

Voortplanting by *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta) en die invloed van diel-drien op aspekte daarvan.

Moya Lizle Froneman

B.Sc. Hons.

Verhandeling voorgelê as gedeeltelike

nakoming van die vereistes vir die graad

Magister Scientiae

in Dierkunde

in die Fakulteit Natuurwetenskappe van die

Potchefstroomse Universiteit vir Christelike

Hoër Onderwys.

Leier : Dr. S.A. Viljoen

Potchefstroom

April 1992



FABEL

Onder misbredie
in die reën uitgestrek,
voer twee erdwurms
'n spits gesprek

oor "ek" en "jy"
en "my kontrei".
oor "hier was eerste
my krot van klei".

'n Toevallige graaf
het toevallig gesak,
die twee erdwurms
middeldeer gekap :

Vler erdwurms
ruk slymerig voort -
die "ek's" en die "jy's"
twyfel waar hulle hoort.

In digter bredie
by die herontmoet
het elkeen beleef
homself gegroet.

REPRODUCTION OF E. EUGENIAE (OLIGOCHAETA)
AND THE INFLUENCE OF DIELDRIN.

ABSTRACT

The reproductive organs of the tropical vermicomposting earthworm species *Eudrilus eugeniae* was investigated. The ovaries and oviducts contain sperms, thus making it highly probable that fertilisation is internal.

Spermatogenesis was studied at the ultrastructural level. Spermatogonia, spermatids and mature sperm are described. The general steps of spermatogenesis in *E. eugeniae* are basically similar to those found in many other annelids.

An ultrastructural study of the mature sperm of *E. eugeniae* showed an elongated sperm cell, typical of the Oligochaeta. From SEM studies could be seen that the sperm possesses a very long, well developed flagellum with a typical "corkscrew" head. TEM studies showed the presence of a characteristic vesicle-type acrosome, cylindrical nucleus and spirally curved mitochondrion with six lobes. The flagellum have a typical 9+2 microtubule arrangement.

During the present study the influence of the organochlorine, dieldrin, on the reproduction of *E. eugeniae* was investigated. This was done by exposing adult, clitellate specimens to the toxin. The contact filter paper method was used, and a number of replicates of the worms were exposed for 48 hours to concentrations of 0,154; 0,462; 0,77 and 1,54 $\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$ of dieldrin. The exact amounts of dieldrin which had penetrated the bodies of the worms were determine by means of gas chromatography.

In comparison to the "normal" spermatozoa of the control group, no changes in sperm morphology in specimens exposed to 0,154 or 0,462 $\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$ were observed. In the sperm from the higher concentration exposures, however, the TEM work showed definite damage to the nuclei of a number of sperm (up to 10% in the case of the 1,54 $\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$ exposure). Under the SEM the sperm from the two lowest concentrations also appeared normal, but an abnormal curling and folding of the sperm flagella was observed in a number of spermatozoa of the worms exposed to the higher concentrations of dieldrin.

The gross damage observed in the nuclei of some of the spermatozoa might directly damage the genetic material within the spermatozoa and this could seriously influence reproduction or cause malfunctions in offspring if these sperm remained viable. The effect of malfunction of the flagella on the other hand could have an effect on fertilization. Further experimental work is, however, needed to determine the effect of dieldrin on these processes of reproduction.

INHOUDSOPGAWE

1	INLEIDING.....	1
2	MATERIAAL EN METODES.....	12
2.1	<i>Eudrilus eugeniae</i> (Kinberg 1867) as proefdier..	12
2.2	Aanhou en versorging van eksperimentele diere..	15
2.3	Studie van uitwendige- en inwendige morfologie van voortplantingstrukture van <i>E. eugeniae</i>	15
2.4	Mikrotegniek.....	16
2.5	Versameling van spermatozoa en ontwikkeling- stadia tydens spermatogenese.....	17
2.6	Fiksering en voorbereiding vir Elektronmikro- skopie (SEM en TEM).....	18
2.7	Die keuse van dieldrien as gifstof.....	19
2.8	Vorbereiding van glasware vir blootstelling aan dieldrien.....	21
2.9	Vorbereiding van dieldrienstandaarde en 'n stamoplossing.....	21
2.10	Die Kontakfiltreerpapiertoets.....	22
2.11	Ekstraksie en analise van dieldrien.....	23

2.12	Gaschromatografie.....	24
3	RESULTATE EN BESPREKING.....	26
3.1	Morfologie van die voortplantingstrukture van <i>E. eugeniae</i>	27
3.2	Beskrywing van die proses van spermatogenese...	41
3.3	Die morfologie van die spermatozoa van <i>E.</i> <i>eugeniae</i>	48
3.4	Die invloed van verskillende konsentrasies dielddrien op eksemplare van <i>E. eugeniae</i>	58
4	OPSOMMENDE AFLEIDING.....	68
5	DANKBETUIGINGS.....	70
6	LITERATUURVERWYSINGS.....	72
7	BYLAE.....	82

INLEIDING

Voortplanting is nodig vir die voortbestaan van enige spesie. Die voortplanting van verskeie organismes is ook van ekonomiese belang vir die mens, veral waar die organismes as 'n bron van voedsel dien. In sommige gevalle word die organisme nie self benut nie, maar wel stadia in die voortplantingsproses, byvoorbeeld eiers en sade. Die toestand waarin 'n ekosisteem verkeer hang ook grootliks af van die voortplantingskoers van die menigte spesies waaruit dit saamgestel is (Vouk & Sheehan 1983). Invertebrate maak 'n groot persentasie van die gemeenskappe in ekosisteme uit en daar is nie veel bekend oor hul voortplanting nie aangesien 'n baie klein persentasie van hulle as ekonomies belangrik beskou

word. Invertebrate speel egter wel 'n belangrike rol in verskeie komponente van die ekosisteem. Nematode en erdwurms is potensieel nuttige gronddiere en krustasieërs speel weer 'n belangrike rol in akwatiese-, vars- en mariene voedselkettings. Daar bestaan ook 'n direkte en indirekte wisselwerking tussen invertebrate en die mens. Invertebrate dien as voedsel vir die mens en bestuif plante, terselfdertyd vernietig ander oeste en verlaag die kwaliteit van ons lewe as gevolg van hulle parasitiese leefwyse (Vouk & Sheehan 1983).

Die mens se voortbestaan word in 'n groot mate bepaal deur die invloed van invertebraatwisselwerking op die gesondheid asook op ander hulpbronne wat vir die mens van belang is. Benadeling van voortplantingsprosesse van invertebrate kan dus ook nadele vir ander organismes, soos die mens inhou. Die mens is besig om die kringlope van stowwe in die natuur omver te werp as gevolg van sy eksploitering van hulpbronne, en besoedeling te veroorsaak deur die vrystel van omgewingskontaminante. Hierdie eksploitering en besoedeling speel 'n rol daarin om natuurlike prosesse, waaronder voortplanting by invertebrate, te benadeel.

Ten einde vas te stel of bepaalde omgewingskontaminante wel 'n nadelige invloed op voortplanting by sodanige organismes uitoefen, is daar tydens die huidige studie op een van die invertebraat-filums, naamlik die Annelida gekonsentreer. Die komposterende erdwurmspesie, *Eudrilus eugeniae*, 'n verteenwoordiger van die klas Oligochaeta, is as model gebruik.

Erdwurms as potensieel nuttige gronddiere is nog nie genoegsaam bestudeer met betrekking tot die invloed van gifstowwe op hulle lewensprosesse en hulle weerstand teen, en invloed op, die aanwesigheid van skadelike gifstowwe nie. Die vermoë wat erdwurms besit om organiese materiaal in die grond in te werk is belangrik.

Die eenvoudige afbraakprodukte van hierdie organiese materiaal wat uiteindelik deur mikroörganismes teweeg gebring word, stel voedingstowwe wat noodsaaklik is vir plantegroei, beskikbaar (Evans & Guild 1947; Van Rhee 1965; Edwards & Lofty 1972). Erdwurms lewer dus 'n groot bydrae tot die verhoging van grondvrugbaarheid en speel 'n belangrike rol in die ekologie van terrestriële ekosisteme. Om hierdie redes is dit belangrik om 'n gesonde erdwurmbevolking in die grond te hê.

Erdwurms is ekologies naby die basis van die terrestriële voedselpiramide en is nie alleen sensitief vir sekere chemikalieë nie, maar het die vermoë om komponente soos organochlorien-insektisiede en swaarmetale in hul weefsels te konsentreer (Davey 1963; Edwards 1984). Hierdie chemikalieë vernietig selde die wurms, maar kan subletale effekte hê asook letale effekte op die wurms se predatore. Die stowwe kan ook opgeneem word in die weefsels van die predatore en ander diere wat hoër op in die voedselkringloop voorkom (Edwards 1984; Lofs-Holmin 1980; Lofs-Holmin & Boström 1988; Callahan 1988). Deur dus vas te stel watter nuwe-effekte bepaalde omgewingskontaminante op die erdwurms het, sou lig gewerp kon word op die nadele van sodanige stowwe in die totale omgewing.

Die uitwerking van 'n gifstof in 'n biologiese stelsel word die beste bepaal deur ondersoeke na die uitwerking daarvan op die individue in die stelsel, aangesien dit die individuele organisme is wat die gifstof uit die omgewing absorbeer, metaboliseer en daarna oordra na ander organismes.

Kommer oor die uitwerking van toksiese chemiese stowwe op die plant- en dierelêwe in die omgewing het gelei tot die ontwikkeling van 'n lewenskragtige nuwe studierigting, naamlik ekotoksikologie. Ekotoksikologie is 'n multidissiplinêre vakgebied wat die uitwerking van

gifstowwe op die natuurlike en mensgemaakte omgewing bestudeer. Dit handel oor die bestudering van die reaksies van organismes in die laboratorium en in veldstudies op vreemde stowwe in hulle omgewings. Soos wat die kanaries van ouds in myne gebruik is om die teenwoordigheid van giftige gasse te verklap, kan ander organismes in riviere en damme en in grond vroegtydig teen dreigende gevare waarsku. Ekotoksikoloë ontwikkel daarom toetse om versteurings in die gedrag van diere, veranderings in vrugbaarheid, vertraagde ontwikkeling en wangeskopenheid betyds waar te neem, omdat dit hele bevolkings kan beïnvloed en grootskaalse ekologiese gevolge kan hê (Reinecke 1991).

Die ontwikkeling van ekotoksikologiese evalueringsprosedures kom al 'n ver pad maar min vooruitgang is nog gemaak om 'n toets te ontwikkel wat maklik, goedkoop, herhaalbaar en ekologies relevant is ten opsigte van die grondsituasie (Edwards 1984; Callahan 1988; Goats & Edwards 1988). Sedert 1981 het die Europese Ekonomiese Gemeenskap sekere erkende toksikologiese toetse aanbeveel (Edwards 1984). Alvorens 'n substans bemark word moet dit hiervolgens eers onderwerp word aan 'n toksikologiese toets wat ekologiese data op 'n algtoets, 'n *Daphnia*-toets, 'n hoër planttoets, 'n vistoets, 'n toets vir spesie-akkumulators, 'n biograderingstoets en 'n toets op erdwurms insluit.

Erdwurms word as ideale toetsorganismes in die grondomgewing beskou aangesien hulle direk met die pestisie in die grond in aanraking kom, enersyds deur middel van voedselinname en andersyds deur direkte kontak met die besoedelde substraat (Lord, Briggs, Neale & Manlove 1980; Edwards 1984; Callahan 1988). Deur dus die uitwerking van 'n gifstof op hierdie diere te bepaal, kan heelwat afleidings ten opsigte van die toksisiteit daarvan vir die omgewing gemaak word.

Ten einde die invloed van omgewingskontaminante op die voortplantingstrukture en prosesse van organismes soos erdwurms te bepaal, is dit nodig dat die voortplantingsbiologie van die organismes onder gunstige toestande eers bekend moet wees. Die keuse van 'n proefdier het in die huidige ondersoek op *E. eugeniae* geval, aangesien heelwat kennis reeds oor bogenoemde aspekte van hierdie dier beskikbaar is. Hierdie erdwurmspesie het ook 'n relatief kort lewensloop, 'n hoë voortplantingspotensiaal en die maklike teling en aanhouding daarvan, maak dit ideaal geskik om as toetsorganisme te gebruik. Die algemene biologie en ekologie van hierdie spesie is reeds volledig nagevors (Neuhauser, Kaplan & Hartenstein 1979; Graff 1981, 1982; Loehr, Neuhauser & Malecki 1985; Bano & Kale 1988; Reinecke & Viljoen 1988; Viljoen & Reinecke 1989a, 1989b en 1989c).

Die oligogete is hermafrodities en besit dus beide manlike en vroulike voortplantingstrukture. Hierdie strukture is beperk tot die voorste segmente van die wurm. Die morfologie van die voortplantingstrukture van *E. eugeniae* is volgens Vati (1945), onder andere deur Beddard (1886, 1887) en Gates (1942) bestudeer. Beddard (1886, 1887) het klem daarop gelê dat die morfologie van die voortplantingstrukture van *E. eugeniae* nie ooreenstem met die voortplantingstrukture van ander Oligochaeta, byvoorbeeld die Lumbricidae nie. Volgens Vati (1945) het Beddard die bewering gemaak dat die manlike strukture soos die testis en semenvesikels ooreenstem met die van ander erdwurms, maar dat die vroulike strukture kenmerkend is ten opsigte van die kontinuïteit van die ovarium en die oviduk en die versmelting van die oviduk met die spermateka.

Vati (1945) het die voortplantingstrukture van *E. eugeniae* opnuut bestudeer. Hy het gevind dat die beskrywing van die testis, soos deur Beddard (1886, 1887) aangedui, nie korrek was nie en dat daar 'n aantal

strukture beide in die manlike en vroulike stelsels was wat tot op daardie tydstip nie intensief genoeg bestudeer is nie. Vati (1945) het gevind dat spermatozoa en ova gelyktydig in die oviduk van *E. eugeniae* voorkom. Dit kan dus 'n aanduiding wees dat inwendige bevrugting by hierdie spesie voorkom (Sims 1969 , 1987). Tydens die huidige studie is die morfologie van die voortplantingstrukture van *E. eugeniae* bestudeer deur meer moderne tegnologie (uitvoerige skandeer- en transmissie-elektronmikroskoopstudies) te gebruik.

Die studie het ook 'n ondersoek na spermatogenese en spermiogenese behels. Spermatogenese verwys na die proses van seldeling en die differensiasie wat 'n aanvang neem met die primordiale kiemselle en eindig met die produksie van die volgroeiende spermatozoa. Laasgenoemde stadium van die proses, waartydens die spermatiede differensieer sonder seldeling om spermatozoa te produseer, word spermiogenese genoem (Roosen-Runge 1977; Jamieson 1981; Eckelbarger & Grassle 1987). Daar is deur verskeie navorsers bevind dat omgewingskontaminante verskillende effekte op die spermatozoa van diere sowel as die mens kan hê. Voorbeelde hiervan is 'n verlaging in die spermatozoagetalle, afname in die motiliteit van die spermatozoa en morfologiese afwykings van die spermatozoa (Dinnel, Link, Stober, Letourneau & Roberts 1989; Nelson 1990; Alexaki, Samara, Alexopoulos, Tsafaris & Smokovitis 1990).

Sedert die sestigerjare toe wangeskape babas gebore is nadat moeders thalidomiede gebruik het, is die fout hiervoor dikwels net by die moeder gesoek. Navorsing het egter getoon dat die omgewingskontaminante die manlike sowel as die vroulike organismes kan beïnvloed, en die aandag word dus nou ook na die manlike kant gelei. Die vraag kan gevra word wat die manlike organisme of manlike geslagselle se rol en bydrae kan wees tot die voorkoms van wangeskape nakomelinge. Daarom is daar juis in

hierdie studie gekyk na die invloed van 'n omgewingskontaminant, naamlik dieldrien, op die spermatozoa van *E. eugeniae*. Die spermatozoon sou ook as 'n aanvaarbare model vir die graad van besoedeling kan dien (Nelson 1990). Die spermatozoon bevat kenmerkende eienskappe van die senuweesel, sowel as die spiersel en dit wil voorkom of die spermatozoa dus noodsaaklike modelle vir die ondersoek op sellulêre toksisiteit kan wees (Nelson 1990). Dit kan gebruik word as 'n "tipiese" sel tydens toksikologiese toetse.

Die invloed van verskillende kontaminasievlakke van dieldrien op voortplanting en aspekte daarvan is dus bestudeer. Omgewingsvergiftiging word onder andere veroorsaak deur chemikalieë wat as plaagbeheermiddels aangewend word. Vele probleme het egter ontstaan as gevolg van die wangebruik van sekere middels, veral die gechlloreerde koolwaterstowwe soos DDT, dieldrien en 2,4D wat feitlik onvernietigbaar is en in ekosistels ophoop, sodat dit gevaar inhou vir mense en organismes in die algemeen (Nash & Harris 1973; Edwards 1984; Lofs-Holmin & Boström 1988; Barlin-Brinck 1991). Die neue-effekte wat voortspruit uit die gebruik van die gechlloreerde koolwaterstowwe het eers in die laat vyftiger- en vroeë sestigerjare bekend geword, nadat hoë residuvlakke in die grond gerapporteer is. Die gechlloreerde koolwaterstowwe het 'n baie lae wateroplosbaarheid en dit loog nie maklik uit die grond nie. Wat veral kommer gewek het was dat tekens van die gechlloreerde koolwaterstowwe wat in dierweefsel gestoor en gekonsentreer word gevind is (Edwards 1970; Edwards & Loftly 1972; Edwards & Thompson 1973; Johnson & Finley 1980). Navorsers soos Doane (1962), Edwards (1970) en Davis (1971) het gevind dat aldrin, dieldrien, DDT en heptachloor in erdwurms voorgekom het in konsentrasies wat tot tien keer hoër was as die van die omringende grond.

Daar is verskeie metodes ontwikkel vir die blootstelling van erdwurms aan toksiese chemikalieë (Tabel 1).

Tabel 1. Erdwurmtoksikologiese toetse (laboratorium)

-
- toetse met na-verwante spesies (*Tubifex*)
 - inspuiting
 - voeding
 - immersie
 - kontak-filtreerpapier*
 - natuurlike medium
 - kunsmatige medium*
 - "artisol"*
-

* = metodes wat deur die EEG (Europese Ekonomiese Gemeenskap) aanvaar word (Heimbach 1988).

Volgens Edwards (1984) toon bogenoemde metodes verskeie tekortkominge en voldoen nie aan die vereistes vir 'n korrekte aanvaarbare ekotoksikologiese toets nie. Daar is 'n aantal vereistes vir die ontwikkeling van 'n ekotoksikologiese toets. Eerstens moet daar 'n deeglike databank bestaan oor die biologie, ekologie en *omgewingsbenodigdhede* van die spesie wat gebruik gaan word as toetsorganisme. Die organisme moet ook maklik aangehou en geteel kan word in 'n laboratorium (soos reeds gemeld voldoen *E. eugeniae* aan hierdie vereistes). Kulture moet beskikbaar wees en die blootstelling aan die chemikalieë moet aanvaarbaar en verteenwoordigend wees, want 'n toetsorganisme wat té sensitief is vir chemikalieë is nie bruikbaar in toetsprogramme nie.

Tweedens moet die toetsmetode maklik, goedkoop, vinnig, relevant en herhaalbaar wees en dit moet maklik resultate oplewer. Erdwurms kan blootgestel word aan toksiese chemikalieë in die akwatiese fase (wanneer die chemikalieë oplos in die kapillêre water wat die gronddeeltjies omring) of deur direkte kontak met die

chemikalieë op die oppervlak van die blootstellingsmedium. Albei toetse kan waardevolle informasie verskaf (Edwards 1984). Die bewaring en beskerming van die bodem is dus onder andere afhanklik van die beskikbaarheid van eenvormige toetse om omgewingstoksitasiteit van chemikalieë te bepaal.

Die toetsmetode wat in hierdie studie gebruik is, is die Kontakfiltreerpapiertoets. Die toets is gestandaardiseer en word deur die EEG en die OESO (Organisasie vir Ekonomiese Samewerking en Ontwikkeling) aanvaar as ekotoksikologiese toets (Edwards 1984). Die toets berus op die direkte blootstelling van die wurms aan die gifstof vir 'n periode van 48uur, in 'n donker omgewing. Die toets is vinnig, sensitief en groot getalle diere kan gelyktydig aan die gifstof blootgestel word (Edwards 1984; Robert & Dorrough 1984).

Die omgewingskontaminant wat tydens die huidige studie gebruik is, was dieldrien. Dieldrien is in die verlede wêreldwyd vir huishoudelike en landboukundige doeleindes soos die bekamping van insekte waaronder termiete, miere en sprinkane gebruik is (Barlin-Brinck 1991). Sedert 1964 is die gebruik van dieldrien en aldrien in die Verenigde Koninkryk beperk (Edwards 1970). Tans is dit ook die geval in die meeste ontwikkelde lande, so ook in Suid-Afrika. 'n Probleem wat egter 'n rol speel is dat pestisiede maklik internasionale grense kan oorskry (Barlin-Brinck 1991). Riviere word byvoorbeeld gedeel, voëls migreer van een plek na 'n ander en daar is atmosferiese vervoer tussen gebiede. Suid-Afrika word begrens deur buurstate soos Zimbabwe waar DDT gebruik word en Botswana wat dieldrien gebruik vir die bekamping van tsetsevlieë (Barlin-Brinck 1991). Die moontlikheid bestaan dus dat pestisiede op een van bogenoemde wyses Suid-Afrika kan binnedring. Dieldrien is ook chemies baie stabiel en degradeer baie stadig. Volgens Nash & Harris (1973) is 23,3% dieldrien 15 jaar na toediening

nog steeds in die grond aanwesig. Dit is juis hierdie eienskappe wat dit belangrik maak dat dieldrien as omgewingskontaminant bestudeer word. Dit is gevolglik ook belangrik om te weet watter effekte hierdie omgewingskontaminant op nuttige gronddiere, soos byvoorbeeld erdwurms, het.

Akute toksikologiese toetse is ontwerp om die konsentrasie van omgewingskontaminante wat nadelige effekte (gedurende 'n korttermyn blootstelling) op die toetsorganisme het, te bepaal deur letale waardes te gebruik die LD50 te bepaal. Om standarde vir omgewingsbeskerming op hierdie wyse daar te stel is egter nie so maklik nie omdat daar nie voorsiening gemaak word vir subletale/vertraagde effekte nie. Die resultate van 'n akute toets kan dus nie 'n antwoord gee op die vraag wat is die omgewingsaanvaarbare konsentrasies van chemikalieë tydens toestand van chroniese blootstelling is nie. Die subletale effekte wat 'n chemikalie by 'n lae konsentrasie op die gedrag en voortplanting kan hê, word nie deur LD50 waardes aangedui nie (Venter & Reinecke 1988). Tydens die huidige studie is daar meer klem op die chroniese of subletale effekte gelê.

Die algemene gebruik van chemiese metodes om peste en plae te bestry, het noodwendig tot die ontwikkeling van analitiese metodes gelei om die vlakke van die chemiese stowwe in die omgewing, te bepaal. In die huidige studie is daar van gaschromatografie, Mallory se drievoudige kleuringstegniek, ligmikroskopie, SEM en TEM gebruik gemaak.

Die doel van die huidige studie was dus om eksperimentele ondersoeke uit te voer om eerstens die morfologie van die voortplantingstrukture van die erdwurmspesie te bestudeer. Tweedens is die proses van spermatogenese en die morfologie van die spermatozoa van hierdie spesie

ondersoek. Derdens is die invloed van verskillende kontaminasievlakke van dieldrien op die voortplanting, en verskeie aspekte daarvan, bepaal.

MATERIAAL

& METODES

2.1 Eudrilus eugeniae (Kinberg 1867) as proefdier

2.1.1 Klassifikasie

Filum : Annelida

Subfilum : Clitellata

Klas : Oligochaeta

Orde : Haplotaxida

Suborde : Lumricina

Superfamilie : Megascolecoidea

Familie : Eudrilidae

Subfamilie : Eudrilinae (Gates 1972)

2.1.2 Algemene morfologie

Die lengte van die wurms wissel van 90-140mm en is 5-8mm in omtrek. Die aantal segmente kan wissel van 145-196. Die setae is gepaard. Die klitellum kom voor tussen segmente XV - XVIII en is ventraal minder ontwikkel. Die manlike openinge is gepaard en ovaalvormig, 'n peniale seta is afwesig by hierdie spesie. Die vroulike en die spermateka-openinge is gepaard en spleetvormig. 'n Aaneenlopende spysverteringskanaal kom voor. Gepaarde testissakke word in segmente X en XI aangetref. Gepaarde ovariums word in segment XIII aangetref en hulle is in verbinding met die oviduk wat uitloop in die spermateka (Sims & Gerard 1985).

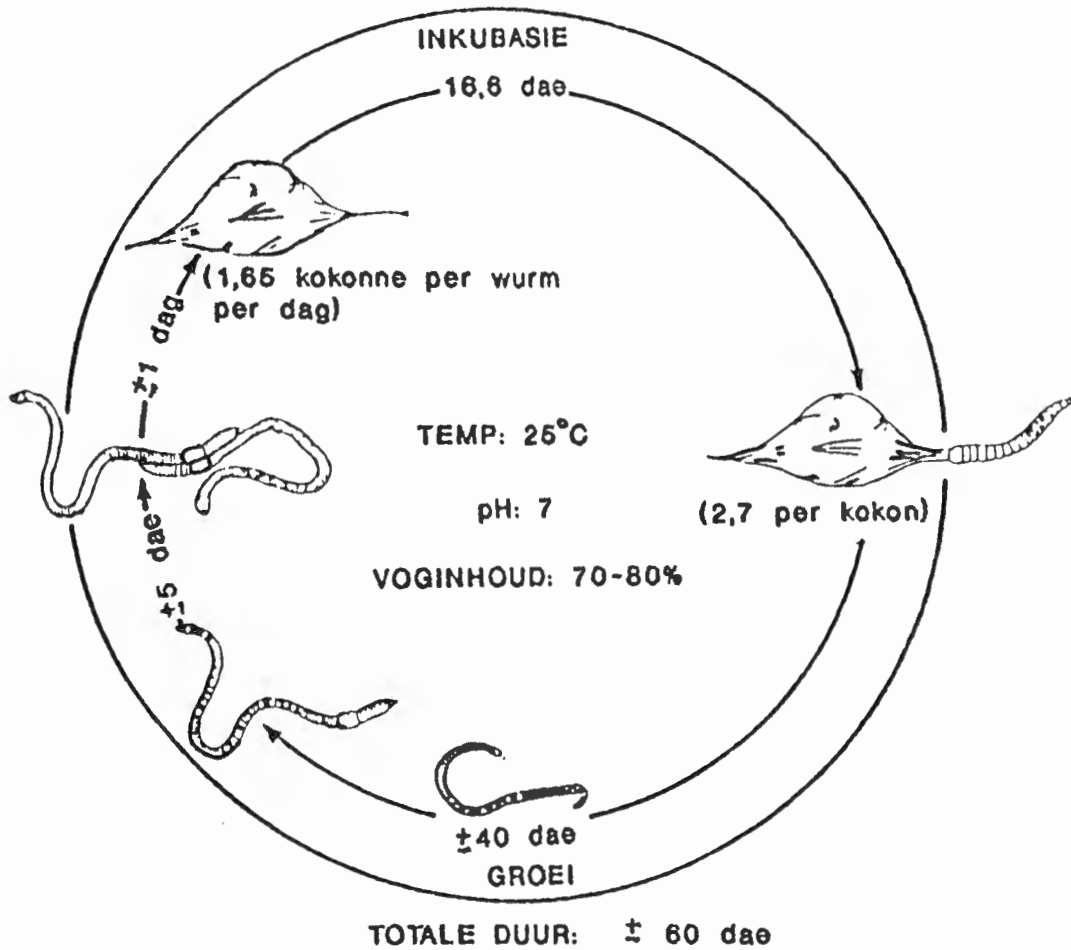
2.1.3 Verspreiding

E. eugeniae is 'n Tropiese Wes-Afrika (Nigerië) komposterende wurm. Die spesie het ooswaarts versprei vanaf Afrika na Indië en Nieu-Seeland en weswaarts na die Tropiese dele van Amerika, spesifiek na die Atlantiese en Karibiese eilande. Die spesie het ook gekoloniseer in die suide van die Verenigde Koninkryk, waar dit vir boerderydoeleindes gebruik word. *E. eugeniae* staan ook algemeen bekend as die "African Nightcrawler", omdat die wurms in die nag baie aktief rondbeweeg (Sims & Gerard 1985). Die wurms wat vir die doel van die studie gebruik is, is oorspronklik vanaf Prof. O. Graff van Braunschweig in Wes-Duitsland verkry. Hy het ook die wurms as *E. eugeniae* geïdentifiseer.

2.1.4 Lewensloop

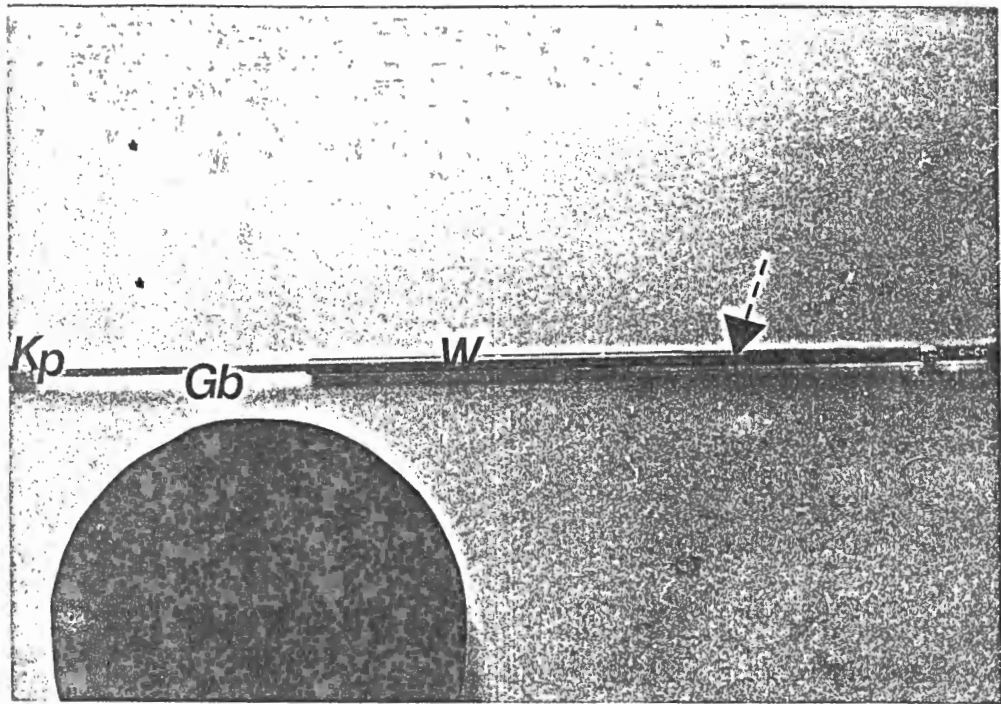
Verskeie navorsers onder andere Neuhauser, Kaplan & Hartenstein 1979; Graff 1981, 1982; Loehr, Neuhauser & Malecki 1985; Rodriguez, Canetti, Reines & Sierra 1986; Reinecke & Viljoen 1988; Viljoen & Reinecke 1989a, 1989b, 1989c) het die spesie se lewensgeskiedenis bestudeer. 'n

Kort opsomming van die lewensloop van *E. eugeniae* word in figuur 1 weergegee.



Figuur 1. Diagram van die lewensiklus van *E. eugeniae* by 'n temperatuur van 25°C in beesmismedium met 'n voginhoud van 70-80% (Viljoen & Reinecke 1989a).

Die wurms bereik geslagsrypheid na 40-50 dae en die klitellum ook sigbaar vanaf 25-30 dae. Geen slymband word gevorm gedurende kopulasie nie en die wurms paar deurdat die een wurm sy kopulasieorgaan in die ovo-



Figuur 2. Die apparaat wat gebruik is om die hantering van die wurms te vergemaklik vir fotografiese doeleindes. Pylpunt dui op die wurm binne-in die glasbuis.

Gb = glasbuis
Kp = kurkprop
Sw = swart plastieksak
W = wurm

spermateka opening van die ander wurm inplaas (Sims & Gerard 1985). Die kokonne van *E. eugeniae* het 'n onreëlmatige, ovaal vorm, met gepunte veselagtige eindpunte. Direk na vorming verander die sagte wit kleur van die kokon na oranje-bruin. Die kokon word al hoe bruiner tot donkerbruin net voordat dit uitbroei (Viljoen & Reinecke 1989a).

2.2 Aanhou en versorging van eksperimentele diere

Klitellate eksemplare van *E. eugeniae* is in plastiek teelbakke (5000cm^{-3}) in 'n Specht Scientific klimaatbeheereenheid aangehou. 'n Konstante temperatuur van 25°C , 'n relatiewe humiditeit van 70-75% en 'n voginhoud van 70-80% in die medium is tydens die eksperiment gehandhaaf. Die wurms is weekliks met vars beesmis gevoed, omdat suksesvolle resultate met beesmis as voedingsmedium verkry is deur Graff (1981), Knierieman (1984) en Viljoen & Reinecke (1989b). Kokonne is versamel en vyf kokonne is per sel van 'n multiselhouer wat met beesmis gevul is geplaas. Beesmis is as medium gebruik omdat daar deur Viljoen & Reinecke (1989b) gevind is dat dit die geskikste medium is vir die uitbroei van kokonne van *E. eugeniae*. Die medium in die houer is elke tweede dag met 'n breë spatel deursoek. Die pasuitgebroeide wurms is verwyder en in glasbottels (600cm^{-3}) met beesmismedium geplaas. Die wurms is toegelaat om in die glasbottels volwassenheid (klitellaatheid) te bereik.

2.3 Studie van die uitwendige en inwendige morfologie van die voortplantingstrukture van *E. eugeniae*

Die uitwendige geslagsopeninge, naamlik die manlike en ovo-spermateka openinge is bestudeer deur van 'n metode wat Thielemann (1986) beskryf het, gebruik te maak (fig. 2). Die metode vergemaklik die hantering van die wurms en is ook geskik vir fotografiese doeleindes,

aangesien die organisme se beweeglikheid hierdeur beperk word. Die wurms is skoongemaak deur hulle met gedistilleerde water af te spoel. 'n Glasbuis met 'n omtrek van min of meer die van die wurm is gebruik en is uitgespoel met gedistilleerde water. Sodoende is die blootstellingsoppervlakte klam gemaak. Die wurm is geprikkel om in die glasbuis in te beweeg deur dit met die hand aan te raak.

Die wurm het kop eerste in die glasbuis ingegaan en om toestande vir die wurm gunstiger te maak, is 'n swart plastieksak oor die glasbuis gevou om sodoende 'n donkereffek te bewerkstellig, aangesien die wurms heftig negatief op skerp lig reageer deur daarvan af te probeer weg beweeg. Twee kurkproppe is aan weerskante van die glasbuis ingedruk om te verhoed dat die wurm uit die glasbuis kon kruip. Die posisie van die geslagsopeninge is aangeteken en dit is met 'n Wild fotografiese stelsel, wat aan 'n Wild Stereomikroskoop gekoppel is, gefotografeer.

Die inwendige voortplantingstrukture is bestudeer deur die wurms met behulp van tungstennaalde te dissekteer. Die strukture is met 'n Wild fotografiese stelsel, wat aan 'n Wild Stereomikroskoop gekoppel is, gefotografeer. Die manlike en vroulike voortplantingstrukture is verwyder en is voorberei vir skandeer- en transmissie-elektronmikroskopie (SEM & TEM). Tydens die huidige studie is daar meer aandag gegee aan die manlike strukture wat spermatozoa bevat, met klem op die testissakke en die semenvesikels.

2.4 Mikrotegniek

Tydens die huidige studie is dit noodsaaklik geag om die tipe weefsel waaruit die voortplantingstrukture bestaan te bepaal, om sodoende die funksies van die verskeie strukture verklaar. Volwasse wurms is vir die ondersoek

gebruik en hulle is vir ten minste 24uur op klam filtreerpapier geplaas om sodoende hul spysverteringskanaal te ledig. Die wurms is in Bouin se fikseermiddel (kyk bylae) geplaas vir 'n verdere 24uur. Die wurms is in stygende alkoholreekse gedehidrateer en ingebed in was (Paraplast, vervaardig deur Monoject Scientific Inc. Ierland). Sneë van die wasblokkies, met die materiaal in, is met 'n American Optical "820" Spencer draaimikrotoom gemaak.

Die sneë is op 'n voorwerpglasie gemonteer en oornag op 'n warmplaat gelaat. Mallory se drievoudige kleurings-tegniek is gebruik om die sneë volgens die metode van Humason (1979) te kleur. 'n Dekglasie is bo-op gemonteer met DPX-monteerstof en dit is oornag gelaat om droog te word. Die strukture is met 'n Wild fotografiese stelsel, wat aan 'n Wild Stereomikroskoop gekoppel is, gefotografeer.

2.5 Versameling van spermatozoa en ontwikkelingstadia tydens spermatogenese

Vir die ondersoek na die spermatozoa is die testissakke , waarin die volwasse spermatozoa gestoor word met behulp van tungstennaalde verwyder. Vir die SEM studies is 'n enkele testissak op 'n voorwerpglasie geplaas. 'n Tweede voorwerpglasie is bo-op geplaas en deur die twee voorwerpglasies teen mekaar te druk is die spermatozoa uit die testissak geforseer. Die spermatozoa is daarna met behulp van 'n kwassie na 'n Nuclepore filtertjie met 'n maasgrootte van $0,45\mu\text{m}$ oorgedra.

Die spermatozoa is deurgaans met Todd se fikseermiddel bedek, omdat dit van kardinale belang was dat die materiaal, in hierdie geval die spermatozoa, nooit mag uitgedroog het nie en baie vinnig gepreserveer moes word. Vir die TEM studies is die volledige testissak in Spurr-hars (kyk bylae) ingebed.

Vir die ondersoek na die proses van spermatogenese is die semenvesikels verwyder. Die semenvesikels is op 'n voorwerpglasie geplaas en met behulp van twee naalde uitmekaar getrek. Gedeeltes van die semenvesikels is met behulp van 'n kwassie na 'n Nuclepore filtertjie met 'n maasgrootte van $0,45\mu\text{m}$ oorgedra. Die materiaal is vir SEM studies voorberei. Vir TEM studies is die volledige semenvesikels in Spurr-hars ingebed.

2.6 Fiksering en voorbereiding vir elektronmikroskopie (SEM & TEM)

2.6.1 Fiksering

Die wurms is in Todd se fikseermiddel geplaas en gedissekteer. Die manlike en vroulike voortplantingsstrukture is verwyder. Die materiaal is vir 'n minimum van twee ure in die fikseermiddel gelaat. Die materiaal is in 'n Na-kakodilaat buffer gewas ($3 \times 10\text{min}$). Die materiaal is gepost-fikseer in 1% Osmiumtetroksied vir een uur. Dit preserveer delikate sitoplasmiese dele en veroorsaak geen veranderinge by mitochondria en ander sensitiewe subsellulêre dele nie.

Die materiaal is daarna gewas in gedistilleerde water ($3 \times 10\text{min}$). Tussen elke stap van fiksering is deeglike was van die materiaal nodig omdat die verskillende chemikalieë moontlik met mekaar kon reageer. Die materiaal is daarna vir 30min behandel met 2% uranielasetaat. Die uranielasetaat reageer vinnig met proteïene en stabiliseer strukture voordat ekstraksie kan plaasvind.

Die materiaal is gedehidrateer deur dit agtereenvolgens vir 20min elk, in 'n reeks toenemende konsentrasies asetoon-oplossings van 50, 75, 95 en 100% te plaas. Dit is daarna twee keer in 100% asetoon geplaas sodat alle water met asetoon vervang kan word. Daar is gebruik

gemaak van 'n reeks van geleidelike toenames in asetoonkonsentrasies om vervorming en inkrimping van weefsels te voorkom. Dieselfde prosedure van fiksering tot en met 100% asetoon van materiaal is vir SEM en TEM gevolg.

2.6.2 Verdere voorbereiding vir SEM

Die materiaal is in gaashouertjies in 'n kritiespunt-drooghouer geplaas, waarna die houer gevul is met asetoon. Vloeibare koolstofdioksied is in die stelsel ingelaat en het die asetoon vervang. Sodra bogenoemde proses voltooi is, is die apparaat verhit (50°C) en deurdat die koolsuurgas in gasvorm vrygekóm het is die materiaal absoluut droog. Die droë materiaal is op knopies deur middel van kleefplakkertjies gemonteer en met koolstofgom geaard sodat daar geleiding tussen die voorwerp en die knopie kon wees. Daarna is dit onderskeidelik met koolstof en goud-palladium (stroomsterkte = 5mA) bedamp en in 'n Cambridge 250 SEM ondersoek by 'n werkspanning van 20KV en mikrograwe is geneem.

2.6.3 Verdere voorbereiding vir TEM

Die materiaal is in Spurr se hars (kyk bylae) ingebed. Die 100% asetoon is met 'n mengsel van asetoon : Spurr (2:1 ;1:1) en Spurr : asetoon (3:1) vervang. Laastens is dit met 100% Spurr vervang en die materiaal is gelaat om in die houertjie af te sak. Dit is by 70°C gepolariseer, blokkies is afgewerk en sneë van 17µm is met 'n Ultracut E (Reichert-Jung) gemaak. Die sneë is vir 20min met uranielasetaat en vir 5min met loodsitraat gekleur. Die roostertjie is in 'n Phillips CM 10 TEM geplaas en daar is by 'n werkspanning van 100KV gewerk en mikrograwe is geneem.

(isomeer) en isodrien bekend as die gechlloreerde plaagdoders of gehalogeneerde koolwaterstowwe.

2.7.2 Chemiese eienskappe en die werking van dieldrien

Die smeltpunt van dieldrien is 175°C tot 176°C en die dampdruk $1,78 \times 10^{-7}$ mmHg by 20°C. Dit is vir praktiese doeleindes onoplosbaar in water (0,186mg/kg by 25°C tot 29°C), slegs gedeeltelik oplosbaar in petroleumprodukte, goed oplosbaar in asetoon en tolueen (41g/100ml tolueen by 20 °C) en redelik oplosbaar in aromatiese oplosmiddels. Volgens Martin (1971) is dieldrien stabiel ten opsigte van akalië, swak sure en lug.

Dieldrien is 'n persisterende nie-sistemiese plaagdoder met hoë kontak- en maagaktiwiteit vir die meeste insekte. Volgens Martin (1971) is die akute orale dosis LD50 vir rotte 46mg/kg en die akute dermale LD50 10mg/kg tot 102mg/kg (Johnson & Finley 1980).

2.8 Voorbereiding van glasware vir blootstelling aan dieldrien

Daar is voorsorg getref om alle glasware wat gebruik is eers vooraf chemies skoon te maak (om sodoende kontaminasie te voorkom). Die glasware is eers vir 'n paar uur in 'n waterbad wat Extran (Merck art. no. 7553 MA 02 neutraal) bevat het, gespoel. Die temperatuur van die waterbad is op 50°C gestel.

Nadat die glasware uit die Extran-bad gehaal is, is dit met chroomsuur gespoel, ten einde van oorblyfsels van wurms of vuiligheid ontslae te raak. Die glasware is vervolgens met kraanwater, gedistilleerde water, asetoon en hekseen gespoel. Glasware wat goed droog is, is gebruik.

2.9 Voorbereiding van dieldrienstandaarde en 'n stamoplossing

Vir die voorbereiding van dieldrienstandaarde en stamoplossings is 100% tegniese dieldrien wat deur die Shell Chemicals SA. (Emds.) Bpk. verskaf is, gebruik. 'n Stamoplossing van 100mg/l is soos volg berei:

'n Volumetriese fles (250ml) is gebruik, 25mg dieldrien is noukeurig met 'n analitiese balans (Sauter 414) afgeweg en na die volumetriese fles oorgedra. Die volumetriese fles is versigtig met tolueen tot by die merk gevul. Vanuit die stamoplossing is verskillende blootstellingskonsentrasies verkry. Die verskillende blootstellingskonsentrasies word in tabel 2 weergegee.

Tabel 2. Die verskillende blootstellingskonsentrasies ($\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$) waaraan die eksemplare van *E. eugeniae* blootgestel is.

Blootstellingskonsentrasies ($\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$)

0,154 $\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$
0,462 $\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$
0,77 $\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$
1,54 $\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$

2.10 Die Kontakfiltreerpapiertoets

2.10.1 Toetshouers en toetskondisies

Glasbuis met 'n deursnee van 2,2cm en 'n hoogte van 8,5 cm is uitgevoer met Whatman No. 1 filtreerpapier (9,5cm x 6,8cm; oppervlakarea = 65cm^2). Dit was nodig om die



Figuur 3. Eksperimentele opstelling om die filtreer-
papier te droog nadat dit met toluen benat
is.

oppervlakte van die filtreerpapier te bepaal om sodoende presies te weet hoeveel milliliter van die vloeistof (tolueen en dieldrien) nodig was om die filtreerpapier deeglik te benat. Die glasbuis is horisontaal geplaas in 'n Specht Scientific klimaatbeheereenheid by 'n konstante temperatuur van 25°C. Die toets is vir 'n periode van 48uur in die donker gedoen.

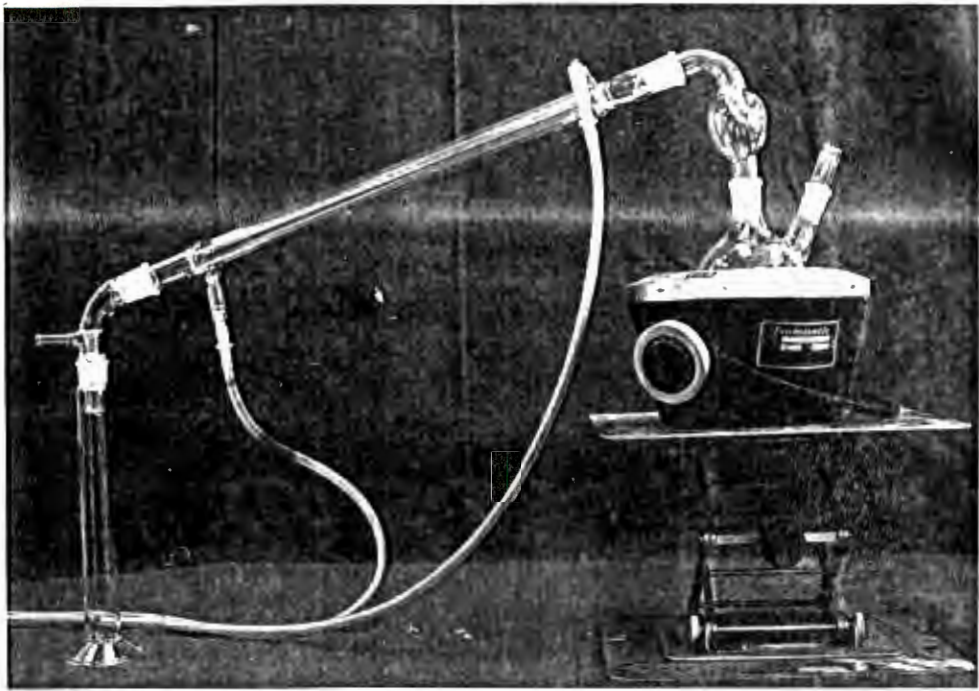
2.10.2 Toetsprosedure

Daar is 1ml van die verskillende blootstellingskonsentrasies van dieldrien, wat opgemaak is in die organiese oplosmiddel, tolueen, op die verskillende filtreerpapiere onderskeidelik gepipetteer. Die filtreerpapier van die kontrolegroep is slegs met 1ml tolueen benat. Die filtreerpapier is met behulp van papierkrammetjies aan 'n lyn opgehang wat in 'n trekkas opgestel is (figuur 3).

Die opstelling is vir 'n periode van 48uur gelaat sodat al die tolueen kon verdamp. Daarna is die filtreerpapier binne-in die glasbuis benat met 1ml Schoonspruit-minerale water (natruim = 4,0 ; kalsium = 58,0 ; sulfaat = 3,1 ; bikarbonaat = 260,0 ; magnesium = 34,8 ; kalium = 1,0 ; silikon = 9,3 ; chloried = 4,8; nitraat = 2,1 ; fluoried = 0,3 : in mg/1000ml).

Wurms van ongeveer 100 tot 120 dae oud is vir hierdie studie gebruik. Die biomassa van die wurms is individueel bepaal. Die groepe wurms het bestaan uit 'n kontrolegroep van 10 wurms en 6 blootstellingsgroepe bestaande uit 10 wurms elk.

Die wurms is vooraf vir 24 uur op klam filtreerpapier geplaas om sodoende hul spysverteringskanale te ledig aangesien die aanwesigheid van substraat in die spysverteringskanaal 'n besliste invloed op die persentasie opbrengs kan hê (die hoeveelheid van die



Figuur 4. Eksperimentele opstelling vir die stoomdistillasie van dieldrienmonsters.

gifstof aanwesig in die wurms na blootstelling) (Hartenstein, Hartenstein & Hartenstein 1981).

Een wurm elk is in die glasbuis, wat uitgevoer is met die behandelde filtreerpapier, geplaas en die glasbuis is met Paraplast toegemaak. Die glasbuis is horisontaal in 'n Specht Scientific klimaatbeheereenheid geplaas en vir 48uur in die donker gelaat. Na 48uur is die biomassa van die wurms bepaal. Die wurms is vir ekstraksie en analiseringsdoeleindes voorberei, asook vir TEM en SEM studies.

2.11 Ekstraksie en analise van dieldrien

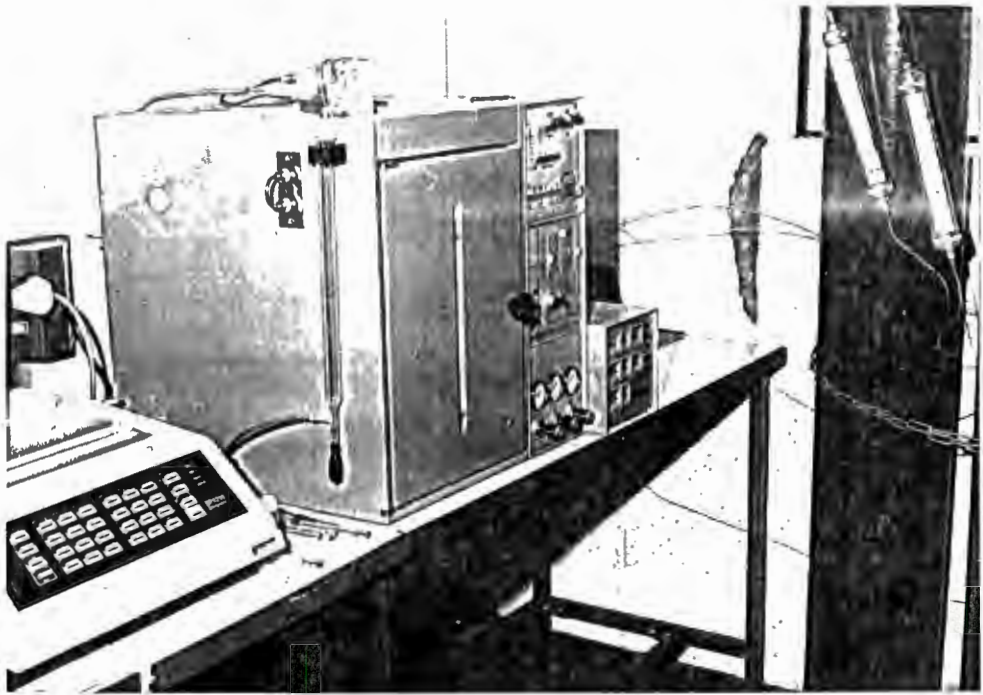
2.11.1 Stoomdistillasie van dieldrien uit erdwurmweefsel

Elke wurm is individueel oorgedra na 'n kroesie met anhidriese natriumsulfaat en met behulp van 'n stamper in natriumsulfaat fyngemaal. Die inhoud van die kroesie is daarna na 'n distilleerfles oorgedra. Die kroesie is met gedistilleerde water en daarna met hekseen uitgespoel, waarna 200ml gedistilleerde water bygevoeg is.

'n Paar korrels gewasde seesand (Kerck art. no. 7712) is onder in die distilleerfles geplaas en 'n waterkoeltoring is met behulp van 'n spatstuk aan die distilleerfles verbind. Die uitlaat van die koeltoring is met behulp van 'n ontvang-koppelstuk aan 'n 100ml maatsilinder verbind (figuur 4).

Die duur van die distillasietyd (die tyd wat dit vir 100ml distillaat geneem het om oor te distilleer en in die maatsilinder te versamel) was ongeveer 60 minute. Die verhittingsmantel is op posisie 8 gestel.

Die inhoud van die maatsilinder (water, dieldrien en hekseen) is geskud en gelaat totdat die inhoud geskei het



Figuur 5. Die Carlo Erba gaschromatograaf en Waters integreerder wat vir die analise van dieldrien gebruik is.

in 'n boonste hekseen- en 'n onderste waterige fase. Die boonste hekseenfase is met behulp van 'n pipet oorgedra na 'n rondeboomfles. Die prosedure is drie keer herhaal. Die hekseen is in die rondeboomfles gelaat om te verdamp. Hierna is 3ml hekseen in die rondeboomfles gepipetteer en die fles is gerol sodat die dieldrien in die hekseen kon oplos. Die hekseen waarin die dieldrien opgelos was, is met behulp van 'n Pasteurpipet na 'n Kimax-flessie oorgedra.

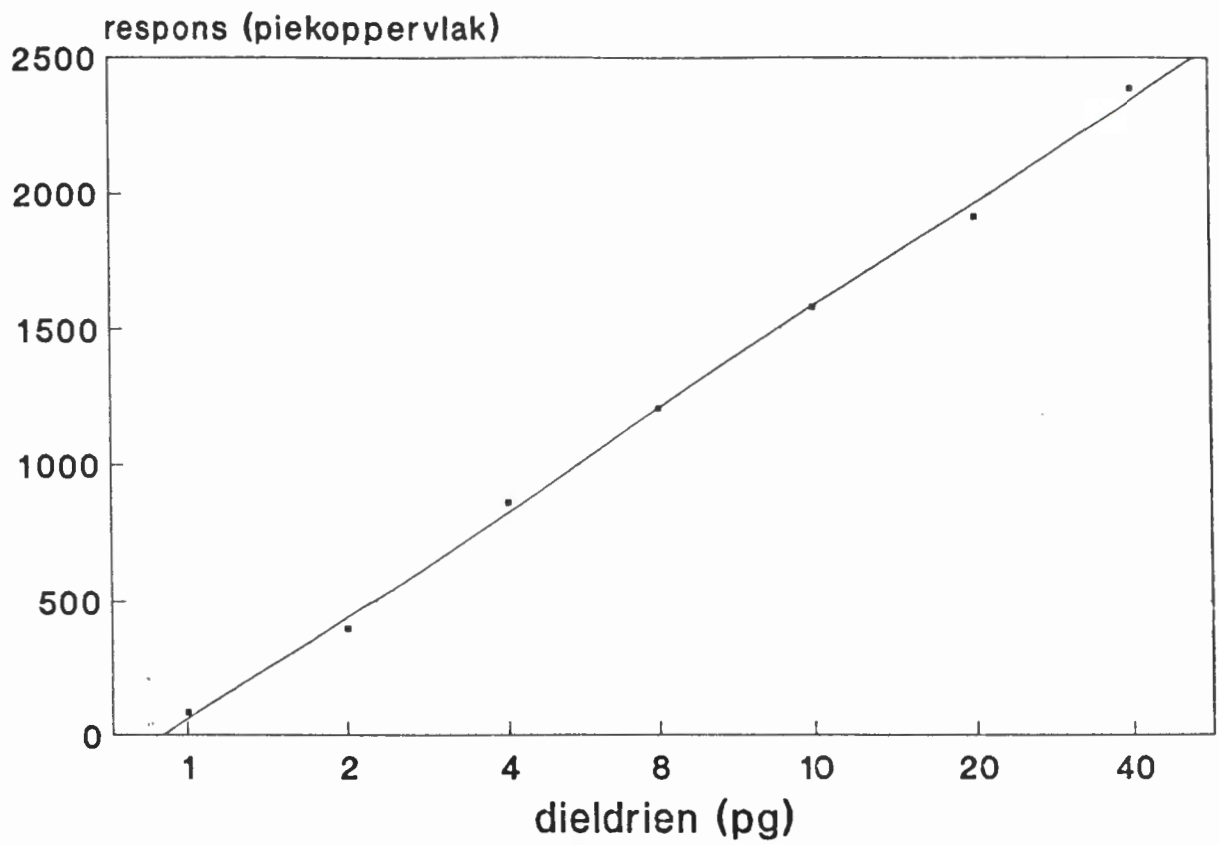
2.12 Gaschromatografie

Vir die gaschromatografiese analise van dieldrien is 'n Carlo Erba Strumentazione Fractovap model 2150 gaschromatograaf, wat met 'n ^{63}Ni elektronontvangsdetektor toegerus is, gebruik. Die gaschromatograaf is gekoppel aan 'n Waters SP 4290 integreerder (figuur 5).

Die kolom wat gebruik is, was 'n 1 meter, 3% OV-17 (stasionêre fase) op 68/80 Cromosorb WAW-DMCS. Die temperature was onderskeidelik 200°C by die inlaat, 220°C by die kolom (isotermies) en 275°C by die detektor. Stikstofgas met 'n vloeitempo van 40ml per minuut is as draergas (mobiele fase) gebruik.

'n Hamilton 1 μ l spuit is gebruik vir die inspuitings en 1 μ l van elke monster is ingespuut. 'n Opmaakgas van 10ml per minuut is deur die detektor gevoer. Die doel van die opmaakgas was om al die deeltjies wat aan die kolom mag vaskleef, te verwyder en so die kolom skoon te maak vir die volgende inspuiting.

Die responskromme is bepaal deur die respons (piekoppervlak) teenoor die konsentrasie dieldrien (pg) te plaas. Die hoeveelheid dieldrien aanwesig in die eksemplare van *E. eugeniae* is afgelees van die responskromme (figuur 6).



Figuur 6. Die responskromme van die respons (piekoppervlak) teenoor die konsentrasie dieldrien (pg).

RESULTATE

& BESPREKING

3.1 Morfologie van die voortplantingstrukture van *E. eugeniae* :

3.1.1 *Uitwendig*

Die posisies van die manlike en die ovo-spermateka openinge stem ooreen met wat Vati (1945) en Sims & Gerard (1985) bevind het (fig. 7A). Die ovo-spermateka openinge is anterior ten opsigte van die manlike openinge geleë en kom op segment XIV voor (fig. 7A). Dié openinge is verder van mekaar geleë as die manlike openinge. Die manlike openinge kom op die grens tussen segmente XVII en XVIII voor (fig. 7A). Die manlike openinge word omring

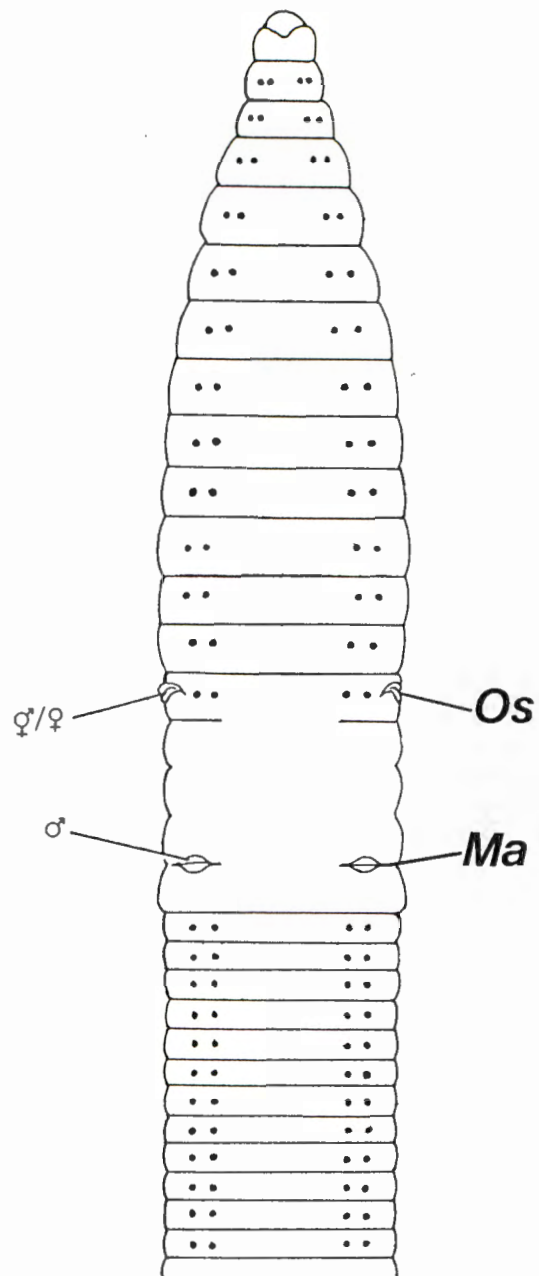
FIGUUR 7

- A** - Diagrammatiese voorstelling van die ventrale aansig van die anteriorstreek van *E. eugeniae* om die manlike- en ovo-spermateka openinge aan te toon (na aanleiding van Sims & Gerard 1985).
- B** - 'n Ligmikrograaf van die manlike opening van *E. eugeniae*. Die openinge kom op die grens van segmente XVI en XVII voor. Pylpunte dui die dik wand en die uitstulpbare penis aan.

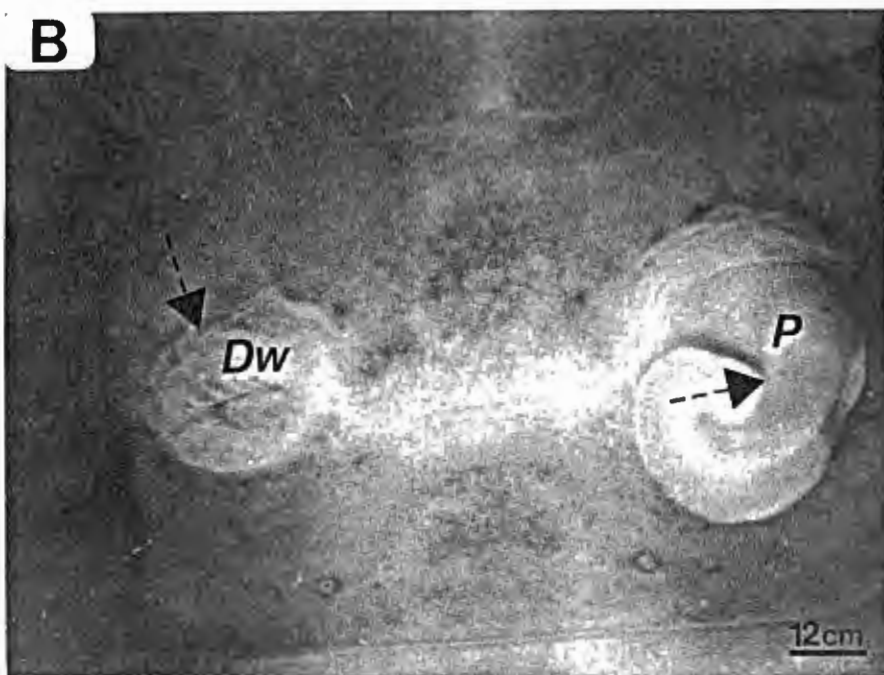
- Dw** - dik wand
Ma - manlike opening
Os - ovo-spermateka opening
P - penis

Figuur 7

A



B



deur 'n dik wand en is groot in teenstelling met die dun wand en spleetvorm van die ovo-spermateka openinge (fig. 7A).

In fig. 7B kan die manlike openinge en die kopulasieorgaan, die penis, waargeneem kan word. Die manlike organe het 'n hoë graad van spesialisasie bereik, deurdat 'n goed ontwikkelde kopulasieorgaan, naamlik die penis, by hierdie spesie voorkom (fig. 7B). 'n Afleiding kan gemaak word dat dit doeltreffende spermoordraging tydens kopulasie van die een wurm na die ander wurm sonder enige verlies van semen kan verseker.

3.1.2 *Inwendig*

Die manlike en vroulike voortplantingstrukture kan in fig. 8 waargeneem word. Tydens die huidige studie is dit noodsaaklik geag om mikrotegniek toe te pas. Die weefsels is met Mallory se drievoudige kleuringstegniek gekleur om sodoende die funksies van die strukture te verklaar. In fig. 9 kan die inwendige voortplantingstrukture na kleuring waargeneem word.

Volgens Humason (1979) is die kleurkode van Mallory se drievoudige kleuringstegniek die volgende: nukleus = rooi; spiere en sitoplasma = rooi tot oranje; kollageen = donker blou; mukus (slym) = blou en bloedvate = geel tot oranje. In die teks sal deurgaans van die kleurkode gebruik gemaak word.

3.1.2.1 *Die vroulike voortplantingstrukture*

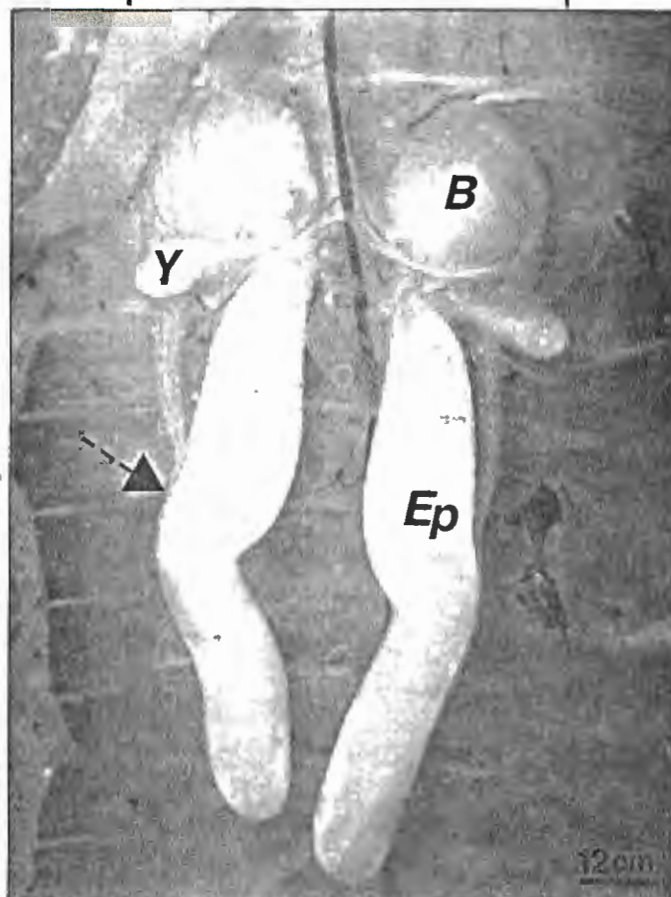
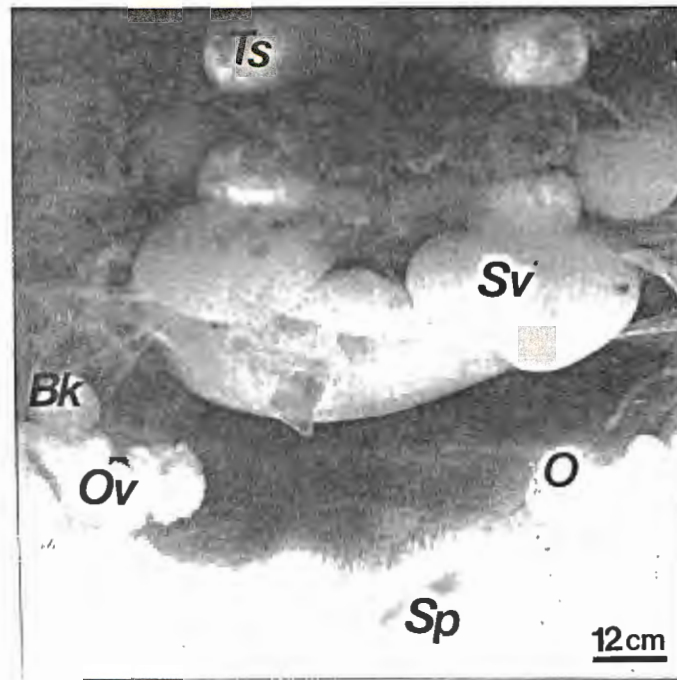
Volgens Vati (1945) bestaan die vroulike voortplantingstrukture uit die volgende: a) twee paar ovariums, een paar in segment XIII en die ander in segment XIV; b) twee paar ovidukte, een in segment XIII en die ander tussen segmente XIII en XIV; c) 'n paar spermateka wat in segmente XIII en XIV geleë is; d) 'n paar atriums wat in

FIGUUR 8

Ligmikrograaf van die inwendige voortplantingstrukture van *E. eugeniae*. Die pylpunt dui aan waar die vas deferens die euprostaat binnedring.

- B - bursa
- Bk - bykomstige klier
- Ep - euprostaat
- O - ovarium
- Ov - oviduk
- Sp - spermateka
- Sv - semenvesikel
- Ts - testissak
- Y - Y-struktuur

Figuur 8



FIGUUR 9

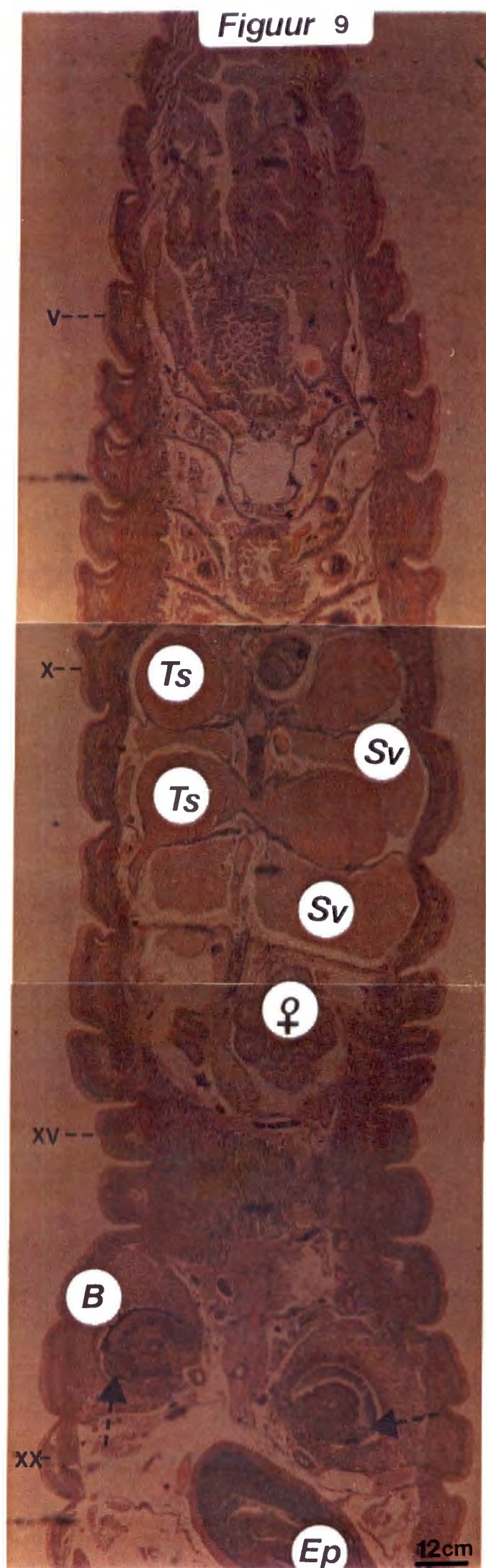
Ligmikrograaf van die inwendige voortplantingstrukture van *E. eugeniae*, wat met behulp van Mallory se kleurings-tegniek gekleur is.

B - bursa
Ep - euprostaat
Sv - semenvesikel
Ts - testissakke

Sleutel tot die kleurcodes (Mallory):

Blou	-	Mukussekreterende selle
Geel-oranje	-	bloedvate
Rooi	-	spiere
Rooi-pienk	-	sitoplasma

Figuur 9



segment XIII begin en in segment XIV open; e) 'n paar ronde bykomstige kliere, wat in segment XIII net agter die aansluiting tussen die atrium en die spermateka voorkom en in die atrium open (fig. 10A).

Vati (1945) het die een paar ovariums in segment XIV as funksioneel beskou en die ander paar in segment XIII as rudimentêr. In teenstelling hiermee is daar tydens die huidige studie gevind dat daar slegs een paar ovariums in segment XIV voorkom (fig. 10B). Dit toon ooreenkomste met die funksionele paar ovariums, soos deur hom in 1945 beskryf is.

By dwarsneë deur die ovarium kan die oviduk waargeneem word (fig. 11A) asook verskillende stadiums van ontwikkeling van die ova (fig. 11A & B). Volgens Vati (1945) en Sims (1969) kom daar spermatozoa in die oviduk voor maar geen bewyse staaf hierdie bevinding nie. Tydens die huidige studie is spermatozoa opgemerk in die oviduk sowel as in die onmiddellike omgewing van die ova (fig. 11C & D). 'n Afleiding wat gemaak kan word is dat die spermatozoa via die oviduk direk na die ovarium beweeg en interne bevrugting van die ova is dus baie moontlik by *E. eugeniae*.

Volgens Viljoen en Reinecke (1989a) kan kokonne van *E. eugeniae* geproduseer word sonder dat kopulasie plaasvind. Dit het voorgekom waar wurms in isolasie grootgemaak is direk nadat die wurms uitgebroei het. Dit dui dus daarop dat kopulasie nie nodig is om kokonne te produseer nie. Geen nakomelinge is egter geproduseer deur sodanige kokonne nie (Viljoen en Reinecke 1989a). Dit dui dus daarop dat alhoewel ongepaarde wurms kokonne produseer hulle nie partenogeneties of deur selfbevrugting nakomelinge kan voortbring nie.

Tydens die bestudering van die morfologie van die voortplantingstrukture tydens die huidige studie, is daar

FIGUUR 10

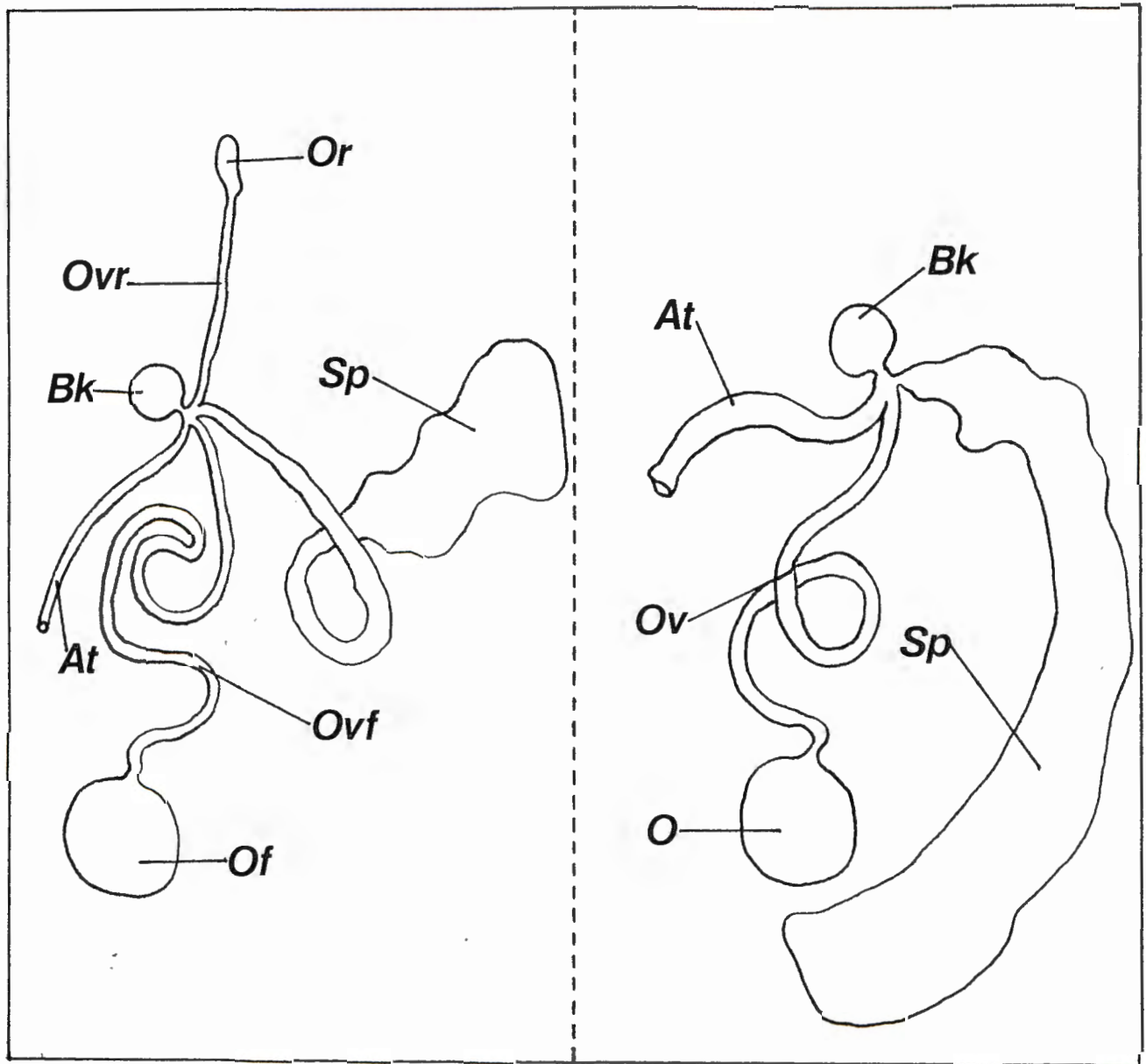
Diagrammatiese voorstellings van die vroulike voortplantingstrukture van *E. eugeniae*.

A - Aangetoon deur Vati (1945).

B - Soos waargeneem tydens die huidige studie.

At - atrium
Bk - bykomstige klier
O - ovarium
Of - ovarium (funksioneel)
Or - ovarium (rudimentêr)
Ov - oviduk
Ovf - oviduk (funksioneel)
Ovr - oviduk (rudimentêr)
Sp - spermateka

Figuur 10



FIGUUR 11

Ligmikrograwe van die ovarium en die ova van *E. eugeniae*:

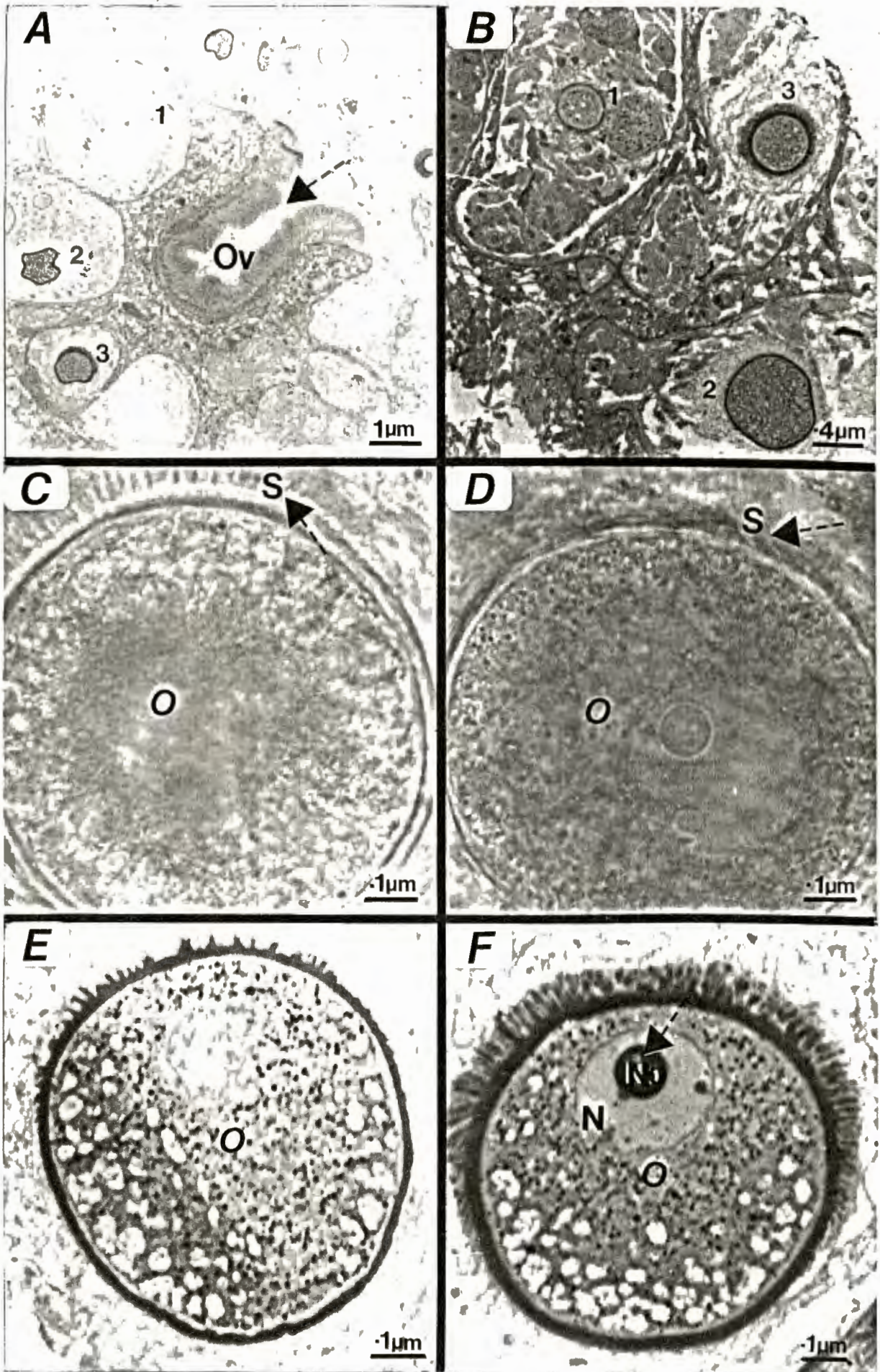
A ; B - Verskillende stadiums van ontwikkeling van die ova (1,2,& 3). Pylpunt dui die posisie van die oviduk aan.

C ; D - ova met spermatozoa in die onmiddellike omgewing van die ova. Pylpunte dui die spermatozoa aan.

E ; F - die ova van *E. eugeniae*. Pylpunte dui die nukleus en die nukleolus aan.

N - nukleus
No - nukleolus
O - ova
Ov - oviduk
S - spermatozoa

Figuur 11



geen verbindings tussen die manlike en vroulike strukture aangetref nie. Dit verseker dus die vermoede dat selfbevrugting by hierdie organismes nie moontlik is nie. 'n Studie van die chromosoomgetalle in die somatiese en voortplantingselle van *E. eugeniae* sal gedoen moet word, ten einde uitsluitel te gee ten opsigte van moontlike partenogenetiese voortplanting.

Volgens Vati (1945) vertoon die struktuur van die ovarium verskeie ooreenkomste met die van die soogdierovarium. Tydens die huidige studie is die ooreenkoms van die ova van *E. eugeniae* met die ova van die soogdier ook waargeneem. Die ova bevat 'n nukleus met 'n nukleolus (fig. 11E & F). Die ovarium loop uit in 'n lang opgedraaide oviduk wat die atrium binnedring net agter die aansluiting van die atrium met die spermateka (fig. 8 & 10B). Tydens die huidige studie is daar gevind dat die spermatozoa in die spermateka gestoor word. Bykomstige kliere kom voor by die basis van spermateka en hul funksie kan dalk verband hou met die sekresie van die voedingstowwe aan die spermatozoa. Die spermateka sluit op sy beurt ook by die atrium aan (fig. 8 & 10B).

3.1.2.2 Die manlike voortplantingstrukture

Twee gepaarde testissakke is in segmente X en XI waargeneem en twee gepaarde semenvesikels in segmente XI en XII (fig. 8 & 9). Die testissakke is gepaard en nie ongepaard soos deur Gates (1942) beskryf is nie. Die testissakke kom aan die ventrale kant van die segment voor. Dorsaal van die testissak is 'n tregtervormige struktuur waargeneem en dit blyk dat die struktuur 'n rol speel tydens die migrasie van die spermatozoa van die testisse na die testissakke (fig. 12A).

Geen testisse is tydens die huidige studie waargeneem nie. Volgens Stephenson (1972) neem die grootte van die testisse geleidelik af namate die wurms ouer word, totdat

dit geheel en al verdwyn. Ten einde die testisse te ondersoek sou meer aandag aan die bestudering van jonger (nie-klitellate) wurms gegee moes word.

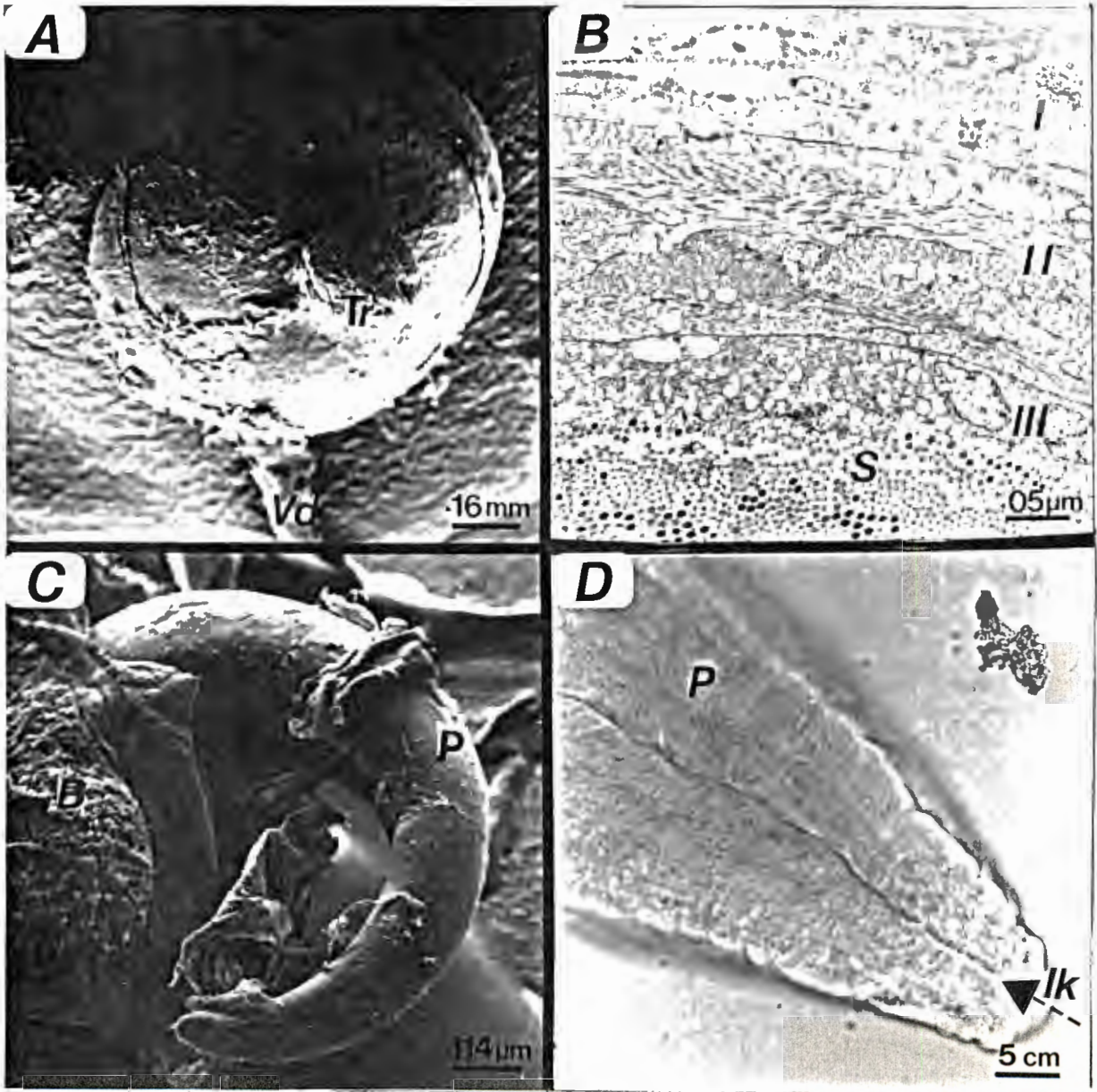
Aan die ventrale kant van die testissak kom 'n vas deferens voor en dit dien as afvoerbuis, wat die spermatozoa van die testissakke na die euprostaat vervoer (fig. 12A). Die lae waaruit die testissak bestaan kan in figuur 12B waargeneem word. Die heel buitenste laag is 'n bindweefsel laag en dit word opgevolg deur spierlae. In die middel kom die spermatozoa voor (fig. 12B).

Die semenvesikels is gepaarde, vleesagtige wit strukture en verleng latero-dorsaal aan beide kante van die oesofagus (fig. 8 & 9). Die semenvesikels bestaan uit twee lobbe wat in verbinding met mekaar is (fig. 8). Die voorste gedeelte is kleiner as die agterste gedeelte.

Die euprostaat is gepaard, spieragtig, wit van kleur en worsvormig (fig. 8). Die euprostaat word gevorm deur twee parallelle klieragtige buise (fig. 13A & B). Die een buis (rooi gekleur) strek deur die hele lengte van die euprostaat terwyl 'n tweede korter buis (blou gekleur) slegs in die voorste gedeelte van die euprostaat voorkom (fig. 13A & B). Die twee buise word van mekaar geskei deur 'n dun spierlaag (fig. 13A & B). Die twee buise word nie slegs deur hul lengte onderskei nie maar ook deur die tipe selle wat daarin voorkom. Die rooi gekleurde (volgens Mallory) buis bestaan uit 'n diverse kliertipes, dit is ryklik voorsien van bloedvate en slegs 'n aantal mukussekreterende klierselle kom daarin voor (fig. 13A & B). Die blou gekleurde (volgens Mallory) buis bestaan oorwegend uit mukussekreterende klierselle en min bloedvate kom daarin voor (fig. 13A & B). Fig 13C dui op die aansluitingspunt van die rooi- en blou gekleurde buise en die buitenste spierlaag, wat die euprostaat omhul.

FIGUUR 12

- A - SEM mikrograaf van die testissak met die tregter-
struktuur dorsaal en die vas deferens ventraal.
 - B - TEM mikrograaf van die lae waaruit die testissak
bestaan.
 - I - buitenstelaag selle
 - II - spierlaag
 - III - in die middel kom die spermatozoa voor
 - C - SEM mikrograaf van die penis wat gedurende
kopulasie uitgestulp word.
 - D - Ligmikrograaf van die punt van die penis. Pylpunt
dui die posisie van die interne kanaal aan.
-
- B - bursa
 - Ik - interne kanaal
 - P - penis
 - S - spermatozoa
 - Tr - tregterstruktuur
 - Vd - vas deferens



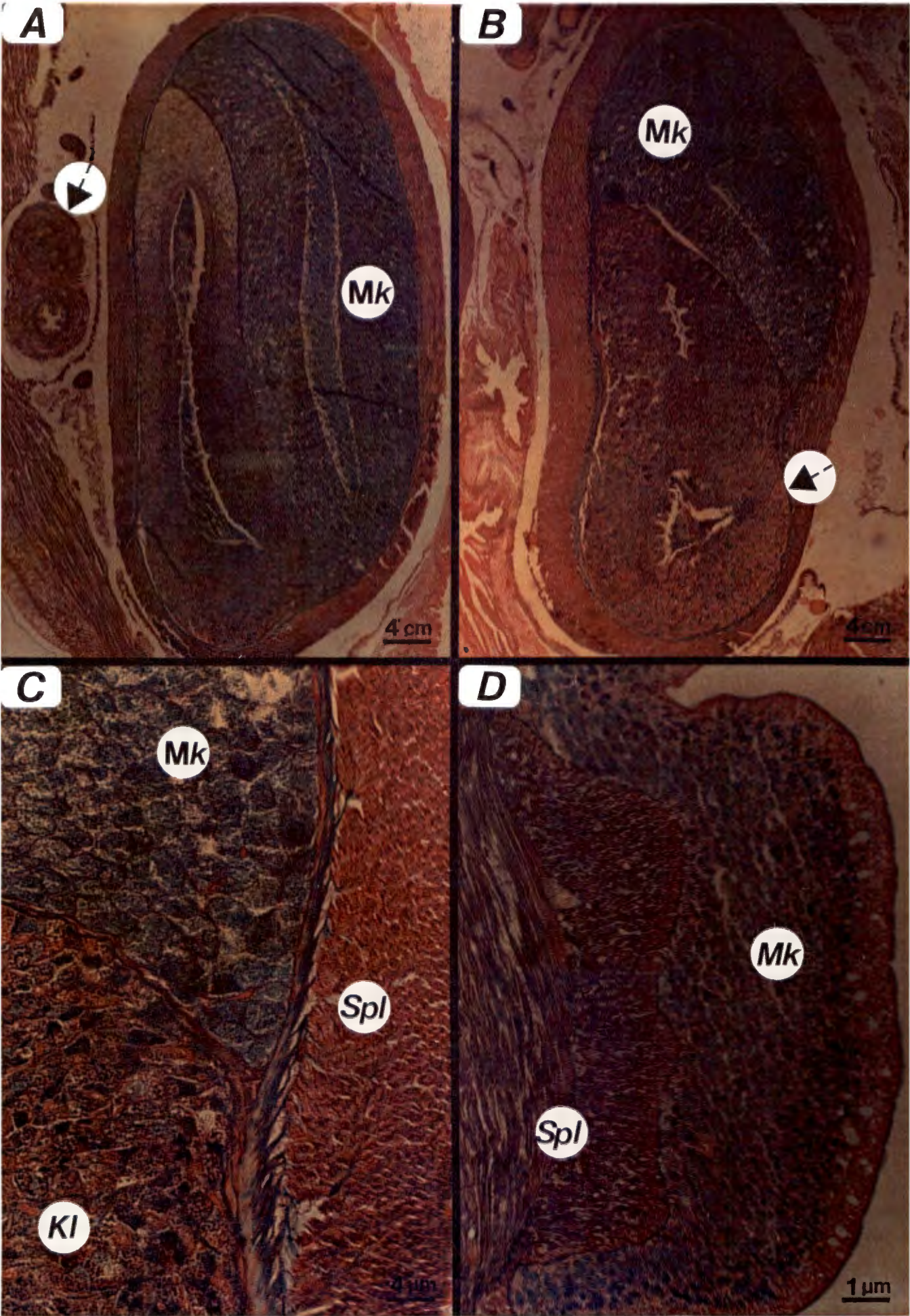
FIGUUR 13

Ligmikrograwe deur verskillende strukture van *E. eugeniae* wat met behulp van Mallory se kleuring gekleur is.

- A - 'n Lengtesnit deur die euprostaat waar die twee buise (rooi- en blou gekleur) duidelik waargeneem kan word. Pylpunt dui die Y-struktuur aan.
- B - 'n Dwarssnit deur die euprostaat. Pylpunt dui aan waar die vas deferens die euprostaat binne-dring.
- C - 'n Lengtesnit deur die verskillende tipes selle wat in die euprostaat voorkom.
- D - 'n Lengtesnit deur die dorsale streek van die klitellum. Let op na die blou gekleurde mukussekreterende selle wat by die euprostaat sowel as die klitellum voorkom.

- Kl - kliërselle (verkeidenheid van kleure)
- Mk - mukussekreterende selle (ligblou)
- Sp1 - spierlaag (rooi)

Figuur 13



Volgens Vati (1945) is daar 'n merkbare ooreenkoms tussen die tipe selle van die euprostaat en die klitellum. In die huidige studie is die ooreenkoms ook vasgestel (fig. 13A, B & D). Ooreenkomstige mukussekreterende selle is in beide die euprostaat (blou gekleurde buis) en die klitellum opgemerk (fig. 13A, B & D). Dit kan dus 'n aanduiding wees dat die twee strukture morfologies dieselfde funksie verrig naamlik die afskeiding van sekresies wat benodig word tydens die kopulasieproses.

By die anterior kant van die euprostaat smelt die rooi- en die blou gekleurde buise saam om 'n enkele kanaal te vorm wat die bursa binnedring. Hierdie kanaal strek tot aan die begin van die penis en sluit by die interne kanaal van die penis aan (fig. 12D). In 'n uitgestulpte toestand is die penis 'n spieragtige haakvormige struktuur (fig. 12C). Terwyl dit in 'n ontspanne toestand 'n opgekrulde vorm aanneem (fig. 14A & C). Die penis word omring deur mucus wat in die kanaal voorkom en dit sluit by die kanaal van die Y-struktuur aan (fig. 14A & B). Fig. 14B dui op die aansluitingspunt tussen die verskillende kanale. Die oorsprong van die penis is by wand van die bursa en 'n smal interne kanaal kom voor (fig. 12C). Die penis is ryklik voorsien van bloedvate, bindweefsel en klierselle (fig. 12C & D).

Die twee vasa deferentia wat van die onderskeie testissakke af kom sluit bymekaar aan in segment XII en verloop posterior na segment XVIII waar dit die euprostaat binnedring (fig. 8). Die spermatozoa beweeg dus via die vas deferens na die euprostaat waar dit waarskynlik prostatiese sekresies ontvang. Die spermatozoa beweeg hierna die prostatiese buis en die interne kanaal van die penis, waarvandaan dit die terminale punt van die penis bereik (fig. 12D).

'n Y-vormige struktuur kom by die basis van die euprostaat voor en dit word in twee helftes verdeel deur

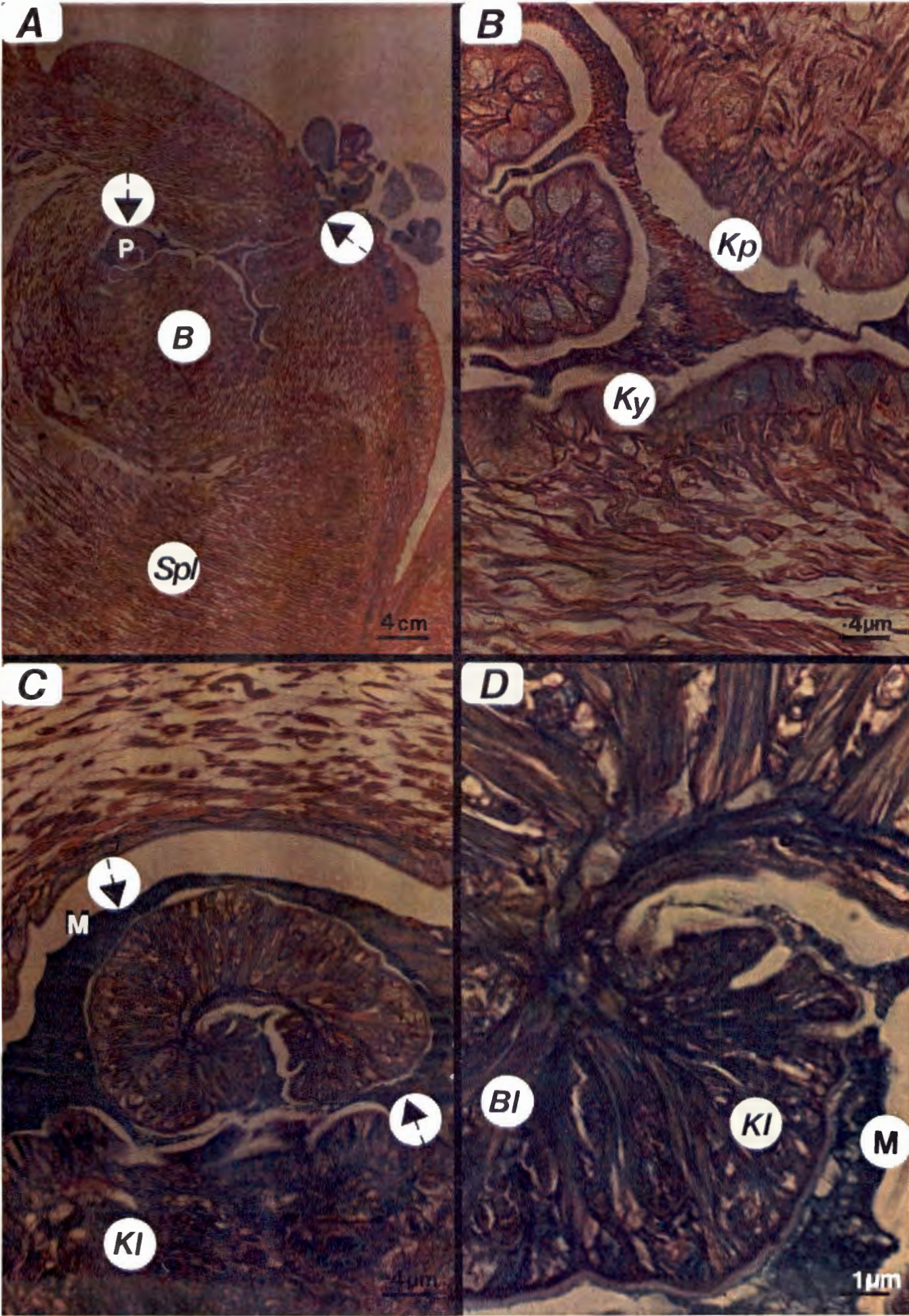
FIGUUR 14

Ligmikrograwe van die penis en omliggende strukture, wat met behulp van Mallory se kleuringstegniek gekleur is.

- A - Die bursa met die penis wat daarin voorkom.
Pylpunte dui die penis en die opening na buite aan.
- B - Die aansluitingspunt tussen die kanaal waarin die penis voorkom en die kanaal wat van die Y-struktuur afkomstig is.
- C - Die penis word omring deur mukus wat in die kanaal voorkom. Pylpunt dui die mukus aan.
- D - Die bloedvate en verskeidenheid van klierselle wat in die penis voorkom.

- B - bursa
- B1 - bloedvate (geel, oranje en groen)
- K1 - klierselle ('n verskeidenheid van kleure)
- Kp - kanaal afkomstig van penis
- Ky - kanaal afkomstig van Y-struktuur
- M - mukus (blou-donkerpers)
- Spl - spiere (rooi)

Figuur 14



'n longitudinale septum (fig. 15A, B & C). Die funksie van die Y-vormige struktuur is nog nie duidelik nie, maar omdat dit gespierd is, met epiteelweefsel en klierselle uitgevoer is, kan die funksie dalk verband hou met afskeiding van sekresies. Dit sou byvoorbeeld die punt van die penis kan smeer gedurende die kopulasieproses alvorens die gemengde semen en prostatiese vloeistof uitgestort word in die atrium van die ander wurm.

3.2 Beskrywing van die spermatogenese proses

Spermatogonia, wat deur die testis vervaardig word, ondergaan 'n reeks van mitotiese delings en gee oorsprong aan 'n morula. Die morula bestaan uit 'n sentrale sitofoor met spermatogonia daaromheen (fig. 16). Die morulas word deur die testis vrygestel en beland in die semenvesikels waar dit verdere rypwordingsfases ondergaan (Ferraguti 1984; Bunke 1985). Tydens die huidige studie is daar na sekere aspekte van die proses van spermatogenese gekyk om vas te stel of *E. eugeniae* ook aan die algemene ontwikkelingspatroon, soos gevind by ander spesies van die Annelida, voldoen (fig. 16). Daar is veral aandag gegee aan die tweede fase van spermatogenese naamlik spermiogenese.

3.2.1 Spermiogenese

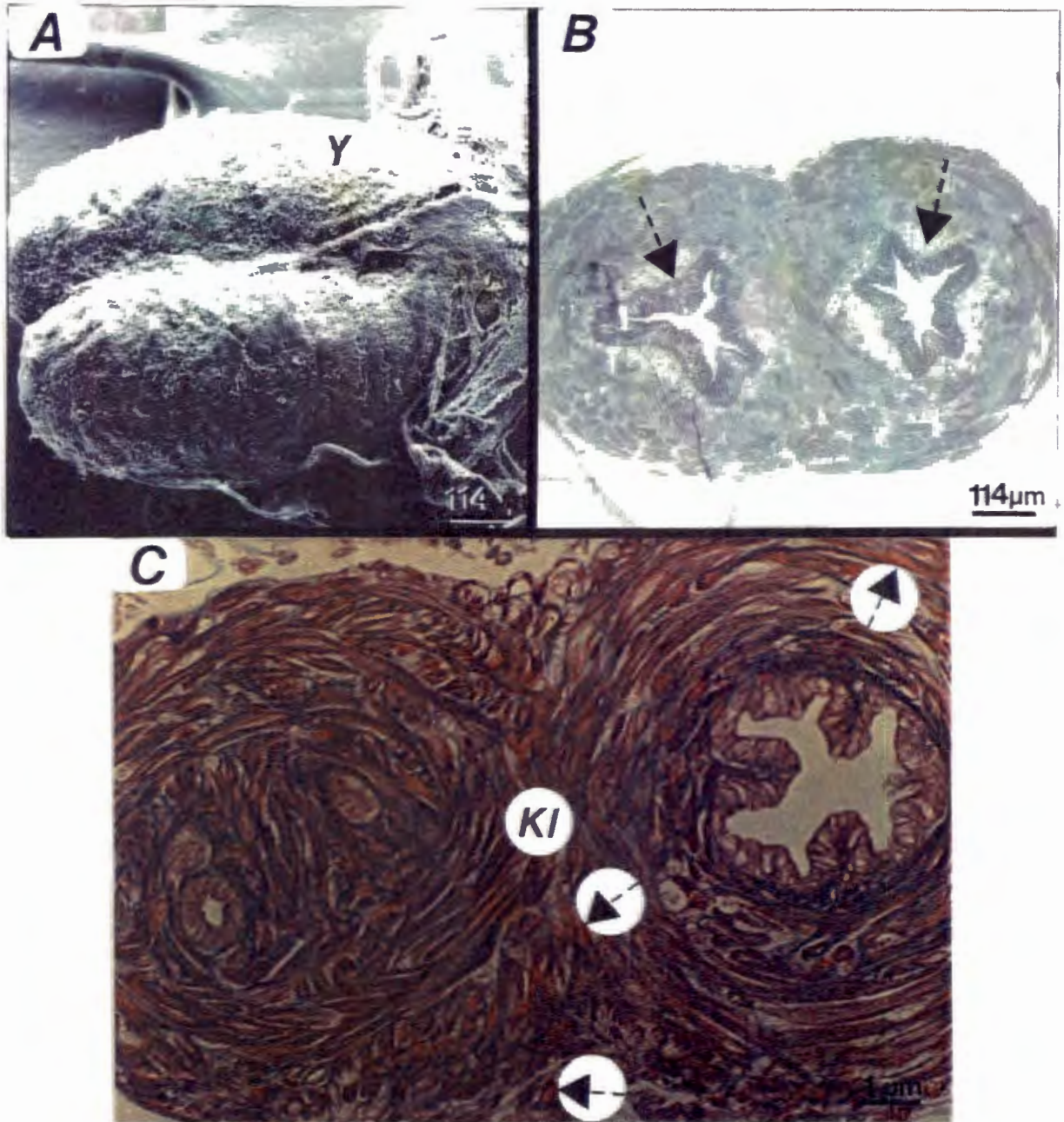
Die proses van spermiogenese kan in twee fases verdeel word naamlik: (1) sitologiese veranderinge in die spermatiede, waartydens die sel en sy nukleus 'n sferiese vorm aanneem en (2) die transformasie van die sel na 'n draadvormige spermatoosoon (fig. 17A tot F). Die verskillende spermatoosoa-streke word op die volgende wyse sigbaar : eerste verskyn die flagellum en dit groei tot die normale lengte (fig. 17B). Tweede ontwikkel die nukleusstreek (fig. 17C & D), dan volg die verlenging van

FIGUUR 15

- A - SEM mikrograaf van die Y-struktuur wat by die basis van die euprostaat voorkom.
- B - Ligmikrograaf van die inwendige struktuur van die Y-struktuur. Pylpunte dui die twee kanale van die Y-struktuur aan.
- C - Ligmikrograaf van die inwendige struktuur van die Y-struktuur waar die klierselle duidelik waargeneem kan word (Mallory se kleuringstegniek). Pylpunte dui die bloedvate aan.

K1 - klierselle
Y - Y-struktuur

Figuur 15

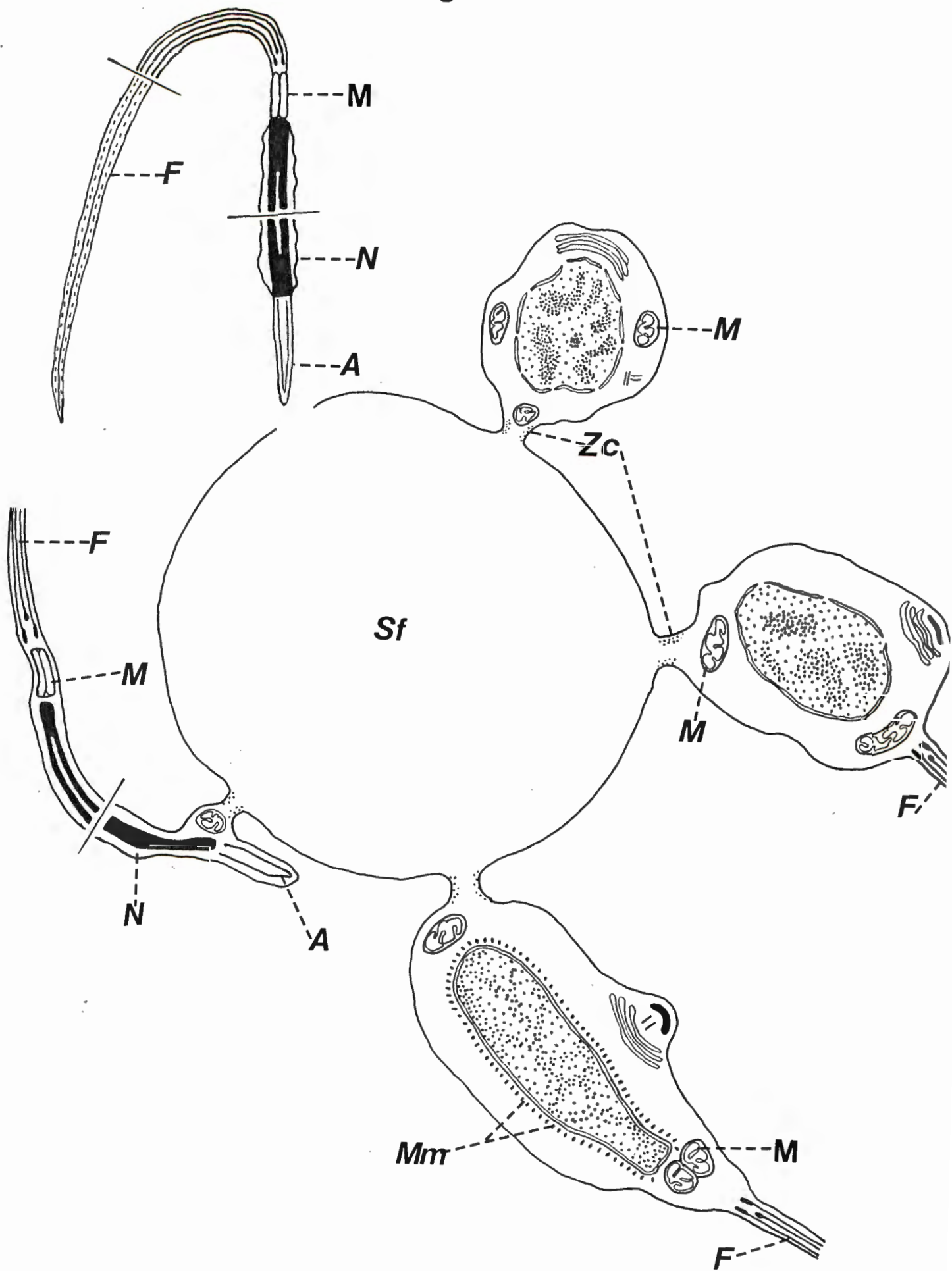


FIGUUR 16

'n Diagrammatiese voorstelling van 'n enkele morula om die belangrike stadiums van die proses van spermatogenese, soos aangetref by die meeste Annelida, te illustreer.

- A - akrosoom
- F - flagellum
- Mm - mikrotubulêre mansjette
- M - mitochondrium
- N - nukleus
- Sf - sitofoor
- Zc - zonula collaris

Figuur 16



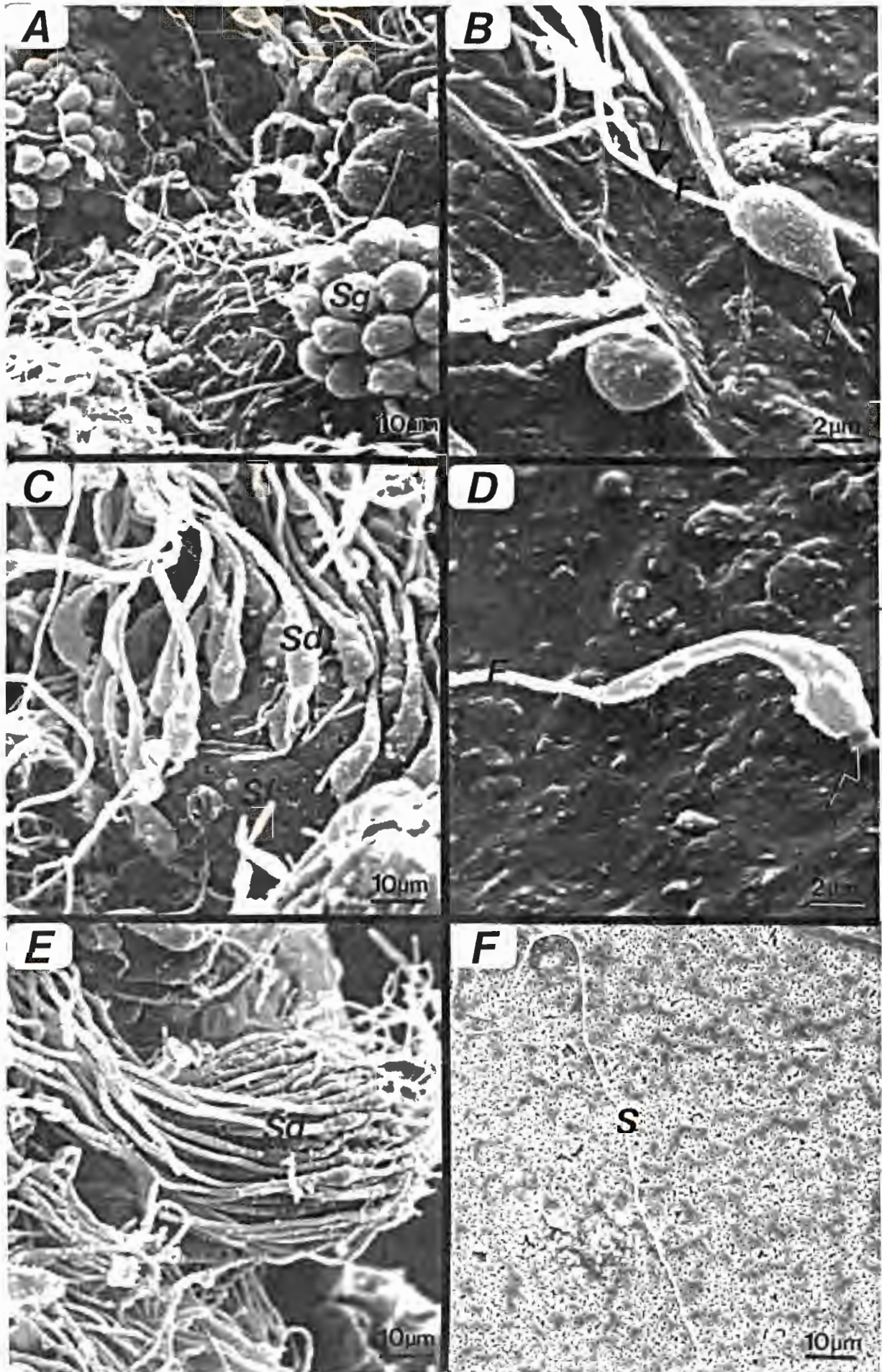
FIGUUR 17

SEM mikrograwe van die verskillende fases van spermatogenese en spermiogenese soos aangetref in die semenvesikels van *E. eugeniae*.

- A - spermatogonia in 'n ronde vorm
- B - 'n vroeë spermatied net voor nukleusverlenging. Pylpunte dui die flagellum en oorblyfsel van die *zonula collaris*, waar die spermatied aan die sitofoor geheg was, aan.
- C - spermatiede gedurende nukleusverlenging. Die spermatiede is geheg aan die sitofoor deur middel van 'n *zonula collaris*.
- D - 'n spermatied gedurende nukleusverlenging. Pylpunt dui die oorblyfsel van die *zonula collaris*, waar die spermatied van die sitofoor vrygekom het, aan.
- E - spermatiede wat in 'n latere stadium van ontwikkeling gevorm is.
- F - 'n volwasse spermatoosoon wat van die sitofoor vrygekom het.

- F - flagellum
- sd - spermatied
- sf - sitofoor
- sg - spermatogonia
- s - spermatoosoa
- zc - *zonula collaris*

Figuur 17



die middelstuk (fig. 17E) en uiteindelik die ontwikkeling van die akrosoomstreek (fig. 17E).

Vroeë spermatiede verskyn as knoppe en is geheg aan die sentrale sitofoor deur 'n kraag naamlik die *zonula collaris* (fig. 18A & B). Die sitofoor het 'n ronde vorm en dit blyk dat die funksie hiervan is om die spermatogonia te ondersteun tydens die transformasie van 'n ronde na 'n langwerpige vorm. Die membraan van die *zonula collaris* word gekenmerk deur 'n elektrondigte sitoplasmiese laag en ekstrasellulêre vesels (fig. 18C). Die *zonula collaris* verhoed dat die nukleusse die sitofoor binnegaan en dit speel 'n rol in die migrasie van die selelemente en selorgane byvoorbeeld ribosome, golgi-apparaat, lisosoomliggaampies en mitochondriums wat nie verder vir die spermiogenese proses benodig word nie (Jamieson 1981, Ferraguti & Jamieson 1984).

Die eerste stap van differensiasie is die flagellum wat by die teenoorgestelde pool as die *zonula collaris* ontstaan (fig. 18C & D). Volgens Ferraguti (1984) is die sel op hierdie stadium alreeds gepolariseerd, dit wil sê daar is 'n potensiaalverskil oor die membraan.

Die akrosoomontwikkeling begin wanneer die pro-akrosoomvesikel by die bo-punt van die golgi-apparaat, eers as 'n klein elektrondigte vesikel en dan as 'n plat struktuur wat aan die plasmamembraan vaskleef, gevorm word (fig. 18C & E). Volgens Jamieson (1981) en Ferraguti (1984) vind die migrasie van die akrosoom na die distale punt van die nukleus in 'n latere stadium plaas.

Die vroeë spermatiede het 'n groot ovaal nukleus en die chromatien is eweredig versprei as klein granules (fig. 19A). Die transformasie van die nukleus van 'n ovaalvorm na 'n silindriese vorm word veroorsaak deur die mikrotubulêre mansjette (fig. 19B & C). Volgens Troyer

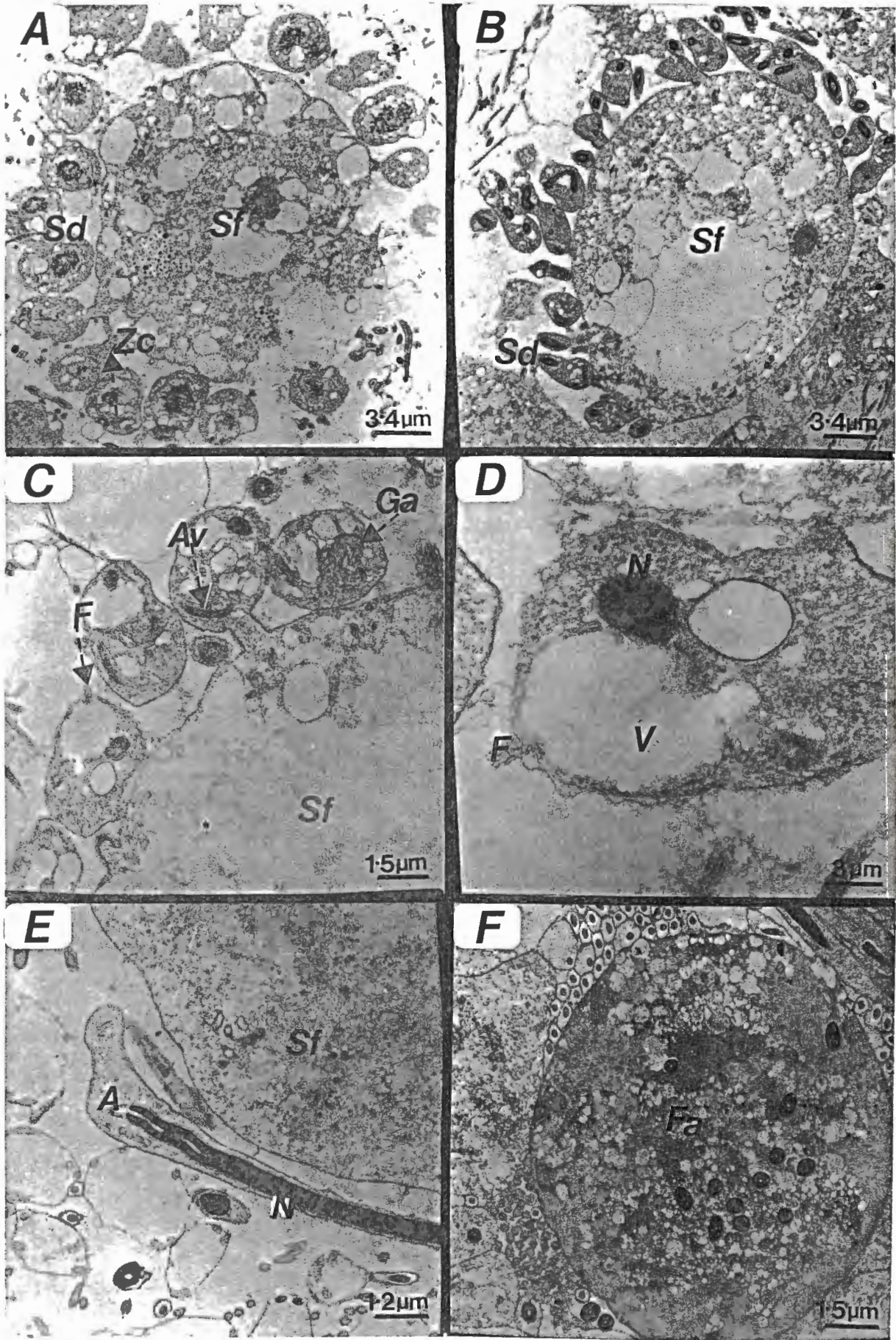
FIGUUR 18

TEM mikrograwe van fases tydens spermatogenese en spermiogenese soos aangetref in die semenvesikels van *E. eugeniae*.

- A - morula in 'n vroeë stadium van spermatogenese.
- B - spermatiede wat aan die sitofoor geheg is deur middel van 'n *zonula collaris*.
- C - spermatiede in 'n latere stadium wat geheg is aan die sitofoor deur middel van 'n *zonula collaris*. Pylpunte dui die golgi-apparaat flagellum en die akrosoomvesikel aan.
- D - 'n spermatied waar 'n gedeelte van die flagellum waargeneem kan word.
- E - 'n spermatied wat alreeds nukleus- en akrosoom-transformasie ondergaan het.
- F - 'n fagosiet wat in die semenvesikels voorkom. Pylpunt dui op nukleusse wat deur die fagosiet ingeneem is.

- A - akrosoom
- Av - akrosoomvesikel
- F - flagellum
- Fa - fagosiet
- Ga - golgi-apparaat
- N - nukleus
- Sd - spermatied
- Sf - sitofoor
- V - vesikel
- Zc - *zonula collaris*

Figuur 18



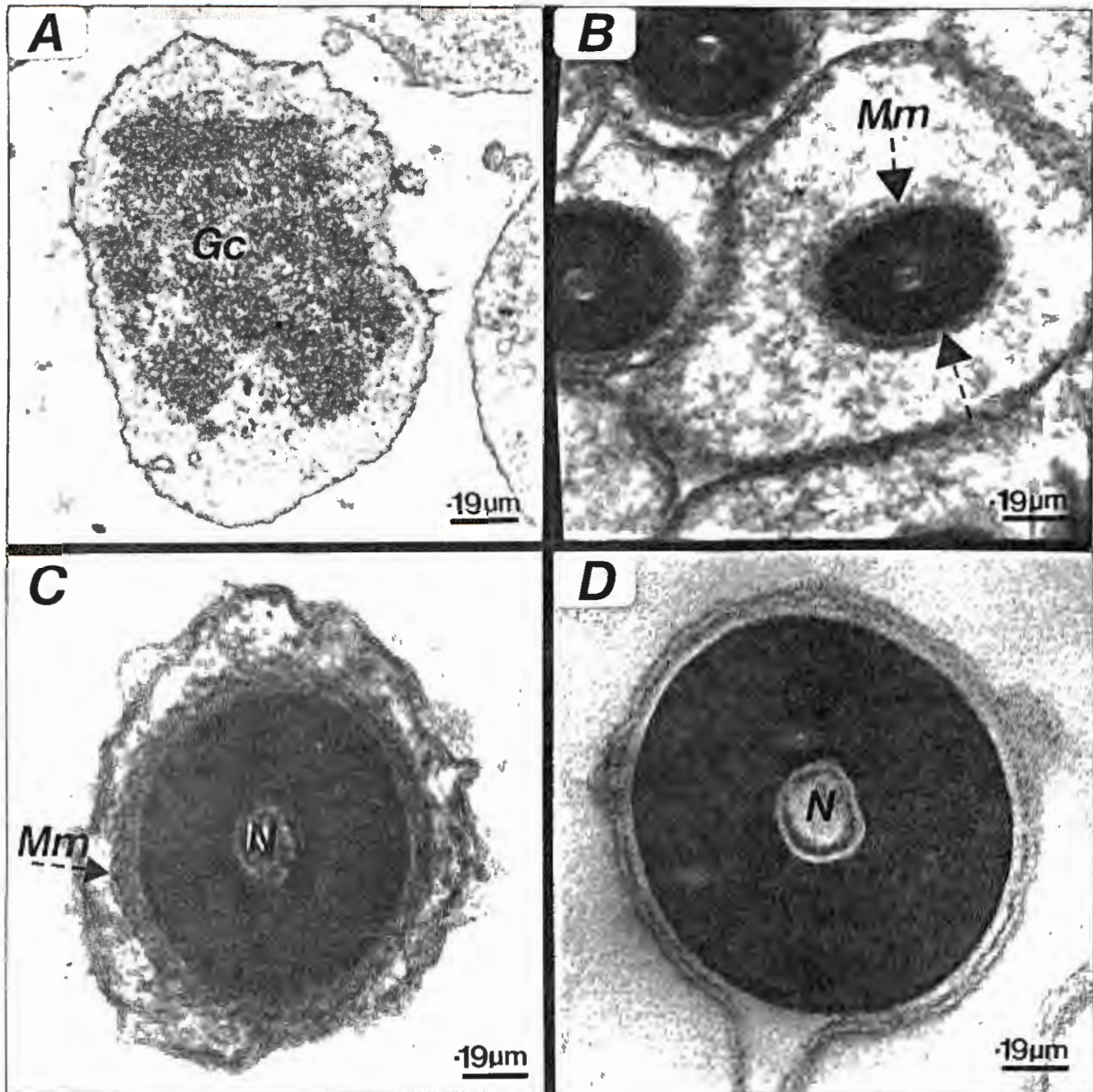
FIGUUR 19

TEM mikrograwe van die verskillende stadiums van nukleustransformasie gedurende spermiogenese.

- A - die nukleus is ovaalvormig en die granulêre chromatien is los gepak.
- B - die granulêre chromatien begin saampak. Pylpunte dui die teenwoordigheid van die mikrotubulêre mansjette aan.
- C - 'n dwarsnit van die nukleus in 'n meer gevordere stadium van nukleustransformasie.
- D - 'n dwarsnit van die nukleus soos aangetref word in die volwasse spermatosoon.

- Gc - granulêre chromatien
- Mm - mikrotubulêre mansjette
- N - nukleus

Figuur 19



(1980) is die mikrotubulêre mansjette verantwoordelik vir die kragte wat gegenereer word wat lei tot die definitiewe vorm van die nukleus. Die granulêre chromatien in die nukleus begin saampak en neem progressief die saamgepakte vorm aan soos wat in die volgroeiende spermatosoon waargeneem word (fig. 19B, C & D).

Die mitochondrium kom aanvanklik voor by die aansluiting tussen die *zonula collaris* en die sitofoor (fig. 20A). Die mitochondrium migreer later van die *zonula collaris* na die teenoorgestelde pool van die spermatied (fig. 20B). Mikrotubulêre mansjette word ook by die mitochondrium aangetref (fig. 20C). Die mitochondrium-lobbe groepeer saam en verlenging van die mitochondrium vind plaas soos aangetref word in die volgroeiende spermatosoon (fig. 20D).

In hierdie stadium van die ontwikkeling verdwyn die mikrotubulêre mansjette en die spermatied kom vry van die sitofoor en word 'n spermatosoon genoem. Wanneer die finale stadium van spermiogenese bereik word begin die sitofoor 'n degenerasieproses ondergaan en fagosiëte word gevorm (fig. 18F). Die volgroeiende spermatosoa migreer dan vanaf die semenvesikels na die testissakke en word daar gehuisves totdat kopulasie plaasvind.

3.3 Die morfologie van die spermatosoa van *E. eugeniae*

Volgroeiende spermatosoa is in die testissakke waargeneem (fig. 12A & B). Die spermatosoon is draadvormig met 'n gepunte terminale akroosoom, 'n lang, dun en silindriese nukleus, 'n middelstuk en 'n lang flagellum (fig. 21A). Die spermatosoon van *E. eugeniae* is ongeveer 80µm lank.

3.3.1 Akroosoom

Die akroosoom bestaan uit 'n lang vesikel met 'n gepunte

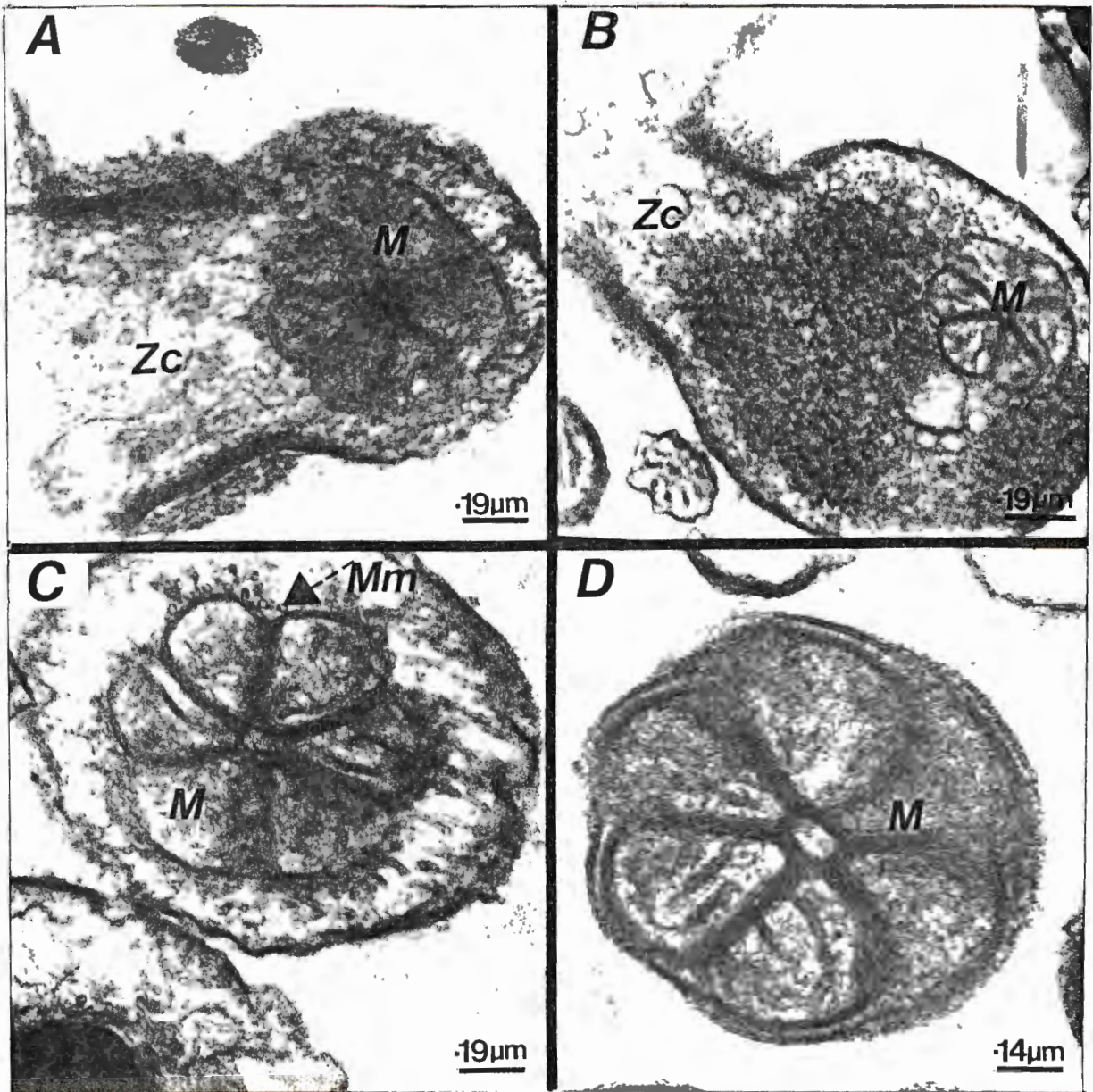
FIGUUR 20

TEM mikrograwe van die mitochondriumtransformasie gedurende spermiogenese.

- A - die mitochondrium is teenwoordig by die aansluiting tussen die *zonula collaris* en die sitofoor.
- B - die mitochondrium migreer van die *zonula collaris* na die teenoorgestelde pool van die spermatied.
- C - mikrotubulêre mansjette kan waargeneem word rondom die mitochondrium.
- D - 'n dwarsnit van die mitochondrium soos aangetref by die volwasse spermatosoon.

- M - mitochondrium
- Mm - mikrotubulêre mansjette
- Zc - *zonula collaris*

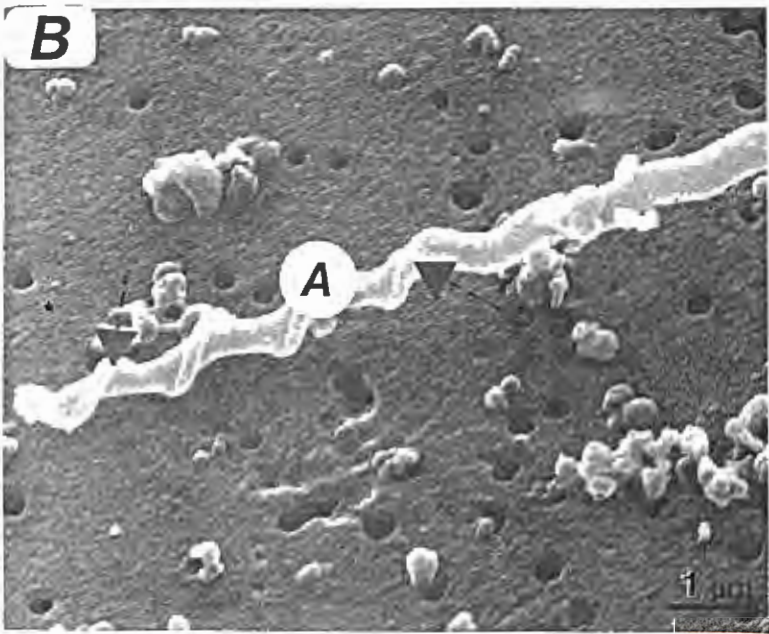
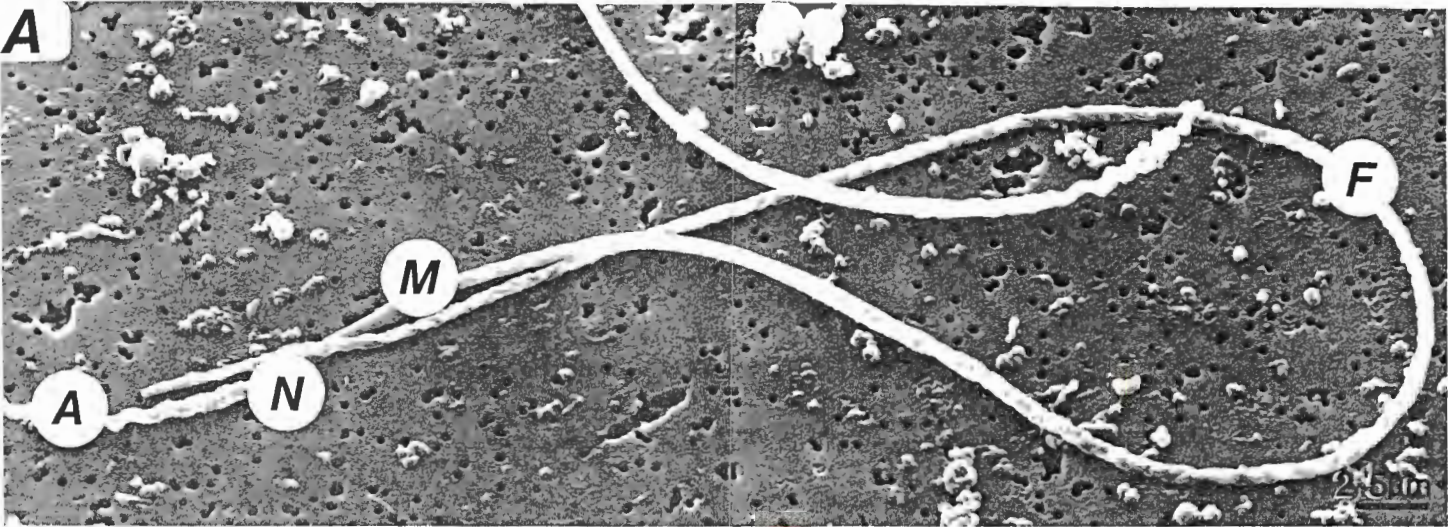
Figuur 20



FIGUUR 21

- A - SEM mikrograaf van die volwasse spermatoosoon van *E. eugeniae*.
- B - SEM mikrograaf van die akrosoom. Pylpunte dui die duidelike kurktrekker voorkoms aan.

- A - akrosoom
- N - nukleus
- M - mitochondrium
- F - flagellum



terminale ent (fig. 21B). Die akrosoom is ongeveer $5,5\mu\text{m}$ lank en het 'n kurktrekker-voorkoms (fig. 21B). Dit bestaan uit 'n primêre akrosoomvesikel, 'n akrosoombuis, 'n plasmamembraan en 'n sentrale aksiale staaf kom voor (fig. 22Aa).

Die aansluiting tussen die akrosoom en die nukleus word gevorm deur 'n digte, sterk konkavo-konvekse skyf wat met die nukleus in aanraking is deur digte materiaalinhoud (fig. 22Ab).

3.3.2 Nukleus

Die nukleus is 'n silindervormige struktuur en is ongeveer $9,5\mu\text{m}$ lank. Dit blyk of die aksiale staaf tot in die nukleus strek en daar kom 'n los skede rondom die nukleus voor (fig. 22Ba). Die nukleus bevat digte chromatieninhoud (fig. 22Ba). Die distale ent van die nukleus is afgeplat waar dit oorgaan in die mitochondrium (fig. 22Bb).

3.3.3 Mitochondrium

Die mitochondrium vertoon 'n spiraal-gedraaide voorkoms en is ongeveer $1,8\mu\text{m}$ lank (fig. 22Bb). In dwarsnee is ses mitochondriumlobbe waargeneem (fig. 22Bb). Die ses mitochondriumlobbe word van mekaar geskei deur radiale septums (fig. 22Bb). In lengtesnee is twee longitudinale lobbe waargeneem (fig. 22Bb & 22Ca). Die aansluiting tussen die mitochondrium en die flagellum kan duidelik in figuur 22Ca waargeneem word.

3.3.4 Flagellum

Die flagellum ontstaan uit 'n distale sentriool wat agter die middelstuk voorkom (fig. 22Ca). Die flagellum is ongeveer $63,7\mu\text{m}$ lank met 'n gepunte distale ent (fig. 22Db). In dwarsnee kan die kenmerkende 9+2 rangskikking

FIGUUR 22

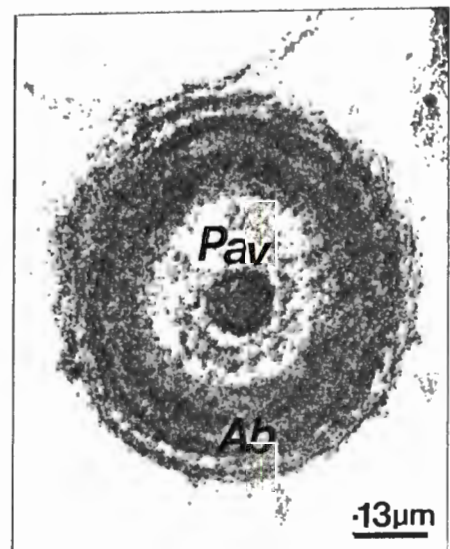
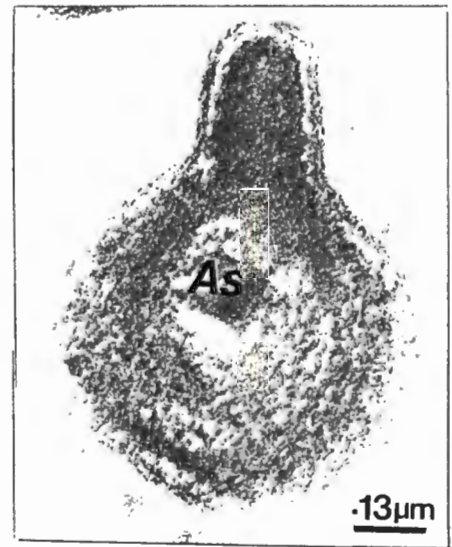
TEM mikrograwe van lengte- en dwarssneë deur die verskillende streke van die volwasse spermatoosoon van *E. eugeniae*.

Aa - Akrosoom.

Ab - Die aansluiting tussen die akrosoom en die nukleus is met behulp van pylpunte aangetoon.

Ab - akrosoombuis
As - aksiale staaf
Cm - chromatienmateriaal
N - nukleus
Pav - primêre akrosoomvesikel

Figuur 22



FIGUUR 22 (vervolg)

Ba - Nukleus.

Bb - Die aansluiting tussen die nukleus en die mitochondrium is met behulp van pylpunte aangetoon (1,2,3,4,5,6 = aantal lobbe) .

As - aksiale staaf

Ls - los skede

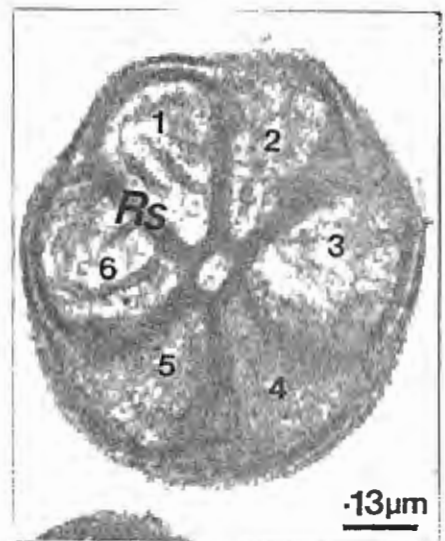
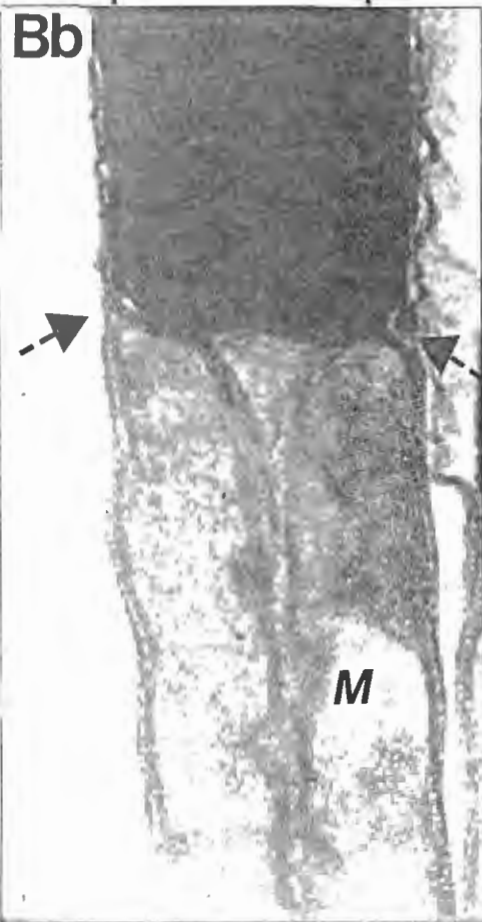
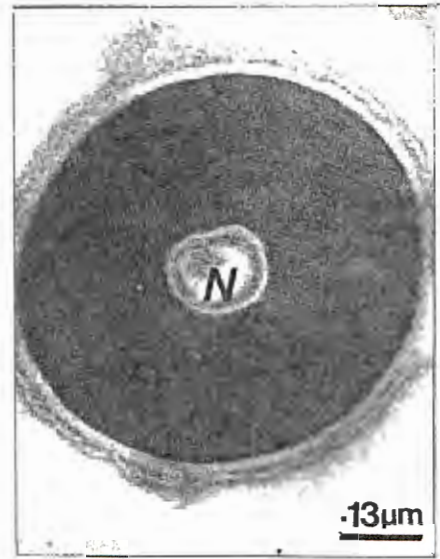
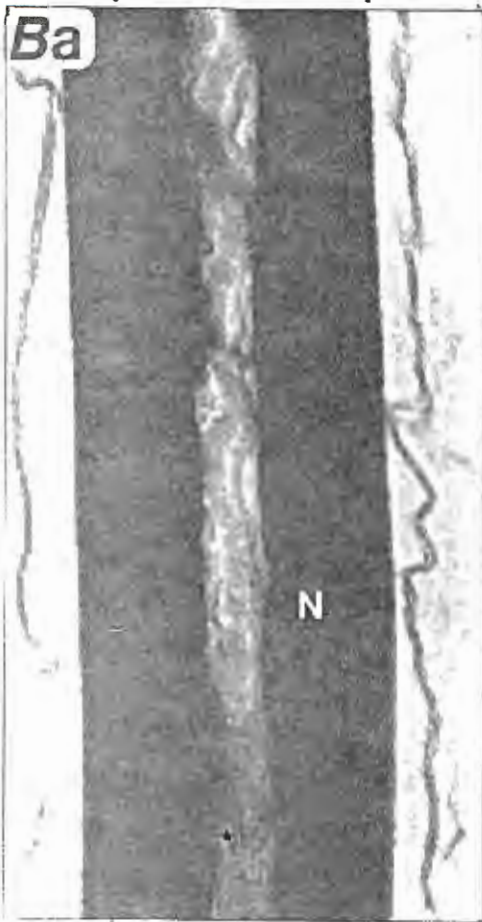
Cm - chromatiemateriaal

M - mitochondrium

N - nukleus

Rs - radiale septums

Figuur 22



FIGUUR 22 (vervolg)

Ca - Die aansluiting tussen die mitochondrium en die flagellum is met behulp van pylpunte aangetoon.

Cb - Flagellum (proksimaal)

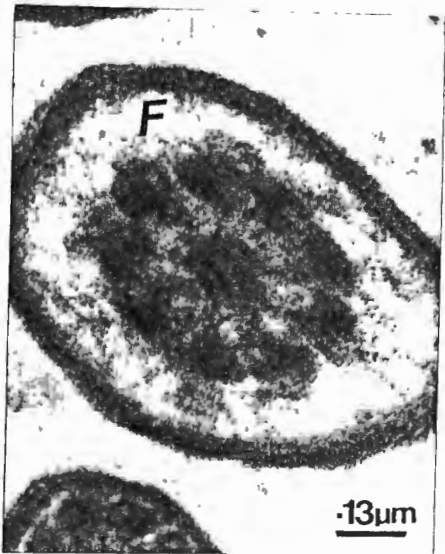
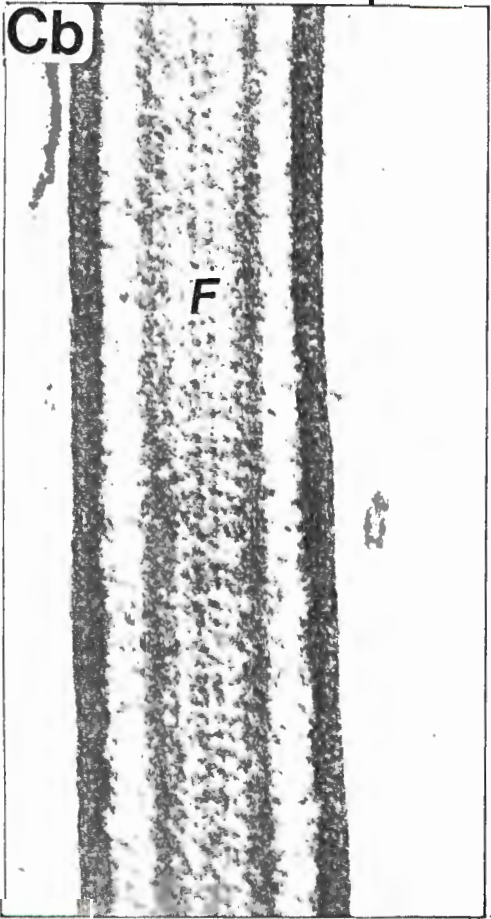
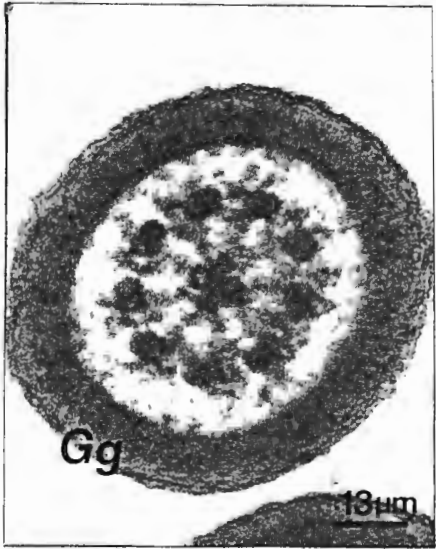
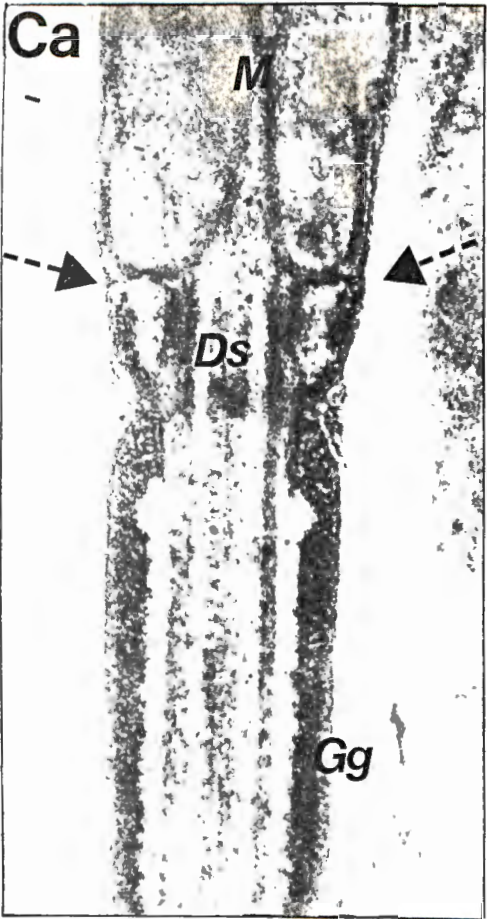
Ds - distale sentriool

Gg - glikogeen granules

F - flagellum

M - mitochondrium

Figuur 22



FIGUUR 22 (vervolg)

Lengte- en dwarssneë deur die verskillende streke van die flagellum.

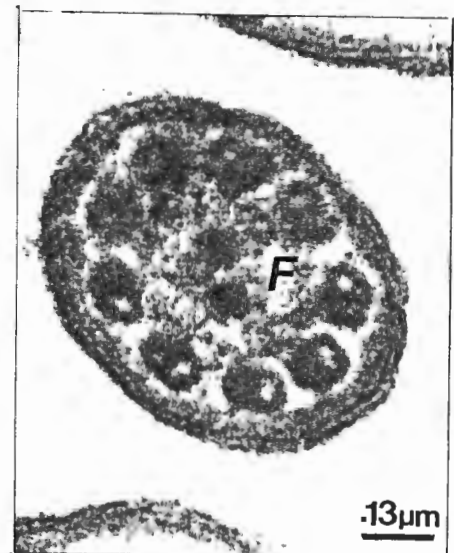
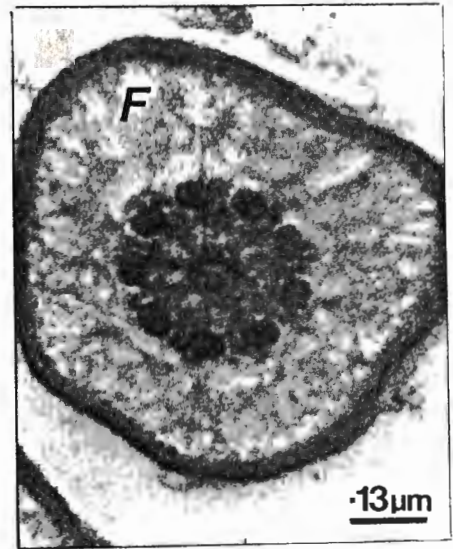
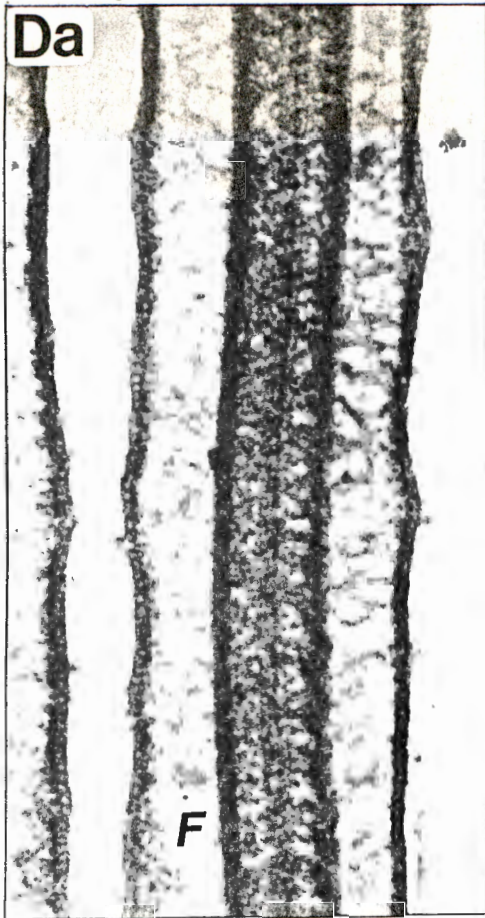
Da - Middelstreek.

Db - Distale punt.

F - flagellum

St - sentrale tetragoon

Figuur 22



van die mikrotubulêre buisies duidelik waargeneem word (fig. 22Db). Figure 22Cb, Da en Db dui op verskillende sneë deur die proksimale-, middelste- en die distale streke van die flagellum. Die proksimale streek van die flagellum het nege perifere pare buisies en twee sentrale buisies (fig. 22Cb). Die nege perifere pare buisies is ook verbind met 'n paar glikogeen granules, verder distaal is die glikogeen granules en die soliede vesels afwesig (fig. 22Da). By die terminale streek is die pare buisies vervang met twee enkele buisies (fig. 22Db).

3.3.5 'n Vergelyking met ander Annelida-spermatozoa

Vergelykende studies het aangetoon dat interspesifieke variasies in die spermatozoonstruktuur baie groot is (Baccetti & Afzelius 1976, Jamieson, Erseus & Ferraguti 1987). Spermatozoa van twee spesies mag dieselfde vorm hê maar dit is nooit identies nie. Spesie-spesifisiteit is nie net in die genetiese materiaal vasgelê wat deur die spermatozoon in sy nukleus gedra word nie maar ook in die morfologie van die sel self (Baccetti & Afzelius 1976).

'n Kort opsomming van die spermatozoon-tipes en die manier van bevrugting wat by Annelida aangetref word, word kortliks weergegee. Die Annelida word in die volgende drie klasse verdeel naamlik, Polychaeta, Oligochaeta en die Hirudinea en daar word verskillende maniere van bevrugting by die drie klasse aangetref (Bonet & Molinas 1988).

By die meeste Polychaeta word die kiemselle in die water vrygelaat en bevrugting vind dan uitwendig plaas. Die spermatozoa van hierdie diere behoort aan 'n primitiewe tipe: 'n ronde kop, 'n middelstuk wat vier of vyf sferiese mitochondria bevat en 'n lang flagellum (Franzen

1973, Baccetti & Afzelius 1976, Rice 1989, Jamieson & Rouse 1989).

By die meeste Oligochaeta vind bevrugting binne in die kokon plaas en die spermatozoa word in die nabyheid van die vroulike opening vrygestel tydens kopulasie. Die volgroeide spermatozoa van die Oligochaeta is draadvormig. By die apeks van die spermatozoön is 'n akrosoom, wat varieer by die verskillende individue van die groep, en bestaan uit 'n akrosoombuis, 'n akrosoomvesikel, 'n sekondêre buis en 'n subakrosomale-ruimte kom voor waar die akrosoomstaaf herken word (Jamieson 1981, Ferraguti, Bernardini, Melone & Dallai 1988, Ferraguti, Grassi & Erseus 1989).

Die nukleus is saamgepak, dun en varieer in vorm van byvoorbeeld reguit soos by die lumbrisiëde en megaskolesiëde, tot gekronkeld soos by die Lumnodriloides (Jamieson 1981, Jamieson 1982, Jamieson 1987).

Die mitochondria is dig saamgepak en varieer in getal van twee tot agt. Dit kan reguit wees soos by *Lumbricus* of gedraai soos by *Phreodrilus* (Jamieson 1981). Slegs een hoogs gemodifiseerde sentriool is teenwoordig by die basis van die lang flagellum (Ferraguti 1984).

Wanneer die spermatozoa van die Clitellata vergelyk word, word daar gevind dat daar ooreenkomste en verskille voorkom tussen die klasse Oligochaeta en Hirudinea (Garavaglia, Dolin & Lanzavecchia 1974, Ferraguti, Bernardini, Melone & Dallai 1988). Albei besit draadvormige spermatozoa en 'n akrosoom homolog aan die posterior-akrosoom van die Hirudinea, kom by die Oligochaeta voor.

Die nukleusstreek is silindries en reguit by die Oligochaeta in plaas van gelob en helies soos by die Hirudinea (Franzen 1973, Bonet & Molinas 1988, Ferraguti,

Grassi & Erseus 1989, Jamieson & Rouse 1989). Die mitochondriale streek besit verskeie saamgepakte mitochondria en volgens Jamieson (1981) kan dwarsseë van die mitochondrium 'n belangrike rol speel in die identifikasie van die verskillende families. By *E. eugeniae* kom ses mitochondriumlobbe voor en dit stem ooreen met wat Jamieson (1981) van die Megascolecidae gevind het.

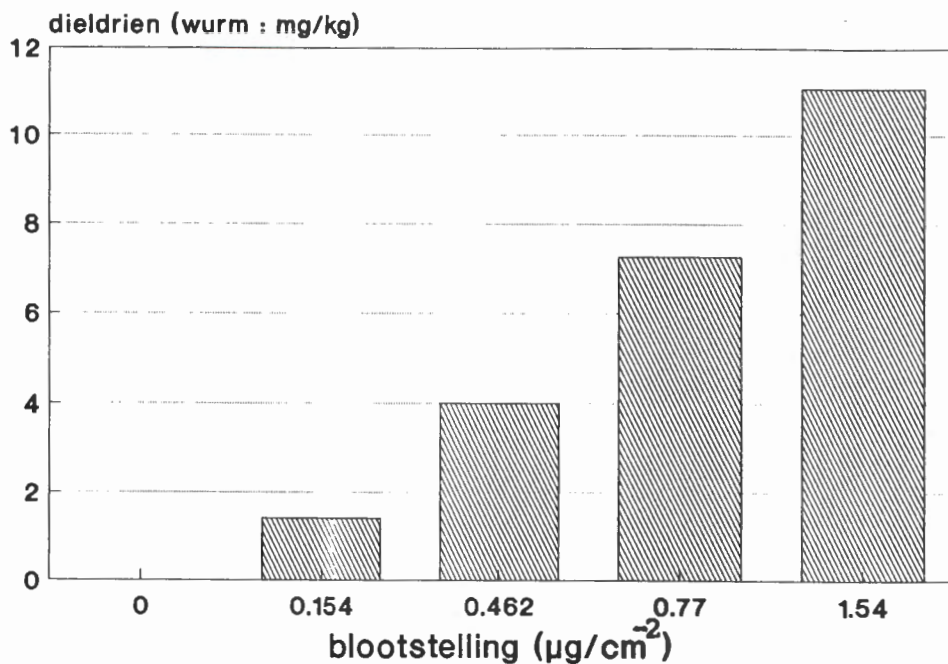
3.4 Die invloed van verskillende konsentrasies dieldrien op die eksemplare van *E. eugeniae* :

3.4.1 Bepalings met behulp van gaschromatografie

Die konsentrasie dieldrien in eksemplare van *E. eugeniae* wat vir 'n periode van 48uur aan verskillende dieldrienkonsentrasies blootgestel is, is bepaal. Die resultate van hierdie ondersoek verskyn in tabel 3 en word in figuur 23 weerspieël.

Tabel 3. Die konsentrasie dieldrien aanwesig in eksemplare van *E. eugeniae* na 'n blootstellingsperiode van 48uur op filtreerpapier, aan verskillende dieldrienkonsentrasies.

BLOOTSTELLINGSKONSENTRASIES ($\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$)	DIELDRIEN (mg/kg) AANWESIG IN WURMS NA BLOOTSTELLING
1,54	11,0855
0,77	7,2695
0,462	4,0035
0,154	1,40



Figuur 23. Die konsentrasies dieldrien aanwesig in die eksemplare van *E. eugeniae*, wat aan verskillende dieldrienkonsentrasies blootgestel is vir 48uur. Gebasseer op tabel 3.

Uit die resultate blyk dit dat daar 'n nie-liniêre verband bestaan tussen die blootstellings konsentrasies en die hoeveelheid dieldrien aanwesig in die eksemplare van *E. eugeniae*, na 'n periode van 48uur (fig. 23). In die multiplikatiewe model is die koëffisient van determinansie 99,69% en as 'n grafiese voorstelling gemaak word is die helling betekenisvol ($p=0,00008$).

Volgens Roberts & Dorough (1984) se klassifikasie van akute-kontaktoxisiteit van 90 verskillende chemikalieë, op *Eisenia fetida*, val dieldrien in die tweede toksiese kategorie en is die LK50 tussen $1 - 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Hieruit blyk dit dat dieldrien minder giftig is as karbofuraan wat geklassifiseer word as supertoksies, waarvan die LK50 $< 1,0 \mu\text{m}/\text{cm}^2$ is.

3.4.2 *Mikroskopieswaarneembare invloed op uitwendige en inwendige strukture*

Eksperimente wat alreeds gedoen is dui daarop dat chemikalieë 'n negatiewe effek op die voortplantingsbiologie van organismes het (Vouk & Sheehan 1983). Daar is ook gevind dat die aantal genetiese deffekte verhoog in verhouding tot die verhoging van die dosis van die chemikalieë (Vouk & Sheehan 1983). Tydens die huidige studie is by die eksterne oppervlak van die kontrole wurms geen abnormaliteite aangetref nie terwyl daar by die eksemplare wat aan 'n konsentrasie van $1,54\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$ dieldrien blootgestel is gevind is dat die klitellum 'n opgeblaasde voorkoms gehad het (fig. 24A). Outotomering (afsnoering van die liggaam) het ook voorgekom by die blootgestelde wurms (fig. 24B).

By die interne strukture het blasies by die proksimale punt van die spysverteringskanaal voorgekom (fig. 24C). Blasies is ook by die manlike voortplantingstrukture opgemerk (fig. 24D). Geen testissakke is opgemerk by die wurms wat aan 'n konsentrasie van $1,54\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$ blootgestel is nie (fig. 24D). Die semenvesikels het ook nie die kenmerkende wit kleur vertoon soos by die kontrolegroepe nie (fig. 24D). Dit wil dus voorkom of die deffekte toegeskryf kan word aan die blootstelling van die wurms aan dieldrien, aangesien dit slegs by die hoër konsentrasies voorgekom het en nie by die laer konsentrasies of kontroles nie.

3.4.3 *Ultramikroskopieswaarneembare afwykings van die invloed van dieldrien op die spermatozoa van E. eugeniae :*

3.4.3.1 *Oppervlakkig waarneembare afwykings*

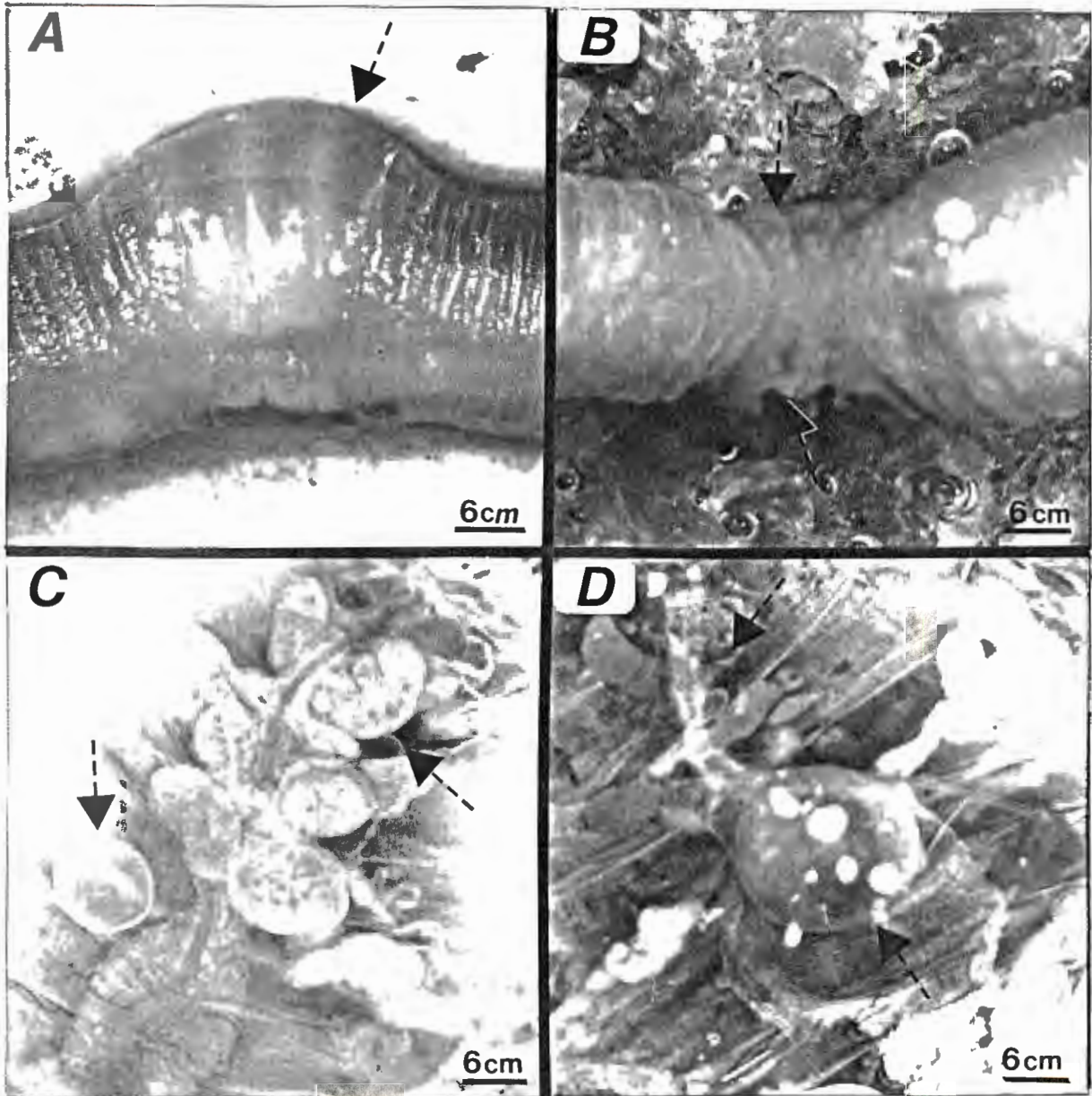
Volgens Vouk & Sheehan (1983) word beskadiging die beste weespieël in die volwasse spermatozoa. Tydens die

FIGUUR 24

Ligmikrograwe van eksemplare van *E. eugeniae* wat aan 'n konsentrasie van $1,54 \mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$ dieldrien blootgestel is. Die skade is telkens met behulp van pylpunte aangetoon.

- A - die klitellum het 'n opgeblaasde voorkoms gehad,
- B - outotomering het voorgekom,
- C - blasies by die begin van die spysverteringskanaal is opgemerk en
- D - disintegrasie van die testissakke en deffekte by die semenvesikels het voorgekom.

Figuur 24



huidige studie is volgroeide spermatozoa van wurms wat nie aan dieldrien blootgestel is nie teenoor wurms wat wel aan die verskillende konsentrasies dieldrien blootgestel is uit die testissakke vekry. By die kontroles en eksemplare wat aan konsentrasies laer as $0,77\mu\text{m}/\text{cm}^{-2}$ blootgestel is, is daar geen waarneembare morfologiese afwykings waargeneem nie.

By die spermatozoa wat aan konsentrasies hoër as $0,77\mu\text{m}/\text{cm}^{-2}$ blootgestel is, was sommige van die flagellums duidelik opgewen en styf spiralig gekronkel soos onder die SEM waargeneem (fig. 25A, B, C & D). Hierdie afwyking is by 10% van die spermatozoa waargeneem. Beskadigende spermatozoa is nie funksioneel nie en wanneer daar morfologiese afwykings voorkom kan die spermatozoa nie sy funksionele rol vertolk nie (Vouk & Sheehan 1983). By insekte kan fisiologiese onbeweeglikheid van spermatozoa toegeskryf word aan morfologiese afwykings wat by die flagellum voorkom as gevolg van toksiese effekte (Vouk & Sheehan 1983). 'n Afleiding wat gemaak kan word is dat by individue waar morfologiese afwykings van die flagellum voorkom dit kan lei tot die onbeweeglikheid van spermatozoa en op die ou einde tot 'n lae bevrugtingsukses.

3.4.3.2 Afwykings waargeneem by sneë van spermatozoa

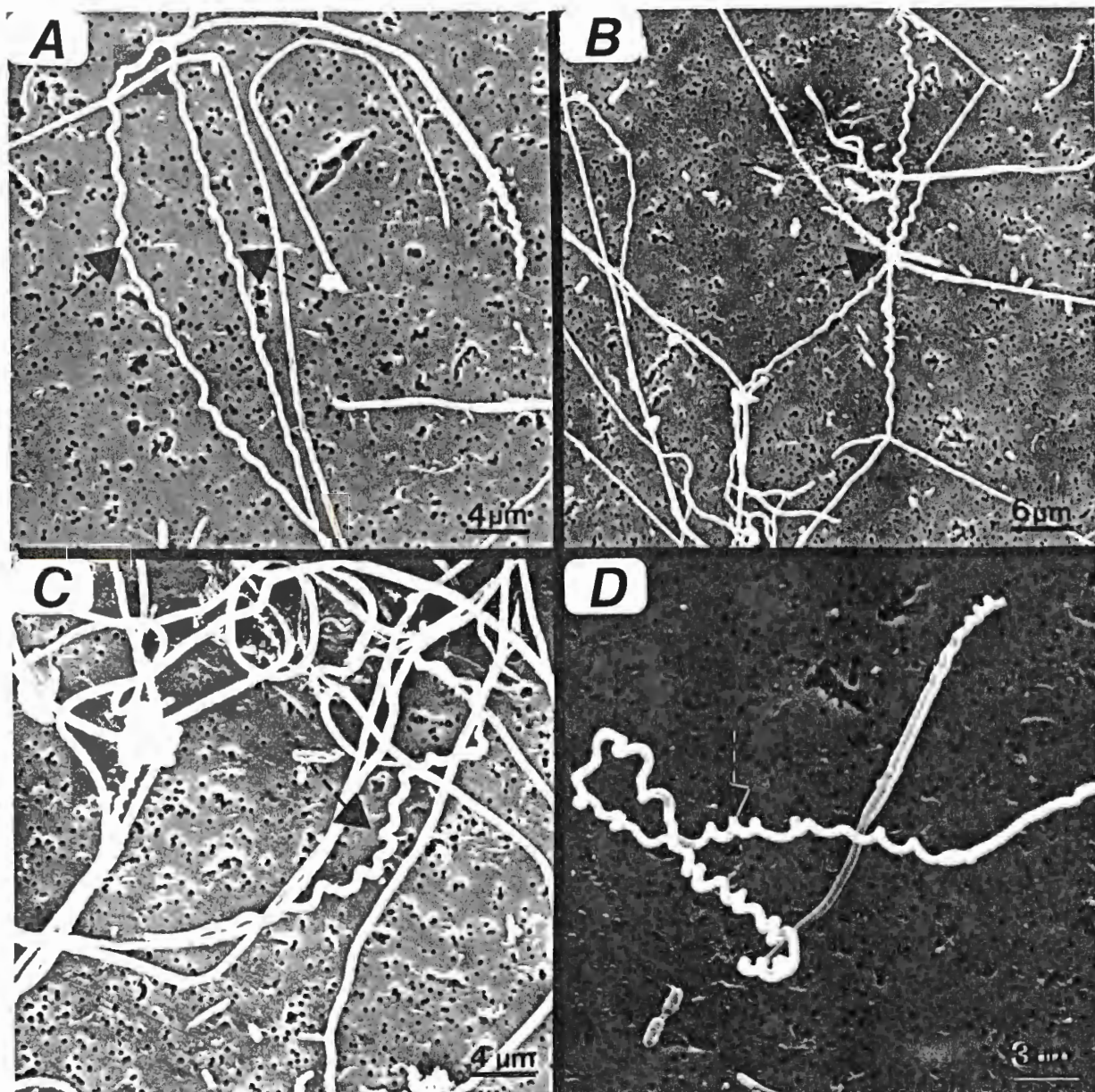
By die kontroles en die eksemplare wat aan konsentrasies laer as $0,77\mu\text{m}/\text{cm}^{-2}$ blootgestel is, is daar geen waarneembare veranderinge ten opsigte van die morfologie van die spermatozoa opgemerk nie. Slegs die nukleusse van die spermatozoa wat aan die konsentrasies hoër as $0,77\mu\text{m}/\text{cm}^{-2}$ blootgestel is is beïnvloed. In dwars- en lengtesneë kan waargeneem word dat die dig saamgepakte nukleusmateriaal plek-plek beskadig is (fig. 26A tot H). Dit wil voorkom of die beskadiging 'n sig-sag patroon aanneem (fig. 26E, 27A tot D). Figure 27E en 27F dui

FIGUUR 25

A ; B - SEM mikrograwe van spermatoos wat aan
C ; D 'n konsentrasie dieldrien hoër as
0,77 μ g/cm⁻² blootgestel is.

Pylpunte dui op die opgewende flagellums
wat by hierdie spermatoos waargeneem is.

Figuur 25



op 'n vergelyking tussen die kontrole- en die beskadigde nukleus van die onderskeie spermatozoa.

Volgens Vouk en Sheehan (1983) kan die mutageniese veranderinge wat deur chemiese komponente veroorsaak word somaties sowel as kiemselle beïnvloed. Beskadiging van slegs een chromatied of algehele beskadiging van die chromosome kan voorkom (Vouk & Sheehan 1983). 'n Afleiding wat gemaak kan word is dat nukleusbeskadiging daarop dui dat die chromatienmateriaal beskadig is en omdat die nukleus belangrike draers van erflike faktore naamlik die chromosome bevat kan dit moontlik lei tot drastiese gevolge. Die skade wat veral dan aan die nukleus van die spermatozoa aangerig word kan tot wangeskopenheid lei. Geen ander tekens van beskadiging het by enige van die ander streke van die spermatozoa voorgekom nie. Dit wil dus voorkom of dieldrien 'n spesifieke invloed op die nukleus van die spermatozoa het.

Tydens die huidige studie is daar ook deur SEM en TEM ondersoeke vasgestel dat nie alle spermatozoa beskadig word nie. Die beskadigde spermatozoa sou egter, indien bevrugting deur middel van so 'n spermatoosoon plaasvind, tot die ontwikkeling van 'n abnormale embrio kon lei. Daar kan 'n afname in die voortplantingspotensiaal voorkom en dit kan noodwendig lei tot 'n afname in bevolkingsgetalle. Hierdie is dus 'n belangrike evaluering van subletale gevolge. Die invloed van plaagdoders op nie-teikenorganismes is 'n belangrike ekologiese faktor wat al meer op die voorgrond tree. Volgens Edwards (1966, 1975) kan die effek van 'n plaagdoder soms lank nadat die chemikalieë reeds verdwyn het, tot uiting kom. Hierdie na-effekte of vertraagde respons kan uitgedruk word in terme van die subletale invloed op verskeie organisatoriese vlakke, hetsy op sellulêre of op orgaanvlak. Organismes wat dus letale dosisse oorleef vertoon soms 'n vertraagde respons of

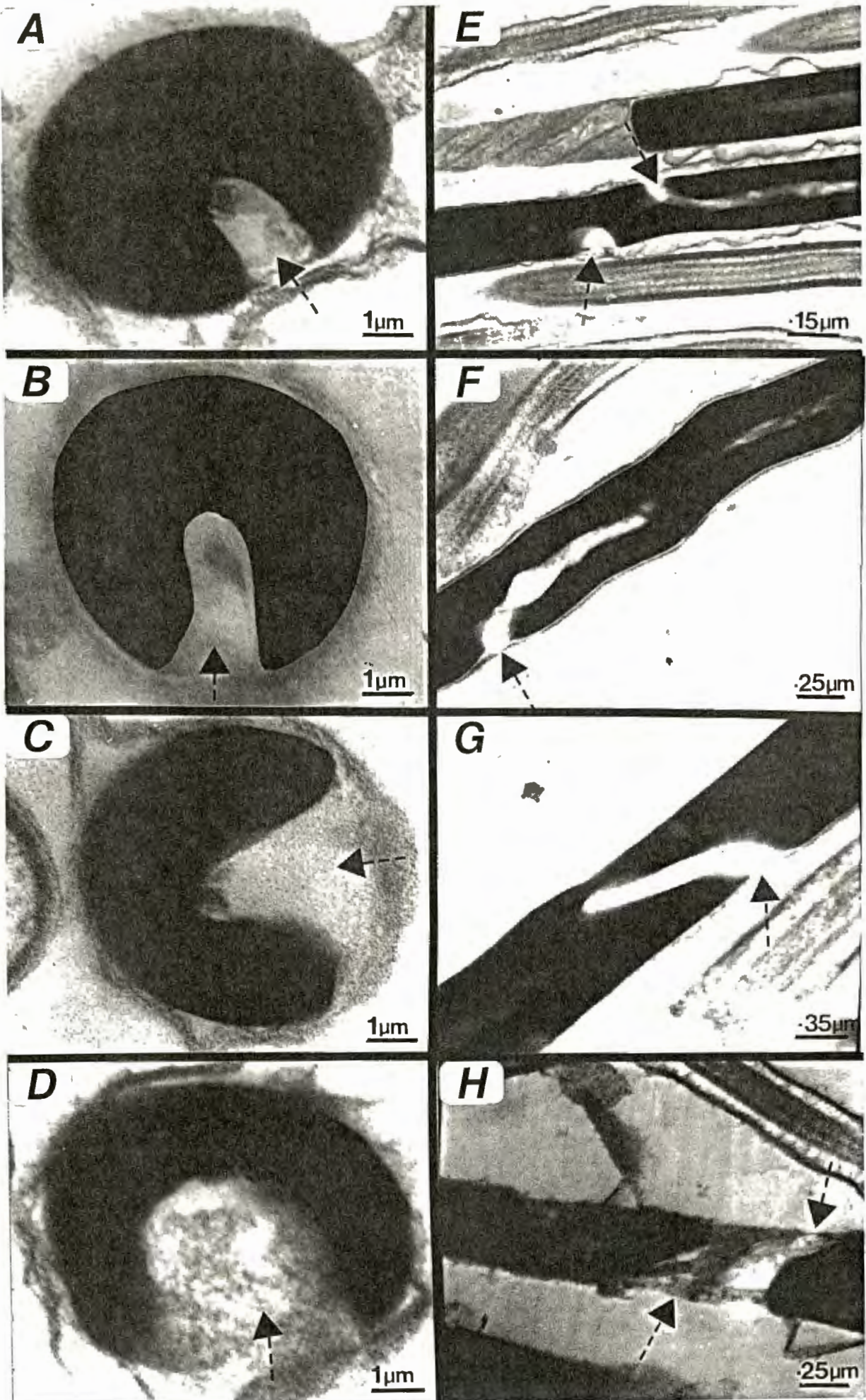
FIGUUR 26

TEM mikrograwe van spermatozoa wat aan 'n konsentrasie dieldrien hoër as $0,77\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$ blootgestel is. Die skade is telkens met behulp van pylpunte aangetoon.

A ; B ; C ; D - dwarsneë deur die nukleus

E ; F ; G ; H - lengtesneë deur die nukleus

Figuur 26



FIGUUR 27

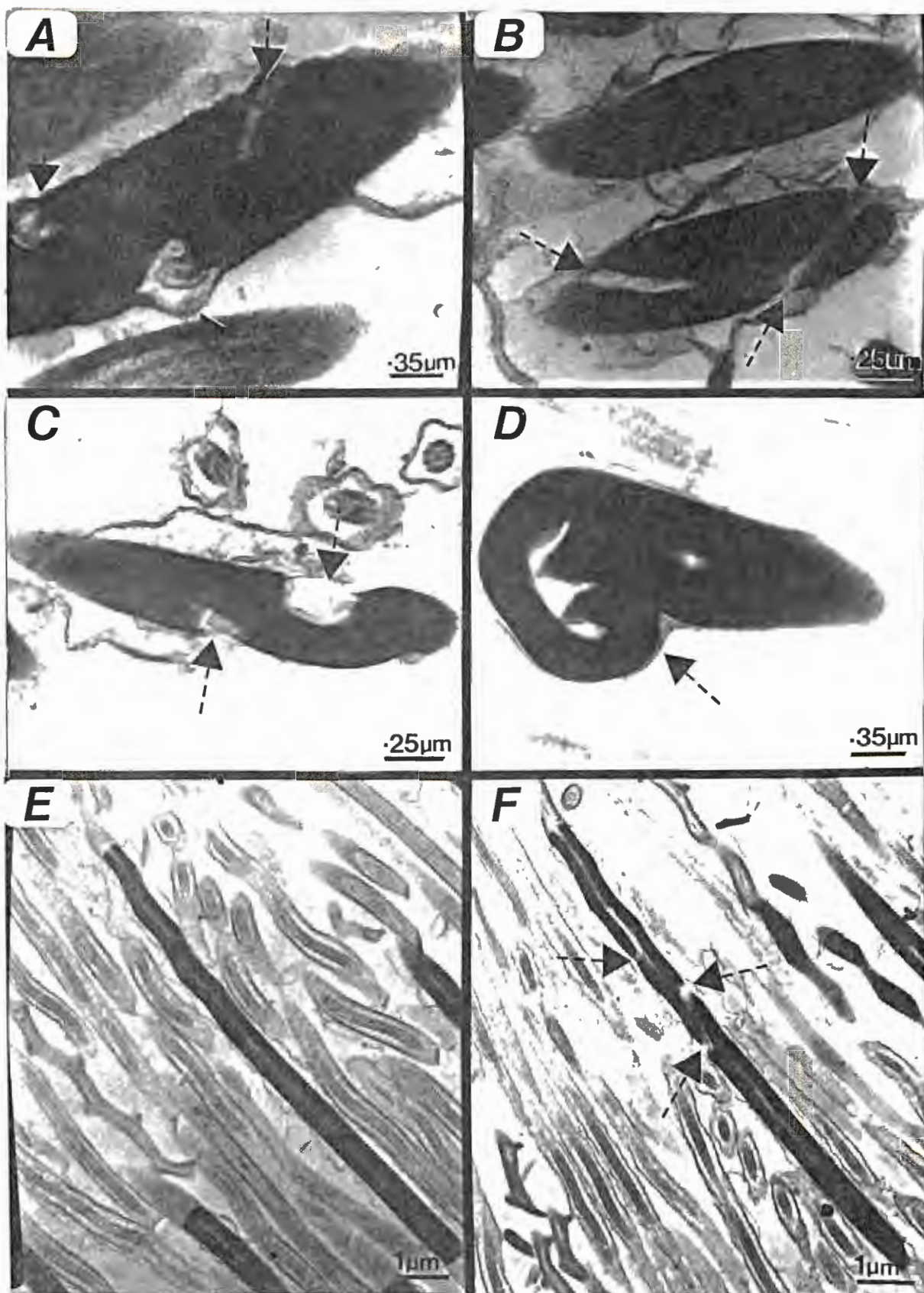
Verskillende sneë deur die spermatozoa wat aan 'n konsentrasie dieldrien hoër as $0,77\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$ blootgestel is. Skade is tekens met behulp van pylpunte aangetoon.

A ; B ; C - dit wil voorkom of die beskadiging in 'n sig-sag patroon aanneem.

D - 'n lengtesnit deur die nukleus waar die eenkant van die nukleus heeltemal beskadig is. Die nukleus neem 'n opgerolde vorm aan.

E ; F - 'n vergelyking tussen die kontrole (E) en beskadigde (F) nukleusstreke van die onderskeie spermatozoa.

Figuur 27



ander patologiese simptome. Die omvang van hierdie subletale effekte is van kardinale belang in die natuur, omdat 'n verlies aan doeltreffendheid ten opsigte van beweging, voedselverkryging en voortplanting die oorlewing van die soort kan bepaal.

Die omvang en implikasie van omgewingsvergiftiging deur persisterende pestisiede, veral ten opsigte van langtermyn subletale effekte op nie-teikenorganismes, word selde ten volle begryp. Deur die gebruik van sintetiese plaagdoders het die mens 'n nuwe abiotiese ekologiese faktor geskep, wat in baie gevalle beperkend inwerk op ander bevolkings as dié waarvoor die pestisied oorspronklik bedoel is. Omgewingsbestuur vereis dus goeie en eenvoudige maniere vir die meting van omgewingsvergiftiging en veral subletale of chroniese effekte wat nie andersins maklik meetbaar is nie. Deur van eenvoudige toetsmetodes en biologiese indikatoren in die verband gebruik te maak kan 'n bydrae hiertoe gelewer word.

OPSOMMENDE AFLEIDING

Tydens die huidige ondersoek is gevind dat die voortplantingstrukture van *E. eugeniae* 'n hoë graad van spesialisasie bereik ten opsigte van die kompakte vorm en die doeltreffendheid daarvan teenoor ander Oligochaeta. Daar is ook gevind dat spermatozoa in die omgewing van die ovarium en in die oviduk voorkom. Dit versterk die vermoede dat interne bevrugting by *E. eugeniae* baie moontlik is. 'n Goed ontwikkelde kopulasieorgaan naaamlik die penis kom by die manlike voortplantingstrukture voor. Dit verseker doeltreffende spermoordraging tydens kopulasie.

Ligmikroskopie, SEM en TEM studies is gedoen om sekere aspekte van die proses van spermatogenese by *E. eugeniae* te ondersoek. Daar is vasgestel dat die algemene ontwikkelingspatroon van die proses van spermatogenese, soos aangetref by ander Annelida, ook vir *E. eugeniae* geld.

Uit die resultate kan afgelei word dat die spermatoosoon van *E. eugeniae* ooreenstem met die algemene oligogeeetpatroon wat die bou betref. Dit is tipies langwerpig met 'n proksimale akrosoom wat bestaan uit 'n primêre akrosoomvesikel, 'n aksiale staaf en 'n akrosoombuis. Die nukleus is silindries en bevat digte materiaalinhoud, twee tot agt (in die geval van *E. eugeniae* ses) radiale mitochondriumlobbe kom voor. Geen proksimale sentriool is teenwoordig by die volgroeide spermatoosoon nie. 'n Distale sentriool is wel teenwoordig. In 'n dwarsneë van die flagellum van die spermatoosoon kan die kenmerkende 9+2 konfigurasie van die mikrotubulêre buisies duidelik waargeneem word.

Wat die resultate van die ondersoek oor die invloed van dieldrien op die voortplantingstrukture en aspekte daarvan betref, kan daar afgelei word dat die gemelde konsentrasies ten spyte van die feit dat dit nie letaal was nie die erdwurms nadelig beïnvloed het. Tydens die huidige studie is dit dan ook gevind dat morfologiese afwykings op mikroskopiese- en ultramikroskopiese vlak by die spermatoosoa van *E. eugeniae* voorgekom het as gevolg van blootstelling aan dieldrien. Min is egter nog bekend oor die rol wat gifstowwe of vreemde chemikalië kan speel om kleinere deffekte in die spermatoosoa te veroorsaak. Hierdie kleinere deffekte wat duidelik deur elektronmikroskopiese ondersoeke uitgewys is, sal indien dit ook by die mense sou voorkom, kon lei tot 'n normale swangerskap maar wangeskapenheid by die nakomeling.

DANKBETUIGINGS

Ek wil van hierdie geleentheid gebruik maak om my opregte dank en waardering teenoor die volgende persone uit te spreek :

- Dr. S.A. Viljoen wie se professionele hulp en raad deurentyd tot my beskikking was.
- Prof. A.J. Reinecke vir hulp en belangstelling en die beskikbaarstelling van fasiliteite.
- Dr. H. Bouwman vir onbaatsugtige hulp en positiewe aanmoediging te alle tye.

- Prof. G. van der Horst, van die Departement Fisiologie van die Universiteit van Wes Kaapland, vir die onskatbare ondervinding om saam met hom te kon werk.
- Die personeel en nagraadse studente van die Departement Dierkunde van die P.U. vir C.H.O.
- Dr. I. Stighling en Mej. R. Pieters vir hulp met die mikrotegnieke.
- Dr. L. Tiedt en die personeel van die Elektronmikroskoopeenheid vir hulp en ondersteuning.
- Mnr. Casper Geldenhuys vir hulp met fotografiese werk.
- Die SNO vir finansiële steun.
- My ouers, my susters en vir Theuns vir die volgehoue onderskraging en belangstelling.
- My Skepper want deur Hom is jy tot alles instaat !

LITERATUUR— VERWYSINGS

ALEXAKI, E., SAMARA, C., ALEXOPOULOS, C., TSAFARIS, F. & SMOKOVITIS, A. 1990. Detection of lead in blood, seminal plasma, and spermatozoa of bulls. Effect in vitro of lead acetate on sperm motility. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 45 : 824-828.

BACCETI, B & AFZELIUS, B.A. 1976. The biology of the sperm cell. New York: S. Karger. 253p. B

BANO, K. & KALE, R.D. 1988. Reproductive potential and existence of endogenous rhythm in reproduction of earthworm, *Eudrilus eugeniae*. *Proceedings of Zoology society, Calcutta*, 39 : 9-14. T

BARLIN-BRINCK, M. 1991. Pesticides in Southern Africa: an assessment of their use and environmental impact. Durban: The Wildlife society of South Africa. 97p. ^B

BEDDARD, F.E. 1886. Note on the ovaries and oviducts of *Eudrilus*. *Zoologischer Anzeiger*, 9(342) : 342-344. ^T

BEDDARD, F.E. 1887. On the so called prostate glands of the Oligochaeta. *Zoologischer Anzeiger*, 10 : 675-678. ^T

BONET, S & MOLINAS, M. 1988. Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis and spermiogenesis of *Dina lineata* (Hirudinea, Erpobdellidae). *Gamete research*, 19 : 177-190. ^T

BOT, J. & HOLLINGS, N. 1981. Pesticides and fungicides. Pretoria : Government Printer. 309p. ^B

BUNKE, D. 1985. Ultrastructure of the spermatozoon and spermiogenesis in the interstitial Annelid *Potamodrilus fluviatilis*. *Journal of morphology*, 185 : 203-216. ^T

CALLAHAN, C.A. 1988. Earthworms as ecotoxicological assessment tools. (In Edwards, C.A. & Neuhauser, E.F., eds. Earthworms in waste and environmental management. The Hague : SPB Academic Publ. p. 295-301.) ^T

DAVIS, B.N.K. 1971. Laboratory studies on the uptake of dieldrin and DDT by earthworms. *Soil Biology and Biochemistry*, 3 : 221-233. ^T

DAVEY, S.P. 1963. Effects of chemicals on earthworms: a review of the literature special scientific report. *Wildlife*: 74. ^T

DINNEL, P.A., LINK, J.M., STÖBER, Q.J., LETOURNEAU, M.W. & ROBERTS, W.E. 1989. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 18 : 748-755.

DOANE, C.C. 1962. Effects of certain insecticides on earthworms. *Journal of economic Entomology*, 55(3) : 416-418.

ECKELBARGER, K.J. & GRASSLE, J.P. 1987. Spermatogenesis sperm storage and comparative sperm morphology in nine species of *Capitella*, *Capitomastus* and *Capitellides* (Polychaeta: Capitellidae). *Marine Biology*, 95 : 415-429.

EDWARDS, C.A. 1966. Insecticide residues in soils. *Residue reviews*, 13 : 83-113.

EDWARDS, C.A. 1970. Persistent pesticides in the environment. *Critical reviews in environmental control*, 1(1) : 7-67.

EDWARDS, C.A. 1975. Factors that effect the persistence of pesticides in plants and soils. *Pure and applied Chemistry*, 42(1) : 39-56.

EDWARDS, C.A. 1978. Testing chemicals for toxicity to earthworms. Report of Rothamsted Experimental Station for 1978. Harpenden Hertz, England. 7p.

EDWARDS, C.A. 1984. Report of the second stage in development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. 99p.

EDWARDS, C.A. & LOFTY, J.R. 1972. Pesticides and earthworms. Report of Rothamsted Experimental Station for 1972. Harpenden Hertz, England. 212p.

EDWARDS, C.A. & THOMPSON, A.R. 1973. Pesticides and the soil fauna. *Residue reviews*, 13 : 1-17.

EVANS, A.C. & GUILD, W.J.McL. 1947. Studies on the relationships between earthworms and soil fertility. *Annals of applied Biology*, 34(3) :307-330.

FERRAGUTI, M. 1984. Cytological aspects of Oligochaete spermiogenesis. *Hydrobiologia*, 115 : 59-64.

FERRAGUTI, M., BERNARDINI, G., MELONE, G & DALLAI, R. 1988. Structure and function of the metachronal wave in *Tubifex tubifex* spermatozeugmata (Annelida, Oligochaeta). *Journal of ultrastructure and molecular structure research*, 99: 79-95.

FERRAGUTI, M., GRASSI, G & ERSEUS, C. 1989. Different models of tubificid spermatozeugmata. *Hydrobiologia*, 180 : 73-82.

FERRAGUTI, M. & JAMIESON, B.G.M. 1984. Spermiogenesis and spermatozoal ultrastructure in *Hormogaster* (Hormogastridae, Oligochaeta, Annelida). *Journal of submicroscopic Cytology*, 16(2) : 307-316.

FRANZEN, A. 1973. Sperm ultrastructure in some Polychaeta. (In Afzelius, B.A. ed. The functional anatomy of the spermatozoon. Proceedings of the Second International Symposium, Wenner-Gren Center, Stockholm, August 1973. New York: Pergamon Press.)

GARAVAGLIA, C., DOLIN, C.L.L & LANZAVECCHIA, G. 1974. Ultrastructural morphology of spermatozoa of Hirudinea. *Journal of submicroscopical Cytology*, 6 : 229-244.

GATES, G.E. 1942. Notes on various Pergerine earthworms. *Bulletin of museum of comparative Zoology*, 89(3) : 64-143.

GATES, G.E. 1972. Burmese Earthworms: an introduction to the systematics and biology of Megadrile Oligoghaetes with special reference to Southeast Asia. *Transactions of the American Philosophical society*, 62 (7) :51-52.

GOATS, G.C. & EDWARDS, C.A. 1988. The prediction of field toxicity of chemicals to earthworms by laboratory methods. (In Edwards, C.A. & Neuhauser, E.F., eds. *Earthworms in waste and environmental management*. The Hague : SPB Academic Publ. p. 283-294.)

GRAFF, O. 1981. Preliminary experiments of vermicomposting of different waste materials using *Eudrilus eugeniae* Kinberg. (In Appelhof, A., ed. *Role of earthworms in the stabilization of organic residues*. Workshop, Beech Leaf, Kalamazoo, Michigan. p. 179-191.)

GRAFF, O. 1982. Vergleich der regenwurmart *Eisenia foetida* und *Eudrilus eugeniae* hinsichtlich ihrer eignung zur proteingewinnung aus abfallstoffen. *Pedobiologia*, 23 : 277-282.

HARTENSTEIN, F., HARTENSTEIN, E. & HARTENSTEIN, R. 1981. Gut load and transit time in the earthworm *Eisenia foetida*. *Pedobiologia*, 22 : 5-20.

HEIMBACH, F. 1988. A comparison of laboratory methods for toxicity testing with earthworms. (In Edwards, C.A. & Neuhauser, E.F., eds. Earthworms in waste and environmental management. The Hague : SPB Academic Publ. p. 329-335.)

HUMASON, G.L. 1979. Animal tissue techniques. San Francisco : Freeman and Company. 661p.

JAMIESON, B.G.M. 1981. The ultrastructure of the Oligochaeta. London : Academic Press. 462p.

JAMIESON, B.G.M., ERSEUS, C & FERRAGUTI, M. 1987. Parsimony analysis of the phylogeny of some Oligochaeta using spermatozoal ultrastructure. *Cladistics*, 3(2) : 145-155.

JAMIESON, B.G.M. & ROUSE, G.W. 1989. The spermatozoa of the Polychaeta (Annelida) : an ultrastructural review. *Biological reviews*, 64 : 93-157.

JOHNSON, W.W. & FINLEY, M.T. 1980. Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic Invertebrates. Washington : United States Department of the interior fish and wildlife service. 98p.

KAPLAN, D.L., HARTENSTEIN, R., NEUHAUSER, E.F. & MALECKI, M.R. 1980. Physicochemical requirements in the environment of the earthworm *Eisenia foetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 12 : 347-352.

KNIERIEMEN, D. 1984. Biomassegewinnung durch vermehrung wärmeliebender regenwurmart. (Unpublished Doctorate Thesis.) Giessen : Justus-Liebig-Universität.

- LOEHR, R.C., NEUHAUSER, E.F. & MALECKI, M.R. 1985. Factors effecting the vermistabilization process. Temperature, moisture content and polyculture. *Water research*, 19 : 1311-1317.
- LOFS-HOLMIN, A. 1980. Measuring growth of earthworms as a method of testing sublethal toxicity of pesticides. *Swedish journal of Agricultural research*, 10 : 25-33.
- LOFS-HOLMIN, A. & BOSTRÖM, U. 1988. The use of earthworms and other soil animals in pesticide testing. (In Edwards, C.A. & Neuhauser, E.F., eds. *Earthworms in waste and environmental management*. The Hague : SPB Academic Publ. p. 303-313.)
- LORD, K.A., BRIGGS, G.G., NEALE, M.C. & MANLOVE, L. 1980. Uptake of pesticides from water and soil by earthworms. *Pesticide Science*, 11 : 401-408.
- MARTIN, H. 1971. *Pesticide manual*. London : Oxford. 371p.
- NASH, R.G. & HARRIS, W.G. 1973. Chlorinated hydrocarbon insecticide residues in crops and soil. *Journal of environmental quality*, 2 (2) : 296-273.
- NELSON, L. 1990. Pesticide perturbation of sperm cell function. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 45 : 876-882.
- NEUHAUSER, E.F., KAPLAN, D.L. & HARTENSTEIN, R. 1979. Life history of the earthworm *Eudrilus eugeniae*. *Revue d' Ecologie et de Biologie du sol*, 16 : 525-534.
- REINECKE, A.J. 1991. Omgewingstoksikologie : 'n nuwe uitdaging. *Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie* 10 (2) : 66.

REINECKE, A.J. & VILJOEN, S.A. 1988. Reproduction of the earthworm, *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta)-cocoons. *Biology and fertility of soils*, 7 : 23-27.

RICE, S.A. & ECKELBARGER, K.J. 1989. An ultrastructural investigation of spermatogenesis in the holopelagic polychaetes *Vanadis formosa* and *Krohnia lepidota* (Polychaeta). *Biology bulletin*, 176 : 123-134.

ROBERTS, B.L. & DOROUGH, H.W. 1984. Relative toxicities of chemicals to the earthworm *Eisenia foetida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3 : 67-78.

RODRIGUES, C., CANETTI, M.E., REINES, M. & SIERRA, A. 1986. Life-cycle of *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta : Eudrilidae) at 30° Celsius. *Poeyana Instituto de Zoologia academia de Ciencias de Cuba*, 326 : 1-13.

ROOSEN-RUNGE, E.C. 1977. The process of spermatogenesis in animals. Cambridge : Cambridge University Press. 214p.

SIMS, R.W. 1969. Internal fertilization in Eudrilid earthworms with the description of a new Pareudriline genus and species (Oligochaeta) from Ghana. *Journal of Zoology*, 157 : 437-447.

SIMS, R.W. 1987. Review of the central African earthworm family. Eudrilidae (Oligochaeta). (In Pagliai, A.M.B. & Omodeo, P., eds. On earthworms : Proceedings of the International Symposium on Earthworms, December 1987, Italy. p. 359-388.)

SIMS, R.W. & GERARD, B.M. 1985. Earthworms. London : Pitman . 171p.

STEPHENSON, J. 1972. The Oligochaeta. New York : Wheldon & Wesley. 978p.

- THIELEMANN, U. 1986. Glasröhrchenmethode zur lebendbestimmung von regenwürmern. *Pedobiologia*, 29 : 341-343.
- TODD, W.J. 1986. Effects of specimen preparation on the apparent ultrastructure of microorganisms. (In Aldrich, H.C. & Todd, W.J., eds. *Ultrastructure techniques for microorganisms*. New York : Plenum. p. 87-100.
- TROYER, D. 1980. Spermiogenesis in Lumbricid earthworms revisited. II - Elongation and shortening of the spermatied nuckleus and the roles of microtubules and chromatin in organelle shaping. *Biology Cellulaire*, 37 : 287- 292.
- VAN RHEE, J.A. 1965. Earthworm activity and plant growth in artificial cultures. *Plant and soil*, 22 : 45-48.
- VATI, V. 1945. The reproductive organs of the Oligochaete *Eudrilus eugeniae*. (Kinb.). *Proceedings of the National Institute of Sciences* , 11 : 345-352.
- VENTER, J.M. & REINECKE, A.J. 1988. Sublethal ecotoxicological effects of dieldrin on the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). (In Edwards, C.A. & Neuhauser, E.F., eds. *Earthworms in waste and environmental management*. The Hague : SPB Academic Publ. p. 337-353.)
- VILJOEN, S.A. & REINECKE, A.J. 1989a. The life-cycle of the African Nightcrawler *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta). *South African journal of Zoology*, 24(1) : 27-32.

VILJOEN, S.A. & REINECKE, A.J. 1989b. The number, size and growth of hatchlings of the African Nightcrawler, *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta). *Revue Ecologie et Biologie du sol*, 25 : 225-236.

VILJOEN, S.A. & REINECKE, A.J. 1989c. Moisture and growth, maturation and cocoon production of *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta). *Revue Ecologie et Biologie du sol*, 26(3) : 291-303.

VOUK, V.B. & SHEEHAN, P.J. 1983. Methods for assessing the effect of chemicals on reproductive functions. Scope 20. New York : Wiley 541p.

BYLAE

A. FIKSEERMIDDELS

* *Bouin se fikseermiddel* (Humason 1979)

pikriensuur.....	75.0ml
gekonsentreerde formalien.....	25.0ml
ysasynsuur.....	5.0ml

** Todd se fikseermiddel (Todd 1986)*

25% glutaaraldahied (2,5%).....10ml.....5ml
 Paraformaldahied (1,25%) in 20ml
 Na-kakodilaat buffer, verhit tot
 60°C.....1,25g.....0,675g
 Kalsiumchloried
 (voorraadopl. 0,3%) 0,03%.....10ml.....5ml
 Pikriensuur
 (voorraadopl. 0,3%) 0,03%.....10ml.....5ml
 Vul aan met Na-kakodilaat
 buffer tot.....100ml.....50ml

B. INBED VIR TEM-WERK

** Spurr se hars (Todd 1986)*

ERL 4206.....10g (5g)
 DER 736.....4g (2g)
 NSA.....26g (13g)
 S-1.....0,4g (0,2g)

- Weeg die eerste drie bestanddele in die korrekte volgorde af in 'n papierbeker
- Meng goed voordat S-1 bygevoeg word
- Meng vir 5 minute met 'n magnetiese roerder
- Na inbed is hars vir 8 ure by 70°C gelaat om te set.