000. Growth and ageing of feral *Xenopus laevis* (Daudin) in South Wales, U. K. *J. Zool., Lond.* 254: 547 – 555.
20. 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): 241 – 249.

21. Parham J. F., Dodd C. K., Zug G. R. 1996. Skeletochronological Age Estimates for the Red Hills Salamander, *Phaeognathus hubrichti*. *Journal of Herpetology* 30, 3: 401 – 404.
22. Plyzycz B., Mika J., Bigaj J. 1995. Age – Dependent Changes in Thymuses in the European Common Frog, *Rana temporaria*. *The journal of experimental zoology* 273: 451 – 460.
23. 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.
24. Senning W. C. 1940. A study of age determination and growth of *Necturus maculosus* based on the parasphenoid bone. *American Journal of Anatomy* 66: 483 – 494.
25. Smirina E. M. 1994. Age Determination and Longevity in Amphibians. *Gerontology* 40: 133 – 146.
26. Trenham P. C., Bradley Shaffer H., Koenig W. D., Stromberg M. R. 2000. Life History and Demographic Variation in the California Tiger salamander (*Ambystoma californiense*). *Copeia*, 2: 365 – 377.
27. 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.

6.2 DRUGI VIRI

- bioge.ubbcluj.ro/vivariu/rana.htm
- Hemelaar A.1985. An Improved Method to estimate the Number of Year Rings resorbed in Phalanges of *Bufo bufo* (L.) and its Application to Population from Different Latitudes and Altitudes. *Amphibia – Reptilia*, 6, 4:323 – 341.
- http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Necturus_maculosus
- http://www.first-nature.com/amphibians/rana_temporaria.htm
- Novak J. 2004. Morfološka analiza jeter pri blatnem kužku (*Necturus maculosus*, Amphibia: Urodela). Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana.
- Pistotnik M. 2002. Določanje starosti pri navadnem polhu (*Glis glis*) na osnovi rastnih plasti kostnega tkiva v spodnji čeljustnici. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana.
- Staniša: histološke tehnike, Inštitut za patologijo.
- www.digimorph.org/.../mudpuppy.phtml
- www.scq.ubc.ca/?p=229
- www2.pms-lj.si/najpred/proteus.html

7 ZAHVALA

Najlepša hvala Tadeji Herzog in dr. Petri Maji Prelovšek za prve korake in koristne nasvete.

Prisrčna hvala tudi mentorju prof. dr. Borisu Bulogu in somentorici dr. Lilijani Bizjak Mali za vso pomoč in zaupanje.

Zahvaljujem se tudi ostalim sodelavcem na Katedri za zoologijo in vsem, ki so kakorkoli pomagali pri izdelavi diplomske naloge.

Nenazadnje hvala tudi Roku, staršem, sestri in prijateljem za podporo in potrpežljivost.

8 PRILOGE

PROTOKOL ZA DEKALCINACIJO Z EDTA IN PRIPRAVO HISTOLOŠKIH REZIN

1. Spiranje pod tekočo vodo 24 ur
2. Dekalcinacija z EDTA v mikrovalovni pečici pri $T= 50^{\circ}\text{C}$, moč $MW= 6$, in sicer 5 x 60 min (raztopino vsako uro zamenjamo s svežo)
3. Spiranje pod tekočo vodo čez noč
4. Dehidracija z alkoholi in bistrenje z JFC
70 % etanol v mikrovalovni pri $T= 30^{\circ}\text{C}$, $MW= 6$, 1 x 5 min
100 % etanol v mikrovalovni pri $T= 30^{\circ}\text{C}$, $MW= 6$, 1 x 5 min
JFC v mikrovalovni pri $T= 40^{\circ}\text{C}$, $MW= 6$, 3 x 60 min (raztopino vsako uro zamenjamo s svežo)
5. Infiltracija v parafinu 2 uri, nato čez noč
6. Vklapljanje in rezanje z mikrotomom, debelina rezin: $7\mu\text{m}$
7. Barvanje z Weigert – ovim hematoksilinom, 3 min

PROTOKOL ZA DEKALCINACIJO Z EDTA IN PRIPRAVO ZAMRZNJENIH REZIN

1. Spiranje pod tekočo vodo 24 ur
2. Dekalcinacija z EDTA v mikrovalovni pečici pri $T= 50^{\circ}\text{C}$, moči $MW= 6$, in sicer 5 x 60 min (raztopino vsako uro zamenjamo s svežo)
3. Spiranje pod tekočo vodo 2 uri
4. Tkivo prekrijemo z zamrzovalnim medijem in zamrznemo s tekočim dušikom
5. Rezanje s kriotomom pri -20°C , debelina rezin $10\ \mu\text{m}$
6. Barvanje z Weigert – ovim hematoksilinom, 3 min

PROTOKOL ZA DEKALCINACIJO Z DUŠIKOVO KISLINO IN PRIPRAVO HISTOLOŠKIH REZIN

1. Spiranje pod tekočo vodo čez noč
2. Dekalcinacija s 5 % dušikovo kislino: od 2h do 7h - odvisno od velikosti tkiva; po potrebi preveriti uspešnost dekalcinacije z natrijevim oksalatom
3. Spiranje pod tekočo vodo čez noč
4. Dehidracija po naraščajoči alkoholni vrsti v mikrovalovni pečici pri $T = 40^{\circ}\text{C}$ in moči 450 W:

70 % etanol	2 x 10 min
96 % etanol	2 x 10 min
100 % etanol	3 x 10 min
5. Bistrenje s ksilenom 2x 60 min
6. Infiltracija v parafinu čez noč ter zamenjava in še enkrat čez noč
7. Vklapljanje in rezanje z mikrotomom, debelina rezin: $7\mu\text{m}$
8. Barvanje z Weigert – ovim hematoksilinom, 3 min

PROTOKOL ZA DEKALCINACIJO Z DUŠIKOVO KISLINO IN PRIPRAVO ZAMRZNJENIH REZIN

1. Spiranje pod tekočo vodo čez noč
2. Dekalcinacija s 5 % dušikovo kislino: od 2h do 7h - odvisno od velikosti tkiva; po potrebi preveriti uspešnost dekalcinacije z natrijevim oksalatom
3. Spiranje pod tekočo vodo 2 uri
4. Tkivo prekrijemo z zamrzovalnim medijem in zamrznemo s tekočim dušikom
5. Rezanje s kriptomom pri -20°C , debelina rezin: $10\ \mu\text{m}$
6. Barvanje z Weigert – ovim hematoksilinom, 3 min