

STRUCTURE OF MIDGUT AND PERITROPHIC MATRIX IN THE LAST INSTAR LARVAE OF *CULEX PIPPIENS* (DIPTERA: CULICIDAE)

Mehmet Salih YIKILMAZ, Önder DEVECİ*

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bornova, İzmir, TÜRKİYE
e-mail:deveci@sci.ege.edu.tr

ABSTRACT

Larval midgut and peritrophic matrix (PM) of *Culex pipiens* were investigated by light and electron microscope. Foregut and anterior midgut together form the special folding area called cardia. Cardia and gastric caeca are located in the thorax. Abdominal midgut follows the gastric caeca and lies between the first and the fifth abdominal segments. The luminal surfaces of the structures mentioned above are lined by single layered epithelial cells. However, the cell sizes and staining properties exhibit differences. The epithelial cells of the anterior midgut which are located in the cardia, produce PM. It surrounds the food bolus and lies to the end of the fifth abdominal segment. Golgi canals of midgut epithelial cells are upright to the apical membrane of the cell and the cellular organelles are seldom in peripheral cytoplasm. Electron-dense granular and electron-lucent microfibrillated layers are seen in the electron micrograph of PM. The thick microfibrillated layer is separated into three regions by electron dense bilayer

Key Words: Midgut, Peritrophic matrix, Culex pipiens, Larva, Mosquito

CULEX PIPPIENS (DIPTERA: CULICIDAE)'İN SON EVRE LARVALARINDA ORTABAĞIRSAK VE PERİTROFİK MATRİKSİN YAPISI

ÖZET

Culex pipiens'in larval ortabağırsağı ve peritrofik matriks (PM)'i ışık ve elektron mikroskopuyla incelenmiştir. Önbağırsak ve anterior ortabağırsak birlikte, kardiya olarak isimlendirilen özel bir katlanma bölgesi oluştururlar. Kardiya ve gastrik çekumlar toraksta bulunur. Gastrik çekumlardan sonra, birinci ve beşinci abdomen segmentleri arasında uzanan abdominal ortabağırsak gelir. Yukarıda sözü edilen yapıların lümenine bakan tarafları tek tabakalı epitelle döşelidir. Ancak, hücresel büyüklükleri ve boyanma özellikleri farklılık göstermektedir. Kardiyada yer alan anterior ortabağırsak hücreleri PM'i salgılar. PM, besin kitlesini çepeçevre sarar ve beşinci abdomen segmentinin sonuna kadar uzanır. Ortabağırsak epitel hücrelerindeki Golgi kanalları hücrenin apikal zarına diktir ve periferel sitoplazmada hücresel organeller azdır. PM'nin elektron mikrograflarında elektronca yoğun granüler ve elektronca az yoğun mikrofibrilli tabakalar görülür. Kalın olan mikrofibrilli tabaka ise elektronca yoğun iki tabaka tarafından üç bölgeye ayrılır.

Anahtar Kelimeler: Ortabağırsak, Peritrofik matriks, Culex pipiens, Larva, Sivrisinek

1. GİRİŞ

Sivrisinek larvalarında sindirim sistemi; ağızla başlayıp, farinks, özofagus, önbağırsak, ortabağırsak, ileum, kolon ve rektuma kadar devam eden düz bir boru şeklindedir. Ortabağırsağın anterior kısmından hemen sonra, gastrik çekum olarak isimlendirilen kese yapıları yer alır. Ön ve ortabağırsak duvarları tek sıralı epitel hücreleriyle

1. INTRODUCTION

The alimentary canal of mosquito larvae has been described by various authors. Passing backwards, the canal consists of preoral cavity, mouth, pharynx, oesophagus, foregut, midgut, ileum, colon and rectum. The pharynx, oesophagus and proventriculus (in part) collectively form the foregut (1). The proventriculus of mosquito larvae is

döşelidir (1,2).

Böcek bağırsağındaki hücresele olmayan ve besini çepeçevre saran zarımsı yapıya peritrofik membran veya peritrofik matriks (PM) denmektedir (2-10). Sivrisineklerde ve genel olarak böceklerde PM, oluşum şekline göre iki tiptir. Ergin sivrisinekteki Tip 1 PM, besin alınmasının ardından bütün ortabağırsak hücreleri tarafından oluşturulur. Bazı böcek türleriyle birlikte sivrisinek larvalarında da gözlenen Tip 2 PM ise ortabağırsağın anterioründe, kardiyaya adı verilen özel bir bölgedeki epitel hücreleri tarafından salgılanır ve bağırsak boyunca geriye doğru itilir. Larva besin alsın ya da almasın Tip 2 PM sürekli vardır (2,6,7,9,10).

Besin ve ortabağırsak epitelini arasında yer alan ve seçici geçirgen özelliğe sahip olan PM, koruyucu kütikula tabakası bulunmayan ortabağırsak epitelini, besinin mekanik etkisinden ve patojenlerin olası enfeksiyonlarından korur (3,4,7,9-12). Ayrıca PM ortabağırsak lümenini fizyolojik olarak farklı bölgelere ayırır. Besinle PM arasında kalan alana endoperitrofik saha, PM ile ortabağırsak hücreleri arasında kalan alana ise ektoperitrofik saha adı verilir (6,7,11). PM, kitin taşıyan mikrofibrillerin oluşturduğu ağısı yapının, karbonhidrat ve proteinlerden oluşmuş bir matrikse gömülmesiyle şekillenir (3,7-10).

Yurdumuzda yaygın olan *Culex* cinsi sivrisineklerin (13) erginleri fil hastalığına (Elephantiasis) neden olan *Wuchereria bancrofti*'nin en önemli vektörüdür (14-17). Sivrisineklerle savaşımın larval dönemlerde yapılması daha etkili, ekonomik ve pratik bir yoldur. Sivrisinek larvalarının ortabağırsağı ve özellikle PM, dışarıdan besinle birlikte alınabilecek olası patojenlerin ve larva mücadelesinde kullanılan biyolojik larvisitlerin doğrudan karşı karşıya geldiği yerdir. Patojenlerin ve biyolojik larvisitlerin etki mekanizmalarının anlaşılması için larval ortabağırsak ile PM'in histolojik ve sitolojik yapısının iyi bilinmesi gerekir. Bu nedenlerle çalışmanın amacı, *Culex pipiens*'in larval ön ve ortabağırsağı ile larvanın bağışıklık sisteminde önemli bir yer tutan PM'in, histolojik ve ince yapısının araştırılmasıdır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Larvaların Yetiştirilmesi

Çalışma materyali *C. pipiens*'in son evre (dördüncü evre) larvalarıdır. Doğal ortamdan toplanan *C. pipiens* yumurtaları, dindendirilmiş içme suyu bulunan uygun cam kaplara konularak embriyonik gelişimleri sağlanmıştır. Yirmidört saatten sonra açılmaya başlayan yumurtalardan çıkan larvalar, ilk evrelerinden itibaren akvaryum balık yemi ile beslenmiştir. Larvaların içinde buldukları ortam suları her gün besin verilmeden önce değiştirilmiştir. Larvalar 27±2°C sıcaklık, 14 saat aydınlık-10 saat karanlık periyodu ve %30-40 oranındaki laboratuvar ortamında yetiştirilmiştir. Dördüncü evreye gelen larvalar amaca uygun olarak histolojik ve sitolojik incelemeler için ayrılmıştır.

located in the thorax, and is formed by protrusion of the foregut into the anterior end of the midgut (2). Immediately beyond the proventriculus is the portion of midgut from which the balloon-like diverticula or gastric caeca arise (1). The wall of the foregut and midgut are lined by simple squamous epithelial cells (1, 2).

Membranous, noncellular and nonliving material that surrounds the food in the insect gut is called the Peritrophic membrane or Peritrophic matrix (PM). Traditionally insect PMs are categorized as type 1 and type 2 according to their method of formation (2-10). A type 1 PM is delaminated from the entire midgut epithelium and, in some cases, may only be formed in response to feeding and the type of meal ingested. A type 2 PM is produced by a specialized region of the anterior midgut called the cardia and forms a continuous sleeve that is always present (2, 6, 7, 9, 10).

The PM may protect the midgut epithelium from mechanical damage of food and insult from pathogens, toxins, and other damaging substances (3, 4, 7, 9-12). The PM acts as a semipermeable membrane and separates the midgut lumen into two different regions. The first region which is located between the food bolus and PM is called endoperitrophic space and the second region which is located between PM and the midgut cells, is called ectoperitrophic space (6, 7, 11). The PM is formed of a mixture of proteins, glycoproteins and proteoglycans (3, 7-10).

Culex pipiens which cause elephantiasis are widely spread in Turkey (13-17). Combating mosquitoes in the larval period is more effective, economical and practical. The midgut of larval mosquitoes and especially PM is the first place that contacts pathogens and biological larvicides. Histological and cytological structure of larval midgut and PM must be well known for understanding the mode of action of pathogens and biological larvicides. The purpose of the study is the investigation of the histological and fine structure of larval foregut, midgut and PM which is important in the immune response of insects.

2. MATERIALS and METHODS

2.1. Rearing the Larvae

Studying material is the last instar (fourth instar) larvae of *Culex pipiens*. Eggs were collected from their natural habitats. Embryonic development was completed in laboratory conditions. Larvae hatched about in one or two days. They were fed with commercial aquarium fish food. All larvae were reared in a 14hr light-10hr dark cycle at 30-40 % relative humidity and 27±2 °C. The fourth instar larvae were divided into two groups for histological and cytological observations.

2.2. Histolojik İncelemeler

Stok kültürden alınan dördüncü evre larvaların başları kesilip uzaklaştırıldıktan sonra toraks ve abdomen kısımları total olarak Sainte-Marie tespit sıvısında (18) bir gece boyunca +4°C'de tespitle bırakılmıştır. Tespit işleminin ardından örnekler alkol, ksilol ve parafin serilerinden geçirilip parafine gömülmüştür. Mikrotomla alınan 5 µm'lik kesitler hematoksilin-eosin (H-E) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir.

2.3. Sitolojik İncelemeler

Dördüncü evre larvalar dissekte edilerek ortabağırsakları çıkarılmıştır. Örnekler 0.025 M sukroz (19) içeren Karnovsky (20) tespit sıvısında +4°C'de bir gece bekletildikten sonra, fosfat tamponla hazırlanan %1'lik OsO₄ ile +4°C'de 90 dakika süre ile ikinci tespiti (21) yapılmıştır. Daha sonra etil alkol, toluol ve epon serilerinden geçirilerek Epon 812'ye gömülmüştür. Ultramikrotomla alınan 0.5-1 µm kalınlığındaki kesitler toluidin blue ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir. Gridlere alınan ince kesitler ise uranyl asetat ve kurşun sitrat (UA-KS) (22) ile boyanarak Jeol 100 C transmisyon elektron mikroskopunda incelenmiş ve mikrografları alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Ön ve Ortabağırsağın Histolojisi ile Peritrofik Matriks'in Yapısı

Dördüncü evre *C. pipiens* larvalarının boyuna kesitlerinde, toraks bölgesinde sırasıyla posterior özofagus, önbağırsak ve anterior ortabağırsağın bir araya gelerek oluşturduğu özel katlanma bölgeleri ve bu katlanma bölgelerini takip eden gastrik çekumlar gözlenmektedir. Gastrik çekumlardan sonra düzgün sıralı ortabağırsak hücreleri abdomen segmentleri boyunca devam etmektedir (Şekil 1a).

Orta bağırsağa doğru sokulan posterior özofagus bir süre düz bir şekilde devam ettikten sonra 180° lik dönüş yaparak I. katlanmayı meydana getirir. I. katlanma bölgesinin en uç kısmında kütikulanın yoğun olduğu yarım halka şeklinde bir yapı yer alır. Buraya kadar olan bölgenin içi, üzeri kütikula ile kaplı yassı epitel hücreleriyle döşelidir. Bu yapıdan sonraki epitel hücre sırasının yüksekliği artarak önbağırsak hücrelerini oluşturur. Önbağırsak hücreleri 20-25 hücrelik bir sıra oluşturduktan sonra II. katlanma bölgesinde 180° lik bir dönüş daha yapar ve 4-5 hücre sonra H-E ile koyu boyanan anterior ortabağırsak epitel hücre sırası başlar. Anterior ortabağırsak epitel hücreleri ise 15-20 hücrelik bir sıra oluşturduktan sonra gastrik çekumları oluşturmak üzere bir yay çizer (Şekil 1b).

Posterior özofagusun yassı tek sıralı epitel hücrelerinin yüzeyinde mikrovillus bulunmaz, onun yerine kütikula tabakası vardır. Birinci katlanma bölgesinde, posterior özofagus hücreleri ile önbağırsak hücreleri arasında gelişmekte olan kas demetleri ve geniş boşluklar halinde kan sinüsleri gözlenmektedir. Tek sıralı epitelden oluşan önbağırsak hücreleri II. katlanma bölgesine doğru gidildikçe kübik-prizmatikçe doğru değişen bir yükseklik farkı gösterirler. Anterior ortabağırsak hücreleri ise belirgin mikrovillusa sahip, koyu boyanmış,

2.2. Histological Methods

The head of the fourth instar larvae were removed from the body. The thorax and abdominal regions of the body were totally fixed in Sainte-Marie solution (18) for overnight at +4°C. After fixation, materials were embedded in paraffin for examination with light microscopy. 5 µm thickness sections were stained with Haematoxylin-Eosin (H-E) and investigated by light microscope.

2.3. Cytological Methods

The midgut of the fourth instar larvae were dissected and fixed in 0.025 M sucrose containing (19) Karnovsky (20) fixative overnight at +4 °C and postfixed in Millonig (21) buffer containing 1 % OsO₄ for 90 min. at +4 °C. After fixation, materials were embedded in epon 812. Thin sections were stained with uranyl acetate (UA) and lead citrate (LC) and then examined in a Jeol 100 C transmission electron microscope.

3. RESULTS

3.1. Histology of Foregut, Midgut and the Structure of PM

In longitudinal sections of the thorax region, alimentary canal forms the special folding regions that consist of posterior oesophagus, foregut and anterior midgut. These folding regions are followed by gastric caeca and abdominal midgut which line throughout from first to the fifth abdominal segments (Fig. 1a).

The posterior oesophagus invaginates to anterior midgut, lines straightly up to the first folding point and then turns 180°. There is a ring made by cuticle on the corner of the first folding point. Up the first folding point, is the region lined by simple squamous type epithelial cells which are covered by the cuticle. This folding point is followed by foregut cells and the height of the foregut cells increase. Approximately 20-25 foregut cells line straightly then turn again 180° to make the second folding point. After that point, the following area consists of two regions. The first one is the end part of the foregut that has approximately 4-5 cells and the second part is the anterior midgut that has approximately 15-20 cells. The epithelial cells of the anterior midgut are stained dark with H-E (Fig. 1b, c).

Single layered squamous epithelial cells of posterior oesophagus has a layer of cuticle instead of microvilli. The cuticle protects the oesophageal cells from the mechanical effects of foods and infections of pathogens. Developing muscle cells and blood sinus are located between the oesophagus and the foregut in the first folding region. Single layered foregut cells vary from cuboidal to columnar up to the second folding point. Single layered and columnar anterior midgut cells are darkly stained and have microvilli. Foregut and anterior midgut cells together form cardia, and anterior midgut cells release PM that are seen as a thin layer (Fig. 1b, c). Immediately beyond the

silindirik tek sıralı epitel hücreleridir. Önbağırsak ve anterior ortabağırsak epitel hücreleri, birlikte kardiya bölgesini oluşturur ve anterior ortabağırsak epitel hücrelerinin salgısı sonucu oluşan PM, ince bir bant halinde gözlenir (Şekil 1b,c).

Toraks bölgesinin büyük bir kısmını kaplayan gastrik çekumlar, boyuna kesitlerde iki (Şekil 1a), enine kesitlerde ise sekiz adet (Şekil 2a) olarak gözlenir. Değişik görünüşteki gastrik çekum hücreleri anterior ortabağırsak hücrelerine oranla daha iridir ve daha uzun mikrovillusları vardır (Şekil 2b). Gastrik çekumlardan sonra gelen abdominal ortabağırsak hücreleri, birinci ve beşinci abdomen segmentleri arasında devam eder. Birinci ve üçüncü abdomen segmentlerine dahil olan ortabağırsak hücreleri boyuna kesitlerde en ve yükseklikleri birbirine eşit olarak görülürken (Şekil 3), enine kesitlerde boyları yüksekliklerinden daha uzun, yassı hücreler olarak görülürler (Şekil 4a). Üçüncü abdomen segmentinden sonra ortabağırsak hücrelerinin morfolojileri yavaş yavaş değişir. Giderek irileşen hücrelerin mikrovillusları da uzar. Boyuna ve enine kesitlerde bu değişim gözlenmektedir (Şekil 3, 4b).

Kardiya bölgesindeki anterior ortabağırsak hücreleri tarafından salgılanan PM, gastrik çekumların hemen altından toraksı geçerek abdomen segmentlerine ulaşır ve bağırsak lümenindeki besin içeriğini çepeçevre sarar. PM, boyuna (Şekil 1c, 3) ve enine kesitlerde (Şekil 2a, 4a,b) besinle ortabağırsak epiteli arasında ince bir çizgi şeklinde gözlenir. Orijini kardiya bölgesi olan ve beşinci abdominal segmente, yani ortabağırsağın sonuna kadar kesintisiz olarak uzanan PM, bağırsak lümenini iki kısma ayırmış olur. Lümendeki besinle PM arasında kalan kısım endoperitrofik saha, PM ile epitel hücreleri arasında kalan kısım ise ektoperitrofik sahadır.

anterior midgut arise the balloon like diverticula or gastric caeca. They are two in number in the longitudinal section (Fig. 1a) and they are eight in number in the cross section. Cells which are massive and have microvilli, occupy a large part of the thorax (Fig. 2b). After those massive structures, abdominal midgut cells line throughout from the first to the fifth abdominal segments. In the longitudinal sections between the first and the third abdominal segments, the midgut cells are seen as cuboidal (Fig. 3) but in the cross section these cells are seen as squamous (Fig. 4a). After the third abdominal segment, the shapes of the midgut cells gradually vary. These cells are greater and have long microvilli. Longitudinal and cross sections display this variation (Figs. 3, 4b).

PM is released from the anterior midgut cells which is located in the cardia and pass through the thorax and reach to the abdominal segments. It surrounds the food bolus and is seen in longitudinal (Figs. 1a, 3) and cross sections (Figs. 2a, 4a, b) as a thin line between the food and the midgut cells. PM which originates from the cardia continuously lines to the end of the midgut (fifth abdominal segment). It separates the midgut lumen into two regions, respectively the endoperitrophic space is located between PM and the food bolus, and the ectoperitrophic space is located between PM and the midgut cells.

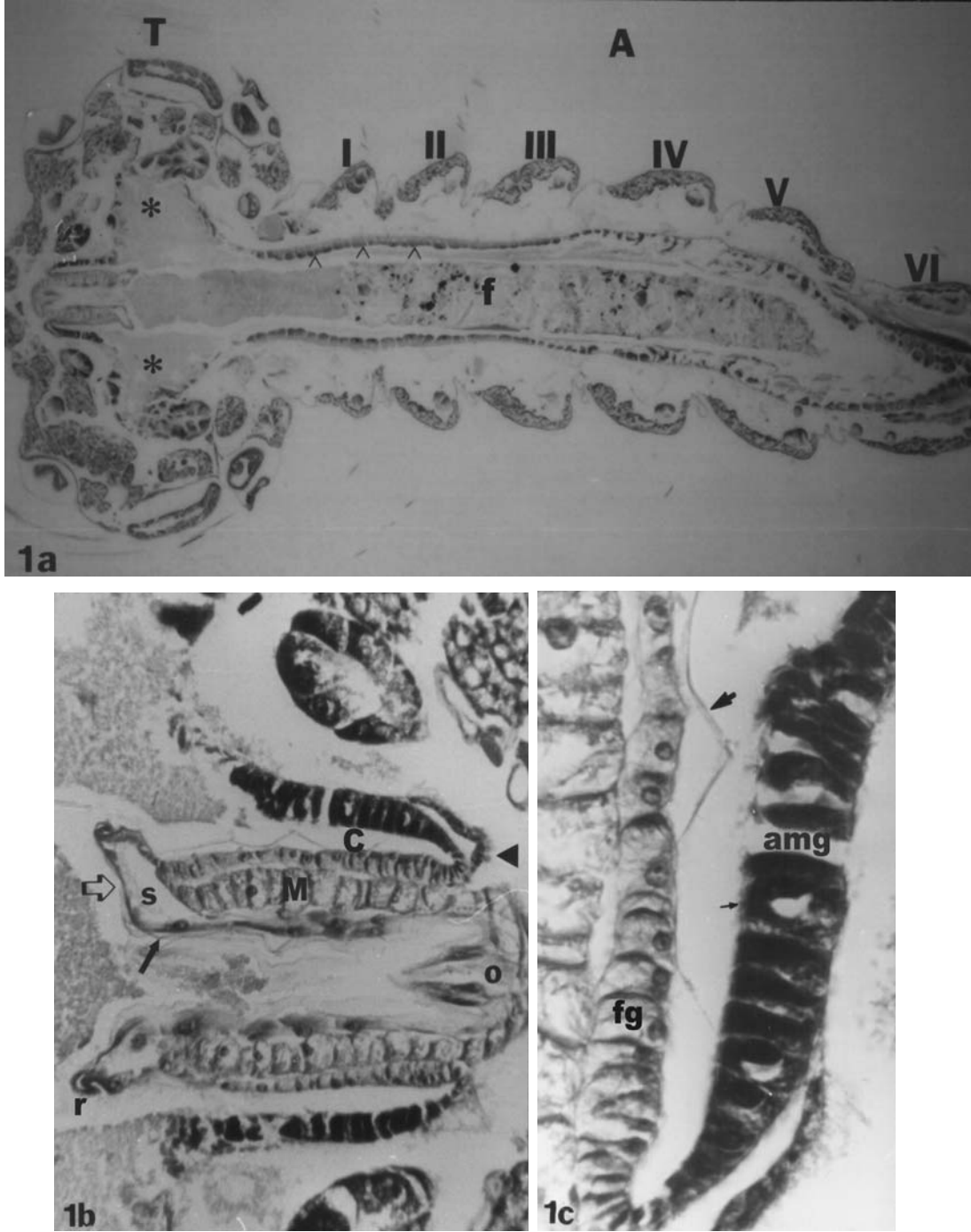


Figure 1. Longitudinal sections of larval alimentary canal. **1a:** A general view from the thorax (T) to the sixth abdominal (A) segments. **1b:** Folding regions of midgut. **1c:** Cardia region. * gastric caeca, Δ abdominal midgut cells, f food bolus, o oesophagus, → cuticle, ⇨ first folding point, r ring, ▶ second folding point, C cardia region, M developing muscles, s blood sinus, fg foregut cells, amg anterior midgut cells, → microvilli, ▶ peritrophic matrix (H-E; 1a, x120; 1b, x220; 1c, x600).

Şekil 1: Son evre larvada sindirim borusunun boyuna kesiti. **1a:** toraks (T) ve abdomenin (A) ilk altı segmenti boyunca bağırsağın genel görünümü. **1b:** bağırsağın katlanma bölgesinden, **1c:** kardiya bölgesinden geçen boyuna kesitler. * gastrik çekumlar, Δ düzgün sıralı abdominal ortabağırsak hücreleri, b lümendeki besin, ö özofagus, → kütikula, ⇨ birinci katlanma bölgesi, h halka, ▶ ikinci katlanma bölgesi, K kardiya bölgesi, k gelişmekte olan kas dokusu, s kan sinüsü, öb önbağırsak hücreleri, ab anterior ortabağırsak hücreleri, → mikrovillus, ▶ peritrofik matriks (H-E; 1a, x120; 1b, x220; 1c, x600).

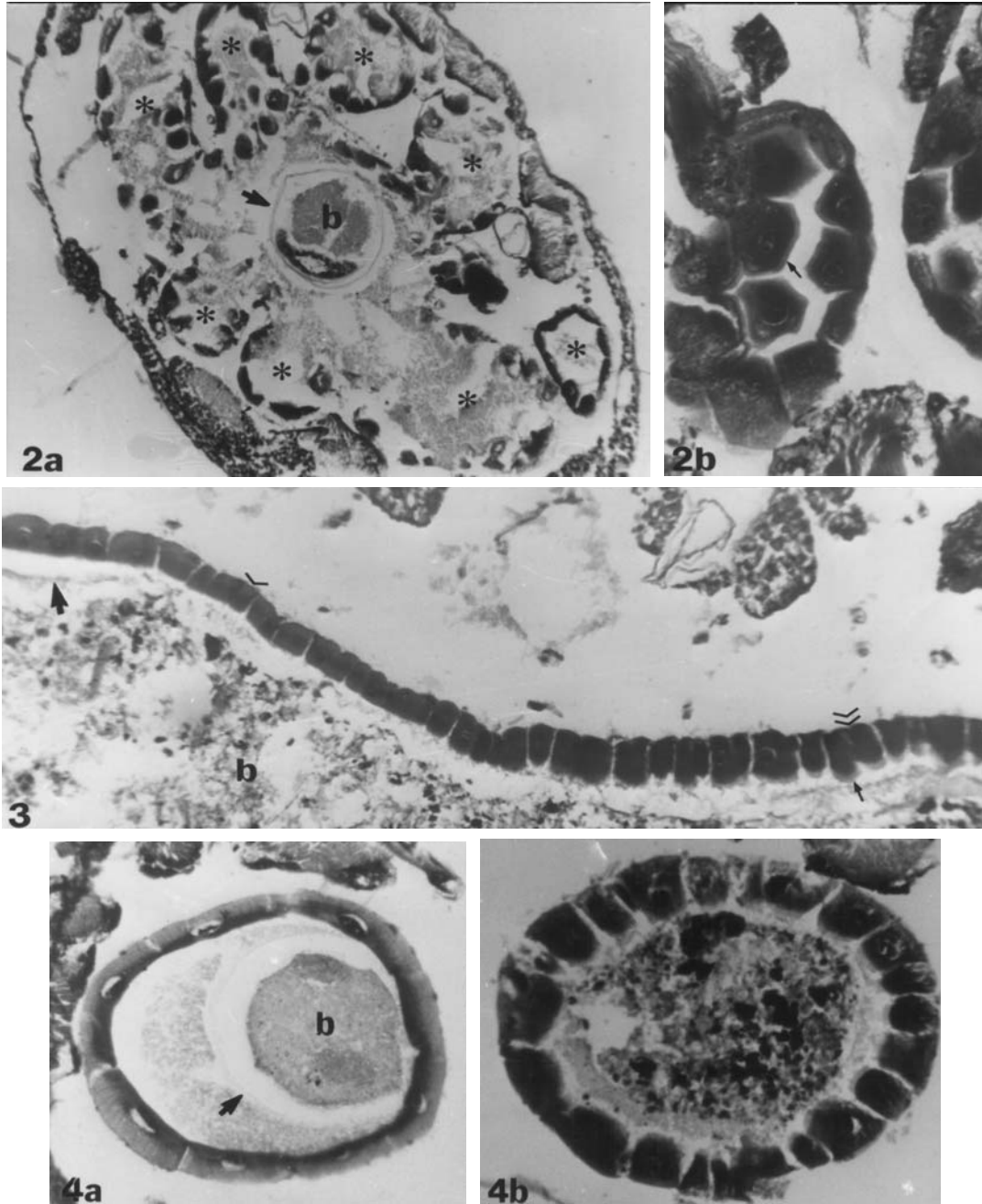


Figure 2: Cross sections of gastric caeca. **2a:** General view. **2b:** Gastric caeca have microvilli. * gastric caeca, → microvilli belonging to gastric caeca, → peritrophic matrix, **f** food bolus in the lumen (H-E; 2a, x100; 2b, x200).

Şekil 2: Gastrik çekumların enine kesiti. **2a:** genel görünüm. **2b:** mikrovillüslü gastrik çekum hücreleri. * gastrik çekumlar, → gastrik çekum hücrelerinin mikrovillüsları, → peritrofik matris, **b** lümendeki besin (Parafin kesit, H-E; 2a, x100; 2b, x200).

Figure 3: Longitudinal section of abdominal midgut cells. > cuboidal cells from anterior region, » columnar cells having microvilli from posterior region, → peritrophic matrix, **f** food bolus, → microvilli (H-E, x150).

Şekil 3: Boyuna geçen abdominal ortabağırsak kesitinin, anterior bölgesindeki kübik görülen (>) ve posterior bölgesindeki mikrovillüslü silindirik hücreler (»). → peritrofik matris, **b** besin, → mikrovillüs (Parafin kesit, H-E, x150).

Figure 4: Cross sections of abdominal midgut. **4a:** Squamous cells from anterior region. **4b:** Columnar cells have microvilli from posterior region. → peritrophic matrix, **f** food bolus (H-E; x200).

Şekil 4: Abdominal ortabağırsağın enine kesiti. **4a:** anteriordeki yassı görülen hücreler. **4b:** posteriordeki mikrovillüslü silindirik hücreler. → peritrofik matris, **b** besin (Parafin kesit, H-E; x200).

3.2. Ortabağırsak Hücreleri ve Peritrofik Matris'in İnce Yapısı

Elektron mikroskobu gözlemlerine göre, ortabağırsak epitel hücrelerinin serbest yüzeylerinde lümene doğru çıkıntı yapan değişik sayıda mikrovilluslar görülür. Hücrelerde, periferde yakın bölgede Golgi alanlarına rastlanır. Golgi kompleksinin dar kanalları apikal hücre zarına dik olarak uzanırlar. Sakkuluslarında elektronca yoğun materyal birikmiştir. Benzer materyal içeren küçük kesecikler Golgi zarları arasında ve plazma zarının hemen altındaki kortikal sitoplazmada çok sayıda bulunur. Kortikal sitoplazma hücre organelleri bakımından fakirdir. Esas olarak Golgi zarlarından türevlenmiş tek veya grup halindeki kesecikler bulunur. Yeterli büyütmelerde bu bölgenin ince filamentleri görülebilmektedir. Bunların çevresinde ise mitokondriler ve daha derin sitoplazmada granüllü endoplazmik retikulum zarları gözlenir (Şekil 5). PM'in tabakalı ince yapısında elektronca yoğun ve elektronca az yoğun olan bölgelere rastlanmaktadır. PM'in, endoperitrofik sahaya bakan tarafı elektronca yoğundur. Sırasıyla açık ve koyu bantlar şeklinde görülen enine çizgileri küçük kanallara benzer, hemen altında, elektronca az yoğun ve bol sayıda mikrofibril içeren ve ektoperitrofik sahaya kadar uzanan kalın bir tabaka bulunur. Bu tabaka içinde yer alan elektronca yoğun ve kesintili iki tabaka, az yoğun olan tabakayı farklı üç bölgeye ayırır. Elektronca yoğun kanallı tabakanın hemen altında yer alan ve elektronca az yoğun ilk mikrofibrilli tabaka oldukça incedir. Elektronca yoğun iki ayırıcı tabaka arasında kalan ikinci mikrofibrilli ve açık renk tabaka ise ilkinden biraz daha kalındır. Elektronca az yoğun olan üçüncü ve son mikrofibrilli tabaka ise en kalın olanıdır ve ektoperitrofik sahaya bakar (Şekil 6a,b).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sivrisinek larvalarında sindirim kanalının toraksta yer alan kısmının, tek tabakalı epitel hücrelerinin kıvrılıp katlanmalarıyla meydana gelen karmaşık yapısı değişik araştırmacılar tarafından farklı şekilde adlandırılıp tanımlanmıştır. Christophers (1) önbağırsağı; farinks, özofagus ve kısmen proventrikulusun bir araya gelerek oluşturduğu bir yapı olarak tanımlarken, Richards ve Richards (2) proventrikulusun; önbağırsağın özofagus üzerinden bir çıkıntı yapması sonucu şekillendiğini bildirmişlerdir. Lehane (9) ise, anterior ortabağırsak ve önbağırsağın toraksta özel bir katlanma bölgesi oluşturduğunu ve genellikle proventrikulus olarak bilinen bu yapının kardiya olarak adlandırılmasının daha doğru olacağını ileri sürmüştür. Bu çalışmada, Lehane (9)'nin tanımlaması esas alınmış ve boyuna kesitlerde gözlenen yapılar sırasıyla özofagus, önbağırsak ve anterior ortabağırsak olarak adlandırılmıştır. Önbağırsak ve anterior ortabağırsak epitel hücre sırasının katlanarak oluşturduğu yapıya da kardiya adı verilmiştir.

3.2. Fine Structure of Midgut Cells and PM

According to the electron micrograph, a various number of microvillus is seen on the apical of the midgut cells. Below the peripheral zone of the cell, there is the Golgi region. The narrow canals of the Golgi complex are upright to the apical membrane of the cell. Electron dense materials are filled in Golgi sacculus. Small vesicles containing similar materials are located between the Golgi membranes and the cortical cytoplasm. Cellular organelles are seldom found in the cortical cytoplasm. Instead of cellular organelles, the vesicles which originated from the Golgi exist in the cortical cytoplasm. In higher magnitude, thin filaments are observed in this region. Beneath these regions are mitochondria and in deeper cytoplasm, endoplasmic reticulum membranes are observed (Fig. 5).

Electron-dense and electron lucent microfibrillated layers are observed in the electron micrograph of PM. The electron dense layer of PM is against the endoperitrophic space and porous or canal like structures are arranged into this layer. Under this structure, the electron lucent layer containing microfibrilles is present. This layer is thick and reaches to the border of the ectoperitrophic space. This thick microfibrillated layer is separated into three regions by the electron dense bilayer. The first and second regions have almost the same thickness but third region is thicker than the others. This third region is against the ectoperitrophic space (Fig. 6a, b).

4. DISCUSSION

The larval alimentary canal which is located in the thorax represents complex folding structure and many investigators have used various types of terms. Christophers (1) describes that the pharynx, oesophagus and proventriculus (in part) collectively form the foregut. Richards and Richards (2) mention that the proventriculus of mosquito larvae is located in the thorax and is formed by protrusion of the foregut into the anterior end of the midgut. Finally Lehane (9) describes that specialized fold of the anterior midgut and foregut form the structure which is correctly termed cardia but is commonly called the proventriculus. In this study in order to prevent any misunderstanding we use the explanation suggested by Lehane (9). Structures observed in longitudinal sections are respectively termed oesophagus, foregut and anterior midgut. Finally, the special folding region which was collectively formed by the foregut and the anterior midgut is termed cardia.

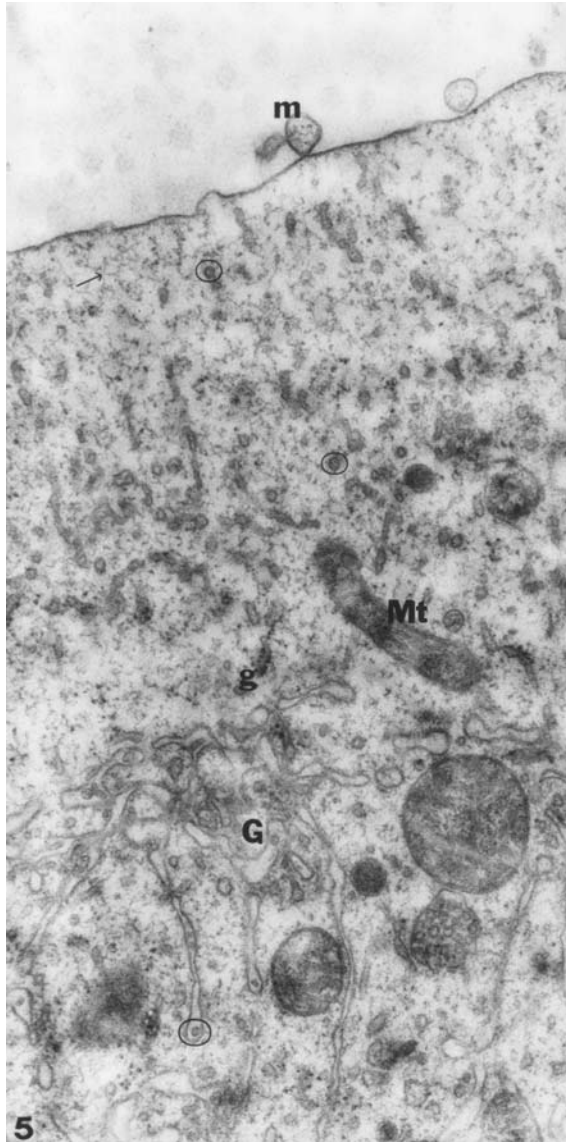


Figure 5. Fine structure of midgut cells. **m** microvilli, **G** Golgi complex, **O** sacculus and small vesicles fill with electron dense material, \rightarrow filaments of cytoskeleton, **Mt** mitochondrion, **g** granular endoplasmic reticulum (UA-LC; x42000).

Şekil 5. Ortabağırsak hücrelerinin ince yapısı. **m** mikrovillus, **G** Golgi kompleksi, **O** sakkuluslar ve küçük kesecikler içindeki elektronca yoğun materyal, \rightarrow sitoskelet filamentleri, **M** mitokondri, **g** granüllü endoplazmik retikulum (UA-KS; x42000).

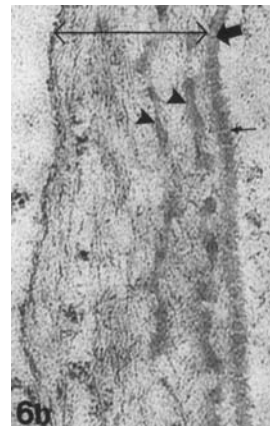
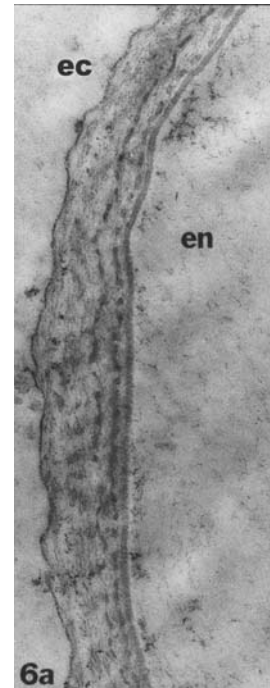


Figure 6. Structure of the PM. **6a:** General view. **6b:** Electron dense and electron lucent layers. **ec** ectoperitrophic space, **en** endoperitrophic space, \blacktriangleright electron dense thin layer, \rightarrow porous or canals, \leftrightarrow electron lucent thick, microfibrillated layer, \blacktriangleright electron dense layers (UA-LC; 6a, x23000; 6b, x50000).

Şekil 6. Peritrofik Matriks'in tabakalı yapısı (**6a**), elektronca yoğun ve az yoğun bölgeler (**6b**); **ek** ektoperitrofik saha, **en** endoperitrofik saha, \blacktriangleright kanallar (\rightarrow) içeren elektronca yoğun ince tabaka, \leftrightarrow elektronca yoğun kesintili fibrillerle (\blacktriangleright) üç bölgeye ayrılmış elektronca az yoğun tabaka (Epon kesit, UA-KS; 6a, x23000; 6b, x50000).

Aedes aegypti'de özofagus, kütikula ile kaplı yassı epitel hücrelerinden yapılmıştır ve hemen dışında halkasal kas demetlerinin oluşturduğu bir tabaka bulunur. Dairesel kas demetleri ile özofagus hücreleri arasında (boyuna kesitlerde) kan sinüsleri yer alır. Özofagus orta barsağa doğru, gastrik çekumlardan hemen önce sona eren bir girinti yapar ve bu girintinin kan sinüslerini çevrelediği kısmın köşesinde ise kütikulaca yoğun bir tabaka bulunur (1). Kütikulaca yoğun bu tabakaya halka denir ve *A.*

In *Aedes aegypti* the oesophagus is made by simple squamous epithelial cells which is covered by the cuticle. Circular muscle is located in the outer space of the oesophageal region. Blood vessels are located between the oesophagus and the circular muscle. Oesophagus invaginates to the gastric caeca and this invagination ends just before the gastric caeca. At the corner of this invagination there is a thick cuticle portion (1) named a ring and in *A. aegypti*, from this ring two collars extend to

aegypti'de bu halkadan dışarı doğru uzanan ve yaka olarak adlandırılan iki adet çıkıntı vardır (2). *C. pipiens*'in boyuna kesitlerinde ise özofagusun ortabağırsağın içine doğru yaptığı girinti gastrik çekumlardan önce değil çekimleri geçtikten sonra sona ermektedir ve ayrıca kütikulaca zengin halkalardan dışarı doğru çıkıntı yapmış her hangi bir yapıya rastlanmamıştır.

A. aegypti'de ışık ve elektron mikroskobuyla kolayca ayırt edilen ön ve ortabağırsağın birleşme yeri (2) *C. pipiens*'in son evre larvalarından alınan boyuna kesitlerde de ışık mikroskobunda kolayca ayırt edilmektedir. Birleşme yerinden hemen sonra mikrovillüslü ortabağırsak epitel hücreleri görülmeye başlar.

A. aegypti'de ortabağırsağın anterioründeki hücreler tipik olarak prizmatiktir ve koyu boyanmıştır. Bu hücrelerin salgıları sonucu PM oluşur (1,2,9). *C. pipiens*'ten enine ve boyuna alınan kesitlerde de aynı hücreler benzer olarak koyu renktedir. Ayrıca bu hücreler ortabağırsağı oluşturan diğer hücelere oranla daha küçüktürler.

A. aegypti'de gastrik çekumların epitel hücreleri büyüktür ve uzun mikrovillüslara sahiptir (1). *C. pipiens* larvalarının toraksından alınan enine ve boyuna kesitlerindeki bulgularımız, *A. aegypti*'de saptanan bulgularla (1) uyum sağlamaktadır.

A. aegypti'nin erken larval evrede tek tip olan ortabağırsak epitel hücreleri son evre larvalarda farklılıklar gösterir. İlk abdominal segmentlerin boyuna kesitlerinde kübik, enine kesitlerinde ise yassı olan ortabağırsak epitel hücreleri, posteriöre doğru silindirik hücelere dönüşür ve irileşen hücrelerin mikrovillüsları uzar (1). *C. pipiens*'in enine ve boyuna kesitlerden elde edilen ışık mikroskobu görüntüleri yukarıdaki verileri desteklemektedir ve bunlara ek olarak posteriördeki hücreler daha koyu renk boyanmıştır.

PM'i salgılayan hücrelerin sayısı kesin olarak bilinmemekle beraber çok fazla olmadığı düşünülmektedir. *A. aegypti*'nin ışık mikroskobunda incelenen enine kesitlerinde yaklaşık 40 hücrenin, boyuna kesitlerinde ise gastrik çekumların kaidesinden itibaren anteriöre doğru 20 hücrenin salgı oluşturduğu bildirilmektedir. Elektron mikroskobunda incelenen boyuna kesitlere göre ise anteriordeki ilk 8-10 hücrenin PM salgısına katıldığı görülür (2). *C. pipiens*'in ışık mikroskobu görüntüleri enine kesitlerdeki 40 hücrenin ve boyuna kesitlerdeki 20 hücrenin PM oluşumuna katıldığını işaret etmektedir.

A. aegypti'de PM'in besinle yüzleşen tarafı yoğun granüler bir tabaka halindedir. Bu granüler tabakadan epitel hücrelerine doğru birbirlerinden aralarındaki fibrilli materyalle ayrılan üç mikrofibril tabakası vardır (2). *C. pipiens*'in elektron mikroskobu görüntülerinde PM'deki mikrofibrilli bu üç tabaka ve onları ayıran fibrilli tabakalar net olarak ayırt edilmektedir. Çalışmanın bu düzeyinde mikrofibrillerin ve içinde buldukları temel maddenin kimyasal yapısının belirlenmesi için her hangi bir yöntem kullanılmamıştır. Ancak Peters ve Latka (23)'ya göre X ışını difraksiyon analizleri ve lektin bağlanması çalışmaları mikrofibrillerin kitinden oluştuğunu göstermiştir. Ayrıca PM'in proteoglikan bir matriksi içine gömülmüş mikrofibrillerden oluştuğuna dair veriler de vardır (3,7-10).

A. aegypti'de PM yüzeyi porsuzdur ve lümendeki besin

the outer space (2). In the longitudinal sections of *C. pipiens*, the invagination of the oesophagus ends just after the gastric caeca and there is not any collars extending to the outer space from the ring.

The commissure of the foregut and midgut of *A. aegypti* is easily seen in light and electron microscope (2). This phenomenon is also seen easily in longitudinal sections of *C. pipiens* by light microscope. Immediately beyond this commissure, anterior midgut cells are observed.

Anterior midgut cells of *A. aegypti* are columnar, deeply stained and they release PM (1, 2, 9). Anterior midgut cells of *C. pipiens* are also columnar and deeply stained and PM is seen both in longitudinal and cross section. Furthermore, these cells are smaller than other midgut cells.

Gastric caeca cells of *A. aegypti* are massive and have long microvilli (1). In *C. pipiens* these cells exhibit similar characteristics.

Younger larval stage (first and second instar) of *A. aegypti*, the midgut is lined by uniform cells but it varies for the later stages (third and fourth instar). Flattened type cells are observed in cross sections of the first abdominal segments. But columnar and big cells which have long microvilli are observed in cross sections of the fourth and fifth abdominal segments (1). The observations of longitudinal and cross sections of *C. pipiens* are similar. Furthermore posterior midgut cells are darkly stained.

The number of cells involved in secreting the PM is not certain but is not a large number. In *A. aegypti*, cross sections of larvae show approximately 40 midgut cells in the secretory zone. Longitudinal sections show approximately 20 cells anterior to the bases of the gastric caeca. Electron micrographs suggest that only the anteriormost 8 to 10 cells are involved in secreting material for the PM (2). Cross sections of *C. pipiens* larvae also show approximately 40 cells and longitudinal sections show approximately 20 cells are involved in secreting PM.

The PM of *A. aegypti* has thin electron dense granular layer against the food bolus. Thick electron lucent microfibrillated layer is separated into three regions by electron dense bilayer (2). Electron dense thin granular layer and microfibrillated layer separated into three regions are observed in electron micrograph of *C. pipiens*. In this study we did not use any methods to show the chemical composition of the PM and its components. However, Peters and Latka (23) have used X-ray diffraction analyses and lectin binding methods. Latter one suggests that the microfibrilles of PM contain chitin. Other authors suggest that PM is formed by the mixture of proteins, glycoproteins and proteoglycans (3, 7-10).

In *A. aegypti* the surface of PM is nonporous and there is no evidence that any food components pass through these pores (2). On the contrary electron micrograph investigations of *C. pipiens*, porous or canal like structures arranged in granular layer which are against the food bolus are observed.

Consequently, the anatomical structure of the foregut and midgut of *C. pipiens* and fine structure of PM exhibit some differences from *A. aegypti* which is well known as a material to have been studied and to be compared. In *C. pipiens*, the invagination of the oesophagus ends just after gastric caeca and there is not any collars extending to the outer space from the ring. However, there are not any

kitlesinden hücrelerin bulunduğu tarafa besin parçalarının geçtiği görülmemiştir (2). Farklı olarak *C. pipiens*'in elektron mikrograflarında PM'in besinle karşı karşıya gelen granüllü kısmında enine çizgiler şeklinde gözlenen kanal benzeri yapılara rastlanmıştır.

Sonuç olarak; *C. pipiens*'in ön ve ortabağırsak anatomik yapısı ile PM'in ince yapısı, larval dönemde çalışılmış ve karşılaştırılacak tek materyal olarak görülen *A. aegypti*'den birkaç noktada farklılık göstermektedir. *C. pipiens*'te özofagusun orta bağırsağa girintisi daha geride sonlanır ve I. katlama bölgesindeki halka yapısına bağlı bir yaka ayırt edilmemektedir. Bununla beraber histolojik yapılarında önemli bir fark görülmemektedir. PM'in endoperitrofik tarafındaki granüllü tabakanın kanallı oluşu da *C. pipiens*'e özgü bir durum olarak görülmektedir. *C. pipiens*'in ön ve ortabağırsağının genel yapısı 1930'lu yıllarda Wigglesworth (24) ve onu takip eden yıllarda birkaç araştırmacı tarafından incelenmiş (25) ve bugüne kadar kayda değer başka bir çalışma da bulunamamıştır. Bu çalışmayla, ülkemizdeki en yaygın sivrisinek türü olan *C. pipiens* ile ilgili bundan sonraki larvisit uygulama çalışmalarımıza temel oluşturacak histolojik ve sitolojik yapı tanımlanmıştır.

5. TEŞEKKÜR

Çalışmaya elektron mikroskobu düzeyindeki değerli katkılarından dolayı Hocamız Sayın Prof. Dr. Sabire KARAÇALI'ya ve 98 Fen 039 No'lu Proje ile destek sağlayan Ege Üniversitesi Araştırma Fonu'na teşekkür ederiz.

REFERENCES/ KAYNAKLAR

1. Christophers, S.R., *Aedes aegypti (L) The yellow fever mosquito: Its life history, bionomics and structure*, Cambridge Univ. Press., London: 287-298 (1960).
2. Richards, A.G. and Richards, P.A., "Origin and composition of the peritrophic membrane of the mosquito, *Aedes aegypti*", *J. Insect Physiol.*, 17: 2253-2275 (1971).
3. Stam, B., D'Haese, J. and Peters, W., "SDS Gel electrophoresis of proteins and glycoproteins from peritrophic membranes of some diptera", *J. Insect Physiol.*, 24: 1-8 (1978).
4. Perrone, B. and Spielman, A., "Time and site of assembly of the peritrophic membrane of the mosquito *Aedes aegypti*", *Cell Tissue Res.*, 252: 473-478 (1988).
5. Huber, M., Cabib, E. and Miller, L.H., "Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane", *Proc. Nat. Acad. Sci.*, USA, 88: 2807-2810 (1991).
6. Billingsley, P.F. and Rudin, W., "The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species", *J. Parasitol.*, 78(3): 430-440 (1992).
7. Eisemann, C.H. and Binnigton, K.C., "The peritrophic membrane: Its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropoda", *Int. J. Parasitol.*, 24(1): 15-26 (1994).
8. Lehane, M.J., Allingham, P.G. and Weglicki, P., "Composition of the peritrophic matrix of the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*", *Cell Tissue Res.*, 283: 375-84 (1996).
9. Lehane, M.J., "Peritrophic matrix structure and function", *Ann. Rev. Entomol.*, 42: 525-50 (1997).
10. Tellam, R.L., Wijffels, G. and Willadsen, P., "Peritrophic matrix proteins", *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 87-101 (1999).

significant differences between their histological structures. In addition, porous or canal like structures arranged in the granular layer of PM are typical of *C. pipiens*. By this work, histological and cytological structure of *C. pipiens* which is most the common species in Turkey has been identified. This will be a base to our studies about applying larvicide, related to *C. pipiens*.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We want to thank Prof. Dr. Sabire KARACALI for her valuable contribution at the stage of electron microscopic level. Thanks also to E.U. Research Fund (98 Fen 039) for their partial financial support.

11. Shahabuddin, M., "Plasmodium ookinete development in the mosquito midgut: a case of reciprocal manipulation", *Parasitol.*, 116: 83-93 (1998).
12. Langer, R.C. and Vinetz, J.M., "Plasmodium ookinete-secreted chitinase and parasite penetration of the mosquito peritrophic matrix", *Trends in Parasitol.*, 17 (6): 269-272 (2001).
13. Yazıcıoğlu, T., "İzmir ve çevresinin sivrisinek türleri (Diptera: Culicidae) üzerine sistematik araştırma", Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 3-15 (1985).
14. Herms, W.B., *Medical Entomology*, 4th ed., *The Macmillan Comp.*, New York, 175-195 (1956).
15. Gordon, R.M. and Lavoipierre, M.M.J., *Entomology for Students of Medicine*, *Blackwell Scientific Publ.*, Oxford, 90-95 (1962).
16. Busvine, J.R., *Insects and Hygiene; The Biology and Control of Insect Pests of Medical and Domestic Importance*, 3th ed., *Chapman and Hill*, London and New York, 100-150 (1980).
17. Demirsoy, A., *Yaşamın Temel Kuralları. Omurgasızlar/Böcekler*, *Entomoloji*, Cilt II/Kısım II; *Meteksan A.Ş.*, Maltepe, Ankara, 726-733 (1997).
18. Tucket, F. and Morris-Kay, G., "Alcian blue staining of glycosaminoglicans in embriyonic material: Effect of different fixatives", *Histochem. J.*, 20:174-182 (1988).
19. Asakura, K., "Phosphatase activity in the larva of the euryhaline mosquito, *Aedes togoi* Theobald, with special reference to sea-water adaptation", *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 31: 325-337 (1978).
20. Karnovsky, M.J., "A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy", *J. Cell Biol.*, 27:137 A-138 A (1965).
21. Millonig, G., "Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solution in fixation", *J. Appl. Physiol.*, 32: 1637 (1961).
22. Reynolds, E.S., "The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy", *J. Cell Biol.*, 17: 208-212 (1963).
23. Peters, W. and Latka, I., "Electron micrographic localisation of chitin using colloidal gold labelled wheat germ agglutinin", *Histochem.*, 84: 155-60 (1986).
24. Wigglesworth, V.B., *The Principles of Insect Physiology*, 2nd ed., *Methuen & Co Ltd., London*, 254-298 (1942).
25. Imms, A.D., *A General Textbook of Entomology*, 9th ed., revised by Richards, O.W and Davies, R.G., *Methuen & Co Ltd.*, London, 123-132 (1970).