

**'N MIKROSKOPIESE EN ULTRAMIKROSKOPIESE
ONDERSOEK NA ASPEKTE VAN VOORTPLANTING BY *DENDROBAENA*
VENETA
(OLIGOCHAETA)**

Lieze Edith Hartman
B.Sc. Honns., H.O.D.

Verhandeling voorgelê vir gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die graad **Magister Scientiae** in die Departement **Dierkunde** aan die **Potchefstroomse Universiteit** vir **Christelike Hoër Onderwys**.

Leier: Dr. S.A. Viljoen MSc. PhD

POTCHEFSTROOM
DESEMBER 1992

INHOUDSOPGAWE

1. INLEIDING	1.
2. MATERIAAL EN METODES	11
2.1. Proefdier: <i>Dendrobaena veneta</i> (Rosa, 1886)	11
2.1.1. Aanhou van eksperimentele diere	12
2.2. Versameling van kokonne	12
2.3. Stereo- en ligmikroskopie	13
2.4. Elektronmikroskopie	14
2.4.1. Die prosedure vir die fiksering en inbedding van materiaal vir die transmissie-elektronmikroskopiese ondersoek	15
2.4.2. Voorbereiding en montering van monsters vir die skandeerelektronmikros- kopiese ondersoek	16
2.5. Histochemie	17
2.5.1. Inleiding	17
2.5.2. Materiaalvoorbereiding	17
2.5.3. Fiksering	18
2.5.4. Weefselprosessering	18
2.5.5. Mikrotomering	18
2.5.6. Ontwassing, hidratering en dehidratering van sneë	19
2.5.7. Hematoksilien-eosien	19
2.5.8. Ander kleurtegnieke	20

3. RESULTATE EN BESPREKING

3.1. Normale liggaamsepidermis	22
3.2. Klitellum	24
3.2.1. Die kutikula	27
3.2.1.1. Die kollageenvesels	28
3.2.1.2. Die mikrofibrillêre matriks	30
3.2.1.3. Die mikrovilli vanuit die epiteelselle	30
3.2.1.4. Die epikutikulêre projeksies	31
3.2.1.5. Die kutikulêre onderbrekings	31
3.2.2. Die ondersteunende selle	32
3.2.3. Die klierselle	33
3.2.3.1. Die groot granulêre selle (sel tipe 1)	34
3.2.3.2. Die fyn granulêre, proteïenagtige selle (sel tipe 2)	36
3.2.3.3. Metachromatiese slymselle	39
3.2.3.4. Ortochromatiese slymselle	40
3.2.4. Bakterioïedbevattende selle	41
3.2.5. Basaalmembraan	41
3.3. Kokonne	42
3.3.1. Uitwendige kenmerke	43
3.3.2. Ultramikroskopies	44
3.4. Embriologie	47
3.4.1. Eierselle	47
3.4.2. Bevrugting	48

Inhoud (vervolg)

3.4.3. Kliewing	49
3.4.4. Gastrulasie	50
4. SAMEVATTENDE OPSOMMING	53
5. ABSTRACT	58
6. DANKBETUIGINGS	60
7. LITERATUURVERWYSINGS	62
8. BYLAAG 1	73

1. INLEIDING

Meer as 100 jaar het reeds verloop sedert Charles Darwin sy boek "The Formation of Vegetable Mould Through the Action of Worms" (1881) geskryf het. Hierdie boek was die produk van meer as 40 jaar se persoonlike waarnemings van die gedrag en aktiwiteite van erdwurms. In die 60 jaar daarna het die wetenskaplike wêreld heelwat meer oor hierdie alomteenwoordige organismes te wete gekom. In 1955 is die eerste internasionale konferensie gehou waar gronddierkunde tot sy reg gekom het. Publikasies oor erdwurmnavorsing het daarna begin toeneem en in 1972 het Edwards en Lofty die eerste boek oor die biologie van erdwurms gepubliseer. Dit was 'n deeglike opsomming oor die bestaande kennis van erdwurms. Na die verskyning van hierdie en vele ander publikasies, het daar verskeie kongresse en werksbyeenkomste plaasgevind wat as 'n groot stimulus gedien het vir die benutting van erdwurms as proteïenbron en die gebruik daarvan in vermikultuur (Edwards & Neuhauser, 1988).

Darwin het reeds probeer aandui in watter mate erdwurms, wat op daardie stadium deur sommige wetenskaplikes en oningelikes as peste beskou is, tot die vrugbaarheid van die grond kon bydra (Darwin, 1881). Intussen het vele outeurs die nuttigheidswaarde van hierdie grondorganismes beklemtoon omdat erdwurms onder andere verantwoordelik is vir die omdolwing en vermenging van die grond. Ander eienskappe van grond waartoe erdwurms 'n bydrae maak is: 'n verhoogde waterhouvermoë, verbeterde waterindringing, verhoogde porositeit en belugting asook verhoogde mikrobe-aktiwiteit (Evans & Guild, 1947a; Stockdill, 1966; Van Rhee, 1977; Hoogerkamp, Rogaar & Eijsackers, 1983; Satchell, 1983 en Joschko, Diestel & Larink, 1989). Die rol van erdwurms in grond is dus van groot belang en die teenwoordigheid van hierdie organismes in grond is daarom tot groot voordeel vir die landbou en is hul rol in terrestriële ekosistels baie belangrik.

Hierbenewens is erdwurms ook van groot belang in die dierevoedselindustrie

(proteïenproduksie), die verwerking van groot hoeveelhede organiese afvalstowwe (vermikompostering) en die kommersiële teling op groot skaal vir gebruik as visaas. Verskeie navorsers het bygedra tot hierdie kennis en 'n groot hoeveelheid daarvan is saamgevat in die boek van Edwards & Neuhauser (1988), "Earthworms in Waste and Environmental Management". Die een belangrike faktor wat telkens in hierdie boek na vore kom, is die noodsaaklikheid van groot getalle wurms. Die nodigheid van groot getalle wurms vir proteïenproduksie, vermikompostering en teling as visaas spreek vanself. Dit is dus noodsaaklik dat die voortplanting (reproduksie) van die wurms wat hiervoor gebruik word, optimaal moet wees en so gehandhaaf word. Lofs-Holmin (1980) meld dan ook dat vermeerdering en veral die tyd wat dit vir erdwurms neem om geslagsryp te word van groot ekonomiese belang is, aangesien 'n vertraging in die ontwikkeling tot geslagsrypheid tot 'n afname in die bevolking kan lei. Voortplanting is die positiewe krag vir bevolkingsgroei en is van groot belang vir die instandhouding van 'n bevolking (Moriarty, 1983).

Wanneer voortplanting egter as 'n bevolkingseienskap bestudeer word, word van die navorser vereis om die voortplantingsprosesse van die spesie/s onder bespreking eers goed te verstaan sowel as die invloed van omgewingsfaktore wat die verskillende stadiums van die voortplantingsproses kan beïnvloed. Omgewingsfaktore mag hul invloed gedurende verskillende stadiums van die voortplantingsproses uitoefen en daarom moet hierdie prosesse met die eksterne omgewing geïntegreer wees om die voortbestaan van die spesie te verseker. 'n Belangrike aspek tydens die ondersoek van voortplantingsprosesse is dat elke spesie afsonderlik beskou moet word, omdat nie twee spesies presies dieselfde fisiologiese en endokrinologiese eienskappe of dieselfde voortplantingsgedrag het nie (Snyder, 1976).

In 'n wêreld waar die mensegetalle al groter word en dus 'n al groter invloed op die omgewing het, het die bewaring van die omgewing sterk op die voorgrond getree. Die besorgdheid oor die impak van toksiese en gevaarlike stowwe op die grandomgewing, neem steeds toe. Aangesien erdwurms wesenlik kosmopolities is, dit is, hulle is talryk in

meeste gronde en is gedurig met die grond in aanraking, kan hulle sensitief vir hierdie impak op grondekosisteme wees (Reinecke, 1992). Aangesien die diere maklik verkrygbaar en hanteerbaar is kan hulle as bioindikatore en toetsorganismes vir chemiese stowwe in die grondomgewing dien (Reinecke, 1992).

Dat gevaarlike en toksiese stowwe 'n invloed op die voortplantingsprosesse van erdwurms het, is reeds aangetoon. Lofs-Holmin (1982) het aangetoon dat die subletale invloed van gifstowwe op erdwurms deur voortplanting, gemeet in terme van kokonproduksie, bepaal kan word. Venter & Reinecke (1988 b) staaf hierdie bevinding deur die ondersoek van die invloed van dieldrin op *Eisenia fetida*. Hierin toon hulle aan dat kokonproduksie afneem namate die gifstofkonsentrasie toeneem. Hulle wys ook daarop dat die kokonvorm en grootte deur die gifstof beïnvloed word.

Soos hierbo genoem, is dit egter noodsaaklik om die voortplantingsprosesse van die spesie wat in hierdie studie ondersoek is, eers goed te verstaan voordat die invloed van die omgewing daarop in aanmerking geneem kan word en voordat dit as bevolkingseienskap oorweeg kan word. Die vernaamste oogmerk van hierdie studie was dus om 'n aantal voortplantingsprosesse en -strukture van ***Dendrobaena veneta*** (Rosa, 1886) te ondersoek.

Die spesie waarvan die voortplantingsprosesse en -strukture tydens die in hierdie studie ondersoek is, is afkomstig van die meer gematigde Noordelike Halfrond. Hierdie organisme is baie gevoelig vir uiterste temperature en vertoon ook 'n lae temperatuur optimum vir oorlewing (Edwards, 1988). *D. veneta* is 'n groot wurm maar as gevolg van die feit dat dit nie baie teelkragtig is nie en dat dit nie vinnig groei nie (Edwards, 1988) is die verspreiding en gebruik daarvan redelik beperk. Volgens Lofs-Holmin (1986) besit *D. veneta* die potensiaal om as komposverwerker op te tree en as proteïenbron te dien. In teenstelling hiermee het Edwards (1988) waargeneem dat hierdie spesie minder geskik is as byvoorbeeld *Eisenia fetida* of *Eudrilus eugeniae* vir die verwerking van organiese afvalstowwe. Viljoen, Reinecke & Hartman (1991) neem ook waar dat *D. veneta* oor

minder potensiaal beskik vir vermikompostering as ander vermikomposterende spesies wat onder dieselfde omgewingstoestande geteel word. In 1988 het Stafford & Tacon waargeneem dat *D. veneta* 'n geskikte voedselbron vir reënboogforel is. Viljoen, Reinecke & Hartman (1991 & 1992) het die lewensloop van hierdie spesie ondersoek maar die voortplantingstrukture en -prosesse wat tydens hierdie ondersoek ter sake is, is nie bestudeer nie.

Omdat voortplantingsprosesse en -strukture 'n omvangryke studieveld is, is daar in hierdie literatuurondersoek op die volgende drie aspekte van voortplanting van erdwurms gekonsentreer: die klitellum; die kokonne waarbinne bevrugting plaasvind en wat beskerming aan die embrio verleen; die embrionale ontwikkeling. Hier volg nou 'n bespreking van elkeen van hierdie aspekte.

Die klitellum is 'n sekondêre geslagskenmerk wat teenwoordig is by volwasse lede van die Clitellata. Hierdie struktuur is 'n saalagtige gebied van gemodifiseerde velepiteel wat saamgestel is uit ongespesialiseerde ondersteunende selle en 'n verskeidenheid sekretoriese selle (Mill, 1978). Die sekretoriese selle is verantwoordelik vir sekresies wat geassosieer is met die voortplantingsprosesse. Hieronder word ingesluit: die produksie en vorming van die eierkapsul(kokon), die afskeiding van die voedingsvloeistof (albumien) in die kokon, sowel as slym en ander verbindings wat gebruik word tydens kopulasie (Edwards & Lofty, 1972 en Morris, 1985). Kopulasie vind gewoonlik plaas wanneer twee individue "kop-teen-stert" teenmekaar lê sodat die klitellumstreek van elk styf teen die liggaamswand van die spermatekale streek van die ander lê. Die klitellum is soms breed en kan dan tydens kopulasie amper die hele liggaam van die konkopulant omring, veral in die geval van spesies met dorsaalgeleë spermatekale porieë, byvoorbeeld *D. veneta* en *E. fetida* (Edwards & Lofty, 1972). Soos wat die buitenste oppervlak van die slym droog word, word die klitellumstreek van 'n konkopulant styf teen die spermatekale streek van die maat gedruk terwyl sperms veilig in die vloeistofmedium oorgedra word (Edwards & Lofty 1972, Sims & Gerard, 1985).

Die rol wat die klitellum tydens die voortplantingsproses speel, is reeds in die vorige eeu waargeneem. Cerfontaine het volgens Grove (1925) reeds in 1890 belangrike werk oor die struktuur van die klitellum van *Lumbricus terrestris* gedoen. Grove het alleen en in samewerking met Cowley ondersoek ingestel na die klitellum en die rol wat dit in die vorming van die kokon speel (Grove, 1925, Grove & Cowley, 1926 & 1927). Volgens Grove & Cowley (1927) word die histologiese struktuur van die klitellums van *E. fetida* en *L. terrestris* in drie streke verdeel (Figuur 1). Die verdeling in die drie streke word later (par 2.4) in meer besonderhede bespreek.

Die normale epidermis sowel as die klitellum word deur 'n kollageenagtige kutikula bedek en is daarom 'n sterk omhulsel waarvan die hoof funksie die beskerming teen verwerping is. Alhoewel die kutikula deurlaatbaar is vir respirasiegasse is die deurlaikbaarheid daarvan vir chemiese stowwe nie 'n uitgemaakte saak nie (Jamieson, 1981 en Richards & Arme, 1982). Die epidermis besit sekretoriese en nie-sekretoriese selle. Die sekretoriese selle van die ongemodifiseerde epidermis help met voortbeweging, verskaf 'n geskikte area vir die uitruiling van respiratoriese gasse, verskaf 'n beskermende versperring en bevat parings- en ander feromone (Jamieson, 1981).

Vanaf 1927 het verskeie navorsers mikroskopiese en ultramikroskopiese ondersoeke van die epidermis en klitellums van 'n aantal verskillende erdwurmspesies uitgevoer. In 1931 het Antonie Heumann 'n vergelykende mikroskopiese ondersoek van die geslagsorgane en klitellum van drie oligogeetspesies nl. *Allolobophora caliginosa*, *L. terrestris* en *L. rubellus* uitgevoer. Reed & Rudall het in 1948 reeds elektronmikroskopiese ondersoeke van die kutikula van 'n erdwurmspesie uitgevoer. Daarna het Ruska & Ruska (1961), Lufty (1965), Coggeshall (1966), Richards (1973, 1974a,b,c,d, 1975 & 1984), Burke (1974), Morris (1983 & 1985), Fernandez & Benito (1987) en Benito & Fernandez Bernaldo de Quiros (1987) breedvoerige ondersoeke van die klitellums van verskillende erdwurmspesies voltooi.

Die optimale funksionering van die klitellum as sekondêre geslagskenmerk is van uiterste belang en sou enige aspek hiervan nie optimaal funksioneer nie, kan die voortbestaan van 'n bevolking daardeur belemmer word. Die belang en noodsaaklikheid van die klitellum in die voortbestaan van 'n erdwurmbevolking en die invloed wat skadelike plaagdoders op die ontwikkeling en ultramikroskopiese funksionering van die klitellum kan hê, is kwalik in die literatuur aangeraak. Wielgus-Serafinska (1979) neem waar dat loodverbindinge in die sitoplasma van klierselle in die normale epidermis van *E. fetida* akkumuleer. Dit gaan gepaard met 'n toename in die sekretoriese aktiwiteit. Dat plaagdoders wel 'n effek op klitellumontwikkeling kan hê, is aangetoon deur Venter & Reinecke (1988 b). Hulle het in 'n ondersoek na die invloed van dieldrin op *E. fetida* waargeneem dat wurms wat aan hoë dieldrin konsentrasies blootgestel word, nie klitellums ontwikkel het nie en kom tot die gevolgtrekking dat die vertraging in klitellumontwikkeling 'n subletale effek van die gifstof is.

Die aantasting van een van die sekretoriese klierselle en of ander selle in die klitellum deur 'n gifstof, aanleiding kan gee tot wangevormde kokonne terwyl die inhoudelike samestelling van die kokonne ook daardeur beïnvloed kan word.

Die kokonne of eierkapsules (oothecae) (Edwards & Lofty, 1972) is 'n karakteristieke kenmerk van die Oligochaeta (Stephenson, 1930). Die kokonne dien as beskerming vir die eierselle en sperms, vir die ontwikkelende embrio teen meganiese beskadiging, teen die indringing van gevaarlike stowwe asook teen die verlies van water (Ramisch & Graff, 1985). Die vorming van die kokon is reeds so vroeg as 1926 deur Grove & Cowley waargeneem. Die kokon en sy verband met die klitellum, waardeur dit afgeskei word, is deur Grove & Cowley (1927) bestudeer. Hierdie outeurs (Grove & Cowley, 1926) het ook reeds waarnemings gemaak oor die uitwendige kenmerke van die kokon. Hulle het ook die eerste poging aangewend om die wand van die kokon te karakteriseer. Volgens hierdie outeurs is dit 'n membraan, wat, wanneer dit droog word, sterk en weerstandbiedend is en ooreenkom met die chitien van insekte. Stephenson (1930) het met verdere ondersoeke waargeneem dat die kokonwand uit ineengevlegde vesels bestaan.

Hierdie fibrille is 'n baie weerstandbiedende medium en kokonne kan na drie jaar nog ongeskonde in die grond aangetref word (Stephenson, 1930). Pearce, Oates & Carruthers (1990) het na die ontdekking van 'n gefossileerde erdwurmembrio (*Oligochaeta: Lumbricidae*) in 'n gedeelte van 'n kokon die gevolgtrekking gemaak dat die kokon die embrio inderdaad gedeeltelik teen mikrobiële afbraak moes beskerm het. In 'n poging om die fossielembrio te klassifiseer, het hierdie outeurs egter gevind dat beskrywings van erdwurmkokonne ontoereikend en inkonsekwent is. Daar is inderdaad baie min inligting beskikbaar oor die mikroskopiese en veral ultramikroskopiese struktuur van erdwurmkokonne. Marcel, Cardon & Degand (1985) het egter in 'n omvangryke ultrastrukturele en biochemiese bestudering van die kokonne van *E. fetida* waargeneem dat die kokonwand uit ineengevlegde vesels bestaan. Hierdie vesels word saamgestel uit bondels mikrobuisies (tubules). 'n Biochemiese analise het getoon dat die kokonwand glikoproteïene bevat en aminosuuranalises het getoon dat hierdie verbindings nie keratien, kollageen of fibroïen is nie (Marcel *et al*, 1985).

Hoewel min, is daar tog inligting bekend ten opsigte van die vorming en struktuur van kokonne in die geval van die akwatiese oligogeetspesie, *Tubifex hattai* (Hirao, 1965 & Suzutani-Shiota, 1980) asook die molekulêre en ultrastrukturele kenmerke van die eierkapsule in die geval van die bloedsuierspesie *Erpobdella octoculata* (Knight & Hunt, 1974). Ondersoeke van die kokonne van *D. veneta* (Viljoen, Reinecke & Hartman, 1991) strek slegs sover as uitwendige waarnemings en afmetings.

Die inligting wat bekend is ten opsigte van oligogeet- en veral erdwurmkokonne is te gebrekkig om duidelike antwoorde te kan bied ten opsigte van hul voorkoms en samestelling.

Alhoewel die embriologiese ontwikkeling van erdwurms 'n belangrike aspek is van hulle voortplanting, is min literatuur daarvoor beskikbaar. Gedetailleerde embriologiese ondersoeke van veral *E. fetida* en *L. terrestris* is reeds in die vorige eeu onderneem

(Wilson, 1889). In hierdie en daaropvolgende ondersoeke (Stephenson, 1930) is veral klem gelê op die grondliggende meganismes van embriologie. Dit sluit in: die herhaalde mitotiese delings wat groepe selle ondergaan en wat later differensieer om weefsels en organe van die ontwikkelende embrio te vorm (Wilson, 1889, Stephenson, 1930 & Anderson, 1973). Die potensiaal van sommige selle om te spesialiseer met die oog op bepaalde funksies is ook in bogenoemde studies waargeneem.

Die suksesvolle gebruik van embriologie as 'n sensitiewe indikator vir die teenwoordigheid en invloed van 'n verskeidenheid gifstowwe insluitend metale, pestisiede en ander organiese gifstowwe en sedimente, is reeds in die literatuur beskryf (Cherr, Shoffner-McGee & Shenker, 1990). So ook is die gebruik van subletale gifstofvlakke deur DeVriès (1979 en 1988) beskryf waarin hy aangetoon het dat segmentasie 'n eienskap is wat deur subletale gifstofvlakke beïnvloed word. DeVriès (1979 en 1988) het *E. fetida*-embrios van verskillende ouderdomme aan kadmium (Cd), bromodeoksiuridien (BrDu) asook azasitidien (AzaC) blootgestel. In hierdie ondersoeke is waargeneem dat segmentasie uitwendig sowel as inwendig deur hierdie omgewingskontaminante beïnvloed word. Die belangrikheid vir die normale embriologiese prosesse om plaas te vind, kan nie genoeg beklemtoon word nie omdat normale ontwikkeling noodsaaklik is vir die voortbestaan van 'n spesie.

Die hoofdoel van hierdie ondersoek was nie om die grondliggende embriologiese meganismes van *D. veneta* te ondersoek nie, maar om met veral twee eienskappe in gedagte, te poog om 'n spesifieke ontwikkelingsstadium van daardie eienskap aan 'n bepaalde ouderdom te koppel. Die twee eienskappe waarop besluit is, is die ontwikkeling van die segmentasie en die ontwikkeling van die mondgebied en gepaardegaande siliumband. Daar is op hierdie twee eienskappe besluit aangesien dit maklik waarneembaar is met lig- en elektronmikroskopie en die moontlikheid bestaan dat dit eienskappe is wat deur omgewingskontaminante beïnvloed kan word.

Die inkubasietydperk van kokonne van *D. veneta* is gemiddeld 42,1 dae by 25°C maar dit

varieer egter tussen 15 en 80 dae (Viljoen, Reinecke & Hartman, 1991). Dit verskil van inkubasietydperk van *E. eugeniae* (16.89 dae) (Reinecke & Viljoen, 1988) en die van *E. fetida* (23 dae) (Venter & Reinecke, 1988 a) en mag 'n weerspieëling wees van die verskil in die tempo van embriologiese ontwikkeling tussen hierdie organismes. Dit het ook die vraag laat ontstaan waarom daar so 'n groot variasie tussen die inkubasieperiodes van die verskillende spesies is en waarom sommige kokonne so lank neem om uit te broei. Vanuit die beskikbare literatuur is dit duidelik dat relatief min inligting beskikbaar is ten opsigte van die verskillende aspekte van die voortplanting van erdwurms. Dit geld veral vir die spesie *D. veneta*. Daarom is die volgende doelstellings ten opsigte van die voortplantingaspekte van *D. veneta* vir hierdie studie geformuleer.

1. Die klitellum: 'n Vergelyking van die klitellumweefsel met die epidermis en die waarneming van verskillende tipes klierselle in hierdie weefsel deur middel van histochemiese en elektronmikroskopiese ondersoeke. Die moontlikheid om hierdie inligting te benut as indikator vir die teenwoordigheid en invloed van omgewingskontaminante is ook ondersoek.
2. Die kokonne: 'n Bestudering van die uitwendige kokonkenmerke van *D. veneta* en om hierdie kenmerke te gebruik vir identifisering van kokonne van erdwurms in die algemeen.
3. Embriologie: Bepaling van die ouderdom van die embryo deur middel van die beskrywing van bepaalde waarneembare eienskappe van die ontwikkelende embryo.

Om 'n bydrae te maak ten opsigte van die beskrywing van sekere voortplantingsaspekte van *D. veneta* en ter bereiking van die doelstelling van die verhandeling is die volgende benaderingwyses gevolg:

1. Erdwormkulture van die spesie *D. veneta* is onder. wat beskou word as optimale toestande (25°C, 75% vog en relatiewe humiditeit van 80%), aangehou en eksperimentele materiaal is hieruit versamel.
2. Mikroskopiese en elektronmikroskopiese (Skandeer- en Transmissie) ondersoek is uitgevoer ten einde die normale liggaamsepidermis en klitellumweefsel met mekaar te vergelyk asook ter beskrywing van die kutikula, klierselle en ondersteunende weefsel wat daarin voorkom.
3. Histochemie is gebruik om bepaalde klierselle van mekaar te onderskei waar dit nie op grond van ultrastruktuur gedoen kon word nie.
4. Die kokonne is mikroskopies ondersoek terwyl die wandstruktuur ultramikroskopies bestudeer is. Geen biochemiese analises van die kokonwandsamestelling is uitgevoer nie.
5. Sekere aspekte van die embriologiese ontwikkeling is mikroskopies en elektronmikroskopies (SEM) ondersoek.

2. MATERIAAL EN METODES

2.1. PROEFDIER: *Dendrobaena veneta* (Rosa, 1886).

Die plaaslike bevolking van *D. veneta* is oorspronklik van Prof. O. Graff verkry, wat 'n kultuur van hierdie spesie in Braunschweig, Duitsland instand hou.

D. veneta is 'n spesie van die Noordelike Halfrond en kom in Siberië, Ysland, Groenland, Poland, Denemarke, Finland en Noord Amerika voor. Die wurms se natuurlike habitat is onder verrottende blare en houtstompe, in ryk organiese grond, en in kompos en rioolbeddings (Sims & Gerard, 1985).

Klassifikasie:

Filum: Annelida

Subfilum: Clitellata

Klas: Oligochaeta

Orde: Haplotaxida

Suborde: Lumbricina

Superfamilie: Lumbricoidea

Familie: Lumbricidae

Genus: *Dendrobaena*

Spesie: *Dendrobaena veneta* (Gates, 1972)

D. veneta word deur Edwards & Lofty (1972) as 'n medium tot groot wurm beskou. Die wurms is 50-155 mm lank met 80-225 segmente. Die kleur is olyfbruin met afwisselende gepigmenteerde en ongepigmenteerde bande op die dorsale oppervlak. Die agterste gedeelte van die wurm is kenmerkend geel (Edwards & Lofty, 1972).

Baie min is oor die lewensgeskiedenis van hierdie wurms bekend. Navorsers wat wel tot die kennis van hierdie spesie bygedra het is, Lofs-Holmin (1986); Edwards (1988); Neuhauser, Loehr & Malecki, (1988) en Viljoen, Reinecke & Hartman (1991 & 1992).

Die gemiddelde massa van die klitellate wurms is 2200 mg met die hoogste massa vir 'n individuele wurm 3640mg. Die inligting is by 25°C verkry. Na 30 dae bereik sommige wurms volwassenheid met geswolle, wit klitellums. Daar word gemiddeld 0,28 kokonne per wurm per dag geproduseer. Die gemiddelde inkubasietyd is 42,1 dae en gemiddeld 1,1 wurms broei per kokon uit (Viljoen, Reinecke & Hartman, 1991).

Volgens Lofs-Holmin (1986) besit *D. veneta* die potensiaal om as komposverwerker op te tree en as proteïenbron te dien. Edwards (1988) en Neuhauser *et al.* (1988) het bevind dat *D. veneta* baie geskik is as proteïenbron alhoewel dit lank neem om die maksimum massa te bereik. Edwards (1988) het waargeneem dat hierdie spesie minder geskik is vir die afbreek van organiese afvalstowwe as ander spesies onder dieselfde omgewingstoestande. Viljoen, Reinecke & Hartman (1991) het hierdie bevindinge ondersteun.

2.1.1. Aanhou van eksperimentele diere

D. veneta is in asbesbakke in beesmismedium geteel waar dit weekliks met vars beesmis gevoer is. Kokonne van wurms in hierdie bakke is uitgesoek en in beesmismedium gelaat om uit te broei. Die klein wurmpies is in Consolflesse geplaas waarin daar beesmismedium was. Die medium is voorberei deur beesmis te sondroog en dit met 'n versapper fyn te maal. Die fyngemaalde mis is gesif tot deeltjiegrootte 500 - 1000 μ m (Venter & Reinecke, 1988 a). Gedistilleerde water is by hierdie medium gevoeg om 'n voginhoud van tussen 70% en 80% te verkry. Die medium is vir 24 uur gelaat om te stabiliseer voordat die klein wurmpies daarin geplaas is. Die flesse met wurms is in 'n Conviron klimaatbeheereenheid by 'n temperatuur van 25°C en relatiewe humiditeit (RH) van 80% geplaas (Viljoen & Reinecke, 1989). Die wurms is weekliks met vars beesmis gevoer.

2.2. VERSAMELING VAN KOKONNE

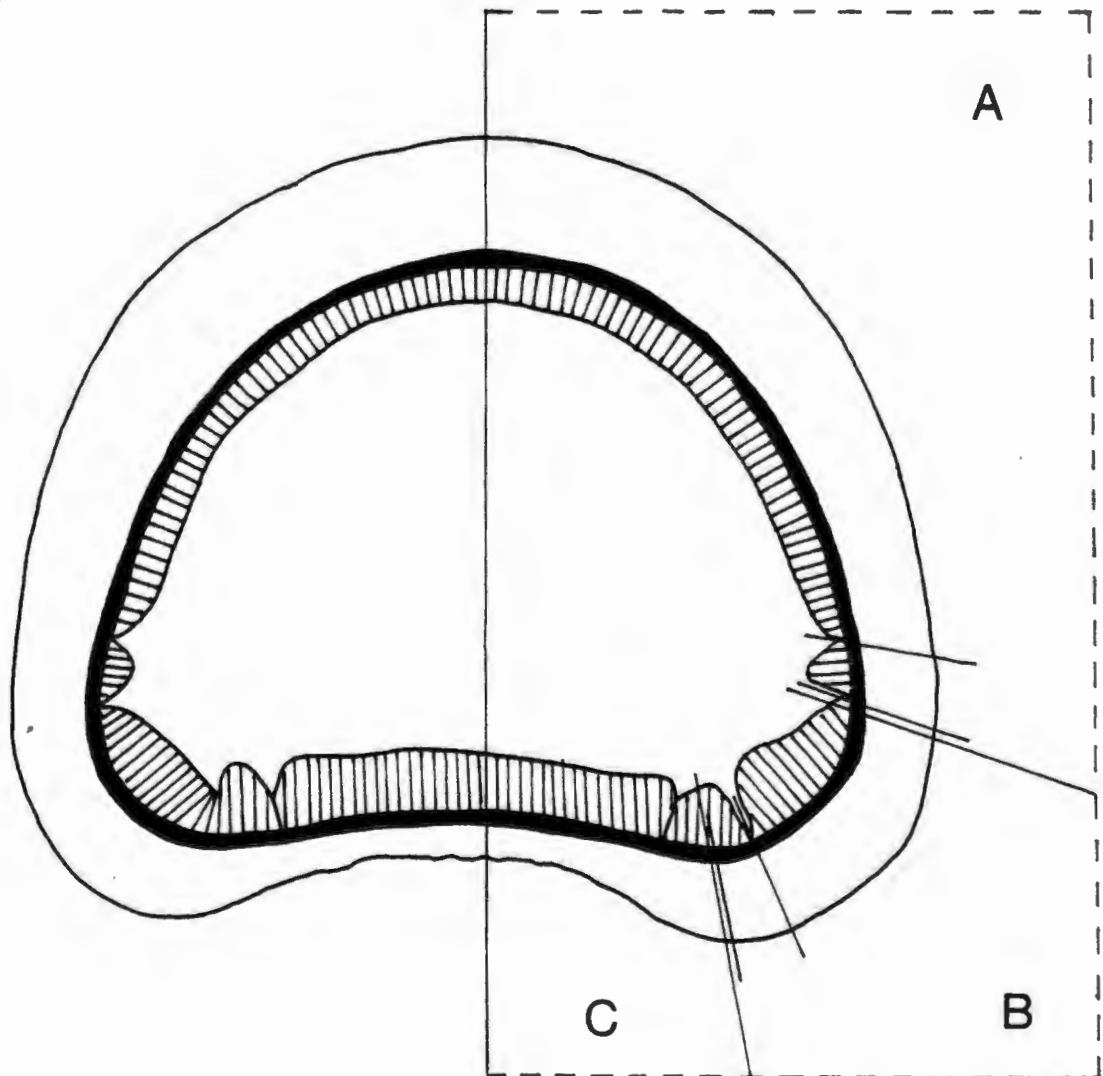
Die lewensiklus (by 25°C) van *D. veneta* verskil aansienlik van die ander komposterende spesies wat onder dieselfde toestande geteel is. *D. veneta* voltooi sy lewensiklus by 25°C in 107 dae (Viljoen, Reinecke & Hartman, 1991). Dit is veel langer as die van *E. fetida* wat tussen 65 en 85 dae neem (Venter & Reinecke, 1988 a), *E. eugeniae* wat ongeveer 60 dae nodig het (Viljoen & Reinecke, 1989) en *P. excavatus* wat 56 dae neem (Hallat, Reinecke & Viljoen, 1990) om die lewensiklus te voltooi.

Nadat die wurms die geskikte ouderdom bereik het en kokonproduksie hoog genoeg was, is die medium elke tweede dag vir kokonne deursoek. Aanvanklik is die mis elke dag vir kokonne deursoek maar die gedurige versteuring van die medium het veroorsaak dat die kokonproduksie afgeneem het en daar is gevind dat daar minder negatiewe invloed is indien die mis elke tweede dag deursoek word. Die kokonne is in multiselhouders met beesmismedium geïnkubeer. Die multiselhouders is duidelik gemerk sodat die presiese ouderdom van die kokonne bekend was.

2.3. STEREO- EN LIGMIKROSKOPIE

Die kokonne en embriologiese stadiums is ligmikroskopies ondersoek. Die biomassa van die kokonne is bepaal deur dit in gedistilleerde water te was om sodoende alle grondpartikels te verwyder. Daarna is dit in 'n weegbootjie met gedistilleerde water op 'n Sartorius analitiese balans geweeg. Die lengte en breedte is met 'n skuifpasser bepaal. Die lengte is oor die langste gedeelte, vanaf die een klossie na die ander, bepaal. Dit sluit egter nie die klossies in nie aangesien dit meer prominent by sommige is as by ander. Die breedte is oor die breedste gedeelte van die kokon bepaal. Die biomassa, lengte en breedte is bepaal vir 100 kokonne wat ewekansig uit die teelhouders uitgesoek is (Bylaag 1). Nadat die kokonne geweeg en gemeet is, is dit onder die stereomikroskoop op 'n voorwerpglasie

①



Figuur 1. 'n Diagrammatiese voorstelling van 'n dwarsnit deur die klitellumstreek van *D. veneta* om die grense van die drie streke aan te toon.

A - Streek A

B - Streek B

C - Streek C

(Geneem en aangepas uit Grove & Cowley, 1927).

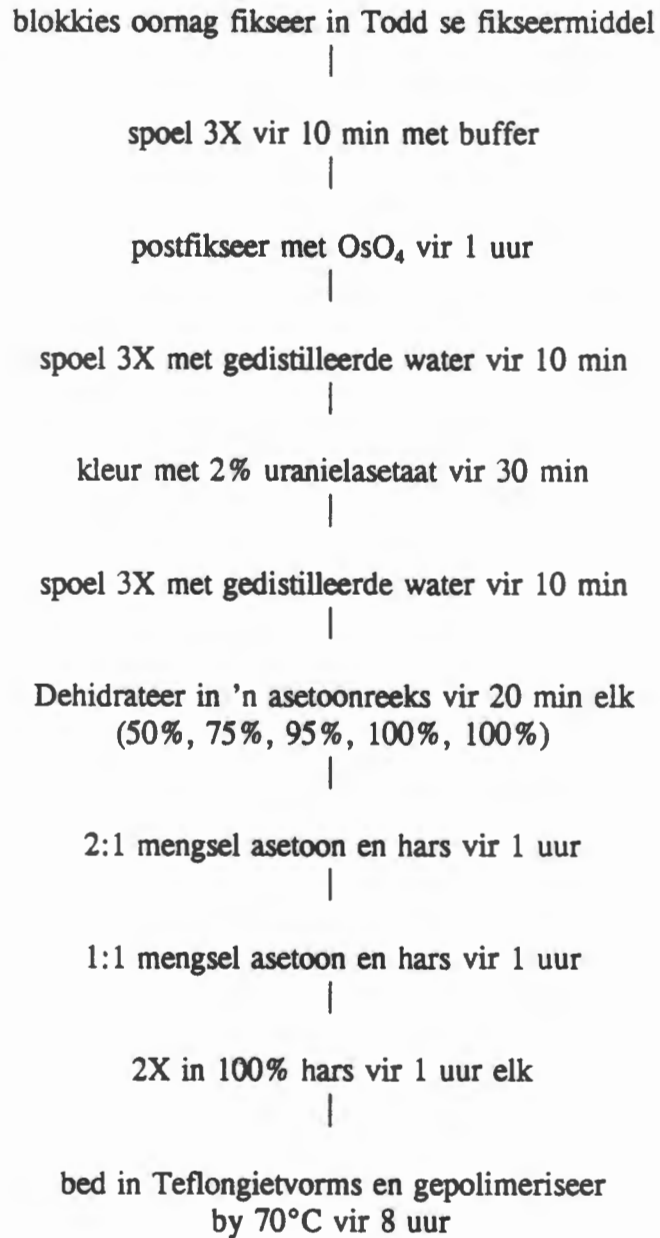
geplaas vir verdere ondersoek. Die vorm, oppervlakstruktuur en kleur van kokonne is genoteer en fotos is met 'n Wild Photoautomat MPS 45 fotografiese stelsel wat aan 'n Wild stereomikroskoop gekoppel is, geneem. Nadat uitwendige waarnemings gemaak is, is die kokonwand deur middel van 'n fyn tangetjie en 'n tungstennaald oopgeskeur. Die kokoninhoud wat op die voorwerpglasie uitgeloopt het, is uitgesprei vir verdere mikroskopiese ondersoek. Die kokonwand is deeglik in gedistilleerde water gewas en in Todd se fikseermiddel vir elektronmikroskopie gefikseer.

Waar ova of embryos in die kokoninhoud waargeneem is, is dit verwyder en in 'n hol voorwerpglasie in gedistilleerde water geplaas vir ligmikroskopiese ondersoek. Fotos is met 'n Wild fotografiese stelsel wat aan 'n Leitz Laborlux S ligmikroskoop gekoppel is, geneem. Sommige materiaal is direk gefikseer vir transmissie- en skandeerelektronmikroskopiese ondersoeke.

2.4. ELEKTRONMIKROSKOPIE

Die klitellum, liggaamsepidermis, kokonne en embryos is elektronmikroskopies ondersoek. 'n Vergelyking is getref tussen die klitellumweefsel en die res van die normale liggaamsepidermis. Om die bestudering van die klitellumweefsel te vergemaklik, is die weefsel in drie streke verdeel. Hierdie verdeling is reeds in 1927 deur Grove & Cowley voorgestel en is sedertdien deur verskeie navorsers gebruik (El-Duweini, 1951 & Morris 1983 & 1985). Die verdeling is gedoen op grond van die aanwesigheid van sekere klierelemente in die klitellumweefsel. Omdat die teenwoordigheid van hierdie elemente ook by *D. veneta* waargeneem is, is daar tydens hierdie ondersoek ook van die verdeling soos voorgestel deur Grove & Cowley (1927) gebruik gemaak. Die drie streke is soos volg:

- A:** alle dorsale en laterale oppervlakke tot net onder die laterale paar setas,
- B:** vanaf net onder die laterale setas tot net onder die binneste paar setas,
- C:** die midventrale gedeelte wat plat of selfs konkav mag wees (Figuur 1).



Figuur 2. 'n Vloeidiagram om die voorbereidingsproses vir die Transmissie-elektronmikroskoop voor te stel.

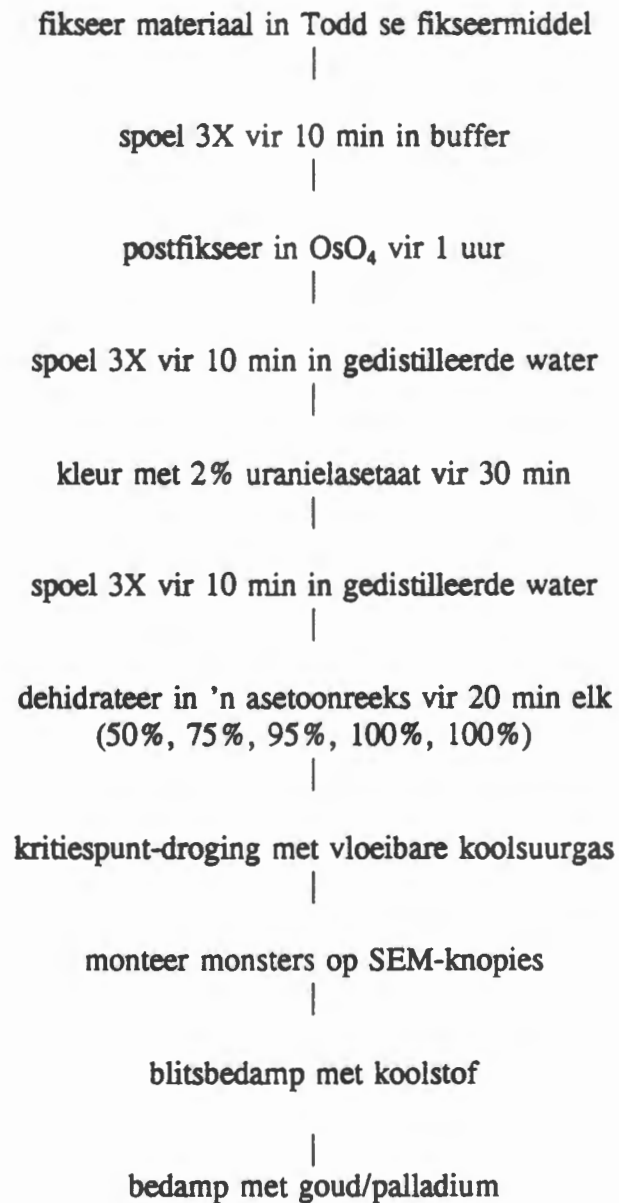
Die kokonne is soos volg ondersoek: Hulle is met 'n skerp lemmetjie oopgesny waarna die inhoud verwyder is. Sommige kokonhelftes is intak gefikseer terwyl ander in blokkies gesny of geskeur is. Kokonne van twee ouderdomsgroepe, naamlik 1 en 45 dae na vorming is gefikseer en ondersoek om vas te stel of enige verandering in die wandstruktuur met toename in ouderdom voorkom.

Embrios uit bevrugte kokonne van verskillende ouderdomme is direk in Todd se fikseermiddel gefikseer vir Skandeerelektronmikroskopie (SEM) studies.

2.4.1 Die prosedure vir die fiksering en inbedding van materiaal vir die transmissie-elektronmikroskopiese ondersoek.

Die monsters is oornag in Todd se fikseermiddel gefikseer (Todd, 1986). Daarna is dit drie maal vir 10 min elk in 0,05M natrium-kakodilaatbuffer gewas en postfikseer in 0.5% osmium tetroksied (OsO_4) vir een uur. Die monsters is drie maal vir 10 min elk in gedistilleerde water gewas, 30 min in 2% uranielasetaat gekleur, weer gewas met gedistilleerde water vir 10 min en gedehidrateer in 'n asetoon reeks (50%, 75%, 95%, 100%, 100%) vir 20 min elk. Die monsters is vir 1 uur deurweek met 'n 2:1 mengsel van asetoon en Spurr se hars (Spurr, 1969), daarna in 'n 1:1 mengsel en laastens twee maal vir 1 uur elk in skoon 100% Spurr hars. Die monsters is ingebed in 100% hars in teflongietvorms en oornag gelaat om te polimeriseer by 70°C. Bogenoemde prosedure word in 'n vloeidiagram (Figuur 2) voorgestel.

Sneë van 80-100 nm dik is gemaak met 'n Reichert Ultracut E ultramikrotoom. Die sneë is opgetel met 200 maas Cu/Pd roostertjies en op 'n kolplaat vir 20 min met 2% uranielasetaat gekleur. Die roostertjies is met gedistilleerde water gespoel en met filtreerpapier gedroog. Daarna is die sneë vir 'n verdere 5 min met loodsitraat (Reynolds, 1963) gekleur, met gedistilleerde water gespoel en gedroog waarna dit ondersoek is met 'n Philips CM 10 Transmissie-elektronmikroskoop by 'n werkspanning van 100kV.



Figuur 3. 'n Vloiediagram om die SEM voorbereidingsproses vir kritiese-droging voor te stel.

2.4.2 Voorbereiding en montering van monsters vir die skandeerelektronmikroskopiese ondersoek.

Voorbereiding van monsters vir die skandeerelektronmikroskopiese ondersoek volg dieselfde prosedure soos vir die TEM tot en met die 100% asetoon stap (Figuur 2). Die monsters is ook oornag in Todd se fikseermiddel gefikseer. Daarna is dit drie maal vir 10 min elk met 0,05M natrium-kakodilaatbuffer gewas en postfikseer met 0,5% osmium tetroksied vir een uur. Die monsters is drie maal vir 10 min elk met gedistilleerde water gewas, 30 min met 2% uranielasetaat gekleur, weer gewas met gedistilleerde water vir 10 min en gedehidrateer in 'n asetoon reeks (50%, 75%, 95%, 100%, 100%) vir 20 min elk. Hierna is die monsters met vloeibare koolsuurgas in 'n kritiese-droogpuntapparaat gedroog. Die gedroogde monsters is op metaal SEM-knopies gemonteer met koolstof geleidingsgom (Tiedt, 1991). Die monsters op die metaalknopies is in 'n metaalopdamper (Emscope TB500) met dik lagie koolstof blitsbedamp.

Die monsters is daarna drie maal onder vakuum vir 3 min elk met goud/palladium bedamp. Dit is gedoen met behulp van 'n elektriese stroom van 5 mA deur die inlaat van argongas. Die monsters is met 'n Cambridge Stereoscan 2505 Skandeerelektronmikroskoop ondersoek met 'n werkspanning van 10kV. Die prosedure word in 'n vloeidiagram (Figuur 3) voorgestel.

2.5. HISTOCHEMIE

2.5.1. Inleiding

Die histochemiese tegnieke wat in hierdie ondersoek gebruik is, is so gekies dat dit die elektronmikroskopiese waarnemings sou kon ondersteun om 'n duidelike geheelbeeld te vorm. Ultrastrukturele onderskeiding tussen verskillende weefsels en selle in die weefsels word bemoeilik deur die variasie wat daar ontstaan a.g.v. verskeie faktore waaronder snitdikte, hoek van snit en fikseermiddel. Uit die ultramikroskopiese struktuur kan slegs gepoog word om die spesifieke selle van mekaar te onderskei.

Aangesien daar gedetailleerde literatuur oor die histochemiese samestelling van die epidermisweefsel van die Oligochaeta bekend is (Richards, 1973, 1974b & d en Morris 1983 & 1985), is daar in hierdie ondersoek slegs van twee inbeddingstegnieke en 'n aantal kleurtegnieke gebruik gemaak om die nodige inligting te bekom.

In die eerste tegniek is paraffienwas (Paraplast) gebruik en in die tweede geval is die celloidientegniek gebruik. In laasgenoemde tegniek word gebruik gemaak van nitrosellulose met 'n lae viskositeit wat weefsel vinnig indring. Dit laat die vorming van harder blokke in 'n kort tyd toe, asook die sny van dunner sneë (Lillie, 1965 & Humason, 1979).

2.5.2. Materiaalvoorbereiding

Volwasse klitellate wurms is vooraf vir 24 uur tussen klam laboratoriumpapier by 25°C en 75% RH gelaat om hul spysverteringskanale te ledig. Die wurms is in die fikseermiddel geplaas en die klitellums is met 'n skerp dissekteermessie verwyder. Dit is in Bouin se oplossing gedoen. Die spysverteringskanaal is verwyder en die klitellum in die lengte deurgesny vir wasinbedding.

2.5.3. Fiksering

Al die monsters is vir 24 uur in Bouin se oplossing by kamertemperatuur gefikseer.

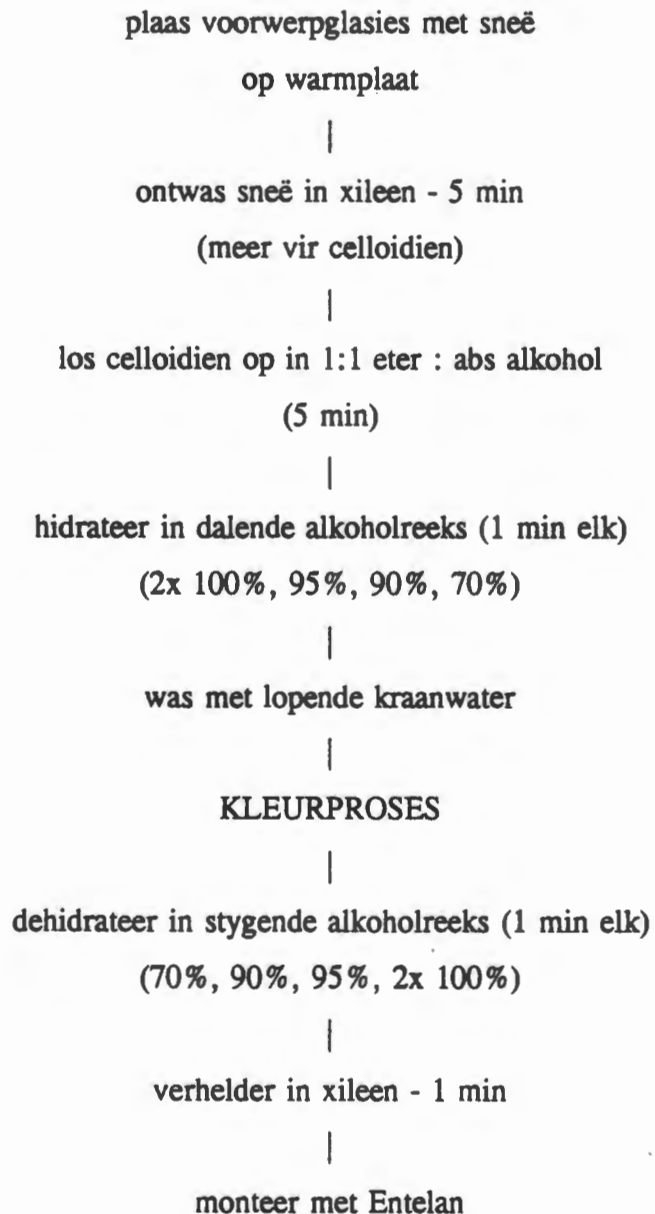
2.5.4. Weefselprosessering

Fikseerde monsters is in stygende konsentrasies etanol (70%, 90% en 3 x 100%) vir 30 min elk gedehidrateer. Gedehidrateerde monsters is vir 30 min elk met 'n 1:1 mengsel van absolute alkohol en chloroform behandel en daarna vir twee ruilings van 30 min elk met chloroform. Impregnasie met paraffienwas (Paraplast, Monoject Scientific Inc. Ierland) het by 58°C plaasgevind. Dit is drie keer vir 20 min herhaal waarvan die laaste 10 min onder vakuum geskied het. Papiergietsvorms (Humason, 1979) is vooraf gemaak. Die was is hierin gegiet, die monsters ingebed en die blokke is oornag gelaat om te verhard.

'n Alternatiewe metode was om Bouin-gefikseerde monsters dubbel in te bed met celloïdiën en paraffienwas: Die monsters is gedehidrateer soos hierbo beskryf en daarna vir een uur met 'n 1:1 mengsel van droë etieleter en absolute alkohol behandel. Al die monsters is dan vir 3 dae onderskeidelik eers in 4% en daarna 8% celloïdiën in 'n verseëlde houer gelaat vir deeglike infiltrering. Blokke is met 8% celloïdiën in wasverseëlde gietvorms gegiet en die weefsel is daarheen oorgedra. Blokke is oornag aan chloroformdampe in 'n dessikator blootgestel totdat die blokke hard was. Die blokke is finaal reggesny en in chloroform gelaat vir 90-120 min of totdat die blokke sink. Dit is in bensol verhelder (1 uur) en laastens drie maal vir 30 min elk met paraffienwas infiltreer. Die blokke is uit die was verwyder en gelaat om droog te word.

2.5.5. Mikrotomerig

Wasblokke is met 'n draaimikrotoom (American Optical "820" Spencer mikrotoom) en dubbelingebedde blokke met 'n glymikrotoom, respektiewelik, 5µm en 3µm dik gesny.



Figuur 4. 'n Vloeidiagram om die ontwassing, hydratering en dehydratering van snee voor en na die kleurprosesse aan te toon.

Die sneë is op voorwerpglasies gedryf wat vooraf met poli-L-lisien behandel is. Die voorwerpglasies is daarna op 'n warmplaat (58°C) geplaas en vir ten minste 1 uur gelaat om te droog. Die sneë is daarna gekleur.

2.5.6. Ontwassing, hydratering en dehidratering van sneë.

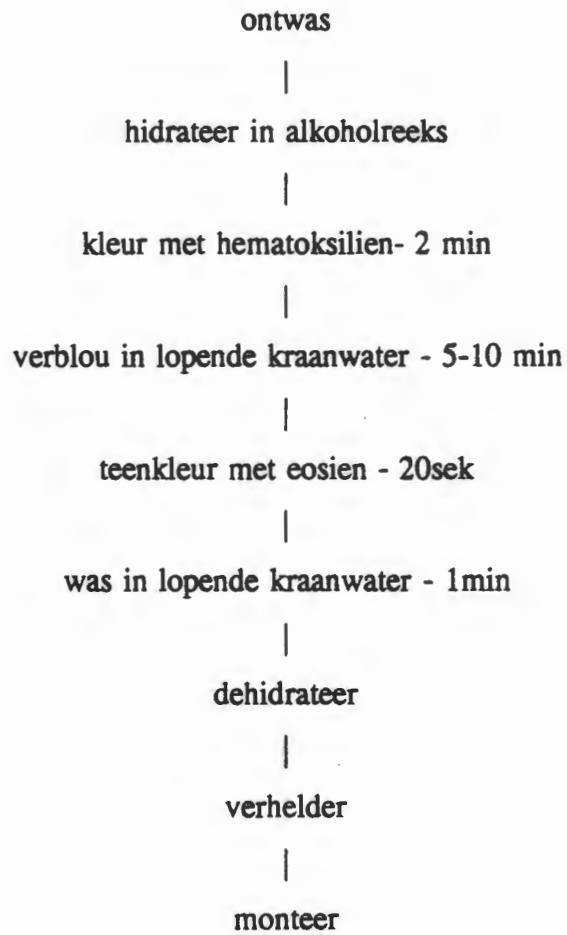
Voordat enige kleurproses aangepak is, is alle sneë (beide was en celloidien) eers in xileen ontwas en daarna hidrateer in 'n dalende reeks alkohole (2x 100%, 95%, 90%, 70%) vir 1 min elk. Die celloidiensneë is na entwassing in xileen eers vir 'n verdere 5 min in 'n 1:1 mengsel van eter en absolute alkohol geplaas om die celloidien op te los. Hierna is dit ook deur 'n alkoholreeks gedehidrateer. Daarna is die snitte in lopende kraanwater gewas en die verlangde kleurproses is gevolg.

Nadat die kleuring plaasgevind het is die sneë gedehidrateer in 'n stygende reeks alkohol (70%, 90%, 95%, 2x 100%) vir 1 minuut elk en verhelder in xileen vir 1 minuut. Die sneë is gemonteer met behulp van Entelan en oornag op 'n warmplaat (40°C) gelaat om te droog. Bogenoemde stappe word in Figuur 4 voorgestel.

2.5.7. Hematoksilien-eosien

Die hematoksilien-eosien kleurtegniek word hier bespreek aangesien dit 'n kleurtegniek is wat altyd gebruik word wanneer 'n nuwe weefseltipe ondersoek word. Hematoksilien is een van die belangrikste natuurlik kleurmiddels in histochemie (Humason, 1979). Die presiese kleur wat dit spesifieke weefsels kleur, is ook goed bekend en saam met eosien is dit hier gebruik om die kwaliteit van fiksering, wasindringing en mikrotroomsneë te toets (Humason, 1979).

Die sneë is ontwas en gehidrateer in alkohol. Daarna is dit vir 2 min in Mayer se hematoksilien volgens Humason (1979) gekleur en vir 1 min in lopende kraanwater verblou. Dit is vir 20 sek in eosien gekleur waarna dit weer in lopende kraanwater gewas



Figuur 5. 'n Vloeidiagram om die prosedure vir die hematoksilien-eosien kleurtegniek aan te toon.

is. Die sneë is gedehidrateer, verhelder en gemonteer soos hierbo genoem (Figuur 5). Alle weefsels is met 'n Wild fotografiese stelsel wat aan 'n Leitz Labrolux S ligmikroskoop gekoppel is, geneem.

2.5.8. Ander kleurtegnieke

Tydens hierdie ondersoek is van verskillende ander kleurtegnieke gebruik gemaak in 'n poging om sekere seltipes en verbindings te identifiseer. Die onderskeie kleurtegnieke is ontwerp om spesifiek vir sekere verbindings te kleur (Lillie, 1965 & Humason, 1979). Na aanleiding van die kleur wat 'n sel/weefsel kleur, kan daar dan 'n afleiding gemaak word watter verbinding teenwoordig is (Lillie, 1965 & Humason, 1979).

Hier volg 'n tabel wat die kleurtegniek asook die verbinding waarvoor dit spesifiek is, sowel as die kleur daarvan, aantoon.

TABEL 1. 'n Samestelling van die kleurtegnieke, verbinding waarvoor die tegniek spesifiek kleur en kleur wat dit volgens Lillie (1965) en Humason (1979) sal aanneem.

KLEURTEGNIIEK	VERBINDING WAARVOOR SPESIFIEK	KLEUR
Musienkarmien (Lillie, 1965)	slym	rooi of donkerpienk
Massontrichroom (Humason, 1979)	slym of kollageen	donker rooi-pienk
Perjoodsuur Schiff (PAS), (Lillie, 1965) (Humason, 1979)	kollageen en slymverbindings	donker rooi-pienk

KLEURTEGNIIEK	VERBINDING WAARVOOR SPESIFIEK	KLEUR
Verhoeff (Humason, 1979)	kollageen en elastien	rooi blou-swart
Picro-ponceau met hematoksilien (Humason, 1979)	kollageen en retikulêre vesels elastien	rooi geel
Toluïdienblou (Humason, 1979)	slym sitoplasma	rooi-pienk blou-groen

3. RESULTATE EN BESPREKING

Ten einde 'n geheelbeeld van die resultate te verkry, word dit in samehang met die literatuur bespreek.

3.1. NORMALE LIGGAAMSEPIDERMIS

Die integument bestaan hoofsaaklik uit die epidermis en die bedekkende kutikula, klierselle asook setas en hul follikels (Jamieson, 1981). Die epidermis is een sellag dik (Figuur 7a) en bedek die hele liggaamsoppervlak en voer die dorsale porieë, stomodeum, proktodeum, setale follikels en die genitale en ekskretoriese openinge uit (Richards, 1977 en Jamieson, 1981).

By *D. veneta* word die normale liggaamsepidermis bedek deur 'n kutikula van kollageen en dit word in meer besonderhede in paragraaf 3.2.1.1. bespreek. Die epidermis rus weer op die basaalmembraan wat ook uit kollageenvesels bestaan (par 3.2.5. Figuur 43). Die normale liggaamsepidermis is een sellag dik en bestaan uit sekretoriese en nie-sekretoriese selle. Die nie-sekretoriese selle of ondersteunende selle beslaan 'n groot gedeelte van die epidermis (par 3.2.2. Figuur 29). Omdat die epidermis ook ander funksies verrig as net die van liggaamsbedekking kom daar wysigings voor wat geassosieer word met die vorming van sekresies. In die gewone epidermis kom daar drie tipes klierselle voor, naamlik die groot granulêre selle, meta- en ortochromatiese slymselle. Die een seltepe wat hier afwesig (Figuur 7a) is maar teenwoordig by die klitellêre epiteel, is die fyn granulêre seltepe (par 3.2.3.2.) wat gemoeid is met die sekresie van albumien. Die ander drie tipes klierselle kom in groter getalle in die normale liggaamsepidermis voor as in die klitellumstreek. Hierdie selle is eweredig versprei en kom nie meer gekonsentreerd in sekere gebiede as in ander voor nie. Die funksies van hierdie selle in die epidermis verskil ook van ooreenstemmende selle in die klitellum en word dus hier bespreek. Die struktuur van die selle kom ooreen met die in die klitellumstreek en word later beskryf.

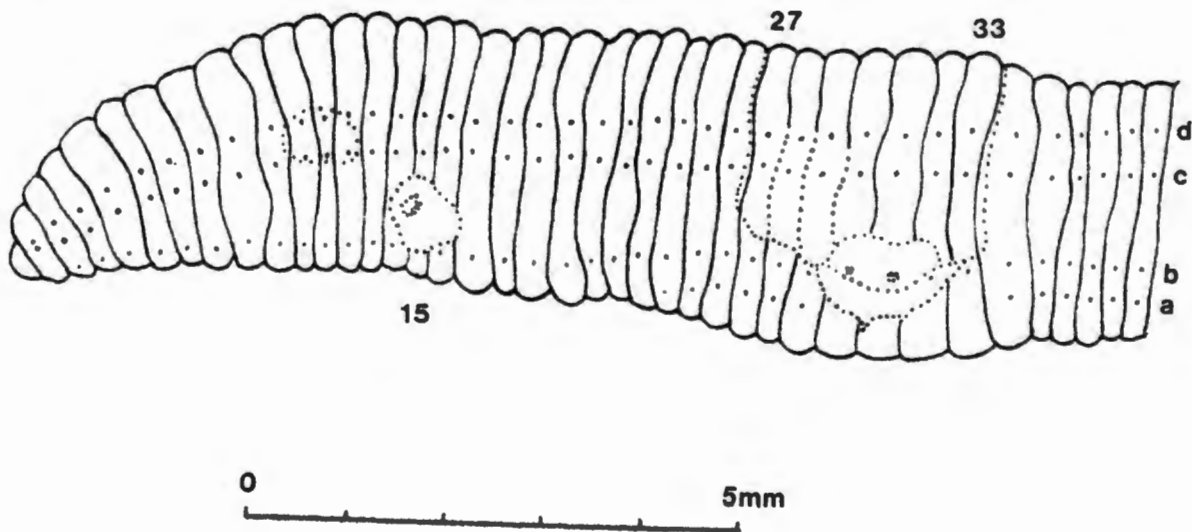
Die funksie van die groot granulêre selle is die sekresie van 'n visko-elastiese smeermiddel wat 'n rol speel tydens beweging (Richards, 1977).

In 'n deeglike histochemiese ondersoek na die aard van die granuulinhoud van die metachromatiese slymselle, het Richards (1974b) tot die gevolgtrekking gekom dat die inhoud 'n gekarboksileerde slym is. Volgens haar is dit 'n slym met 'n laer viskositeit en sy spekuleer dat die funksie in die gewone epidermis die volgende mag wees: In 'n ondersoek van die kutikula van die lumbrisiëde berig Richards (1974b) dat 'n baie dun slymfilm permanent die oppervlak van die kutikula bedek en deur die epikutikulêre projeksies vasgevang word. Volgens haar dien hierdie slym as 'n laag waarin respirasie kan plaasvind sowel as om uitdroging te voorkom.

Tydens 'n kleurproses met musienkarmien (Humason, 1979) wat spesifiek slym kleur, is die slymaard van die sekresie van die ortochromatiese selle bevestig. Volgens Richards (1973, 1974 b & c) is die belangrikste funksie dñe van die verskaffing van slym vir beweging. Dit mag ook wees waarom meer van hierdie selle ventraal as dorsaal voorkom. Richards (1974c) spekuleer ook na gedragseksperimente met *L. terrestris* dat die ortochromatiese slym ook kan funksioneer as 'n feromoonmeganisme en noem dat wurms, wurmslym kan uitken. Die sekretering van die ortochromatiese slym kan in twee vlakke geskied, naamlik normaal laag en hoog. Hierdie enkele verbinding in verskillende hoeveelhede, kan verskillende gedragsresponse meebring. Daar word gespekuleer dat in normale lae vlakke, dit as 'n spesifieke aantrekkingsferomoon dien wat gebruik word tydens paring. By hoë vlakke, soos tydens stres dien dit as nie-spesifieke waarskuwingsferomoon (Richards, 1974c).

Die ultrastruktuur van die slymsekreterende selle kom ooreen met die wat in die klitellum aangetref word en word later beskryf (par 3.2.3.3 en 3.2.3.4.).

⑥



Figuur 6. 'n Diagrammatiese voorstelling van 'n laterale aansig van *D. veneta*. Die klitellum is geleë op segmente 27-33 en die manlike porie op segment 15. a - b dui die binneste paar setas en c - d die buitenste paar setas aan.

(Geneem uit Valovirta & Terhivuo, 1976)

3.2. KLITELLUM

Die klitellum is prominent by Oligochaeta en bloedsuiers en word aangetref by geslagtelik volwasse wurms waarvan die epidermis wysigings ondergaan het. Hierdie wysigings sluit nie alleen die kopulasieoppervlaktes, insluitend die tuberkula pubertatis, klieragtige gedeeltes op glossoskoliede omhelsers en genetale setale kliere in nie, maar ook die kokonsekreterende klitellum (Richards, 1978). Die klitellum ontwikkel en word onderhou onder die invloed van die a selle van die supraesofageale ganglia (Andre, Barbe & Riviere, 1972). Hierdie selle, ook genoem Tipe 2 (A2) selle, word ook in die serebraal ganglia aangetref, direk onder die Tipe 1 selle. Die selle word aktief gedurende die voortplantingstydperk. Hulle sekresie is ook noodsaaklik vir spermatogenese (Jamieson, 1981).

Die rol wat die gewysigde epidermis (klitellum) tydens die voortplantingsprosesse by erdwurms speel, is lank reeds bekend. In hierdie streek is die epidermis gewysig en besit 'n verskeidenheid klierselle met 'n aantal sekresieprodukte, wat die slymband tydens paring asook die kokon vorm. Sommige klierselle sekreteer ook 'n medium vir die voeding en beskerming van die ontwikkelende embrio in die kokon.

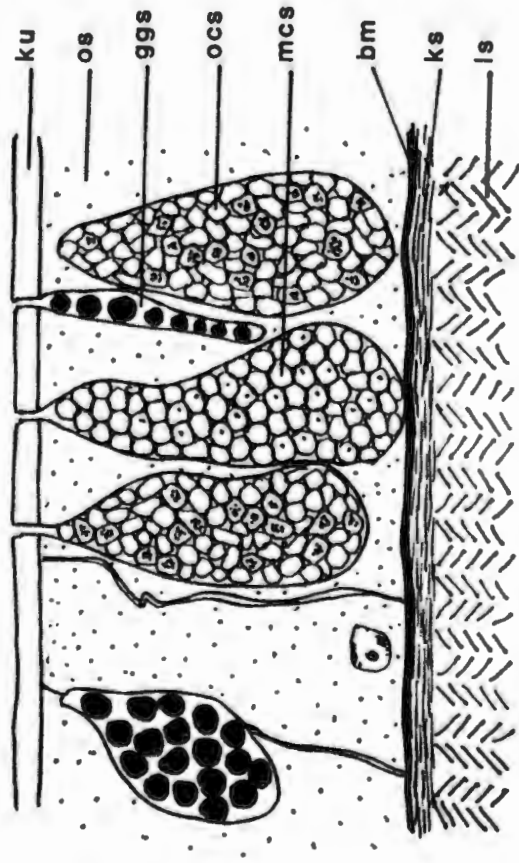
Die klitellum van geslagtelik volwasse *D. veneta* individue is geleë tussen segmente XXVII en XXXIII (Figuur 6). Die eerste aanduidings van klitellumontwikkeling word sigbaar tussen dag 20 en 35. Hierdie aanduidings manifesteer as 'n ventraal ligter en effens opswelde gedeelte. Die volledig ontwikkelde klitellum is 'n geswolle, wit, saalagtige gedeelte wat nie die wurm volledig omsirkel nie (Sims & Gerard, 1985 & Viljoen, Reinecke & Hartman, 1991). Die klitellum bedek die dorsale, laterale en ventrolaterale gedeeltes van die wurm. Die midventrale gedeelte, wat tussen die binneste stel setas geleë is, is minder geswolle as die res van die klitellum soos ook waargeneem deur Valovirta & Terhivuo (1976) (Figuur 6).

Kopulasie vind by *D. veneta*, net soos by ander erdwurmspesies, plaas wanneer twee individue "kop-teen-stert" teenmekaar lê met die klitellumstreek van die een styf teen die spermatekalestreek van die ander wurm. By *D. veneta* rek die klitellum tydens kopulasie om twee "klitellumflappe" te vorm wat amper die hele liggaam van die konkopulant, omsirkel. Kopulasieslym word deur klierselle in die klitellum afgeskei. Wanneer kopulasie voltooi is of wanneer wurms tydens kopulasie versteur word kan die "klitellumflappe" wat die konkopulant omring duidelik waargeneem word. Die "flappe" word stadig teruggetrek en na 'n rukkie neem die klitellum weer sy normale vorm aan. Daar is waargeneem dat die klitellum grof en rosig vertoon nadat kopulasie plaasgevind het terwyl dit ongeveer dieselfde deursnit as die omringende segmente het. Sims & Gerard (1985) het hierdie verskynsel ook waargeneem nadat kokonne gevorm is.

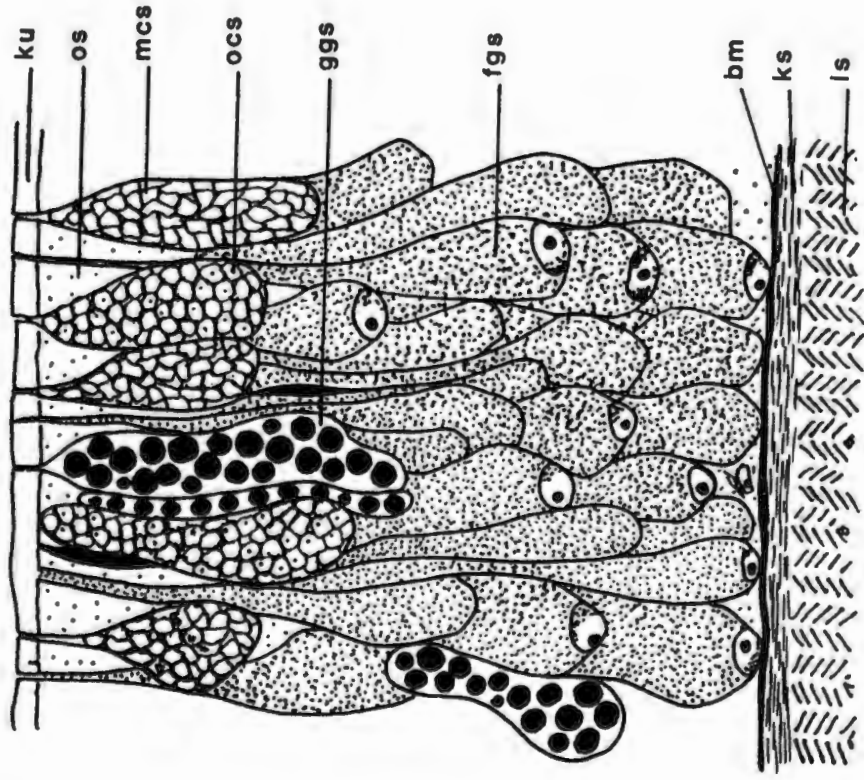
Die pseudogelaagde klitellum is in die dorsale gebied van lumbrisiëde erdwurms drie tot vier maal dikker as die ongewysigde normale liggaamsepidermis (Welsch, Storch & Richards, 1984). Volgens Michalis & Panidis (1993, ongepubliseerde resultate) verander die dikte van die klitellum met seisonale veranderinge en is die klitellum volledig ontwikkel gedurende die wintermaande van Februarie en Mei. Suzutani-Shiota (1977) neem ook waar dat die klitellum van *T. hattai* twee tot drie maal dikker is as die ongewysigde epidermis. By die annelied *Enchytraeus fragmentosus* strek die klitellum net oor twee segmente en is slegs een sellaag dik (Hess & Vena, 1974). Grove (1931) neem waar dat die klitellum van die glossoskolied *Alma emini* ooreenkomste toon met die rangskikking van die Lumbricidae en dat die klitellum meer as een helfte so dik soos die ongewysigde epidermis is.

Om die bestudering van die klitellumstreek van sommige oligogete te vergemaklik kan die liggaamswand van die klitellumstreek, soos reeds genoem (par 2.4, Figuur 1) in drie streke verdeel word. Die drie streke is weer kortliks die volgende:

7a



7b



Figuur 7a. 'n Diagrammatiese voorstelling van die normale liggaamsepidermis van *D. veneta* om die tipes klierselle, basaalmembraan en spierlae aan te toon.

Figuur 7b. 'n Diagrammatiese voorstelling van streek A van die klitellumweefsel van *D. veneta* om die tipes klierselle, basaalmembraan en onderliggende spierlae aan te toon.

bm - basaalmembraan

fgs - fyn granulêre selle

ggs - groot granulêre selle

ks - kringspiere

ku - kutikula

ls - lengtespiere

mcs - metachromatiese slymselle

ocs - ortochromatiese slymselle

os - ondersteunende selle

- A: alle dorsale en laterale oppervlakke tot net onder die laterale paar setas
- B: vanaf net onder die laterale setas tot net onder die binneste paar setas
- C: die midventrale gedeelte wat plat of selfs konkav mag wees (Figuur 1).

Die verskillende streke word verder nog in drie pseudolae verdeel wat soms duidelik waargeneem kan word maar soms glad nie onderskei kan word nie. Nou volg 'n beskrywing in samehang met die literatuurgegewens van die morfologie van die verskillende streke soos wat dit in die geval van *D. veneta* waargeneem is:

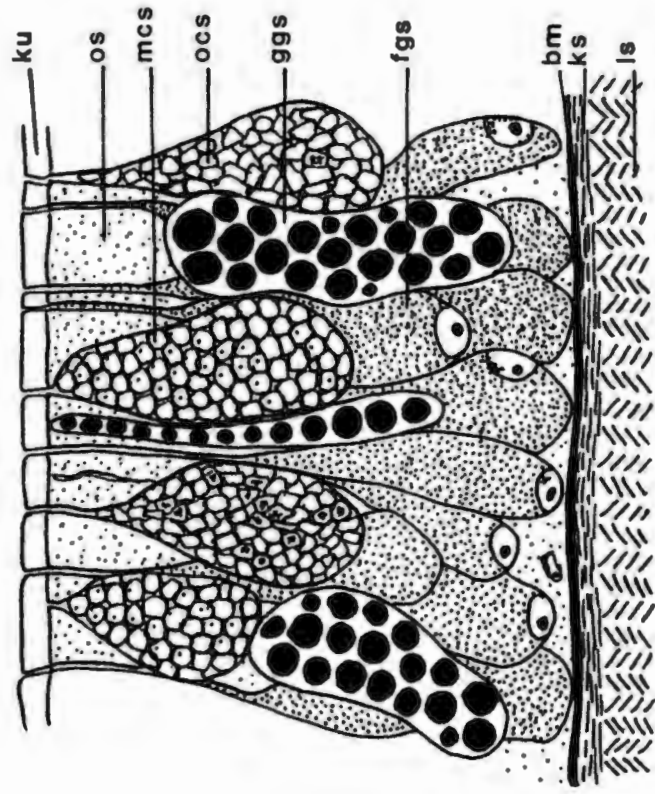
STREEK A

Hierdie streek (Figuur 7b) beslaan die grootste gedeelte van die klitellum, is die dikste en bevat vier tipes klierselle asook ander epidermale selle. In hierdie streek kom ondersteunende selle (Figuur 29) tussen die klierelemente en net onder die kutikula voor. Die vorm van die ondersteunende selle word grootliks bepaal deur die druk van die omringende klierselle waarvan die struktuur later in meer besonderhede bespreek word.

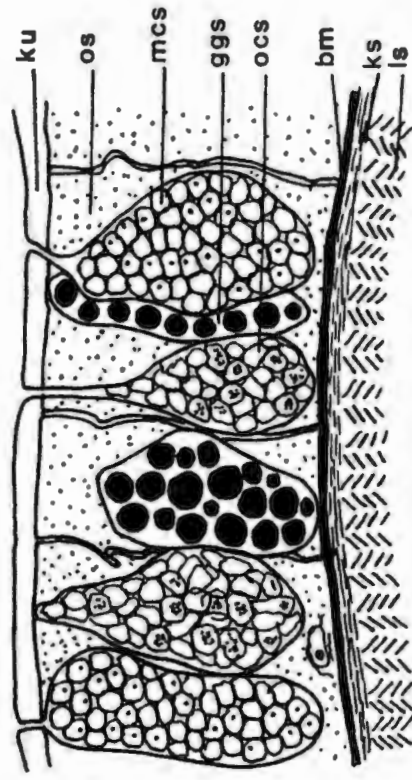
Die mees kenmerkende en ooglopende kliersel van hierdie streek is die fyn granulêre selle (Figure 35-37). Hier selle beslaan die grootste deel van die onderste twee derdes van streek A van die klitellumweefsel, waar dit donker blou-pers met toluïdienblou kleur. Hierdie selle is kolfvormig en die breë basale swelling rus op die basaalmembraan, terwyl die lang dun nekke na bo strek en op die kutikula uitmond.

Die res van die boonste een derde van die klitellum word beslaan deur: 1. die groot granulêre selle (Figuur 30 & 32), 2. die ortochromatiese- (Figuur 40) en 3. die metachromatiese slymselle (Figuur 38). Hierdie drie tipes selle, waarvan die struktuur later beskryf word kom meestal in die boonste derde van die klitellum voor, alhoewel enkele groot granulêre selle tog soms tussen die fyn granulêre selle aangetref word. Die vorm van hierdie selle wissel van ovaalvormig tot langwerpig en bekervormig met dun nekke wat tot in die kutikula strek waar dit dan uitmond. Die orto- en metachromatiese

8



9



Figuur 8. 'n Diagrammatiese voorstelling van streek **B** van die klitellumweefsel van *D. veneta* om die tipes klierselle, basaalmembraan en onderliggende spierlae aan te toon.

Figuur 9. 'n Diagrammatiese voorstelling van streek **C** van die klitellumweefsel van *D. veneta* om die tipes klierselle, basaalmembraan en onderliggende spierlae aan te toon.

bm - basaalmembraan

fgs - fyn granulêre selle

ggs - groot granulêre selle

ks - kringspiere

ku - kutikula

ls - lengtespiere

mcs - metachromatiese slymselle

ocs - ortochromatiese slymselle

os - ondersteunende selle

slymselle kom yl versprei in hierdie streek voor waar dit onderskeidelik blou en donkerpienk met toluïdienblou kleur. Die ultrastruktuur word later beskryf.

STREEK B

Hierdie streek (Figuur 8) kan van die vorige onderskei word deurdat dit dunner is as streek A en dat hier baie minder fyn granulêre selle voorkom. Die groot granulêre selle is meer kenmerkend van hierdie gebied en kom in groter getalle as in streek A voor. Groter getalle van hierdie selle kom aan die ventrale kant van die klitellum voor en kleur blou met toluïdienblou. Al die selle wat op die kutikula uitmond het lang "nekke".

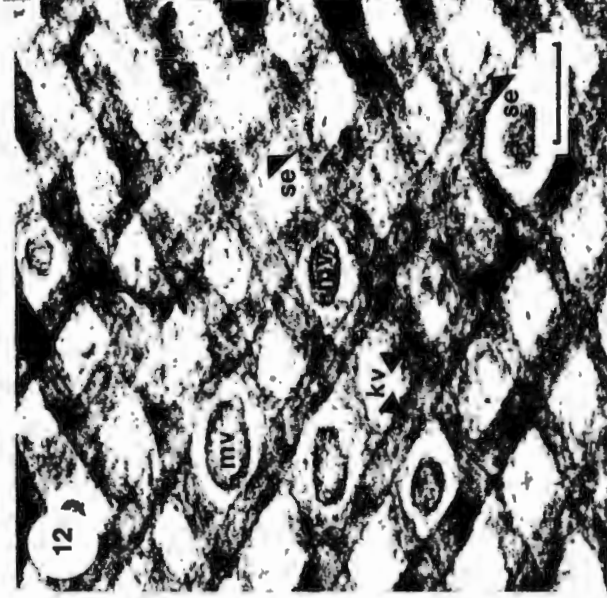
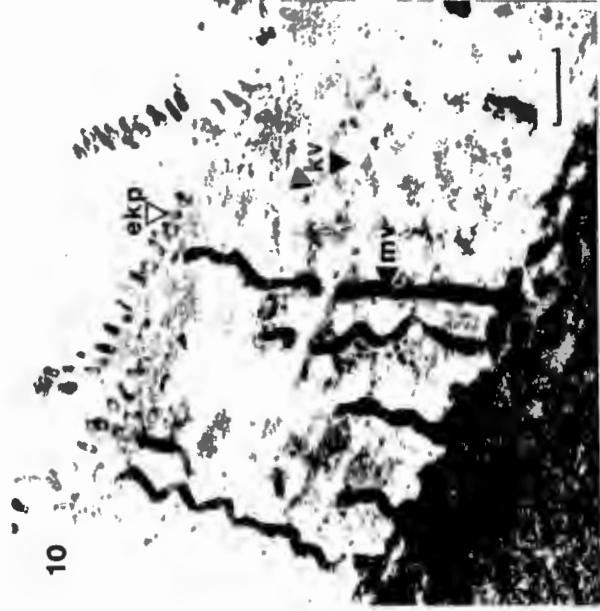
STREEK C

By *D. veneta* is hierdie streek effens konkaaf (Figuur 1) en bestaan slegs uit een sellaaag (Figuur 9). Dit besit geen fyn granulêre selle nie en is 'n enkel sellaaag dik met dieselfde klierelemente as streek B (Figuur 8) maar net in kleiner hoeveelhede. Die groot granulêre selle kom in baie klein getalle in hierdie streek voor en daar is ook meer ondersteunende selle in hierdie streek as in streke A en B teenwoordig. Die orto- en metachromatiese selle word in groter getalle in hierdie as in die ander streke aangetref.

Vervolgens word die verskillende selle en weefseltipes wat binne die klitellum en die normale liggaamsepidermis aangetref word, beskryf.

3.2.1. Die kutikula

In die geval van die Annelida word die epidermis met 'n kollageen kutikula bedek. Die kutikula voer ook die dermkanaal, genitalieë en ekskretoriese openinge asook die setale follikels in poligete en oligoete uit (Richards, 1984).



Figuur 10. TEM-mikrograaf van 'n dwarsnit deur die kutikula van *D. veneta* om die kollageenvesels (kv), mikrovilli (mv) en epikulikulêre projeksies (ekp) aan te toon. Skaal: $0,5\mu\text{m}$

Figuur 11. TEM-mikrograaf van 'n lengtesnit deur die kutikula van *D. veneta* om die gesplete kollageenvesels (pyltjies) en die oneweredige rangskikking van die mikrovilli (mv) aan te toon. Die ortogonale rangskikking van die kollageenvesels kan ook waargeneem word. Skaal: $0,3\mu\text{m}$

Figuur 12. TEM-mikrograaf van 'n lengtesnit deur die kutikula van *D. veneta* om die oneweredige rangskikking van die mikrovilli (mv) en die ortogonale rangskikking van die kollageenvesels (kv) aan te toon. Die kollageenvesels is kenmerkend ongeband en bestaan uit lengteverlopende mikrofibrillêre subeenhede (se). Skaal: $0,25\mu\text{m}$

Figuur 13. SEM-mikrograaf van 'n dwarsnit van die kollageenvesels in die kutikula van *D. veneta*. Die gesplete kollageenvesels (pyltjies) en die ortogonale rangskikking daarvan kan waargeneem word. Skaal: $2\mu\text{m}$

Figuur 14. TEM-mikrograaf van 'n dwarsnit deur die basale area van die kutikula van *D. veneta* om die vesikels (pyltjies) wat aanleiding gee tot die vorming van die kollageenvesels aan te toon. Skaal: $0,3\mu\text{m}$

Binne 'n anneliedklas is die deursnee van die liggaamskutikula ongeveer eweredig aan die liggaamsgrootte, maar poligete het dikker kutikulas as oligoete en oligoete as bloedsuiers (Richards, 1978).

Soos reeds genoem, bedek die kutikula die epidermis en daar kon geen verskil waargeneem word tussen die kutikula van die klitellum en die van die normale liggaamsepidermis nie (Figuur 10). Om die beskrywing van die kutikula te vergemaklik word daar onderskei tussen; die kollageenvesels, die mikrofibrillêre matriks, die mikrovilli, die epikutikulêre projeksies en die kutikulêre onderbrekings.

3.2.1.1. Die kollageenvesels

Die kutikula van die klitellum bestaan uit verskeie kollageenlae wat in 'n amorfe (struktuurlose) matriks ingebed is (Figuur 10). Anders as by meeste vertebrate en invertebraatkollagene, is erdwurm kutikulêrekollageen, kenmerkend ongeband (Reed & Rudall, 1948) (Figuur 11 & 12). Elke laag bestaan uit parallelle vesels, waarvan die hoofveselaksis van elke laag 'n hoek van ongeveer 90° met die van die veselaksis in die lae bo en onder die laag maak (Figuur 12, 13 & 15). By *D. veneta* bestaan die klitellumstreek uit 7-8 kollageenvesellae (Figuur 10).

Die vorm van die vesels wissel van rond tot effens afgeplat en meer reghoekig. Die vesels naaste aan die epiteelseloppervlak is dunner en die dikte neem geleidelik toe tot by die middel van die kutikulêre laag. Van hierdie punt af word dit weer geleidelik dunner totdat dit moeilik word om die vesels duidelik te onderskei (Figuur 10).

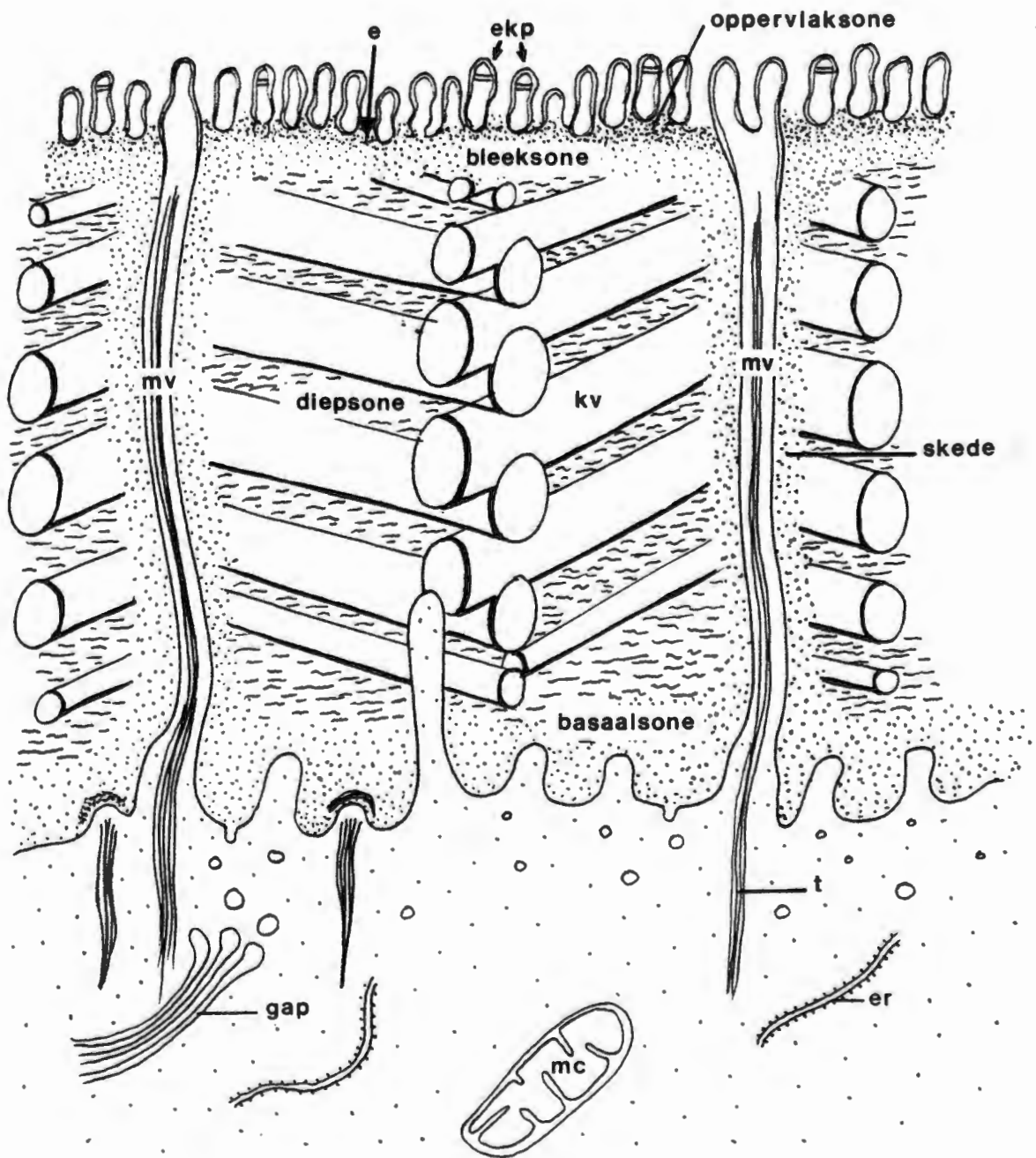
In lengtesnee van die kutikula (Figuur 11 & 12) kan waargeneem word dat die kollageenbondels uit fyn lengteverlopende mikrofibrillêre subeenhede saamgestel is. Hierdie fyn filamente word saamgegroepeer en vergroei om groot kollageenvesels te vorm. Die vesels besit die vermoë om te splyt (Figuur 11 & 13, pyltjies) soos wat in die geval van die vertebrate voorkom (Theron, 1979). Die gedeelte van die hoofvesel wat

afsplyt sluit dan weer aan by 'n naasliggende vesel sodat dit 'n eenheidstruktuur vorm soos in die geval van die hartspier (Storer, Usinger, Stebbins & Nybakken, 1979). Hierdie splyting van kollageenvesels kom veral voor by die openinge van die klierselle waar die ortogonale rangskikking versteur word. Sover vasgestel kon word, is hierdie splyting van die kutikulêre kollageen by erdwurms nog nie voorheen waargeneem nie.

Soos wat deur Richards (1974a) waargeneem is, en ook in hierdie ondersoek die geval is, is onreëlmatighede in die swaarmetaalkleuring van die kollageenvesels tydens TEM-ondersoeke waargeneem. Die periferie van die vesels kleur donkerder sodat hulle binneste gedeelte bleek en wit vertoon (Figuur 10). In die geval van lengtesneë deur die kutikula kleur die vesels weer donker (Figuur 11 & 12). Hierdie waarnemings is ook in gepubliseerde mikrograwe van ander outeurs waargeneem (Coggeshall, 1966, Burke, 1974 en Burke & Ross, 1975), maar dit is nie deur die outeurs bespreek nie. Geen verklaring kan vir hierdie verskynsel voorgestel word nie.

Die sekresie van die kollageenvesels geskied vermoedelik deur die onderliggende epidermale selle (Burke & Ross, 1975 en Humphreys & Porter, 1976) maar die selle besit geen veselagtige materiaal nie. Nietemin lê daar klein vesikels in die apikale streek wat naby of in kontak met die distale plasmalemma geleë is (Figuur 14, pyltjies). Bogenoemde outeurs veronderstel dat die kollageensubeenhede vanaf hierdie vesikels vrygestel word wat dan later polimeriseer in kollageen eenheidsfilamente in die basale sone van die kutikula. Hierdie eenheidsfilamente aggregeer om die vesels te vorm (Burke & Ross, 1975 en Humphreys & Porter, 1976). Dit is duidelik dat die anneliedkutikula nie as 'n eenvoudige sekresie aanvaar moet word nie, want dit mag in 'n dinamiese verhouding met die onderliggende epidermis staan en 'n belangrike rol in die verdedegingsmeganisme van die organisme speel.

Die vernaamste funksie van die annelied kutikula is beskerming. Volgens Richards (1984) mag dit die indringing van swaarmetale vertraag maar kan die kutikula nie as effektiewe versperring teen toksiese metale dien nie.



Figuur 15. 'n Diagrammatiese voorstelling van die struktuur van die kutikula van *D. veneta* om die ortogonale rangskikking van die kollageenvesels (kv), en die mikrovilli (mv) wat oorsprong aan die epikutikulêre projeksies (ekp) gee, aan te toon. Die basaalsone, diepsone, oppervlaksone, bleeksone, skede van die mikrovilli, epikutikula (e), tonofilamente (t), Golgi-apparaat (gap), mitochondrium (mc), en growwe endoplasmiese retikulum (er) word ook aangetoon.

(Geneem en aangepas uit Richards, 1977)

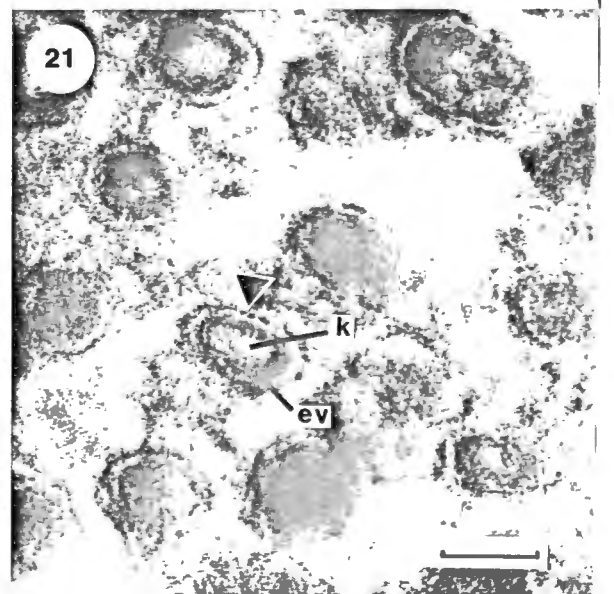
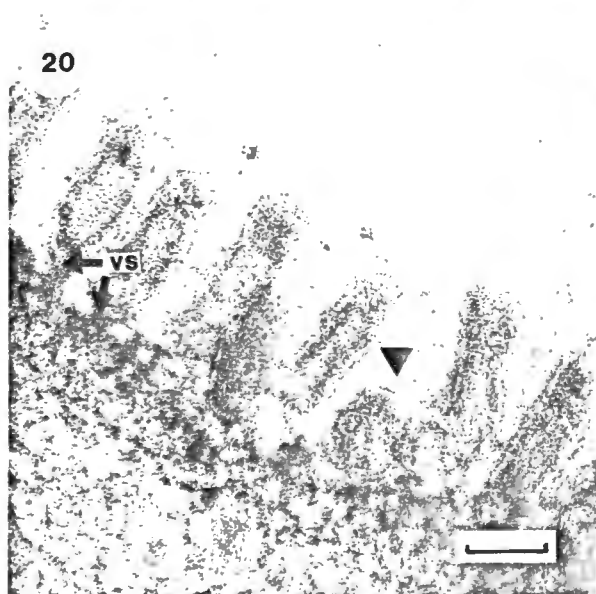
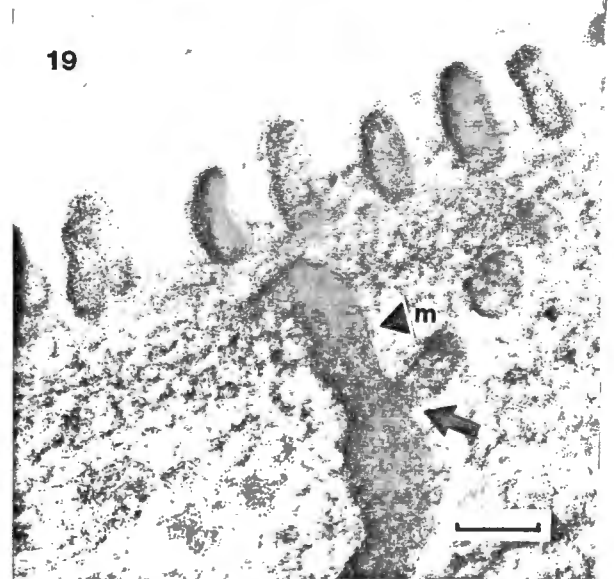
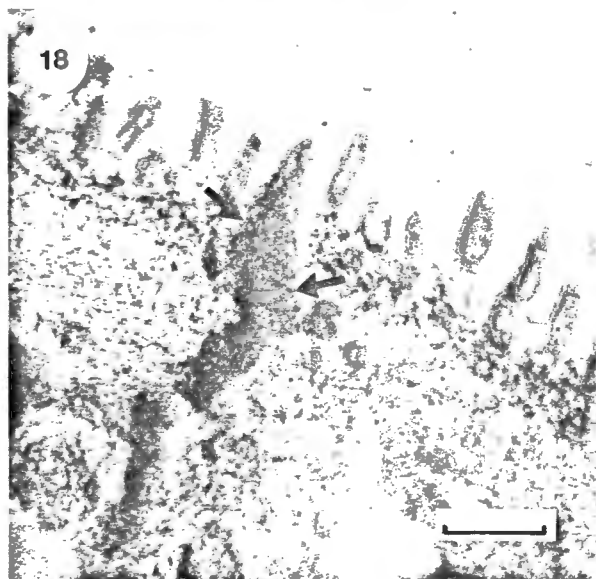
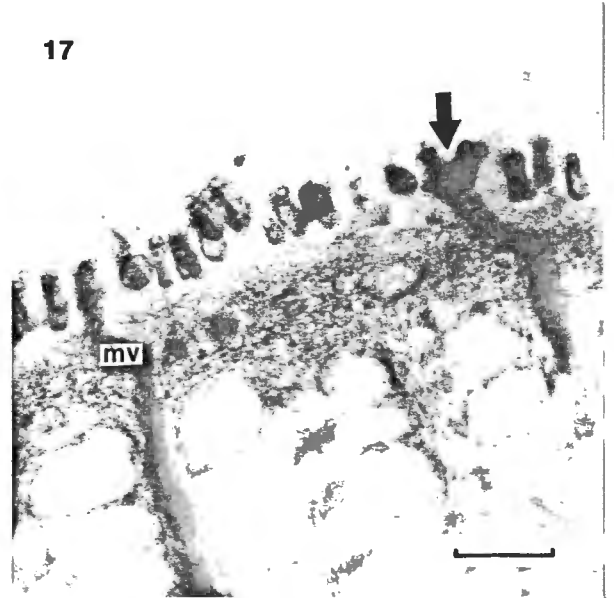
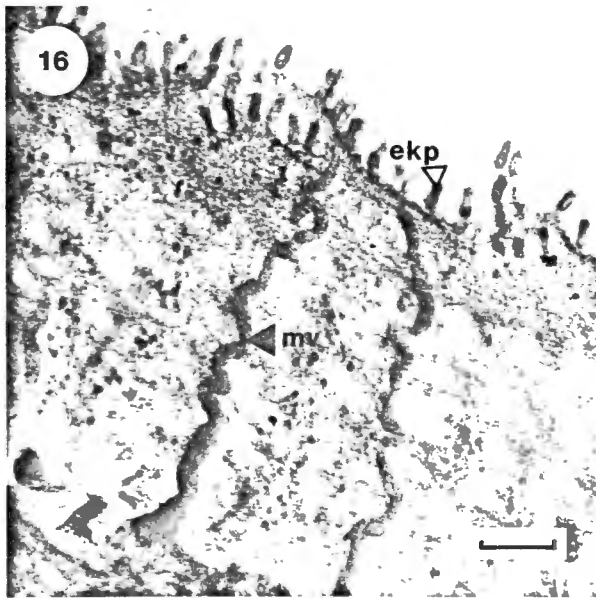
3.2.1.2. Die mikrofibrillêre matriks

Die mikrofibrillêre matriks kan volgens Richards (1974a) in vier sones verdeel word (Figuur 15). Die gebied naaste aan die epiteeloppervlak is die **basaalsone** wat direk onder die kollageenvesels lê. Bokant hierdie laag is die **diepsone** wat om en tussen vesels voorkom. Hierdie laag word opgevolg deur 'n laag van losgepakte mikrofibrille van lae elektrondigtheid, die **bleeksone**. Die heel buitenste sone is saamgestel uit elektrondigte mikrofibrille, die **oppervlaksone**. Hierdie sone het nie 'n beperkende membraan nie, alhoewel die epikutikulêre projeksies wat daarop rus wel deur 'n membraan omring word. In ligmikroskoopsneë kleur die oppervlaksone donker met toluïdienblou en staan bekend as die epikutikula (Richards, 1974a).

Soos wat deur Richards (1974a) waargeneem is en ook in figuur 15 duidelik sigbaar is, is die matriksmikrofibrille in die gebied van die mikrovilli in 'n los maar duidelik onderskeibare "skede" rondom die mikrovilli gerangskik. Hierdie "skede" verloop as 'n band, vertikaal regdeur die kutikula tot in die oppervlaksone waar dit met die filamentte daarvan saamsmelt.

3.2.1.3. Die mikrovilli vanuit die epiteelselle

Die ondersteunende selle word gekenmerk deur reëlmatige verlengings(mikrovilli) in die kutikula. Hierdie mikrovilli verloop regdeur, en min of meer reguit deur die kutikula en termineer tussen die epikutikulêre projeksies (Figuur 16). Richards (1974a) het waargeneem dat die mikrovilli met gereëldes tussenposes voorkom. By *D. veneta* kon hierdie verskynsel nie in lengte- of dwarssneë deur die kutikula waargeneem word nie. Hier is dit meer 'n onreëlmatige rangskikking wat veral duidelik was in lengtesneë deur die kutikula (Figuur 11 & 12). Die mikrovilli gee oorsprong aan die epikutikulêre projeksies deur afknyping en kan óf aan enkel projeksies oorsprong gee (Figuur 17 & 18) óf vertak en aan meer as een projeksie oorsprong gee (Figuur 17).



Figuur 16. TEM-mikrograaf van 'n dwarsnit deur die kutikula van *D. veneta* om mikrovilli (mv) wat regdeur die kutikula loop en tussen die projeksies (ekp) termineer aan te toon. Skaal: $0,3\mu\text{m}$

Figuur 17. TEM-mikrograaf van 'n dwarsnit deur die kutikula van *D. veneta*. Sommige epikutikulêre projeksies ontstaan enkel uit die mikrovilli (mv) terwyl ander vertak om aan twee projeksies oorsprong te gee (pyltjie). Skaal: $0,25\mu\text{m}$

Figuur 18. TEM-mikrograaf wat die oorsprong van 'n projeksie aantoon. Die membraan wat nog 'n gedeelte van die mikrovillus omring kan waargeneem word (pyltjies). Skaal: $0,25\mu\text{m}$

Figuur 19. TEM-mikrograaf wat die membraan (m) wat die mikrovillus omring aantoon asook 'n vertakking van die mikrovillus (pyltjie) om moontlik oorsprong te gee aan 'n tweede projeksie. Skaal: $0,3\mu\text{m}$

Figuur 20. TEM-mikrograaf van 'n lengtesnit deur die epikutikulêre projeksies. Die membraan wat die mikrovilli omring (pyltjie) asook die voetstuk (vs) waarop sommige projeksies staan word aangetoon. Skaal: $0,1\mu\text{m}$

Figuur 21 TEM-mikrograaf van 'n dwarsnit deur die epikutikulêre projeksies. Die substruktuur wat bestaan uit 'n ligte kern (k) en 'n elektrondigte voering (ev) wat deur 'n membraan (pyltjie) omring word, kan waargeneem word. Skaal: $0,05\mu\text{m}$

3.2.1.4. Die epikutikulêre projeksies

Bokant die oppervlaksone kom 'n streek van eweredig gerangskikte, membraanomringde, ellipsoïdale epikutikulêre projeksies voor (Figuur 16 & 20). Dit is die eerste keer deur Reed & Rudall (1948) by *A. longa* waargeneem. Hierdie epikutikulêre projeksies het in die geval van *D. veneta*, die vorm van 'n uurglas (Figuur 18 & 20). Die projeksies is hier ongeveer 90nm lank en wissel in deursnee.

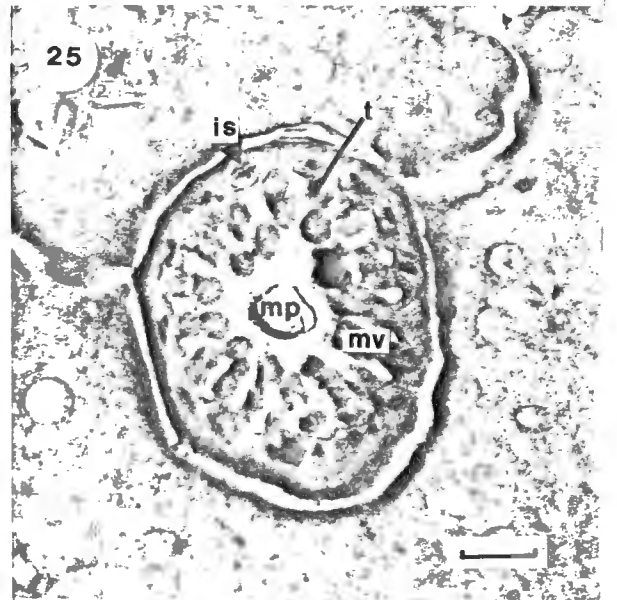
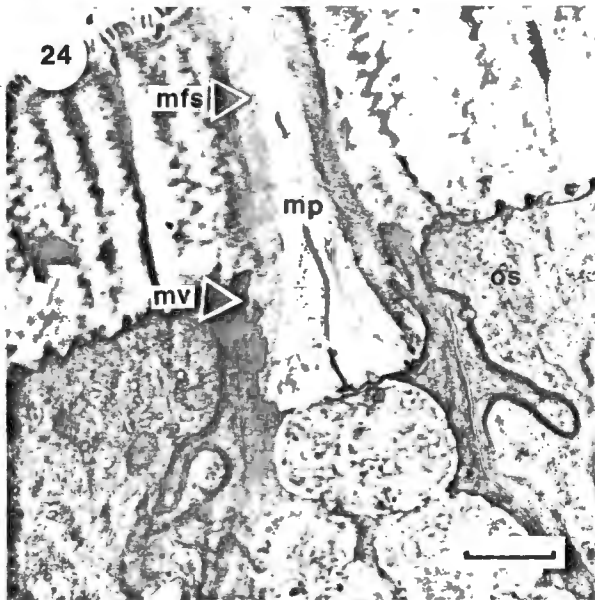
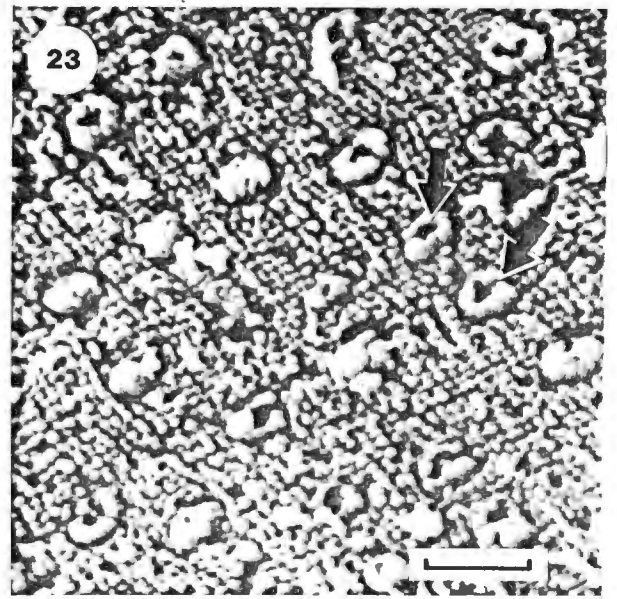
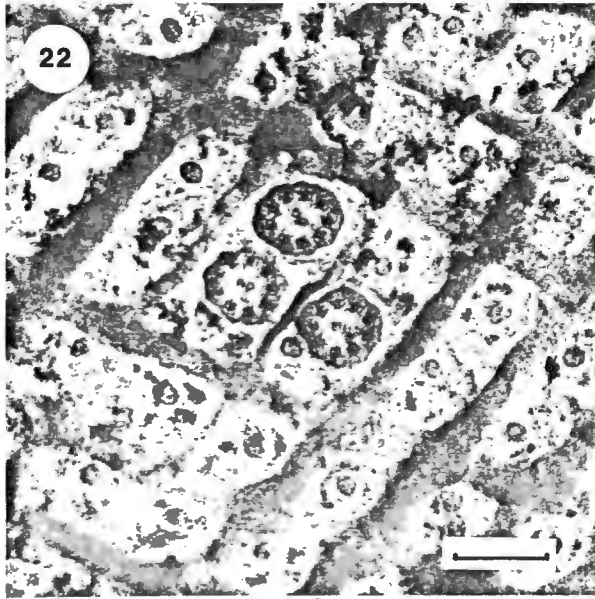
Die projeksies vertoon 'n definitiewe substruktuur, wat neergelê word voordat die projeksie afgeknyp word. Dit het 'n elektrondigte voering en 'n ligte kern wat deur 'n membraan omring word (Figuur 21). Hierdie membraan omring reeds die mikrovillus waaruit die projeksie ontstaan. Die membraan strek egter nie om die volle lengte van die mikrovillus nie maar slegs apikaal vir 'n kort entjie en smelt distaal saam met die matriks (Figuur 18 & 19).

Die wyse waarop die projeksies aan die kutikula geheg is, is nie duidelik nie. Dit lyk asof die fyn mikrofibrillêre filamente vanaf die oppervlaksone met die parallelle mikrofibrille van die projeksies saamsmelt. Soms lyk dit egter asof die projeksie op 'n voetstuk staan (Figuur 20) wat dan weer met die oppervlaksone saamsmelt. Hierdie voetstukke kan egter oorblyfsels wees van die mikrovilli waaruit die projeksies ontstaan.

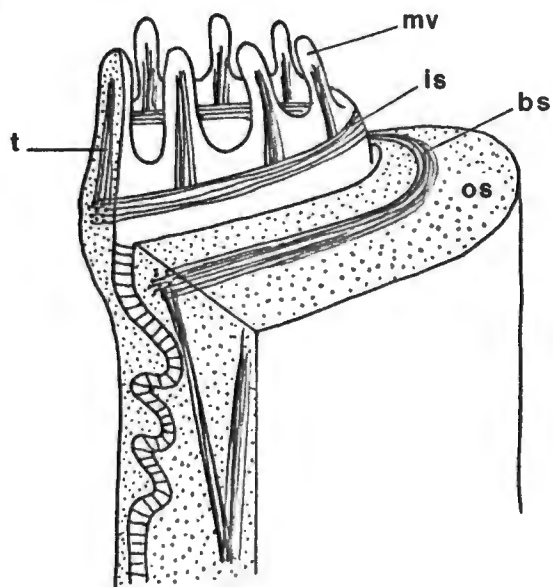
3.2.1.5. Die kutikulêre onderbrekings

Op verskeie plekke in die kutikula word die normale rangskikking van kollageenvesels en mikrovilli onderbreek deur siliums van die sensoriese selle en openinge van die klierselle. In lengtesneë deur die kutikula is die siliums van die sensoriese selle sigbaar (Figuur 22). Die mikrobuisies van die siliums het die tipiese 9 + 2 rangskikking (Mill, 1978) en kom binne die kutikula voor en veroorsaak geen noemenswaardige versteurings nie (Figuur 22).

Alle klierselle besit porieë waarvan die openinge groot is (1,2-1,5 μ m) en definitiewe



26



- Figuur 22.** TEM-mikrograaf van 'n lengtesnit deur die kutikula van *D. veneta* om die siliums van die sensoriese selle aan te toon. Die mikrobuisies van die siliums het 'n tipiese 9 + 2 rangskikking. Skaal: 0.25 μm
- Figuur 23.** SEM-mikrograaf van die kutikula-oppervlak van *D. veneta*. Die oliebolvormige klierselopeninge kan duidelik waargeneem word (pyltjies). Skaal: 2 μm
- Figuur 24.** TEM-mikrograaf van 'n lengtesnit deur 'n klierselopening. Die porie (mp) word omring deur mikrovilli (mv) en uitgevoer deur 'n mikrofibrillêre matriks (mfs). Skaal: 1 μm
- Figuur 25.** TEM-mikrograaf van 'n dwarsnit deur die porie (mp) van 'n kliersel. Die binneste sluitring (is) en die tonofilamente (t) wat die binne sluitring met die basis van elke mikrovilus (mv) verbind, word aangetoon. Skaal: 0,3 μm
- Figuur 26.** 'n Diagrammatiese voorstelling van die sluitmeganisme van 'n kliersel. Die binneste sluitring (is) word deur tonofilamente (t) aan die mikrovilli (mv) in die porie verbind. Die buitenste sluitring lê in die aangrensende ondersteunende sel (os). (Geneem uit Richards, 1977)

kutikulêre versteurings veroorsaak (Figuur 23 & 24). Die porie gaan deur die kutikula, is redelik reguit en word uitgevoer deur 'n mikrofibrillêre sone (Figuur 24). By die distale punt van die porie vloei die mikrofibrillêre sone ineen met die bleek matrikssone van die kutikula. Die oppervlaksone en die epikutikulêre projeksies is nie betrokke by die porievoering nie.

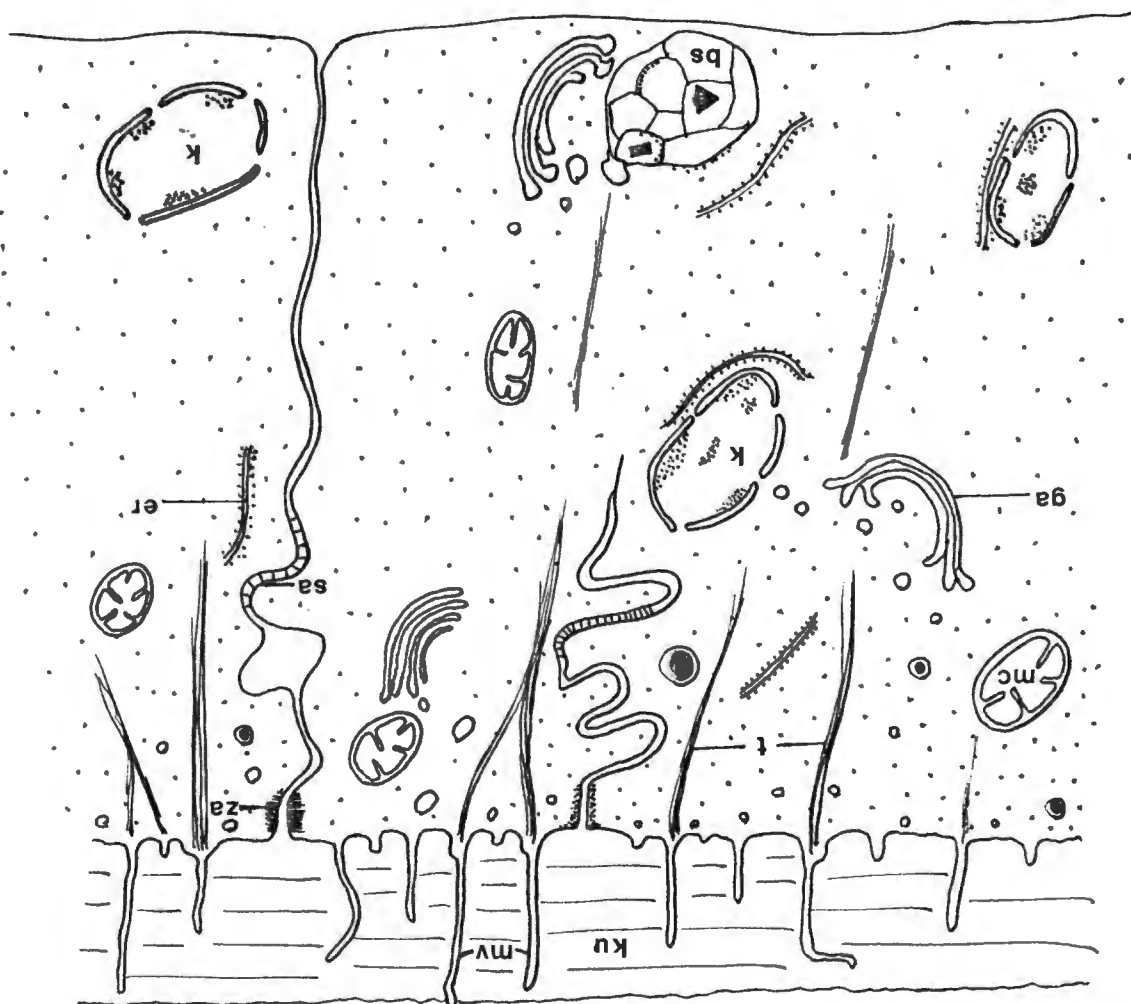
In SEM mikrograwe lyk die openinge van die porie na buite soos 'n oliebol: ringvormig met 'n gaatjie in die middel (Figuur 23). Die versteuring van die ordelik gerangskikte epikutikulêre projeksies kan hier waargeneem word. Daar kon nie sekerheid verkry word oor die materiaal waaruit hierdie ringvormige porie opgebou is nie.

Die distale gedeelte van die porie ontstaan uit die buitenste oppervlak van die selsitoplasma en bestaan uit 'n ring van kort mikrovilli wat prominent deur tonofilamente voorsien word (Figuur 24, 25 & 26). Die porie-ultrastruktuur is deur Richards (1977) beskryf en kan hier ook duidelik waargeneem word (Figuur 25 & 26).

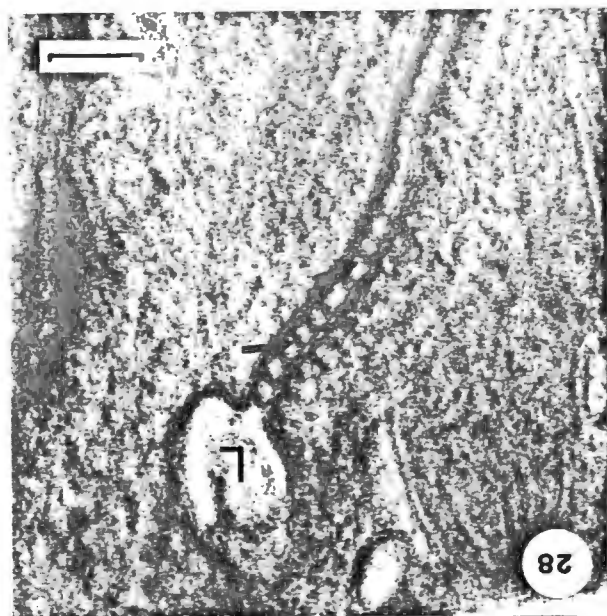
Daar word vermoed dat elke porie 'n openingsmeganisme besit wat verantwoordelik is vir die uitpersing van die sekreet van die sel (Richards, 1977). Die struktuur van die openingsmeganisme bestaan uit 'n dubbele sluitring van tonofilamente. Die binneste sluitring lê binne die apikale sitoplasmavoering van die sel net onder die mikrovilli, met tonofilamente wat na elke mikrovilli verloop (Figuur 26). Die buitenste sluitring lê in die aangrensende ondersteunende sel (Figuur 26).

3.2.2. Die ondersteunende selle

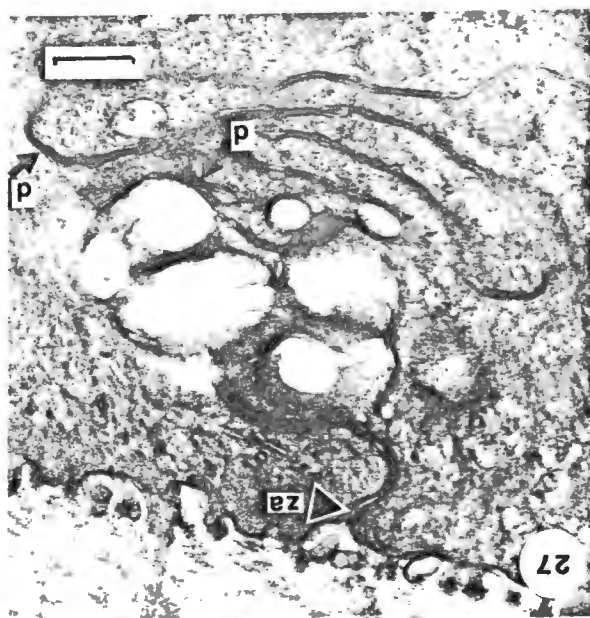
Die ondersteunende selle waarna hier verwys word is epidermale selle wat nie gespesialiseer is soos die sekretoriese en sensoriese selle nie (Welsch *et al.*, 1984). Die apikale gedeeltes van hierdie selle vorm mikrovilli wat die kutikula binnedring (Figuur 29). Die nukleï van die selle is prominent en het een nukleolus elk en chromatien (eu- en heterochromatien). In die sitoplasma kom ook mitochondria, growwe endoplasmiese



29



28



27

Figuur 27. TEM-mikrograaf wat twee tipes verbindingspesialisasies tussen ondersteunende selle aantoon. Die zonula adhaerens (za) en desmosome (d) kan hier waargeneem word. Skaal: $0,5\mu\text{m}$

Figuur 28. TEM-mikrograaf wat die derde tipe verbindingspesialisasie tussen ondersteunende selle aantoon. Die gesepteerde tipe kan hier waar geneem word, met dwarsbalkies (pyljies) wat vanaf die lumen (L) vir 'n kort gedeelte gevolg kan word. Skaal: $0,08\mu\text{m}$

Figuur 29. 'n Diagrammatiese voorstelling van ondersteunende selle in die klitellumweefsel van *D. veneta*. Die mikrovilli (mv) wat die kutikula (ku) binnedring, die kern (k), Golgi-apparaat (ga), tonofilamente (t), endoplasmiese retikulum (er), bakterioïedbevattende selle (bs), zonula adhaerens (za) en gesepteerde aansluitings (sa) kan waargeneem word.

retikulum en Golgi-apparaat asook membraanomringde pigmentgranules voor (Figuur 29). Die apikale gedeeltes van die ondersteunende selle vorm klein vesikels wat soms in kontak is met die basale gedeeltes van die kutikula (Figuur 14 & 29). Daar word aanvaar dat hierdie vesikels die materiaal vir die kutikulêre subeenhede sekreter (Burke, 1974 ; Jamieson, 1981).

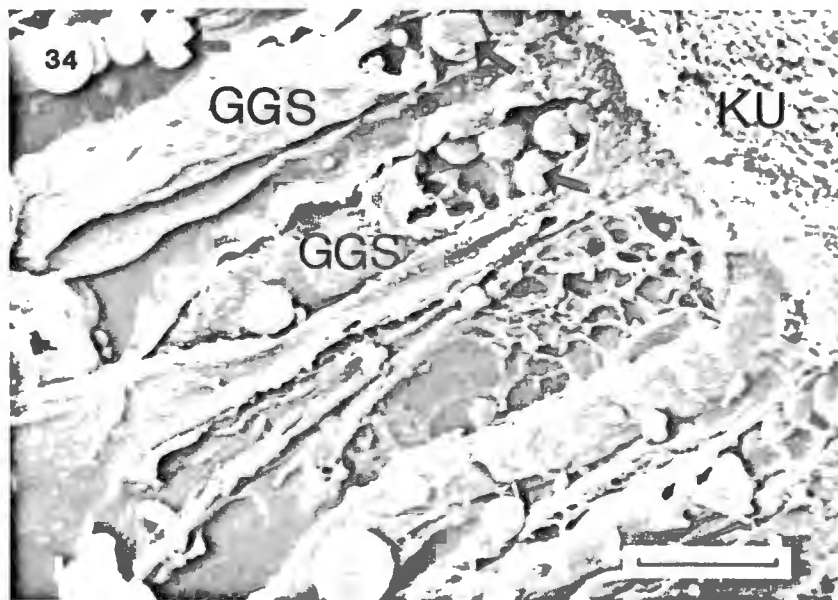
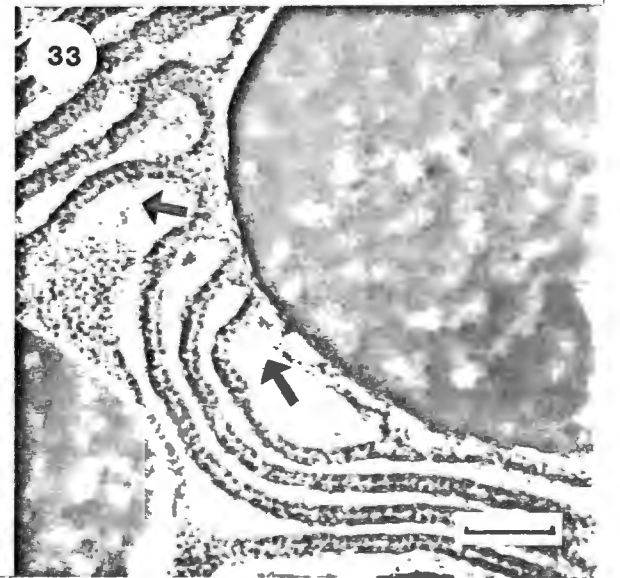
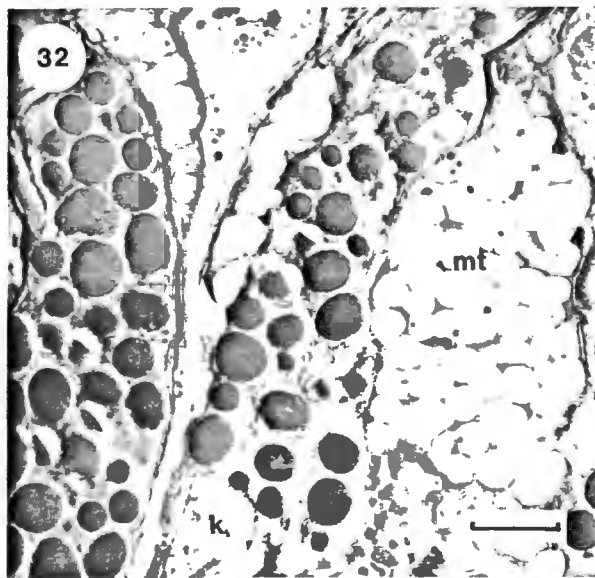
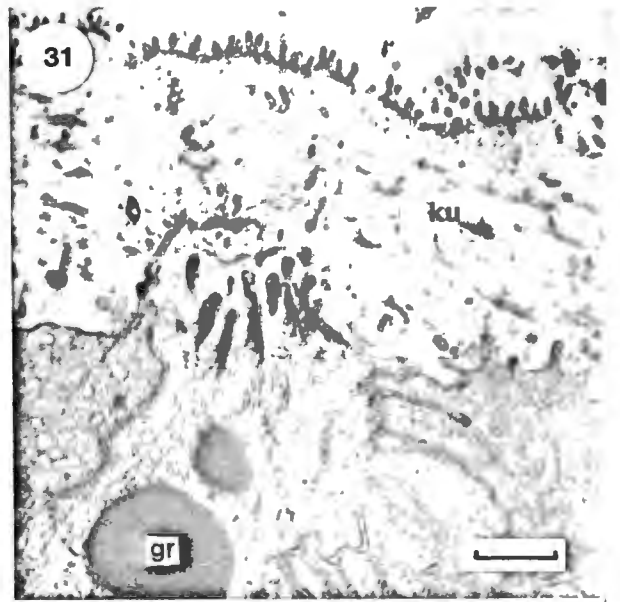
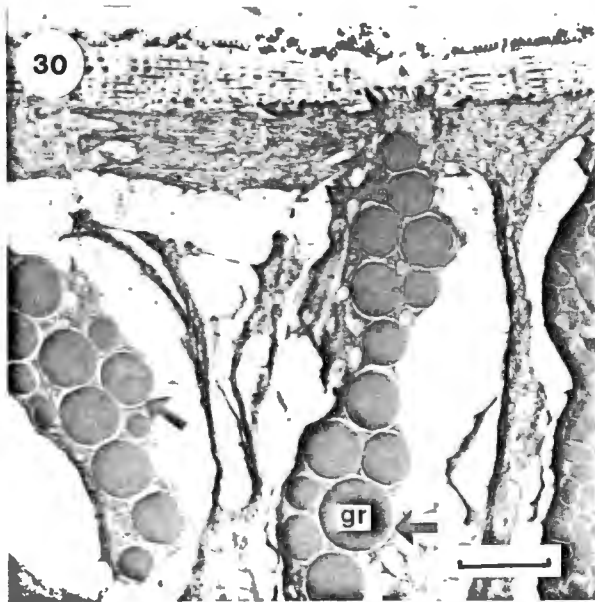
'n Opvallende kenmerk van die ondersteunende selle is die tonofilamentnetwerk (Figuur 29). Volgens Hopkins (1978) is die proteïen, desmien, die hoofkomponent van hierdie filamente en dien dit as meganiese ondersteuning vir die behoud van die vorm van die sel (Theron, 1979) asook om die spanning wat binne die sitoplasma ontstaan, te verstrooi (Hopkins, 1978).

Elke ondersteunende sel word aan 'n aangrensende sel verbind deur 3 tipes verbindingskomplekse. Volgens Coggeshall (1966) kan hierdie verbindingsgebiede by *L. terrestris* in drie verbindingspesialisasies verdeel word naamlik: die zonula adhaerens, die macula adhaerens (desmosoom) (Figuur 27) en die gesepteerde aansluitings (Figuur 28). Hierdie verskillende streke kan ook duidelik by *D. veneta* waargeneem word.

Die gesepteerde aansluitings (Figuur 28) word algemeen in die apikale gedeeltes van selaansluitings aangetref, asook in die sluitingsarea tussen slymselle en aangrensende ondersteunende selle (Richards, 1977) (Figuur 26). Klein balkies oorbrug die gaping tussen die twee selle (Figuur 28). Die afstand tussen die balkies is nie konstant nie.

3.2.3. Die klierselle

In die geval van die klitellum van *D. veneta* word vier tipes klierselle aangetref, naamlik die groot granulêre selle, die fyn granulêre selle en die orto- en metachromatiese selle wat verantwoordelik is vir die sekresie van slym. Klierselle wat nie op grond van ultrastrukturele kenmerke van mekaar onderskei kon word nie, is deur histochemiese metodes van mekaar onderskei. Hierdie metodes kon ook tot 'n mindere mate die



Figuur 30. TEM-mikrograaf van die groot granulêre selle in die klitellum van *D. veneta*. Die sferies tot ovaalvormige granules (gr) waarvan die membraan soms weggetrek is (pyltjie) word aangetoon. Skaal: 4 μ m

Figuur 31. TEM-mikrograaf van 'n kutikulêre porie waardeur die groot granulêre selle na buite open. ku - kutikula, mv - mikrovilli, gr - granule
Skaal: 0,6 μ m

Figuur 32. TEM-mikrograaf van groot granulêre selle in die klitellum van *D. veneta*. Die kern (k) word basaal verplaas. mt -metachromatiese slymsel
Skaal: 4 μ m

Figuur 33. TEM-mikrograaf van die growwe endoplasmiese retikulum wat in konsentriese ringe om die granules (gr) van die groot granulêre selle voorkom. Nuutgevormde proteïen vul die holtes van die sisternae (pyltjies).
Skaal: 0,2 μ m

Figuur 34. SEM-mikrograaf van die kutikula (KU) en boonste gedeelte van die dikte van die klitellum van *D. veneta*. Die groot granulêre selle (GGS) en granules van hierdie selle (pyltjies) word aangetoon. Die identiteit van die ander klierselle is inbekend.
Skaal: 5 μ m

verbindings aandui wat deur die selle gesekreter word.

3.2.3.1. Die groot granulêre selle (sel tipe 1)

Die groot granulêre selle kom verspreid oor al drie die streke (Figuur 1, 7b, 8 & 9) waarin die klitellum verdeel word voor. Die aanwesigheid van die selle is hoofsaaklik beperk tot die boonste een derde, naby die buitenste oppervlak van die klitellumweefsel (Figuur 7b) maar enkele klierelemente word ook soms tussen die fyn granulêre selle en in die onderste derde van die klitellumweefsel waargeneem. Die groot granulêre selle word ook aangetref in die normale liggaamsepidermisweefsel (Figuur 7a).

Die groot granulêre selle wat in hierdie ondersoek waargeneem is (Figuur 30 & 32) verskil nie veel van soortgelyke klierselle wat by ander oligogete beskryf is nie. Grove (1925) het in *L. terrestris*; Grove & Cowley (1927) in *E. ferida*; Grove (1931) in *Alma emini*; El-Duweini (1951) in *A. nilotica* en Lufty (1965) in *A. caliginosa* soortgelyke klierelemente waargeneem en beskryf.

In lengtesneë vertoon hierdie selle as verlengde, slank klierelemente wat gebuig is en soms effens kronkelend tussen die ander selle lê (Figuur 32). Die selle het soms dun nekke met 'n verlengde, verdikte basis. Die granules in die selle is sferies tot ovaalvormig (Figuur 30 & 34), is tussen 1,5 en 2,8 μm in deursneë en het soms 'n gevlekte voorkoms. Dit is die gevolg van die afwisselende elektrondigte en -minder digte materiaal wat daarin voorkom (Figuur 33). Die sekretoriese granules is van eenvormige grootte behalwe in die nekopening van die sel waar dit kleiner is (Figuur 31). Die membraanomringde granules vul die grootste gedeelte van die inhoud en verplaas die kern, growwe endoplasmiese retikulum (GER) en Golgi-apparaat na die basale gedeelte van die sel (Figuur 32). Deurgans is waargeneem dat die membraan wat die granules omring daarvan wegtrek (Figuur 30, pyltjies). Dit is ook deur Morris (1983) waargeneem, maar geen verklaring kan vir hierdie verskynsel aangebied word nie.

Die growwe endoplasmiese retikulum is die oorheersende sekretoriese organel en kom ook algemeen tussen die granules van die groot granulêre selle in konsentriese ringe voor (Figuur 33). Dit is tipies van aktief sekreterende selle dat die sisternae van die GER verwyd en die holtes van die meeste sisternae gevul word met nuutgevormde proteïen (Hopkins, 1978) (Figuur 33, pyltjie).

Die groot granulêre selle toon die volgende histochemiese kleurreaksies.

TABEL 2: 'n Samevatting van die kleurreaksies van die groot granulêre selle.

KLEURREAKSIE	REAKSIE	AFLEIDING
Musienkarmien	grys	negatief - geen slym
Massontrichroom	ligrooi	negatief - geen slym of kollageen
Verhoeff	lig blou-swart	negatief - geen kollageen effens positief vir elastien
Picro-ponceau en hematoksilien	liggeel	positief-elastien
PAS	rooi-pers	positief

Uit bogenoemde resultate (Tabel 2) kan die afleiding gemaak word dat die groot granulêre selle nie betrokke is by die sekresie van slym nie. Die rede hiervoor is die negatiewe resultate met toluïdienblou en musienkarmien, wat gebruik is om spesifiek vir slym te kleur (Tabel 1). Dit toon egter 'n PAS-positiewe reaksie wat deur Morris (1983) by *E. fetida* as 'n neutrale slymverbinding met 1,2-glikolgroepe beskou word. Die

teenwoordigheid van elastien is deur die effens positiewe reaksie met Verhoeff se kleurstof vir elastien, asook deur die effens positiewe reaksie met picro-ponceau en hematoksilien bevestig. Kollageen is egter afwesig op grond van die negatiewe reaksies met Massontrichroom en Verhoeff. Dit bevestig die resultate van Morris (1983) wat aangetoon het dat in die geval van die groot granulêre selle van *E. fetida* kollageen, keratien en elastien afwesig is.

Volgens Grove & Cowley (1927), Stephenson (1930) en Hess & Vena (1974) is die funksie van die groot granulêre selle die sekresie van die kokonwand. Hiaro (1965) en Suzutani-Shiota (1980) bevestig bogenoemde funksie deurdat hulle aangetoon het dat die inhoud van die groot granulêre selle geledig was na kokonvorming.

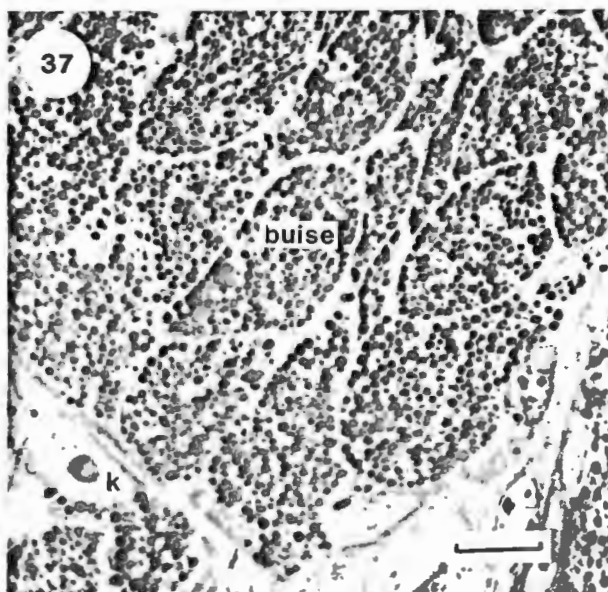
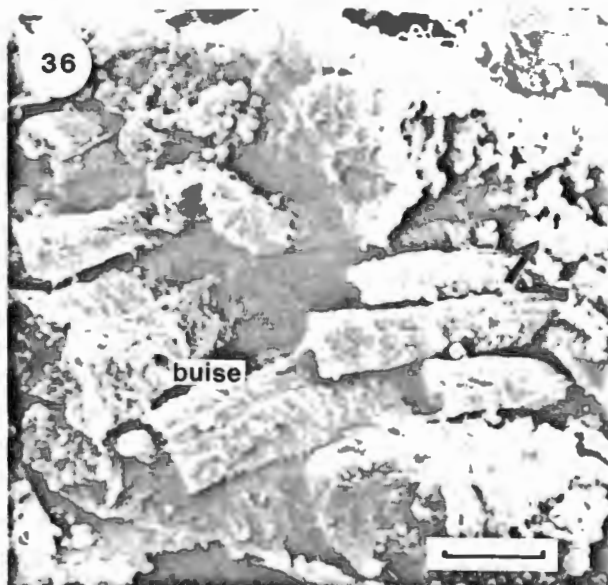
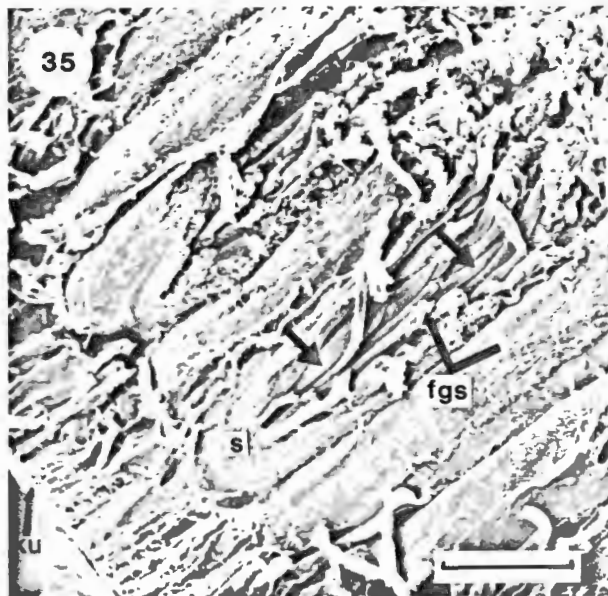
Die feit dat geen kollageen of keratien in die inhoud van die groot granulêre selle teenwoordig is nie (Morris, 1983) word bevestig deur aminosuuranalise van die kokonwand van *E. fetida* (Marcel *et al*, 1985). Hierdie navorsers toon dat die samestelling van die kokonwand van *E. fetida* nie keratien, kollageen of fibroïen bevat nie.

Die presiese samestelling van die granuulinhoud en die verband met die kokonwand kan slegs deur chemiese ontledings gedoen word en val buite die doelstellings van hierdie ondersoek.

3.2.3.2. Die fyn granulêre, proteïenagtige selle (sel tipe 2)

Hierdie selle is die volopste en mees opvallende selle in streek A en B (dorsaal en ventrolateraal) (Figuur 1) van die klitellum van *D. veneta* en beslaan die grootste gedeelte van die deursnee daarvan (Figuur 7b & 8). Hierdie selle word glad nie aangetref in die ventrale gedeelte van die klitellum nie en ook nie in die normale liggaamsepidermis nie.

Die struktuur van die selle verskil van die van ander klierselle in die klitellum en word gekenmerk deur lang dun nekke wat verwyd tot kolfvormige basale areas (Figuur 35). Die



Figuur 35. SEM-mikrograaf van streek A van die klitellum van *D. veneta*. Die " buise-binne-'n-sak-rangskikking " van die fyn granulêre selle kan waargeneem word.

fgs - fyn granulêre selle, ku - kutikula
s - sak, buise (pyltjies).

Skaal: 40 μ m

Figuur 36. SEM-mikrograaf van afgebreedte buise van die fyn granulêre selle. Die granules (pyltjies) by die afgebreekte punte kan waargeneem word.

Skaal: 5 μ m

Figuur 37. TEM-mikrograaf van die basale area van 'n fyn granulêre sel van *D. veneta*. Die basale areas van die buise in die sak word waargeneem as ook die kern (k) wat basaal verplaas is.

Skaal: 6 μ m

sekretoriese granules van hierdie selle word omsluit deur 'n membraan wat distaal afgeëindig is en soos 'n blindeindigende buis vertoon. In figuur 36 kan die buise waargeneem word waar dit afgebreek het tydens fiksering, asook die granules waar dit by die afgebreekte punte uitgeloop het. Groepe van hierdie buise, waarvan sommige dikker is as ander, word weer deur 'n dikker membraan omring (Figuur 35 & 37) en lyk dan soos 'n sak waarin 'n aantal buise lê. Die onderste of proksimale gedeelte van die selle (sakke) is verbind met, of rus op die onderste verbindingsweefsel of basaalmembraan. Hierdie rangskikking van die fyn granulêre selle is ook in die geval van *A. caliginosa* (Lufty, 1965) en *A. nilotica* (El-Duweini, 1951) waargeneem.

Die kerne van die fyn granulêre selle is basaal onder die diggepakte sekretoriese granules geleë (Figuur 37). Die granules waarvan die deursnee wissel tussen $0,3-0,7\mu\text{m}$, se vorm kan sferies of ellipsoïdaal wees. Die inhoud wissel in elektrondigtheid van lig na donker (Figuur 37) en word deur 'n membraan omring.

Alhoewel die bestaan van die fyn granulêre selle lank reeds deur Grove & Cowley (1927) waargeneem is, is die ultrastruktuur daarvan voorheen slegs in mikrodriële families beskryf. Slegs Morris (1983) het 'n ultrastrukturele ondersoek van hierdie selle by *E. fetida* uitgevoer. Die seltepe wat in die geval van *D. veneta* waargeneem is, stem ooreen met seltepe 2 van *E. fragmentosus* (Hess & Vena, 1974). In die geval van *Lumbricillus rivalis* is die granules van die fyn granulêre selle (seltepe 2) tussen $0,5-0,6\mu\text{m}$ groot en stem die elektrondigtheid ooreen met die van die lumbrisiëde (Richards, 1977).

Die volgende histochemiese kleurreaksies is in die geval van die fyn granulêre selle waargeneem (Tabel 3).

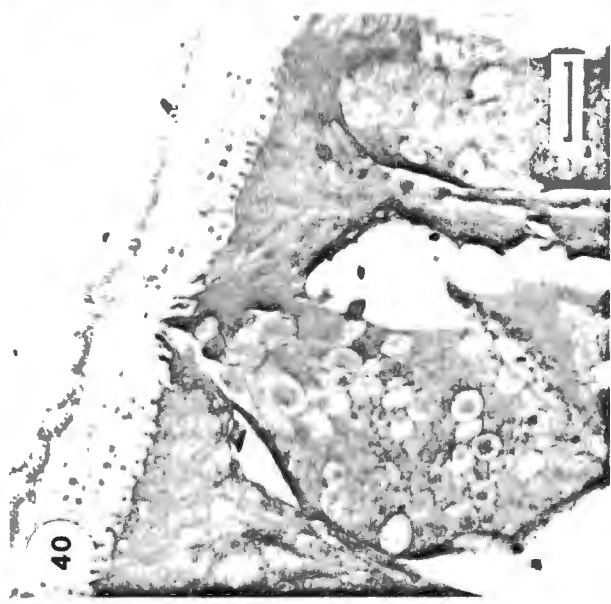
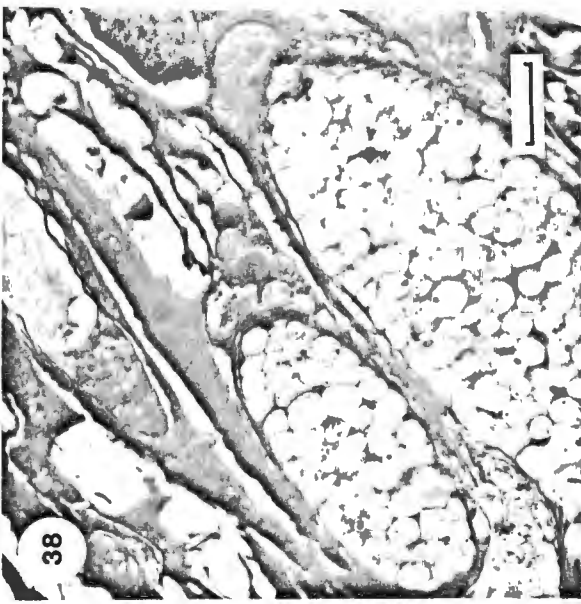
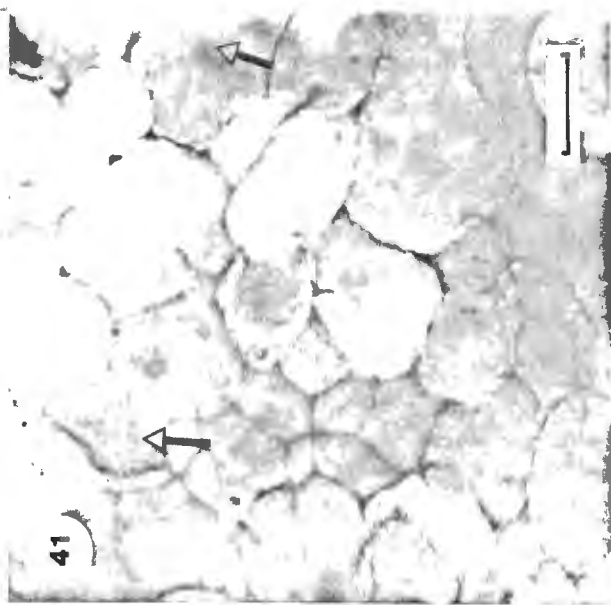
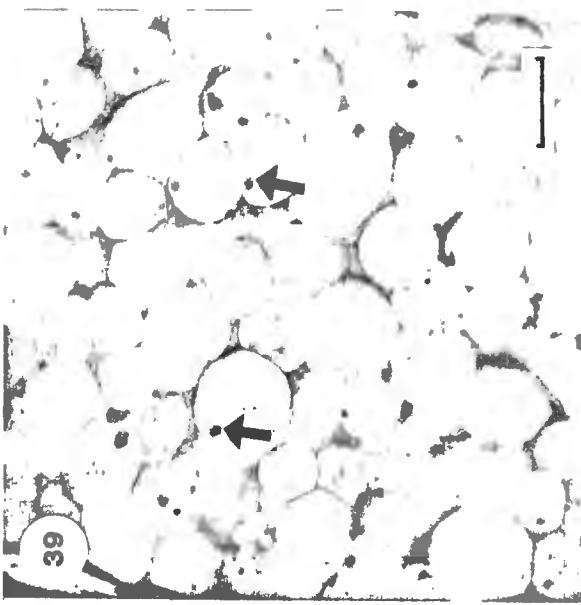
TABEL 3: Die histochemiese resultate van die fyn granulêre selle (seltipe 2).

KLEURTEGNIÛK	REAKSIE	AFLEIDING
Massontrichroom	ligrooi	negatief vir slym en kollageen
Musienkarmien	grys	negatief vir slym
PAS	helder-pienk	positief
Toluïdienblou	ligblou	negatief vir slym
Verhoeff	geel	negatief vir kollageen

Uit die resultate (Tabel 3) wil dit voorkom asof die fyn granulêre selle ook nie betrokke is by die sekresie van slym nie en bevestig bevindinge deur Lufty (1965) en Morris (1983). In die huidige ondersoek is egter waargeneem dat hierdie selle betrokke mag wees by die sekresie van 'n PAS-positiewe verbinding. Morris (1983) bevind dat die PAS-positiewe verbinding by die fyn granulêre selle van *E. fetida*, neutrale slymverbinding met 1,2-glikolgroepe is, en dat hierdie selle ook verantwoordelik is vir die sekresie van proteïene. Die huidige ondersoek bevestig dus dat kollageen en elastien nie in die sekresiemateriaal van die selle teenwoordig is nie (Morris, 1983).

Verskillende navorsers, onder andere Grove & Cowley (1927) en El-Duweini (1951) het waargeneem dat die fyn granulêre selle verantwoordelik is vir die sekresie van die voedende vloeistof in die kokon. Hierdie afleiding word ook gemaak deur Hess & Vena (1974) vir *E. fragmentosus* en deur Suzutani-Shiota (1980) vir die varswater oligogeeet *T. hattai*.

In die huidige ondersoek kon daar geen verband gevind word tussen die verbinding wat



Figuur 38. TEM-mikrograaf van 'n lengtesnit deur die metachromatiese slymselle in die klitellum van *D. veneta*. Skaal: 5 μ m

Figuur 39. TEM-mikrograaf van die granules van die metachromatiese slymselle. Die fyn retikulêre voorkoms en elektrondigte skyfie (pyltjie) kan waargeneem word. Skaal: 2 μ m

Figuur 40. TEM-mikrograaf van 'n lengtesnit deur 'n ortochromatiese slymsel in die klitellum van *D. veneta* wat op die oppervlak uitmond. Skaal: 2 μ m

Figuur 41. TEM-mikrograaf van die homogene granules van die ortochromatiese slymselle. 'n Elektrondigter gedeelte in die kern kan waargeneem word (pyltjies). Skaal: 0,3 μ m

in die histochemiese ondersoek geïdentifiseer is en die albumieninhoud van die kokonne nie.

3.2.3.3. Metachromatiese slymselle

Die woord metachromaties is afkomstig van die Griekse woorde "meta" en "chroma" wat onderskeidelik "verandering van" en "kleur" beteken. Hierdie selle kleur 'n ander kleur as die fundamentele kleur van die kleurstof waarmee dit behandel word. In die geval van die metachromatiese kleurstof, toluïdienblou, kleur die selle dus pienk of rooi-pers. Hierdie kleurreaksie word toegeskryf aan die teenwoordigheid van groot anioniese molekules wat 'n oorvloed sulfaat-, fosfaat- en karboksielsuurradikale bevat. Hierdie groepe is geslote en laat binding met die kleurstofmolekule plaasvind sodat polimerisering volg. Die slym in die granules van die metachromatiese selle besit sommige van hierdie bestanddele en tree daarom metachromaties op. Hierdie selle kan dus duidelik onderskei word op grond van die helder pienk kleur wat dit aanneem wanneer dit met toluïdienblou gekleur word (Lillie, 1965 en Humason, 1979).

Hierdie tipe selle kom meer algemeen in streke B en C (ventrolateraal en ventraal) (Figuur 1) voor asook in die normale liggaamsepidermis. Hierdie klier-elemente is groot en ovaalvormig en word omring deur 'n membraan (Figuur 38). Die slymgranules het 'n ronde of sferiese vorm en wissel in grootte tussen 0,8 - 2,3 μm (Figuur 39). In metachromatiese slymselle van *E. fetida* wissel die grootte van die granules tussen 0,4-3,7 μm (Morris, 1985). In die geval van *D. veneta* lyk dit asof die granules amper geen inhoud het nie maar by hoër vergrotings kan die fyn retikulêre inhoud waargeneem word (Figuur 39). In meeste granules kom 'n klein elektrondigte skyfie voor (Figuur 39, pyltjie) wat hierdie selle van die ortochromatiese selle onderskei.

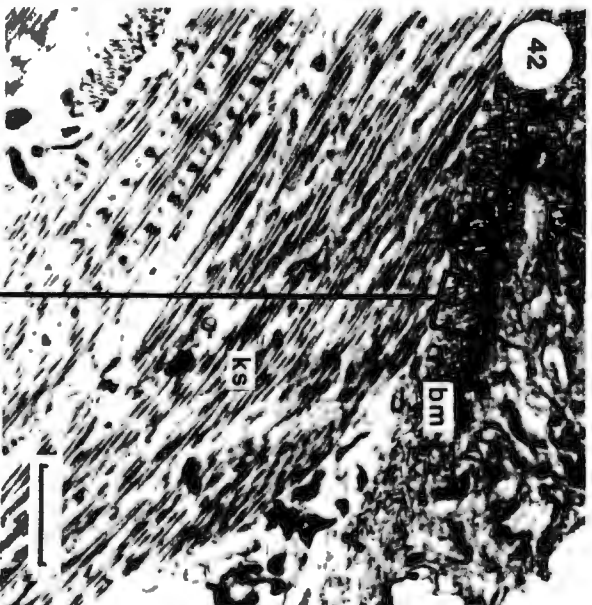
Tydens die huidige ondersoek is daar wel waargeneem dat die metachromatiese selle slym afskei omdat hierdie selle pienk kleur wanneer dit met toluïdienblou behandel word. Volgens Grove & Cowley (1927) en El-Duweini (1951) is die slymselle verantwoordelik

vir die sekresie van die slymband wat die kopulerende wurms omring, sowel as die slymbuis wat die kokon, pas na vorming, omring. In die literatuur word egter nie tussen die funksies van die orto- en metachromatiese slymselle in die klitellum onderskei nie. Die funksies van hierdie selle kan ook nie in die huidige ondersoek bevestig word nie.

3.2.3.4. Ortochromatiese slymselle

Die woord ortochromatiese is afkomstig van die Griekse woorde "orthos" en "chroma" wat onderskeidelik "direk" en "kleur" beteken. Wanneer selle of weefsels dus met ortochromatiese kleurstowwe gekleur word, beteken dit dat die reaksie daarvan direk en voorspelbaar is onder normale omstandighede (Humason, 1979). In die geval van toluïdienblou kleur ortochromatiese slymselle dus blou. In teenstelling met die metachromatiese selle vind polimerisering van die kleurstofmolekule nie plaas nie. Die slym van hierdie selle tree dus ortochromaties op (Lillie, 1965 en Humason, 1979).

Die ortochromatiese slymselle (Figuur 40) is bykans afwesig in streek A (dorsaal) maar kom meer algemeen in veral streek C voor (ventraal) (Figuur 1 & 9). Hierdie selle is kolfvormig en open na buite met 'n porie wat deur 'n ring mikrovilli omring word. Die slymgranules varieër geweldig in vorm (Figuur 41). Dit lyk asof die vorm van hierdie selle deur die druk van die omringende granules bepaal word. Die inhoud van die granules is fibrilagtig met 'n meer elektrondigte gedeelte in die kern (Figuur 41, pyltjie). Na aanleiding van hierdie eienskappe word hierdie tipe ortochromatiese sel deur Richards (1977) geklassifiseer as die homogene tipe. Tydens 'n deeglike ondersoek wat op 11 Britse lumbrisiëde onderneem is, is waargeneem dat die ortochromatiese selle spesiespesifiek is. Onderskeid word gemaak tussen heterogene (Tipes L, A, E, & O) en homogene selle. Die granuulkern van die heterogene tipe selle het 'n kenmerkende patroon terwyl die homogene tipe granules oor geen patroon beskik nie. By laasgenoemde tipe mag daar vae areas van digter materiaal voorkom (Richards, 1974c).



Figuur 42. TEM-mikrograaf wat die basaalmembraan (bm) en aangrensende kringspiere (ks) van *D. veneta* aantoon. Skaal: $2\mu\text{m}$

Figuur 43. 'n Vergroting van figuur 42 om die oriëntasie van die kollageenvesels in die basaalmembraan aan te toon. Die kollageen is anders as dñe in die kutikula, geband (pyltjies). Skaal: $0,3\mu\text{m}$

Figuur 44. TEM-mikrograaf van 'n bakterioïedbevattende sel. Die reghoekige bakterioïede (ba) kan duidelik waargeneem word. Dit ontstaan uit partikels in sisternae van die Golgi-apparaat wat deur die pyltjies aangedui word. Skaal: $1\mu\text{m}$

3.2.4. Bakterioïedbevattende selle

In die ondersteunende selle van die klitellumweefsel van *D. venera* kom daar bakterioïedbevattende selle voor (Figuur 44). Hierdie selle bevat bakterioïedkristalle wat nie 'n spesifieke vorm het nie alhoewel die meeste min of meer reghoekig is. Die eksterne kristaloppervlak is dikwels skerp afgebaken en die inhoud het 'n latwerk voorkoms.

Die bakterioïede ontstaan volgens Jamieson (1981) tydens aktiewe proteïensintese uit geordende partikels in die sisternae en vakuole van die Golgiapparaat (Figuur 44 ,pyltjie). Die kristal vergroot en die aantal kristalle per vakuool neem toe. Volgens Jamieson (1981) is dit duidelik dat die kristalle deel is van aktiewe sintese maar die funksie daarvan is onseker.

3.2.5. Basaalmembraan

Die epidermis word deur 'n kollageenbevattende, basaalmembraan begrens en lê tussen die epidermis en die liggaamswandspiere (Figuur 42). Hierdie kollageenvesels is egter baie meer wanordelik gerangskik maar neem tog die ortogonale rangskikking aan (Figuur 43). Die vesels lyk baie soos die kollageenvesels maar is geband (Figuur 43, pyltjies) en is heelwat dunner as die van die kutikula.

3.3 KOKONNE

Kokonne word gevorm deur die verharding van 'n sekreet wat deur die klierselle in die klitellum afgeskei word. Die kokonne vorm oor die klitellumstreek (27-33 by *D. veneta*) en word, wanneer dit voltooi is, agtergelaat deurdat die wurm agteruit daardeur beweeg. Die punte van die kokon trek saam en gee dit dus 'n ovaal- of suurlemoenvorm. Indien paring plaasgevind het, bevat die kokon ova, spermatozoa en 'n hoeveelheid albumienagtige vloeistof vir die latere voeding van die embrio. Die kokonne van die Lumbricidae word algemeen na aan die grondoppervlak waarin dit voorkom, gevorm en as die voggehalte van die grond hoog is, selfs bo-op die grond (Stephenson, 1930). Die kokonne van *D. veneta* word gewoonlik in miskapsules aangetref wat bestaan uit die gietsels van die wurms asook uit gronddeeltjies. Hierdie miskapsules beskerm teen die kokon en die embrio binne die kokon teen meganiese beskadiging en besering (Ramisch & Graff, 1985).

Hoewel die eerste waarnemings in verband met kokonvorming volgens Grove (1925) reeds so vroeg as 1902 deur Foot & Strobell gemaak is, is die inligting, veral ultramikroskopies, oor kokonne baie skaars. Hierdie skaarste aan inligting word onderskryf deur Pearce, Oates & Carruthers (1990) wat, nadat hulle 'n gemineraliseerde fossielembrio en gedeelte van 'n kokonwand probeer identifiseer het, op die leemtes in hierdie gebied gewys het.

Alhoewel die inligting beperk is, het Grove & Cowley reeds in 1926 die eerste poging aangewend om die wand van die kokon te karakteriseer. Hulle het gevind dat die kokonmembraan, nadat dit droog geword het, sterk en weerstandbiedend is en 'n ooreenkoms toon met die chitien van insekte. Stephenson (1930) het verder ondersoek ingestel en waargeneem dat die kokonwand uit ineengevlegde fibrille of vesels bestaan. Na 1930 en tot en met 1985, toe Marcel *et al* (1985) 'n deeglike ultrastrukturele en biochemiese ondersoek van die kokonne van *E. fetida* uitgevoer het, is baie min inligting oor lumbrisiëdkokonne aangeteken. Suzutani-Shiota (1980) in die geval van *T. hattai* en

Knight & Hunt (1974) in die geval van *E. octoculata*, het egter bygedra tot 'n duideliker beeld van kokonne en kokonvorming van die Tubificidae en Hirudinea.

Volgens die literatuur het slegs Rouabah-Sadaoui (1984) en Marcel *et al* (1985) gepoog om die biochemiese samestelling van die kokonwand te bepaal. Die biochemiese samestelling van die kokonne blyk ooreen te stem met die kollageen van die klitellum (kutikula) maar is volgens bogenoemde outeurs nie kollageen, keratien of fibroïen nie (Marcel *et al*, 1985). Knight & Hunt (1974) kon ook nie tydens 'n ondersoek, waar daar gepoog is om die samestelling van die kokonwand van die bloedsuier *E. octoculata* te bepaal, presies vasstel waaruit dit bestaan nie. Hierdie outeurs het waargeneem dat die materiaal nie verwant is aan insekfibroïen nie maar wel 'n ooreenstemming toon met die keratiene.

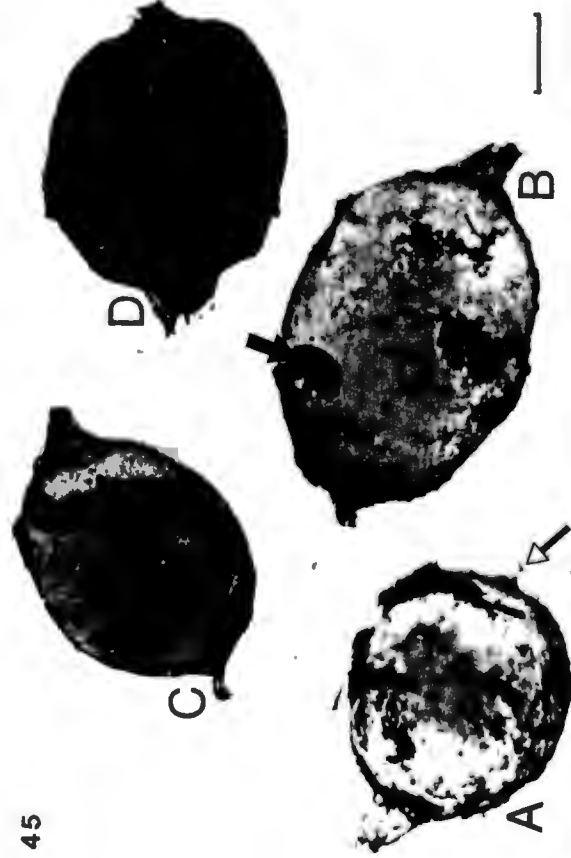
Heelwat histo- en biochemiese werk is nog nodig om inligting te verskaf ten opsigte van die samestelling van kokonne van die Oligochaeta.

3.3.1. Uitwendige kenmerke

Die kokonne van *D. veneta* is ovaalvormig met veselagtige punte (klossies) aan beide kante. Die een klos is egter meer gepunt (keëlvormig) terwyl die ander steelagtig is en die vesels daarvan soms teruggevou is sodat dit sambreelvormig vertoon (Figuur 45A, pyltjie). Hierdie kokonvorm kom ook voor by *A. chlorotica* en *E. fetida* (Evans & McL. Guild, 1947b).

Direk nadat die kokonne gevorm is, is hulle geelwit, sag, jellierig en vervorm maklik. In die meeste gevalle is die slymband nog teenwoordig maar namate die kokonne ouer word, verdroog en verdwyn die slymband en die kokonne word groen-geel. Na drie dae verander die kleur na ligbruin met donkerbruin punte (Figuur 45B) en soos wat die kokonne nog ouer word, verander die kleur na rooibruin. Die kokonne waarin bevrugting

45



46



47



Figuur 45. Fotomikrograaf van kokonne van *D. veneta*.
A - 'n Pasgevormde kokon. Die keëlvormige en sambreelvormige (pyltjie) klossies kan waargeneem word.
B - 'n Ouer kokon, met donkerder punte. Die embrio (pyltjie) is deur die kokonwand sigbaar.
C - 'n Ouer kokon met 'n groter embrio wat deur die wand sigbaar is.
D - 'n Onbevrugte kokon. Die kleur is donker en die wand ondeursigtig.
Skaal: 40 μ m

Figuur 46. Fotomikrograaf van 'n kokon van *D. veneta* in 'n miskapsule.
Skaal: 45 μ m

Figuur 47. Fotomikrograaf van 'n kokon waarin die embrio duidelik gesien kan word. Die spysverteringskanaal (svk) en segmentasie (pyltjie) kan waargeneem word.
Skaal: 25 μ m

nie plaasgevind het nie, word donkerbruin en ondeursigtig (Figuur 45D). Kokonne met embryos behou hul ligbruin kleur en die kokonwand en albumien word deursigtig sodat die embrio deur die wand sigbaar is (Figuur 47).

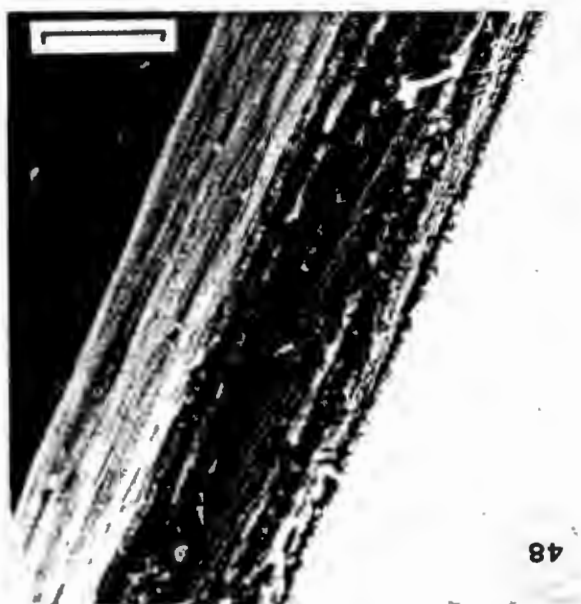
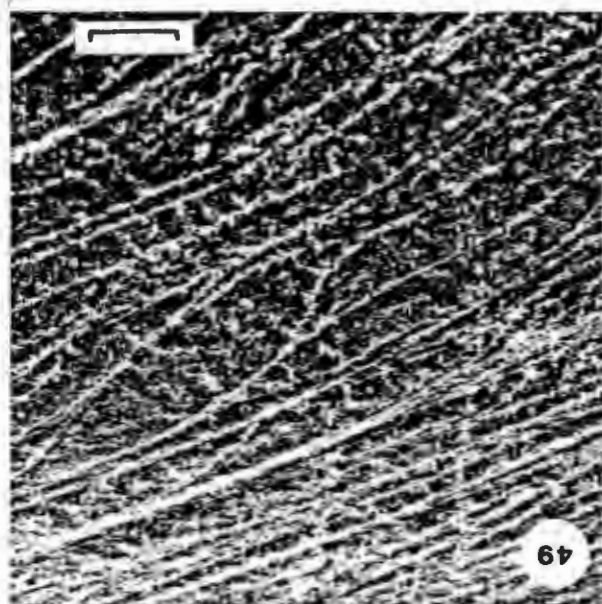
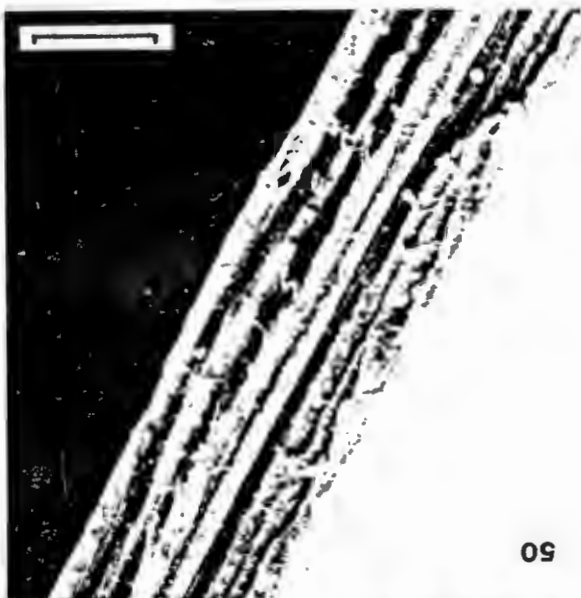
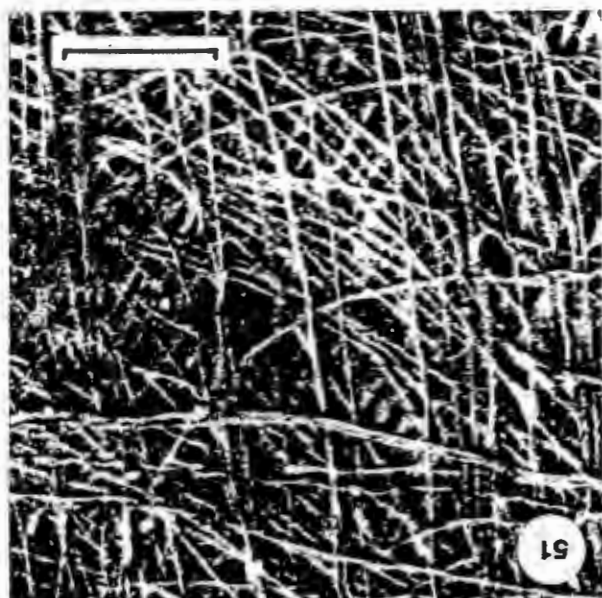
Die kokonwand is glad en in teenstelling met byvoorbeeld *E. eugeniae* (Reinecke & Viljoen, 1988), kleef hier slegs 'n klein hoeveelheid organiese partikels en gronddeeltjies aan die wand vas (Figuur 47). Waar die kokonne van *E. eugeniae* deur die organiese partikels en gronddeeltjies gekamoepeer word, word die ligkleurige kokonne van *D. veneta* gekamoepeer en beskerm deur 'n miskapsule (Figuur 46). Die miskapsules bestaan uit die gietsels van die wurms asook ander organiese deeltjies (Ramisch & Graff, 1985 en Viljoen, Reinecke & Hartman, 1991) en is by verskillende ander spesies waargeneem (Ramisch & Graff, 1985). Gewoonlik kom slegs een kokon per kapsule voor maar somtyds kan selfs drie of vier kokonne in so 'n kapsule aangetref word.

Die metings wat op die kokonne uitgevoer is, het die volgende ingesluit; die lengte, (dit strek oor die lengte vanaf die een klos na die ander maar sluit nie die klossies vesel aan beide kante in nie, omdat dit meer prominent by sommige is as by ander); die breedte en ook die massa. Die gemiddelde lengte van die kokonne was $4,89 \pm 0,05\text{mm}$ (omvang 3,1-6,4mm), die gemiddelde breedte $3,1 \pm 2,5\text{mm}$ (omvang 2,9-3,9mm) en die gemiddelde massa $25,5\text{mg} \pm 5,11\text{mg}$ (omvang 16,1 -40,8mg) vir die 100 kokonne wat ewekansig versamel is (Bylaag 1).

3.3.2. Ultramikroskopie

Soos reeds genoem, bestaan erdwurmkokonne uit 'n kokonmembraan wat 'n vloeibare, albumienagtige inhoud omring. Daar is veral klem gelê op die kokonwand tydens die ultramikroskopiese ondersoek.

Uit die ultramikroskopiese ondersoek en veral SEM-studies, is dit duidelik dat die



Figuur 48. SEM-mikrograaf van die kokonwand van 'n 1 dag oue kokon van *D. veneta*. Die verskillende lae kan nie so duidelik onderskei word nie.

Skaal: 10 μ m

Figuur 49. SEM-mikrograaf van die vesels van 'n 1 dag oue kokon van *D. veneta*. Die vesels kan nie duidelik van mekaar onderskei word nie, a.g.v. die teenwoordigheid van die matriks.

Skaal: 10 μ m

Figuur 50. SEM-mikrograaf van die kokonwand van 'n 45 dag oue kokon van *D. veneta*. Die verskillende lae kan duideliker van mekaar onderskei word.

Skaal: 10 μ m

Figuur 51. SEM-mikrograaf van die vesels van 'n 45 dag oue kokon van *D. veneta*. Die matriks het verweer en die vesels kan duideliker van mekaar onderskei word.

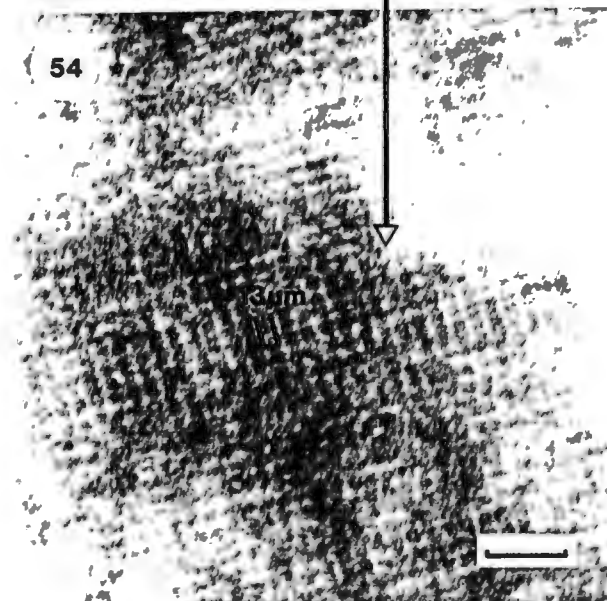
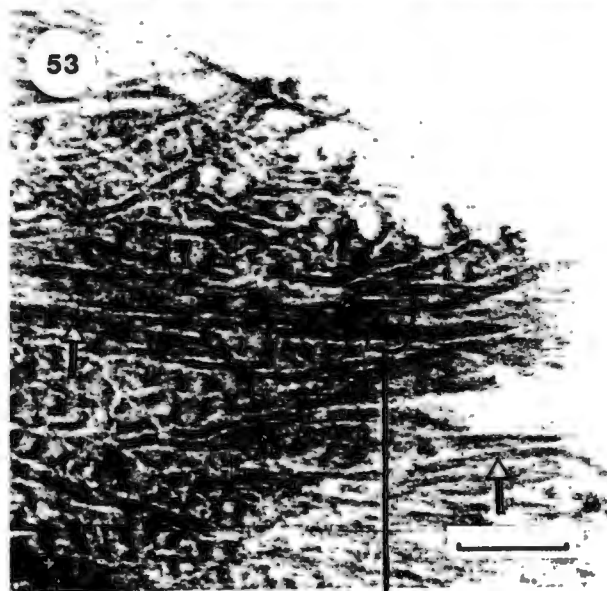
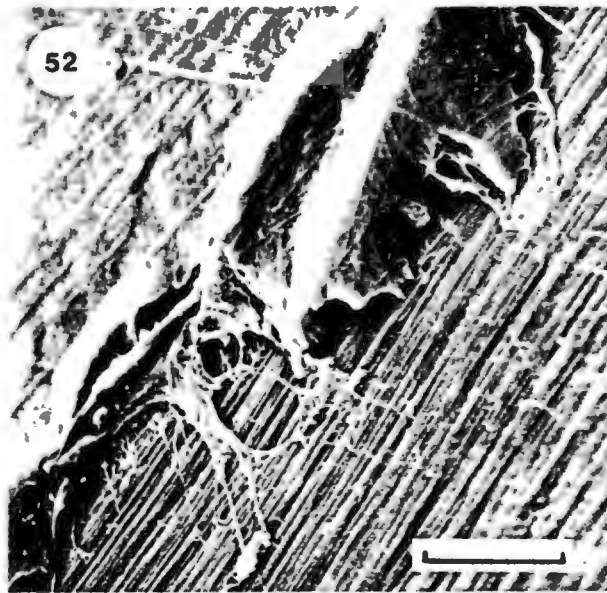
Skaal: 10 μ m

kokonwand uit verskillende lae bestaan (Figuur 48 & 50). Tot soveel as 7 lae kan waargeneem word (Figuur 50). Die deursnee van die kokonwand self varieer tussen 15,6 en 17,1 μm terwyl die deursnee van die onderskeie lae wissel tussen 0,95 en 1,9 μm . Tussen die kokonwandlae asook tussen die vesels waaruit die lae saamgestel is, is 'n matriks (bindmiddel) wat die lae en vesels bymekaar hou (Figuur 49 & 51).

In hierdie ondersoek (par 2.4) is onderskei tussen kokonne van twee verskillende ouderdomme (1 dag en 45 dae) om te bepaal of die struktuur van die kokonwand met die ouderdom van die kokon verander. Uit SEM-waarnemings is dit duidelik dat dit wel die geval is. In Figuur 48 word die wand van 'n een dag oue kokon getoon waarvan die lae nie duidelik van mekaar onderskei kan word nie. Die matriks wat die lae bymekaar hou, is nog sigbaar en dit lyk asof die lae op plekke ineenvloei. In die geval van die 45 dag oue kokonne, net voordat die jong wurmpie uitbroei, kan die verskillende lae duideliker van mekaar onderskei word (Figuur 50). Dit wil voorkom asof die matriks met die verloop van tyd verweer en verdwyn en die lae dan losser gerangskik is. Geen melding word in die literatuur gemaak van enige strukturele veranderinge van die kokonwand wat met toename in ouderdom van die kokon gepaard gaan nie.

Volgens die beskikbare literatuur is die deursnee van die kokonwand van *D. veneta* (15,6-17,1 μm) in ooreenstemming met die van *E. ferida* (20 μm) (Marcel *et al*, 1985) maar verskil heelwat van die varswater oligogeeet *T. hattai* (3 μm) (Suzutani-Shiota, 1980) en die bloedsuier *E. octoculata* (0,7 μm) (Knight & Hunt, 1974).

Die verskillende lae van die kokonwand bestaan uit ineengevlegde vesels (fibrille) (Figuur 51, 52 & 53) waarvan die rangskikking ooreenstem met die van die kollageen in die kutikula: die vesels van die verskillende lae vorm 'n hoek van 90° met mekaar en dit lyk volgens Figure 49 en 51 asof die voorkoms van die matriks tussen die vesels verander met 'n toename in die ouderdom van die kokon. In die geval van een dag oue kokonne kan die rangskikking van die vesels nie duidelik waargeneem word nie, as gevolg van die teenwoordigheid van die matriks (Figuur 49). In die geval van die 45 dag oue kokonne



Figuur 52. SEM-mikrograaf van die buitewand van 'n kokon van *D. veneta* om die orientasie van die fibrille aan te toon. Skaal: 10 μ m

Figuur 53. TEM-mikrograaf van 'n skuinssnit deur die kokonwand van *D. veneta*. Op hierdie mikrograaf word die rangskikking van die vesels (pyltjie) in die binnewand getoon. Skaal: 0,5 μ m

Figuur 54. 'n Vergroting van figuur 53. Dit dui die mikrobuisies waaruit die onderskeie vesels opgebou is aan. Die buisies is tussen 12 en 14nm in deursnee. Skaal: 0,1 μ m

is die rangskikking van die vesels wel waarneembaar as gevolg van die verwerking en verdwyning van die matriks (Figuur 51).

Die deursnee van die vesels in die kokonwand van *D. veneta* wissel van 0,27 - 0,4 μm en is dikker as die van *E. fetida* wat wissel tussen 0,13 μm in die binne- en 0,28 μm in die buitewand van die kokon (Marcel *et al*, 1985). Dit verskil heelwat van die van *T. hattai* (50nm) (Suzutani-Shiota, 1980) en *E. octoculata* (400 Å) (Knight & Hunt, 1974).

In die geval van baie hoë vergrotings (105 000 X) lyk dit asof die onderskeie vesels verder saamgestel is uit mikrobuisies (tubules) (Figuur 54). Die deursnee van die mikrobuisies in die geval van *D. veneta* wissel tussen 11 en 14 nm. Dit stem ooreen met die van *E. fetida* (10-12nm) (Marcel *et al*, 1985). In die kokonwand van die bloedsuier *E. octoculata* het Knight & Hunt (1974) waargeneem dat die lae waaruit die kokonwand opgebou is, bestaan uit wat genoem word, silindriese matriks-eenhede en gebande fibrille wat weer uit buisagtige eenhede saamgestel is. 'n Kokonwandlaag is dus opgebou uit verskillende van hierdie eenhede, waarvan die oriëntasie van die fibrille en matrikseenhede verander tussen opeenvolgende lae. Geen matrikseenhede of spesifieke oriëntasie van vesels is in die kokonwand van *D. veneta* opgemerk nie.

In die geval van die volgende vier anneliedspesies nl: *D. veneta* (huidige ondersoek) en *E. fetida*, *T. hattai* en *E. octoculata* (literatuur) is inligting oor die kokon ultrastruktuur bekend. Drie van die spesies val in die klas Oligochaeta terwyl *E. octoculata* onder die klas Hirudinea (bloedsuiers) sorteer. Uit die drie oligoëet spesies val twee in die familie Lumbricidae terwyl *T. hattai* aan die familie Tubificidae behoort. Die kokonvorming van al vier hierdie spesies vind op min of meer dieselfde manier plaas. Die kokonvorming van die erdwurmspesies vind in en op die grond plaas terwyl kokonne van *T. hattai* op die bodem van riviere en strome, tussen die sand gevorm word en die van *E. octoculata* onder klippe in strome en riviere.

Uit die ultrastrukturele ondersoek kan die afleiding gemaak word dat daar meer ooreenkomste as verskille tussen hierdie spesies voorkom. Die verskil in habitat tussen hierdie vier spesies was dan ook verantwoordelik vir die grootste ultrastrukturele verskil, naamlik dat die deursnee van die kokonwande van die twee terrestriële spesies veel meer is as die van die akwatiese spesies. Die belangrikheid hiervan is redelik voor die hand liggend, naamlik: beskerming teen waterverlies. Hierdie funksie van die kokonne word dan ook deur Ramisch & Graff (1985) as die belangrikste funksie van die kokon beskou.

Die kokonwande van die vier spesies bestaan uit vesels wat saamgestel is uit mikrobuisies. Die rangskikking van die vesels (naamlik met 'n hoek van 90° met mekaar) kom by al vier spesies voor terwyl 'n spiraalvormige rangskikking van die vesels om die kokon in die geval *E. octoculata* (Knight & Hunt, 1974) en *E. fetida* (Marcel *et al*, 1985) voorkom. Dit is nie by *D. veneta* waargeneem nie en word nie by *T. hattai* bespreek nie.

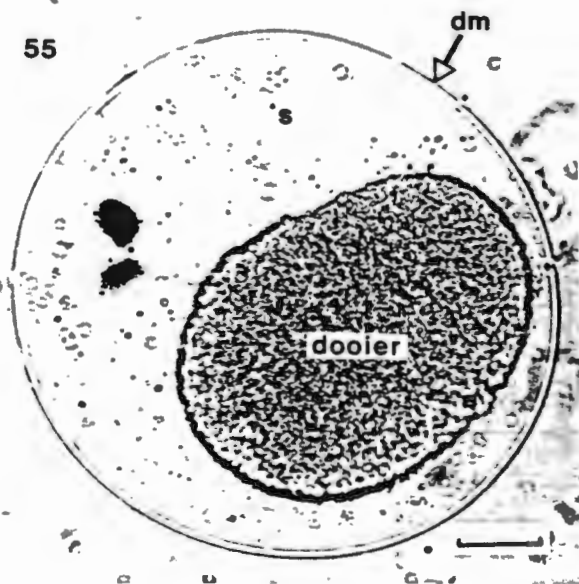
3.4. EMBRIOLOGIE

Navorsing in hierdie verband is reeds in die vorige eeu deur Wilson(1889) gedoen. Navorsing wat tans onderneem word, het ten doel om 'n aantal fundamentele vrae op te los (Storey, 1989 a & b) of konsentreer op eksperimentele werk met gifstowwe (DeVriès, 1979 & 1988). Soos reeds in die inleiding genoem, is die doelwit van die huidige ondersoek nie om 'n gedetailleerde weergawe van die embriologiese prosesse die geval van die *D. veneta* te beskryf nie, maar was om spesifieke kenmerke van die embrio aan 'n bepaalde ouderdom te koppel. Die klem het geval op eksterne eienskappe wat maklik deur ligmikroskopie of elektronmikroskopie waargeneem kan word, soos die ontwikkeling van segmentasie en die mondgebied met gepaardgaande siliumband.

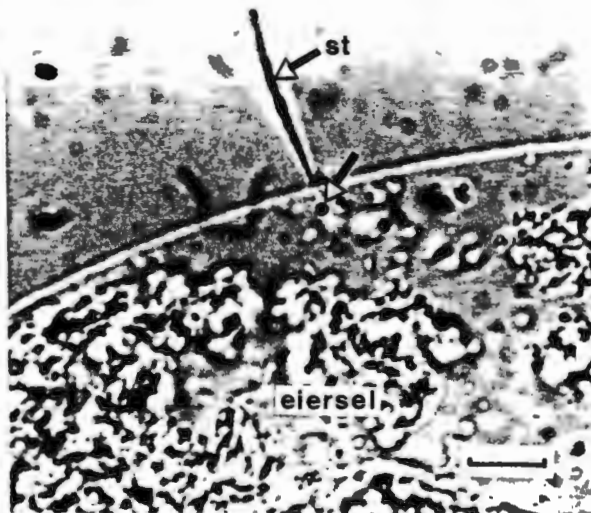
3.4.1. Eierselle

Die eierselle word tydens kokonvorming in die kokon geplaas (Stephenson, 1930). Nadat die kokonwand met 'n tangetjie oopgeskeur is, is die vloeibare albumien waarin die

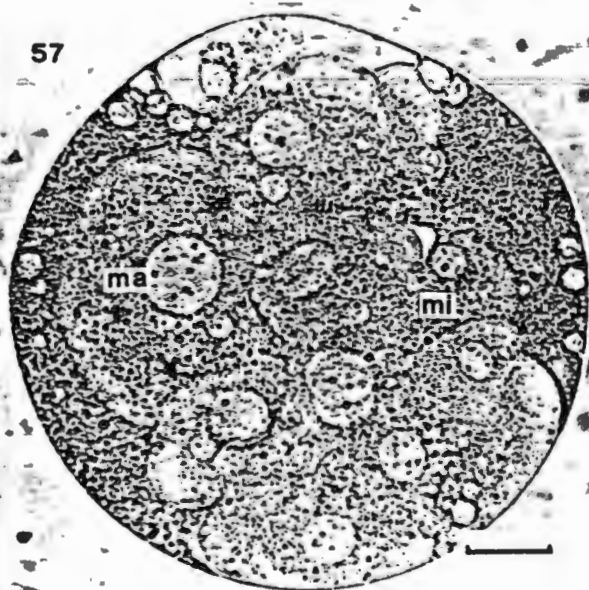
55



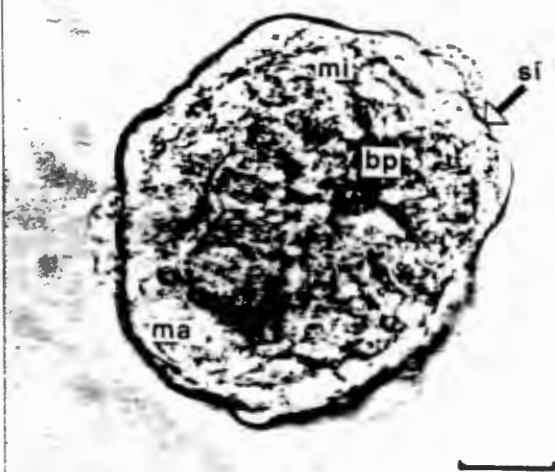
56



57



58



59



Figuur 55. Fotomikrograaf van 'n eiersel van *D. veneta*. Die dooiermembraan (dm) omring die helder sitoplasma (s). Die dooier is nie eweredig versprei nie.
Skaal: 10 μ m

Figuur 56. Fotomikrograaf van bevrugting by *D. veneta*. Die stert (st) van die sperm kan gesien word waar dit die eiersel binnedring (pyltjie).
Skaal: 2 μ m

Figuur 57. Fotomikrograaf van die 10-16 sel stadium. Die mikromere (mi) en makromere (ma) wat tipies van hierdie stadium is, kan waargeneem word.
Skaal: 14 μ m

Figuur 58. Fotomikrograaf van die vroeë gastrula van *D. veneta*. Die blastoporie (bp), mikromere (mi), makromere (ma) en siliums (si) kan waargeneem word.
Skaal: 10 μ m

Figuur 59. Fotomikrograaf wat die rotasiebewegings van die vroeë gastrula van *D. veneta* aantoon.
Skaal: 10 μ m

eierselle ronddryf (gesuspendeerd is) toegelaat om uit te loop. Die eierselle het 'n silwerwit kleur en daar kom tussen een, en dertig eierselle per kokon voor. Alhoewel so 'n groot aantal eierselle voorkom, is daar nooit meer as een embrio per kokon aangetref nie. By *E. ferida* is daar tussen tien en sestig eierselle voor maar net tussen twee en ses embryos word aangetref (Stephenson, 1930). Venter & Reinecke (1988 a) het tot nege nakomelinge by *E. ferida* getel.

Die eierselle is effens ovaalvormig (Figuur 55) en ongeveer 200 μm in deursnee. Hulle is effens groter as die van *E. ferida* (100-120 μm) maar kan volgens Anderson (1973), wanneer hulle vergelyk word met die groot eierselle van *Tubifex* (300-500 μm), *Rhynchelmis* (1000 μm) en *Glossiphonia* (500-1000 μm), as klein geklassifiseer word. Volgens Anderson (1973) lê al die Clitellata, uitgesonderd die Tubificidae en die Lumbriculidae, klein eiers met min dooier. Gedurende die embrioniese ontwikkeling word die omringende albumien as belangrikste bron van voedsel gebruik. Verder bevind Anderson (1973) dat die wyse van ontwikkeling van die Clitellata, en spesifiek die erdwurms, bewys lewer van die sekondêre reduksie van die dooier en die reduksie in die grootte van die eier, wat gepaard gaan met die ontwikkeling van 'n verskeidenheid van tydelike voedingsorgane (onder andere die siliumband) in die embrio. Hierna word later weer verwys (par 3.4.4.).

Die eiersel word omring deur 'n vitellienmembraan (dooiermembraan) wat aanvanklik teen die helder sitoplasma lê maar later daarvan wegtrek (Figuur 55). Die helder sitoplasma besit klein dooierglobules en granules wat die deursigtigheid daarvan slegs gedeeltelik belemmer. Die dooier is nie eweredig deur die sitoplasma versprei nie (Figuur 55).

3.4.2. Bevrugting

Bevrugting is na 48 uur by eierselle van *D. veneta* waargeneem (Figuur 56). Volgens Stephenson (1930) vind bevrugting by die Oligochaeta egter plaas sodra die sperms in die

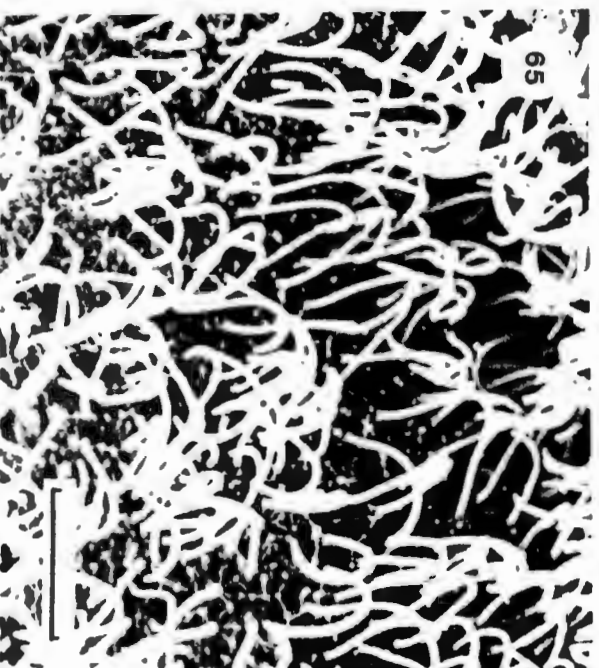
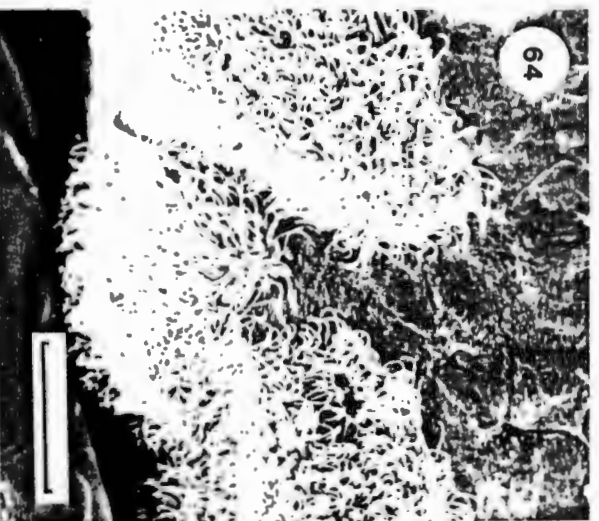
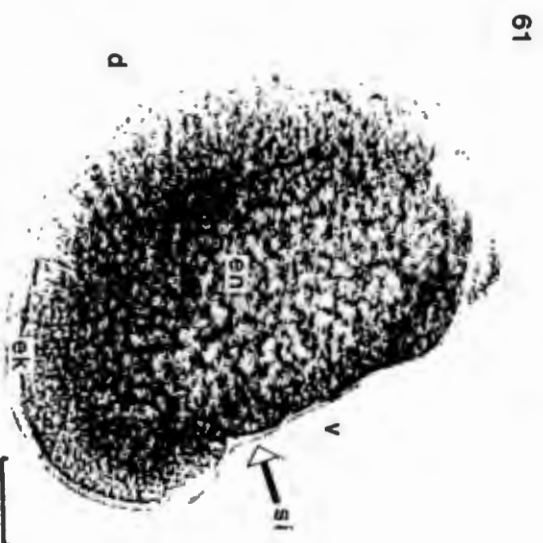
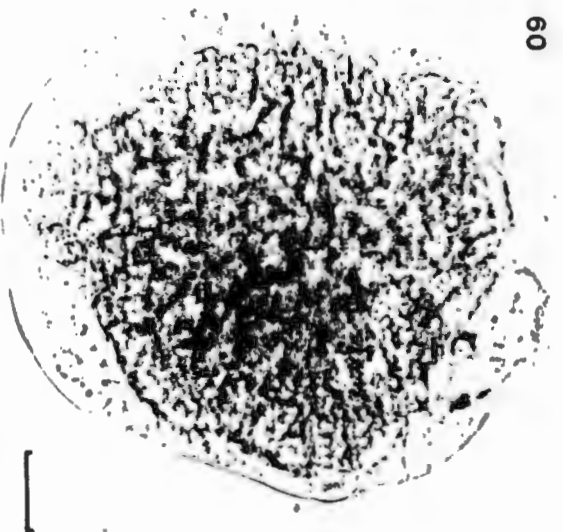
kokon toegang tot die eiersel kry. Die sperms word uit die spermateka vrygestel soos wat die kokon voorwaarts oor die anterior segmente beweeg. Die sperms kon dus reeds die eiersel binnegedring het teen die tyd wat die kokon gedeponeer is (Stephenson, 1930). Volens Stephenson (1930) kom polispermie by die Oligochaeta voor en kan tot nege sperms binne die eiersel aangetref word. Hierdie waarneming word in die huidige ondersoek bevestig deurdat al die kere wat bevrugting waargeneem is, daar meer as een sperm die eiersel binnegedring het.

3.4.3 Kliewing

Volgens Anderson (1973) kom 'n gewysigde *Tubifex*-kliewing by erdwurms voor, dit is; 'n gewysigde vorm van spiraalkliewing. Die bestemming van die blastomere is bekend omdat die kliewing bepaald is. Die posisie van elke blastomeer kan gevolg word tot by die besondere weefsel of orgaan waaraan dit oorsprong in die volwassene gee. Die eerste deling is ongelyk en een groot en een klein sel word gevorm. Hierdie eerste deling is nie by *D. veneta* waargeneem nie maar is volgens DeVriès (1979) by *E. fetida* binne ses uur voltooi en 100-130 μm in deursnee. Die daaropvolgende delings vind met 'n sekere mate van variasie plaas tot en met die 7- of 8-sel stadium wat uit twee groot en ewe groot selle, tweemiddelslag en ewe groot selle en drie of vier klein selle bestaan (Stephenson, 1930 & Anderson 1973). Vanaf hierdie stadium is dit moeilik om met 'n mate van sekerheid die verdere delings te volg.

Die volgende stadium, 10-16 sel stadium, is by *D. veneta* na 120 uur (5 dae) waargeneem (Figuur 57). Hierdie stadium word deur DeVriès (1979) ook die jong blastula genoem en is by *E. fetida* na 96 uur voltooi. Tydens hierdie stadium kan die mikro- en makromere, wat tipies is van oneweredige delings, waargeneem word (Figuur 57).

Die volgende stadium wat waargeneem is, is die vroeë gastrula (Figuur 58 & 59). Volgens DeVriès (1979) word hierdie stadium in die geval van *E. fetida* na twee dae



Figuur 60. Fotomikrograaf van een van die eerste stadiums van gastrulasie.
Skaal: 12 μ m

Figuur 61. Fotomikrograaf van 'n 10 dag oue embrio. Die embrio begin konkaaf word aan die ventrale kant (v). Die ekto-(ek) en endoderm (en) kan waargeneem word. Siliums (si) kom op die ventrale oppervlak voor. d - dorsaal.
Skaal: 10 μ m

Figuur 62. Fotomikrograaf van 'n 10-15 dag oue embrio. Die beginstadiums van die stomodeum (st) en prostomium (pr) kan waargeneem word.
v - ventraal, d - dorsaal. Skaal: 100 μ m

Figuur 63. SEM-mikrograaf van die selfde 10-15 dag oue embrio as in figuur 62. Die stomodeum (st) en prostomium (pr) sowel as die siliumband (pyltjie) kan waargeneem word.
Skaal: 50 μ m

Figuur 64. 'n Hoër vergroting van die siliumband op die ventrale oppervlak van die embrio.
Skaal: 20 μ m

Figuur 65. 'n Hoër vergroting van die siliums om die vorm daarvan aan te toon.
Skaal: 4 μ m

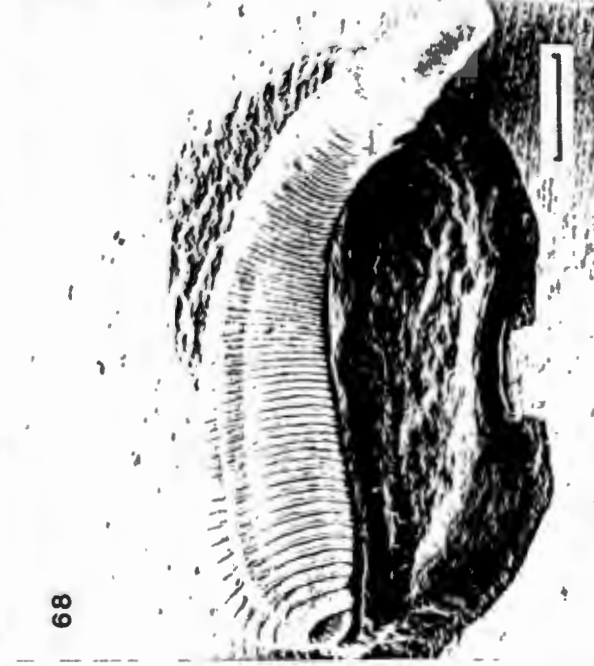
bereik en is dit ongeveer 150 μm groot. In die geval van *D. venera* is dit na agt dae waargeneem. Die blastoporie wat die blastoseel met die buite omgewing verbind, asook die mikro- en makromere kan onderskei word (Figuur 58). Die vroeë gastrula voer gedurig stadige rotasiebewegings uit (Figuur 59) wat deur die deursigtige kokonwand sigbaar was. Hierdie rotasiebewegings word veroorsaak deur siliums wat in die omgewing van die blastoporie aanwesig is. Die funksie van die siliums kom in die volgende embrionale stadiums duidelik na vore.

3.4.4. Gastrulasie

Na nege dae begin die blastula afplat en effens verleng en dui die eerste stadiums van gastrulasie aan (Figuur 60). Volgens Stephenson (1930) en DeVriès (1979) vind hierdie afplatting tussen drie en drie en 'n half dae in die geval van *E. fetida* plaas. Dit dui die begin van gastrulasie aan maar die tempo van ontwikkeling varieer geweldig met temperatuur, voeding en ook tussen verskillende individue (Stephenson, 1930).

Na tien dae is die embrio nog meer afgeplat en verleng en begin konkaaf word aan die ventrale kant (Figuur 61). Op hierdie stadium kan reeds onderskei word tussen die ektoderm en endoderm. Geen aanduiding van segmentasie word nog waargeneem nie. 'n Siliumband kom op die ventrale oppervlak van die embrio voor en voer albumien oor die embrio. Die embrio beweeg nou ook meer vrylik in die albumien binne in die kokon rond. Volgens DeVriès (1979) word hierdie stadium by *E. fetida* na ongeveer ses dae waargeneem en is ongeveer 400-500 μm lank.

Die funksie van die siliums is heelwaarskynlik om as tydelike voedingsorgaan te dien aangesien die dooier gereduseer is en die embrio op albumien as voedsel aangewese is. Die siliums verdwyn later soos wat die farinks ontwikkel en die embrio (jong wurm) self albumien kan inneem (Anderson, 1973). 'n Ander funksie van die siliums, gekoppel aan die van voeding, mag wees om die embrio in die kokon te laat rondbeweeg of om die albumien te meng om sodoende suurstof en voedingstowwe eweredig te versprei.



Figuur 66. SEM-mikrograaf van 'n 15-20 dag oue embrio om die eerste stadiums van segmentasie asook die siliumband (pyltjies) op die ventrale oppervlak aan te toon. Skaal: 100 μ m

Figuur 67. SEM-mikrograaf van 'n vergroting van figuur 66 om die siliumband en segmentasie aan te toon. Skaal: 40 μ m

Figuur 68. SEM-mikrograaf van 'n 20-30 dag oue embrio van *D. veneta*. Skaal: 400 μ m

Figuur 69. SEM-mikrograaf van die stertgedeelte van die 20-30 dag oue embrio. Hierdie gedeelte is nog nie volledig ontwikkel nie en segmentasie kan nie waargeneem word nie. Skaal: 33 μ m

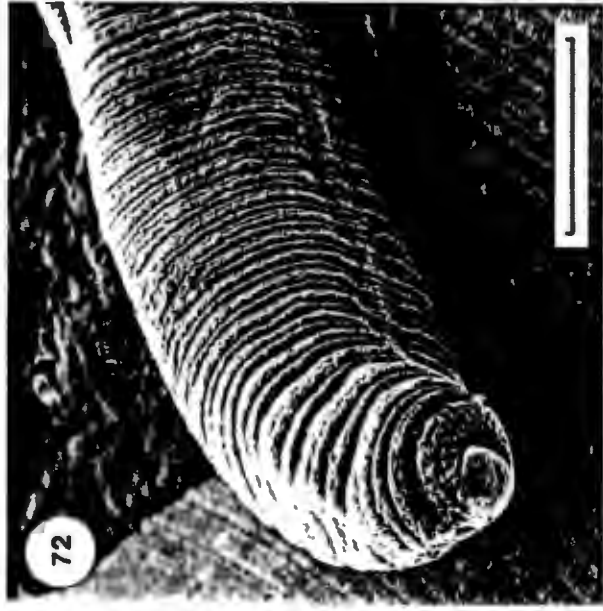
Figuur 70. SEM-mikrograaf van die voorste gedeelte van die 20-30 dag oue embrio. Die prostomium (pr) en peristomium(pe) asook die gebroke siliumband (si) kan waargeneem word. Die segmente word onderverdeel deur een of meer sekondêre groewe (pyltjies). Skaal: 100 μ m

Figuur 71. SEM-mikrograaf van die onderbroke siliumband van die 20-30 dag oue embrio. Skaal: 100 μ m

Aangesien die Oligochaeta geen larwale vorm in hul ontwikkeling het nie, mag die siliums en bewegingspatroon van die gastrula 'n oorblyfsel wees van die trogofoorlarf wat nog by die orde Polychaeta aanwesig is. Die Polychaeta word as 'n voorvader van die Oligochaeta beskou (Storer *et al*, 1979). By hierdie groep vind bevrugting in die see plaas en die sigoot ontwikkel in 'n peervormige trogofoorlarf wat siliums besit en vryswemmend is (Storer *et al*, 1979).

Na 'n ontwikkelings tydperk van tussen tien en vyftien dae word die beginstadiums van die stomodeum en prostomium waargeneem (Figuur 62 & 63). Stephenson (1930) beskryf volledig hoe die stomodeum eers uit die ektodermse begin vorm en dan later by die endodermse aansluit namate die embrio ouer word. Daar is egter hier nie klem gelê op inwendige ontwikkeling nie. Siliums kom in 'n aaneenlopende band op die ventrale oppervlak (Figuur 63) voor, maar kan nie op ligmikrograwe waargeneem word nie. Die vorm van die siliums word in Figuur 64 & 65 aangetoon.

Tussen vyftien en twintig dae kan die eerste stadiums van segmentasie waargeneem word (Figuur 66 & 67). Die stomodeum en prostomium is meer volledig ontwikkel. 'n Duidelik aaneenlopende band siliums kom vanuit die stomodeum (anterior) tot heel posterior voor. Volgens Anderson (1973) ontstaan daar in albumienvoedende embryos, soos erdwurmembrios, 'n vroeë funksionele farinks wat met silia uitgevoer word. Hierdie is 'n voorlopige farinks wat gedurende gastrulasie gevorm word en dien om die omringende albumien te ingesteer maar word later verander of vervang deur die volwaardige farinks (Anderson, 1973). Soos in die volgende ontwikkelingsfase (tussen 20 en 30 dae) (Figuur 68) waargeneem is, word die siliumband op die ventrale oppervlak meer gebroke en minder dig (Figuur 70 & 71). Dit gaan gepaard met die volledige ontwikkeling van die peristomium of eerste liggaamsegment en die prostomium, 'n lob wat oor die mondopening hang (Figuur 74). Daar word vermoed dat die vermindering van die siliums op die ventrale liggaamsoppervlak saamhang met die ontwikkeling van die mondopening, farinks en spysverteringskanaal. Namate hierdie organe meer volledig ontwikkel en sterker word, neem dit die funksie van voedselverkryging oor wat aanvanklik deur die siliums verrig is.



Figuur 72. SEM-mikrograaf van 'n embrio ouer as 30 dae. Die afgebroke siliumband (pyltjie), kan waargeneem word. Skaal: 400 μ m

Figuur 73. SEM-mikrograaf van die afgebroke en yl verspreide siliumband (pyltjie) van 'n embrio ouer as 30 dae. Skaal: 100 μ m

Figuur 74. SEM-mikrograaf van 'n volledig ontwikkelde epilobe prostomium van *D. veneta*. Die sensoriese papille op die mondgebied kan waargeneem word (pyltjies). Skaal: 200 μ m

Figuur 75. SEM-mikrograaf van 'n volledig ontwikkelde embrio van *D. veneta* in 'n kokon. Die ventrale bloedvat (pyltjie) kan deur die kokonwand waargeneem word. Skaal: 15 μ m

In hierdie stadium van ontwikkeling (20-30 dae) is die segmentasie meer volledig (Figuur 71), behalwe in die stertgebied (Figuur 69).

Vanaf 30 dae en tot en met die stadium wat uitbroei plaasvind, neem die jong wurm in grootte toe en alle organe ontwikkel volledig. Kenmerke van die wurm wat uitwendig waargeneem word en wat in hierdie laaste stadium van ontwikkeling plaasvind (Figuur 72) is die volgende: Die segmentasie ontwikkel volledig terwyl sommige segmente onderverdeel word deur een of twee sekondêre groewe (Figuur 70). Volgens Edwards & Lofty (1972) is hierdie groewe oppervlakkig en word nie in die inwendige anatomie gereflekteer nie.

Die volgende eienskap wat volledig ontwikkel is die stomodeum, prostomium en peristomium. Figuur 74 toon aan hoe 'n volledig ontwikkelde, epilobe prostomium lyk. Sensoriese papille kan op die pro- sowel as peristomium waargeneem word (Figuur 74, pyltjies). Die peristomium is ook reeds volledig ontwikkel. Die siliums wat in vroeër stadia in 'n aaneenlopende band voorgekom het, is nou afgebroke, minder dig en kom yl verspreid voor (Figuur 73).

Die volledig ontwikkelde embrio kan duidelik deur die wand van die kokon waargeneem word (Figuur 75). Die spysverteringskanaal en segmentasie is duidelik in figuur 47 en die bloedvatstelsel kan in figuur 75 waargeneem word.

4. SAMEVATTENDE OPSOMMING

Voortplanting is gerig op die behoud van lewe op aarde. Dit verseker kontinuïteit van 'n spesie en bring dikwels verskeidenheid en variasie mee. Sukses in voortplanting is die uiteindelijke kriterium vir volgehoue bestendigheid van 'n spesie. In die geval van erdwurms speel voortplanting en veral vermeerdering 'n belangrike rol by die gebruik van groot getalle erdwurms vir vermikompostering en om as proteïenbron te dien.

In hierdie studie is ondersoek ingestel na veral drie aspekte van voortplanting in die geval van die erdwurmspesie *D. veneta*.

Die eerste aspek wat ondersoek is, is 'n sekondêre geslagskenmerk van die Oligochaeta naamlik die klitellum. Hierdie struktuur is met die normale liggaamsepidermis vergelyk en daar is waargeneem dat dit 2-3 maal dikker is as die epidermis. Die normale liggaamsepidermis is saamgestel uit dieselfde weefsel tipes as die klitellum behalwe vir die teenwoordigheid van die fyn granulêre selle wat slegs in die klitellum voorkom. Die klitellum is saamgestel uit ondersteunende selle en vier tipes klierselle, naamlik die groot granulêre selle, die fyn granulêre selle en die orto- en metachromatiese selle waarvan twee tipes slym afskei. Die onderskeie klierselle vervul verskillende funksies wat reeds in die literatuur beskryf is. Die fyn granulêre selle in die klitellum sekreteer die voedende vloeistof waarvan die embrio tydens ontwikkeling leef. Die groot granulêre selle in die normale liggaamsepidermis sekreteer 'n visko-elastiese slym wat 'n rol speel tydens voortbeweging terwyl hierdie selle in die klitellum verantwoordelik is vir die sekretering van die kokonwand. Die funksies van die meta- en ortochromatiese slymselle in die normale liggaamsepidermis is onderskeidelik die sekresie van die slymfilm waardeur respirasie plaasvind en die sekresie van slym wat 'n rol speel tydens beweging en moontlik mag funksioneer as feromoonmeganisme (Richards, 1973, 1974 b & c). Die orto- en metachromatiese slymselle in die klitellum sekreteer die slym wat die kopulerende wurms omring asook die slymband wat om die kokon voorkom, pas nadat dit gevorm is (Grove

& Cowley, 1927). Alhoewel die resultate van die histochemiese kleurings en ultrastrukturele ondersoek met reeds bekende inligting wat in die literatuur beskryf is vergelyk is, kan daar nie in die huidige studie met sekerheid funksies aan spesifieke klierselle toegeken word nie. Meer werk is nog in hierdie verband nodig.

Verder word die klitellum en normale liggaamsepidermis deur 'n kutikula bedek. Die kutikula van *D. veneta* bestaan uit 7-8 lae kollageenvesels wat 'n ortogonale rangskikking toon. Die liggaamsepidermis en klitellum word distaal deur 'n basaalmembraan begrens wat die epidermisweefsel van die spierweefsel skei. Die basaalmembraan is ook saamgestel uit kollageenvesels, wat, anders as in die geval van die kutikula, geband is. Na die bestudering van die normale liggaamsepidermis en die klitellumweefsel van *D. veneta*, is 'n noue ooreenstemming waargeneem tussen hierdie weefsels en die normale liggaamsepidermis en klitellumweefsel van ander oligoheet- en anneliedvorme wat in die literatuur beskryf is (Mill, 1978; Jamieson, 1981 en Richards, 1984).

Die klitellum as geslagskenmerk is soos genoem, gekoppel aan die vorming van die kokon wat dan ook die tweede aspek van ondersoek was. Klem is veral gelê op die ultrastrukturele struktuur van die kokonwand en daar is waargeneem dat die voorkoms van kokonne verander namate ouer word. Namate hulle ouer word, het hulle 'n meer verweerde voorkoms aangeneem maar geen verandering in dikte is waargeneem nie. Die kokonwand wat tussen 15,6 en 17,1 μm dik is, is saamgestel uit sewe lae, elk tussen 0,95 en 1,9 μm in deursnee. Die onderskeie lae is saamgestel uit ineengevlegde vesels wat 'n ooreenkoms met die ortogonale rangskikking van die kutikula-kollageen vertoon. Die vesels is weer opgebou uit mikrobuisies, elk tussen 11 en 14 μm in deursnee. Daar is ook getoon dat die kokonwande van die terrestriële oligoheetvorme nl *D. veneta* en *E. fetida*, dikker is as die van die akwatiese spesies *Tubifex* en *Erpobdella*. Dit mag dui op die mate van beskerming teen uitdroging wat die kokonwand aan die embryo bied.

Die volledige embrionale ontwikkeling van *D. veneta* geskied by 25°C tussen 15 en 80 dae

met 'n gemiddeld van 42 dae (Viljoen, Reinecke & Hartman, 1991). Dit is veel stadiger as die 23 dae van *E. fetida*, (Venter & Reinecke, 1988 a), die 18,7 dae van *P. excavatus*, (Hallat, Reinecke & Viljoen, 1990) en die 16,6 dae van *E. eugeniae*, (Viljoen & Reinecke, 1989). By 15°C wat kenmerkend van die organisme se natuurlike habitat in Europa is, neem die embrionale ontwikkeling nog langer, naamlik 71 dae. Dit wil dus voorkom asof 'n lang embrionale ontwikkeling 'n inherente eienskap van hierdie organisme is. Dit is egter onduidelik waarom daar so 'n groot variasie by die inkubasieperiode voorkom (15-80 dae) en waarom embryos, wat op die oog af volledig ontwikkel blyk te wees, nie uitbroei nie. Hierdie verskynsel is waargeneem toe 15 volledig ontwikkelde embryos kunsmatig met 'n tangetjie en tungstennaald uitgebroei is en in beesmismedium geplaas is. Dertien van die embryos het oorleef tot volwassenes.

Tydens die embrionale gedeelte van die ondersoek is daar veral gekonsentreer op die ontwikkeling van segmentasie en die mondgebied met gepaardgaande siliumband. Die teenwoordigheid van 'n duidelike siliumband op die ventrale oppervlak van die embryo is waargeneem. Die siliumband hou verband met die voeding van die jong embryo en verdwyn namate die spysverteringskanaal volledig ontwikkel.

Die resultate van hierdie studie gee 'n duideliker beeld van drie aspekte van voortplanting by *D. veneta* in besonder en lewer 'n bydrae tot die kennis van erdwurms in die algemeen. Die resultate kan verder nuttig gebruik word om die effek van omgewingskontaminante daarop te bepaal en alhoewel dit buite die doelstellings van die studiegebied val, kan die volgende afleidings gemaak word.

Die benutting van ultrastrukturele veranderinge om die teenwoordigheid en invloed van subletale gifstofvlakke waar te neem, word bemoeilik deurdat tydens TEM-ondersoeke waargeneem is dat verskillende sneë van dieselfde klitellumweefsel onderling verskil as gevolg van faktore soos: fiksering, snitdikte, hoek van snit en kleuring. 'n Bydraende faktor wat die waarneming van die invloed van subletale gifstofvlakke bemoeilik, is dat dit nie altyd moontlik is om sneë op presies dieselfde plek by verskillende organismes te

maak nie. Die bepaling van die kwantitatiewe invloed van die gifstof word dus hierdeur bemoeilik. Hierdie stelling word ondersteun deur voorlopige eksperimente wat in ons laboratorium met *E. eugeniae* uitgevoer is waar waargeneem is dat hierdie tipe variasie ten opsigte van voorkoms byvoorbeeld by die kerne aangetref word. Hierdie variasie bemoeilik die maak van sinvolle afleidings. Daarom is die benutting van ultrastrukturele verandering van die klitellumweefsel nie baie geskik om die invloed van subletale gifstofvlakke aan te toon nie.

Die vorming van kokonne daarenteen is afhanklik van die normale funksionering van die klitellum. Al kan die invloed van die subletale vlakke van die gifstof op die klitellum nie bepaal word nie, kan die invloed daarvan moontlik in die kokonne waargeneem word. Nie net die kokonne nie maar ook die embriologiese ontwikkeling blyk geskik te wees vir omgewingstoksikologiese ondersoeke. Beide bogenoemde moontlikhede word ondersteun deur navorsing van Venter & Reinecke (1988 b) met *E. fetida* wat aangedui het dat kokonne, getal nakomelinge per kokon en biomassa van pas uitgebroeide wurms deur die gifstof beïnvloed word. Na aanleiding van DeVries (1988) word segmentasie van *E. fetida*-embrios beïnvloed deur azasitidien. Die moontlikheid dat *D. veneta*-embrios ook deur omgewingskontaminante beïnvloed mag word bestaan dus. Hierdie voortplantingseienskappe van *D. veneta* kan moontlik met sukses as eienskap tydens omgewingstoksikologiese ondersoeke benut word.

Uit hierdie ondersoek blyk dit dus dat die volgende bydraes gemaak is om bestaande leemtes ten opsigte van voortplantingsaspekte van *D. veneta* in besonder en erdwurms in die algemeen op te klaar.

1. Tydens die ondersoek van die klitellumweefsel van *D. veneta* is gevind dat dit nou ooreenstem met die weefseltipes van ander oligoete en sommige anneliede wat reeds in die literatuur beskryf is. Die weefsel word nie as baie geskik beskou vir die bepaling van die invloed van subletale gifstofvlakke daarop nie.

2. Lig- en ultramikroskopiese waarnemings van die kokonne van *D. veneta* het onderskeidende kenmerke aan die lig gebring waarvolgens kokonne geïdentifiseer kan word.
3. Die bepaling van die spesifieke ouderdom van 'n embrio is moontlik deur te kyk na die stadium van ontwikkeling van segmentasie en die mondgebied met gepaardgaande siliumband.
4. Die resultate van hierdie ondersoek kan as basisdata dien vir omgewingstoksikologiese ondersoeke mits die eksperimente tekortkominge oorbrug kan word.

Gedeeltes van hierdie werk is by nasionale en internasionale kongresse aangebied.

Hartman, L.E., Viljoen, S.A. & Reinecke, A.J. 1991. The formation, structure and embryogenesis of cocoons of *Dendrobaena veneta* (Oligochaeta). Plakkaatvoordrag. Dierkunde vereniging van Suid-Afrika simposium. Stellenbosch : Suid-Afrika.

Viljoen, S.A., Reinecke, A.J. & Hartman, L.E. 1992. The formation, structure and embryogenesis of cocoons of *Dendrobaena veneta* (Oligochaeta). Plakkaatvoordrag. XI International colloquium on soil zoology. Javäskylä : Finland.

5. ABSTRACT

A microscopical and ultramicroscopical study on aspects of reproduction of Dendrobaena veneta (Oligochaeta).

Reproduction is aimed at maintaining life on earth. When reproduction as a population characteristic is studied, one first has to understand the reproductive processes of the species being studied. The main aim of this study was to determine some of the reproductive structures and processes of *D. veneta*. All the processes which are mentioned were either studied microscopically and/or ultramicroscopically.

The first reproductive structure of *D. veneta* that was studied was the clitellum. The epithelium of the clitellum is some 2-3 times thicker than that of the rest of the epidermis. Although the clitellum epithelium is thicker, the normal epidermis has the same structure and cells, except for the fine granular cells which only occur in the clitellum. The clitellum epithelium consists of supporting cells, mucous cells and glandular cells overlain by a thin cuticle. Four types of glandular cells were observed: large granular cells; fine granular, proteinaceous cells; orthochromatic and metachromatic mucous cells.

The cocoons were also studied. The formation of cocoons is characteristic of all Oligochaeta. The cocoons are formed by the hardening of secretions by the large granular cells in the clitellum. The cocoons have an oval shape, are yellow-green when formed and change colour to red-brown when older. Some cocoons are found in cocoon chambers in the medium in which they are cultured and which protect the cocoon against waterloss. The cocoon wall (15.6-17.1 μ m thick) consists of several layers (0.95-1.9 μ m each) which are built up of interwoven fibres. The fibres are built up of microtubules (11-14nm in diameter).

The process of embryogenesis was also studied. The emphasis was placed on the development of segmentation and the stomodeum, peristomium and prostomium.

6. DANKBETUIGINGS.

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

- Dr S.A. Viljoen, onder wie se leiding ek hierdie projek onderneem het, vir haar professionele raad en bystand.
- Prof A.J. Reinecke vir sy gewaardeerde belangstelling.
- Dr. G. van Aswegen vir sy waardevolle hulp en raad met die histochemie.
- Personeel en vriende aan die Departement Dierkunde vir raad hulp en aanmoediging.
- Departement Dierkunde en Laboratorium vir Elektronmikroskopie vir die fasiliteite wat voortdurend tot my beskikking was. .
- Mnr C. Geldenhuys vir sy groot aandeel in die fotografiese werk.
- SNO vir finansiële steun.
- Louwrens Tiedt vir sy spesiale raad en bystand, en sy eindelose geduld met die neem en ontwikkeling van fotos.
- Wilna Pretorius vir besondere aanmoediging, morele ondersteuning en hulp by die mikrotroom.
- Oom Pieter Pretorius vir die taalversorging en betekenisvolle raad tydens die finalisering van hierdie verhandeling.

- Oom Flip en Tannie Ingrid, wie se kennis en liefde vir die natuur, sonder hul medewete, as aansporing gedien het vir die onderneming en voltooiing van hierdie studie.
- My ouers, vir jare van toewyding, aanmoediging en volgehoue ondersteuning. Met dank, erkenning en liefde dra ek hierdie verhandeling aan hulle op.

7. LITERATUURVERWYSINGS.

ANDERSON, D.T. 1973. Embryology and phylogeny in annelids and arthropods. Oxford : Pergamon Press. 495p.

ANDRE, F., BARBE, L. & RIVIERE, S. 1972. Mécanismes neuroendocrines du dépôt des cocons chez *Eisenia foetida*. *Bulletin de la Societe Zoologique de France*, 96(4):399-403.

BENITO, J. & FERNANDEZ BERNALDO DE QUIROS, I. 1987. The specific gland cells of the tubercula pubertatis in *Lumbricus friendi* Cognetti, 1904 (Oligochaeta). An ultrastructural study. *Zeitschrift fuer Mikroskopisch-Anatomische Forschung (Leipzig)*, 101(5):829-843.

BURKE, J.M. 1974. Wound healing in *Eisenia foetida* (Oligochaeta). II. A fine structural study of the role of the epidermis. *Cell and tissue research*, 154:61-82.

BURKE, J.M. & ROSS, R. 1975. A radioautographic study of collagen synthesis by earthworm epidermis. *Tissue and cell*, 7(4):631-650.

CHERR, G.N., SHOFFNER-MCGEE, J. & SHENKER, J.M. 1990. Methods for assessing fertilization and embryonic/larval development in toxicity tests using the California mussel (*Mytilus californianus*). *Environmental toxicology and chemistry*, 9(9):1137-1145.

COGGESHALL, R.E. 1966. A fine structural analysis of the epidermis of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L). *The journal of cell biology*, 28:95-108.

DARWIN, C. 1881. The formation of vegetable mould through the action of worms. Faber & Faber : London. 153p.

DEVRIES, J. 1979. Effects de la cordycepine et de la bromodésoxyuridine sur le développement embryonnaire du lombricien *Eisenia foetida* (bicolor). *Archives de Biologie (Bruxelles)*, 90:381-396.

DEVRIES, J. 1988. Effets de l'azacytidine sur le développement de la métamérie régionalisée du ver de terre *Eisenia foetida*. Transdétermination de demi-segments mésodermiques. *Archives de Biologie (Bruxelles)*, 99:83-110.

EDWARDS, C.A. 1988. Breakdown of animal, vegetable and industrial organic wastes by earthworms. (In Edwards, C.A. & Neuhauser, E.F., eds. Earthworms in waste and environmental management. The Hague, The Netherlands : SPB Academic Publishing. p.21 - 31)

EDWARDS, C.A. & LOFTY, J.R. 1972. The biology of earthworms. London : Chapman & Hall. 333p.

EDWARDS, C.A. & NEUHAUSER, E.F., eds. 1988. Earthworms in waste and environmental management. The Hague, The Netherlands : SPB Academic Publishing. 391p.

EL-DUWEINI, A. 1951. On the clitellum and cocoons of *Alma nilotica*, Grube. *Proceedings of the Egyptian Academy of sciences*, 6:52-63.

EVANS, A.C. & GUILD, W.J. McL. 1947a. Studies on the relationships between earthworms and soil fertility 1. Biological studies in the field. *Annales of applied biology*, 34(3):307-330.

EVANS, A.C. & GUILD, W.J.MCL. 1947b. On the cocoons of some British Lumbricidae. *Annales and magazine of natural history*, 14(11):714-719.

FERNANDEZ, I. & BENITO, J. 1987. Ultraestructura del clitelo de *Lumbricus friendi*, Cognetti, 1904 (Annelida, Oligochaeta). *Boletin de la real sociedad Española de historia natural seccion biologica*, 83(1-4):79-91.

GATES, G.E. 1972. Burmese Earthworms: an introduction to the systematics and biology of Megadrile Oligochaetes with special reference to Southeast Asia. Transactions of the American Philosophical Society. Philadelphia: The American Phylosophical Society. 326p. (Vol 62. Part 7)

GROVE, A.J. 1925. On the reproductive processes of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Quarterly journal of microscopical science*, 69(274):245-290.

GROVE, A.J. 1931. The structure of the clitellum of *Alma emini*, Mich. *Quarterly journal of microscopical science*, 74 : 223-233.

GROVE, A.J. & COWLEY, L.F. 1926. On the reproductive processes of the brandling worm, *Eisenia foetida* (Sav). *Quarterly journal of microscopical science*, 70(280):559-581.

GROVE, A.J. & COWLEY, L.F. 1927. The relation of the glandular elements of the clitellum of the brandling worm (*Eisenia foetida*, Sav) to the secretion of the cocoon. *Quartarly journal of microscopical science*, 71(281):31-46.

HALLATT, L., REINECKE, A.T. & VILJOEN, S.A. 1990. The life-cycle of the oriental compost worm *Perionyx excavatus* (Oligochaeta). *South African journal of zoology*, 25:41-45.

HESS, R.T. & VENA, J.A. 1974. Fine structure of the clitellum of the annelid *Enchytraeus fragmentosus*. *Tissue and cell*, 6(3):503-514.

HEUMANN, A. 1931. Vergleichend-histologische Untersuchungen über Geschlechtsorgane und Clitellum der Regenwürmer. *Zeitschrift fuer Wissenschaftliche Zoologie*, 3:515-554.

HIARO, Y. 1965. Cocoon formation in *Tubifex*, with its relation to the activity of the clitellar epithelium. *Journal of the Faculty of Science Hokkaido University. Series. VI Zoology.*, 15(4):625-362.

HOOGERKAMP, M., ROGAAR, H. & EIJSSACKERS, H.J.P. 1983. Effect of earthworms on grassland on recently reclaimed polder soils in the Netherlands. (In Satchell, J.E., ed. *Earthworm ecology*. London : Chapman and Hall. p 85-105.)

HOPKINS, C.R. 1978. Structure and function of cells. London : Saunders. 266p.

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

HUMPHREYS, S. & PORTER, K.R. 1976. Collagenous and other organizations in mature annelid cuticle and epidermis. *Journal of morphology*, 149:33-52.

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

JOSCHKO, M., DIESTEL, H. & LARINK, O. 1989. Assessment of earthworm burrowing efficiency in compacted soil with a combination of morphological and soil physical measurements. *Biology and fertility of soils*, 8:191-196.

KNIGHT, D.P. & HUNT, S. 1974. Molecular and ultrastructural characterization of the egg capsule of the leech *Erpobdella octoculata* L. *Comparative biochemistry and physiology*, 47A:871-880.

LILLIE, R.D. 1965. Histopathologic technic and practical histochemistry. New York : McGraw Hill. 715p.

LOFS-HOLMIN, A. 1980. Measuring growth of earthworms as a method of testing sublethal toxicity of pesticides. Experiments with benomyl and trichloroacetic acid (TCA). *Swedish journal of agricultural research*, 10:25-33.

LOFS-HOLMIN, A. 1982. Measuring cocoon production of the earthworm *Allolobophora caliginosa* (Sav) as a method of testing sublethal toxicity of pesticides. *Swedish journal of agricultural research*, 12:117-119.

LOFS-HOLMIN, A. 1986. Processing of municipal sludges through earthworms (*Dendrobaena veneta*). *Swedish journal of agricultural research*, 16:67-71.

LUFTY, R.G. 1965. Studies on the skin of oligochaetes.I. On the histology, cytology and histochemistry of the clitellum of *Allolobophora caliginosa*. *Proceedings of the Egyptian Academy of Science*, 19:65-76.

MARCEL, R., CARDON, C. & DEGAND, P. 1985. Le cocon D'*Eisenia foetida* Sav (Annélide, Oligochète). Etude ultrastructurale et biochimique. *Archives d'anatomie microscopique et de morphologie experimentale*, 74(3):181-191.

MICHALIS, K & PANIDIS, S. 1993. Structure and seasonal changes in the clitellum of *Octodrilus complanatus* (DUGES, 1828) (Oligochaeta, Lumbricidae). *European journal of soil biology*. (In press).

MILL, P.J. 1978. Physiology of Annelids. London : Academic Press. 683p.

MORIARTY, F. 1983. Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems. London : Academic Press. 141p.

MORRIS, G.M. 1983. The cocoon-producing cells of *Eisenia foetida* (Annelida, Oligochaeta): A histochemical and ultrastructural study. *Journal of morphology*, 177:41-50.

MORRIS, G.M. 1985. Secretory cells in the clitellar epithelium of *Eisenia foetida* (Annelida, Oligochaeta): A histochemical and ultrastructural study. *Journal of morphology*, 185:89-100.

NEUHAUSER, E.F., LOEHR, R.C. & MALECKI, M.R. 1988. The potential of earthworms for managing sewage sludge. (In Edwards, C.A. & Neuhauser, E.F., eds. *Earthworms in waste and environmental management*. The Hague, The Netherlands : SPB Academic Publishing. p 9 - 20)

PIEARCE, T.G., OATES, K. & CARRUTHERS, W.J. 1990. A fossil earthworm embryo (Oligochaeta) from beneath a late bronze age midden at Potterne, Wiltshire, UK. *Journal of zoology (London)*, 220:537-542.

* RAUABAH-SADAOU, L. 1984. Contribution a l etude biologique et biochimique du clitellum et du cocon d *Eisenia foetida* Sav. (Annelide oligochete). These Doct. 3e Cycle, UST Lille.

- RAMISCH, H. & GRAFF, O. 1985. Die kokonkammern einiger Regenwurmart (Lumbricidae : Oligochaeta) aus der Umgebung von Braunschweig. *Braunschweiger Naturkundliche Schriften*, 2(2):299-307.
- REED, R. & RUDALL, K.M. 1948. Electron microscope studies on the structure of earthworm cuticles. *Biochimica et Biophysica acta*, 2:7-18.
- REINECKE, A.J. 1992. A review of ecotoxicological test methods using earthworms. (In Grieg-Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J. & Heimbach, F. eds. *Ecotoxicology of earthworms*. Andover : Intercept. 269p)
- REINECKE, A.J. & VILJOEN, S.A. 1988. Reproduction of the African earthworm, *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta) - cocoons. *Biology and fertility of soils*, 7:23-27.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of cell biology*, 17:208-212.
- RICHARDS, K.S. 1973. The histochemistry of the large granular, orthochromatic, mucous cells of some lumbricids (Annelida:Oligochaeta). *Annales D'Histochemie*, 18(4):289-300.
- RICHARDS, K.S. 1974a. The ultrastructure af the cuticle of some British lumbricids (Annelida). *Journal of zoology (London)*, 172:303-316.
- RICHARDS, K.S. 1974b. The histochemistry of the metachromatic mucous cells of some lumbricids (Annelida:Oligochaeta). *Annales d'Histochemie*, 19(3):187-197.
- RICHARDS, K.S. 1974c. The ultrastructure of the orthochromatic mucous cells of some British lumbricids (Annelida). *Journal of zoology (London)*, 174:575-590.

RICHARDS, K.S. 1974d. The histochemistry of the small granular, proteinaceous cells (albumen cells) of the epidermis of some lumbricids. (Annelida:Oligochaeta). *Annales d'Histochimie*, 19(4):239-251.

RICHARDS, K.S. 1975. The ultrastructure of the small granular, proteinaceous epidermal cells of some British lumbricids (Annelida) and a reassessment of the identity of the so-called albumen cells. *Journal of zoology (London)*, 177:517-527.

RICHARDS, K.S. 1977. Structure and function in the Oligochaete epidermis (Annelida). *Symposia of the zoological society of London*, 39:171-193.

RICHARDS, K.S. 1978. Epidermis and cuticle. (In Mill, P.J. ed. *Physiology of annelids*. London : Academic Press. 683p.)

RICHARDS, K.S. 1984. Cuticle. (In Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G. & Richards, K.S. eds. *Biology of the integument. I. Invertebrates*. Berlyn : Springer-Verlag. 367p.)

RICHARDS, K.S. & ARME, 1982. Integumentary uptake of dissolved arganic materials by earthworms. *Pedobiologia*, 23:358-366.

RUSKA, C. & RUSKA, H. 1961. Die cuticula der epidermis des Regenwurms (*Lumbricus terrestris*, L). *Zeitschrift für Zellforschung*, 53:759-764.

SATCHELL, J.E. 1983. Earthworm microbiology. (In Satchell, J.E., ed. *Earthworm ecology*. London : Chapman & Hall. p. 351-364.)

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

- SNYDER, R.J. 1976. The biology of population growth. London : Croom Helm. 134p.
- SPURR, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of ultrastructure research*, 26:31-43.
- STAFFORD, E.A. & TACON, A.G.J. 1988. The use of earthworms as a food for rainbow trout *Salmo gairdneri*. (In Edwards, C.A. & Neuhauser, E.F., eds. Earthworms in waste and environmental management. The Hague, The Netherlands : SPB Academic Publishing. p 193-208.)
- STEPHENSON, J. 1930. The Oligochaeta. Oxford : Clarendon Press. 978p.
- STOCKDILL, S.M.J. 1966. The effect of earthworms on pastures. *Proceedings of the New Zealand Ecological Society*, 13:68-75.
- STORER, T.I., USINGER, R.L., STEBBINS, R.C. & NYBAKKEN, J.W. 1979. General Zoology. New York : McGraw Hill. 902p.
- STOREY, K.G. 1989a. Cell lineage and pattern formation in the earthworm embryo. *Development*, 107:519-531.
- STOREY, K.G. 1989b. The effects of ectoteloblast ablation in the earthworm embryo. *Development*, 107:533-545.
- SUZUTANI-SHIOTA, C. 1977. Light and electron microscopical observations on the clitellar epithelium of *Tubifex*. *Journal of the Faculty of Science Hokkaido University. Series. VI. Zoology*, 21(1):1-11.

- SUZUTANI-SHIOTA, C. 1980. Ultrastructural study on cocoon formation in the freshwater Oligochaete, *Tubifex hattai*. *Journal of morphology*, 164:25-38.
- THERON, J.J. 1979. Die ultrastruktuur van die sel. Durban : Butterworth. 243p.
- TIEDT, L.R. 1991. Inexpensive carbon conductive cement for SEM. *Electron microscopy society of Southern Africa*, 21:37-38.
- 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 Press. p.87-100)
- VALOVIRTA, I. & TERHIVUO, J. 1976. *Dendrobaena veneta* (Rosa) ssp. hortensis (Michaelsen, 1890) (Oligochaeta, Lumbricidae) found in Finland. *Annales Zoologici Fennici*, 13:81-83.
- VAN RHEE, J.A. 1977. A study of the effect of earthworms on orchard productivity. *Pedobiologia*, 17:107-114.
- VENTER, J.M. & REINECKE, A.J. 1988a. The life-cycle of the compost worm *Eisenia ferida* (Oligochaeta). *South African journal of zoology*, 23(3):161-165.
- VENTER, J.M. & REINECKE, A.J. 1988b. Sublethal ecotoxicological effects of dieldrin on the earthworm *Eisenia foetida* (Oligochaeta). (In Edwards, C.A. & Neuhauser, E.F. eds Earthworms in waste and environmental mangement. The Hague, The Netherlands : SPB Academic Publishing. p. 337-353.)
- VILJOEN, S.A. & REINECKE, A.J. 1989. Life-cycle of the African nightcrawler, *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta). *South African journal of zoology*, 24(1):27-32.

VILJOEN, S.A., REINECKE, A.J. & HARTMAN, L.E. 1991. Life-cycle of the European compost worm *Dendrobaena veneta* (Oligochaeta). *South African journal of zoology*, 26(1):43-48.

VILJOEN, S.A., REINECKE, A.J. & HARTMAN, L.E. 1992. The influence of temperature on the life-cycle of *Dendrobaena veneta* (Oligochaeta). *Soil biology and biochemistry*. (In press).

WELSCH, U., STORCH, V. & RICHARDS, K.S. 1984. Epidermal cells. (In Bereier-Hahn, J., Matoltsy, A.G. & Richards, K.S., eds. *Biology of the integument I. Invertebrates*. Berlin : Springer-Verlag. 367p.)

WIELGUS-SERAFINSKA, E. 1979. Influence of lead poisoning and ultrastructural changes in the body wall of *Eisenia foetida* (Savigny), *Oligochaeta*. I. Short action of different concentrations of lead and ultrastructural changes in the cells of the body wall. *Folia histochemica et cytochemica*, 17(2):181-188.

WILSON, E.B. 1889. The embryology of the earthworm. *Journal of Morphology*, III(3):388-449.

* bron nie in die oorspronklike gesien nie

8. BYLAAG 1.

Tabel 1. Dui die metinge aan wat op 100 kokonne van *D. venera* wat ewekansig versamel is, uitgevoer is.

kokon nr	lengte (mm)	breedte (mm)	massa (mg)	kokon nr	lengte (mm)	breedte (mm)	massa (mg)
1	5,0	3,4	24,7	36	5,6	3,8	25,2
2	5,0	3,3	29,2	37	6,0	3,8	40,0
3	6,0	3,7	28,2	38	5,8	3,3	24,8
4	5,0	3,4	24,9	39	4,0	3,5	31,7
5	5,0	3,2	31,1	40	5,6	3,0	24,1
6	5,0	3,0	34,6	41	5,0	3,0	25,2
7	5,0	3,8	23,9	42	5,4	3,4	27,6
8	5,0	3,5	25,8	43	5,5	3,3	27,7
9	4,9	3,3	32,6	44	6,0	3,85	19,7
10	5,4	3,4	16,3	45	5,3	3,5	27,1
11	4,8	3,2	26,3	46	5,3	3,7	17,9
12	5,0	3,7	18,5	47	4,7	3,7	24,6
13	5,0	3,1	20,8	48	4,5	3,6	23,8
14	5,8	3,55	24,9	49	5,0	3,6	30,4
15	5,0	3,6	23,3	50	3,1	3,6	21,7
16	5,2	3,3	26,5	51	5,0	3,35	22,0
17	4,4	3,35	26,9	52	5,7	3,4	16,2
18	6,4	3,6	21,5	53	5,4	3,2	25,3
19	5,5	3,35	28,3	54	4,4	3,0	28,5
20	5,7	3,6	24,0	55	4,4	3,2	22,7
21	4,8	3,0	21,1	56	4,5	3,4	29,5
22	4,55	3,0	25,5	57	4,5	3,2	28,7
23	5,0	3,4	22,0	58	5,0	3,85	27,8
24	4,6	3,0	19,2	59	4,2	3,0	21,5
25	6,0	3,3	19,4	60	5,0	3,4	37,9
26	4,5	3,5	25,2	61	5,1	3,0	32,0
27	5,0	3,5	25,4	62	4,8	3,0	31,3
28	4,0	3,0	20,0	63	4,5	3,2	22,7
29	5,25	3,0	36,0	64	4,8	3,3	22,3
30	4,5	2,9	28,4	65	4,7	3,4	16,1
31	4,3	3,4	27,8	66	5,1	3,2	20,7
32	4,3	3,1	18,5	67	4,7	3,0	24,7
33	4,5	3,4	23,3	68	5,0	3,5	20,5
34	5,2	3,0	22,3	69	4,9	3,2	24,9
35	4,6	3,0	22,2	70	4,2	3,0	26,6

kokon nr	lengte (mm)	breedte (mm)	massa (mg)	kokon nr	lengte (mm)	breedte (mm)	massa (mg)
71	5,6	3,8	34,9	87	4,4	3,2	30,8
72	4,7	3,1	20,7	88	4,8	3,0	24,0
73	3,5	3,0	24,7	89	4,6	3,0	20,2
74	3,85	3,0	22,1	90	4,7	3,6	25,9
75	5,0	3,0	28,1	91	4,8	3,4	27,2
76	3,4	3,4	36,2	92	3,7	2,9	24,2
77	4,3	3,2	23,7	93	5,3	3,4	23,9
78	5,0	2,9	29,0	94	4,8	3,5	29,9
79	4,7	3,0	16,3	95	4,55	3,4	22,1
80	5,4	3,4	27,1	96	4,8	3,1	31,0
81	4,6	3,0	21,6	97	4,7	3,0	21,2
82	5,0	3,3	22,8	98	4,5	3,6	20,8
83	4,5	3,2	24,5	99	5,7	3,5	29,6
84	5,3	3,4	28,2	100	5,2	3,5	33,9
85	5,0	3,5	40,8	x	4,89	3,1	25,5
86	5,0	3,2	25,5	SA	0,05	2,5	5,11