

## 장수풍뎅이 유충 내에 있는 전장 상피세포들의 미세구조

류재혁

인하대학교 이과대학 생명과학과

### Ultrastructure of the Foregut Epithelial Cells in the Scarab Beetle, *Allomyrina dichotoma* Linne

Chai Hyeock Yu

Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon, 402-751 Korea

(Received September 8, 2005; Accepted September 20, 2005)

#### ABSTRACT

The foregut epithelium of the last instar larva in the scarab beetle, *Allomyrina dichotoma* was observed with electron microscopes. The foregut epithelium of the scarab beetle larva is composed of a single layered squamous absorptive cell. The luminal surface of the epithelium is covered with cuticular intima. The free surface of the squamous cell has a irregular array of microvilli "brush border", while cell membranes close to the basal lamina are infolded and a lot of mitochondria are concentrated in those processes. The cytoplasm in the epithelial cells is well developed nucleus, mitochondria. And the basal region of cell contains large lipid , protein droplets and numerous glycogen granules. The basal lamina is located between the basal membrane and muscle bundle, providing barrier between the epithelium and the hemolymph. The epithelium is surround by the subepithelial space and muscles. The subepithelial space, which is composed of fibrous connective tissue is innervated by many tracheoles and axon.

**Key words :** *Allomyrina dichotoma* (Dynastidae), Epithelial cell, Foregut, Ultrastructure

#### 서 론

곤충의 소화관은 각 종마다 형태와 크기는 다르지만, 전장(foregut), 중장(midgut), 그리고 후장(hindgut) 등 크게 3부분으로 구분된다. 전장과 후장은 외배엽에

서 발생되어 장 내면이 얇은 큐티클 층으로 덮여 있으며, 전장에서는 섭취물의 일시적 저장 및 물리적 소화를 후장에서는 물과 이온들의 재흡수 기능을 수행한다. 따라서 소화 물질의 분해와 흡수작용, 즉 소화작용은 대부분 중장에서 일어나는 것이 곤충의 특징이다(Wigglesworth, 1972). 전장은 다시 인두부, 식도, 소

\*이 논문은 2004년도 인하대학교의 지원에 의하여 연구되었음 (INHA-31572)

\*Correspondence should be addressed to Dr. Chai Hyeock Yu, Department of Biological Sciences, College of Natural Science, Inha University, 253 Youghyun-Dong, Nam-ku, Incheon, 402-751 Korea. Ph: (032) 860-7693, E-mail: chyu@inha.ac.kr

낭(crop) 그리고 전위(proventriculus) 등으로 세분되는데 크게 분화된 소낭이 전장의 대부분을 차지하며 중장으로 이어지는 잘룩한 전위부위에 의해 전장부분은 뚜렷하게 구분할 수 있다.

전장의 내강에 면한 큐티클 층의 두께 및 상피면의 분화 정도는 곤충에 따라 다르다. 그리고 전장의 소낭상피조직은 기저막상에 단층의 편평상피세포들로 이루어졌는데 섭취하는 먹이의 종류에 따라 세포의 크기와 분화내용이 차이가 있다(Chapman, 1985).

이러한 전장에 대한 연구는 먼저 소낭의 해부·조직 연구로서 횟개미목(Isoptera)의 *Mastotermes darwiniensis*(Czolig et al., 1984), 과리목(Diptera) 과실파리의 일종인 *Rhagoletis pomonella*(Ratner & Stoffolano, 1984) 그리고 딱정벌레목(Coleoptera) 수시렁이 일종인 *Attagenus megatoma*(Dunkel & Boush, 1968) 등이 보고되었다. 특히 Gupta(1965)는 딱정벌레목 가로과(Meloidae) 곤충 32종의 전장에 대한 비교해부학적 연구보고를 한바 있다. 전장에 관한 연구중에는 전위 상피내면을 덮고 있는 큐티클의 분화내용에 대한 보고가 많았다. Boudreault(1980)는 11목(Order) 곤충의 전위부분의 큐티클의 가시에 대한 비교연구를 비롯하여, 딱정벌레 바구미의 *Anthonomus grandis*(MacGown & Sikorowski, 1981), 예우기목의 풀무치, *Locusta migratoria*(Hochuli et al., 1992)와 *Paulina acminata*, *Marellia remmipes* 2층의 큐티클 분화(Bentos-Pereira & Lorier, 1992) 내용 등의 보고가 있다. 그리고 소낭과 전위 부분에서는 먹이를 분쇄하여 중장으로 보내는 일종의 사낭(gizzard)의 역할을 하기 때문에 장내면의 큐티클은 가시(돌기)로 분화된 반면 장외벽을 둘러싸고 있는 근육이 발달하였으므로 이곳에 대한 연구도 이루어진 바 있다(Zacharuk, 1971; Chapman, 1985). 그리고 전장은 중장과 같이 섭취물의 소화와 흡수기능은 일어나지 않지만, 물과 이온들의 흡수를 위한 유리연원형질막의 분화(Bayon, 1981)와 중장으로부터 흡수된 물질이 혈립프를 통해 이동되어 축적되는 내용(Zacharuk, 1971; Hanrahan & Nicolson, 1987) 등에 대한 연구 등이 보고된 바 있다.

본 연구에서는 상기 연구내용을 참고로 장수풍뎅이 유충의 전장 중에서 대부분을 구성하고 있는 소낭의 상피조직에 대해 관찰 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

본 연구에서는 딱정벌레(Coleoptera)의 일종인 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma* Linne; Dynastidae)를 25±2°C 되는 항온실에서 인공먹이를 주고 사용한 총령 유충을 암·수 구별없이 실험재료로 사용하였다.

상기 유충을 해부현미경하에서 해부하여 전장 소낭부분을 적출하여 2% paraform-glutaraldehyde(0.1 M phosphate buffer, pH7.4) 혼합고정액(4°C)에 12시간 전고정하였다. 그 후 4°C의 0.1 M phosphate buffer 용액으로 3시간 동안 3회 세척한 후 다시 1% osmium tetroxide(0.1 M phosphate buffer, pH7.4)로 2시간 동안 후고정하였다. 고정된 재료를 ethyl alcohol의 농도를 증가시켜 탈수하고, propylene oxide로 치환하여 epoxy resin(Epon-812 혼합액)에 침투시켜 포비하였다. 60°C에서 36시간 동안 열 중합시켜 볼록을 제작하였으며 포비된 재료를 semi-section하여 methylene blue와 basic fuchsin으로 염색하여 광학현미경하에서 조직을 관찰하였다. 그리고 LEICA ULTRACUT R을 이용해 70~90 nm로 절편한 후 uranyl acetate(20분간), lead citrate(10분간) 이중 염색하여 투과전자현미경(Philips CM 200)으로 관찰하였다.

## 결 과

장수풍뎅이 종령 유충의 전장 상피조직을 구성하는 세포들의 미세구조를 관찰한 결과는 다음과 같았다.

본종의 전장은 대부분 소낭으로 이루어져 섭취한 먹이를 저장하고 있으며 크게 평출되었는데 해부학적으로 암·수 차이는 없었다. 전장부분을 횡단한 조직을 보면 편평상피세포들이 단층의 접막상피를 이루고 있으며 장내면에는 큐티클층이 덮여 있고 기저막 아래에 좁은 접막하조직이 있으며 그 주위에 환상근과 중주근이 관찰되었다.

전장의 상피면을 덮고 있는 큐티클(표피)층은 약 1 μm 두께로서 단단하며 전자밀도가 높게 관찰되는 상표피(epicuticle)와 전자밀도가 낮아 밝게 보이는 내원표피(endocuticle)로 관찰되었다(Figs. 1, 2). 얇은 상표

피는 거치형 또는 가시형으로 장 내강으로 돌기를 형성하였으며(Fig. 2, 화살표), 큐티클층의 대부분분을 차지하는 넓은 내원표피는 5층으로 세분되어 미세섬유상 물질이 축적되어 있는 모습으로 관찰되었다. 단층의 점막상피를 이루고 있는 상피세포는 유리연 원형질막이 미세융모(microvilli)로 변형되어 “brush border”를 이루고 있는데, 미세융모가 짧고 불규칙하게 배열된 것(Fig. 1)과 1.5~2 μm 길이로 길게 신장되어 조금 규칙적으로 배열된 것(Fig. 3)이 관찰되었다. 상피세포의 핵은 크게 발달하였으며 주로 기저쪽에 위치하였다. 그리고 핵 주변에는 사립체(mitochondria)가 발달하였으며 리소조ーム(lysosome) 등도 관찰되었다(Fig. 6). 관찰된 사립체들은 크게 발달하였으며(Fig. 5), 핵 주변부 뿐만 아니라 첨단부(Fig. 4), 기저부(Fig. 9) 등 세포 전체적으로 고르게 분포함이 특징이었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 두 세포간에 접하고 있는 측부 원형질막(lateral plasma membrane)은 굴곡이 심하였으며, 첨단부 쪽은 격막연접(septate junction)을 하고 있어 전자밀도가 높게 관찰되었다(Fig. 4). 그리고 세포질 내에는 지질과 단백질이 크고 작은 파립의 형태로 관찰되었으며 특히 당진파립(glycogen granules)이 넓게 축적된 것이 자주 관찰되었다. 또한 세포질내에는 다양한 크기의 액포(vacuole)도 산재해 있었다(Figs. 7, 8).

상피세포의 기저원형질막은 기저막 주름(basal infolding)이 잡혀 “canaliculi”, “basal labylynth”를 만들었다(Fig. 9, \*). 기저막 주름은 짧고 조금 불규칙하였으며 그 사이에는 크게 발달한 사립체가 많이 분포하고 있었다. 기저막(basal lamina)은 여러겹으로 기저초(basal sheath)의 구조로 관찰되는 것이 특징인데, 기저막은 8~12층의 겹으로 전체 두께는 약 200~500 nm 정도로 관찰되었다(Figs. 9, 10, 11). 기저막 내 또는 기저막 아래 점막하조직 내에는 기관지세포(tracheole cell)와 신경세포(axon cell)들이 관찰되었는데 신경세포들은 대부분 기관지 세포내에서 관찰되었다(Figs. 10, 11). Fig. 11과 같이 중단된 기관지세포를 관찰할 수 있는데 내면이 큐티클층으로 이루어져 전자밀도가 높아 진하게 관찰되는데 특히 안쪽으로 돌출한 용수실(tanidium)이 환상으로 배열되었음을 관찰할 수 있었다.

점막하조직 바깥쪽에는 6~8 μm 굵기의 근육다발이 관찰되었는데 z-선(z-line, 화살표)과 z-선 간격은 약 4 μm 정도로서 전형적인 골격근 구조를 하고 있었다(Fig. 12). 안쪽으로 환상근(circular muscle)이 바깥 쪽에는 종주근(longitudinal muscle)이 배열되었다.

## 고 칠

본 실험재료는 완전변태를 하는 딱정벌레의 일종인 장수풍뎅이 (*Allomyrina dichotoma* Linne; Dynastidae; Coleoptera) 유충을 암수 구별없이 사용하였다. 장수풍뎅이는 유충시기에 약간 쪽은 밀이나 보리줄기 더미 속에서 사는 곤충인데, 쇠근에는 텁밥 등으로 인공먹이를 개발하여 애완동물로 사육하기도 하는 곤충이다.

곤충의 전장은 구강에서부터 식도, 소낭 그리고 전위부위 등으로 세분하지만 이들의 크기 및 분화 정도는 섭취먹이의 종류에 따라 다양하다(Gupta, 1965; Yu, 1980; Jarjees et al., 1988) 그런데 본 종은 먹이를 완성히 섭취하는 유충시기에는 전장부분이 중장과 후장에 비해 크게 발달하였으며, 전장은 대부분 소낭으로 이루어 졌으며 본 연구에서 관찰한 전장은 바로 소낭부분을 말한다. 외배엽에서 발생 분화된 전장은 내면이 얇은 큐티클층으로 덮여있어 먹이를 저장하고 분쇄하기에 적합한 구조를 하고 있다. 특히 상표피면이 가시 또는 거치형으로 분화되었다(Fig. 2, 화살표). 그런데 전장의 먹이의 양을 조절하여 중장으로 조금씩 보내주는 전위부분은 먹이의 분쇄 뿐만 아니라 역류하는 것을 막기 위해 돌기가 좀더 크게 발달하였다. 그런 역할을 하는 돌기를 Boudreux(1980)은 가시의 일종인 “acanthus”라 하였고, MacGrown & Sikorowski(1981)과 Hochuli et al.(1992)는 “microspine” 그리고 Bentos-Pereira & Lorier(1992)는 “teeth, spine”이라 하였는데 그 크기와 모양은 조금씩 차이가 있었다. 곤충의 체벽을 구성하는 큐티클층은 상표피(epicuticle), 외표피(exocuticle) 그리고 내표피(endocuticle) 등 3층으로 구분되나(Chapman, 1985), 전장의 내면을 싸고있는 큐티클층은 상표피와 내표피 2층으로만 구성되었다. 그리고 장수풍뎅이와 같이 섬유소질이 많은 먹이를 섭취하는 곤충들은 세균들이 공

생하는 경우가 있는데, Fig. 2에서와 같이 장 내강에서 많은 세균들이 관찰되었다. 이는 매미종인 *Euscelidius variegatus* (Cheung & Purcell, 1993)과 *Tetraponera* 개미 (Billen & Buschinger, 2000) 등에서도 세균들이 공생하고 있음을 보고하였다.

본 종의 전장 상피세포의 첨단부 원형질막은 불규칙하고 엉성하게 배열된 미세융모로 관찰되었지만 (Figs. 1, 3), 유사종인 소똥구리 일종에서는 밀착된 막 주름 형태로 관찰되었다 (Bayon, 1981). 세포질내에는 Fig. 7, 8에서와 같이 크기가 다양한 지질이나 단백질 과립 그리고 글리코겐 입자들이 자주 관찰되었는데, 방아벌레 일종인 *Metarrhizium anisopliae* (Zacharuk, 1971)과 거저리파 일종인 *Onymacris plana plana* (Hanrahan & Nicolson, 1987) 등의 전장 상피세포 내에서도 보고 되었는데 저장풀질의 크기와 분포상태는 달랐다. 앞으로 이를 저장풀질에 대하여 세포화학적 분석방법을 실시하여 정확한 풀질 규명이 이루어져야 할 것으로 사료된다. 상피세포의 측부 원형질막의 세포연접 그리고 기저원형질막의 기저막 주름들은 곤충 장상피세포의 공통된 특징이다 (Chapman, 1985; Lehane, 1998). 상피세포 기저면에 접하고 있는 기저막은 본 종과 같이 여러겹의 basal sheath 형태로 분화된 것과 나방류 (Judy & Gilbert, 1970), 하루살이류 (Harker, 1999)와 같이 약 200 nm 두께의 단일막으로 분화된 것과 대별된다. 그런데 Fig. 9, 10에서와 같이 여러겹의 기저막이 팽창된 것으로 관찰된 것은 고정 시약의 농도와 pH 등을 적절히 사용하지 못한 원인으로 생각된다.

곤충의 호흡기관은 기관 (trachea)으로서 복부마디 숨문 (spiracle)으로부터 뻗어 들어와 말단은 여러 다른 기관의 점막 하 조직에 분포하게 된다. 기관지가 분지하여 직경이 1  $\mu\text{m}$  이하가 되면 기관세지 (tracheole)라 하는데, 기관지의 내면은 용수실로 분화된 것이 특징이다.

고등동물에 있어 장의 수축과 이완, 즉 연동운동을 하는 내장근은 평활근 이지만 곤충의 내장근은 골격근이다 (Snodgrass, 1935; Wigglesworth, 1972). 본 장수풍뎅이의 수축근도 전형적인 골격근의 구조를 하고 있으며 환상근과 종주근이 구분되었다 (Fig. 12).

곤충은 알, 유충, 용 그리고 성충 등으로 변태를 하

기 때문에 같은 종이라 할 지라도 먹이를 왕성히 섭취하는 유충시기에 장 상피조직이 가장 발달하였다. 그러나 성충시기의 소화관은 그 크기와 전장, 중장, 후장 등의 비교에 있어 유충시기와는 큰 차이를 보인다 (Judy & Gilbert, 1970; Suzuki & Ando, 1981; Kishimoto & Ando, 1986). 따라서 소화관을 구성하는 장 상피조직에 대한 연구는 성장 단계별로 비교연구도 병행되어져야 할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Bayon C: Ultrastructure de l'épithelium intestinal et flore pariétale chez la larve xyloophage d'*Oryctes nasicornis* L. (Coleoptera; Scarabaeidae). Int J Insect Morphol Entomol 10 : 359-374, 1981.
- Bentos Pereira A, Lorier E: Cuticular structures of the stomodeum in *Paulinia acuminata* (DeGeer) and *Marellia remipes* Uvarov (Orthoptera; Paulinidae). Int J Insect Morphol Embryol 21 : 161-174, 1992.
- Billen J, Buschinger A: Morphology and ultrastructure of a specialized bacterial pouch in the digestive tract of *Tetraponera* ants (Formicidae; Pseudomyrmecinae). Arthropod structure Development 29 : 259-266, 2000.
- Boudreaux HB: Proventricular acanthae and their phylogenetic implications. Ann Entomol Soc Am 73 : 189-196, 1980.
- Chapman RF: Structure of the digestive system. In: Kerkut GA, Gilbert LI, ed, Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 4 pp. 165-212. Pergamon press, Oxford. 1985.
- Cheung WWK, Purcell AH: Ultrastructure of the digestive system of the leafhopper *Euscelidius variegatus* Kirshbaum (Homoptera; Cicadellidae), with and without con genital bacterial infections. Int J Insect Morphol Embryol 22 : 49-61, 1993.
- Czoliz R, Slaytor M, Veivers PC, O'Brien RW: Gut morphology of *Mactotermes darwiniensis* Froggatt (Isoptera; Mastotermitidae). Int J Insect Morphol Embryol 13 : 337-355, 1984.
- Dunkel FV, Boush GM: Studies on the internal anatomy of the black carpet beetle, *Attagenus megatoma*. Ann Entomol

- Soc Amer 61 : 755~765, 1968.
- Gupta AP: The digestive and reproductive systems of the Meloidae (Coleoptera) and their significance in the classification of the family. Ann Entomol Soc Amer 58 : 442~474, 1965.
- Harrahan SA, Nicolson SW: Ultrastructure of the Malpighian tubules of *Onymacris plana plana* Peringuey (Coleoptera; Tenebrionidae). Int J Insect Morphol Embryol 16 : 99~199, 1987.
- Harker JE: The structure of the foregut and midgut of nymphs, subimagoes and imagoes of *Cloeon dipteron* (Ephemeroptera) and the functions of the gut of adult mayflies. J Zool Lond 248 : 243~253, 1999.
- Hochuli DF, Roberts B, Sanson GD: Anteriorly directed microspines in the foregut of *Locusta migratoria* (Orthoptera; Acrididae). Int J Insect Morphol Embryol 21 : 95~97, 1992.
- Jarjees E, Merritt DJ, Gordh G: Anatomy of the mouthparts and digestive tract during feeding in larvae of the parasitoid wasp *Trichogramma australicum* Girault (Hymenoptera; Trichogrammatidae). Int J Insect Morphol Embryol 27 : 103~110, 1998.
- Judy KJ, Gilbert LI: Histology of the alimentary canal during the metamorphosis of *Hyalophora cecropia* (L.). J Morphol 131 : 277~300, 1970.
- Kishimoto T, Ando H: Alimentary canal formation in the stonefly, *Kamimuria tibialis* (Pictet) (Plecoptera; Perlidae). Int J Insect Morphol Embryol 15 : 97~105, 1986.
- Lehane MJ: The foregut. In Harrison FW, Locke M, ed. Microscopic Anatomy of Invertebrates; Insecta, Vol 11B pp. 713~724, Wiley Liss, Inc, 1998.
- MacGowan MW, Sikorowski PP: Digestive anatomy of the adult boll weevil, *Anthonomus grandis* Bohrman (Coleoptera; Curculionidae). Ann Entomol Soc Amer 74 : 117~126, 1981.
- Ratner SS, Stoffolano JG: Ultrastructural changes of the esophageal bulb of the adult female apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (Diptera; Tephritidae). Int J Insect Morphol Embryol 13 : 191~208, 1984.
- Smith DS: Insect cells; Their Structure and Function. Oliver and Boyd, Edinburgh, pp. 223~233, 1968.
- Snodgrass RE: Principles of insect Morphology, McGraw Hill, New York, pp. 347~388, 1935.
- Suzuki N, Ando H: Alimentary canal formation of the scorpion fly, *Panorpa pryeri* MacLachlan (Mecoptera; Panorpidae). Int J Insect Morphol Embryol 10 : 345~354, 1981.
- Wigglesworth VB: The principles of Insect physiology. 7th Ed. Methuen, London, pp. 476~552, 1972.
- Yu, CH: Comparative anatomy of the alimentary canal of the 4 species of Orthoptera. Korean J Entomol 10 : 13~20, 1980.
- Zacharuk RY: Ultrastructural changes in tissues of larval Elateridae (Coleoptera) infected with the fungus *Metarrhizium anisopliae*. Can J Microbiol 17 : 281~302, 1971.

### <국문 초록>

장수풀령이 (*Allomyrina dichotoma*; Dynastidae; Coleoptera)를 사용하여 종령 유충의 전장 상피를 구성하는 세포들에 대한 미세구조를 전자현미경으로 관찰하였다. 상피조직은 편상피 세포들이 단층의 점막상피를 이루었으며, 그 내면은 얇은 큐티클을 층으로 덮여 있었다. 상피세포의 유리면 원형질막은 미세옹모로 변형되었고, 기저 원형질막은 기저막주름이 접혀 "canaliculi"를 만들며 크게 발달한 사립체와 접해 있었다. 핵은 크게 발달하였고 세포질 내에는 발달한 사립체가 산재해 있었으며, 지질 및 단백질 과립과 글리코겐 입자들이 많이 축적되었다. 상피의 기저막은 여러겹으로 된 기저초를 이루고 있으며, 기저막 내 또는 섬유상 결합조직인 점막하조직내에는 기관지세포와 신경이 뻗어 있었다. 그리고 점막하 조직 바깥쪽에는 환상근과 종주근이 관찰되었다.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** The foregut epithelial cells are covered with endocuticle (EnCu), and epicuticle (EpCu). Apical plasma membranes are made of the microvilli (MV) "brush border". Lu: lumen. Bar indicates 1  $\mu$ m.

**Fig. 2.** Detail of cuticular intima of foregut epithelial cell. Epcuticles are formed into spines (arrow). Ba: bacteria, Lu: lumen, Bar indicates 0.5  $\mu$ m.

**Fig. 3.** Microvilli (Mv) of foregut cell under subcuticular space. EnCu: endocuticle, Bar indicates 0.5  $\mu$ m.

**Fig. 4.** Apical zone between the adjacent cells of the foregut epithelium. Which shows numerous mitochondria and lateral plasma membrane (LPM) are made convoluted sptate junction. Bar indicates 1  $\mu$ m.

**Fig. 5.** Numerous mitochondria (Mi) are seen in the cytoplasm of foregut cell. Bar indicates 1  $\mu$ m.

**Fig. 6.** Showing the large nucleus (Nu), lysosome (Ly) and numorous mitochondria (Mi) in the foregut epithelial cell. Bar indicates 1  $\mu$ m.

**Fig. 7.** Large lipid droplets (Lp) and protein droplets (Pr) in the basal region of foregut epithelial cell. Bar indicates 1  $\mu$ m.

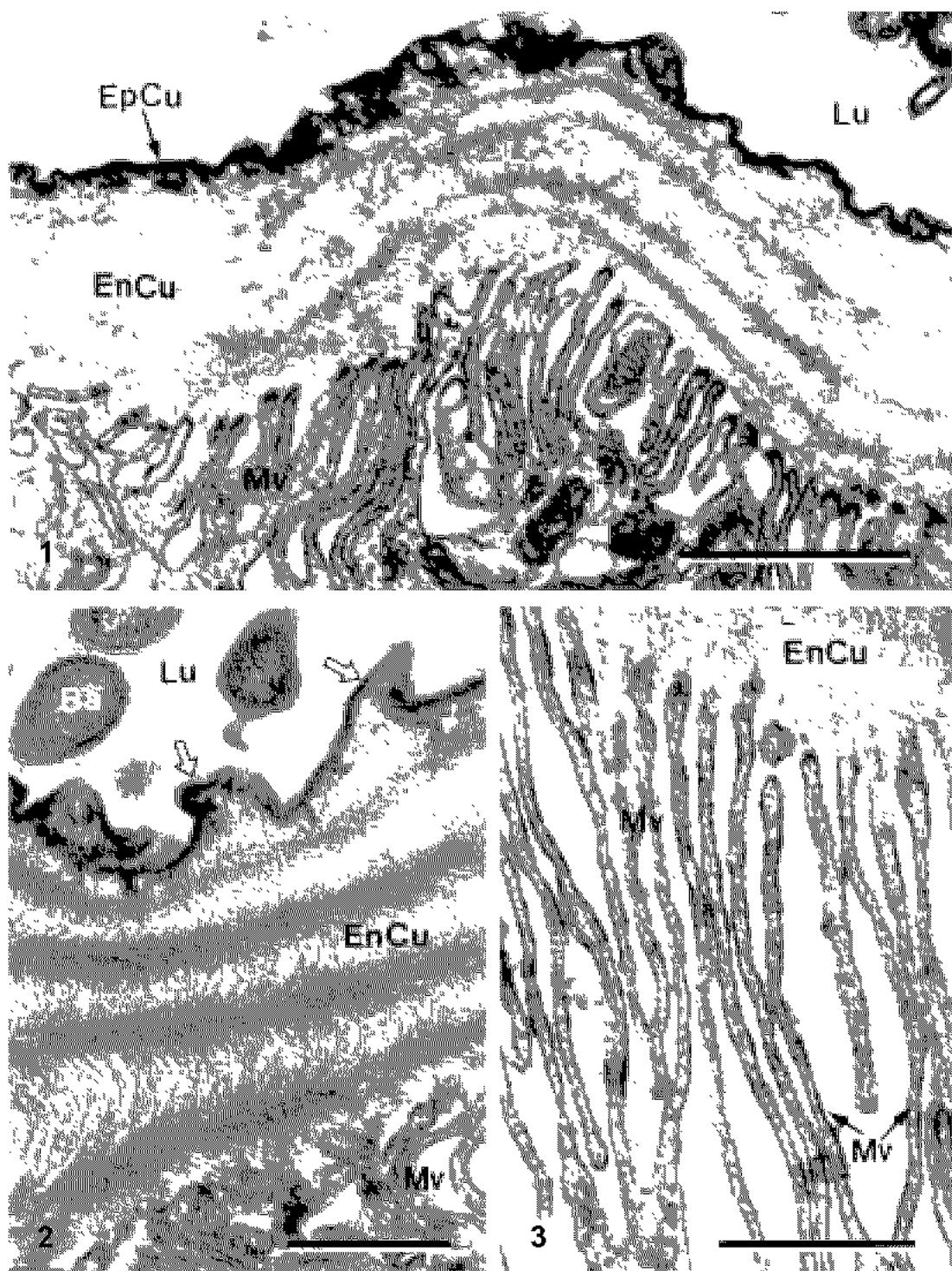
**Fig. 8.** Vacuole (Va), lipid droplets (Lp) and glycogen granules (Gl) are seen in the foregut epithelial cell. Bar indicates 1  $\mu$ m.

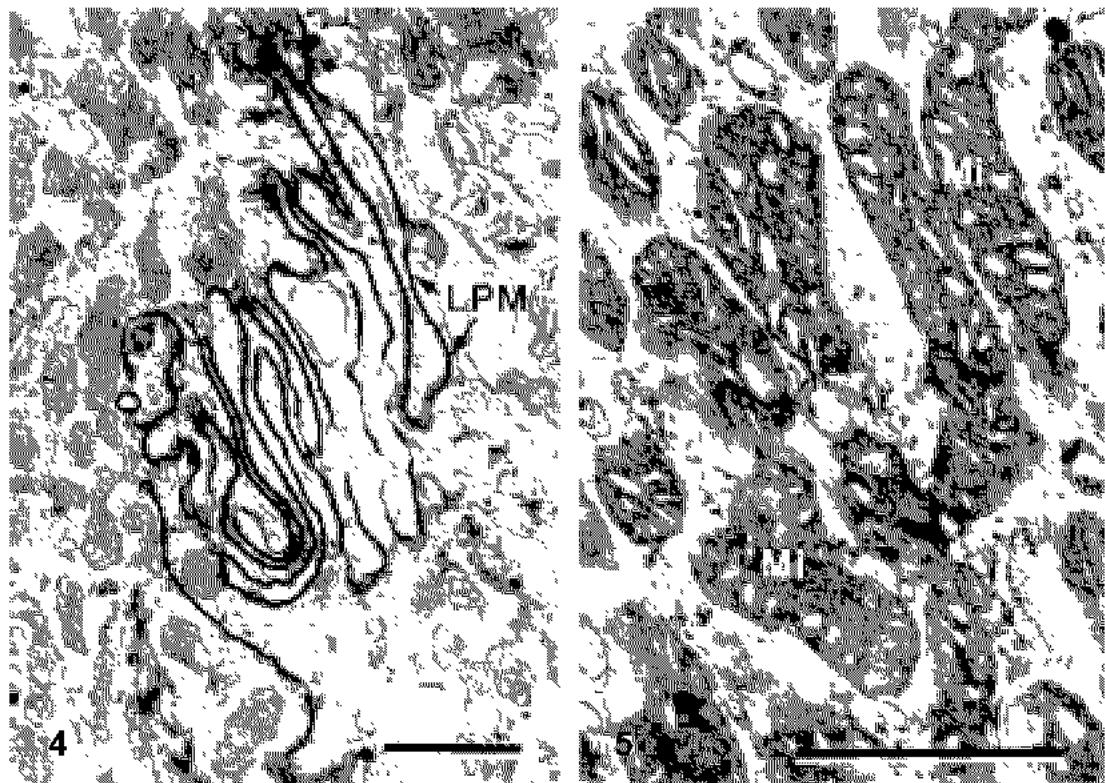
**Fig. 9.** Basal portion of the foregut epithelial cell. The basal plasma membrane are made infoldings, formed basal labyrinth (\*). BL: basal lamina, Mi: mitochondria. Bar indicates 1  $\mu$ m.

**Fig. 10.** Thacheoles (Tr) and axon (Ax) are seen within the basal lamina (BL). Nu: nicleus. Bar indicates 1  $\mu$ m.

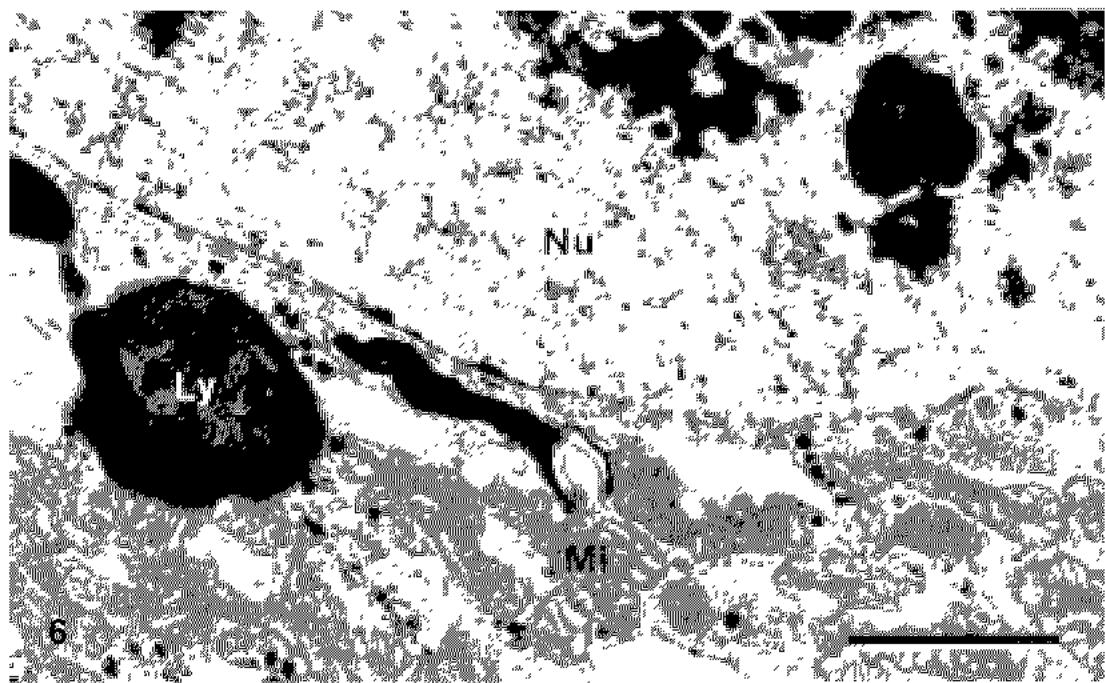
**Fig. 11.** Longitudinal section of the tracheole cell, showing the spiral thickening of the intima called a taenidium (arrow). BL: basal lamina, Va: vacuole. Bar indicates 1  $\mu$ m.

**Fig. 12.** Longitudunal section of the circular muscle bundle (Mu). Arrow; z-line. Bar indicates 1  $\mu$ m.





4



6

