

**DIE ULTRASTRUKTUUR VAN SPERME VAN DIE ROOIBOK**  
***Aepyceros melampus* (Lichtenstein, 1812)**  
**IN DIE NASIONALE KRUGERWILDTUIN MET SPESIALE**  
**VERWYSING NA DIE INVLOED VAN KOPERBESOEDELING**

DEUR

**DIRK J. ACKERMAN**

Departement Soölogie, Universiteit van Stellenbosch



Proefskrif aangebied ter gedeeltelike voltooiing aan die vereistes vir die graad:  
Doctor Philosophae in Dierkunde in die Departement Soölogie  
aan die Universiteit van Stellenbosch.

Promotor:

**Prof. A.J. Reinecke**

Aangebied: Augustus 1995

## **VERKLARING**

**Ek die ondergetekende verklaar hiermee dat die werk in hierdie proefskrif vervat, my eie oorspronklike werk is wat nog nie vantevore in die geheel of gedeeltelik by enige ander Universiteit ter verkryging van 'n graad voorgelê is nie.**

**Handtekening:**

**Datum:**

*Opgedra aan my vrou*

*Antoinette*

# INHOUDSOPGAWE

<b>OPSOMMING</b>	.....	(vii)
<b>ABSTRACT</b>	.....	(x)
<b>DANKBETUIGINGS</b>	.....	(xiii)

## HOOFSTUK 1

<b>ALGEMENE INLEIDING</b>	.....	1
1.1 Inleiding	.....	1
1.2 Doelwitte	.....	4
1.3 Koperbesoedeling van rooibokke se weiding te Phalaborwa	.....	4
Figuur 1.1 : Studie-areas	.....	8
Figuur 1.2 : Die Nasionale Krugerwildtuin (NKW)	.....	9
1.4 Die studie-area	.....	10

## HOOFSTUK 2

<b>MATERIAAL EN METODEDES</b>	.....	11
2.1 Inleiding	.....	11
2.2 Phalaborwaprojek : (Projek-P)	.....	11
2.3 Skukuzaprojek: (Projek-S)	.....	11

2.4 Nwaswitshakaprojek: (Projek-N) . . . . .	12
2.5 Versameling van sperme . . . . .	13
2.6 Versameling van skrotums . . . . .	13
2.7 Fiksering van sperme . . . . .	14
2.8 Skandeer-elektronmikroskopie (SEM) . . . . .	16
2.8.1 Voorbereiding van sperme (SEM) . . . . .	16
2.8.2 Kwantitatiewe analiseringsmetode (SEM) . . . . .	17
2.9 Transmissie-elektronmikroskopie (TEM) . . . . .	18
2.9.1 Voorbereiding van sperme (TEM) . . . . .	18
2.9.2 Kwantitatiewe analiseringsmetode (TEM) . . . . .	19
a Spermkopsneë . . . . .	21
b Flagellum-neksneë . . . . .	22
c Hoofstuksneë . . . . .	23
2.10 Grafiese analise . . . . .	24
2.11 Die bepaling van koperwaardes in rooibokorgane . . . . .	25
2.12 Die bepaling van rooibokke se kondisie . . . . .	25

### **HOOFSTUK 3**

'n SKANDEER-ELEKTRONMIKROSKOPIESE ONDERSOEK VAN ROOIBOKSPERME . . . . .	27
3.1 Inleiding . . . . .	27
3.2 Metode . . . . .	28
3.3 Resultate . . . . .	28

3.3.1 Normale sperme . . . . .	28
a Die kop . . . . .	28
b Die flagellum . . . . .	29
c Die middelstuk en nek . . . . .	30
d Die hoofstuk . . . . .	31
e Die endstuk . . . . .	31
f SEM-mikrograwe : Normale sperme . . . . .	33
3.3.2 Abnormale sperme . . . . .	37
a SEM-mikrograwe : Abnormale sperme . . . . .	38
3.4 Bespreking . . . . .	48

## HOOFSTUK 4

'n TRANSMISSIE-ELEKTRONMIKROSKOPIESE ONDERSOEK VAN ROOIBOKSPERME . . . . .	54
4.1 Inleiding . . . . .	54
Figuur 4.1. Spermkop: Planêre snee . . . . .	56
Figuur 4.2. Spermkop: Mediane snee . . . . .	56
4.2 Resultate . . . . .	57
4.2.1 Normale sperme . . . . .	57
a Die spermkop . . . . .	58
b Die nek en middelstuk . . . . .	58
c Die hoofstuk . . . . .	61
d Die endstuk . . . . .	62

e	TEM-mikrograwe: Normale sperme . . . . .	63
4.2.2	Bespreking: Normale sperme . . . . .	77
4.2.3	Abnormale sperme . . . . .	79
4.2.3.1	TEM-mikrograwe: Abnormale sperme . . . . .	81
a	Akrosoom: . . . . .	81
i	Lipvorming . . . . .	81
ii	Sist . . . . .	83
iii	Abnormale verdikking . . . . .	85
iv	Disintegrasië . . . . .	87
b	Kop: . . . . .	91
i	Vakuole . . . . .	91
ii	Kraterdefek . . . . .	91
iii	Vlerk-of rifvorming . . . . .	93
iv	Balvorming . . . . .	95
v	Gevou . . . . .	97
vi	Chromatien-subkondensasië van nukleus . . . . .	99
vii	Veelvuldige nukleï . . . . .	101
c	Flagellum: . . . . .	103
i	Nekafwykings . . . . .	103
ii	Dubbel . . . . .	103
iii	Geknak . . . . .	107
iv	Vakuoles van die hoofstuk . . . . .	109
v	Dagdefek . . . . .	111
4.2.4	Bespreking: Abnormale sperme . . . . .	119

**HOOFSTUK 5****DIE VERBAND TUSSEN DIE LEWERKOPERKONSENTRASIE  
EN SPERMABNORMALITEITE VAN DIE ROOIBOK**

<b>5.1 Inleiding</b>	123
<b>5.2 Resultate</b>	127
5.2.1 Kwantitatiewe analise (SEM)	127
5.2.2 Data van die TEM-studie	128
Tabel 5.1	129
Tabel 5.2	131
Verklarings van simbole in die kolomme van tabel 5.1 en 5.2	134
5.2.3 Wilcoxontoetse	138
5.2.4 Kwantitatiewe analise (TEM)	144
a    Kontrole (KN en KS)	144
b    Eksperiment (EP en ES)	145
5.2.5 Grafiese analise van die data in tabel 5.1 en 5.2	147
<b>5.3 Bespreking</b>	174
5.3.1 Kwantitatiewe analise (SEM)	174
5.3.2 Kwantitatiewe analise (TEM) en bespreking van Wilcoxontoetse	174
a    KN/KS (Tabel 5.3)	175
b    EP/ES (Tabel 5.4)	175
c    ES/KS (Tabel 5.5)	177
d    EP/KN (Tabel 5.6)	178
e    EP+ES/KN+KS (Tabel 5.7)	178



<b>5.3.3 Grafiese data</b> . . . . .	<b>180</b>
<b>5.3.4 Algemeen</b> . . . . .	<b>182</b>

**HOOFSTUK 6**

<b>Algemene bespreking en slotsom</b> . . . . .	<b>187</b>
<b>LITERATUURVERWYSINGS</b> . . . . .	<b>193</b>

-----oOo-----

## **OPSOMMING**

**Die weiding suid van Phalaborwahek in die Krugerwildtuin word waarskynlik vanaf 'n nabygeleë kopersmeltery met koper besoedel. Van die plaasdiere in die omgewing het reeds van kopervergiftiging gevrek en die gemiddelde koperkonsentrasie in die lewers van rooibokke is abnormaal hoog.**

**Die moontlikheid bestaan dat die ultrastruktuur van spermatozoa as 'n indikator van omgewingstoestande kan dien. Om bogenoemde moontlikheid verder te ondersoek was die doelwit van hierdie studie die volgende:**

**Om die ultrastruktuur van normale rooiboksperme en hulle abnormaliteite te beskryf en die spermabnormaliteite van elke proefdier te kwantifiseer en met die koperkonsentrasie in die lewer in verband te bring om sodoende te bepaal of daar 'n korrelasie tussen die twee veranderlikes bestaan.**

**Rooibokke wat maandeliks vanaf 1992.06.09 tot 1993.05.15 vir ander navorsingsprojekte in die omgewing van Phalaborwahek en Skukuza getermineer is, se sperme is vir die studie beskikbaar gestel. Die kontrolegroep het bestaan uit 20 diere wat saamgestel is uit 14 diere afkomstig van die Nwaswitshakaspruit naby Skukuza, uit 'n gebied wat nie met koper besoedel is nie en 6 diere uit 'n groep wat oorspronklik uit dieselfde gebied gekom het, maar wat te Skukuza in aanhouding geleef het op voedsel wat nie met koper besoedel was nie. Die eksperimentele groep het bestaan uit 44 diere waarvan 32 in die omgewing van die Tshutshispruit suid van Phalaborwahek versamel is en die ander 12 diere is langs die**

**Nwaswitshakaspruit gevang en op 'n koperbesoedelde dieet te Skukuza aangehou.**

**Sperme uit die epididymis van elke dier is in 'n tydelike laboratorium versamel en gefikseer. By die Elektronmikroskopie Eenheid van die Fakulteit van Veeartsenykunde van die Universiteit van Pretoria is die sperme voorberei en met behulp van skanderelektronmikroskopie (SEM) en transmissie-elektronmikroskopie (TEM) bestudeer.**

**Die koperkonsentrasie in die lewer is bepaal en murgvet is versamel om die kondisie van die diere te bepaal.**

**Met SEM is die uitwendige morfologie van 'n normale rooiboksperm met mikrograwe gedokumenteer en die mates van die sperm bepaal. Mikrograwe van waargeneemde spermabnormaliteite is met SEM geneem. Persentasies is vir normale sperme en die abnormaliteite van sommige sperme van 'n kontrolegroep (Gemiddelde lewerkoperkonsentrasie - GLKK = 37.9 dpm NB) bereken. Dieselfde persentasies is ook vir 'n eksperimentele groep (GLKK = 104 dpm NB) bereken. Van die kontrolegroep het 91.6% en van die eksperimentele groep 93.6% sperme normaal vertoon. Die verskil in persentasies spermafwykings van die twee groepe was ook van dieselfde orde. Die verhoogde koperkonsentrasie in die lewers van die eksperimentele groep het dus nie gelei tot 'n verhoging van die persentasie makro-abnormaliteite wat met SEM waargeneem is nie.**

**Die ultrastruktuur van 'n normale rooiboksperm is met behulp van TEM beskryf en met mikrograwe gedokumenteer. Die afwykings van die spermultrastruktuur is ook op mikrograwe vasgelê. Persentasies is vir die normale spermsneë en die abnormaliteite van sommige spermsneë van 'n kontrolegroep (GLKK = 33.86 dpm NB) bereken. Dieselfde**

persentasies is ook vir 'n eksperimentele groep (GLKK = 122.5 dpm NB) bereken. Vir die kontrolegroep was die persentasie nekseen met vakuoles = 31.5% en vir die eksperimentele groep was dié persentasie = 57.9%. Die verhoogde koperkonsentrasie in die lewers van die eksperimentele groep het dus gelei tot 'n verhoging van die persentasie nekseen met vakuoles. Rede bestaan om te glo dat die verskil van die persentasies kopsnee van die kontrole- en eksperimentele groep ook aansienlik hoër behoort te wees.

'n Grafiese analise van die TEM-data het ook getoon dat daar 'n statisties betekenisvolle korrelasie tussen die persentasie spermnekke met vakuoles en die koperkonsentrasie in die lewer van rooibokke bestaan. Die bevinding is dat hoë lewerkoperkonsentrasies 'n nadelige invloed op die ultrastruktuur van die spermnek uitoefen. Die moontlikheid bestaan ook dat koperkonsentrasies in die lewer > 500 dpm NB ook 'n korrelasie met sommige van die ander abnormaliteite sal toon.

----- oOo -----

## **ABSTRACT**

Grazing in the Kruger National Park, south of Phalaborwa Gate, is contaminated with copper, probably from a nearby copper refinery. Cattle in the neighbourhood have died from copper poisoning while the average copper concentration in the livers of impala in the Kruger National Park, was found to be abnormally high.

The possibility exists that the ultrastructure of spermatozoa may serve as an indicator of environmental conditions. To examine this statement further, the purpose of this study includes the following:

- To describe the ultrastructure of normal impala sperm as well as their abnormalities.
- To quantify the sperm abnormalities of each experimental animal and to relate the abnormalities with the copper concentration in the impala liver, in order to determine whether any correlation exists between these two variables.

Impala have been terminated monthly, from 1992.06.09 to 1993.05.15, in the vicinity of Phalaborwa Gate and in the Skukuza area for other research projects. Their sperm were made available for this study. The control group consisted of 20 animals which comprised 14 animals from an area, not contaminated with copper, along the Nwaswitshaka spruit near Skukuza and 6 animals originally from the same area but which had been kept in captivity at Skukuza on a diet, not contaminated with copper. The experimental group consisted of 44 animals which comprised 32 animals from copper contaminated grazing along the Tshutshi spruit south of Phalaborwa Gate and 12 animals captured along the Nwaswitshaka spruit which were kept on a copper contaminated diet in captivity at Skukuza.

Sperm from the epididymis of each animal were collected and fixed in a temporary laboratory. The sperm were processed at the Electron Microscopy Unit of the Faculty of Veterinary Science of the University of Pretoria and studied by means of scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM).

The copper concentration in the liver was analyzed and bone marrow collected of each animal in order to determine the condition of the animal.

The external morphology of a normal impala sperm was documented by means of SEM and the dimensions of the sperm determined. SEM micrographs of observed sperm abnormalities were taken.

Percentages for normal sperm and the percentages of some abnormalities of a control group (Average liver copper concentration - ALCC = 37.9 ppm WB) were calculated. The same percentages were also calculated for an experimental group (ALCC = 104 ppm WB). The control group and the experimental group exhibited 91.6% and 93.6% normal sperm respectively. The difference in percentage sperm abnormalities of the two groups was of the same order. The increased copper in the livers of the experimental group has thus not lead to an increase of the percentage macro-abnormalities observed with SEM.

The ultrastructure of normal impala sperm were described and documented with micrographs by means of TEM. The deviations of the normal sperm ultrastructure were also recorded on micrographs. Percentages were calculated for the normal sperm sections, as well as the abnormalities of some sperm sections of a control group (ALCC = 33.86 ppm WB). The same percentages were also calculated for an experimental group (ALCC = 122.5 ppm WB).

For the control group the average percentage sperm neck sections with vacuoles was : 31.5% and for the experimental group this percentage was : 57.9%. The increased copper concentrations in the livers of the experimental group thus led to an increase of the percentage of sperm necks with vacuoles. There is also reason to believe that the difference of the percentages of sections of the sperm head, in the control and experimental group, should be remarkably greater.

A graphic analysis of the TEM-data has also shown that a statistically significant correlation exists between the percentage of sperm with vacuoles in the neck and the copper concentrations in the livers of impalas. The conclusion is that high level copper concentrations exert a detrimental effect on the ultrastructure of the sperm neck. The possibility also exists that copper concentrations in impala liver > 500 ppm WB. will show a correlation with the percentages of some of the other abnormalities observed.

-----oOo-----

## **DANKBETUIGINGS**

Ek wil graag die volgende persone en instansies van harte bedank vir hulp en bystand wat hulle tydens die duur van die projek gelewer het:

Die Universiteit van Stellenbosch vir die voorreg om aan so 'n beroemde Universiteit as student verbonde te wees.

Prof. A.J. Reinecke, my promotor, vir professionele hulp en inspirerende entoesiasme wat deurentyd tot my beskikking was. Sy aandeel in die verkryging van fondse wat vir die studie beskikbaar gestel is, word opreg waardeer

Prof. J. Nel van die Departement Soölogie van die Universiteit van Stellenbosch vir sy goedgesindheid.

Die Universiteit van Stellenbosch, Stigting vir Navorsings Ontwikkeling, Avpro 2000 en J.T. Development Engineering vir finansiële en ander bydraes.

Prof. V de Vos, my koördineerder in die Krugerwildtuin, vir sy leiding en goedgesindheid.

Dr. S.C.J. Joubert, voormalige Parkhoof van die Nasionale Krugerwildtuin, vir sy ondersteuning en die goedkeuring van die projek deur die Nasionale Parkeraad van Suid-Afrika.



Drr. D.G. Grobler en L.E.O. Braack vir die voorreg om gebruik te maak van die sperme en ander data van hulle projekte in die Krugerwildtuin.

Mnre. H. A. Schreiber en H.J. Coetzee, beamptes van die Nasionale Krugerwildtuin en hulle personeel vir hulp in die veld.

Mnr. E. Wood vir entoesiastiese hulp en betrokkenheid in die veld.

Mnr H.J. Els, hoof van die Elektronmikroskopie Eenheid van die Fakulteit Veeartsenykunde van die Universiteit van Pretoria, vir die opleiding om my instaat te stel om die skandeer- en transmissie- elektronmikroskope self te opereer. Sy samewerking en wetenskaplike ervaring wat hy tot my beskikking gestel het, word in die besonder waardeer.

Prof. R.I. Coubrough, Dekaan van die Fakulteit Veeartsenykunde van die Universiteit van Pretoria, vir sy toestemming om sedert 1991 feitlik op 'n permanente basis van die fasiliteite van die E.M. Eenheid onder leiding van mnr H.J. Els gebruik te maak.

Prof. M.S Bornman, hoof van die Sentrum vir Fertiliteits-studies, Departement Urologie, Universiteit van Pretoria, vir haar hulp en samewerking om van die studie 'n sukses te maak.

Mej. E. Pienaar en dr. D. du Toit van bogenoemde departement, vir hulp met die versameling van sperme tydens die eerste paar besoeke aan die Krugerwildtuin.

Dr. J.T. Soley en prof. H.B. Groenewald, Departement Anatomie, Fakulteit van Veeartsenykunde, Universiteit van Pretoria, vir leiding en hulp.

**Me M. Botha, E.M. Eenheid van bogenoemde fakulteit vir haar buitengewone presiesheid tydens die voorbereiding van die sperme en die berging van die data.**

**Me K. Basson, Toksikologie, Onderstepoort Veterinêre Instituut, vir haar vriendelik samewerking.**

**Prof. H.T. Groeneveld, Departement Statistiek, vir sy hulp ten opsigte van statistiese aspekte van die studie en mnr . R. Ehlers wat onder prof. H.T. Groeneveld se leiding verantwoordelik was vir die grafiese analise van alle data.**

**Mevv. M. Potgieter, O. Schreiber en H. Bryden, beamptes van die Nasionale Parkeraad van Suid-Afrika, vir hulle vriendelike hulp en organisering van besoeke aan die Krugerwildtuin.**

**Mnr J. Shitole, Skukuza, vir die bepaling van murgpersentasies.**

**Mev. L.B Oberholzer, vir haar bydrae om 'n sukses van hierdie manuskrip te maak.**

**My ouers, vir hulle liefde.**

**My vrou Antoinette vir haar liefde en die opvoeding van ons kinders Antoinette, Hendrik en Pieter.**

----- oOo -----

# HOOFSTUK 1

## ALGEMENE INLEIDING

### 1.1 Inleiding

Die invloed van toksiese en besoedelings-chemikalieë op die lewende omgewing wek daaglik groter internasionale kommer en daarom het die metode vir die evaluasie van hierdie effekte ooreenstemmend verbeter. Die subletale effekte van lae konsentrasies chemikalieë op die fisiologie, morfologie en gedrag van diere (en die mens), is nie maklik om waar te neem nie. Verlaagde fertiliteit, gedragsveranderinge en vertraagde ontwikkeling is voorbeelde van subletale effekte wat populasies op 'n subtiele wyse beïnvloed (Brown en Fourie, 1987; Reinecke, 1992). Hierdie subletale effekte mag 'n groter ekologiese rol speel in die oorlewing van spesies as die invloed van akute toksisiteit.

Toetse op die digtheid, motiliteit en morfologie van sperme is goed gevestig vir die mens. Die laboratoriummetodes is vinnig, ekonomies en bied oor die algemeen 'n eenvoudige dog effektiewe kwantitatiewe evaluasie. Spermmonsters is met min moeite bekombaar en 'n relatiewe klein hoeveelheid semen is nodig vir 'n effektiewe analise (Menkveld *et al.*, 1991). Ekstensiewe studies op die ultrastrukture van diersperme, as indikatore van die kwaliteit van die omgewing, is nog gebrekkig. Gedurende die laaste twee dekades is 'n aantal toksisiteit bio-evaluerings vir die marine omgewing ontwikkel deur van die gamete van see-kastaiings gebruik te maak (Reinecke *et al.*, 1995). Die gebruik van sperme van marine diere in basiese en toegepaste toksikologie is nie nuut nie. Wynberg *et al.* (1989) en Reinecke *et al.* (1995), rapporteer dat Lillie reeds in 1921 en Hoadley in 1923 van sperme vir hierdie doel gebruik

gemaak het. Min literatuur bestaan oor die waarde van sperm morfologie (vernaamlik ultrastrukturele beskadiging) as 'n indikator van suksesvolle bevrugting of van die kwaliteit van die omgewing (Gamcik *et al.*, 1990; Reinecke *et al.*, 1995).

Die persentasie normale sperm morfologiese eienskappe speel 'n belangrike rol tydens die bevrugtingsproses by die mens (Kruger *et al.*, 1986; De Yi Lui en Baker, 1992). Ultrastrukturele abnormaliteite van sperme by die mens en die dier het gewoonlik 'n negatiewe invloed op fertiliteit (Coubrough en Soley, 1977; Dadoune en Fain-Maurel, 1977; Coubrough en Soley, 1981; Mahadevan en Trounsen, 1984; Thilander *et al.*, 1985; Barthèlème *et al.*, 1992; Baccetti *et al.*, 1993). Enige omgewingssubstans wat sperm parameters affekteer sal dus druk op die mens of die dier se reproduksie uitoefen en 'n effek op hulle intra- en interspesifieke kompetisie hê. Dit behoort weer op die populasievlak te manifesteer (Reinecke *et al.*, 1995).

Die ekotoksikologiese benadering poog om die respons van die ekosisteem op besoedeling en sy herstel as die stresfaktor verwyder is, te bepaal. Maar dit vereis betroubare basislyndata om veranderinge te kan herken en dit korrek te kan verduidelik. Kritiese komponente en prosesse in die ekosisteem leen hulleself as barometers van omgewingsdruk, indien hulle korrek geïdentifiseer en meetbaar is (Reinecke, 1992). Resente navorsing op sperme van erdwurms in Suid-Afrika, het getoon dat hierdie selle baie sensitief in die teenwoordigheid van vreemde chemikalieë reageer (Reinecke *et al.*, 1995). Beskadiging van die sperm nukleus is gedemonstreer met elektronmikroskopie. Die genetiese implikasies vir die nageslag spreek vanself. Dit word vermoed dat die sperm moontlik 'n belangrike toetsmetode vir toksisiteit kan bied.

Gumnow *et al.* (1991) het bewys dat die rooibokke in die omgewing van Phalaborwa-hek in die Nasionale Krugerwildtuin (NKW), se lewerkoperwaardes aansienlik hoër as normaal was. Hierdie feit was een van die redes wat as aansporing gedien het om aansoek te doen om met die samewerking van twee beamptes van die Nasionale Parkeraad van Suid-Afrika, dr. D. G. Grobler en L.E.O. Braack, die invloed van lewerkoperwaardes op die ultrastruktuur van rooiboksperme te bestudeer deur van die materiaal en gegewens van drie van hulle goedgekeurde projekte gebruik te maak.

Die rooibok *Aepyceros melampus* (Lichtenstein, 1812) is die enigste verteenwoordiger van die subfamilie Aepycerotinae en is van middelslaggrootte. Die ramme het liervormige horings, met groot riwwe; die ooie is sonder horings. Hulle het nie preorbitale- voet- of lieskliere nie. Die metatarsale kliere op die agterbene word bedek deur 'n opvallende klossie swart hare. Hulle het twee paar tepels. Hulle het geen valshoewe nie; serte van medium lengte en 'n swart streek op die agterkant van elke dy. Die rooibok is slank soos 'n gasel gebou (Skinner en Smithers, 1990).

Rooibokke kom voor in dele van Kenia, Oeganda, Zaire, Zambië, Angola, Botswana, Zimbabwe en Mosambiek. Hulle word dwarsdeur Tanzanië aangetref en in die Republiek van Suid-Afrika is hulle in die huidige provinsies van Noordwes, die Noordelike Provinsie en Mpumalanga, behalwe in die suidelike grasveld, goed verteenwoordig. Verder kom hulle in die noordelike gedeeltes van Kwazulu/Natal tot sover suid as die Mhlatuzerivier voor (Skinner en Smithers, 1990).

Baie min is bekend oor die sperme van rooibokke. Ligmikroskopiese studies is o.a. deur Morgenthal (1967), Fairall (1971) en Dott en Skinner (1989) gedoen, maar geen

elektronmikroskopiese studies is van die ultrastruktuur van rooiboksperme gevind nie. Dit het die weg oopgelaat om 'n studie met die volgende doelwitte te inisieer.

## **1.2 Doelwitte**

1.2.1 Om die ultrastruktuur van 'n normale rooiboksperm met behulp van skandeer-elektronmikroskopie (SEM) en transmissie-elektronmikroskopie (TEM) te beskryf.

1.2.2 Om die abnormaliteite van rooiboksperme met behulp van SEM en TEM te bepaal.

1.2.3 Om te bepaal of 'n korrelasie tussen verhoogde koperkonsentrasies in rooiboklewers en die ultrastrukturele abnormaliteite van hulle sperme bestaan.

Die volgende is sommige van die publikasies oor die ultrastruktuur van sperme van die mens, die bul en sommige ander soogdiere, wat 'n waardevolle bydrae gelewer het om inligting oor die soogdiersperm in te win en leiding in die studie van die ultrastruktuur van die rooiboksperm te bied: Blom en Birch-Anderson (1960, 1965); Saacke en Almquist (1964a, 1964b); Nicander en Bane (1966); Fawcett en Phillips (1969); Fawcett (1975); Heath en Gupta (1975); Thilander *et al.* (1985); Cummins en Woodall (1985); Schill (1991); Zamboni (1991, 1992).

## **1.3 Koperbesoedeling van rooibokke se weiding te Phalaborwa.**

Gummow *et al.* (1991) het met patologiese bevindinge en lewer- en nier- analises bevestig dat beeste op 'n plaas net wes van Phalaborwa gevrek het van kroniese kopervergiftiging. Hierdie is die eerste bekende gepubliseerde rekord van kroniese kopervergiftiging van beeste in Suidelike Afrika. 'n Epidemiologiese studie het getoon dat 'n bron van koper deur

lugbesoedeling moontlik van 'n naby geleë kopersmeltery afkomstig kon wees. Verder is gevind dat buffels en rooibokke, in 'n aangrensende area van die Nasionale Krugerwildtuin, se kopervlak in die lewer aansienlik hoër was as dié van diere in ander gedeeltes van die bewaringsgebied (Fig. 1.1).

'n Orale dosis van 200 mg/kg koper sal heel waarskynlik die vinnige dood van 'n volwasse koei veroorsaak (Booth en McDonald, 1982). Vergiftiging mag egter ook die resultaat wees van die inname van lae kopervlakke (10-125 mg/kg) oor lang periodes (Booth en McDonald, 1982). Dit is moontlik omdat die koper vanaf die spysverteringskanaal in die lewer versamel en net 'n beperkte hoeveelheid gestoor kan word. 'n Hoë koper-konsentrasie in die lewer inhibeer essensiële ensieme en veroorsaak wanfunksie van die lewer en uiteindelijke nekrose. Groot hoeveelhede koper en ander oksidatiewe substansie word dan deur die lewer in die bloedstroom losgelaat waar hulle vir vasculêre beskadiging, vloeistofverlies, 'n verhoogde bloed kolloïdale osmotiese druk en hematokrit verantwoordelik is. Stres is dikwels die snellermeganisme vir die vrystelling van gestoorde toksiese stowwe in die lewer. 'n Skielike massiewe afbreek van rooibloedselle volg met resulterende nierversaking. Hierdie toestand word toegeskryf aan verstopping van die nierbuissies met hemoglobien en selle van die nierbuissies wat deur die nekrotiseringseffek van die hoë koperkonsentrasie veroorsaak is. Die eerste tekens van die hemolitiese krisis word gewoonlik gevolg deur koma en die dood (Luckey en Venugopal, 1977; Venugopal en Luckey, 1978; Howell en Gooneratne, 1987; Camakaris, 1987; Gummow *et al.*, 1991).

Die term vir bogenoemde gebeure is kroniese kopervergiftiging, maar die term is misleidend omdat die inname van koper kronies is terwyl die begin van toksikose ernstig en akute is as gevolg van die skielike vrystelling van koper deur die lewer (Gummow *et al.*, 1991).

Verder het Gummow *et al.* (1991) vasgestel dat 'n groot oopgroef-kopermyn en 'n kopersmeltery, tussen die plaas waarop die beeste aan kopervergiftiging gevrek het en die Wesgrens van die Nasionale Krugerwildtuin by Phalaborwa, gelokaliseer was. Die lokale lughawe se weerdata het getoon dat die windrigting oorheersend 'n suidoostewind was. Enige afvalstowwe sou dus hoofsaaklik in 'n noordwestelike rigting na die plaas toe gewaai word. Minder dikwels het die wind in die rigting van die Krugerwildtuin gewaai (Fig. 1.1). Grondanalises in die Krugerwildtuin, oos en suidoos van die myn, het getoon dat die gemiddelde koperkonsentrasie in oppervlakgrond,  $67.5 \pm 63$  dpm en in diep grond,  $2 \pm 0$  dpm was. Die koperkonsentrasies in gras en oppervlakgrond, windaf van die smeltery van die kopermyn, was hoër as die aanvaarbare maksimum van 10 dpm in gras (Osweiler *et al.*, 1985). Monsters wat buite die rigting van die heersende winde naby die smeltery geneem is en monsters wat verder weg van die smeltery geneem is, se kopervlakke was laer. Dit het dus gelyk of dié verspreiding van koper verband hou met die rigting van die heersende wind en die afstand van die smeltery af. Die koperkonsentrasies in die diep-grondmonsters was in feitlik alle gevalle aansienlik laer as die van oppervlakgrond en in die meeste gevalle binne aanvaarbare vlakke. Hierdie aansienlike verskil tussen koperkonsentrasies van oppervlak- en diep-grondmonsters, dui daarop dat die hoof bron van koper waarskynlik deur lugbesoedeling veroorsaak is. Die laer koperkonsentrasie van gewaste gras dui daarop dat baie van die koper in die stof op die plante teenwoordig was.

Die gemiddelde koperkonsentrasie in die lewers van rooibokke wat gedurende Oktober 1989 in verskillende gebiede van die Krugerwildtuin deur Gummow *et al.* (1991) versamel is, was as volg:

Area E (Dieselfde area as Projek-N): Skukuza-omgewing:  $25.84 \pm 15.96$  dpm nat basis (NB)



(Fig. 1.2).

**Area X:** Die gebied tussen die Phalaborwa/Letabapad, die Tshutshi-spruit, (Gummow *et al.*, 1991 het die Mashengani-spruit verkeerdelik die Tshutshi-spruit genoem), die Olifantsrivier en die Krugerwildtuin se wesgrens:  $226,67 \pm 96,68$  dpm (NB) (Fig. 1.1).

**Area Y:** Gebied noord van die Phalaborwa/Letaba toeristepad en oos van die Tshutshi-spruit (Mashengani):  $88,28 \pm 46,04$  dpm (NB) (Fig. 1.1).

Dit toon dat die gemiddelde koperkonsentrasie in lewers van rooibokke, geskiet in area X, statisties betekenisvol ( $\alpha = .05$ ) hoër was as die van area E (Skukuza, 133 km suidoos van Phalaborwa-hek) en dié van rooibokke in area Y (noordoos of ver oos van die kopersmeltery). Die lewerkoperkonsentrasies vir rooibokke geskiet te Skukuza (Area E), was volgens Gummow *et al.* (1991) van dieselfde orde as dié wat deur Boyazoglu *et al.* (1972) as normaal vir vrylopende rooibokke in die natuur gerapporteer is nl.  $26,9 \pm 11,9$  dpm (NB).

Fig. 1.1 : STUDIE-AREAS VAN DIE PHALABORWAHEK-OMGEWING

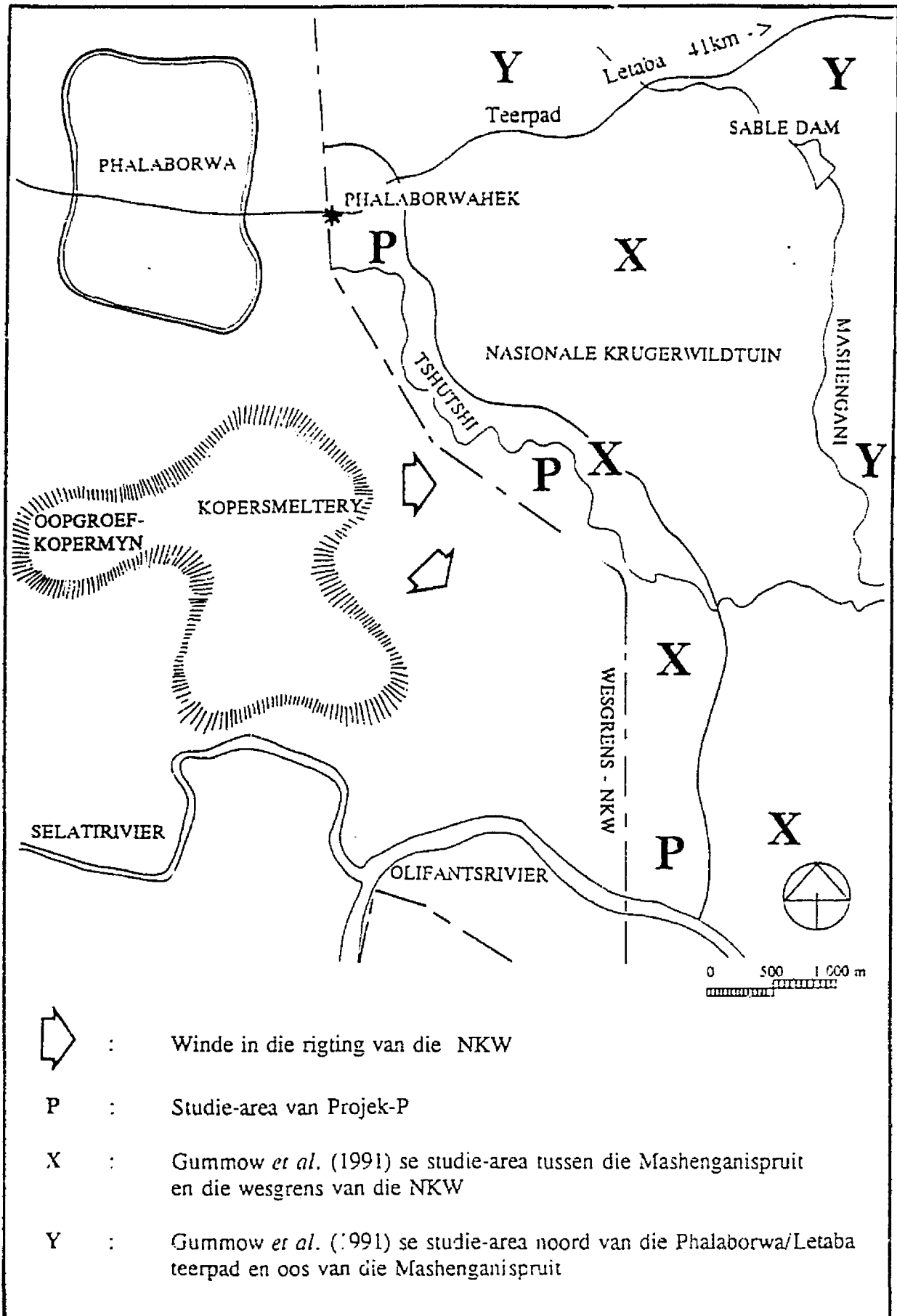
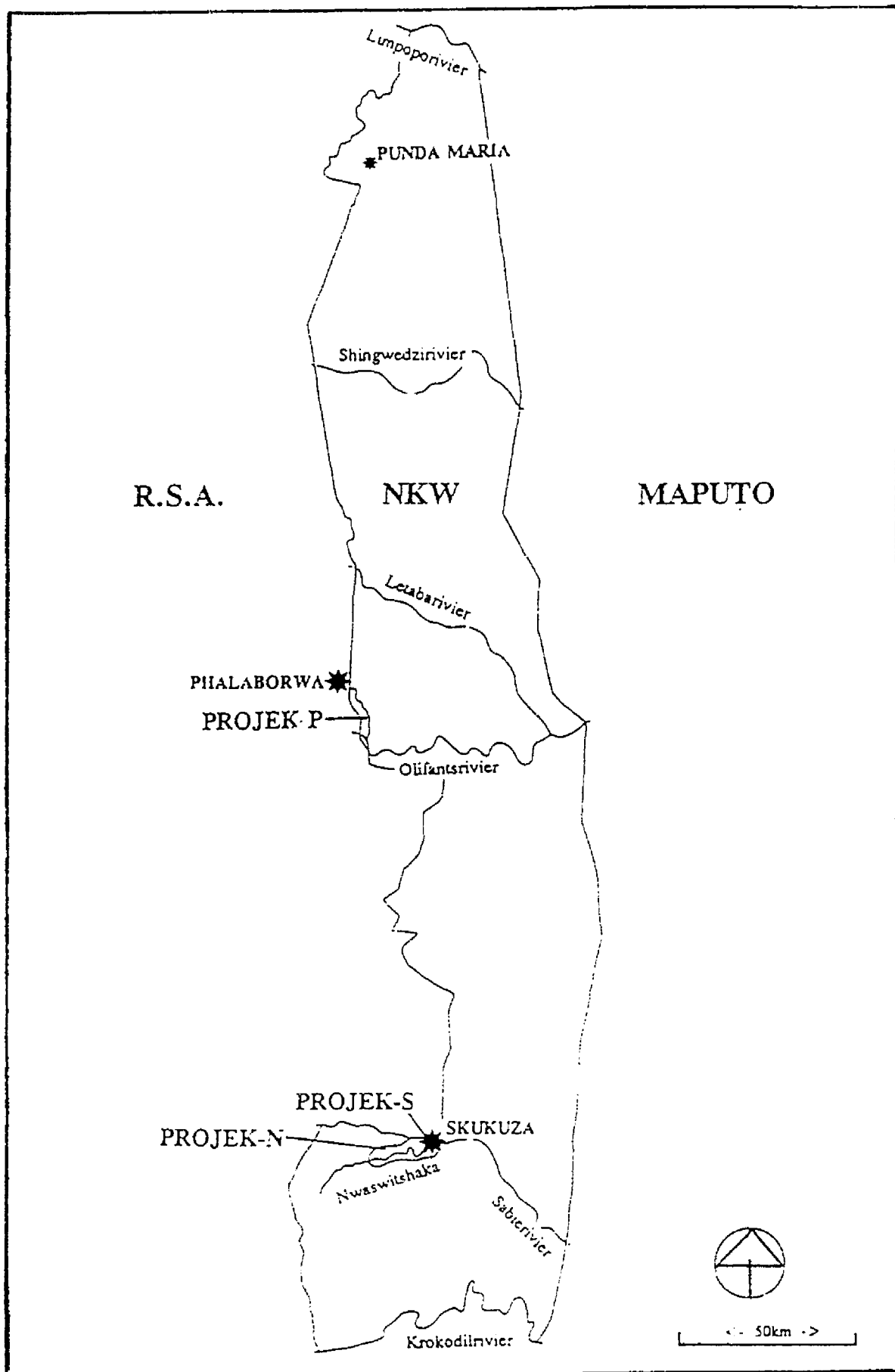


Fig. 1.2 : DIE NASIONALE KRUGERWILDTUIN (NKW)



#### 1.4 Die Studie-area

Die Nasionale Krugerwildtuin is geleë in die Republiek van Suid-Afrika tussen 22°25' tot 25° 32' Suide-breedtegraad en 30° 50' tot 32° 02' Ooste-lengtegraad. Dit is 'n lang, slank gebied wat van noord na suid ongeveer 320 km lank is en gemiddeld ongeveer 65 km breed is. 'n Inleidende beskrywing is deur Joubert (1986) gepubliseer. Die studie-areas van hierdie verhandeling lê in die omgewings van Phalaborwa-hek en Skukuza in hierdie nasionale park (Fig. 1.1, 1.2).

Studie-area P bestaan uit 'n strook grond tussen die Phalaborwa/Letabapad en die Olifantsrivier al langs die wesgrens van die Krugerwildtuin en vorm deel van twee landskappe wat deur Gertenbach (1983) beskryf is (Fig. 1.1, 1.2).

Studie-area N bestaan uit 'n gedeelte van die Nwaswitshakaspruit en die Skukuza-omgewing. Die landskap waarin hierdie studie-area geleë is, is ook deur Gertenbach (1983) beskryf (Fig. 1.1, 1.2).

Alhoewel die studie-areas in die Krugerwildtuin van mekaar verskil het, het die rooibokbevolkings van die twee gebiede, in wisselwerking met die fisiese omgewing en ander bevolkings van die gebiede, daarin geslaag om oor 'n tydperk wat waarskynlik oor eeue strek, natuurlike rooibokbevolkings te handhaaf en 'n nis in beide gebiede te vul. Die ekologiese samestelling van die twee studiegebiede het die natuurlike status van die twee rooibokbevolkings vir 'n baie lang tyd gehandhaaf. Dié status kan hoofsaaklik deur katastrofes, waaronder langdurige droogtes, epidemies en besoedeling van die habitat die belangrikstes is, bedreig word.

----- oOo -----

## HOOFSTUK 2

### MATERIAAL EN METODEDES

#### 2.1 Inleiding

Rooibokke wat in navorsing op kopervergiftiging onder leiding van dr. D.G. Grobler (Veldwagter, NKW) gebruik is, het vir die doeleindes van hierdie studie as 'n bron van sporme gedien. Sy studie het uit twee projekte bestaan:

#### 2.2 Phalaborwaprojek: (Projek - P)

Die studie-area in die NKW van projek-P sluit die direkte omgewing van die Phalaborwa-hek en die gedeelte suid van bogenoemde hek al langs die wesgrens tot teen die Olifantsrivier in. Die grootste gedeelte van die Tshutshispruit lê in hierdie gebied. Hierdie studie-area stem ooreen met die westelike gedeelte van Gummow *et al.* (1991) se gebied-X wat wes van die Mashenganispruit gelê het (Fig. 1.1). Rooibokke uit hierdie gebied het deel gevorm van die eksperimentele groep aangesien die weiding van hierdie gebied met koper besoedel was.

#### 2.3 Skukuzaprojek : (Projek-S)

Aanvanklik is 30 diere deur dr. D.G. Grobler gevang en in 3 groepe van 10 elk te Skukuza in aparte bomas aangehou en gevoer. Groep 1 is antilooptkorrels van Epol, waarby 5 kg kopersulfaat/ton gevoeg is, gevoer. Groep 2 se dosis kopersulfaat was 1.5 kg/ton antilooptkorrels van Epol en groep 3 het antilooptkorrels van Epol sonder kopersulfaat ontvang. Byvoeding van lusern en varsgesnyde takke met blare is aan al drie groepe voorsien in hoeveelhede wat min genoeg was om die diere te dwing om ook van die antilooptkorrels te vreet.

Een dier uit elke groep is maandeliks, vanaf 1992.10.06 tot 1993.05.15 uit elke groep getermineer, totdat leeus gedurende die nag van 1992.12.01 die sewe oorblywende rooibokke van groep 1 in hulle boma doodgebyt het. Die leeus het daarin geslaag om oor 'n hoë heining van ongeveer 2.5 meter te kom. Alhoewel die leeus spoedig weggejaag is, is al die skrotums afgebyt en was dit nie moontlik om hierdie diere se sperme direk na hulle dood te versamel nie.

Daar is besluit om met die projek voort te gaan en om die dosis van groep 2 te verhoog na 5 kg kopersulfaat/ton, terwyl groep 3 geen kopersulfaatbyvoegings in hulle voedsel ontvang het nie. Vir die doeleindes van hierdie projek is al die rooibokke wat aan voedsel met 'n hoë koperinhoud blootgestel is, as deel van 'n eksperimentele groep beskou. Groep 3 het deel van 'n kontrolegroep gevorm.

#### **2.4 Nwaswitshaka - projek (Projek - N)**

Hierdie projek van dr. L.E.O. Braack, 'n entomoloog gestasioneer te Skukuza, was 'n derde bron van rooiboksperme.

Die studiegebied van projek-N het hoofsaaklik uit 'n gedeelte van die Nwaswitshakaspruit en die direkte omgewing van Skukuza bestaan. Die gebied was nie met koper besoedel nie en die sperme van hierdie diere kon dus ook as 'n kontrolegroep beskou word (Gummow *et al.*, 1991). 'n Motivering vir die proefuitleg, saamgestel uit diere van projekte P, S en N, word in hoofstuk 5 aangebied.

Vir etiese en ekonomiese redes is dit noodsaaklik dat diere wat gedood word so sinvol en produktief as moontlik aangewend word. Verskeie navorsers het van die geleentheid gebruik gemaak om aan bogenoemde projekte deel te neem en die projekte is goedgekeur deur die

Komitee vir Etiek van die Nasionale Krugerwildtuin. Die skrotums van elke rooibokram van bogenoemde drie navorsingsprojekte is beskikbaar gestel vir die doel van hierdie studie.

## 2.5 Versameling van sperme

Tussen 1992.06.09 en 1993.05.15 is die NKW tien keer vir 'n periode van ongeveer 5 dae besoek om sperme van rooibokke, wat in bogenoemde projekte getermineer is, te versamel. Die datums en die getal diere per besoek versamel, word in hoofstuk 5, tabel 5.1 en 5.2 weergegee.

### **Eksperimentele groep.**

Die eksperimentele groep is as volg saamgestel:

Projek-P = 32 rooibokke

Projek-S = 12 rooibokke

-----

Totaal = 44 rooibokke

-----

Hierdie diere was almal tot 'n mindere of meerdere mate onderworpe aan koperbesoedelde voedsel.

### **Kontrolegroep**

Die kontrolegroep is as volg saamgestel:

Projek-S = 6 rooibokke

Projek-N = 14 rooibokke

-----

Totaal: = 20 rooibokke

-----

Hierdie diere se voedsel was nie met koper besoedel nie.

## 2.6 Versameling van skrotums

Dr. D.G. Grobler en mnr H.A. Schreiber, Streeksveldwagter te Phalaborwa-hek, het die rooibokramme van projek-P met 'n gepaste klein kaliber geweer in die kop of nek geskiet.

Daarna is die skrotum afgesny, van 'n etiket met dieselfde nommer as die dier voorsien, in 'n plastiese sak geplaas en gepoog om die skrotum by die tydelike laboratorium af te lewer terwyl dit nog warm en die sperme nog lewendig was. 'n Draagbare verkoelingseenheid, vervaardig deur Coleman, wat met behulp van die voertuig se battery ook kon verhit, het gedurende die winter gehelp dat die temperatuur van die testis nie onder 30°C daal nie. Sorg moes egter gedra word dat die temperatuur nie oor 36° C styg nie aangesien die sperme baie gevoelig is vir hoër temperature. 'n Koelsak, waarin papier toegedraaide skrotums geplaas is, het ook goeie resultate gelever en was in die veld makliker hanteerbaar.

Die rooibokramme in aanhouding (Projek-S) is met chemiese middels getermineer wat deur middel van 'n pylgeweer en 'n immobiliseringspyl toegedien is (Hattingh *et al.*, 1988, 1990). Die skrotum is onmiddelik na dood afgesny en in 'n plastiese sakkie na 'n nabygeleë tydelike laboratorium geneem.

Dr. L.E.O. Braack, het die rooibokke van projek-N met 'n gepaste kleingeweer geskiet en maatreëls is getref om die skrotums so spoedig as moontlik by die tydelike laboratorium te besorg. Die meeste sperme van elke monster, waarvan 'n video-opname gemaak is, was nog lewendig net voor fiksering.

## 2.7 Fiksering van sperme

In die tydelike laboratorium is die testis uit die skrotum verwyder en die epididymis uitgedissekteer. Die punt van die cauda epididymis is met 'n skêr afgesny en die epididymis is saggies in die rigting van die afgesnyde punt gemelk. Die versamelde sperme is in 'n Petri bakkie met 4 ml Earle se gebalanseerde soutoplossing (EBSS; Earle, 1943), wat in 'n 220



volt Electrothermal warmbad by 'n konstante temperatuur van 34°C gehou is, afgewas. Vyf mikroliter van die spermsuspensie is met 'n mikropipet op 'n mikroskoopvoorwerpglasie geplaas, versprei en met 'n dun dekglasie bedek. Met behulp van 'n Nikon Optiphot, en later 'n Leitz Laborlux 12 ligmikroskoop, waarop 'n National Panasonic F15 videokamera met 'n battery-aangedrewe National NV-180 draagbare videokassetopnemer gemonteer is, is video-opnames van alle versamelde sperms gemaak.

Die Nikon ligmikroskoop was met fase-kontras, 'n 10x vergroting oogstuk, 'n 20x en 'n 40x vergroting objektieflens toegerus. Die Leitz ligmikroskoop kon met 220 of met 12 volt gebruik word en 'n 10x vergroting oogstuk met 25x en 40x vergroting objektieflense is vir opnames gebruik. Die helfte van die spermsuspensie is na die opnames, wat ongeveer 'n minuut in beslag geneem het, gefikseer in 4 ml 4% glutaraaldehid fikseermiddel in Millonig se fosfaatbuffer vir latere voorbereiding vir SEM-studies (Millonig, 1961). Die ander helfte van die spermsuspensie is op dieselfde wyse vir TEM-studies gefikseer.

Gedurende die studietydperk is daar vir elke dier 'n afsonderlike werksdokument opgestel waarop relevante data en tersaaklike gegewens aangeteken is. Dit het die volgende gegewens ingesluit:

Spesie:	Nommer van dier:
NKW-nommer:	Datum:
Ouderdom:	Lokaliteit:
Tyd geskiet:	Tyd semen versamel:
Toetse uitgevoer:	Koperwaardes in lewer, nier en long:
Koperwaardes, ander organe:	Spermmates:
Tellings van normale en abnormale sperme:	Nommering en beskrywing van mikrograwe:
Take vir ander wetenskaplikes uitgevoer:	Algemene kommentaar:

## 2.8 Skandeer-elektronmikroskopie (SEM)

### 2.8.1 Voorbereiding van sperme (SEM)

Onder die leiding van mnr. H.J.Els, hoof van die Elektronmikroskopie Eenheid van die Universiteit van Pretoria te Onderstepoort, is ongeveer 1 ml van die gefikseerde sperme by 4 ml van Dulbecco se fosfaat gebufferde soutoplossing (DPBS) gevoeg en die spermselle teen 'n lae spoed (100 g) vir 10 minute in 'n bank sentrifuge afgeswaai (Dulbecco en Vogt, 1954). Die materiaal is hersuspendeer in 1 ml DPBS en 2 druppels gepipetteer op 'n 8x8 mm mika vierkant en vir 30 minute gelaat om te verseker dat genoeg sperme op die mikaplaatjies adsorbeer. Die mika was reeds behandel met 0.1% poli-L-lysien (Murphy, 1982) en in 'n poli-etileen dekseltjie geplaas. Na adsorpsie van die sperme is die hele dekseltjie stadig met DPBS gevul en turbulensie so ver as moontlik vermy. Na 5 minute is die DPBS stadig met 'n pipet verwyder en die sperme opeenvolgend vir 5 minute elk met 25%, 50%, 75%, 96% en 100% etanol gedehidreer op 'n soortgelyke wyse soos met buffer. Vervolgens is die sperme in 'n kritiese-punt-droër met CO<sub>2</sub> gedroog, die mika met koolstof op 'n aluminiumknopie gemonteer en met goud bestuif.

Met behulp van 'n Philips XL20 SEM teen 10 KV is die sperme van 40 rooibokke bestudeer. Mates van 'n totaal van 95 normale sperme van 19 verskillende diere is geneem deur van die beeld-analise sisteem van bogenoemde elektronmikroskoop gebruik te maak. Die gegewens is in elke dier se werksdokument aangeteken en die gemiddeld en standaardafwyking van elke stel mates bereken.

### 2.8.2 Kwantitatiewe analiseringsmetode (SEM)

'n SEM-studie is gedoen van normale en abnormale sperme van net 40 van die 64 beskikbare diere, omdat die baie jong diere nie genoeg sperme gelewer het om 'n TEM- en 'n SEM-studie te onderneem nie. Aangesien 'n TEM-studie vir hierdie ondersoek van meer belang was, is al die sperme in bogenoemde gevalle vir die TEM-studie gebruik.

Die gegewens is kwantitatief ge-analiseer deur 5082 sperme van 40 rooibokke by 1 000 x vergroting te ondersoek en die volgende vir elke dier aan te teken:

Getal sperme bestudeer:

Getal sperme wat normaal voorgekom het:

Getal sperme met 'n Dagdefek:

Getal sperme met 'n geluste flagellum:

Getal sperme met 'n dubbel flagellum:

Persentasies is vir normale sperme en die abnormaliteite van die sperme van bogenoemde 40 diere bereken en daarna is dieselfde gedoen vir 'n kontrolegroep bestaande uit 9 rooibokke wat deel gevorm het van bogenoemde 40 diere. Hierdie kontrolegroep se voedsel was nie met koper besoedel nie en die gemiddelde koperkonsentrasie in die lewers van hierdie diere was 37.9 dpm (NB).

Dieselfde berekening is ook gedoen vir 'n eksperimentele groep van 31 rooibokke (die res van die groep van 40) met 'n gemiddelde koperkonsentrasie van 104.1 dpm (NB) in die lewer. Hierdie eksperimentele groep se voedsel was wel met koper besoedel.

## 2.9 Transmissie-elektronmikroskopie (TEM)

### 2.9.1 Voorbereiding van sperme (TEM)

Ongeveer een ml van die gefikseerde sperme is afgeswaai soos wat vir SEM beskryf is. Die materiaal is in 2 druppels 4% glutaaraldehyd in Millonig se fosfaatbuffer fikseermiddel hersuspendeer, oorgedra na mikro-hematokrit buisies en vir 3 minute in 'n hematokrit sentrifuge afgeswaai. Die materiaal is gespoel in Millonig se fosfaatbuffer, postfikseer in osmiumtetra-oksied ( $\text{OsO}_4$ ), gedehidreer met 'n gegradeerde etanol reeks en ingebed in EMbed 812 hars (EMbed-verspreiders: Electron Microscopy Sciences). Dun sneë is gesny met 'n diamantmes en gekleur met uranielasetaat en loodsitraat.

'n Philips CM10 TEM bedryf teen 80 KV, is gebruik om die ultrastruktuur van sperme uit die cauda epididymis van vier-en-sestig rooibokke te bestudeer. Al die beskikbare diere van Phalaborwa en Skukuza is vir hierdie doel aangewend. Slegs spermsneë wat nie 'n erkende strukturele abnormaliteit getoon het nie, is gebruik om die ultrastruktuur van 'n normale rooiboksperm te beskryf. Holstein *et al.* (1988) en Menkveld *et al.* (1991) se metodes om spermabnormaliteite van die mens direk met behulp van TEM mikrograwe te dokumenteer, is nagevolg om abnormaliteite van rooiboksperme te beskryf.

Alle diere wat met koperbesoedelde voedsel in aanraking gekom het se resultate is beskou as die eksperimentele groep. Hierdie groep het bestaan uit die diere van die Phalaborwaprojek (EP; E = eksperiment en P = projek-P) wat afhanklik was van die natuurlike weiding wat moontlik deur die omgewing se kopersmeltery se

rook met sulfate, sulfiedes en oksiedes van koper besoedel is (Gummow *et al.*, 1991; Grobler, persoonlike kommunikasie, 1995) en die diere in aanhouding, ingeslote onder dr. D. G. Grobler se Skukuzaprojek (ES; E = eksperiment en S = projek-S), wat kopersulfaat saam met voedingspille gevoer is.

Die kontrolegroep het bestaan uit diere wat beskikbaar gestel is deur dr. Leo Braack se Nwaswitshakaprojek (KN; K = kontrole en N = projek-N). Hierdie diere is hoofsaaklik versamel in die Nsaswitshakaspruit se dreineringskom en die weiding is nie met koper besoedel nie. Die res van die kontrolegroep het bestaan uit diere in aanhouding van die Skukuzaprojek (KS; K = kontrole en S = projek-S), wat nie kopersulfaat saam met hulle voedingspille gevoer is nie.

Wilcoxontoetse is uitgevoer op die data van die kwantitatiewe analise van die EP-, ES-, KN- en KS-groep wat as 'n motivering vir bogenoemde proefuitleg gedien het (Kyk hoofstuk 5).

'n Normale sperm van die rooibok is beskryf deur gebruik te maak van sneë wat geen erkende abnormaliteite vertoon het nie. Die abnormaliteite wat by rooibokspersmsneë waargeneem is, is met behulp van TEM-mikrograwe beskryf.

### **2.9.2 Kwantitatiewe analiseringsmetode (TEM)**

Vir 20 kontrole- en 44 eksperimentele rooibokke is 25 lengte- of dwarsneë wat 'n gedeelte van die akrosoom en die nukleus vertoon het, 10 planêre- of saggitale sneë deur die flagellumnek wat die organelle van die nek vertoon het en 25 lengte- of dwarsneë van die flagellum wat die hoofstuk se organelle vertoon het,

bestudeer.

Die volgende voorbeeld verduidelik die tel-metode wat vir die analisering van die data van die TEM-sneë gebruik is:

**Voorbeeld.**

Dokumenteer die volgende waarnemings van elke rooibokspermmonster wat ondersoek is:

Getal sneë ondersoek	:	10	(100%)
Getal sneë normaal	:	3	( 30%)
Getal sneë abnormaal	:	7	( 70%)
Abnormaliteit (1)	:	Gevind by 7 van die 10 TEM-sneë = 70%	
Abnormaliteit (2)	:	Gevind by 5 van die 10 TEM-sneë = 50%	
Abnormaliteit (3)	:	Gevind by 3 van die 10 TEM-sneë = 30%	

Alle abnormaliteite word vir elke snee gedokumenteer.

Uit bogenoemde is dit duidelik dat 'n totaal van 15 abnormaliteite, bestaande uit drie soorte abnormaliteite, by sewe van die sperme gevind is. Dit is dus moontlik dat die som van die soorte abnormaliteite se persentasie 100% kan oorskrei.

Indien die abnormaliteite van die spermek buite rekening gelaat word, was die persentasie afwykings van die res van die middelstuk so gering dat dit ooglopend nie tot hierdie studie 'n bydrae sou maak nie en is die abnormaliteite beskryf maar nie kwantitatief geanaliseer nie.

Die gegewens saamgevat in tabel. 5.1 en 5.2 van hoofstuk 5, weerspieël die resultate van bogenoemde studie.

**a Spermkopsneë: (25/rooibok)**

(i) Elke spermkopsnee wat een of meer abnormaliteite vertoon het, is as 'n abnormalesnee gedokumenteer. Die som van die persentasies abnormale spermkopsneë vir 'n spesifieke dier kon dus  $>$  as 100% wees.

(ii) Die volgende maklike herkenbare abnormaliteite is gedokumenteer:

1. Akrosoomafwykings.
2. Akrosoomlipvorming (Aanvanklik is gedink dat hierdie defek 'n spesiale bydrae tot die studie sou lewer en daarom is dit apart van bogenoemde gedokumenteer).
3. Dagdefek ge-assosieer met die spermkop.
4. Nukleusafwykings.
5. Bizarre spermkoppe.

(iii) Bogenoemde afwykings is elkeen vir elke rooibok as 'n persentasie gedokumenteer ten einde hierdie gegewens op 'n grafiek se y-as te stip teenoor die koperkonsentrasie in die lewer van die spesifieke rooibok op die x-as.

(iv) Die gemiddelde persentasie vir elke abnormaliteit is as volg vir die kontrolegroep en die eksperimentele groep bereken:

### **Kontrole**

**Spermkop:** Som van persentasies van elke abnormaliteit van 20 rooibokke  $\div 4 =$   
 $X \div 500 \times 100 =$  Gemiddelde persentasie (kyk tabel 5.1, hoofstuk 5).

### **Eksperiment**

**Spermkop:** Som van persentasies van elke abnormaliteit van 44 rooibokke  $\div 4 =$   
 $X \div 1\ 100 \times 100 =$  Gemiddelde persentasie vir die spesifieke abnormaliteit (Kyk tabel 5.2, hoofstuk 5).

#### **b Flagellumneksneë: (10/rooibok)**

- (i) Elke neksnee wat een of meer abnormaliteit vertoon het, is as 'n abnormale snee gedokumenteer. Die som van die persentasies abnormale spermsneë vir 'n spesifieke dier kon dus  $>$  as 100% wees.
- (ii) Die volgende abnormaliteite is aangeteken.
1. Nekke met gesegmenteerde kolom vakuoles.
  2. Ander abnormaliteite van die nek byvoorbeeld: abnormale inplanting, geknakte nek, verdringing of beskadiging van organelles deur vakuoles en afwykings van die basale plaat. Afwesigheid van organelle soos gesegmenteerde kolomme en die mitochondria van die pars ascendens is nie aangetoon nie aangesien dit moeilik is om te bepaal of hierdie organelle in die snee afwesig is of nie raak gesny is nie.
- (iii) Dieselfde as punt 3 van spermkopsneë.



- (iv) Die gemiddelde persentasie vir elke abnormaliteit is as volg vir die kontrolegroep en die eksperimentele groep bereken:

### **Kontrole**

**Flagellumnek:** Som van persentasies van elke abnormaliteit van 20 rooibokke  $\div 10 = X \div 200 \times 100 =$  Gemiddelde persentasie vir die spesifieke abnormaliteit.

### **Eksperiment**

**Flagellumnek:** Som van persentasies van elke abnormaliteit van 44 rooibokke  $\div 10 = X \div 440 \times 100 =$  Gemiddelde persentasie vir elke spesifieke abnormaliteit.

### **c Hoofstuksneë: (25/rooibok)**

- (i) Hoofstuksneë wat een of meer abnormaliteite vertoon het, is as 'n abnormale snee gedokumenteer. Die som van die persentasies abnormale spermsneë vir 'n spesifieke dier kon dus  $>$  as 100% wees.
- (ii) Die volgende abnormaliteite is aangeteken:
1. Hoofstukvakuool.
  2. Ander abnormaliteite byvoorbeeld afwykings van die aksoneem en veselagtige skede.
  3. Dagdefek - nie op spermkop gevorm nie.
- (iii) Dieselfde as punt 3 van spermkopsneë.

- (iv) Die gemiddelde persentasie vir elke abnormaliteit is as volg vir die kontrole- en die eksperimentele groep bereken.

### **Kontrole**

**Hoofstuk:** Dieselfde as vir die spermkop.

### **Eksperiment**

**Hoofstuk:** Dieselfde as vir die spermkop.

## **2.10 Grafiese Analise**

Die grafiese analise van die data, vervat in tabel 5.1 en 5.2, is op die volgende wyse onderneem:

Eerstens is alle afhanklike data-reekse (y-as) teenoor die onafhanklike data-reeks (x-as, dpm koper in lewer) gestip om enige ooglopende tendense in die data waar te neem sodat die toepaslike reeks modelle geïdentifiseer en gepas kon word.

'n Pakket van "Statgraphics" (Ver. 6.1) is gebruik om alle grafiese voorstellings te maak asook die regressies te doen.

In sekere gevalle moes meer as een kromme gepas word om die beste passing te bepaal.

Alle grafiese analises van die data is onder die leiding van professor H.T. Groeneveld van die Departement Statistiek van die Universiteit van Pretoria, deur mnr R. Ehlers uitgevoer.

## **2.11 Die bepaling van koperkonsentrasies in rooibokorgane**

Dr. D.G. Grobler het gefikseerde monsters van die lewer, long en hart van elke rooibok, afkomstig van studie-area P en S, vir 'n analitiese toksikologiese ondersoek aan die Toksikologie Seksie van die Onderstepoort Veterinêre Instituut gestuur. Hier is koperwaardes in bogenoemde organe onder leiding van dr. N. Fourie deur mev. Karen Basson bepaal. Koperwaardes in die organe van rooibokke is bepaal met die suurverteringsmetode en 'n evaluasie van die oplossing met behulp van 'n atoomabsorpsie-spektrofotometer .

Tydens die projek is verskeie duplikaat monsters vir 'n kontrole onder fiktiewe nommers vir die bepaling van koperwaardes ingestuur. Die gemiddelde waardes van die duplikate en die oorspronklike materiaal het met 4% verskil (D.G. Grobler, persoonlike kommunikasie, 1993).

Koperwaardes is ook by bogenoemde instansie in die testisse van 17 rooibokke uit die Phalaborwa-gebied, 3 rooibokke uit die Nwaswitshaka-kontrolegroep en 3 rooibokke uit die eksperimentele groep van die diere in aanhouding te Skukuza, bepaal.

Die koperwaardes is aangeteken in dele per miljoen (dpm) wat gelykstaande is aan milligram per kilogram (mg/Kg).

## **2.12 Die bepaling van rooibokke se kondisie**

Volgens Brooks et al. (1977), is die droë massa van beenmurg, uitgedruk as 'n persentasie van die vars massa, 'n goeie kwantitatiewe waardering van die beenmurg se vetinhoud.

**Algemene formule:**

$$\% \text{ Murgvet} = \% \text{ Droë massa van murg} - 7$$

Bogenoemde formule is gebruik om die kondisie van soveel as moontlik van die rooibokke kwantitatief te bepaal (Kyk tabel 5.1 en 5.2). Dieselfde metode word ook deur beamptes van die Nasionale Krugerwildtuin gebruik vir 'n kwantitatiewe evaluasie van die kondisie van antilooopspesies.

----- oOo -----

## HOOFSTUK 3

### 'n SKANDEER-ELEKTRONMIKROSKOPIESE ONDERSOEK VAN ROOIBOKSPERME

#### 3.1 Inleiding

Pioniernavorsers was beïndruk met die feit dat die struktuur van diere se spermselle (in teenstelling met eierselle) so variëer dat selfs naverwante spesies, tipiese verskille vertoon. Volgens Mann en Lutwak-Mann (1981), het Wagner en Leuckhart in 1852 selfs voorgestel dat: "one may often safely venture to infer from the specific shape of these elements the systematic position and the name of animals investigated". Negentiende eeuse pioniers soos Ballowitz, Jensen, Meves, Retzius en andere het daarin geslaag om met behulp van die ligmikroskoop teen 1900 te bepaal dat 'n tipiese flagellumdraende sperm 'n plasmalemma besit wat die hele sperm bedek. Hulle het verder bepaal dat die sperm uit 'n kop met 'n akrosoom en nukleus en uit 'n flagellum met 'n nek, middelstuk, hoofstuk en endstuk bestaan (Mann en Lutwak-Mann, 1981).

Die bestudering van soogdiersperme met behulp van 'n ligmikroskoop het egter beperkinge. Skanderelektronmikroskopie (SEM) bied hoër vergrotings en beter resolusie waardeur fyner detail duideliker waargeneem kan word vir 'n beter evaluasie van spermmorfologie (Conradie *et al.*, 1988). 'n Beter drie-dimensionele beeld van die sperm word verkry en as gevolg van die hoër resolusie kan die oppervlakstruktuur van die sperm beter bestudeer word en akkurate dimensies van verskillende komponente van die sperm bepaal word (Fujita *et al.*, 1970; Liakatas *et al.*, 1982; Bonet, 1990; Soley, 1992; Van der Horst *et al.*, 1991). Behalwe vir

ligmikroskopiese studies van sekere ander aspekte van rooiboksperme deur Fairall (1971), Skinner (1971) en Dott en Skinner (1989), is daar sover bekend geen elektronmikroskopiese studies van die ultrastruktuur van hierdie diersoort se sperme gedoen nie.

## 3.2 Metode

Sperme uit die cauda epididymis van 40 rooibokke is met SEM bestudeer. Mates van die kop, middelstuk, hoofstuk en endstuk is van 95 normale sperme van 19 verskillende gesonde rooibokke verkry deur van die beeld-analise sisteem van die Philips XL 20 SEM gebruik te maak. 'n Vollediger beskrywing van die metode word in hoofstuk 2 aangebied.

## 3.3 Resultate

### 3.3.1 Normale sperm

'n Normale rooiboksperm het, tipies vir 'n soogdiersperm, twee prominente dele nl. 'n kop en 'n flagellum gehad (Fig. 3.1). Die kopoppervlakte was duidelik in 'n akrosomale area en 'n post akrosomale area deur die ekwator verdeel (Fig. 3.2, 3.3). Die flagellum het uit vier dele bestaan: die nek, middelstuk, hoofstuk en endstuk (Fig. 3.1). Die gemiddelde totale lengte van rooiboksperme was  $59.23 \pm 2.7 \mu\text{m}$ .

#### a. Die kop

Die spermkop was 'n plat, spaanvormige struktuur met 'n afgeplatte basis (Fig. 3.4). Gemiddelde mates met standaardafwykings was die volgende:

**Kop-mates (n = 95)**

Kop-lengte :  $7.59 \pm 0.61 \mu\text{m}$

Kop-wydte

(Halfpad tussen apikale punt en basis) :  $4.81 \pm 0.49 \mu\text{m}$

Kop-dikte (Dorso/ventraal) (SEM)	: $0.89 \pm 0.15 \mu\text{m}$
Kopdikte (TEM)	: $0.65 \pm 0.05 \mu\text{m}$
Kopbasis-wydte	: $2.13 \pm 0.33 \mu\text{m}$
Akrooomlip-dikte (Gemeet vanaf apikale punt in die rigting van die kopbasis)	: $0.58 \pm 0.12 \mu\text{m}$

Die akrooom het ongeveer twee derdes van die apikale gedeelte van die kop bedek en het 'n duidelike eenkantige verdikking aan die rand van die kop op een plat vlak getoon. Die verdikking was die dikste op die voorste rand van die kop en het langs die sye geleidelik verdun totdat dit naby die ekwator verdwyn het (Fig. 3.2). 'n Ekwator het soms onder hoë vergroting, klein onreëlmatige kartelings of uitskulpings vertoon en het die akrooom en die post akrosomale digte lamina duidelik van mekaar geskei (Fig. 3.3).

#### **b. Die flagellum**

Die flagellum was 'n slank struktuur wat geleidelik vanaf die nek tot by die endstuk verdun het (Fig. 3.1). Gemiddelde mates met standaardafwykings was die volgende:

##### **Flagellum-afmetings (n = 95)**

Flagellum, totale lengte	: $51.72 \pm 2.36 \mu\text{m}$
Middelstuk - lengte (nek ingesluit)	: $10.39 \pm 0.7 \mu\text{m}$
Middelstuk - dikte	: $0.62 \pm 0.11 \mu\text{m}$
Hoofstuk - lengte	: $38.27 \pm 2.2 \mu\text{m}$

Hoofstuk - dikte	: $0.46 \pm 0.09 \mu\text{m}$
Endstuk - lengte	: $3.32 \pm 0.7 \mu\text{m}$
Sitoplasma druppel - lengte	: $2.51 \pm 0.31 \mu\text{m}$
Sitoplasma druppel - dikte om middel	: $1.64 \pm 0.44 \mu\text{m}$

**c Die middelstuk en nek**

SEM mikrograwe het die aansluiting van die kop en nek duidelik gedemonstreer (Fig.3.2). Suboppervlak-strukture was nie duidelik sigbaar nie behalwe dat die pars spiralis soms redelik prominent onder die plasmalemma waargeneem kon word (Fig. 3.4, 3.9). Die nek-area het glad voorgekom en daar was nie 'n verskil in dikte tussen die nek en die middelstuk nie (Fig. 3.2).

Ongeveer 78% van die spermatozoa het 'n distaal geleë sitoplasmiese druppel op die middelstuk vertoon (Fig. 3.2, 3.4). In enkele gevalle is die sitoplasmiese druppel nog in die nek-area waargeneem. In laasgenoemde posisie het die meeste sitoplasmiese druppels duidelike aanhangsels getoon (Fig. 3.5, 3.6, 3.7). Soms was hierdie aanhangsels ook teenwoordig op sitoplasmiese druppels wat naby die annulus gelokaliseer was (Fig. 3.8). In hierdie posisie was die aanhangsels gewoonlik korter en meer robuust. Transmissie-elektronmikroskopiese mikrograwe het getoon dat bogenoemde aanhangsels dieselfde plasmalemma as die sitoplasmiese druppel gehad het en dat die inhoud van die aanhangsel van sitoplasmiese oorsprong was (Kyk hoofstuk 4. Fig. 4.14).



Soortgelyke aanhangsels is soms ook op die middelstuk en die hoofstuk gevind (Fig. 3.9, 3.10 en 3.11). Met behulp van transmissie-eletronmikroskopie (TEM) is bepaal dat die inhoud van die aanhangsels omgewe was deur die plasmalemma van die betrokke strukture en met dieselfde stof gevul was wat net onder die plasmalemma van die middelstuk of die hoofstuk teenwoordig was (Kyk hoofstuk 4. Fig. 4.15, 4.16). Die aanhangsels van die middel en hoofstuk was soms so lank en dun dat die aanhangsel eerder as 'n filament beskryf kon word. Die annulus wat die grens tussen die middel- en hoofstuk afgebaken het, was by 5000x vergroting maklik uitkenbaar in die vorm van 'n effens verdikte ring aan die distale punt van die middelstuk (Fig. 3.4, 3.9). Teen laer vergrotings was die annulus ook duidelik waarneembaar aangesien die hoofstuk by hierdie punt 'n fraksie dunner as die middelstuk was (Fig. 3.4, 3.9).

**d Die hoofstuk**

Die hoofstuk van die flagellum het glad voorgekom, was baie langer as die middelstuk en het geleidelik verdun na die endstuk toe (Fig. 3.1). Aanhangsels, of filamente soos beskryf onder die middelstuk, het soms op die hoofstuk voorgekom (Fig. 3.10, 3.11).

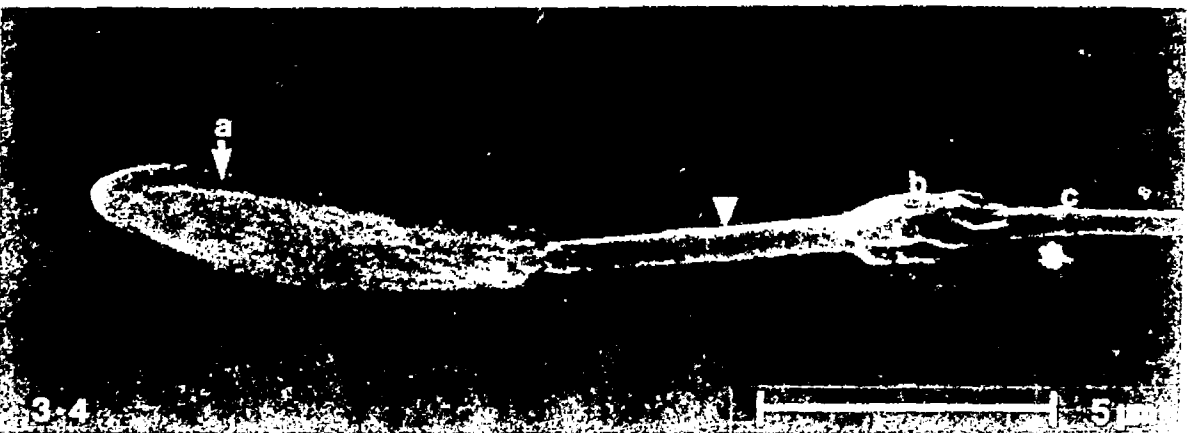
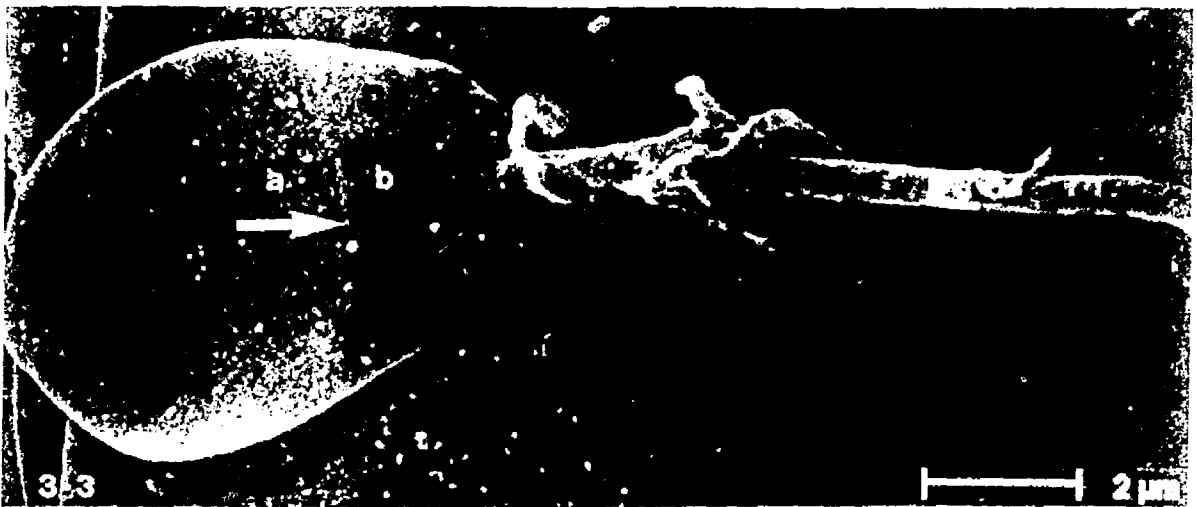
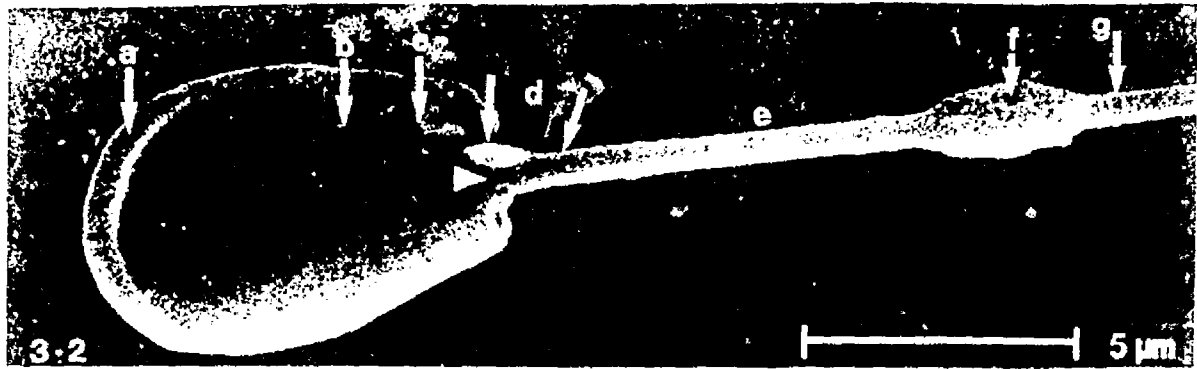
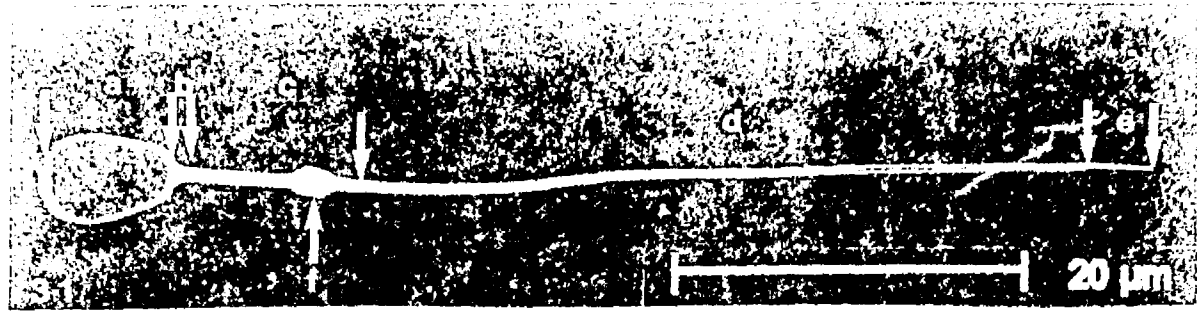
**e Die endstuk**

Die endstuk van die flagellum was selfs teen relatiewe lae vergrotings (1 000 X) nog duidelik sigbaar, omdat dit aansienlik dunner (tot ongeveer 50%) as die hoofstuk was. Dit het 'n ooreenkoms met die voorslag van

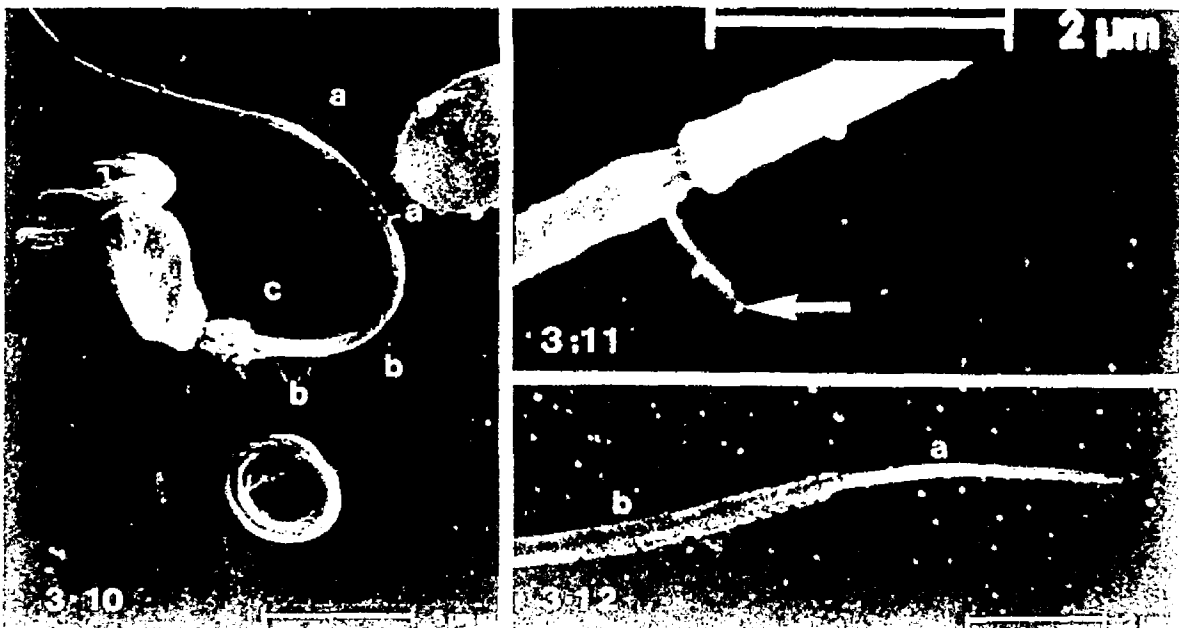
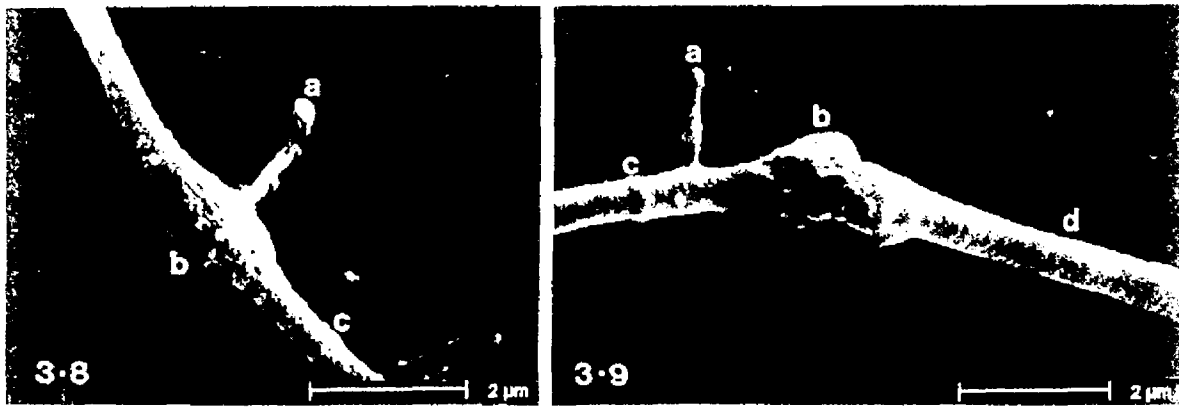
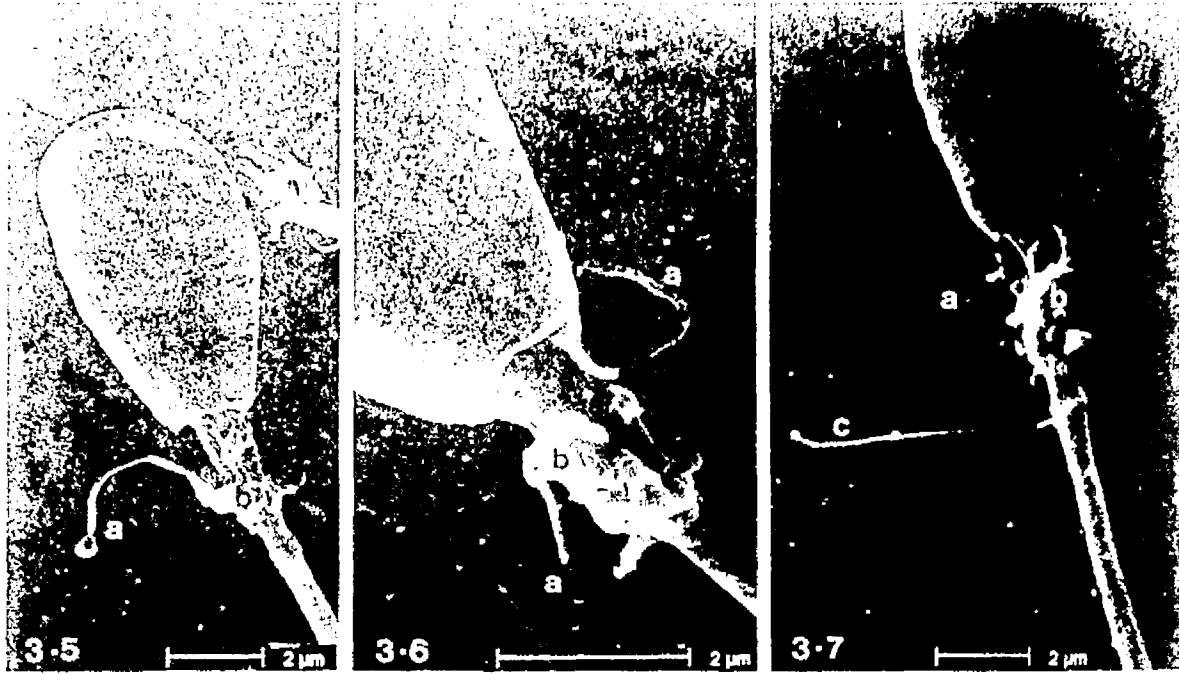
'n sweep getoon (Fig. 3.1, 3.12).

**f SEM Mikrograwe : Normale Sperme**

- Fig. 3.1** 'n Normale rooiboksperm uit die cauda epididymis, word verdeel in 'n kop (a) en 'n flagellum bestaande uit 'n nek (b), middelstuk (c), hoofstuk (d) en endstuk (e). 'n Sitoplasmiese druppel (f) kom gewoonlik op die middelstuk naby die annulus voor. Die annulus vorm die skeiding tussen die middelstuk en die hoofstuk.
- Fig. 3.2** Die spaanvormige kop vertoon 'n eenkantige akrosomale verdikking (a) en 'n ekwator (b), wat die akrosom van die post akrosomale digte lamina (c), skei. Let op na die afgeplatte basis van die kop (pylpunt), die nek-area (d) tussen die twee pyltjies), die pars spiralis (e), die sitoplasmiese druppel (f) en die annulus (g).
- Fig. 3.3** 'n Sperm wat die ekwator se onreëlmatige kartelings of uitskulpings (pyl) vertoon. Die ekwator skei die akrosom (a) en die post akrosomale lamina (b).
- Fig. 3.4** Die dikte (a) van die plat kop en die sitoplasmiese druppel (b) naby die annulus (c), word gedemonstreer. Let op na die pars spiralis (pylpunt) wat gedeeltelik onder die plasmalemma van die middelstuk sigbaar is.



- Fig. 3.5** Aanhangsel (a) van 'n sitoplasmiese druppel (b) in die nek-area.
- Fig. 3.6** Aanhangsels (a) van 'n sitoplasmiese druppel (b) in die nek-area. Let op na die kenmerkende uitskulpings van die ekwator (c).
- Fig. 3.7** Korter aanhangsels (a) van 'n sitoplasmiese druppel in die nek-area (b). Die lang aanhangsel (c) ontstaan waarskynlik uit die distale gedeelte van die sitoplasmiese druppel, maar mag moontlik 'n aanhangsel van die middelstuk wees.
- Fig. 3.8** 'n Meer robuuste aanhangsel (a) van die sitoplasmiese druppel (b) naby die annulus (c).
- Fig. 3.9** Aanhangsel (a) van die middelstuk tussen die sitoplasmiese druppel (b) en die annulus (c). Let op na die pars spiralis (d) van die middelstuk.
- Fig. 3.10** Aanhangsel van die hoofstuk (a), middelstuk (b) en sitoplasmiese druppel (c).
- Fig. 3.11** Aanhangsel (pyl) van 'n hoofstuk met 'n abnormale veselagtige skede naby die annulus.
- Fig. 3.12** Die endstuk (a) wat ongeveer die helfte van die dikte van die hoofstuk (b) is.



### **3.3.2 Abnormale sperme**

Holstein *et al.* (1988) se metode om sperm-abnormaliteite direk met behulp van mikrograwe te beskryf, word in hierdie hoofstuk gebruik. Abnormaliteite van rooiboksperms, soos bestudeer met behulp van SEM, is in die volgende groepe verdeel:

#### **Akrosoom**

**Voorbeelde:** Abnormale verdikking en verspreiding, tepeldefek, rif- of vlerkvorming, disintegrering, en akrosoomverlies.

#### **Kop**

**Voorbeelde:** Verwronge vorm, dubbelkop, loskop, stompkop, bizarre afwykings en agglutinasie.

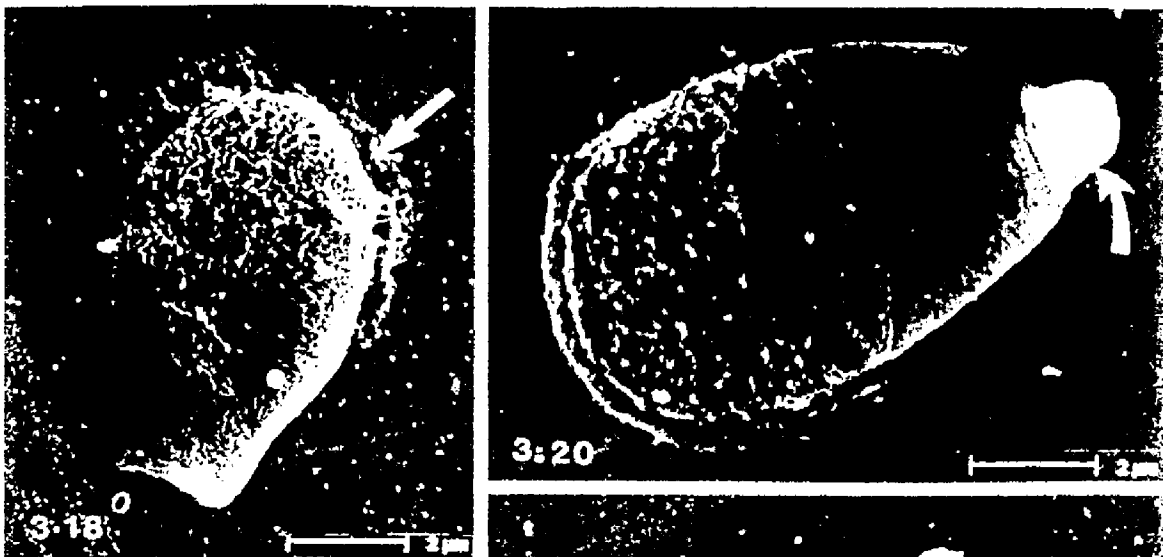
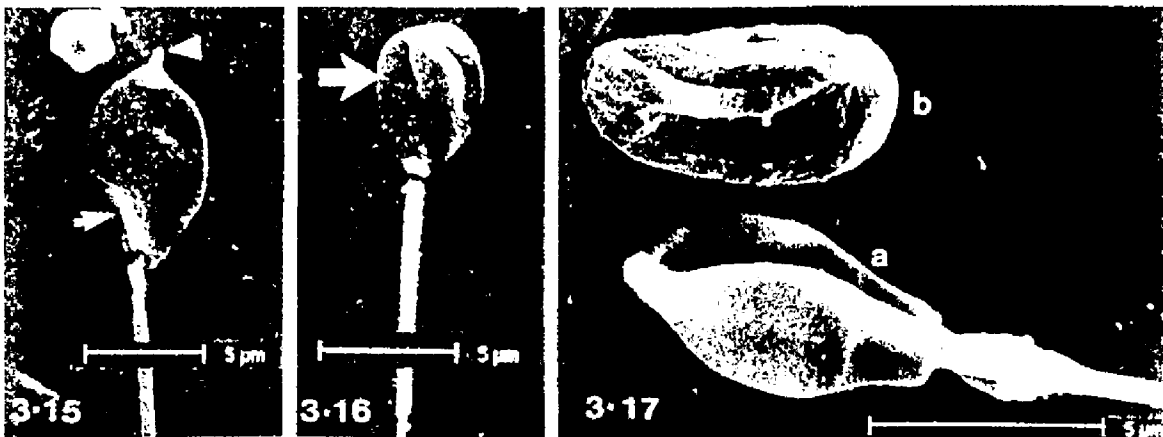
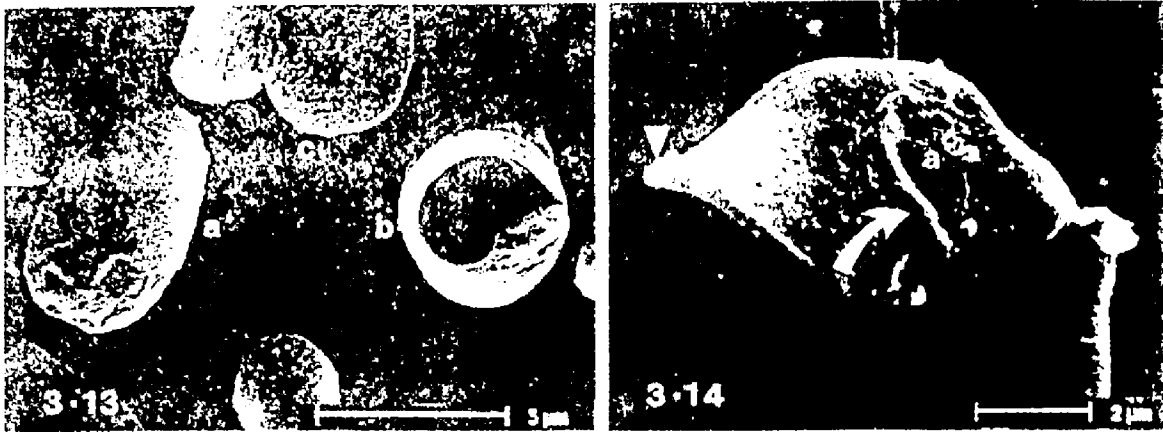
#### **Flagellum**

**Voorbeelde:** Dagdefekte (vanaf 'n lus gevorm deur die flagellum tot die mees bizarre vorms), geknakte flagellum (by nek, sitoplasmiese druppel of annulus), terminaal opgerolde flagellum, dubbel flagellum en abnormale aanhegting van die nek aan die kopbasis.

## **a SEM MIKROGRAWE : ABNORMALE SPERME**

- Fig. 3.13** 'n Loskop (a) waarvan die akrosoom abnormaal verdik is en kraterdefekte toon. Ook teenwoordig is 'n bizarre vorm van 'n Dagdefek (b) met 'n ringvormige kop wat net onder die opgerolde stert sigbaar is. TEM-mikrograwe wys dat sulke eksemplare se akrosoom erg abnormaal is. 'n Gedeelte van 'n kop (c) word getoon met 'n akrosoom wat tekens van disintegrering vertoon.
- Fig. 3.14** 'n Tepeldefek (pylpunt) met 'n abnormaal verdikte akrosoom (pyl) in die abnormale ekwatoriale segment (a). Let op na die abnormale kopvorm (peervormig) en die flagellum se abnormale aanhegting.
- Fig. 3.15** 'n Sperm met 'n tepeldefek (pylpunt) en 'n post akrosomale vervormde kop (pyl).
- Fig. 3.16** Rifvorming van die nukleus veroorsaak dat die akrosoom die abnormale kontoere van die nukleus volg en dus self abnormaal vertoon. In hierdie geval beslaan die akrosoom net een derde van die kop se oppervlakte ( $\pm 60\%$  is normaal). Let op na die abnormale ligging van die ekwator (pyl).
- Fig. 3.17** 'n Tipiese voorbeeld van rifvorming wat dikwels gevind word (a). Let op na 'n Dagdefek (b).
- Fig. 3.18** Loskop. Geen los flagella was in die monster teenwoordig nie. Vergelyk fig. 3.24. (Kyk ook bespreking). Let op na die disintegrerende akrosoom (pyl).
- Fig. 3.19** 'n Loskop met 'n nou kopbasis (pyl). Die gedisintegreerde akrosoom is feitlik afgewerp (pylpunt).
- Fig. 3.20** 'n Stompkop (pyl) met 'n disintegrerende akrosoom. 'n Knop het in die plek van die flagellum gevorm.
- Fig. 3.21** 'n Stompkop met 'n abnormale akrosoomverdikking (pyl), wat nie oor die hele apikale gedeelte van die kop strek nie.





**Fig. 3.22** Peervormige kop met 'n abnormale akrosoomverdikking (pyl) wat oneweredig versprei is.

**Fig. 3.23** 'n Peervormig kop met 'n erg abnormale akrosoomverdikking (pyl).

**Fig. 3.24** In hierdie monster is alle spermkoppe abnormaal. Let op na die volgende:

Loskop - 1

Stompkop met 'n disintegrerende akrosoom - 2

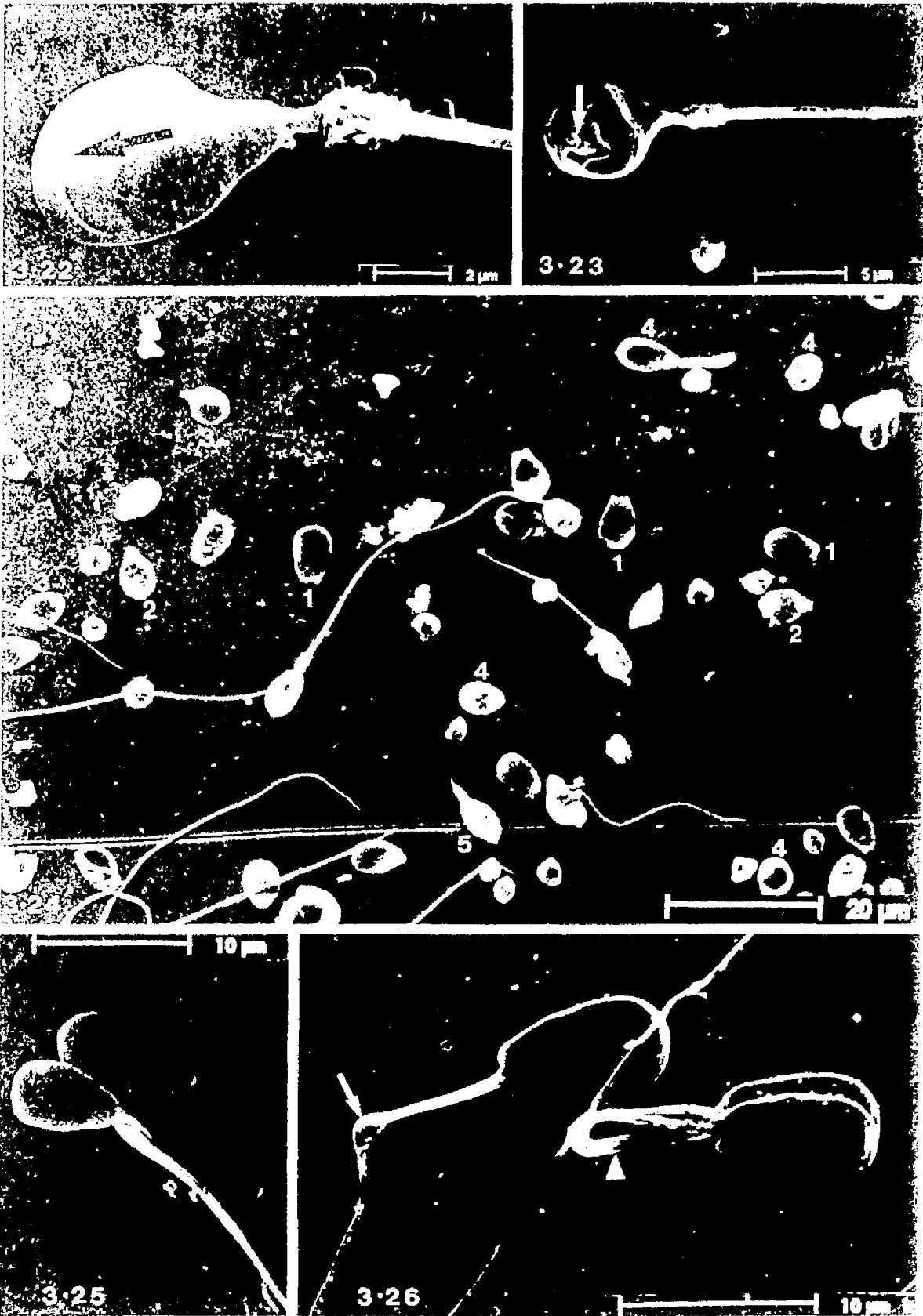
Peervormige stompkop - 3

Verskillende grade van Dagdefekte - 4

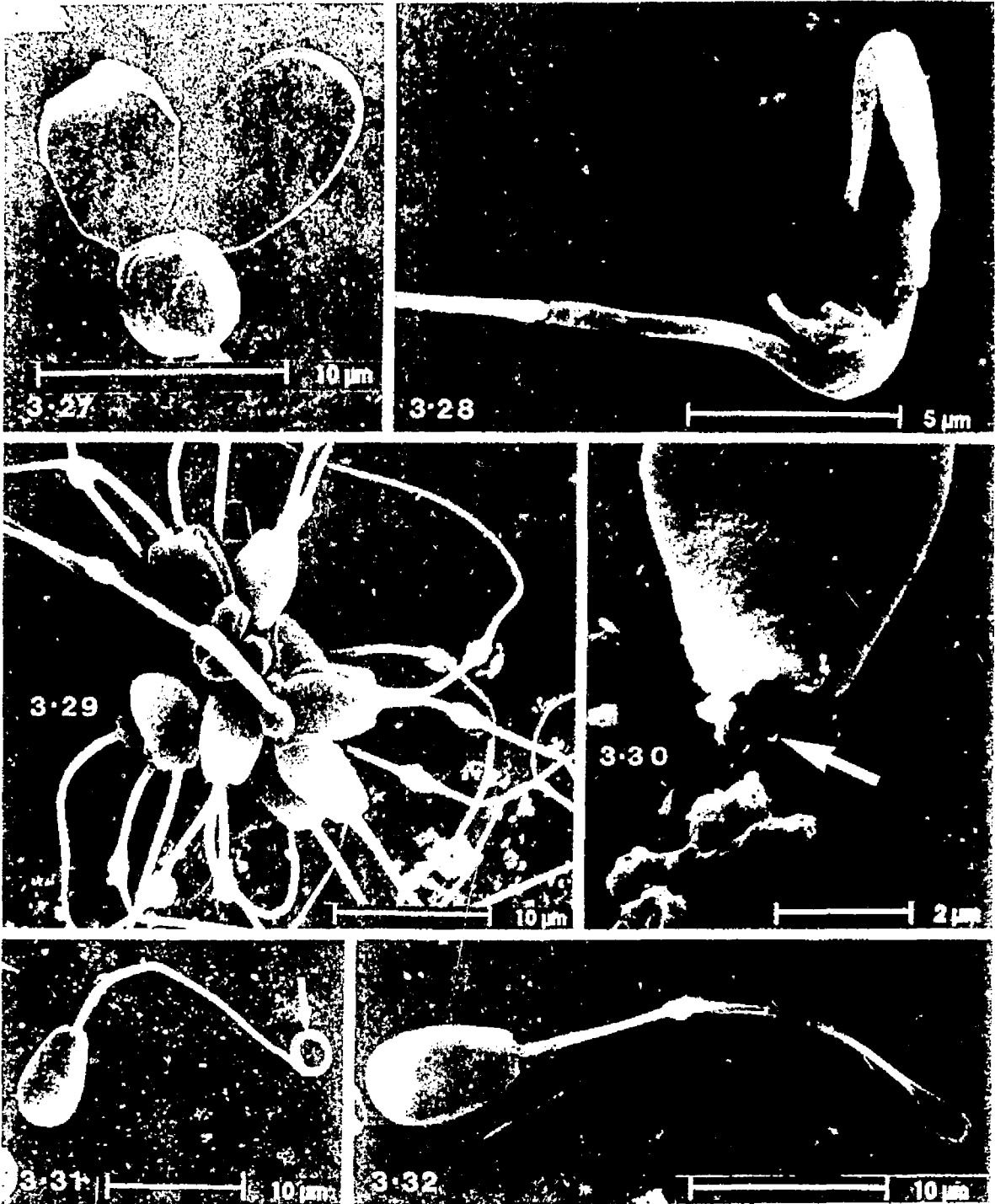
Bizarre, rifvorming - 5.

**Fig. 3.25** Dubbelkop met 'n gemeenskaplike flagellum.

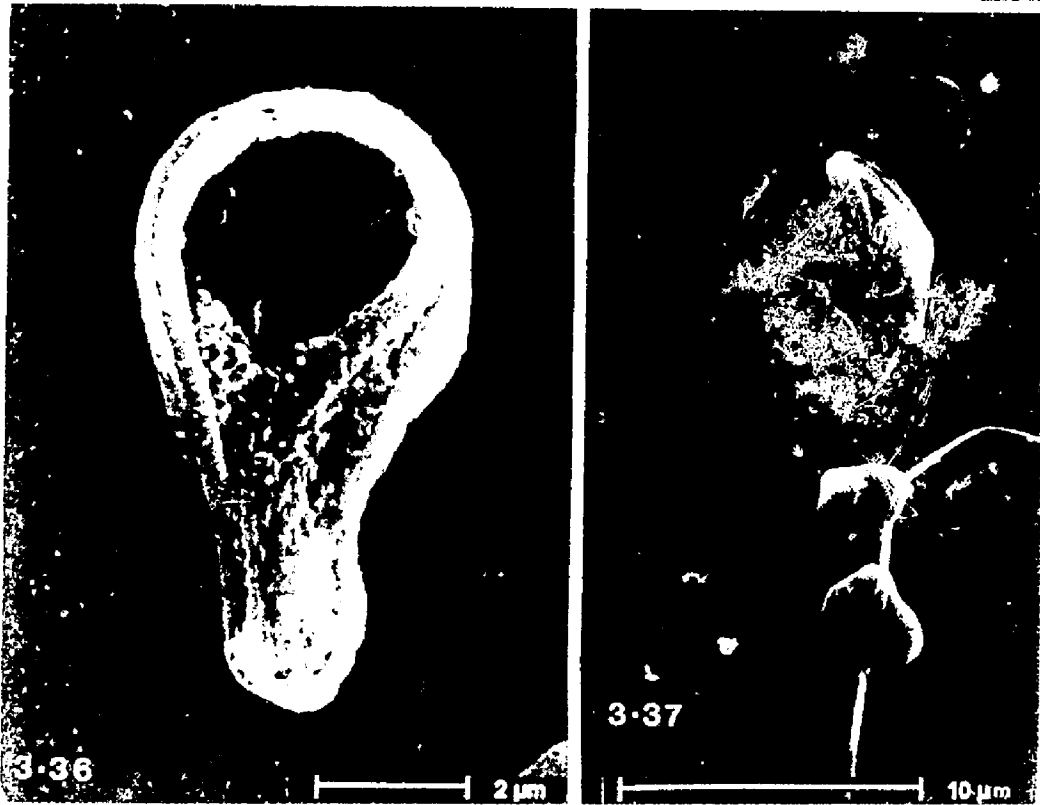
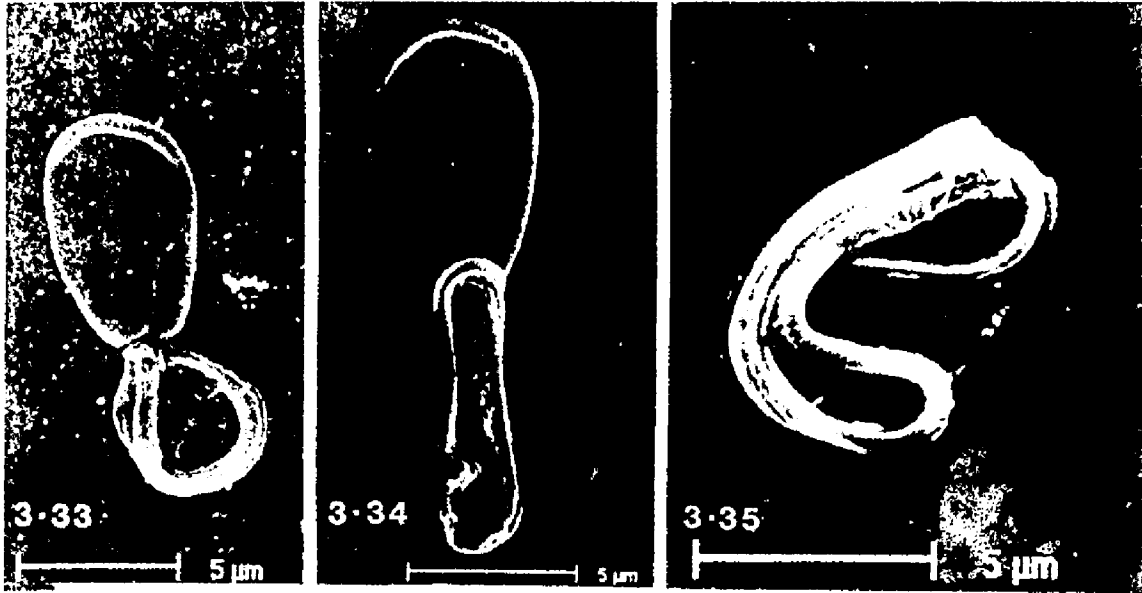
**Fig. 3.26** Dubbelkop met 'n langwerpige opgerolde gemeenskaplike flagellum (Dagdefek, pylpunt). Let op na die geknakte flagellum (pyl) van die ander sperm.



- Fig. 3.27** 'n Dubbelkop met 'n eenvoudig opgerolde gemeenskaplike flagellum (Dagdefek).
- Fig. 3.28** 'n Bizarre gevormde en verwronge kop.
- Fig. 3.29** Agglutinasie van spermkoppe.
- Fig. 3.30** 'n Ongeïdentifiseerde struktuur (pyl) word vertoon in die nek-area van 'n sperm met 'n afgebreekte flagellum.
- Fig. 3.31** Gekrulde flagellum, terminaal opgerol (pyl).
- Fig. 3.32** Flagellum vorm 'n lus (eenvoudigste Dagdefek) en vou terug op homself. Soms is sitoplasmiese materiaal in die lus teenwoordig. Die plasmalemma omring die gedeelte waar die flagellum aanmekaar raak. Hierdie mag die voorloper wees van die Dagdefek wat in die volgende mikrograwe vertoon word.

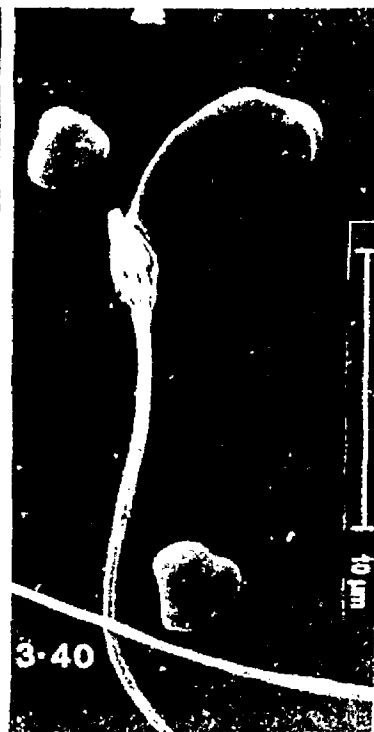


- Fig. 3.33** 'n Dagdefek is geassosiëer met verskillende grade van winding van die flagellum binne die plasmalemma. In hierdie geval is die flagellum redelik los in 'n sirkel opgerol.
- Fig. 3.34** 'n Dagdefek waarvan die flagellum langwerpig opgerol is.
- Fig. 3.35** 'n Dagdefek met die flagellum redelik los op die kop opgerol.
- Fig. 3.36** 'n Dagdefek met die flagellum al op die rand van die kop opgerol. Hierdie variasie en voorbeelde in fig. 3.35 en 3.36 is die mees algemene tipes.
- Fig. 3.37** 'n Dagdefek met die middelstuk op die rand van die kop opgerol, maar die hoofstuk en endstuk hang vry.



- Fig. 3.38** 'n Geknakte middelstuk. In hierdie gevalle is die middelstukke onder die sitoplasmiese druppel gebuig (pyl).
- Fig. 3.39** 'n Geknakte nek (pyl).
- Fig. 3.40** 'n Abnormale inplanting van die flagellum.
- Fig. 3.41** 'n Dubbele inplanting van die flagellum. Die flagella deel moontlik 'n gemeenskaplike plasmalemma.





### 3.4 Bespreking

Soogdiersperme stel ten opsigte van hulle grootte en vorm aansienlike verskille ten toon, alhoewel hulle almal dieselfde stel sellulêre organelle, wat op 'n gemeenskaplike plan saamgestel is, besit (Olsen *et al.*, 1991). Ongepubliseerde waarnemings deur Ackerman op die sperme van die rooihartbees (*Alcelaphus buselaphus*), koedoe (*Tragelaphus strepsiceros*), blesbok (*Damaliscus dorcas phillipsi*) en 'n artikel oor die ultrastruktuur van buffelsperme (*Syncerus caffer*) (Ackerman *et al.*, 1994), toon dat die morfologie van sperme van hierdie spesies en rooiboksperme baie ooreenkom, maar tog ook van mekaar verskil. Aangesien hulle almal lede van die familie Bovidae is, is die ooreenkomste tussen die sperme nie 'n verrassing nie (Skinner en Smithers, 1990). Die klein maar tipiese verskille tussen die sperme van naverwante spesies bevestig die waarnemings van pioniernavorsers Wagner en Leuckhart (Mann en Ludwak-Mann, 1981).

Die kop van die rooiboksperm is dorso-ventraal afgeplat. Hierdie kenmerk word met bogenoemde spesies asook met baie ander soogdiere gedeel (Saacke en Almquist, 1964a; Fawcett, 1975; Tingari, 1991; Ackerman *et al.*, 1994). Die apikale perdeskoenvormige verdikking van die akrosoom op die rand en net op die een vlak van die kop, toon geen waarneembare verskille tussen die verskillende spesies wat hierbo genoem is nie. Saacke en Almquist (1964a) en Barth en Oko (1989) het dieselfde kenmerk by die bul (*Bos taurus*) as 'n haakagtige apikale liggaam wat oor homself teruggebuig is, beskryf. Lipvorming, 'n abnormaliteit by die rooibok en die buffel, kan met bogenoemde beskrywing verwar word. Meer aandag sal in hoofstuk 4 aan hierdie aspek gegee word.

In die meeste gevalle was die ekwator van die spermkop duidelik sigbaar met SEM. Die

voorkoms daarvan het gewissel van 'n ry klein porie-vormige holtes tot 'n krans van onreëlmatige kartelings of uitskulpings, wat die akroosom van die post akrosomale digte lamina van mekaar skei. Porie-agtige holtes het egter die meeste voorgekom. Hierdie variasies dui moontlik op prosesseringsartefakte of strukturele veranderings of toestande in die eindpuntaanhegtings van die akroosom.

Die lengte van die rooiboksperm se kop ( $7.59 \pm 0.61$ ) was effens langer as dié van die buffel ( $5.9 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ), (Ackerman *et al.*, 1994). Dit was egter korter as die bul ( $\pm 9.0 \mu\text{m}$ ) se spermkop (Saacke en Almquist, 1964).

Spermkoppe vertoon feitlik nooit 'n perfekte sy-aansig nie, omdat die sperme tydens die voorbereidingsproses dorso-ventraal op die mikaplaatjie neergelê word. Die dikte van die kop soos met SEM bepaal was dus onder verdenking. Sagitale sneë van die spermkop het met behulp van TEM getoon dat die dikte van die rooibok-spermkop gemiddeld  $0.65 \pm 0.05 \mu\text{m}$  was (SEM =  $0.89 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ). Die TEM-gegewens word vir die dikte van die spermkop as korrek aanvaar. Alle SEM-spermmates, behalwe die flagellumlengtes, is met behulp van van TEM bevestig.

Onvolwasse sperme word gekenmerk deur die teenwoordigheid van 'n sitoplasmiese druppel wat gewoonlik in die testis en corpus epididymis om die nek gevind word. Van hier af beweeg dit langs die middelstuk af tot naby die annulus, waarna dit verdwyn. Die teenwoordigheid van 'n sitoplasmiese druppel om die middelstuk van sperme, wat in die cauda epididymis versamel is, word as normaal beskou (Bonet, 1990). By die mens word dit as abnormaal beskou indien die sitoplasmiese druppel in die ejakulaat nog om die middelstuk teenwoordig is en word die abnormaliteit dikwels as een van die morfologiese kenmerke

tydens die evaluasie van sperme gebruik (Holstein *et al.*, 1988; Dadoune, 1988; Menkveld *et al.*, 1990).

Lewendige rooiboksperme uit die cauda epididymis is met 'n sitoplasmiese druppel om die middelstuk naby die annulus in die vloeibare stikstof gekriopreserveer. Na 30 dae is die sperme ontdooi en is waargeneem dat 90 % van die sperme lewendig was en motiliteit getoon het. Al die sitoplasmiese druppels was afgewerp en het in die medium rondgedryf. Die ejakulaat se sperme sal waarskynlik in die lig van bogenoemde geen sitoplasmiese druppels vertoon nie.

Die aanhangsels van die sitoplasmiese druppel om die nek en ander lokaliteite op die middelstuk, is sover bekend, nog net deur Ackerman *et al.* (1994) in buffelsperme beskryf. Dieselfde geld ook vir soortgelyke aanhangsels wat uit die middelstuk en uit die hoofstuk ontspring. Bonet *et al.* (1993) beskryf 'n filamentagtige sitoplasmiese ekstensie wat tussen die kop en die verbindingstuk ontstaan. Hierdie struktuur is egter nie 'n integrale deel van die sitoplasmiese druppel nie. Dit mag egter vergelyk word met die filamentagtige aanhangsel wat soms op die middel- en hoofstuk van rooibok- en buffelsperme gevind word.

Tydens die migrasie van die sitoplasmiese druppel langs die nek en middelstuk af, verloor die sitoplasmiese druppel, indien dit aanvanklik teenwoordig was, waarskynlik eers die meer delikate aanhangsels en daarna die meer robuuste voorbeelde. Daarom vertoon die sitoplasmiese druppel naby die annulus normaalweg geen aanhangsels nie en indien dit wel nog voorkom is die aanhangsels gewoonlik van die meer robuuste strukture. Normaalweg behoort 'n sperm al die aanhangsels van die sitoplasmiese druppel, die middelstuk en die hoofstuk op sy weg na die ejakulaat te verloor. Hierdie aanhangsels sal dus waarskynlik

onder normale toestande nie in die ejakulaat gesien word nie. Soogdiersperme sal uit die epididymus met SEM bestudeer moet word om hierdie aanhangsels moontlik waar te neem. Die aanhangsels van die sitoplasmiese druppel in buffel- en rooiboksperme kan moontlik gevorm word wanneer die agtergeblewe sitoplasmiese druppel van die spermsel se verbinding met die sitoplasmiese materiaal van die Sertoli sel deur laasgenoemde uitgerek en gebreek word tydens die proses van spermiase (Fawcett en Phillips, 1969; Mann en Lutwak-Mann, 1981). 'n Moontlike verklaring vir die ontstaan van die aanhangsels van die middel- en hoofstuk kan nie aangebied word nie. Gesien in die lig van die verdwyningsproses en die ultrastruktuur van hierdie strukture, is die moontlike funksie wat deur hulle vervul word onduidelik.

Die evaluasie van semenmonsters van die diereryk lewer oor die algemeen homogene spermomorfolgie in individuele spesies (Menkveld *et al.*, 1991). Defekte van die flagellum is met behulp van SEM gebruik vir die evaluasie van spermtoestand omdat afwykings van die akrosoom, nukleus en ander interne strukture net moontlik of meer akkuraat met behulp van transmissie-elektronmikroskopie bepaal kan word en omdat uitgesoekte makro-abnormaliteite van die flagellum, met behulp van SEM, vinnig geïdentifiseer en getel kan word. In die geval van buffels was 87.4% van die sperme van gesonde, volwasse buffels se spermmonsters in die Krugerwildtuin vry van enige opsigtelike, bekende abnormaliteite van die flagellum (Ackerman *et al.*, 1994). In die geval van die rooibokke is hierdie syfer 93.4%. Die hoë persentasie normale spermomorfolgie kan misleidend wees. Dit beteken nie dat sulke sperme in alle opsigte normaal, gesond en vry van alle defekte verklaar kan word nie, aangesien vele ander onsigbare abnormaliteite van ultrastrukturele of biochemiese aard wel nog in die sperme teenwoordig kan wees. Wat dit wel beteken, is dat bogenoemde 93.4% van die sperme van 'n monster van, in hierdie geval, 40 rooibokke normaal vertoon het ten

opsigte van die uitgesoekte abnormaliteite wat gewoonlik gemaklik met SEM geïdentifiseer kan word.

Soos soogdiersperme groot ooreenkomste toon ten opsigte van hulle normale morfologie en ultrastruktuur, toon hulle ook groot ooreenkomste ten opsigte van sperm-abnormaliteite. In die meeste gevalle is die soorte abnormaliteite van spesie tot spesie feitlik identies. Bogenoemde stelling geld vir abnormaliteite waarneembaar met SEM sowel as met TEM (Nicander en Bane, 1966; Ross *et al.*, 1973; Holstein, 1975; Fléchon *et al.*, 1976; Bartoov *et al.*, 1980; Coubrough en Soley, 1981; Holstein *et al.*, 1988; Oettle en Soley, 1988; Dadoune, 1988; Bonet, 1990; Menkveld *et al.*, 1990; Menkveld *et al.*, 1991; Bonet *et al.*, 1993).

**Makro-abnormaliteite** van soogdiersperme kan relatief maklik met SEM geïdentifiseer word. Wat loskoppe betref, bestaan daar egter verskeie beskouinge. Loskoppe is een van die afwykings wat gewoonlik deur fertilitetsklinieke vir die evaluering van spermorfologie gebruik word. Hierdie afwyking kan 'n normale sperm met 'n afgebreekte flagellum wees (Fig. 3.18), of dit kan 'n sperm wees waarvan die flagellum in die testis los van die kop of glad nie ontwikkel het nie (Holstein *et al.*, 1988). Andersins kon die flagella verlore geraak het in die caput of corpus epididymis as gevolg van defektiewe aanhegting. Sentrifugasie tydens die SEM-voorbereidingsproses kan ook verantwoordelik wees vir afgebreekte flagella. Dit gebeur vernameklik met sperme met verswakte nekstrukture. Die "afkop-spermdefek" is deur Blom en Birch-Andersen (1970) vir die bul en Perotti *et al.* (1981) vir die mens beskryf. Hierdie defek wat gekenmerk word deur loskoppe in die ejakulaat met 'n gelyke aantal afsonderlike flagella wat in die meeste gevalle nog motiel is, is nie by sperme uit die cauda epididymis van die rooibok gevind nie. Hierdie defek ontwikkel reeds tydens die spermatied-

fase van spermiogenese (Baccetti *et al.*, 1984). Die defek behoort dus waarneembaar te wees in sperme van die cauda epididymis indien teenwoordig. Met die stompkopdefek (Fig. 3.20, 3.24) is daar geen onduidelikheid nie aangesien 'n opvallende knop in die plek van die flagellum ontwikkel het.

----- oOo -----

## HOOFSTUK 4

### 'n TRANSMISSIE-ELEKTRONMIKROSKOPIESE

#### ONDERSOEK VAN ROOIBOKSPERME

##### 4.1 Inleiding

'n Soogdiersperm moet aan 'n hele aantal gespesialiseerde vereistes voldoen voordat die ovum bevrug kan word. Dit moet in staat wees om met energieke motiliteit die relatief ver distansie deur die vagina en die oviduk suksesvol af te lê. Verder moet die sperm 'n normale akrosoom en nukleus besit om die zona pellucida te penetreer en die ovum te bevrug. Vir elkeen van bogenoemde funksies, sowel as vir sy eie metabolisme, word die sperm toegerus met gespesialiseerde organelle wat struktureel tydens spermatogenese in die testis gevorm word. Indien enige van hierdie organelle 'n defek vertoon, kan dit 'n negatiewe uitwerking op die funksie van die sperm hê (Fawcett, 1975; Holstein en Roosen - Runge, 1981; Holstein *et al.*, 1988).

Die doel van hierdie ondersoek was om die ultrastruktuur van 'n normale rooiboksperm te bepaal en die ultrastrukturele afwykings en abnormaliteite van rooiboksperme met transmissie-elektronmikroskopie (TEM) te dokumenteer. Hierdie gegewens dien as basislyndata en 'n kwantitatiewe analise daarvan kan gebruik word om 'n vergelyking te tref tussen die sperme van rooibokke, wat koperbesoedelde voedsel gevreet het en rooibokke wat voedsel (onbesoedel met koper) gevreet het, ten einde die moontlike uitwerking van 'n hoë kopervlak in die lewer op die ultrastruktuur van die sperme te ondersoek.

Organelle van die spermsel, waarvan die organisatoriese integriteit en funksionele



doeltreffendheid so belangrik is vir die bevrugtingsproses, kan nie in voldoende detail deur middel van lig of fase-kontras-mikroskopie bestudeer word nie. Sperme kan ook nie maklik en akkuraat morfologies ge-evalueer word deur sitochemiese en immunositochemiese prosedures nie. 'n Professionele evaluering van die sperm se ultrastrukturele integriteit, funksionele doeltreffendheid en morfofisiologie kan alleenlik met behulp van transmissie-elektronmikroskopie (TEM) gedoen word (Fawcett, 1965; Mann en Lutwak-Mann, 1981; Zamboni, 1987; Zamboni, 1991).

Die diagramme in Figure 4.1 en 4.2 dien as hulpmiddel om die annotasie van die TEM-mikrograwe te verduidelik.

Fig. 4.1 Spermkop: Planêre snee

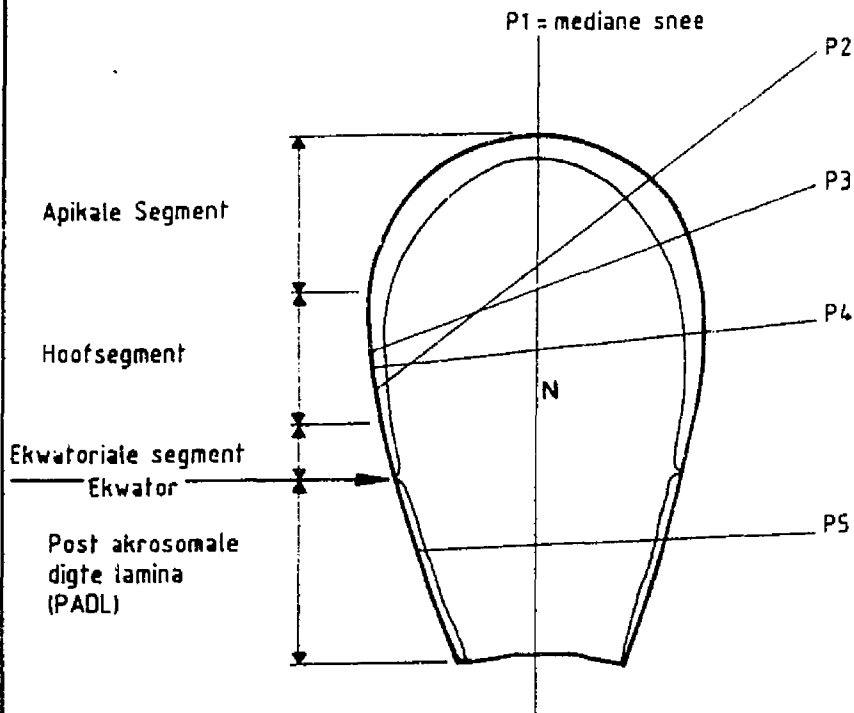
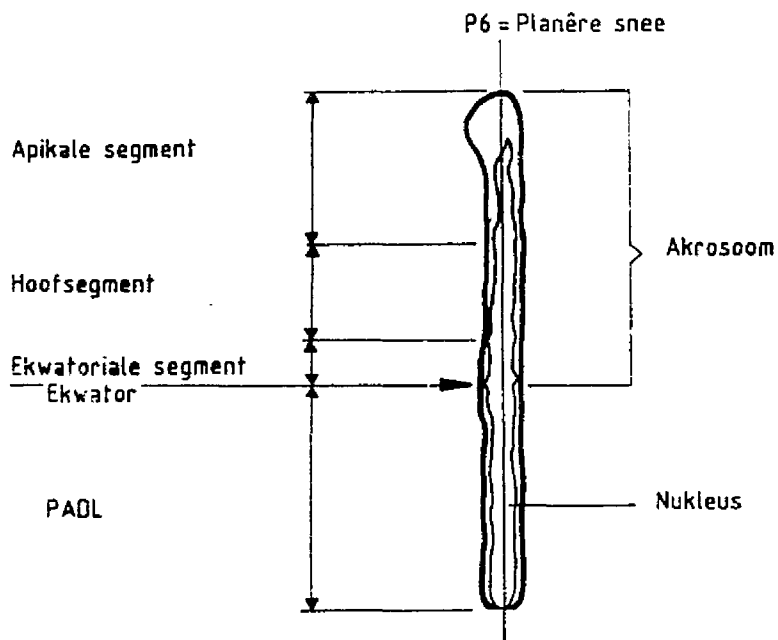


Fig. 4.2 Spermkop: Mediane snee



## 4.2 Resultate

### 4.2.1 Normale sperm

#### a Die spermkop

Mediane sneë van die spermkop (Fig. 4.3) het getoon dat die spaanagtige kop dorso-ventraal afgeplat was en dit is ook bevestig deur planêre sneë (Fig. 4.4). Die kop was bedek met 'n plasmalemma waaronder die akrosoom se apikale segment, hoofsegment, ekwatoriale segment en die post akrosomale digte lamina (PADL) geleë was (Fig. 4.3). Die kerngedeelte van die kop was met 'n nukleus gevul wat na 'n punt, onder die apikale gedeelte van die akrosoom, verloop het.

Ongeveer twee derdes van die apikale gedeelte van die nukleus was bedek met 'n goed ontwikkelde akrosoom bestaande uit fyn homogene materiaal van matige elektrondigtheid. Die apikale segment het 'n prominente verdikking van die akrosoom aan die een kant van die rand van die kop vertoon (Fig. 4.3, 4.4, 4.5, 4.6). Dwarsneë van die posterior gedeeltes van die apikale en hoofsegment en planêre sneë van die spermkop, het getoon dat die eenkantige akrosoomverdikking geleidelik in die rigting van die ekwator verdwyn het (Fig. 4.7, 4.1). Die hoof akrosomale segment was lateraal dikker as dorsaal of ventraal (Fig. 4.7, P-4). Tekens van 'n sub-akrosomale spasie of perforatorium kon nie in die apikale segment gevind word nie, maar 'n sub-akrosomale spasie het dikwels lateraal in dwarsneë, tussen die nukleus en die akrosoom van die hoofsegment, voorgekom (Fig. 4.8). Die ekwatoriale segment van die akrosoom was in mediane sneë van die kop merkbaar dunner as die hoofsegment en het geëindig in die ekwator wat die skeiding tussen die akrosoom en die PADL was (Fig. 4.3, 4.9). By die ekwator het die buitenste en

binneste membrane van die akrosoom ontmoet waarna die plasmalemma die PADL se oppervlakte verder na agter gevolg het (Fig. 4.9). Die PADL het die oorblywende gedeelte van die nukleus vanaf die ekwator tot by die basis van die kop bedek. Tussen die PADL en die nukleus was 'n spasie wat flokkulêre materiaal bevat het (Fig. 4.9, 4.10).

#### **b Die nek en middelstuk**

Naby die basis van die kop het die nek in planêre sneë, effens verdik en uitgesprei om 'n hegte verbinding met die kop te vorm (Fig. 4.11). Waar die nek by die distale punt van die pars ascendens geëindig het, was daar geen of min verskil in dikte tussen die nek en die proksimale punt van die middelstuk nie (Fig. 4.12).

Die meeste sperme het 'n distaal geleë sitoplasmiese druppel op die middelstuk vertoon (Fig. 4.13). Die knop-, knuppel- of steelvormige aanhangsels van die sitoplasmiese druppel, middelstuk en hoofstuk (Fig. 4.14, 4.15, 4.16) is met TEM-waarnemings bevestig soos in hoofstuk drie met behulp van SEM beskryf is (Hoofstuk 3 Fig. 3.5, 3.6, 3.8, 3.9, 3.10). Die inhoud van die sitoplasmiese druppel se aanhangsel was van sitoplasmiese oorsprong en die druppel en die aanhangsels het 'n integrale deel van die spermsel gevorm, aangesien dit in geheel met die spermsel se plasmalemma bedek was (Fig. 4.14). By die middelstuk en die hoofstuk was die aanhangsels ook bedek deur die spermsel se plasmalemma en het die aanhangsels die selinhoud van die spermsel, wat direk onder die plasmalemma teenwoordig was, gedeel (Fig. 4.15, 4.16).

Planêre en mediane sneë van die kop het 'n holte in die basis van die nukleus, bedek

met 'n basisplaat, vertoon. Die organel van die nek (verbindingstuk) wat die stert met die kop verbind het, was in hierdie holte ge-inplanteer en is soos 'n bal in 'n sok deur 'n lip van die basale plaat in posisie gehou (Fig. 4.11). Die capitulum is gevorm deur die proksimale samesmelting van die verbindingstukke van die nege oorlangse gesegmenteerde kolomme. Distaal het laasgenoemde oorgegaan in die nege growwe vesels wat die aksoneem omgewe het (Fig. 4.11, 4.17).

Die proksimale sentriool was silindervormig (Fig. 4.11) met 'n wand bestaande uit nege oorlangs georiënteerde stawe van elektron-digte materiaal waarin nege stelle triplet mikrotubuli ingebed was (Fig. 4.18, 4.19). Die silindervormige proksimale sentriool is waargeneem by die basis van die kop en het 'n hoek met die lengte-as van die flagellum wat tussen  $35^\circ$  en  $70^\circ$  gewissel het gevorm (Fig. 4.11). 'n Distale sentriool is nie waargeneem nie.

Die gesegmenteerde kolomme, elk met ongeveer 14 segmente, was periferaal in die nek teenwoordig. Een van die twee hoof gesegmenteerde kolomme kon in die reël saam met die proksimale sentriool in planêre sneë waargeneem word. Hierdie hoofkolomme se struktuur was meer robuust en het 'n duideliker klokvormige verbindingstuk as die ander kolomme gehad (Fig. 4.11). In mediane sneë kon gewoonlik twee van die ander slanker gesegmenteerde kolomme, wat proksimaal met mekaar in verbinding was, gesien word (Fig. 4.17). Laasgenoemde het, in noue assosiasie met die nege pare randstandige mikrotubuli van die aksoneem, 'n baan deur die middelstuk tot gedeeltelik in die hoofstuk gevolg (Fig. 4.17, 4.20, 4.22).

Die mitochondria van die nek was bedek met die plasmalemma en sommige van die

ronde, langwerpige selle is in dieselfde rigting as die lengte-as van die stert op die rand van die nek waargeneem om 'n tipiese pars ascendens te vorm (Fig. 4.12, 4.17, 4.20). Enkele mitochondria wat dwars met die lengte-as van die stert georiënteer was, het soms tussen die pars ascendens voorgekom (Fig. 4.20, 4.21). Op hierdie wyse het die verskillend geplaaste mitochondria 'n kenmerkende skede om die nek gevorm (Fig. 4.20, 4.21). Die middelstuk was gekenmerk deur 'n skede van omtrek georiënteerde mitochondria, wat end tot end in 'n stywe spiraal gerangskik was (Fig. 4.22). Hierdie mitochondria-skede (pars spiralis) is waargeneem tussen die plasmalemma van die middelstuk en die growwe vesels van die flagellum (Fig. 4.23). Die pars spiralis het ongeveer 48 windings tussen die nek en annulus gevorm (Fig. 4.22).

Die konusvormige annulus het bestaan uit 'n elektron-digte ring wat nou met die laaste winding van die pars spiralis geassosieer was. Distaal het hierdie ring 'n gepunte lip gevorm (Fig. 4.24A). Die veselagtige skede van die hoofstuk het onder die lip van die annulus in gewig en is net deur die basis van die annulus van die mitochondria geskei. Soms het die plasmalemma die kontoere van die laaste winding van die pars spiralis en die lip van die annulus getrou gevolg om 'n retro-annulêre reses te vorm (Fig. 4.24B).

Die aksiale filamentkompleks (aksoneem) was reeds in die nek gevorm en het bestaan uit 'n sentrale paar enkel mikrotubuli en nege pare randstandige dubbel mikrotubuli. Die kenmerkende aksoneem het vir die hele lengte van die flagellum, vanaf die nek tot in die endstuk gestrek (Fig. 4.23, 4.25, 4.26, 4.28). Mikrotubuli het dus die kenmerkende 9+2 rangskikking van flagella vertoon. Die nege pare randstandige

mikrotubuli is genommer soos aangedui in fig. 4.23. Die middelpunte van die sentrale twee enkel mikrotubuli is verbind en die as na weerskante verleng. Indien die dwarsnee deur die middelstuk was, sou drie groot, growwe vesels langs mekaar aan die een kant van die as deur die sentrale paar enkel mikrotubuli gerangskik gewees het. Nommer een randstandige mikrotubuli het regoor die middelste groot, growwe vesel gelê. Van hierdie punt is die rigting gevolg wat deur die dynienarms van die randstandige mikrotubuli aangedui is. Nommer 3 dubbelmikrotubuli het in bogenoemde rigting regoor die een punt van die verlengde as deur die sentrale mikrotubuli gelê en nommer 8 regoor die ander punt van die verlengde as (Fig. 4.23).

Dieselfde prosedure is gevolg as die snee deur die hoofstuk gemaak is. Hier het die dorsale en ventrale kolom gehelp om die posisies van randstandige mikrotubuli nommers 3 en 8 te bepaal. Die nommer van die randstandige mikrotubuli, is aan die growwe vesels wat regoor hom lê, toegeken (Fig. 4.25).

### **c Die hoofstuk**

Die hoofstuk het vanaf die annulus tot by die endstuk geleidelik verdun. Die veselagtige skede van die hoofstuk was bedek met die plasmalemma en het bestaan uit 'n oorlangse dorsale en ventrale kolom wat met mekaar verbind was met ringbande van elektron-digte materiaal (Fig. 4.26, 4.30). Die growwe vesels 3 en 8 het meteens in die hoofstuk naby die annulus verdwyn en die dorsale kolom is in die plek van die growwe vesel nommer 3 gevorm terwyl die ventrale kolom in die plek van nommer 8 growwe vesel gevorm is.. Die dorsale en ventrale kolomme was respektiewelik deur middel van 'n kort spina verbind met mikrotubuli 3 en 8 van die aksoneem (Fig. 4.26, 4.27). Die res van die growwe vesels en die dorsale en ventrale

kolomme het een na die ander geleidelik verdwyn. Naby die endstuk het die veselagtige skede 'n dun ring om die aksoneem gevorm (Fig. 4.27).

#### **d Die endstuk**

Aangesien die endstuk aansienlik dunner as die middelstuk was, kon die distale grens van die hoofstuk maklik bepaal word. Die plasmalemma het ook die endstuk bedek (Fig. 4.31). Dit was duidelik dat die hele spermsel met 'n enkele plasmalemma bedek was (Fig. 4.3, 4.9, 4.11, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.19, 4.31). Die endstuk het die kort einde van die flagellum gevorm en het hoofsaaklik uit die plasmalemma en aksoneem bestaan (Fig. 4.28). Naby die eindpunt van die endstuk het die pare randstandige mikrotubuli geskei sodat 20 enkel mikrotubuli, wat die sentrale paar ingesluit het, soms waargeneem kon word (Fig. 4.29). In die endstuk was die mikrotubuli egter meestal gedisorganiseer, gedeeltelik afwesig of geheel en al afwesig.



**e TEM MIKROGRAWE : NORMALE SPERME**

**SKAAL: EENHEDE IN MIKROMETER ( $\mu\text{m}$ )**

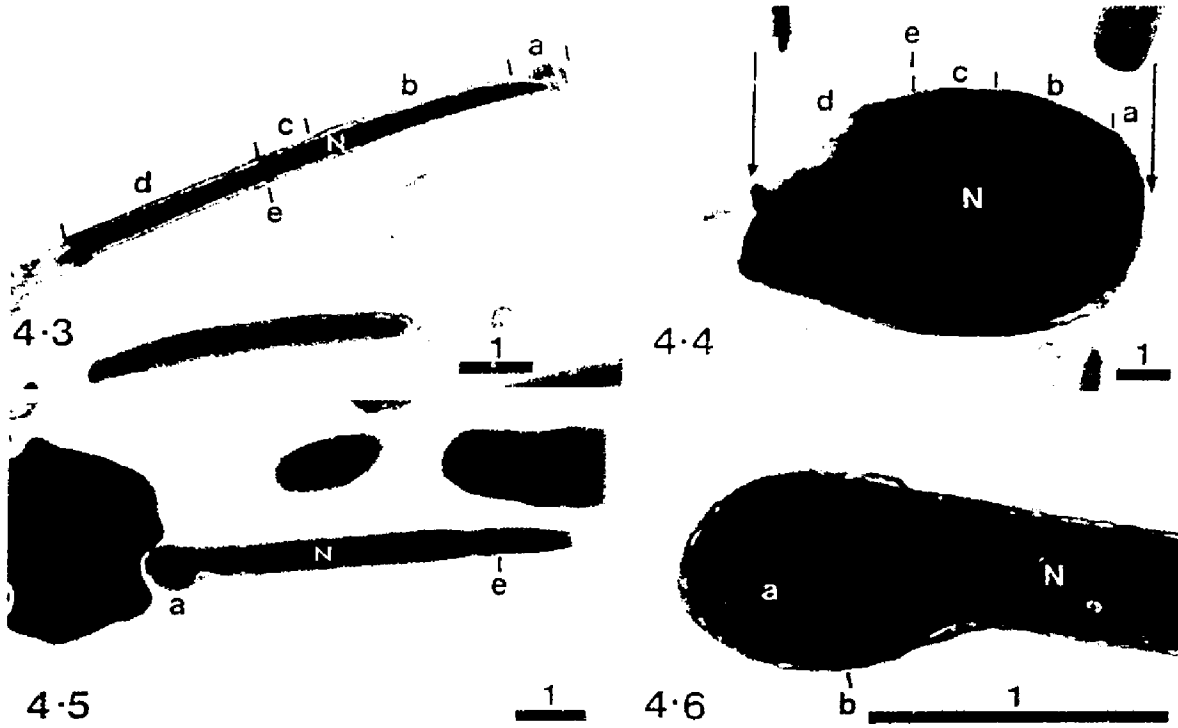
**Fig. 4.3** 'n Saggitale snee wat die dorso-ventrale afplatting van die spermkop demonstreer. Die akrosoom, bestaande uit die apikale segment met 'n eenkantige verdikking (verdik aan die een kant van die kop) (a), die hoofsegment (b) en die ekwatoriale segment (c), word van die post ekwatoriale digte lamina (PADL) (d) deur die ekwator (e) geskei. Let op dat die akrosoom van die ekwatoriale segment dunner is as die akrosoom van die hoofsegment (N=nukleus).

**Fig. 4.4** 'n Planêre snee toon dat die spermkop spaanvormig is en dat die eenkantige verdikking van die akrosoom hoofsaaklik tot die apikale segment (a) beperk is. Die akrosoom, bestaande uit die apikale segment (a), die hoofsegment (b) en die ekwatoriale segment (c) bedek ongeveer die voorste 60% van die kop. Die PADL (d) word deur die ekwator (e) van die akrosoom geskei (N=nukleus).

**Fig. 4.5** 'n Effens skuins saggitale snee van die kop wat die nukleus (N), die ekwator (e) en die eenkantige verdikte akrosoom (a) van die apikale segment vertoon.

**Fig. 4.6** 'n Saggitale snee van die apikale akrosoomverdikking (a), bedek met 'n plasmalemma (b).

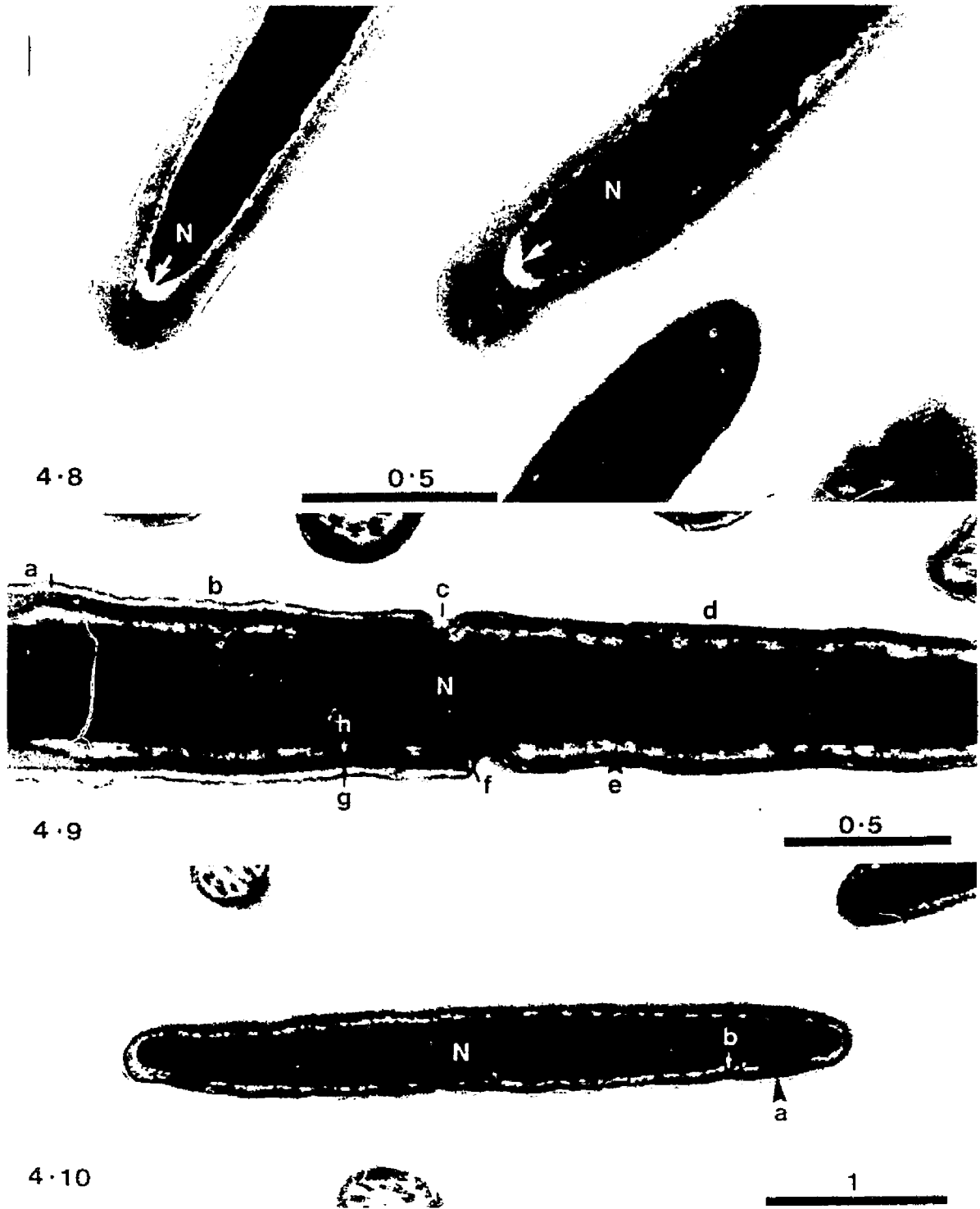
**Fig. 4.7** Dwarssneë deur die vlakke P2, P3, en P4 (Fig. 4.1). Die randstandige akrosoom-verdikking (a), (b) en (c) verdwyn geleidelik na agter. Let op na 'n dwarsnee van die PADL (d).



**Fig. 4.8** 'n Sub-akrosomale spasie (pyl) tussen die nukleus (N) en die akrosoom word in twee dwarsneë van die hoofsegment van die akrosoom aangetoon.

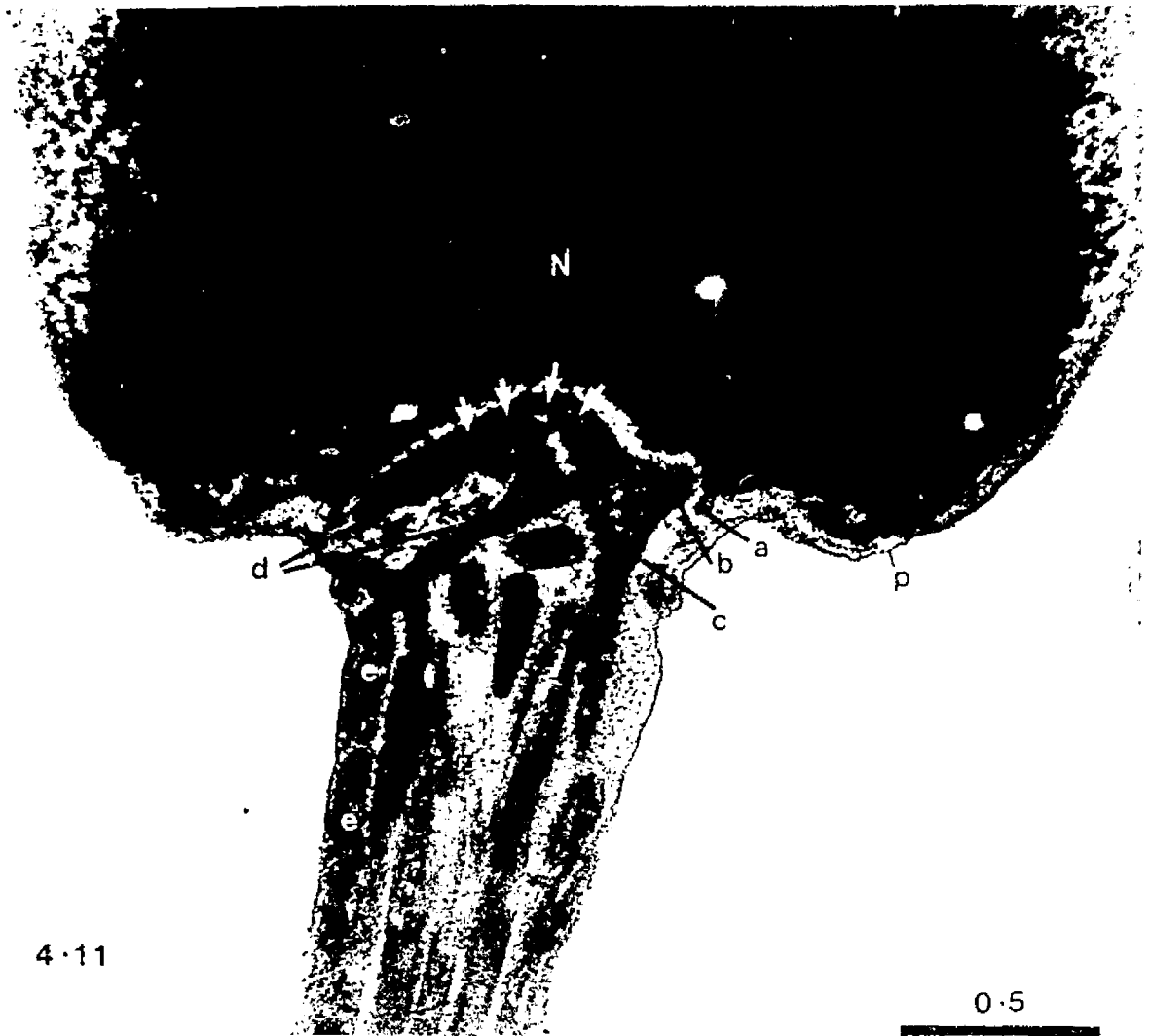
**Fig. 4.9** 'n Mediane snee van die nukleus (N) wat 'n gedeelte van die hoofsegment (a), die hele ekwatoriale segment (b), die ekwator (c) en 'n gedeelte van die PADL (d) demonstreer. Let op dat die binneste (h) en buitenste (g) akrosoommembrane mekaar by die ekwator ontmoet om sodoende die akrosoom van die PADL af te sluit. Die keep, wat deur die plasmalemma (f) by die ekwator gevorm word en die flokkulêre materiaal (e) tussen die PADL en die nukleus, word duidelik vertoon.

**Fig. 4.10** 'n Dwarssnee deur die PADL-gebied van die kop toon die flokkulêre materiaal (b) tussen die PADL (a) en die nukleus (N) aan.



**Fig. 4.11** 'n Planêre snee van die basis van die spermkop. Die basisplaat (a) bedek die holte in die basis van die nukleus en vorm 'n artikulatievlak vir die capitulum (pyltjies). Die tipiese klokvorm van die verbindingstuk (b) van een van die hoof gesegmenteerde kolomme (c) word deur die lip van die basisplaat in posisie gehou. 'n Lengtesnee van die silindervormige proksimale sentriool (d), toon in hierdie geval dat die sentriool 'n hoek van ongeveer  $50^\circ$  met die lengte-as van die flagellum vorm. Twee koaksiaal georiënteerde mitochondria (e) van die pars ascendens kan in hierdie snee waargeneem word. 'n Plasmalemma (p) bedek die spermsel.

**Fig. 4.12** In 'n planêre snee van die kop, wat die nek en 'n gedeelte van die middelstuk insluit, is die volgende van belang: 'n Plasmalemma (p) bedek die pars ascendens (a) van die nek asook die pars spiralis van die middelstuk. 'n Swak ontwikkelde hoof gesegmenteerde kolom (c) is teenwoordig wat distaal oorgaan in 'n growwe vesel. In hierdie geval vorm die proksimale sentriool (d) 'n hoek van ongeveer  $60^\circ$  met die flagellum se lengte-as.

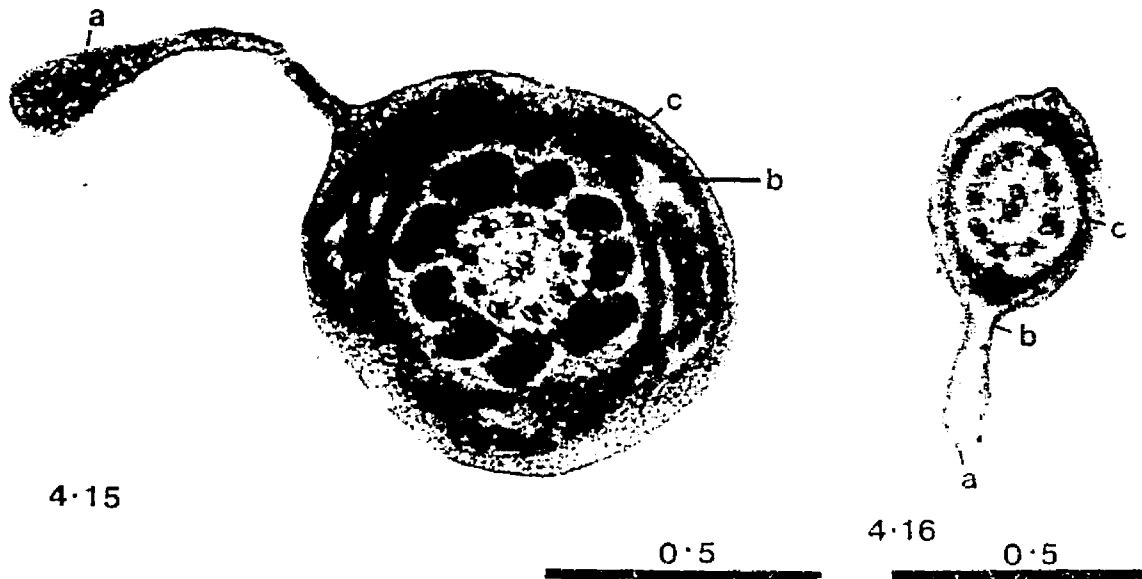
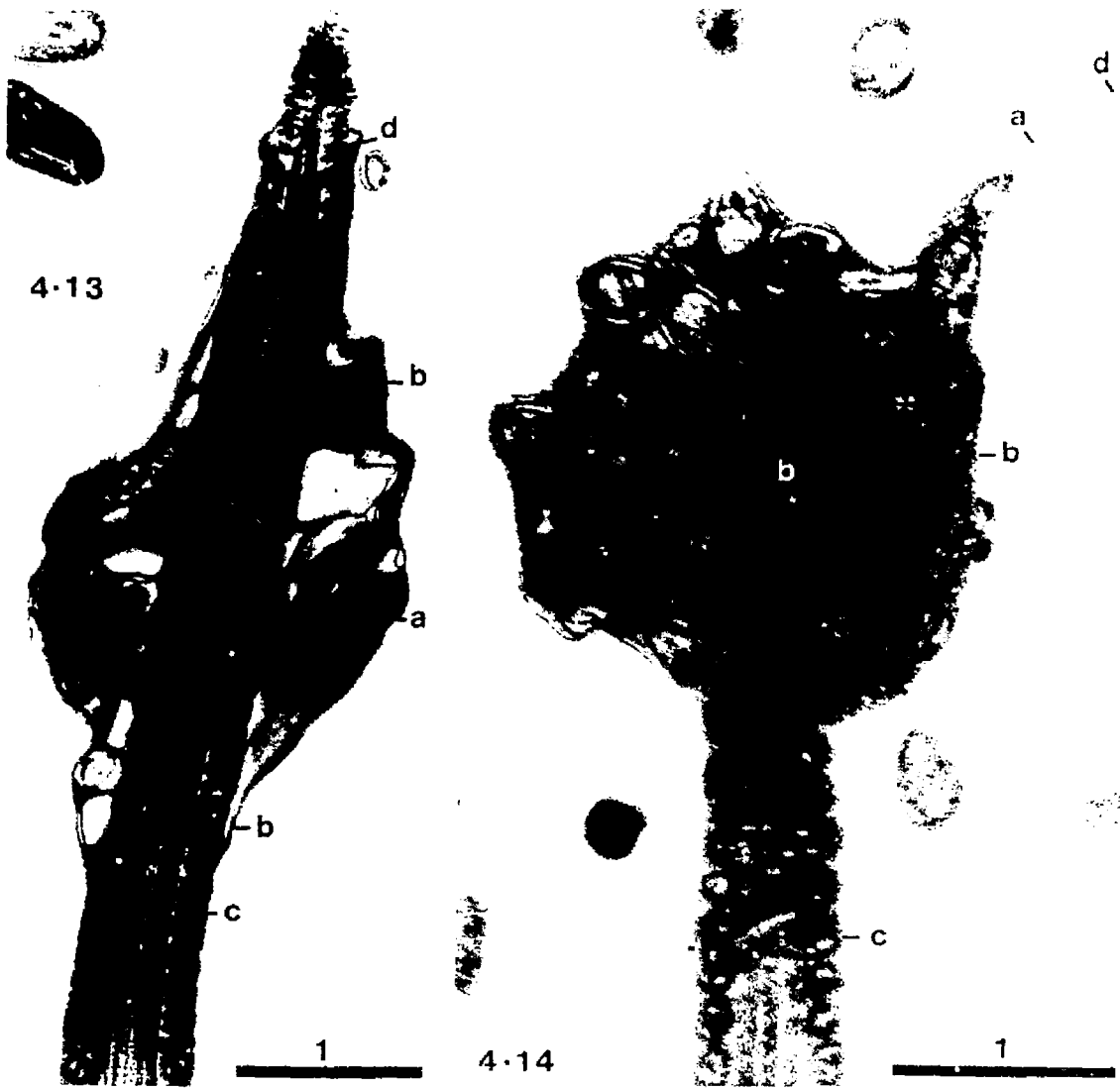


4.11



4.12

- Fig. 4.13** 'n Lengtesnee van die middelstuk (c) toon 'n distaal geleë sitoplasmiese druppel (a) bedek met die plasmalemma (b) van die spermsel. Hierdie ligging by die annulus (d) is die eindpunt van die sitoplasmiese druppel se migrasietog langs die skag van die nek en middelstuk af. Hierna word die sitoplasmiese druppel afgewerp.
- Fig. 4.14** 'n Lengtesnee van die middelstuk van die spermsel. 'n Knopvormige aanhangsel (a) van 'n sitoplasmiese druppel (b) om die middelstuk (c) word met die plasmalemma (d) bedek. Let op dat die knopvormige struktuur met sitoplasmiese materiaal gevul is.
- Fig. 4.15** 'n Dwarssnee van die middelstuk. 'n Knopvormige aanhangsel (a) van 'n middelstuk (b) word met die plasmalemma (c) van die spermsel bedek. Let op dat die materiaal in die knopvormige struktuur dieselfde is as die materiaal wat tussen die plasmalemma (c) en die mitochondria van die pars spiralis (b) lê.
- Fig. 4.16** 'n Dwarssnee van die hoofstuk. 'n Steelvormige aanhangsel (a) van 'n hoofstuk (c) word met die plasmalemma (b) van die spermsel bedek. Let op dat die materiaal in die steelvormige struktuur, elemente van die materiaal teenwoordig tussen die plasmalemma (b) en die veselagtige skede, bevat.



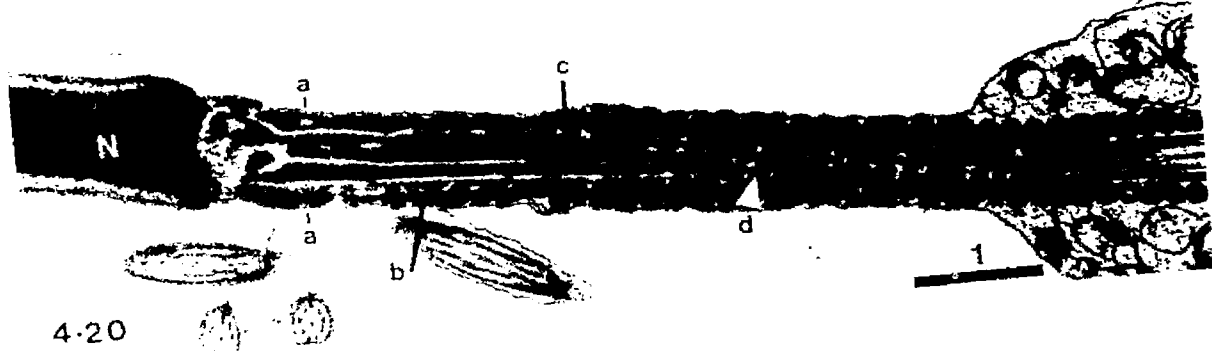
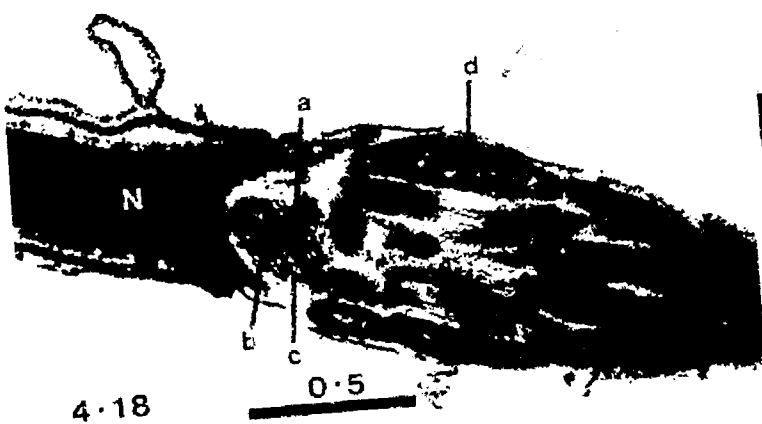


**Fig. 4.17** 'n Mediane snee van die nek en 'n gedeelte van die middelstuk demonstreer twee van die langer gesegmenteerde kolomme (a) se verbindingstukke wat proksimaal verenig om 'n capitulum (b) te vorm. Die mikrograaf toon dat die gesegmenteerde kolomme oorgaan in die growwe vesels (e) en dat die pars ascendens se koaksiaal georiënteerde mitochondria (d) in die nek voorkom. Let op dat koaksiaal georiënteerde mitochondria nooit in die pars spiralis (f) van die middelstuk voorkom nie. Koaksiaal georiënteerde mitochondria is waarskynlik net soos omtrek georiënteerde mitochondria, altyd in die nek teenwoordig maar beide word, veral in lengtesneë, nie altyd raakgesny nie. In hierdie mikrograaf is die lip van die basale plaat (c) waarneembaar.

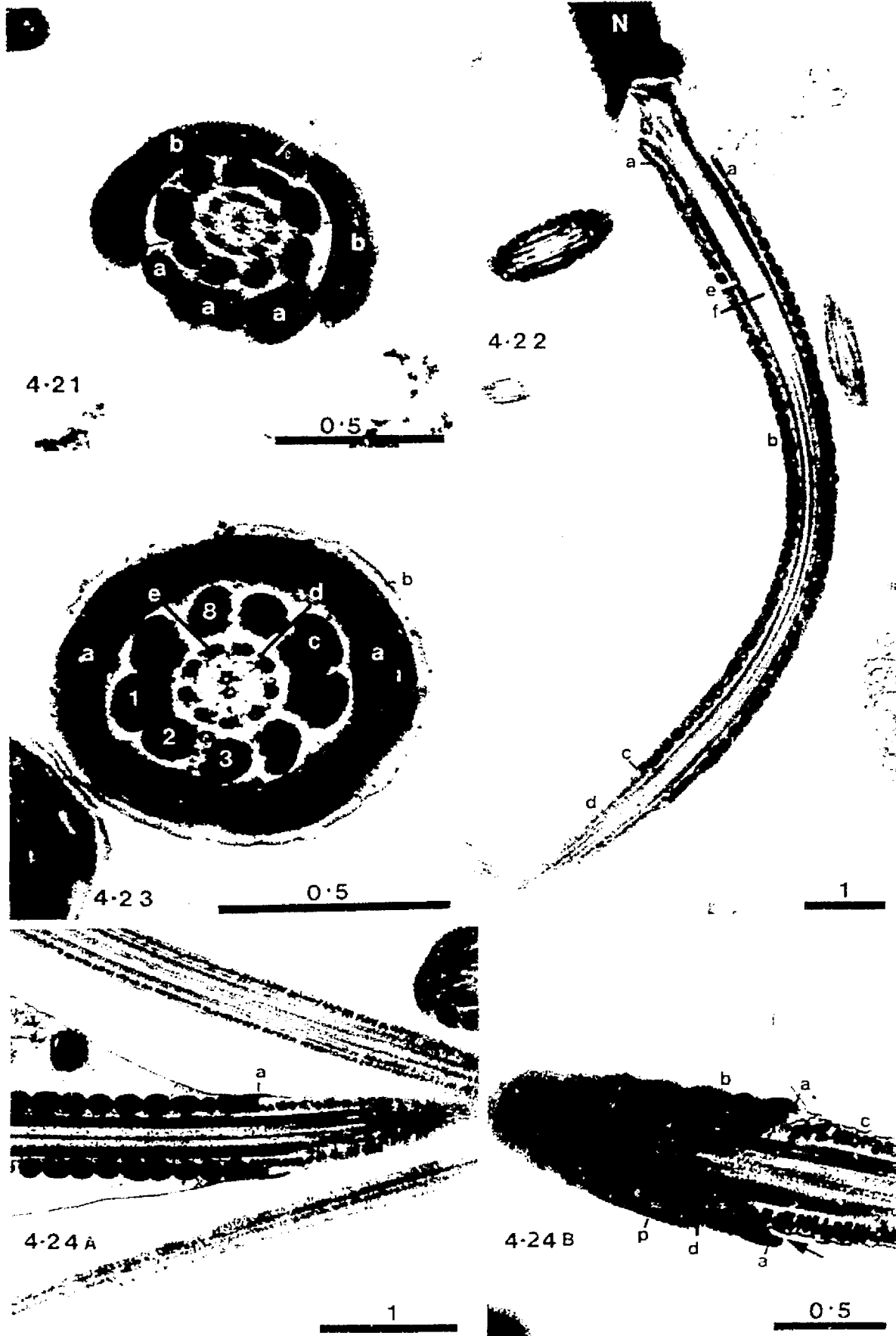
**Fig. 4.18** In 'n mediane snee deur die kop en nek van 'n sperm word 'n dwarssnee van die silindervormige proksimale sentriool (a) vertoon. Die nege stelle triplet mikrotubuli (c), 'n lip van die basale plaat (b) en 'n koaksiaal georiënteerde mitochondrium (d) word ook gedemonstreer.

**Fig. 4.19** 'n Dwarssnee van die proksimale sentriool (a) met net agt van die normale nege stelle triplet mikrotubuli. Hierdie mikrograaf word gebruik om die ultrastruktuur van die triplet mikrotubuli (b) duideliker aan te dui.

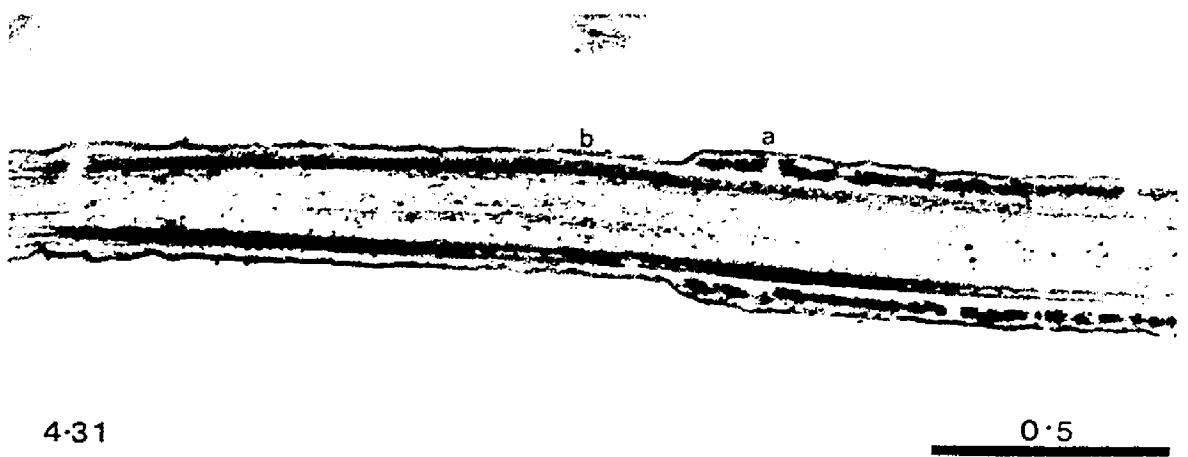
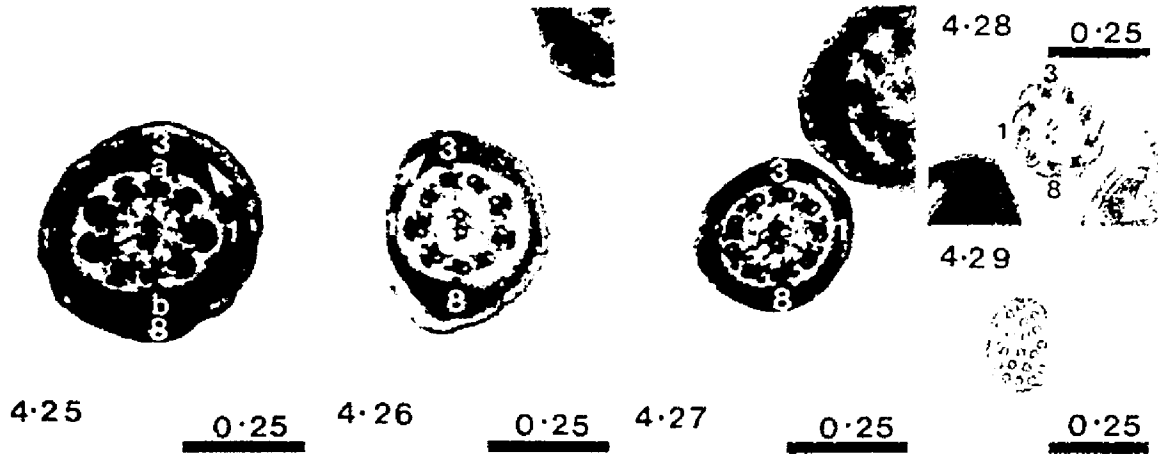
**Fig. 4.20** Koaksiaal georiënteerde mitochondria (a) ge-assosieer met omtrek georiënteerde mitochondria (b) in die nek van die flagellum. Posisie (c) dui die beginpunt van die pars spiralis aan. 'n Indikatie van die spiraal (d), wat deur die mitochondria van die middelstuk gevorm word, kan in hierdie mikrograaf verkry word.



- Fig. 4.21** 'n Dwarssnee van die nek met 3 koaksiaal georiënteerde mitochondria (a) en omtrek georiënteerde mitochondria (b). Let op dat al nege growwe vesels en die aksoneem reeds gevorm is. Die dwarssnee is dus deur die distale gedeelte van die nek.
- Fig. 4.22** 'n Lengtesnee van die nek en middelstuk wat 'n paar koaksiaal georiënteerde mitochondria (a) van 'n swak ontwikkelde nek aantoon. Die pars spiralis van die middelstuk (b) vorm in hierdie mikrograaf 'n skede van ongeveer 46 omwindings om die growwe vesels (e) en die aksoneem (f) om teen die annulus (c) te eindig. Na die annulus volg die hoofstuk (d), wat die langste deel van die flagellum is.
- Fig. 4.23** 'n Dwarssnee van die middelstuk toon die posisie van die pars spiralis (mitochondria-skede) (a) tussen die plasmalemma (b) en die growwe vesels (c) aan. Die as deur die middelpunte van die sentrale twee mikrotubuli sny deur randstandige mikrotubuli en growwe vesels nommers 3 en 8. In hierdie geval lê die drie groot growwe vesels links van bogenoemde as. Die middelste growwe vesel van die groep van drie lê regoor mikrotubuli nommer 1 en erf self hierdie nommer. Die dynienarms (d) van die randstandige mikrotubuli (e) dui die rigting aan wat vanaf nommer een gevolg moet word om die res van die mikrotubuli te nommer.
- Fig.4.24A** 'n Lengtesnee van 'n normale konusvormige annulus (a). Geen retro-annulêre reses is teenwoordig nie.
- Fig. 4.24B** 'n Lengtesnee van die flagellum wat toon hoe die annulus (a) die skeiding tussen die middelstuk (b) en die hoofstuk (c) vorm. Soms volg die plasmalemma (p) die kontoere van die pars spiralis (d) en vernameamlik die kontoere van die annulus so getrou, dat 'n retro-annulêre reses (pyl) gevorm word.



- Fig. 4.25** 'n Dwarssnee van die hoofstuk redelik na aan die annulus wat die dorsale (a) en ventrale (b) kolom respektiewelik in die posisies van growwe vesel nommers 3 en 8 aantoon. Let op dat al die ander randstandige mikrotubuli nog geassosieer is met growwe vesels.
- Fig. 4.26** 'n Dwarssnee naby die middel van die hoofstuk. Let op dat die hoofstuk, behalwe growwe vesels 3 en 8 verder weg van die annulus, nou ook growwe vesels 2, 4 en 7 verloor het.
- Fig. 4.27** In 'n dwarssnee nader aan die eindpunt van die hoofstuk vorm die veselagtige skede 'n dunner ring om die aksoneem, maar hou nog kontak met randstandige mikrotubuli 3 en 8 deur middel van 'n kort spina. Let op dat al die growwe vesels verdwyn het.
- Fig. 4.28** 'n Dwarssnee van die proksimale gedeelte van die endstuk. Die mikrotubuli het nog nie geskei soos in die volgende mikrograaf aangetoon word nie.
- Fig 4.29** 'n Dwarssnee van die distale punt van die endstuk waarvan die randstandige en die sentrale mikrotubuli van mekaar geskei het.
- Fig. 4.30** 'n Lengtesnee van die hoofstuk wat die plasmalemma (a), veselagtige skede (b), growwe vesels (c) en mikrotubuli (d) vertoon. Let op na die ringbande (e) wat die dorsale en ventrale kolomme met mekaar verbind.
- Fig. 4.31** 'n Lengtesnee van die hoofstuk (a) wat oorgaan in die endstuk (b).



#### 4.2.2 Bespreking : Normale sperme

Die kop van 'n rooiboksperm is dorso-ventraal afgeplat, 'n kenmerk wat met ander lede van die Bovidae en die meeste ander soogdiere gedeel word (Saacke en Almquist, 1964a; Fawcett, 1965; Fawcett, 1970; Roldan *et al.*, 1992; Ackerman *et al.*, 1994). Die waarnemings van Blom (1963), Saacke en Almquist (1964a), Blom (1965) en Barth en Oko (1989) ten opsigte van die akrosom van die bulsperm, wat by die apikale punt van die kop op homself terug vou, kon nie by die akrosom van normale rooiboksperm bevestig word nie. By die rooibok en die buffel (*Syncerus caffer*) verdik die akrosom egalig op die rand en net aan die een kant van die apikale gedeelte van die kop. Mediane sneë deur die apikale segment toon geen vouing of haakvorming van die akrosom by normale rooibok- en buffelsperme nie (Ackerman *et al.*, 1994). Voorlopige studies van die akrosom van ander lede van die Bovidae, naamlik rooihartbees, koedoe en blesbok toon ook nie tekens dat die akrosom 'n haak vorm op homself terugvou nie.

Blom en Birch-Andersen (1961) het die teenwoordigheid van 'n apikale vakuool in die apikale segment tussen die akrosom en die punt van die nukleus beskryf. Saacke & Almquist (1964a) kon die teenwoordigheid van so 'n vakuool of spasië by bulsperme nie bevestig nie. Tekens van 'n sub-akrosomale spasië of 'n sogenaamde apikale vakuool of perforatorium kon ook nie by rooiboksperme in die apikale segment gevind word nie.

Die proksimale sentriool is prominent waargeneem in saggitale en planêre sneë, maar die distale sentriool was afwesig soos vir volwasse soogdiersperme beskryf is (Fawcett en Phillips, 1969; Holstein, 1981). Die teenwoordigheid van verskeie koaksiaal-georiënteerde mitochondria, met een of twee omtrek-georiënteerde mitochondria tussen hulle gerangskik, blyk 'n algemene kenmerk van die mitochondria-skede van die rooiboksperm te wees.

Twee of meer mitochondria in die spermnek van ander soogdiere is wel bekend (Fawcett, 1965, 1975; Fléchon *et al.*, 1976; Holstein, 1981). Fawcett (1965) beskryf die nek van 'n sperm as die gedeelte van die flagellum tussen die nukleus en die eerste winding van die mitochondriaspiraal van die middelstuk en alle mitochondria wat tussen die twee punte voorkom, word as normale komponente van die nek beskou. Die mitochondria van die nek verseker ook dat geen verdunning van die nek voorkom nie. 'n Soortgelyke rangskikking van mitochondria in die nek van die kameelsperm is deur Tingari (1991) waargeneem. Hy stel voor dat die nek beskryf moet word as die gedeelte van die flagellum tussen die kop en die voorkoms van die eerste mitochondrium. Die middelstuk sou dus die koaksiaal en die omtrek georiënteerde mitochondria (*pars ascendens*), sowel as die *pars spiralis*, insluit. 'n Saak kan sekerlik vir die siening van Tingari uitgemaak word, maar aangesien die terminologie van Fawcett (1965) vir die doeleindes van hierdie studie gebruik is, word met sy definisie van die nek volstaan. Die rede vir die koaksiaal georiënteerde mitochondria in die nek is onbekend maar is waarskynlik ook, soos ander mitochondria, essensieël vir selmetabolisme (Zamboni, 1992).

Geen beskrywing of vermelding van die steelagtige aanhangsels of filamente van die sitoplasmiese druppel, middelstuk of hoofstuk kon in die literatuur gevind word nie. 'n Mikrograaf van 'n saggitale snee van die middelstuk van 'n Holstein bulsperm in 'n publikasie van Saacke en Almquist (1964b), toon 'n struktuur wat waarskynlik 'n rudimetêre filament van die middelstuk is. In die publikasie of die verduideliking van die figuur word nie van die struktuur melding gemaak nie. Aangesien bogenoemde strukture ook waargeneem is in sperme van buffels, is dit moontlik dat hierdie strukture ook by ander soogdiere se sperme of ten minste by die sperme van ander lede van die Bovidae gevind sal word (Ackerman *et al.*, 1994).



Met geringe afwykings word die kenmerk van 'n konusvormige annulus met die bul, die buffel (*Syncerus caffer*) en die waterbuffel (*Bos bubalis*) gedeel. 'n Retro-annulêre reses is soms by die rooibok en die bul teenwoordig, maar word nie by bogenoemde twee spesies buffels gevind nie (Saacke en Almquist, 1964b; Heath en Gupta, 1976; Barth en Oko, 1989; Ackerman *et al.*, 1994). In die geval van die rooibok mag 'n artifak verantwoordelik gewees het vir die voorkoms van 'n retro-annulêre reses wat net soms waargeneem is. By soogdiere verskil die morfologie van die annulus aansienlik, maar die annulêre kenmerke vir elke spesie is in die reël konstant (Fawcett, 1970).

Die ultrastruktuur van die hoofstuk en endstuk kom ooreen met algemene beskrywings vir soogdiersperme (Fawcett, 1975).

#### **4.2.3 Abnormale sperme**

Abnormale sperme van 'n soogdier word hoofsaaklik tydens die proses van spermatogenese in die testis gevorm. Genetiese faktore, immunologiese agense, temperatuur, hoogte bo seespieël, voeding, toksiese substansie, hormoonveranderinge en stres as gevolg van ander omgewingsinvloede, kan moontlik verantwoordelik wees vir die vorming van abnormale sperme tydens die proses van spermatogenese in die testis en die verdere ontwikkeling van sperme in die epididymis (Mann en Lutwak-Mann, 1981; Holland en White, 1982; Dadoune, 1988; Holstein *et al.*, 1988; Bonet *et al.*, 1993; Reinecke *et al.*, 1995).

Holstein (1988) beskou die onbuigsame klassifikasie van abnormaliteite volgens tipes as verwarrend indien 'n mens die menigte verskillende fenomene en hulle moontlikhede vir kombinasies in ag neem. Hierdie beskouing word met Holstein gedeel en daarom is 'n

eenvoudige klassifikasie vir spermabnormaliteite wat baie dieselfde as Holstein (1988) se stelsel is, vir die doel van hierdie studie gebruik.

Die mikrograwe is die resultaat van 'n TEM-studie wat gedoen is van die abnormaliteite van sperme van vier-en-sestig rooibokke. Dit sluit alle beskikbare diere van die kontrole- sowel as die eksperimentele groep in en moet slegs beskou word as die dokumentering van spermabnormaliteite van rooibokke wat uit verskillende gebiede van die Krugerwildtuin afkomstig is. Vir 'n kwantitatiewe analise is die diere in 'n kontrole en 'n eksperimentele groep verdeel (Kyk tabel 5.1, 5.2, hoofstuk 5).

Die abnormaliteite van rooiboksperme is in die volgende groepe verdeel:

#### **Akrosoom**

Voorbeelde: Lipvorming, abnormale verspreiding en verdikking, sist, disintegreering.

#### **Post akrosomale digte lamina (PADL)**

Voorbeeld: Disintegreering.

#### **Kop**

Voorbeelde: Vakuool, kraterdefek, vlerk- of rifvorming, balvorming, gevoude kop, chromatien sub-kondensasie, veelvuldige nukleï.

#### **Flagellum**

Voorbeelde: Nekvakuoles, kopbasiskrater, flagellum kort, dubbel, geknak en hoofstukvakuoles.

#### **Dagdefek**

Voorbeelde: Flagellum op verskillende wyses op homself opgerol, of in windings op die kop gerangskik.

#### 4.2.3.1 TEM MIKROGRAWE : ABNORMALE SPERME

**SKAAL : EENHEDE IN MIKROMETER ( $\mu\text{m}$ )**

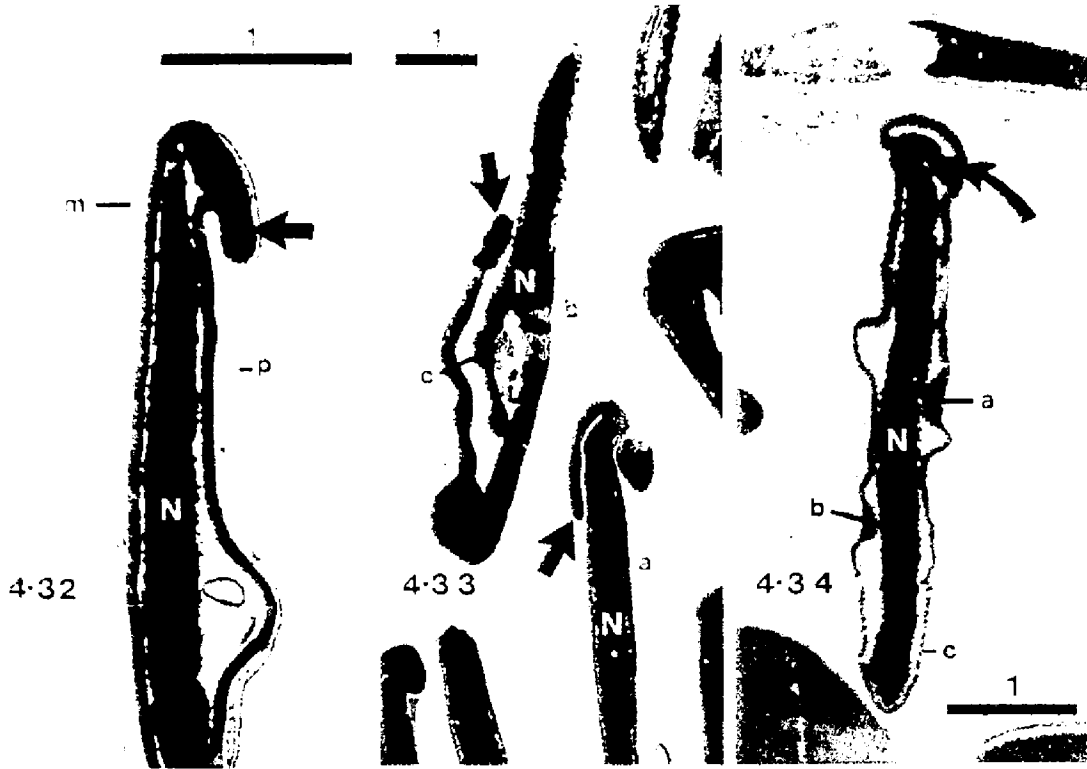
**a (i) Akrosoom : Lipvorming**

**Fig. 4.32** Die vorming van 'n lipagtige abnormaliteit (pyl) is 'n kenmerkende afwyking van die apikale verdikking van die akrosoom van 'n rooiboksperm. Die graad en vorm van die abnormaliteit kan aansienlik varieer. In hierdie saggitale snee van 'n sperm se kop is die materiaal (m), direk onder die plasmalemma (p), waarskynlik reste van 'n verwerende akrosoom.

**Fig. 4.33** In 'n lengtesnee toon sperm (a) 'n verlenging van die akrosoomlip en sperm (b) 'n erg verlengde lip (pyl) van die akrosoom. Die nukleus (N) van (b) toon tekens van rifvorming (c) en die akrosoom in hierdie omgewing is abnormaal verdik.

**Fig. 4.34** Die apikale akrosoom (pyl) met 'n sist met geen inhoud, toon tekens van lipvorming (pyl). Die hoofsegment (a) en die ekwatoriale segment (b) is ook abnormaal verdik. In hierdie geval is die hele akrosoom en die post akrosomale digte lamina (PADL) (c) distaal van die nukleus weggetrek.

**Fig. 4.35** Sperm (a) se apikale akrosoom vorm 'n lip (pyl). Let op na die sist in die lip. Sitoplasmiese materiaal kom in die boog van die kop voor. Sperm: (b) se akrosoom toon dieselfde abnormaliteit (pyl), maar is geassosieer met 'n swak gekondenseerde nukleus (N) en 'n Dagdefek, aangedui deur die sneë van die flagellum (c) wat deur 'n plasmalemma (p) bedek is. Sitoplasmiese materiaal (d) kom in die boog van die spermkop voor.



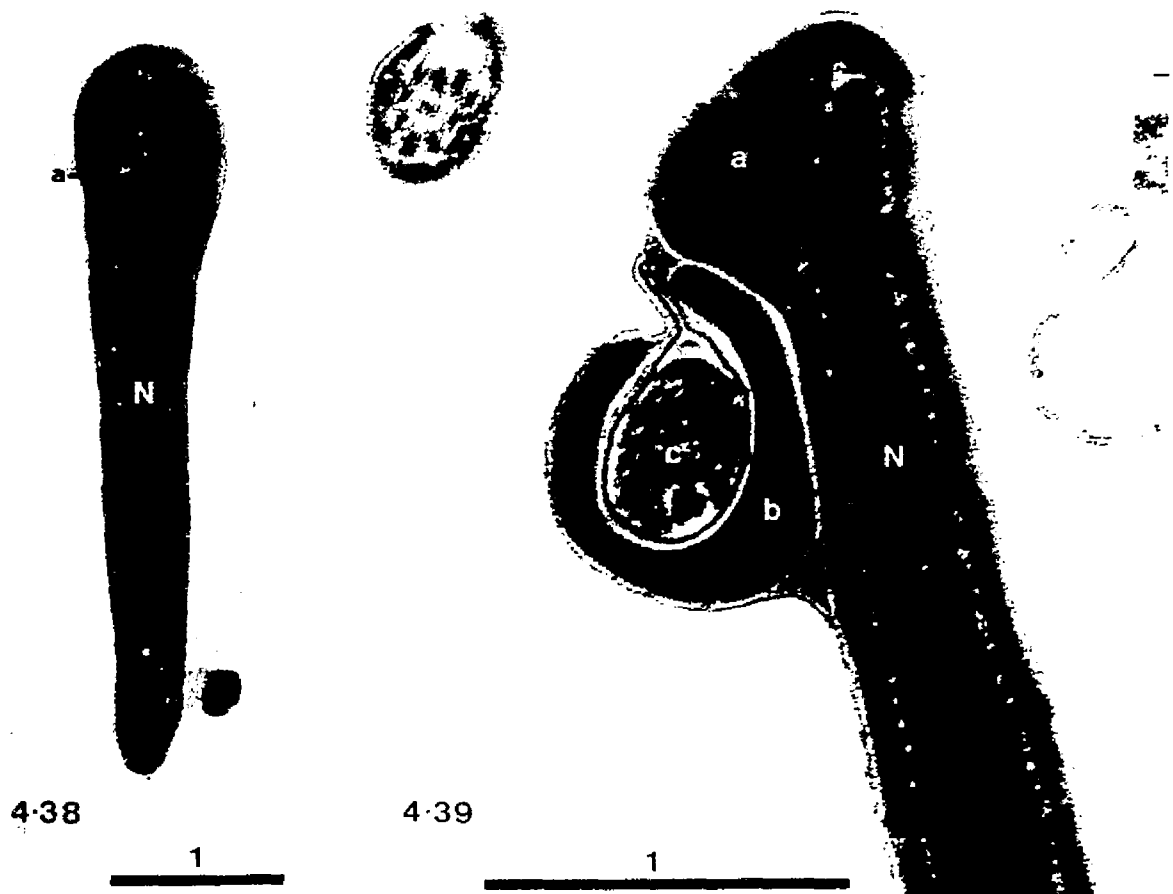
**a (ii) Akrosoom : Sist**

**Fig. 4.36** 'n Sist (a) van die apikale akrosoom (b) gevul met granulêre materiaal waargeneem in 'n mediane snee van die spermkop.

**Fig. 4.37** 'n Apikale sist (a) gevul met granulêre materiaal. Die elektron-digte materiaal in die middel van die sist is waarskynlik reste van die akrosoom. Die punt van die nukleus (N) is effens afgeplat deur die drukking van die sist.

**Fig. 4.38** In hierdie saggitale snee het 'n sist (a) van die apikale akrosoom 'n vormverandering van die punt van die nukleus (N) veroorsaak.

**Fig. 4.39** 'n Saggitale snee van die apikale segment. Die akrosoom (a) het 'n abnormale verdikking (b) gevorm waarin 'n sist (c), gevul met granulêre materiaal, voorkom. .

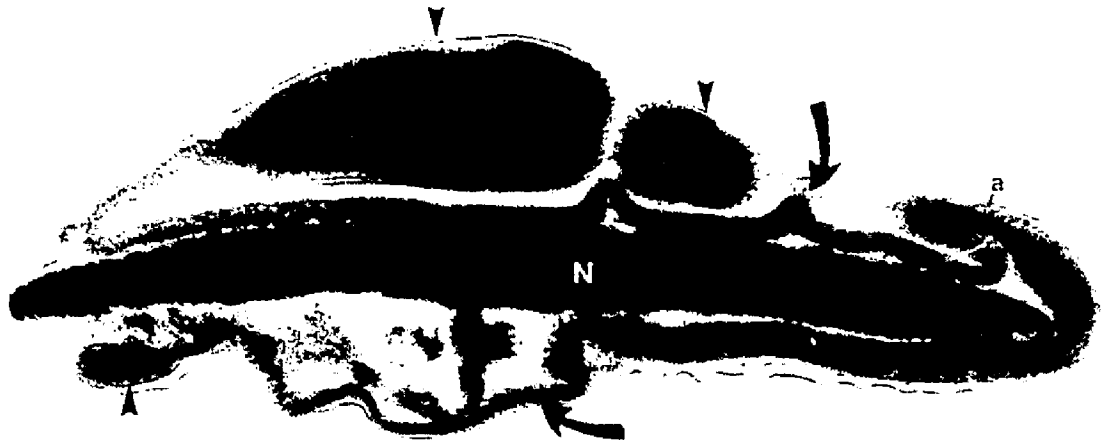


**a (iii) Akrosoom : Abnormale verdikking.**

**Fig. 4.40** 'n Saggitale snee wat 'n gedeelte van die apikale segment insluit. Op verskeie plekke is akrosoommateriaal abnormaal gevorm en verdik (pylpunt). Lipvorming (a) is teenwoordig en die akrosoom is gedeeltelik van die nukleus (N) verwyder (pyl).

**Fig. 4.41** 'n Dwarssnee van die spermkop deur die hoofsegment van die akrosoom. Die akrosoom is abnormaal verdik (pylpunt) en 'n akrosoom sist (a) het die nukleus (N) effens weggedruk.

**Fig. 4.42** 'n Saggitale snee van 'n spermkop wat 'n abnormale akrosoomverdikking (pylpunt) aan beide kante van die apikale gedeelte van die nukleus gevorm het. Die verdikte akrosoom bevat ongeïdentifiseerde elemente.



4-40

0.5



4-41

1



4-42

1



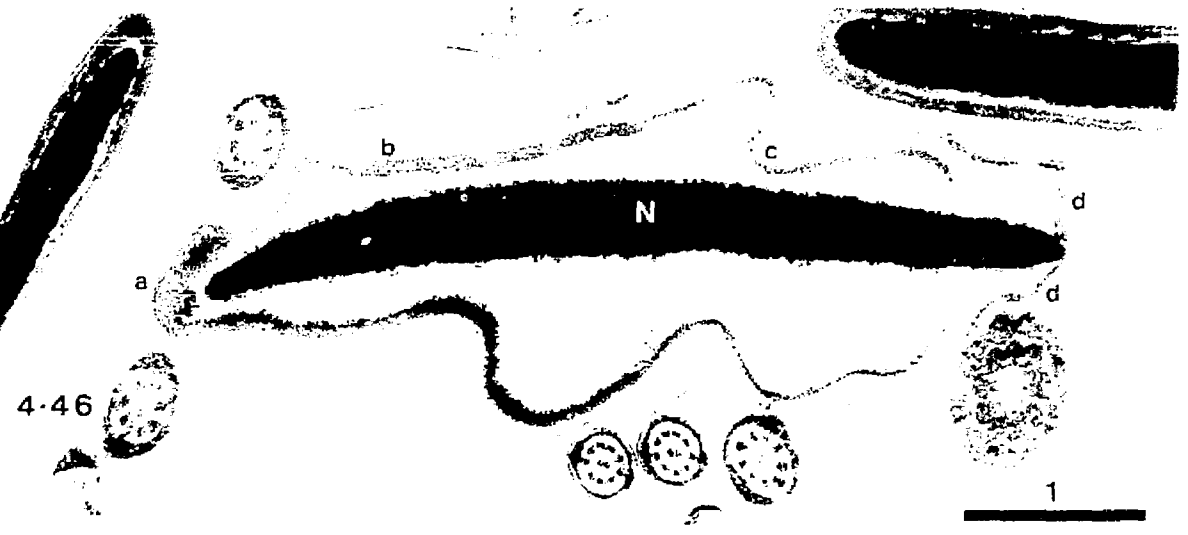
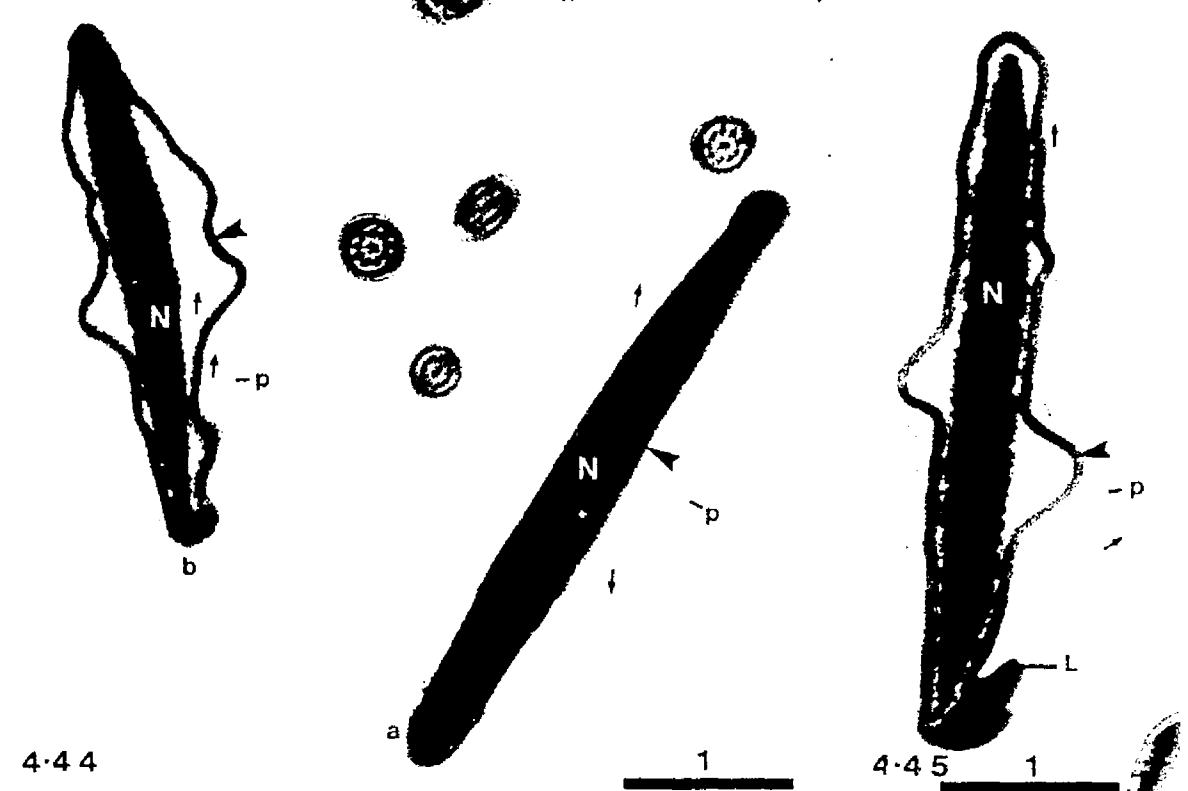
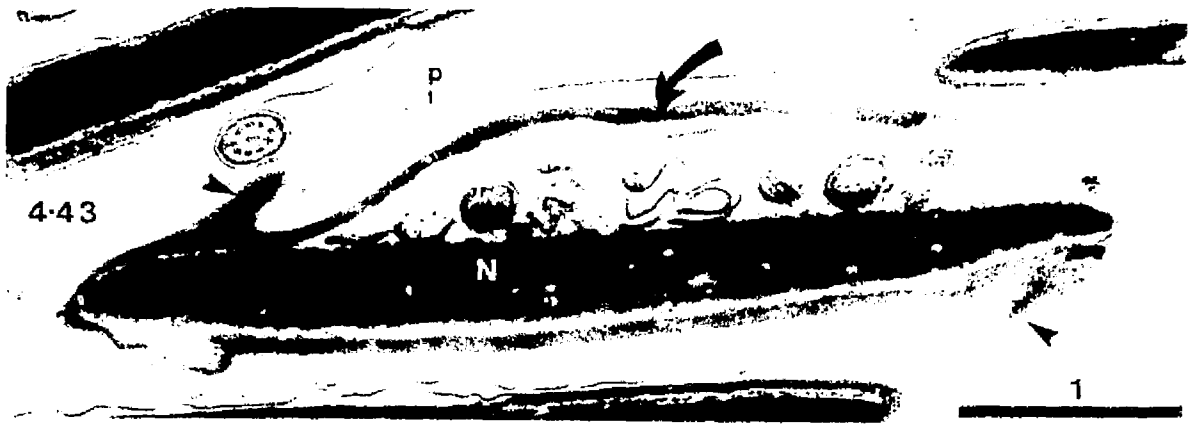
**a (iv) Akrosoom : Disintegrasië.**

**Fig. 4.43** 'n Dwarsnee deur die apikale segment van die spermkop. Sitoplasmiese en verweerde akrosoommateriaal kom tussen die nukleus (N) en 'n abnormaal weggetrekte akrosoom (pyl) voor. Die abnormale spasie tussen die plasmalemma (p) en die akrosoom is ook gevul met verweerde akrosoommateriaal. Die gelipte apikale akrosoom (pylpunt) kom abnormaal aan weerskante van die spermkop voor.

**Fig. 4.44** 'n Saggitale snee deur 'n spermkop (a) toon 'n abnormale los plasmalemma (p) waaraan reste (pyl) van die akrosoom (pylpunt) vasgeheg is. In snee (b), 'n effens skuinser saggitale snee van die spermkop, is die plasmalemma (p) los van die akrosoom (pylpunt) en laasgenoemde is los van die nukleus (N). Hierdie is 'n meer gevorderde voorbeeld van disintegrering van die akrosoom. Let op na die verweerde akrosoommateriaal (pyl) wat die akrosoom omring.

**Fig. 4.45** 'n Saggitale snee van 'n spermkop met 'n los plasmalemma (p) en akrosoom (pylpunt). Verweerde akrosoommateriaal (pyl) word duidelik vertoon. Die apikale akrosoom vorm 'n lip (L).

**Fig. 4.46** Die hele akrosoom, bestaande uit die apikale segment (a), die hoofsegment (b) en die ekwatoriale segment (c), is los van die nukleus (N). Die post akrosomale digte lamina (PADL) (d) is ook los van die nukleus.

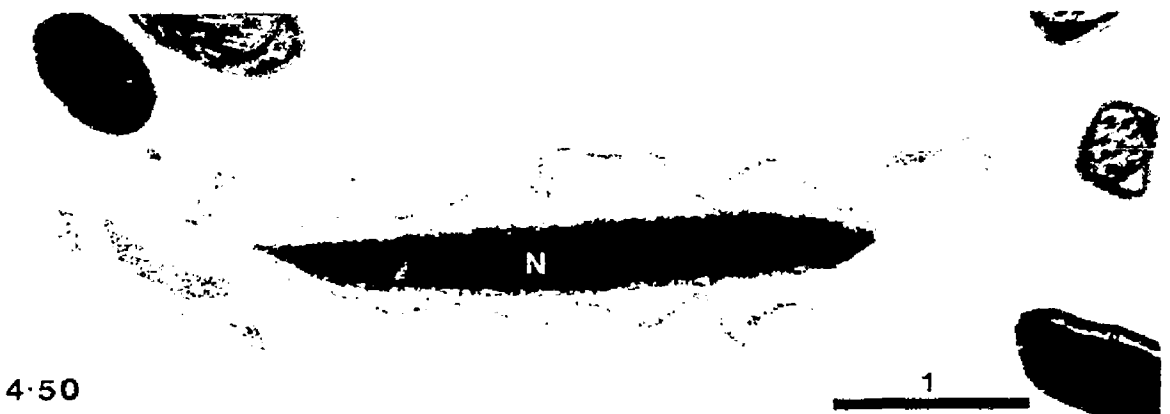
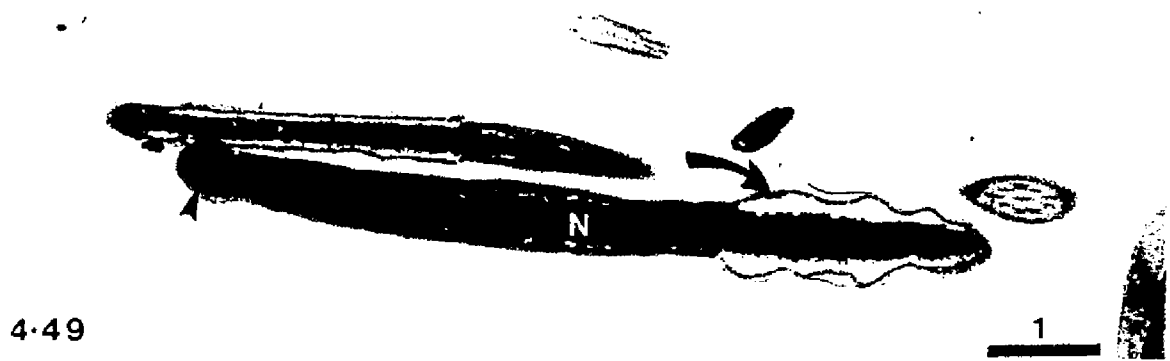
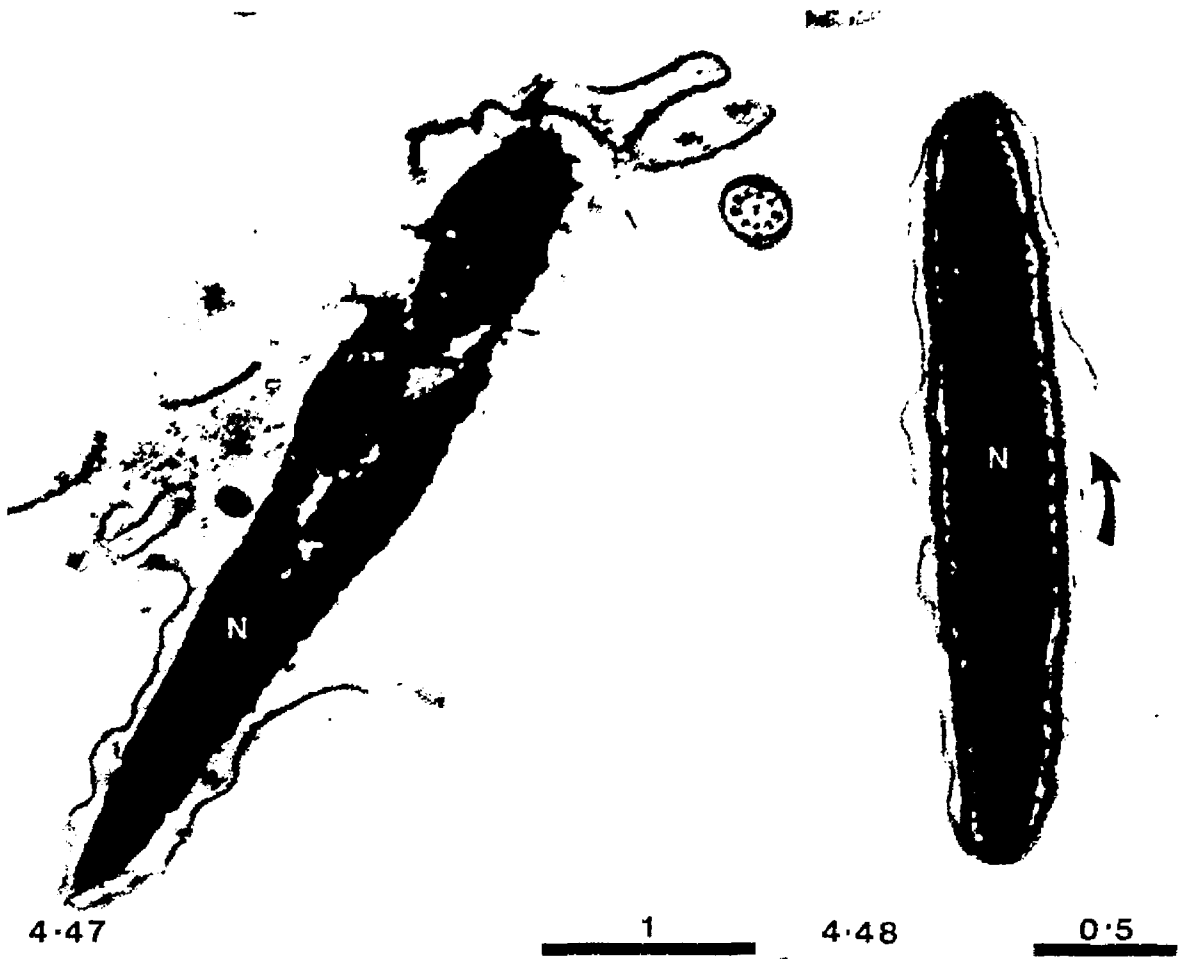


**Fig. 4.47** Die plasmalemma het gebreek en die akrosoom het algeheel gedisintegreer.

**Fig. 4.48** 'n Dwarssnee van die post akrosomale area toon dat die plasmalemma om die post akrosomale digte lamina (PADL) (pyl) beskadig is.

**Fig. 4.49** Die akrosoom (pylpunt) kom normaal voor, maar die plasmalemma is gebreek en die PADL (pyl), is beskadig.

**Fig. 4.50** 'n Dwarssnee toon 'n gevorderde fase van PADL-disintegrasie.



**b (i) Kop : Vakuole**

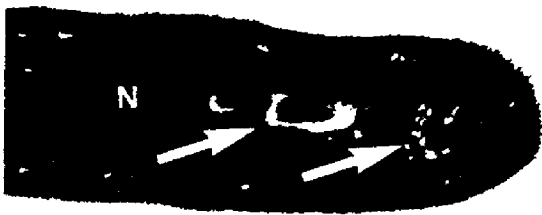
**Fig. 4.51** 'n Dwarsnee deur die kern met twee vakuoles (pyl). Een is met granulére materiaal gevul en die ander een is gedeeltelik met elektrondigte materiaal gevul.

**b (ii) Kop : Kraterdefek**

**Fig. 4.52** 'n Nukleus (N) met 'n kraterdefek (pyl). Reste van die flokkulére materiaal afkomstig van die gebied tussen die nukleus en die akrosoom (pylpunt), kom in die krater voor.

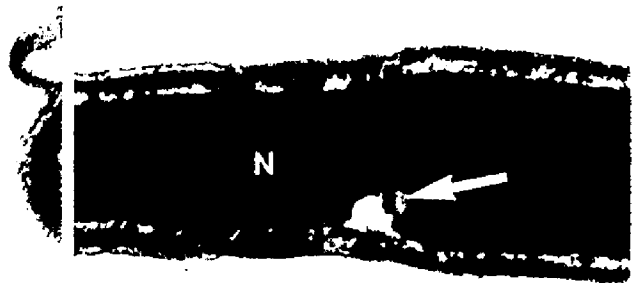
**Fig. 4.53** 'n Kraterdefek (pyl) in die basis van die nukleus.

**Fig. 4.54** 'n Nou opening verbind die kraterdefek van die nukleusbasis met die nek.



4.51

0.5



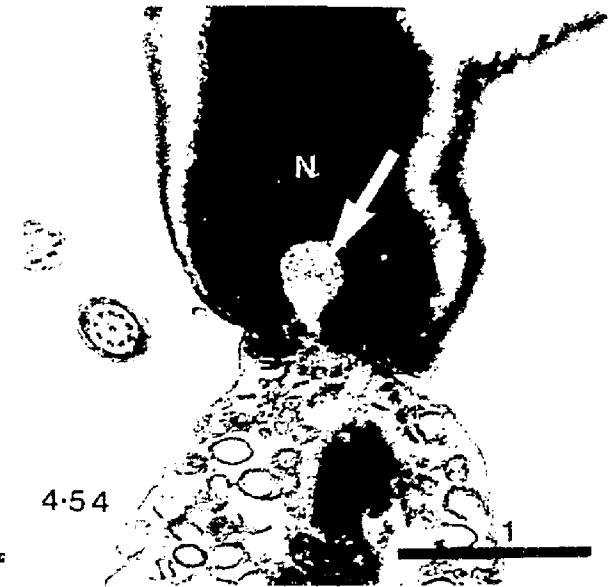
4.52

0.5



4.53

0.5



4.54

1

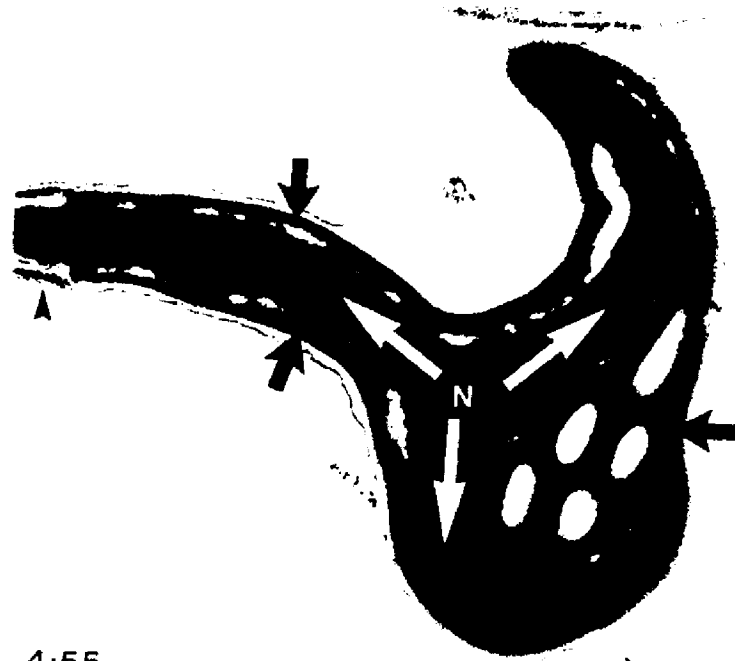
**b (iii) Kop : Vlerk- of rifvorming**

'n Gevlerkte nukleus is dikwels diploïd en is die resultaat van abnormale ontwikkeling met onvoltooide skeiding van sperme tydens spermatogenese (Bertschinger, 1975; Wild *et al.*, 1978; Oettley en Soley, 1988).

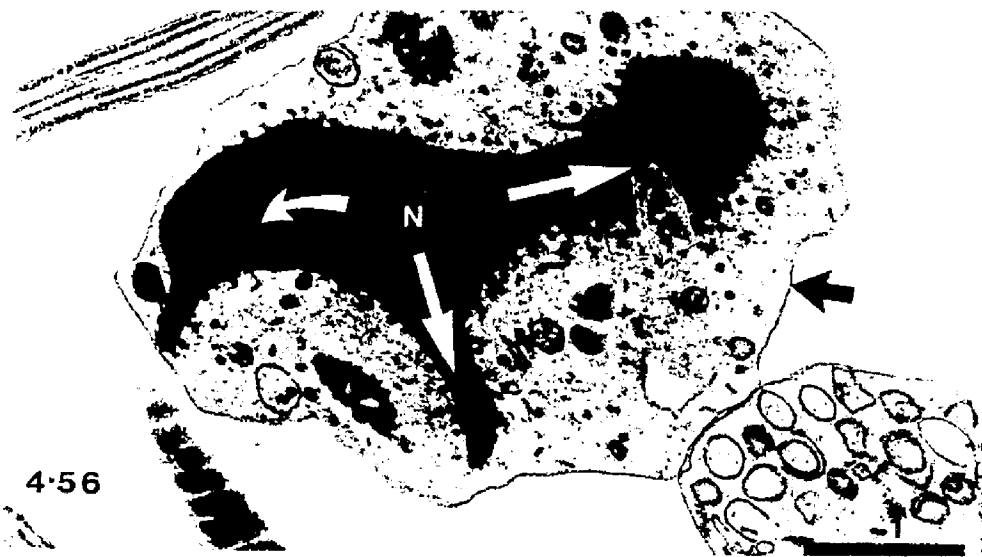
**Fig. 4.55** 'n Dwarssnee (skuins) van 'n spermkop. Die nukleus met sentrale as (N) het drie vlerke gevorm (wit pyl). Een vlerk toon 'n gedeelte van die post akrosomale digte lamina (pylpunt). Hierdie wyse van vlerkvorming kom nou en dan met min variasie voor. Vergelyk hierdie dwarssnee met die SEM-mikrograaf (Fig. 3.17) van 'n sperm met 'n vlerkvormige kop.

**Fig. 4.56** 'n Dwarssnee van 'n nukleus (N) met 3 vlerke (wit pyl) ingebed in sitoplasmiese materiaal omhul deur 'n plasmalemma (pyl). Die akrosoom is afwesig en 'n indruk van wanordelike vlerkvorming word geskep.

**Fig. 4.57** 'n Dwarssnee van 'n nukleus (N) met 4 vlerke (wit pyl). 'n Gedeelte van die plasmalemma (pylpunt) en sitoplasmiese materiaal (swart pyl) geassosieer met die nukleus dui daarop dat tenminste 'n gedeelte van die spermkop met sitoplasmiese materiaal bedek was. Die akrosoom is afwesig en die vorming van vlerke volg nie 'n patroon soos by Fig. 4.55 nie.



4.55



4.56



4.57

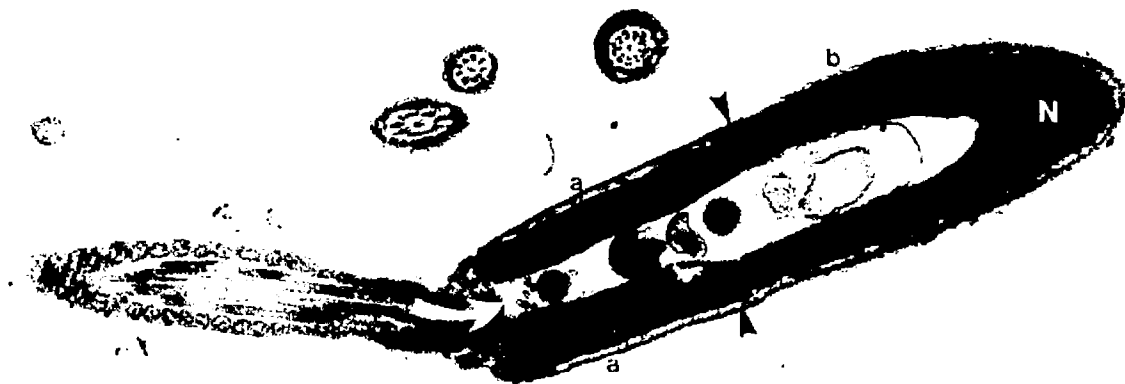


**b (iv) Kop : Balvorming**

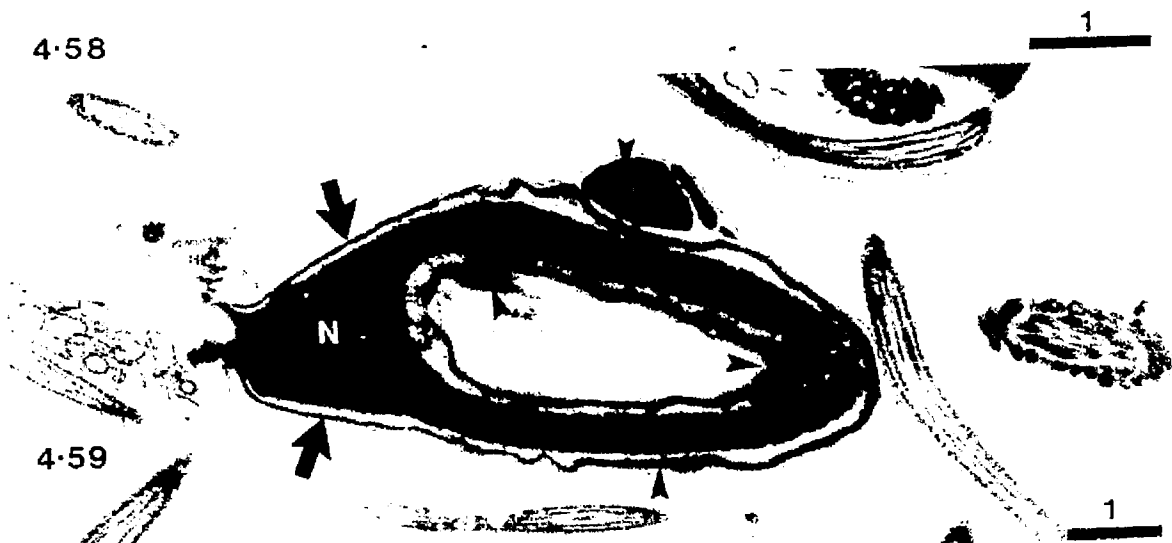
**Fig. 4.58** 'n Mediane snee van 'n spermkop wat 'n langwerpige hol bal gevorm het met 'n opening (pyl) na die nek. Die ekwator is in die omgewing van die pylpunt wat die post akrosomale digte lamina (a) en die akrosoom (b) aan beide kante van die nukleus skei.

**Fig. 4.59** 'n Mediane snee van 'n spermkop wat waarskynlik ook 'n hol bal gevorm het. In hierdie geval is daar geen opening na die nek toe nie. 'n Akrosoom (pylpunt) en 'n PADL (pyl) is oneweredig versprei oor die binne en buite wande van die nukleus (N).

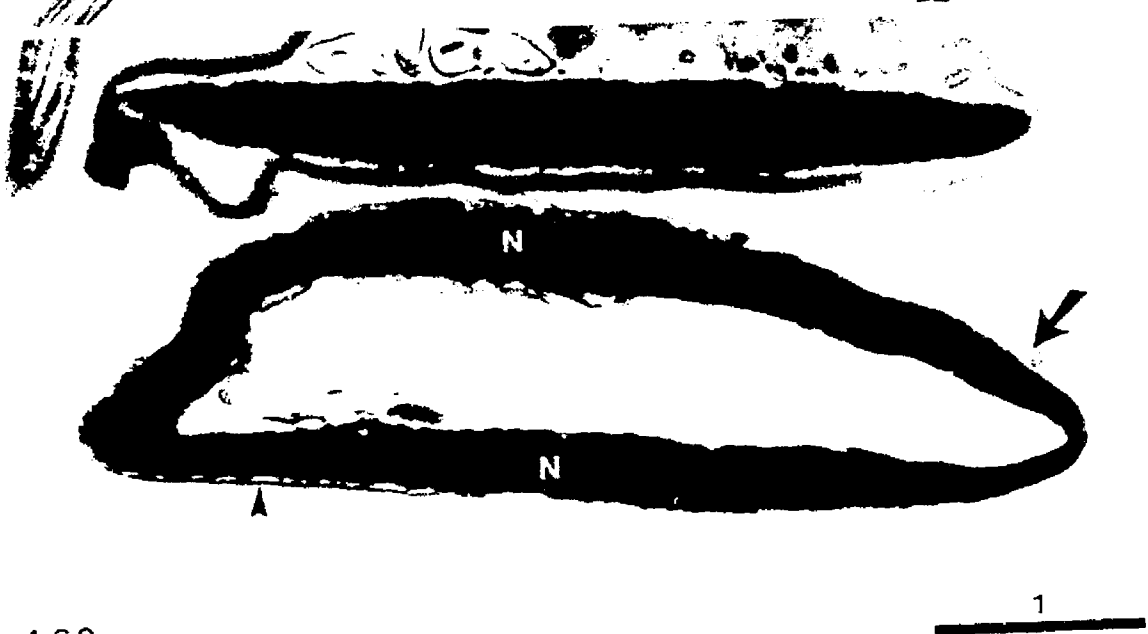
**Fig. 4.60** 'n Dwarssnee van 'n balvormige spermkop. Akrosoom (pyl) en PADL (pylpunt) is in klein hoeveelhede teenwoordig.



4-58



4-59



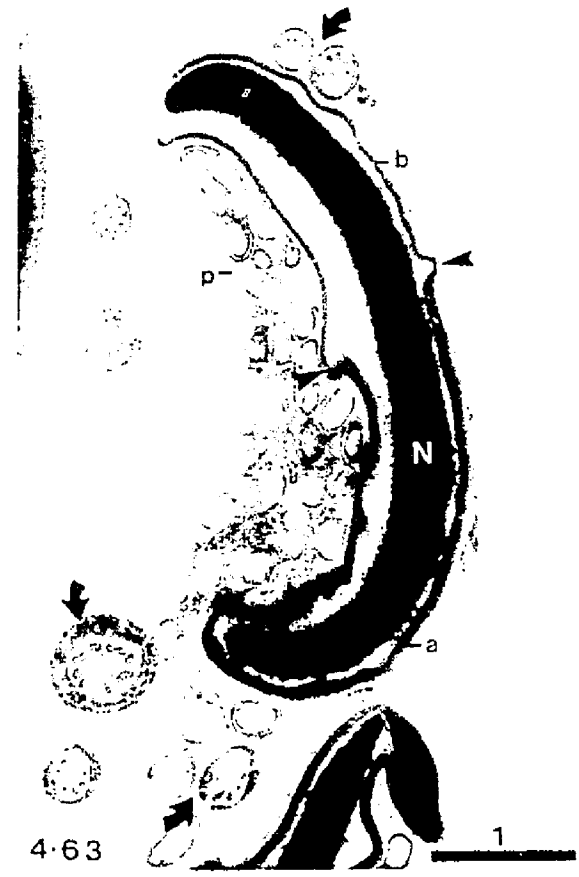
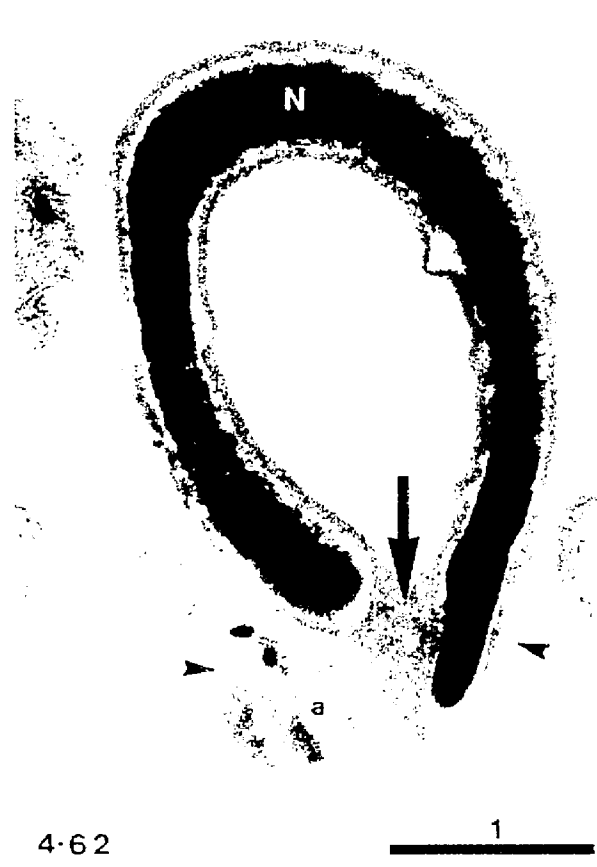
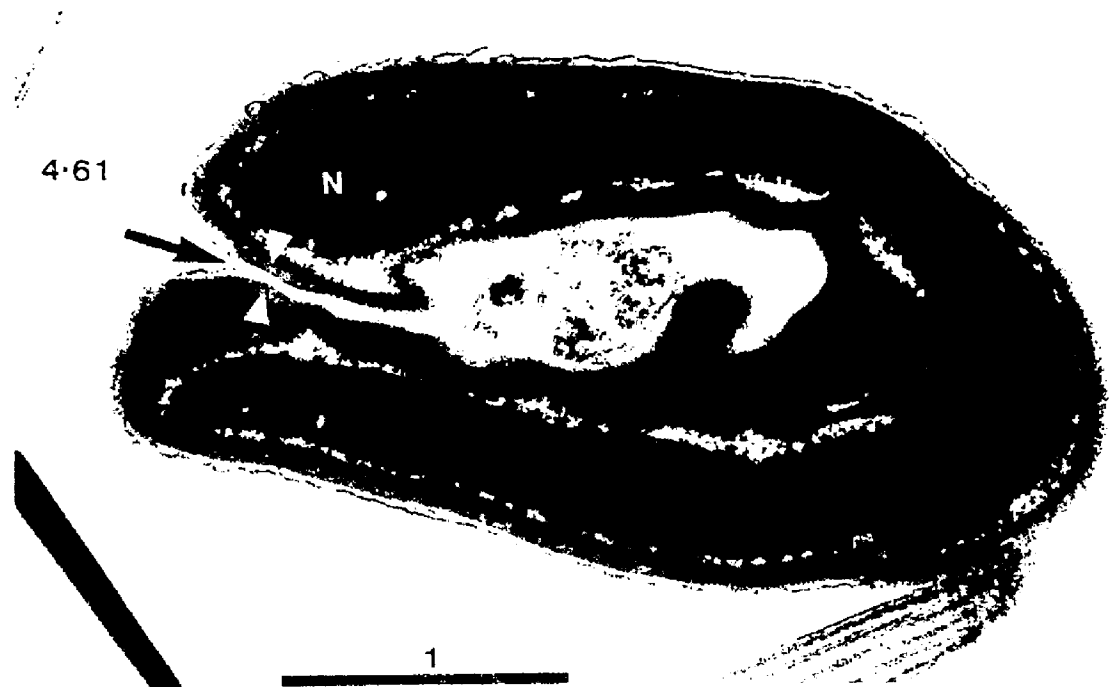
4-60

**b (v) Kop : Gevou**

**Fig. 4.61** 'n Dwarssnee deur die apikale segment van 'n oorlangs toegevoede spermkop. Die akrosoom op die sye van die kop het nie saamgesmelt nie (pypunt) en die plasmalemma (pyl) het nie die akrosoom na die binnekant van die struktuur gevolg nie.

**Fig. 4.62** 'n Dwarssnee deur die hoofsegment van 'n oorlangs toegevoede spermkop. In hierdie geval het die akrosoom op die sye van die kop saamgesmelt (pyl). Die plasmalemma (pypunt) omring die spermkop asook die addisionele akrosoommateriaal (a), maar is nie in die holte teenwoordig nie.

**Fig. 4.63** 'n Saggitale snee van 'n effens gekromde spermkop met 'n akrosoom (a), 'n ekwator (pypunt) en 'n PADL (b). Elemente van die flagellum (pyl) in sitoplasma en bedek deur 'n plasmalemma (p), dui op 'n gevorderde vorm van 'n Dagdefek.



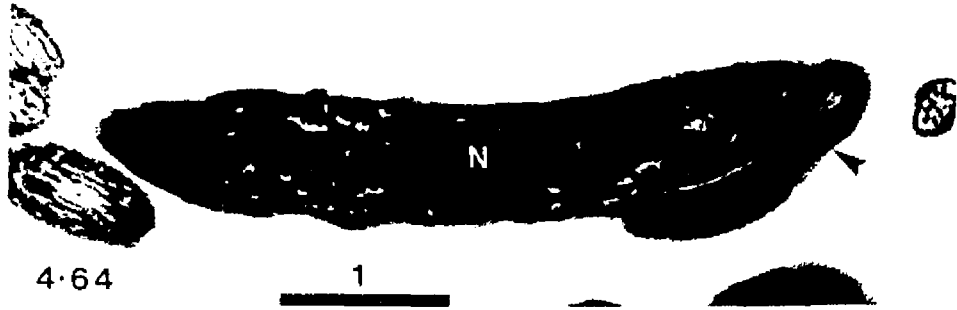
**b (vi) Kop : Chromatien-subkondensasie van die nukleus**

Chromatienkondensasie is 'n chemiese proses wat plaasvind deur middel van makromolekulêre interaksie tussen DNA en basiese proteïne om komplekse te vorm wat deur bisulfiedbinding gestabiliseer word (Bartoov *et al.*, 1980).

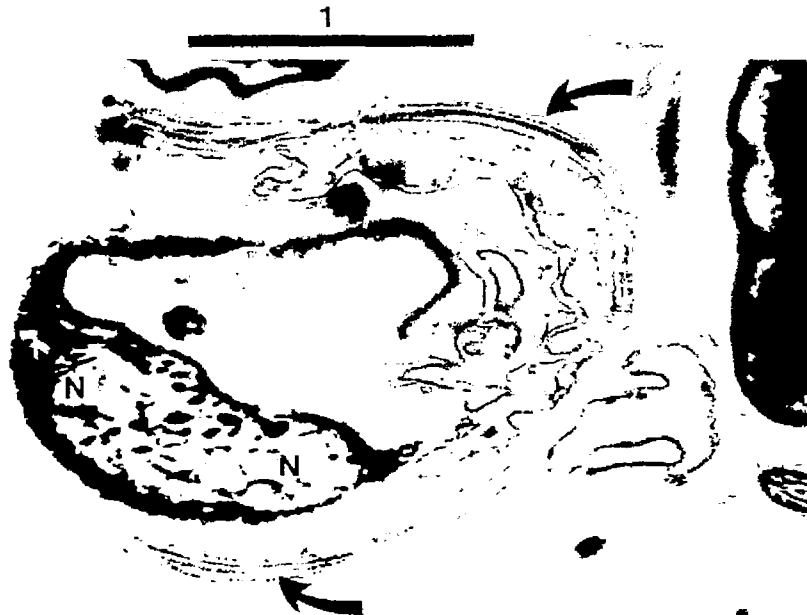
**Fig. 4.64** 'n Saggitale snee van 'n spermkop met 'n gelipte akrosoom (pylpunt). Matige subkondensasie van die chromatien van die nukleus (N) kan waargeneem word.

**Fig. 4.65** 'n Abnormale spermkop met gevorderde subkondensasie van die nukleus (N) se chromatien. Elemente van die flagellum (pyl), bedek deur die plasmalemma, dui op 'n Dagdefek.

**Fig. 4.66** 'n Spermkop met 'n Dagdefek (pyl) en 'n nukleus (N) wat erge subkondensasie van die chromatien demonstreer.



4.65



4.66

**b (vii) Kop : Veelvuldige nuklei**

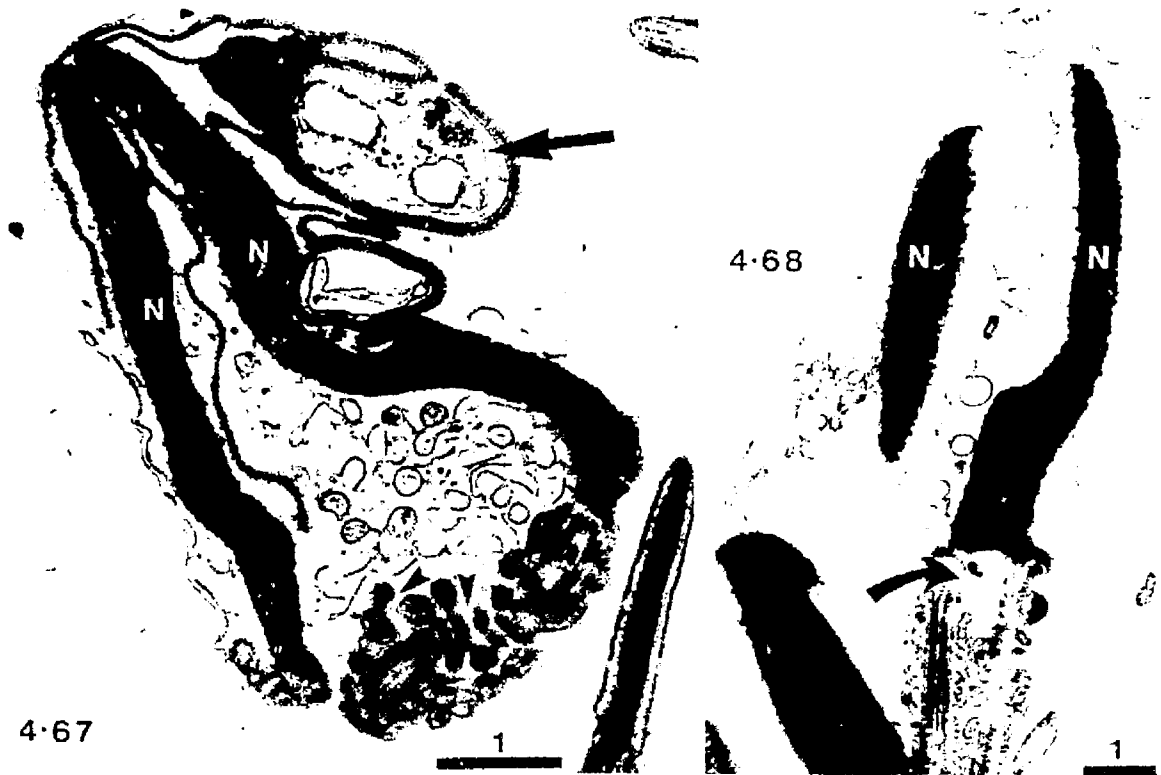
Fig. 4.67 'n Saggitale snee van 'n spermkop met twee abnormaal gevormde nuklei (N). 'n Sist (pyl) is teenwoordig in die gemeenskaplike gelipte apikale akroosom. 'n Flagellum met abnormaal gerangskikte mitochondria (pylpunt) vorm deel van die regterhandse nukleus. Sitoplasma vul die res van die spasie tussen die twee nuklei.

Fig. 4.68 'n Saggitale snee van 'n spermkop met twee nuklei. Die een nukleus besit 'n flagellum waarvan die organelle van die nek (pyl) afwesig of gedisorganiseer is. Sitoplasma kom tussen die twee nuklei voor.

Fig. 4.69 'n Saggitale snee van 'n spermkop met twee nuklei. Die abnormale gemeenskaplike akroosom (pyl) het 'n sist (pylpunt) tussen die twee nuklei gevorm.

Fig. 4.70 'n Dwarssnee van 'n spermkop met 'n Dagdefek (pyl). Die nukleusasse (N) vorm elk twee vlerke (wit pyle).

Fig. 4.71 Waarskynlik 'n lengtesnee van 'n spermkop met drie nuklei (n) wat almal dieselfde akroosom (a) deel. Snitte deur die flagellum (pyl) onder 'n plasmalemma (pylpunt) toon dat 'n gevorderde Dagdefek teenwoordig is. 'n Abnormaal gevormde akroosom (b) is moontlik deel van hierdie struktuur.





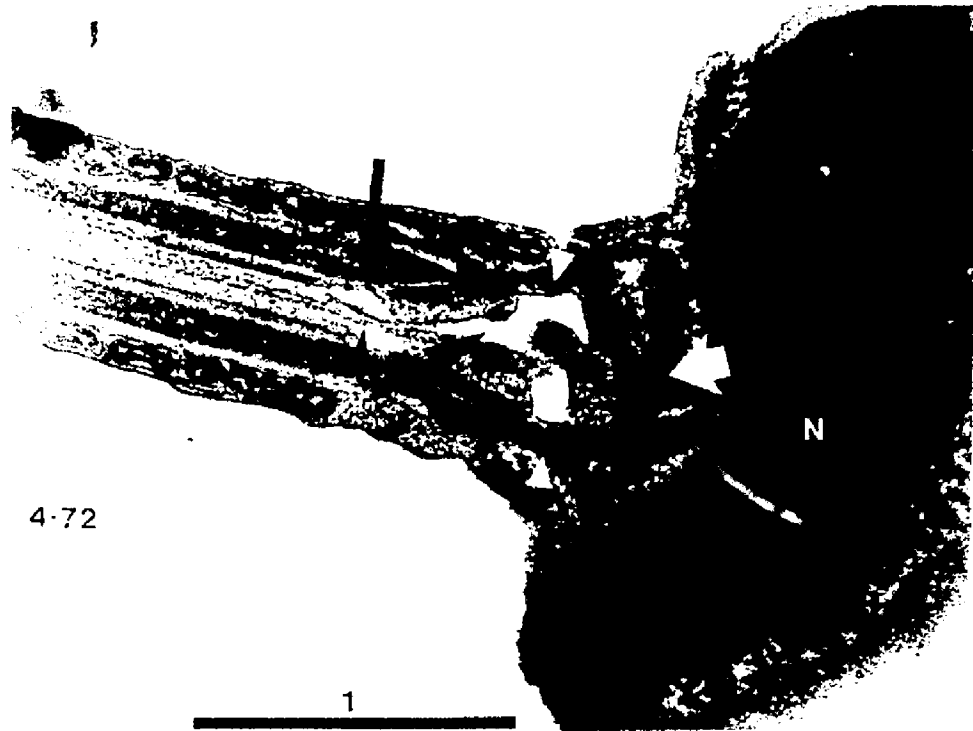
**c (i) Flagellum : Nekafwykings.**

Fig. 4.72 'n Planêre snee van 'n sperm toon 'n vakuool (swart pyl) met 'n duidelike membraan wat tussen die gesegmenteerde kolomme (wit pylpunt) van die nek gevorm het. Die proksimale sentriool (wit pyl) is nie ge-afekteer nie, maar mikrotubuli is uit posisie gedruk (swart pylpunt).

Fig. 4.73 'n Planêre snee van 'n sperm met 'n gesegmenteerde kolom vakuool (wit pylpunt) en 'n vakuool (swart pyl) wat van die kant van die nek indring en skade aan die proksimale sentriool (wit pyl) berokken.

Fig. 4.74 'n Saggitale snee van 'n sperm deur 'n vakuool met 'n opening na buite en 'n arm (pyl) wat om die verbindingstuk en 'n gedeelte van die capitulum strek. Sodoende word die aanhegting van die nek verswak. Die ander vakuool (pylpunt) dra by om die stewigheid van nekstrukture nog verder te verswak.

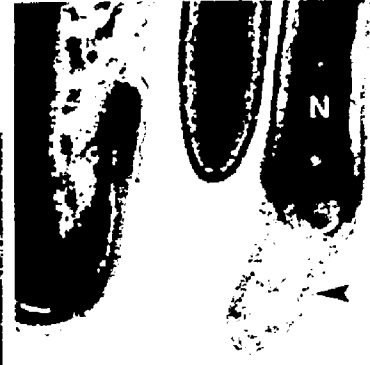
Fig. 4.75 'n Saggitale snee van 'n sperm toon 'n dwarsnit van 'n proksimale sentriool (pyl) waarvan die sentrale gedeelte deur 'n vakuool beset word. Onder die basisplaat (pylpunt) is geen elemente van die verbindingstuk sigbaar nie aangesien 'n vakuool die gebied beset.



- Fig. 4.76 'n Saggitale snee van 'n sperm met gesegmenteerde kolom vakuoles. 'n Kopbasiskrater (pyl) vervorm die aanhegting van die kop met die nek.
- Fig. 4.77 Die sperm met die kopbasiskrater (wit pyl) se flagellum is oppervlakkig raakgesny, maar maak waarskynlik nie met die kop kontak nie. Die ander sperm se flagellum (swart pyl) het nie ge-implanteer nie. Sitoplasmiese druppels is om beide die sperms se nekke teenwoordig.
- Fig. 4.78 'n Sperm met 'n kort flagellum (pylpunt) se organelle van die nek en die res van die flagellum, ontbreek.



4-76



4-78

0.5

1



4-77

1

**c (ii) Flagellum : Dubbel**

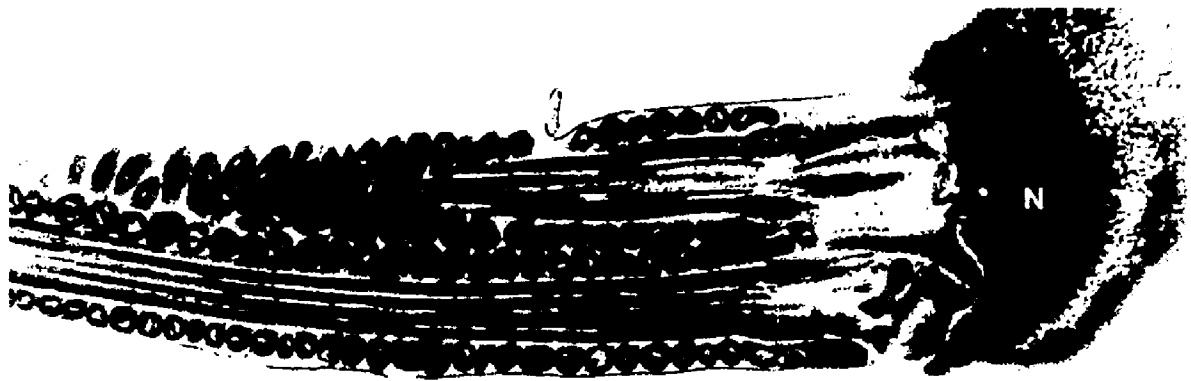
Fig. 4.79 'n Sperm met twee flagella waarvan die organelle oor die algemeen redelik normaal voorkom.

**c (iii) Flagellum : Geknak**

Fig. 4.80 'n Lengtesnee van 'n flagellum met 'n geknakte nek (pyl).

Fig. 4.81 'n Lengtesnee van 'n middelstuk (pyl) wat in 'n sitoplasmiese druppel (pylpunt) geknak het.

Fig. 4.82 'n Lengtesnee van 'n hoofstuk (pylpunt) met 'n geknakte endstuk (pyl).



4-79



4-80

4-81



4-82

**c (iv) Flagellum : Vakuoles van die hoofstuk.**

Fig. 4.83 'n Lengtesnee van die flagellum deur die middelstuk (pylpunt) en 'n vakuole van die hoofstuk naby die annulus. Die veselagtige skede van die hoofstuk het in posisie gebly terwyl die vakuool die growwe vesels en die aksoneem (pyl) opmekaar gedruk het.

Fig. 4.84 'n Lengtesnee van 'n hoofstuk met 'n vakuool verder weg van die annulus af. Die veselagtige skede (pyl) behou sy posisie en die vakuool druk ook die growwe vesels en die mikrotubuli uit posisie.

Fig. 4.85 'n Lengtesnee van die hoofstuk naby die endstuk (pylpunt). In hierdie geval het die growwe vesels nie van posisie verander nie, maar het die vakuool die veselagtige skede (pyl) na buite gedruk. Die vakuoolmembraan (a) kom by alle vakuoles voor.

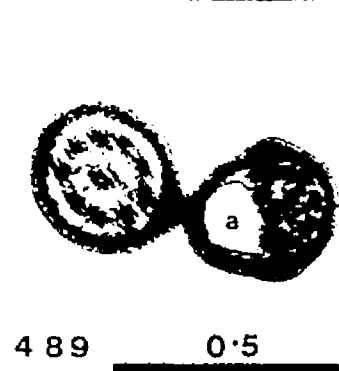
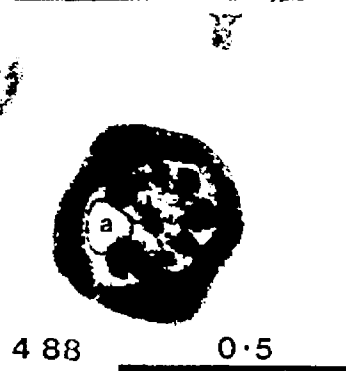
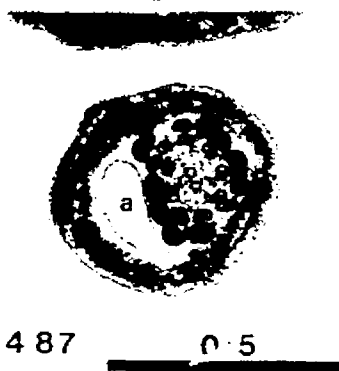
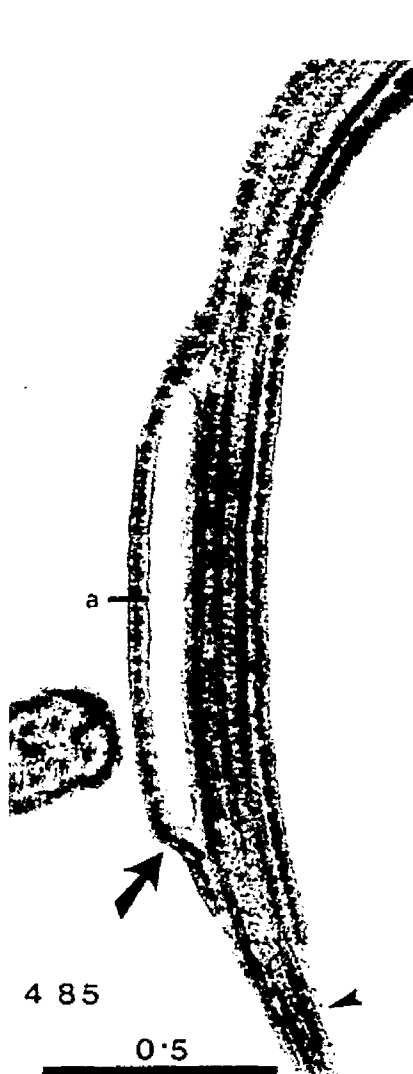
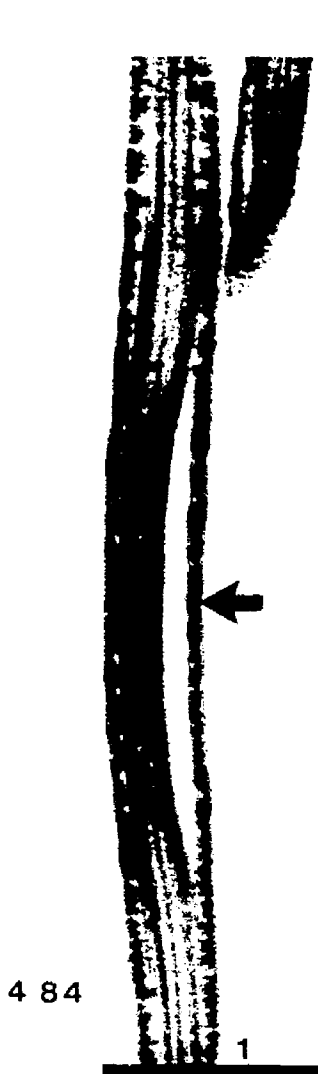
Fig. 4.86 'n Lengtesnee van 'n vakuool wat die veselagtige skede van die hoofstuk beskadig het (pyl).

Fig. 4.87 'n Dwarssnee deur die middelstuk. Die membraan omlynde vakuool (a) druk die growwe vesels en aksoneem inmekaar. Die sentrale paar mikrotubuli het hulle 3/8 oriëntering deur die vakuoldruk verloor.

Fig. 4.88 'n Dwarssnee van 'n hoofstukkakuool (a) wat tussen rowwe vesels en die randstandige mikrotubuli ingewig het en die organelle na weerskante weggedruk het.

Fig. 4.89 'n Dwarssnee van 'n hoofstuk na aan die endstuk met 'n vakuool (a) wat die aksoneem-simmetrie versteur.

483





**c (v) Flagellum : Dagdefek**

'n Dagdefek word gekenmerk deur die flagellum wat oprol of gedeeltes daarvan wat windings vorm en deur die plasmalemma bedek word. Die flagellum mag op die kop of die rand van die kop opgedraai lê. Dit mag ook op sigself op verskeie maniere windings onder 'n plasmalemma vorm.

Fig. 4.90 'n Dwarssnee van 'n Dagdefek waar die hoofstuk langwerpige windings onder 'n gemeenskaplike plasmalemma (pyl) gevorm het. Die gedeelte van die hoofstuk waarin die vakuool voorkom, toon ook die verlies van sommige mikrotubuli van die aksoneem. Net 8 van die normale 9 randstandige mikrotubuli word vertoon deur die ander gedeelte van die aksoneem (pylpunt).

Fig. 4.91 'n Lengtesnee van 'n spermkop met die flagellum styf in die nek-gebied opgerol. Let op dat sommige organelle van die middelstuk (pylpunt) en hoofstuk (pyl) afwesig is.

Fig. 4.92 'n Lengtesnee van 'n sperm met die flagellum losser in sitoplasma opgerol en bedek deur 'n plasmalemma. Organelle van die nek (a) en sneë van die middelstuk (pylpunt) en hoofstuk (pyl) is teenwoordig.

Fig. 4.93 'n Saggitale snee van 'n spermkop met die hoofstuk (pyl) wat op die rand van die kop opgerol het.

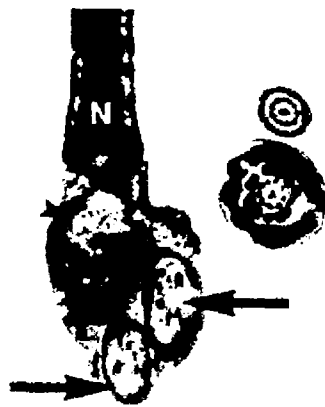
Fig. 4.94 'n Dwarssnee van die post ekwatoriale gebied van 'n spermkop met die hoofstuk (pyl) wat op die rand van die kop opgerol het.



4-90

0.5

4-91

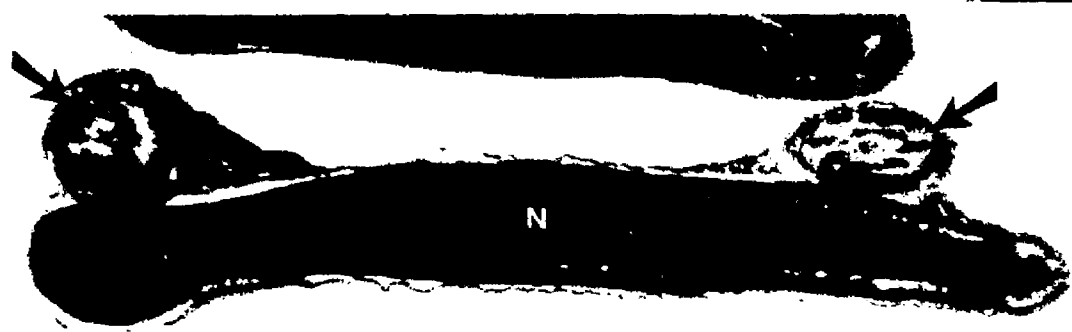


1



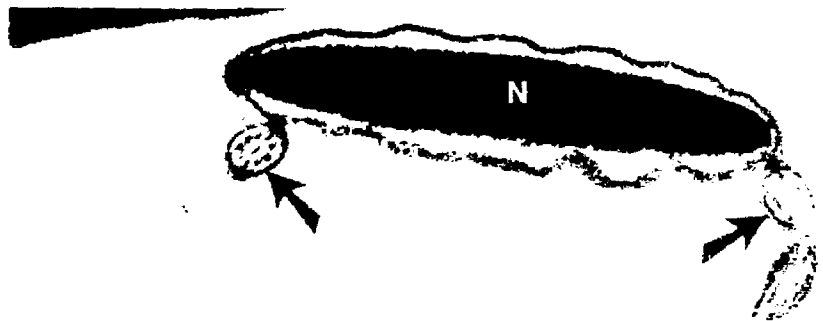
4-92

1



4-93

1

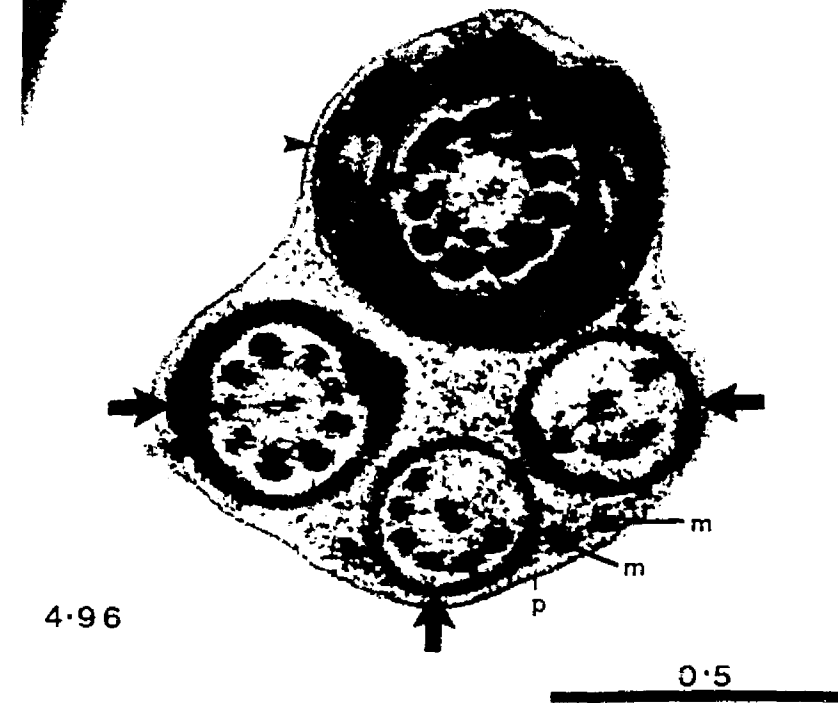


4-94

1

Fig. 4.95 Snee (a) toon die middelstuk (pylpunt) en die hoofstuk (pyl) styf teen die kopbasis opgerol. Snee (b) toon die middelstuk (pylpunt) en die hoofstuk (pyl) los opgerol in 'n matriks van sitoplasma. Die flagellum is nie net op die rand van die kop opgerol nie, maar bedek feitlik die een kant van die kop. By die meeste sneë van die hoofstuk is net die sentrale paar mikrotubuli en randstandige mikrotubuli nommers 3 en 8 teenwoordig.

Fig. 4.96 'n Dwarssnee van 'n Dagdefek met 'n langwerpige opgerolde flagellum. Sneë van die middelstuk (pylpunt) en hoofstuk (pyl) is teenwoordig. Sommige randstandige mikrotubuli van die hoofstuk is afwesig. In die sitoplasma net onder die plasmalemma (p), is randstandige mikrotubuli (m) wat buite die flagellum gevorm het.

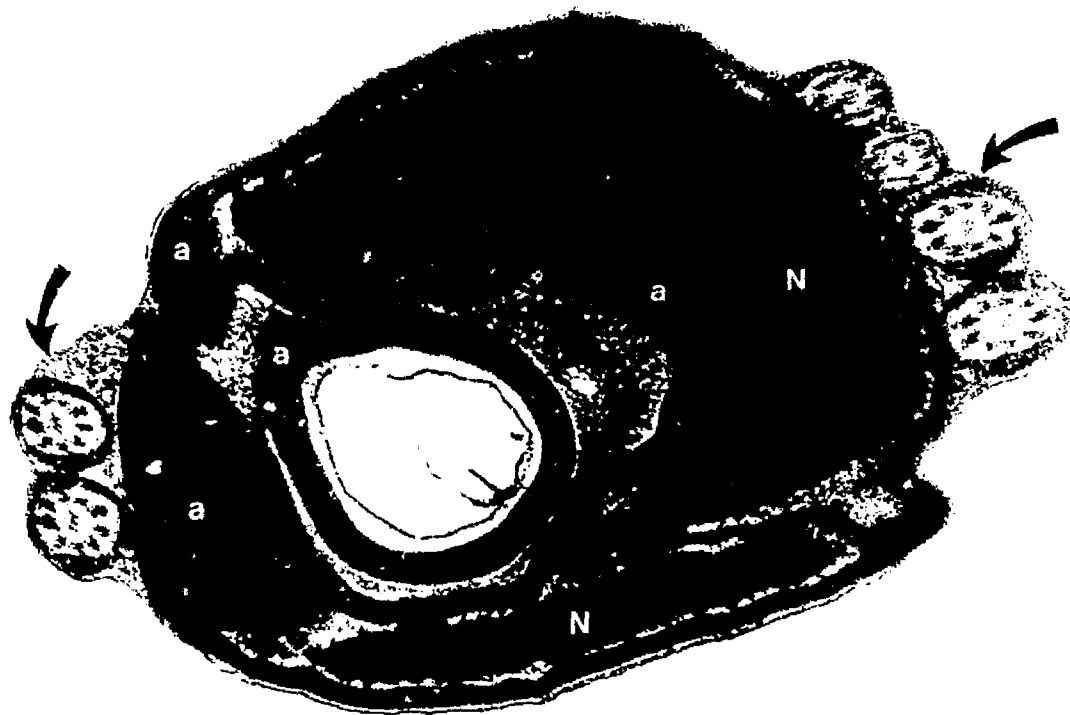


**Fig. 4.97** 'n Dwarssnee van 'n Dagdefek, geleë in 'n sitoplasmiese druppel, wat sneë deur die middelstuk (pylpunt) en hoofstuk (pyl) vertoon. Die organelle van middelstuk (a) is abnormaal gerangskik en nie voltallig nie. Sommige van die randstandige mikrotubuli van hoofstuksneë (b) is afwesig. Los, dubbel mikrotubuli (c) kom net onder die plasmalemma (p) voor. Los mitochondria (d) kom tussen die normale sitoplasmiese organelle voor.

**Fig. 4.98** 'n Dwarssnee van 'n bizarre spermkop met twee nukleï (N), 'n abnormale akrosoom (a) en 'n flagellum, wat die kenmerke van 'n Dagdefek vertoon, rondom die kop (pyl) opgerol.



4-97



4-98



Fig. 4.99 'n Mikrograaf van 'n spermmonster wat 'n hoë persentasie abnormale sneë vertoon. Ongeveer 25% van die sneë van die koppe in die mikrograaf kom normaal voor. By vrylopende, gesonde rooibokke behoort die persentasie normale sneë van spermkoppe ongeveer 50% of hoër te wees.





#### 4.2.4 Bespreking : Abnormale sperme

Die abnormaliteit van rooiboksperme is sover bekend nog nie met behulp van TEM bestudeer nie. Voorlopige studies deur die skrywer van abnormale sperme van sommige ander lede van die Bovidae soos buffel, rooihartbees, koedoe en blesbok, toon dat dieselfde soort spermafwykings by lede van hierdie familie gevind word. Alhoewel baie variasies van dieselfde abnormaliteit voorkom, toon die soorte abnormaliteit van rooiboksperme ook groot ooreenkomste met die spermafwykings wat by die mens en ander soogdiere soos die bui, die vark en die hond gevind word (Coubrough en Barker, 1964; Fujita *et al.*, 1970; Ross *et al.*, 1973; Holstein, 1975; Baccetti *et al.*, 1979; Bartoov *et al.*, 1980; Phillips en Kalay, 1984; Escalier en David, 1984; Soley *et al.*, 1985; Thilander *et al.*, 1985; Coetzee *et al.*, 1985; Holstein *et al.*, 1986; Vierula *et al.*, 1987; Williams, 1987; Zamboni, 1987; Holstein *et al.*, 1988; Oettley en Soley, 1988; Dadoune, 1988; Barthèlèmy *et al.*, 1990; Menkveld *et al.*, 1991; Zamboni, 1991; Bonet *et al.*, 1993).

Die ultrastrukturele patologie van die mens se sperme as 'n oorsaak van onvrugbaarheid is fragmentaries gedokumenteer in die literatuur in die vorm van geïsoleerde gevallestudies (Zamboni, 1991). Behalwe die werk van Zamboni (1987, 1991, 1992) is die oorsigte van Holstein (1975) en Escalier *et al.* (1984) van die belangrikste in bogenoemde verband.

Zamboni (1991) klassifiseer die patologie van die akrosoom in drie hoof kategorieë nl: akrosomale hipoplasia, strukturele defekte en afwesigheid van die organelle. Voorbeelde van al drie bogenoemde groepe kan gesien word in Fig. 4.32 tot Fig. 4.47 van akrosoom abnormaliteit van die rooiboksperm. Die meeste van hierdie sperme sal, afhangende van die graad van afwyking, waarskynlik steriel wees aangesien sulke sperme glad nie of slegs minimaal kan penetreer (Zamboni, 1987, 1991, 1992).

Die meeste defekte van die nukleus sluit ook afwykings van die akrosoom in (Holstein, 1988; Schill, 1991; Zamboni, 1991, 1992). Groot vakuoles in die nukleus, erge vorme van krater defekte en subkondensasie van die chromatiemateriaal is verantwoordelik vir subfertiele of infertiele sperme (Zamboni, 1991, 1992). Vakuoles en krater defekte het net in 'n geringe graad by rooiboksperme voorgekom (Fig. 4.51, 4.52), maar subkondensasie van die chromatiemateriaal het gewissel van gering tot baie erg (Fig. 4.64 - 4.66). Aangesien alle rooiboksperme waarvan die nukleus ruiwe vorm (Fig. 4.55 - 4.57), bolvormig of gevou is (Fig. 4.58 - Fig. 4.63), veelvuldige nuklei vertoon (Fig. 4.67 - 4.71), of deur 'n Dagdefek geaffekteer word (Fig. 4.93 - 4.95, 4.98), gewoonlik as bizarre vorme beskou kan word en sulke sperme se akrosome feitlik altyd abnormaal is, sal hulle volgens neergelegde beginsels waarskynlik nie tot bevrugting in staat wees nie. (Bartoov *et al.*, 1980; Oettle en Soley, 1988). Verskillende vorme van 'n hol bal, gevorm deur die nukleus en bedek met 'n abnormale akrosoom (Fig. 4.58 - 4.60), is sover bekend nog nie voorheen beskryf nie.

Die resultaat van strukturele abnormaliteite van die nek is gewoonlik defektiewe motiliteit wat die vermoë van die sperm om die ovum te bereik feitlik onmoontlik maak. Die belangrikste abnormaliteit van die nek is die afkop-spermdefek (Zamboni, 1987; 1992). In hierdie geval word die flagella met normale motiliteit in die ejakulaat saam met koppe sonder flagella gevind. Vir sulke sperme is dit onmoontlik om die ovum te bevrug.

Melding van gesegmenteerde kolom vakuoles word deur Oettle en Soley (1988) en Menkveld *et al.* (1991) gemaak. Die wyse waarop bogenoemde vakuoles die ultrastruktuur van die spermnek verswak, dui daarop dat hierdie defek waarskynlik ook 'n rol in defektiewe motiliteit en die afbreek van rooibokflagella kan speel (Fig. 4.72 - 4.75).

Defekte van die mitochondria, sentrale paar mikrotubuli, die radiale speke, die randstandige mikrotubuli, hulle dynienarms en die veselagtige skede het elkeen 'n negatiewe effek op die bewegingsvermoë van flagella (Fawcett, 1975; Zamboni, 1987; Ryder *et al.*, 1990; Zamboni, 1991, 1992; Wilton *et al.*, 1992; Haidl, 1993).

Totale sperm-immotiliteit is gewoonlik die resultaat van bogenoemde defekte en die infertiliteit van pasiënte met 'n groot persentasie sperme, wat een of meer van bogenoemde defekte toon, is te wyte aan die feit dat die sperme nie in staat is om die ovum te bereik nie (Zamboni, 1987). Meeste van die bekende defekte van die aksoneem is waargeneem in rooiboksperme, maar die persentasie sperme met sulke afwykings was so klein dat dit waarskynlik geen invloed op reproduksie sou uitoefen nie (Fig. 4.95 - 4.97).

Vakuoles wat in lengtesneë en dwarsneë in sommige van die hoofstukke van rooiboksperme gevind is, is ook beskryf vir die bul en die vark (Uzu *et al.*, 1976; Kojima, 1981). Segretain en Roussel (1988) beskryf die vorming van vesikels (direkte vertaling) van die periaksoneem tydens spermiogenese by die muis. Hierdie vesikels verskyn tydens stap 10 in die ontwikkeling van spermatiede, vermeerder in aantal terwyl sommige vergroot en verleng langs die aksoneem. Onder normale omstandighede verdwyn die vesikels teen stap 16. Indien laasgenoemde stap nie plaasvind nie, kan dit moontlik lei tot die vorming van 'n permanente vakuool langs die aksoneem. Die ultrastruktuur van vakuoles in die flagella van rooibokke dui daarop dat 'n soortgelyke proses moontlik vir hulle vorming verantwoordelik kan wees.

Dit is duidelik dat die vakuoles by rooibokke en buffels gewoonlik druk op die aksoneem uitoefen, wat rangskikking van die mikrotubuli in wanorde laat en hulle styf opmekaar vasdruk (Ackerman *et al.*, 1994). Op hierdie wyse word die glybeweging van die randstandige mikrotubuli waarskynlik geïnhibeer met 'n nadelige uitwerking op die motiliteit

van die sperm (1994; Fig. 4.83, 4.84, 4.87 - 4.90). Soms druk die vakuool die veselagtige skede van die hoofstuk na buite en verswak of breek die ondersteunende rol wat hierdie organel ten opsigte van die aksoneem speel (Fig. 4.85, 4.86). Volgens Zamboni (1991) oefen 'n abnormale veselagtige skede 'n negatiewe effek op die normale motiliteit van sperme uit. Chemes *et al.* (1987) vind dat sperme met abnormale veselagtige skedes, wat gewoonlik gepaard gaan met defekte van die aksoneem, 95 - 100% immotiel is. 'n Bevolking spermatozoa met 'n hoë persentasie flagellumvakuoles se bevrugtingsvermoë mag dus swak wees.

----- oOo -----

## HOOFSTUK 5

### DIE VERBAND TUSSEN DIE LEWERKOPERKONSENTRASIE EN SPERMABNORMALITEITE VAN DIE ROOIBOK

#### 5.1 Inleiding

Koper (Cu) kom as 'n natuurlike metaal in kopererts en in sulfiederts soos malagiet, kupriet (rooikopererts) en chalkopriet voor. Die aardkors bevat ongeveer 4.5 dpm en seewater tussen 1-25 dpb koper. Dit is 'n essensiële voedingstof en kom wydverspreid in dier- en plantweefsel voor. 'n Volwasse mens van 70 kg se liggaam bevat tussen 80 en 150 mg Cu waarvan ongeveer een derde in die spierweefsel voorkom. Die lewer en die brein is besonder ryk aan Cu (Venugopal en Luckey, 1978).

Cu stimuleer groei indien matige hoë dosisse aan diere gevoer word, is noodsaaklik vir die benutting van yster (Fe) en speel 'n rol in ensieme vir energieproduksie, bindweefselvorming en pigmentasie (Linder en Munro, 1973; Poole, 1993). Oor die algemeen neem diere Cu in die vorm van voedsel met 'n lae veselinhoud, byvoorbeeld graan, goed op. Die opname van Cu uit vars weiding is egter swak (Suttle, 1986). Kopermetabolisme by verskillende spesies verskil aansienlik. Suttle (1986) verwys na studies van Woolliams *et al.* (1983) wat toon dat selfs by naverwante skaaprasse soos die Walliese bergskape en Skotse swartgesigskape, eersgenoemde Cu 50% meer doeltreffend absorbeer. Oor die algemeen is die koperkonsentrasie in die lewer van mens of dier laag indien die koperinhoud van die voedsel laag is en hoog indien die koperinhoud van die voedsel hoog is (Cousins, 1985).

Die opname van ioniese Cu deur die spysverteringskanaal word deur 'n aantal faktore beïnvloed. Die chemiese verbindings waarin Cu voorkom soos oksiedes, hidroksiedes, jodiedes, sitrate en die pirofosfate word geredelik geabsorbeer, maar kopersulfied en ander wateronoplosbare soute van koper word swak geabsorbeer. Koperkomplekse van sommige aminosure word maklik geabsorbeer terwyl koperporfirien, teenwoordig in vleis, baie swak geabsorbeer word (Venugopal en Luckey, 1978; Theil en Calvert, 1978).

Afhangend van die dierspesie en die weefsel waarin dit teenwoordig is, bind metallothionien 'n verskeidenheid metale waarvan kadmium (Cd), koper (Cu), kwik (Hg) en sink (Zn) van die vernaamstes is. Dit dui daarop dat dié proteïen 'n rol in die metabolisme van Cu speel (Cousins, 1985).

Volgens Cousins (1985) het Holmberg en Laurell in 1948 die blou proteïen in plasma ceruloplasmien genoem en Frieden (1980) se oorsig van die katalitiese aktiwiteit van ceruloplasmien het die fisiologiese regulering van koper deur dié proteïen ingesluit.

Die interverhoudings van Cu en ander elemente waaronder molibdeen (Mo), sink (Zn), yster (Fe), kobalt (Co) en verbindings soos sulfate, sulfiede, oksiede, metallothionien en ceruloplasmien die belangrikstes is, is kompleks en speel 'n belangrike rol in die metabolisme van Cu (Suttle, 1974, 1975, 1977, 1986, 1988; Oster en Salgo, 1977; Venugopal en Luckey, 1978; Mann en Ludwak-Mann, 1981; Suttle en Field, 1983; Cousins 1985; Bires, 1991).

Die verskil tussen 'n kopertekort en kopertoksisiteit is baie groot by soogdiere en baie klein by bakterieë en fungi. Vir akwatiese organismes is Cu hoogs toksies. Die relatiewe toksisiteit blyk verwant aan die effektiwiteit van die absorpsie- en ekskresiemeganismes van die

verskillende spesies te wees (Venugopal en Luckey, 1978). Onder soogdiere is herkouers meer sensitief vir hoë dosisse koper en toon gouer simptome van kopertoksisiteit as monogastriese diere (Underwood, 1971). Jong kalwers, met rumens wat nog nie tenvolle ontwikkel het nie, reageer gouer op kopertoksisiteit as ouer herkouers (Underwood, 1971). 'n Kopertekort by soogdiere veroorsaak bloedarmoede, abnormale beenstruktuur, swak groei, defektiewe bindweefsel, kardiovaskulêre ineenstorting en die dood (Linder en Munro, 1973; Ayiannidis *et al.*, 1991). Die simptome van kroniese kopervergiftiging in soogdiere is naarheid, braking, epigastriese pyn, geel waterige diarree, duiseligheid, algemene swakheid, asook groen stoelgange, speeksel en braaksel (Venugopal en Luckey, 1978). Akute kopertoksisiteit se simptome is in hoofstuk een genoem en kom baie ooreen met dié van 'n kopertekort.

Die belangrike rol wat koper in die lewensprosesse en orgaanstelsels van soogdiere speel, is reeds lank bekend (Ryke, 1982). Wat koper se rol in die voortplantingsproses betref, het Oster en Salgo (1977) en Holland en White (1982) verwys na de Quatrefages wat in 1850 die eerste wetenskaplike was om die aandag op swaarmetaalsoute se inhibering van spermotiliteit te vestig.

Nadat Zipper *et al.* (1969) gevind het dat koper 'n beter voorbehoedende aksie as enige van die ander getoetste materiale in die uterus van die konyn het en nadat die intra-uterine toestel (IUT) in werking gestel is om bevrugting te voorkom, is hernude aandag op koper se invloed op die motiliteit van sperme gevestig. Ramsperme se motiliteit en fruktolise is byvoorbeeld deur 0.1 mM kopersulfaat gestop (Mann en Ludwag-Mann, 1981). In die mens verloor sperme hulle motiliteit wanneer hulle in aanraking kom met servikale mukus wat aan koperfoelie blootgestel is. Dit gebeur egter eers na 3 tot 4 ure en dit is bekend dat sperme

binne 'n paar minute vanaf die vagina na die ovidukte beweeg (Oster en Salgo, 1977; Mann en Ludwig-Mann, 1981; Holland en White, 1981). Bevrugting kan dus plaasvind voordat sperme motiliteit verloor. Dit is die rede waarom navorsers na hierdie bevinding meer aandag gegee het aan die rol wat Cu in die vroulike geslagstelsel speel. Daar is spesiaal gelet op die invloed van Cu op biochemiese veranderinge in die endometrium van die uterus en die implantering van die blastosist. (Oster en Salgo, 1977).

Die gebruik van Cu as 'n manlike voorbehoedmiddel het gelei tot die eksperimentele inplanting van Cu in die epididymis, vas deferens, skrotum en semenvesikels van soogdiere (Skandhan, 1992). Rotte se fertiliteit is met sulke inplantings in die vas deferens of die semenvesikels verlaag of vernietig (Gilmore *et al.*, 1973; Kesseru en Léon, 1974; Maynard *et al.*, 1975; Ahsan *et al.*, 1976). Weefseltoksisiteit wat deur koper veroorsaak is het dit egter onmoontlik gemaak om hierdie metode prakties te benut (Skandhan, 1992).

Sover bekend is inligting oor die invloed wat 'n verhoogde koperkonsentrasie in die lewer van soogdiere op die ultrastruktuur van hulle sperme speel, nie bekikbaar nie.

Om die moontlike verband tussen die koperwaardes in die lewer en die spermabnormaliteite van rooibokke te bepaal, is dit nodig om die resultate van die kwantitatiewe analises van die ultra-struktuur van rooiboksperme, wat met behulp van SEM en TEM bevind is, te beskou en te vergelyk met hulle lewerkoperwaardes.



## 5.2 Resultate

### 5.2.1 Kwantitatiewe analise (SEM)

Van 40 rooibokke is 'n totaal van 5082 sperme met behulp van SEM ondersoek en daar is gevind dat 93.4% van die sperme normaal vertoon het terwyl die volgende abnormaliteite van die flagella by die res voorgekom het:

Dagdefek	: 4.1%
Geluste flagellum	: 2.4% (eenvoudigste Dagdefek).
Dubbel flagellum	: 0.1%

Van bogenoemde 40 rooibokke het 9 diere uit 'n gebied gekom wat nie met koper besoedel was nie. Die gemiddelde koperkonsentrasie in die lewers van hierdie groep was 37.9 dpm (NB). Hierdie 9 diere kan as die **kontrole** beskou word en die resultate het getoon dat 91.6% van 500 sperme normaal vertoon het, terwyl die volgende makro-abnormaliteite van die flagella by die res voorgekom het:

Dagdefek	: 5.4%
Geluste flagellum	: 3.0% (Eenvoudigste Dagdefek)
Dubbel flagellum	: Geen

Die ander 31 diere was afkomstig van die koperbesoedelde Phalaborwa-gebied of was diere wat koper saam met hulle voedsel gevoer is in 'n eksperiment te Skukuza en kan as die **eksperiment** beskou word. Die koperkonsentrasie in die lewers van hierdie groep was 104.1 dpm (NB). Van hierdie 31 diere is 4582 sperme ondersoek en daar is gevind dat 93.6% van die sperme normaal vertoon

het terwyl die volgende vernaamste makro-abnormaliteite van die flagella by die res voorgekom het:

Dagdefek	: 4.0%
Geluste flagellum	: 2.3%
Dubbel flagellum	: 0.1%

Indien die spermmorfologiese statistiek van die kontrole met dié van die eksperiment vergelyk word, is die gegewens ten opsigte van die persentasie normale sperme, Dagdefekte, geluste flagella en dubbel flagella feitlik dieselfde. (Kyk kwantitatiewe analise vir persentasies). Die gemiddelde lewerkoperkonsentrasie van die kontrole se diere was 37.9 dpm (NB) en by die eksperiment se diere 104.1 dpm (NB). Die verhoogde kôperwaardes in die lewers van die eksperimentele groep het dus nie gekorreleer met 'n verhoging van die persentasie makro-abnormaliteite wat met behulp van SEM waargeneem is nie.

### **5.2.2 Data van die TEM-studie**

Tabel 5.1 en 5.2 waarop die kwantitatiewe analyses, die Wilcoxon-toetse, die grafiese analyses en die bespreking van die TEM-studie gebaseer is, word as 'n brondokument ingesluit om alle relevante data so beknopt as moontlik aan die leser beskikbaar te stel. Die verklarings van die simbole van tabel 5.1 en 5.2 wat na hierdie tabelle volg, moet as die onderskrifte beskou word.

TABEL 5.1

**KONTROLE:** TEM-data van maklik herkenbare abnormaliteite van die kop, nek en hoofstuk van die rooiboksperm, met inligting oor die kondisie (% murgvet) en lewercoperkonsentrasie van elke dier. Die simbole onder opmerkings verwys na klimaat en ander relevante data, aangeteken onder algemene verklarings van simbole.

Algemeen					Kop							Nek				Hoofstuk					Opmerkings	
Rooboknummer	Datum	Groep	% Murgvet	Cu dpm in lewer	Getal TEM-sneë	% Sneë abnormaal	% akrosom afwykings	% Lipvorming	% Deg-defek	% Kernafwykings	% Bizarre koppe	Getal TEM-sneë	% Sneë abnormaal	% Vakuoles	% ander abnormaliteite	Getal TEM-sneë	% Sneë abnormaal	% vakuoles	% ander abnormaliteite	% Deg-defek		
D27	92.08.06	KN	X	*25.8	25	36	36	0	0	0	12	10	40	30	30	25	32	12	4	16		a
D28	92.10.06	KS	77.7	45	25	56	40	16	0	0	12	10	60	20	40	25	16	8	8	4		d
D29	92.10.07	KN	X	*25.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	b
D30	92.10.07	KN	X	*25.8	25	24	24	16	0	0	4	10	80	70	50	25	24	20	0	4		b
D41	92.10.07	KN	X	*25.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	b
D42	92.10.07	KN	X	*25.8	25	28	28	8	8	0	8	10	60	40	30	25	32	16	0	16	2	b
D45	92.11.05	KS	X	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	d
D46	92.11.05	KN	35.6	*25.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	e
D47	92.11.05	KN	1.9	*25.8	25	24	20	12	4	0	4	10	20	20	10	25	20	8	8	4	2	e
D48	92.11.05	KN	75.8	*25.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	e
D56	92.12.01	KS	84.2	36	25	16	16	0	0	0	0	10	40	40	20	25	8	4	0	4	2	d
D57	92.12.01	KN	X	*25.8	25	20	20	8	0	0	0	10	40	30	20	25	20	20	0	0	2	e
D58	92.12.01	KN	X	*25.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	e
D59	92.12.01	KN	X	*25.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	e
D66	93.03.03	KS	86.9	83	25	44	28	32	8	0	0	10	70	50	50	25	0	0	0	0		d
D69	93.02.11	KN	56.0	*25.8	25	72	60	24	4	0	8	10	50	40	20	25	0	0	0	0	4	e
D70	93.02.11	KN	69.2	*25.8	25	80	76	56	4	0	8	10	70	10	60	25	32	32	16	16	4	e
D71	93.02.11	KN	74.8	*25.8	25	80	80	8	0	0	24	10	70	10	70	25	36	24	20	16	4	e
D76	93.04.07	KS	87.5	61	25	12	12	8	8	0	8	10	80	50	50	25	12	0	12	0		d
D78	93.04.05	KN	83.5	*25.8	25	48	48	24	8	0	0	10	80	60	40	25	20	0	12	8	5	e
D79	93.04.05	KN	X	*25.8	25	44	40	24	8	8	12	10	50	30	30	25	48	12	16	28	5	e

TABEL : 5.1 (vervolg)

Kontrole : Algemeen					Kop								Nek				Hoofstuk					Opmerkings	
Reëbok nommer	Datum	Groep	% Murgvet	Cu dpm in lewer	Getal TEM-Sneë	% Sneë abnormaal	% Akrosoom afwykings	% Lipvorming	% Dagdefek	% Kernafwykings	% Bizarre koppe	Getal TEM-sneë	% Sneë abnormaal	% Vakuoles	% Ander abnormali-teite	Getal TEM-sneë	% Sneë abnormaal	% vakuoles	% ander abnormali-teite	% Dagdefek			
D00	93.04.05	KN	58.0	*25.8	25	28	16	20	0	0	8	10	30	20	10	25	16	12	4	4	5	c	
D05	93.05.05	KS	86.9	55	25	88	88	32	0	0	0	10	40	30	10	25	0	0	0	0		c	
D07	93.05.05	KS	86.9	36	25	88	88	0	0	0	0	10	30	20	30	25	12	4	0	8		d	
D08	93.05.15	KN	90.5	*25.8	25	92	92	20	0	0	12	10	40	30	10	25	32	4	12	16	6	c	
D09	93.05.15	KN	88.8	*25.8	25	88	88	24	0	8	0	10	20	20	0	25	8	0	0	8	6	c	
D00	93.05.15	KN	36.7	*25.8	25	92	92	24	4	8	0	10	10	10	10	25	0	0	0	0	6	c	
Getal diere = 20		Totaal			500	1 060	992	356	56	24	120	200	980	630	590	500	768	176	112	152			
		% Abnormaal					53.0	49.6	17.8	2.8	1.2	6.0		49.0	31.5	29.5		18.4	8.8	5.6	7.6		
		% Normaal					47.0	50.4	82.2	97.2	98.8	94.0		51.0	68.5	70.5		81.6	91.2	94.4	92.4		

TABEL 5.2

**EKSPERIMENT:** TEM-data van maklik herkenbare abnormaliteite van die kop, nek en hoofstuk van die rooibokspem, met inligting oor die kondisie (% murgvet) en lewarkoperkonsentrasie van elke dier. Die simbole onder opmerkings verwys na klimaat en ander relevante data, aangeteken onder algemene verklarings van simbole.

Algemeen					Spermkop							Nek				Hoofstuk					Opmerkings	
Rooibok nommer	Datum	Groep	% Murg- vet	Cu dpm in lewer	Getal TEM- Sneë	% Sneë abnor- maal	% Akro- zoom afwy- kings	% Lipvor- ming	% Dag- defek	% Kern- afwy- kings	% Bizarre koppe	Getal TEM- sneë	% Sneë abnor- maal	% Vaku- oles	% Ander abnor- maliteite	Getal TEM- sneë	% Sneë abnor- maal	% Vaku- oles	% Ander abnor- maliteite	% Dag- defek		
D8	92.06.09	EP	55.1	69	25	16	8	4	0	4	0	10	50	40	50	25	24	8	0	16		A
D9	92.06.09	EP	61.1	47	25	8	4	4	0	4	4	10	40	30	20	25	12	12	0	0		A
D10	92.06.09	EP	86.7	48	25	4	4	4	0	0	0	10	60	50	50	25	20	20	0	0		A
D11	92.06.09	EP	7.2	107	25	20	12	12	4	0	0	10	80	70	60	25	16	16	0	0		A
D12	92.06.09	EP	0	269	25	92	76	28	4	0	4	10	90	80	70	25	16	4	4	8	1	A
D13	92.06.09	EP	85.2	101	25	28	28	0	0	0	0	10	90	90	80	25	16	16	0	0		A
D14	92.06.09	EP	2.8	74	25	100	100	16	0	8	0	10	60	50	50	25	12	0	8	4		A
D15	92.06.09	EP	84.9	31	25	52	40	12	0	0	0	10	0	0	0	25	4	0	4	0		A
D16	92.06.09	EP	71.2	38	25	100	84	20	8	8	8	10	0	0	0	25	0	0	0	0		A
D21	92.08.03	EP	1.5	497	25	100	96	44	44	0	0	10	100	70	90	25	28	8	20	12		B
D22	92.08.03	EP	5.3	140	25	44	40	4	0	4	0	10	90	90	80	25	40	16	16	24		B
D23	92.08.03	EP	0.4	474	25	60	48	16	8	8	12	10	80	80	80	25	28	12	4	16		B
D24	92.08.03	EP	6.4	181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	B
D25	92.08.03	EP	X	68	25	28	28	12	0	0	4	10	50	50	50	25	36	20	8	12		B
D26	92.08.03	EP	4.0	98	25	20	20	8	0	0	0	10	80	80	80	25	16	12	4	0		B
D30	92.10.04	EP	18.9	109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	C
D31	92.10.04	EP	3.1	170	25	40	32	24	0	0	8	10	90	90	90	25	36	28	4	12		C
D32	92.10.04	EP	9.0	209	25	56	40	28	12	4	16	10	80	80	70	25	36	20	4	12		C

TABEL 5.2 (vervolg)

Algemeen					Spermkep							Nek				Hoofdstuk					Opmerkinge	
Reekstok nommer	Datum	Groep	% Murg- vet	Cu dpm in lever	Getal TEM- sneë	% Sneë abnor- maal	% Akros- oom afwy- ings	% Lipvor- ming	% Dag- defek	% Kernaf- wyking	% Bizarre koppe	Getal TEM- sneë	% Sneë abnor- maal	% Vaku- oles	% Ander abnor- maliteite	Getal TEM- sneë	% Sneë abnor- maal	% Vaku- oles	% Ander abnor- maliteite	% Dag- defek		
D33	92.10.04	EP	0	362	25	92	84	12	20	12	20	10	100	80	100	25	48	24	8	16	1	C
D34	92.10.04	EP	0.4	320	25	100	100	68	16	0	24	10	100	90	80	25	52	8	32	24		C
D35	92.10.04	EP	67.7	166	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	C
D36	92.10.06	ES	85.9	105	25	72	56	4	0	4	8	10	80	80	60	25	40	24	16	12		D
D37	92.10.06	ES	88.5	189	25	72	72	16	12	0	16	10	90	80	60	25	44	24	24	12		D
D43	92.11.03	ES	87.6	143	25	32	32	12	0	0	0	10	100	100	100	25	36	36	16	12		D
D44	92.11.30	ES	85.5	52	25	20	20	12	4	4	0	10	50	40	40	25	28	12	12	4		D
D49	92.11.30	EP	10.3	99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	E
D50	92.11.30	EP	4.4	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	E
D51	92.11.30	EP	4.9	126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	E
D52	92.11.30	EP	7.4	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	E
D53	92.11.30	EP	26.3	180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	E
D54	92.11.30	EP	14.7	108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	E
D55	92.12.01	ES	88.0	150	25	16	16	0	0	0	0	10	90	90	50	25	8	8	0	0		D
D60	92.12.01	EP	53.4	42	25	64	52	16	8	12	8	10	40	30	30	25	0	0	0	0	4	E
D61	93.02.01	EP	60.4	76	25	24	8	4	4	4	8	10	70	70	70	25	24	12	0	16	4	F
D62	93.02.01	EP	55.9	98	25	24	12	0	12	0	16	10	90	80	80	25	20	4	0	16	4	F
D63	93.02.01	EP	51.3	34	25	20	12	4	4	8	8	10	10	10	0	25	16	8	0	8	4	F
D64	93.02.01	EP	54.9	38	25	20	16	4	0	0	0	10	30	20	10	25	12	12	0	0	4	F
D65	93.02.01	EP	33.8	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	F

TABEL 5.2 (vervolg)

Algemeen					Spermkop								Nek				Heefstak					Opmerking	
Rezekomnummer	Datum	Groep	% Murgvet	Cu dpa in lever	Getal TEM-sneë	% Sneë abnormal	% Akrosoomafwykings	% Lipvorming	% Dagdefek	% Kernafwykings	% Bizarre koppe	Getal TEM-sneë	% Sneë abnormal	% Vakuoles	% Ander abnormaliteit	Getal TEM-sneë	% Sneë abnormal	% Vakuoles	% Ander abnormaliteit	% Dagdefek			
D66	93.02.01	EP	51.4	60	25	32	24	8	4	0	0	10	80	80	60	25	12	12	8	4	4	F	
D67	93.03.03	ES	84.1	118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	D	
D72	93.04.05	EP	87.4	18	25	84	84	56	12	0	16	10	20	10	10	25	20	0	8	12	7	F	
D73	93.04.05	EP	81.5	59	25	68	68	24	0	0	12	10	50	20	30	25	20	12	20	0	7	F	
D74	93.04.05	ES	86.5	62	25	8	8	8	0	0	0	10	90	60	50	25	8	8	0	0	7	D	
D77	93.04.07	ES	61.6	69	25	36	36	0	0	0	0	10	70	70	60	25	0	0	0	0	7	D	
D81	93.05.05	ES	88.1	75	25	80	80	24	0	8	8	10	100	60	60	25	0	0	0	0	8	D	
D82	93.04.07	ES	87.1	125	25	92	84	28	0	0	0	10	100	70	50	25	16	0	16	0	7	D	
D83	93.05.05	ES	88.8	135	25	100	100	32	8	0	0	10	80	70	60	25	4	0	4	0	8	D	
D84	93.05.05	ES	88.5	115	25	100	100	32	0	0	12	10	90	70	60	25	0	0	0	0	8	D	
D86	93.05.05	ES	87.1	122	25	100	100	60	0	16	12	10	70	0	70	25	28	8	0	20	8	D	
D91	93.05.31	EP	36.7	127	25	100	100	12	0	0	0	10	100	70	50	25	16	0	8	8	8	F	
D92	93.05.31	EP	58.2	42	25	64	60	12	0	0	0	10	70	50	50	25	0	0	0	0	8	F	
D93	93.05.31	EP	X	147	25	80	80	36	0	0	16	10	90	80	60	25	28	0	0	28	8	F	
D94	93.05.31	EP	X	88	25	88	88	16	12	0	16	10	70	60	60	25	0	0	0	0	8	F	
D95	93.05.31	EP	X	48	25	56	56	12	0	0	0	10	30	30	10	25	12	0	12	0	8	F	
D96	93.05.31	EP	X	49	25	80	80	16	0	0	0	10	40	30	10	25	0	0	0	0	8	F	
Getal diere = 44	TOTAAL				1 100	2 492	2 288	764	196	108	256	440	3 040	2 550	2350	1 100	832	404	260	308			
	% Abnormal					56.6	52.0	17.4	4.5	2.5	5.8		69.1	57.9	53.4		18.9	9.2	5.9	7.0			
	% Normal					43.4	48.0	82.6	95.5	97.5	94.2		30.9	42.1	46.6		81.1	90.8	94.1	93.0			
EP: n = 32	EP - Totaal				800	1764	1584	536	172	76	200	320	2030	1760	1630	800	620	284	172	248			
	% Abnormal					55.1	49.5	16.8	5.3	2.4	6.3		63.4	55.0	50.9		19.3	8.7	5.4	7.8			
ES: n = 12	ES - Totaal				300	728	704	228	24	32	56	120	1010	790	720	300	212	120	88	60			
	% Abnormal					60.7	58.7	19.0	2.0	2.7	4.7		84.2	65.8	60.0		17.7	10.0	7.3	5.0			

## Verklarings van simbole in die kolomme van tabelle 5.1 en 5.2

### Kolom: Groep

- K** : Rooibokke van die **kontrole**.
- E** : Rooibokke van die **eksperiment**. **K** en **E** word in die brondokumente in kombinasie met die volgende drie simbole gebruik om die groep en die oorsprong van die diere te beskryf.
- P** : **Phalaborwa-projek**: Vrylopende rooibokke in die omgewing van Phalaborwa-hek op natuurlike weiding wat met koper besoedel is (**EP**).
- S** : **Skukuza-projek**: Rooibokke in aanhouding te Skukuza. Die **kontrole (KS)** is voedsel wat nie met kopersulfaat behandel was nie gevoer en die **eksperiment (ES)** is voedsel wat met kopersulfaat behandel was, gevoer.
- N** : **Nwaswitshaka-projek** : Vrylopende rooibokke op natuurlike weiding in die omgewing van Skukuza wat nie met koper besoedel was nie (**KN**). Data van hierdie diere is by die **kontrole** van die Skukuza-projek (**KS**) gevoeg om die kontrolediere aan te vul.

### Kolom: Persentasie murgvet

$$Y = X - 7 \quad (Y = \% \text{ murgvet}; x = \% \text{ droë massa van die murg}).$$

### Ander tekens

- \*** : Die gemiddelde koperwaarde in die lewers van rooibokke wat hoofsaaklik langs die Nwaswitshakaspruit te Skukuza gewei het, is gelyk aan  $25.8 \pm 15.96$  dpm (NB). Hierdie weiding is nie met koper besoedel nie (Gummow *et al.*, 1991).



- X : Murg nie versamel nie.
- : Geen sperme beskikbaar vir ontleding nie. Redes word onder opmerkings gegee.

**Kolom: Opmerkings (Tabel 5.1)**

(Alle reënvalsyfers is volgens die Nasionale Parkeraad van Suid-Afrika se jaarverslae vir 1992/1993 en 1993/1994) weergegee.

- a : Die toestand van die weiding te Skukuza was swak en die rooibokke was feitlik almal maer. Die reënval was baie laag vir die winter en net 14.2 mm, 0.3 mm en 1.6 mm reën is respektiewelik vir April, Junie en Augustus 1992 te Skukuza aangeteken. Geen reën het in Mei en Julie 1992 geval nie.
- b : Geen reënval is vir September 1992 te Skukuza aangeteken nie. Die weiding was in 'n uiters swak toestand en die kondisie van sommige rooibokke was kritiek.
- c : Die 22.5 mm reën vir Oktober 1992 te Skukuza, het verhoed dat die toestand van die weiding in hierdie gebied nie so kritiek geraak het as die toestand van die weiding te Phalaborwa nie. Opvolgreëns gedurende November 1992, 136.9 mm; Desember 1992, 163.1 mm; Januarie 1993, 18.0 mm; Februarie 1993, 18.0 mm; Maart 1993, 72.1 mm; April 1993, 47.7 mm; Mei 1993, 1.8 mm en Junie 1993, 15.5 mm, het veroorsaak dat die rooibokke te Skukuza tot aan die einde van die veldwerk vir hierdie studie op 31 Junie 1993, nog in 'n baie goeie kondisie was.
- d : Rooibokke van die kontrolegroep (KN) in aanhouding te Skukuza, het gedurende die omliggende droogtetoestande 'n hoë persentasie murgvet getoon en was in 'n uitstekende toestand.

- 1 : Rooibokke nog baie jonk (ongeveer 23 maande oud). Het nog geen of baie min sperme geproduseer.
- 2 : Rooibokke ongeveer 24 maande oud: Spermtelling nog baie laag ( $< 1 \times 10^5$ /ml).
- 3 : Rooibokke ongeveer 26 maande oud maar in 'n swakker kondisie as D57: Het geen sperm geproduseer nie.
- 4 : Rooibokke ongeveer 27 maande oud: Spermtelling nog steeds baie laag ( $< 1 \times 10^5$ /ml).
- 5 : Rooibokke ongeveer 29 maande oud: Spermtelling normaal ( $\pm 200 \times 10^6$ /ml). D79 se spermtelling was egter nog laag en kan eerder met die diere onder 4 geklassifiseer word.
- 6 : Rooibokke ongeveer 31 maande oud: Spermtelling normaal ( $\pm 200 \times 10^6$ /ml).

**Kolom: Opmerkings (Tabel 5.2)**

- A : Geen reën is gedurende April en Mei 1992 te Phalaborwa aangeteken nie. As gevolg van die droogte en die koue weer, het die weiding se voedingswaarde reeds gedaal en 'n neerslag van 20.2 mm gedurende Junie 1992 het nie 'n noemenswaardige invloed op die toestand van die weiding gehad nie. Waarnemings in die veld het getoon dat die rooibokke se kondisie oor die algemeen verswak het. Tropprogramme en ooie met lammers het die eerste tekens van vermaering getoon.
- B : Geen reën is gedurende Julie 1992 te Phalaborwa aangeteken nie. Die weiding was droog en feitlik alle rooibokke was maer.
- C : Gedurende September en Oktober 1992 is respektiewelik net 1.5 mm en 2.0 mm reën te Phalaborwa gemeet en die gebied was in 'n droogte wat

in die Nasionale Parkeraad se jaarverslag as die ergste in menseheugenis beskryf word . Feitlik alle diere was in 'n swak toestand en van die swakste rooibokke het teen die einde van Oktober en die eerste gedeelte van November 1992 begin vrek.

- D** : Rooibokke van die eksperiment (ES) in aanhouding te Skukuza was in 'n uitstekende toestand en hulle murg het gedurende die omliggende droogte toestande 'n hoë persentasie murgvet getoon.
- E** : Gedurende November 1992 het 37.5 mm reën te Phalaborwa geval. Die weiding het vinnig op die reën gereageer, sodat die rooibokke se kondisie teen die einde van November en die begin van Desember 1992 reeds begin verbeter het. Geen sperme was op 30 November 1992 te Phalaborwa in die *cauda epididymi* van die 6 beskikbare rooibokke teenwoordig om te versamel nie.
- F** : 'n Buitengewone hoë reënval het gedurende die somer en vroeë winter gesorg vir uitstekende weidingstoestande (Desember 1992, 221.8 mm; Januarie 1993, 115.1 mm; Februarie 1993, 134.9 mm; Maart 1993, 45.5 mm; April 1993, 38.0 mm; Mei 1993, 9.0 mm). Hierdie goeie toestande het veroorsaak dat die rooibokke te Phalaborwa tot aan die einde van die veldwerk van hierdie studie op 31 Junie 1993, nog in 'n baie goeie kondisie was.
- 1** : Die bepaling van die massa van die nat en droë murgmonsters was waarskynlik foutief (% Murgvet = 0).
- 2** : Volwasse diere het nie genoeg sperme geproduseer om vir SEM en TEM voor te berei nie.
- 3** : Rooibokke het geen sperme geproduseer nie. D52 het net genoeg sperme

- geproduseer om met behulp van SEM te bestudeer.
- 4 : Rooibokke het weer begin om sperme te produseer. Volwasse sperme was egter min en voorlopers volop.
  - 5 : Rooibokke het reeds sperme begin produseer, maar te min om te versamel.
  - 6 : Rooibok van die eksperiment (ES) in aanhouding te Skukuza. Die kondisie van die dier was goed maar sperme was nie genoeg vir SEM- en TEM-studies nie.
  - 7 : Rooibokke in die omgewing was besig om te paar.
  - 8 : Sporadiese paringsgedrag is nog onder rooibokke in die omgewing waargeneem.

### 5.2.3. Wilcoxon-toetse

Om statisties betekenisvolle vergelykings tussen die persentasies van abnormaliteite van die verskillende groepe van tabel 5.1 en 5.2 te tref, is Wilcoxon-toetse uitgevoer om die nodige p-waardes te bepaal.

Die gegewens in tabel 5.3 tot 5.7 is ook aangewend om 'n statistiese motivering aan te bied waarom die KN- en die KS-groep as 'n kontrole (Tabel 5.1) en die EP- en die ES-groep as 'n eksperiment (Tabel 5.2), saamgevoeg is.

P-waardes  $\leq 0.05$  van die Wilcoxon-toetse in tabel 5.3 tot 5.7 dui op 'n betekenisvolle verskil tussen die groepe. 'n P-waarde  $> 0.05$  dui daarop dat die groepe nie betekenisvol verskil het nie.

Dit moet daarop gewys word dat die gegewens ten opsigte van die persentasie neksneë met vakuoles vir hierdie studie van groot belang is en dat spesiaal daarop gelet moet word.

**Tabel 5.3**

Wilcoxon-toets vir die berekening van die p-waardes vir die vergelyking van die gemiddelde persentasies spermabnormaliteite van die kontrole van Nwaswitshaka (KN) met die kontrole in aanhouding te Skukuza (KS), soos vervat is in tabel 5.1.

Abnormaliteit	Wilcoxon-toets		Gemiddelde % abnormaal	
	KN/KS:	p-waarde	KN	KS
<b>Kopsneë (Totaal)</b>	0.7096		54.0	50.7
Akrosoomafwykings	0.5624		51.4	45.3
Lipvorming	0.5866		19.1	14.7
Dagdefek	0.8190		2.9	2.7
Kernafwykings	0.2576		1.7	0
Bizarre koppe	0.2270		7.1	3.3
<b>Neksneë (Totaal)</b>	0.7079		47.1	53.3
Vakuoies	0.4246		30.0	35.0
Ander abnormaliteite	0.5850		27.9	33.3
<b>Hoofstuksneë (Totaal)</b>	0.0220		22.9	8.0
Vakuoles	0.0756		11.4	2.7
Ander Abnormaliteite	0.3309		6.6	3.3
Dagdefek	0.0741		9.7	2.7

**Tabel 5.4**

Wilcoxon-toetse vir die berekening van die p-waardes vir die vergelyking van die gemiddelde persentasies spermabnormaliteite van die eksperiment van Phalaborwa (EP) met die eksperiment in aanhouding te Skukuza (ES), soos vervat is in tabel 5.2.

Abnormaliteit	Wilcoxon-toets EP/ES: p-waarde	Gemiddelde % abnormaal	
		EP	ES
<b>Kopsneë (Totaal)</b>	0.7648	55.1	60.7
Akrosoomafwykings	0.4804	49.5	58.7
Lipvorming	0.7847	16.8	19.0
Dagdefek	0.1589	5.3	2.0
Kernafwykings	0.9610	2.4	2.7
Bizarre koppe	0.4695	6.3	4.7
<b>Neksneë (Totaal)</b>	0.0426	63.4	84.2
Vakuoles	0.3884	55.0	65.8
Ander abnormaliteite	0.5641	50.9	60.0
<b>Hoofstuksneë (Totaal)</b>	0.9132	19.3	17.7
Vakuoles	0.9667	8.7	10.0
Ander Abnormaliteite	0.0339	5.4	7.3
Dagdefek	0.3154	7.8	5.0

**Tabel 5.5**

Wilcoxon-toetse vir die berekening van die p-waardes vir die vergelyking van die gemiddelde persentasies van die spermabnormaliteite van die eksperiment in aanhouding te Skukuza (ES) met die kontrole in aanhouding te Skukuza (KS), soos vervat is in tabel 5.1 en 5.2.

Abnormaliteit	Wilcoxon-toets ES/KS: p-waarde	Gemiddelde % abnormaal	
		ES	KS
<b>Kopsneë (Totaal)</b>	0.5101	60.7	50.7
Akrosoomafwykings	0.5108	58.7	45.3
Lipvorming	0.7401	19.0	14.7
Dagdefek	0.7662	2.0	2.7
Kernafwykings	0.1388	2.7	0
Bizarre koppe	0.7078	4.7	3.3
<b>Neksneë (Totaal)</b>	0.0106	84.2	53.3
Vakuoles	0.0081	65.8	25.0
Ander abnormaliteite	0.0062	60.0	33.3
<b>Hoofstuksneë (Totaal)</b>	0.2361	17.7	8.0
Vakuoles	0.2377	10.0	2.7
Ander Abnormaliteite	0.0948	7.3	3.3
Dagdefek	0.8363	5.0	2.7

**Tabel 5.6**

Wilcoxontoetse vir die berekening van die p-waardes vir die vergelyking van die gemiddelde persentasies van die spermabnormaliteite van die eksperiment te Phalaborwa (EP) met die kontrole te Nwaswitshaka (KN), soos vervat is in tabel 5.1 en 5.2.

Abnormaliteit	Wilcoxon-toets EP/KN: p-waarde	Gemiddelde % abnormaal	
		EP	KN
Kopsneë (Totaal)	0.7680	55.1	54.0
Akrosoomafwykings	0.9023	49.5	51.4
Lipvorming	0.3477	16.8	19.1
Dagdefek	0.6146	5.3	2.9
Kernafwykings	0.5387	2.4	1.7
Bizarre koppe	0.6280	6.3	7.1
Neksneë (Totaal)	0.0299	63.4	47.1
Vakuoles	0.0079	55.0	30.0
Ander abnormaliteite	0.0012	50.9	27.9
Hoofstuksneë (Totaal)	0.2465	19.3	22.9
Vakuoles	0.4830	8.7	11.4
Ander Abnormaliteite	0.2940	5.4	6.6
Dagdefek	0.3762	7.8	9.7



**Tabel 5.7**

Wilcoxon-toetse vir die berekening van die p-waardes vir die vergelyking van die gemiddelde persentasies van die spermabnormaliteite van die kontrole te Nwaswitshaka en te Skukuza (KN, KS) met die eksperiment te Phalaborwa en te Skukuza (EP, ES), soos vervat is in tabel 5.1 en 5.2.

Abnormaliteit	Wilcoxon-toets EP+ES / KN+KS p-waarde	Gemiddelde % abnormaal	
		EP+ES	KN+KS
<b>Kopsneë (Totaal)</b>	0.5053	56.6	53.0
Akrosoomafwykings	0.8072	52.0	49.6
Lipvorming	0.6883	17.4	17.9
Dagdefek	0.8052	4.5	2.8
Kernafwykings	0.1818	2.5	1.2
Bizarre koppe	0.8696	5.8	6.0
<b>Neksneë (Totaal)</b>	0.0016	69.1	49.0
Vakuoles	0.0003	57.9	31.5
Ander abnormaliteite	0.0001	53.4	29.5
<b>Hoofstuksneë (Totaal)</b>	0.8819	18.9	18.4
Vakuoles	0.8140	9.2	8.8
Ander Abnormaliteite	0.9188	5.9	5.6
Dagdefek	0.5849	7.0	7.6

#### 5.2.4 Kwantitatiewe analise (TEM)

##### a Kontrole (KN en KS)

Rooibokke wat nie aan koperbesoedelde voedsel blootgestel was nie, sluit die Skukuza-projek se kontrole (KS) en die diere van die Nwaswitshakaprojek (KN) in. Tabel 5.1 het as die brondokument vir die volgende data gedien:

##### a (i) Kop

Van 20 diere is 'n totaal van 500 lengtesneë van spermkoppe ondersoek en daar is gevind dat **47.0%** normaal voorgekom het terwyl **53.0%** van die sneë een of meer van die volgende abnormaliteite vertoon het:

Akrosoom los en begin disintegreer	:	49.6%
Lipvorming van akrosoom	:	17.8%
Bizarre kop	:	6.0%
Dagdefek (stert om kop gerol)	:	2.8%
Kern (krater, swak kondensasie)	:	1.2%

##### a (ii) Nek

Van 20 diere is 'n totaal van 200 lengtesneë van flagellumnekke ondersoek en daar is gevind dat **51.0%** sneë normaal voorgekom het terwyl **49.0%** van die sneë een of meer van die volgende abnormaliteite vertoon het:

Nekvakuoles	:	31.5%
Ander	:	29.5%

Laasgenoemde sluit 'n groot persentasie organelle wat deur nekvakuoles uit posisie gedruk of beskadig is en 'n verskeidenheid afwykings wat net

sporadies voorgekom het in, byvoorbeeld : dubbel flagellums en abnormale nekaanhegtings.

**a (iii) Hoofstuk**

Van 20 diere is 'n totaal van 500 lengte- en dwarsneë van hoofstukke ondersoek en gevind dat **81.6%** sneë normaal voorgekom het terwyl **18.4%** van die sneë een of meer van die volgende abnormaliteite vertoon het:

Vakuool	:	8.8%
Sommige organelle deur vakuool verdruk of afwesig:	:	5.6%
Dagdefek	:	7.6%

Die gemiddelde lewerkoperwaarde van die 20 kontrole-rooibokke was 33.86 dpm (NB).

**b Eksperiment (EP en ES)**

Die rooibokke van die Skukuzaprojek (ES), wat kopersulfaat saam met hulle voedsel gevoer is en die diere wat in die koperbesoedelde Phalaborwagebied (EP) versamel is, kan as die eksperiment beskou word. Tabel 5.2 het as die brondokument vir die volgende data gedien:

**b (i) Kop**

Van 44 diere is 'n totaal van 1 100 lengtesneë van spermkoppe ondersoek en daar is gevind dat **43.4%** sneë normaal voorgekom het terwyl **56.6%** van die sneë een of meer van die volgende abnormaliteite vertoon het:

Akrosoom los en begin disintegreer	:	52.0%
Lipvorming van akrosoom	:	17.4%

Bizarre kop	:	5.8. %
Dagdefek (flagellum om kop gerol)	:	4.5 %
Kern (krater, swak kondensasie)	:	2.5 %

**b (ii) Nek**

Van 44 diere is 'n totaal van 440 lengtesneë van flagellumnekke ondersoek en daar is gevind dat **30.9%** sneë normaal voorgekom het terwyl **69.1%** van die sneë een of meer van die volgende abnormaliteite vertoon het:

Nekvakuoles	:	57.9 %
Ander	:	42.1 %

Laasgenoemde sluit 'n groot persentasie organelle, wat deur nekvakuoles uit posisie gedruk of beskadig is en 'n verskeidenheid afwykings wat net sporadies voorgekom het, in. Die voorkoms van dubbel flagella, abnormale basisplate en abnormale nekaanhegtings dien as voorbeelde van afwykings wat sporadies waargeneem is.

**b (iii) Hoofstuk**

Van 44 diere is 'n totaal van 1100 lengte- en dwarsneë van hoofstukke ondersoek en daar is gevind dat **81.1%** sneë normaal voorgekom het terwyl **18.9%** van die sneë een of meer van die volgende abnormaliteite vertoon het:

Vakuool	:	9.2 %
Sommige organelle deur vakuool verdruk of afwesig	:	5.9 %
Dagdefek	:	7.0 %

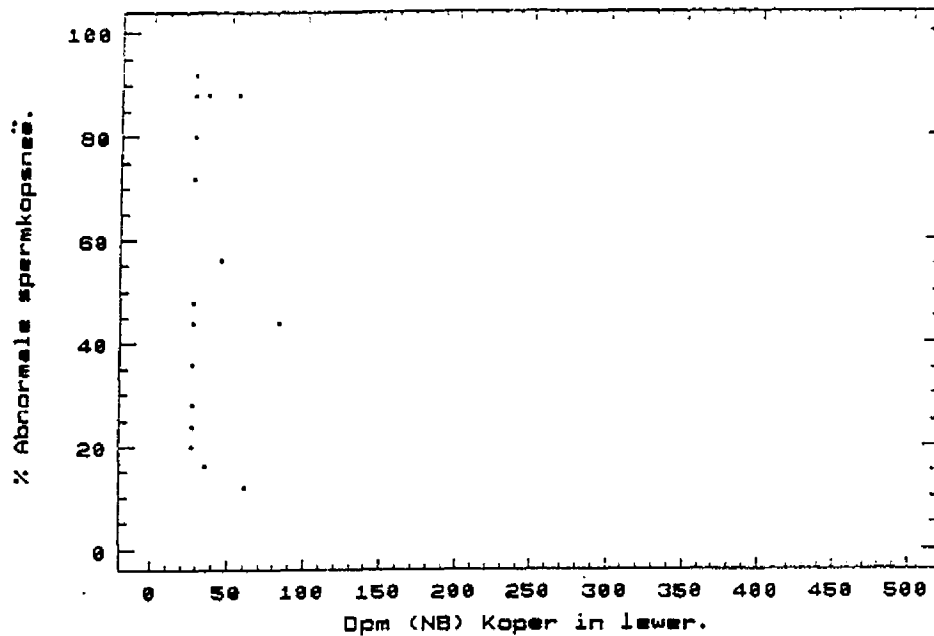
Die gemiddelde lewerkoperwaarde van die 44 rooibokke van die eksperiment was 122.5 dpm (NB).

### **5.2.5. Grafiese analise van die data in tabel 5.1 en tabel 5.2**

Figure 5.1 tot 5.26 stel die data van bogenoemde tabelle grafies voor.

Die figure van die kontrole bestaan uit 'n verspreidingsdiagram en stippels verteenwoordig die data van 20 rooibokke soos vervat in tabel 5.1. In die meeste gevalle is die getal stippels minder as 20, omdat data met dieselfde waarde net een keer deur die rekenaar gestip word. Elke verspreidingsdiagram is ondersoek vir 'n moontlike korrelasie tussen die twee veranderlikes.

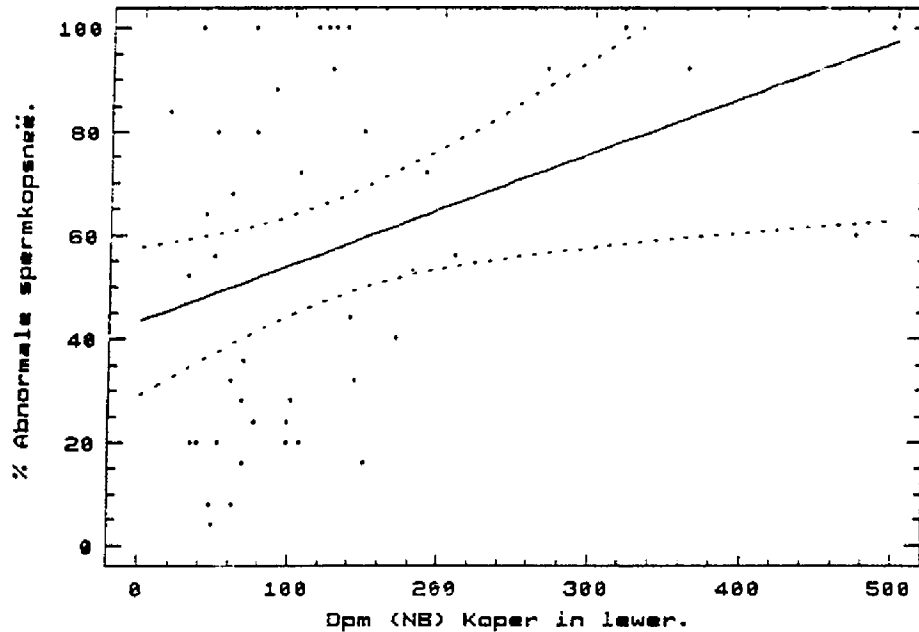
Die figure van die eksperiment bestaan uit 'n verspreidingsdiagram en die stippels verteenwoordig die data van 44 rooibokke soos vervat in tabel 5.2. 'n Regressie-analise is gedoen indien die data van die verspreidingsdiagram 'n moontlike korrelasie tussen die twee veranderlikes getoon het. Data met dieselfde waardes is ook net een keer deur die rekenaar gestip. Stippels kan dus minder as 44 wees.



**Fig. 5.1 : Kontrole**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie abnormale spermkopsneë, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 20 rooibokke.

'n Visuele ondersoek van die data toon dat daar geen verband tussen die twee veranderlikes bestaan nie en daarom is daar nie 'n poging aangewend om 'n kromme te pas nie. Hierdie stelling is geldig vir al die verspreidingsdiagramme van die kontrole (Fig. 5.3, 5.5, 5.7, 5.9, 5.11, 5.13, 5.15, 5.17, 5.19, 5.21, 5.23, 5.25).

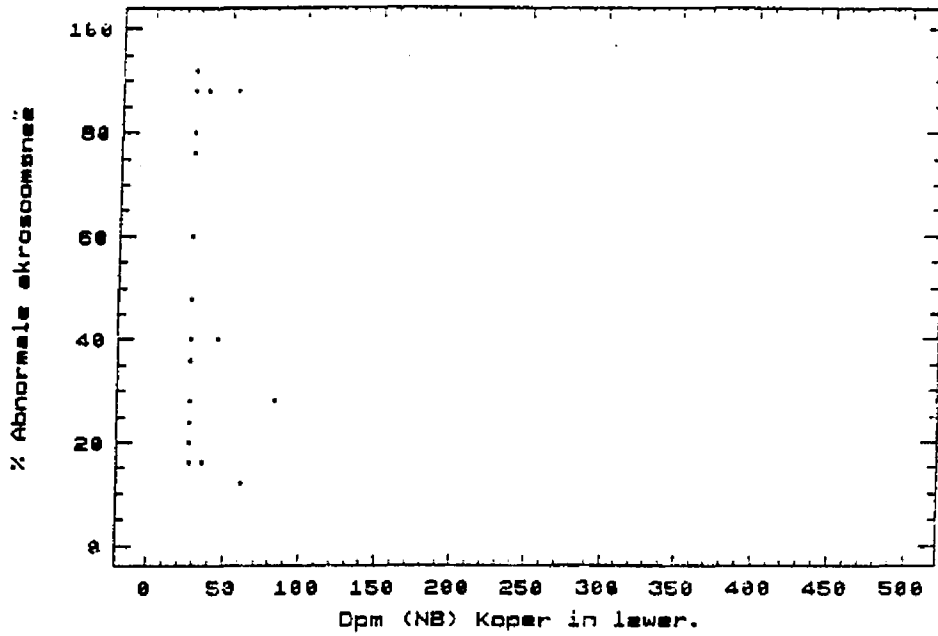


**Fig. 5.2 : Eksperiment**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie abnormale spermkopsneë (Y), gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie (X) van 44 rooibokke. 'n Lineêre kromme (soliede lyn),  $Y = a + bX$ , ( $a = 45.0345$ ,  $b = 0.101389$ ) is gepas en die stippellyne dui op 'n 95% vertrouensinterval van die passing van die data.

Die toetsing van die nulhipotese, dat daar geen korrelasie tussen die twee veranderlikes is nie, is met behulp van 'n F-toets gedoen. 'n Oorskrydingswaarskynlikheid van  $p = 0.02704$  is gevind. Die nulhipotese kan dus verwerp word met 'n waarskynlikheid van 2.7% vir 'n foutiewe verwerping

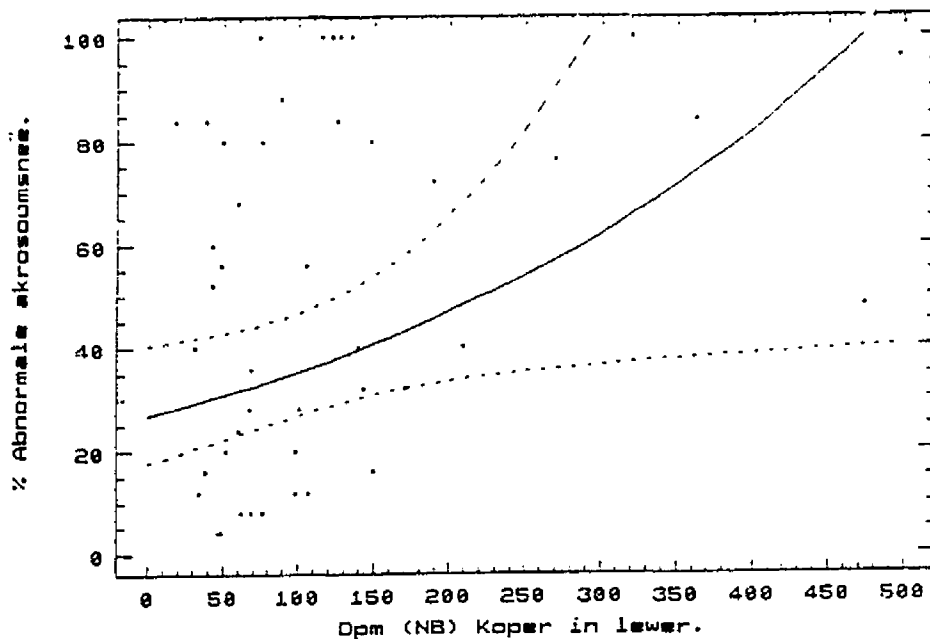
Die  $R^2 = 11.11\%$  dui egter op 'n relatiewe swak korrelasie.



**Fig. 5.3 : Kontrole**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie abnormale akrosomsneë, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 20 rooibokke.



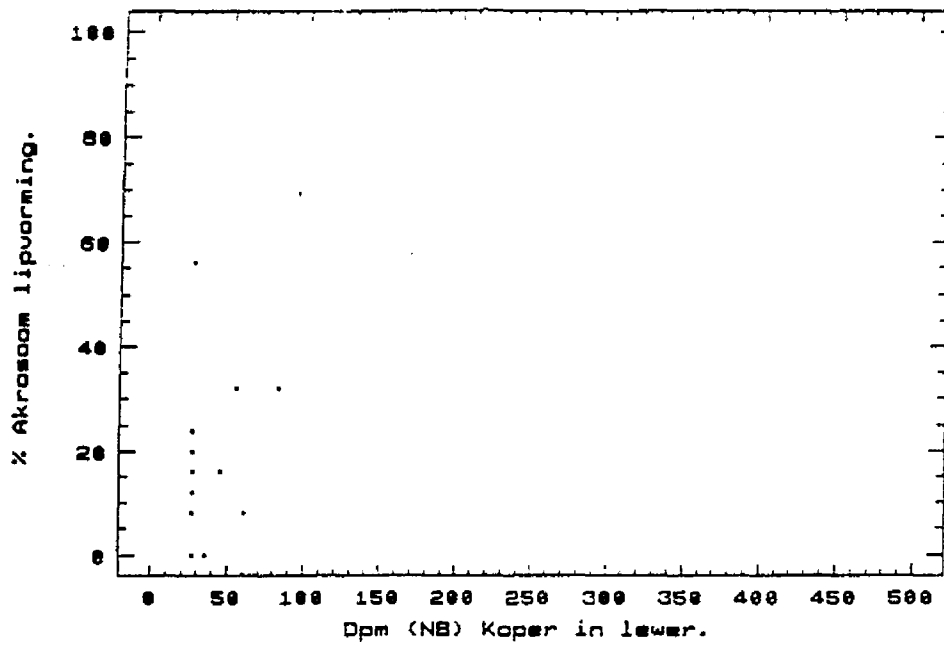


**Fig. 5.4 : Eksperiment**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie abnormale akrosomsneë (Y), gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie (X) van 44 rooibokke. 'n Eksponensiale kromme (soliede lyn),  $Y = \exp(a + bX)$ , ( $a = 3.28934$ ,  $b = 2.78887$ ) is gepas en die stippellyne dui op 'n 95% vertrouensinterval van die passing van die data.

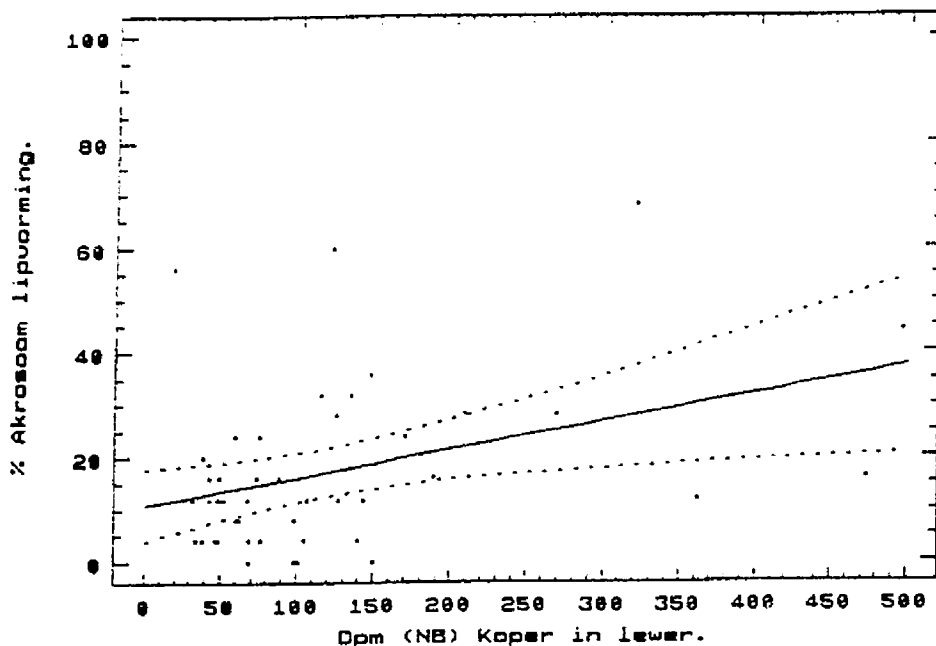
Die toetsing van die nulhipotese, dat daar geen verband tussen die twee veranderlikes is nie, is met behulp van 'n F-toets gedoen. 'n Oorskrydingswaarskynlikheid van  $p = 0.31$  is gevind. Die nulhipotese kan dus aanvaar word.

Die  $R^2 = 10.6\%$  dui egter op 'n relatiewe swak korrelasie.



**Fig. 5.5 : Kontrole**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie abnormale akrosom-lipvorming, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 20 rooibokke.

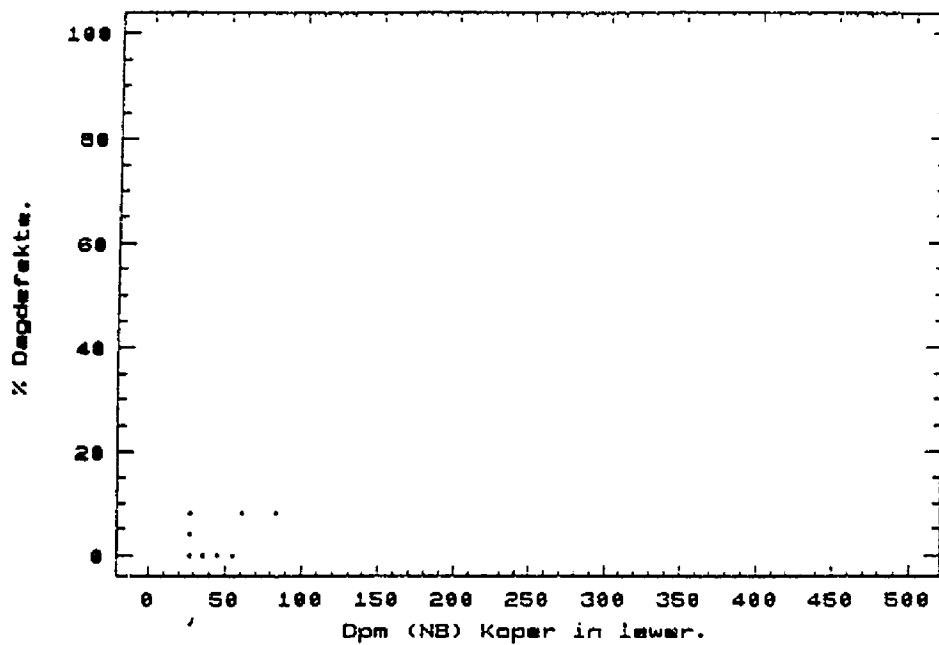


**Fig. 5.6 : Eksperiment**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie abnormale akroosomlipvorming (Y), gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie (X) van 44 rooibokke. 'n Lineêre kromme (soliede lyn),  $Y = a + bX$ , ( $a = 10.8793$ ,  $b = 0.052933$ ) is gepas en die stippellyne dui op 'n 95% vertrouensinterval van die passing van die data.

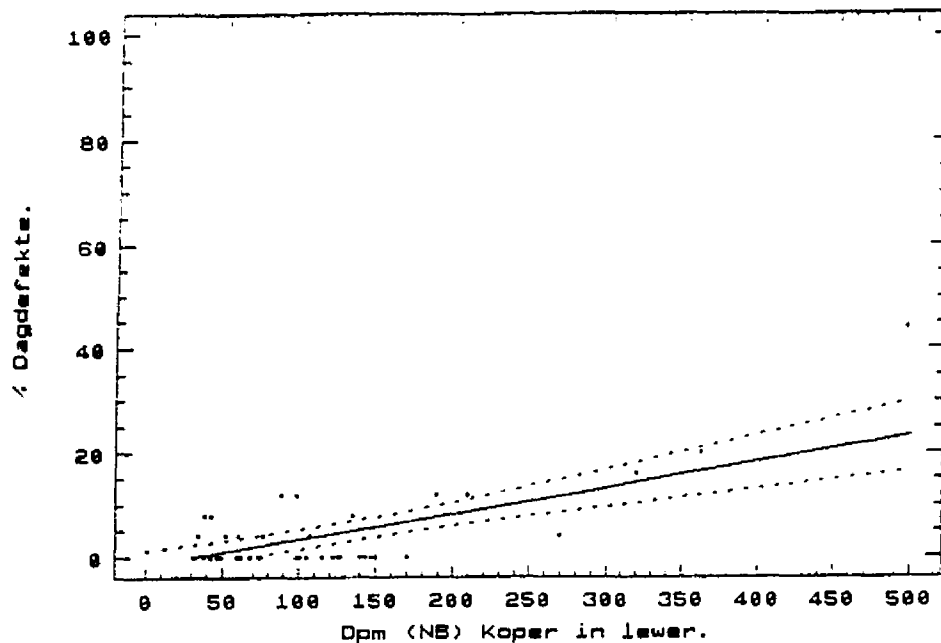
Toetsing van die nulhipotese, dat daar geen korrelasie tussen die twee veranderlikes is nie, is met behulp van 'n F-toets gedoen. 'n Oorskrydingswaarskynlikheid (p) van 0.01 is gevind. dus kan die nulhipotese verwerp word met 'n waarskynlikheid van 1.0% vir 'n foutiewe verwerping.

Die  $R^2$  van 12.99% dui daarop dat die korrelasie relatief swak is.



**Fig. 5.7 : Kontrole**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie Dagdefekte, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 20 rooibokke.

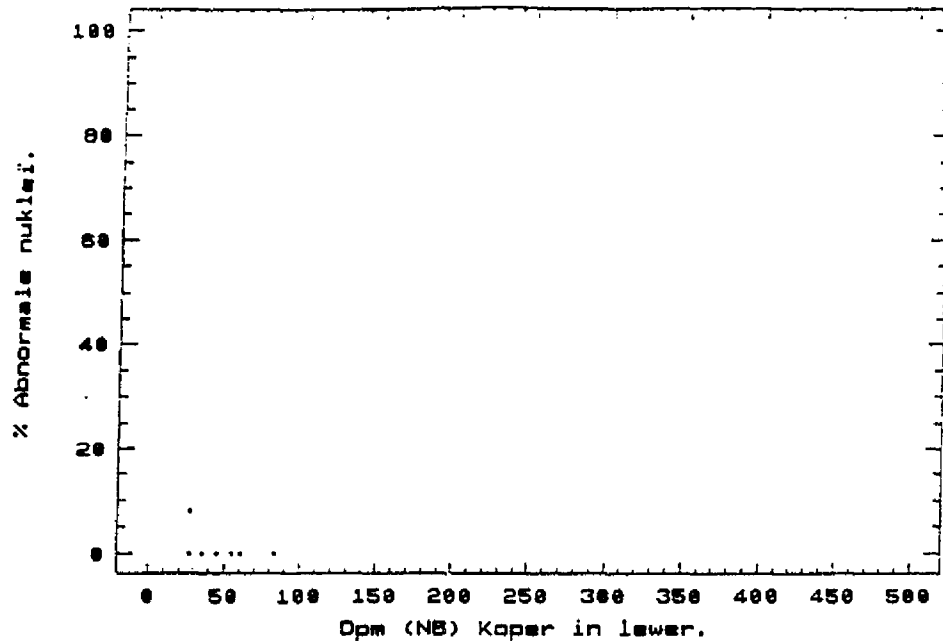


**Fig. 5.8 : Eksperiment**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie abnormale Dagdefekte (Y), gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie (X) van 44 rooibokke. 'n Lineêre kromme (soliede lyn),  $Y = a + bX$ , ( $a = -1.63207$ ,  $b = 0.0496866$ ) is gepas en die stippellyne dui op die 95% vertrouensinterval van die passing van die data.

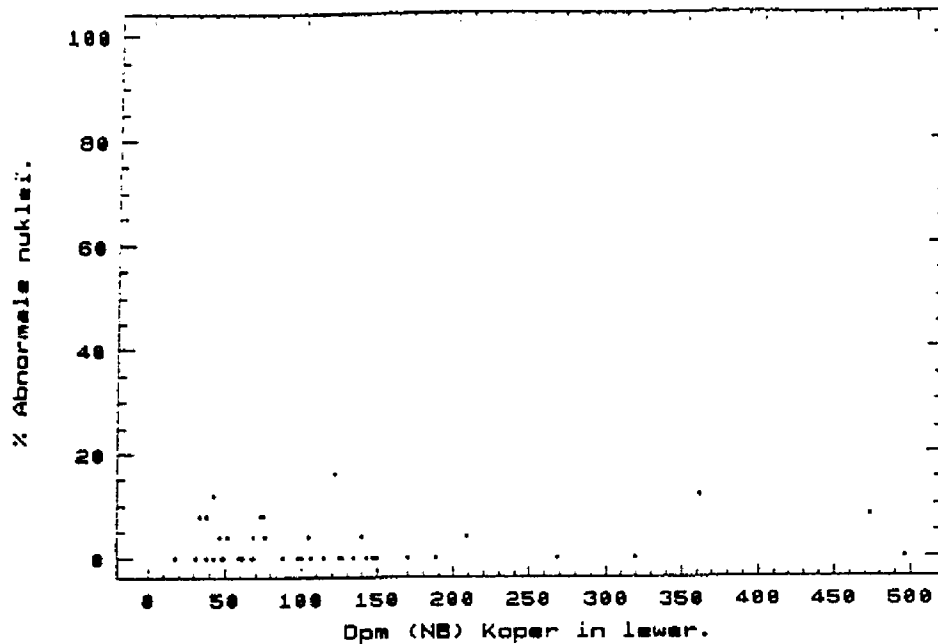
Toetsing van die nulhipotese, dat daar geen korrelasie tussen die twee veranderlikes is nie, is met behulp van 'n F-toets gedoen. 'n Oorskrydingswaarskynlikheid (p) van 0.000 is gevind. Dus kan die nulhipotese verwerp word met 'n waarskynlikheid van 0.0% vir 'n foutiewe verwerping.

Die  $R^2$  van 45.12% dui daarop dat die korrelasie relatief goed is.



**Fig. 5.9 : Kontrole**

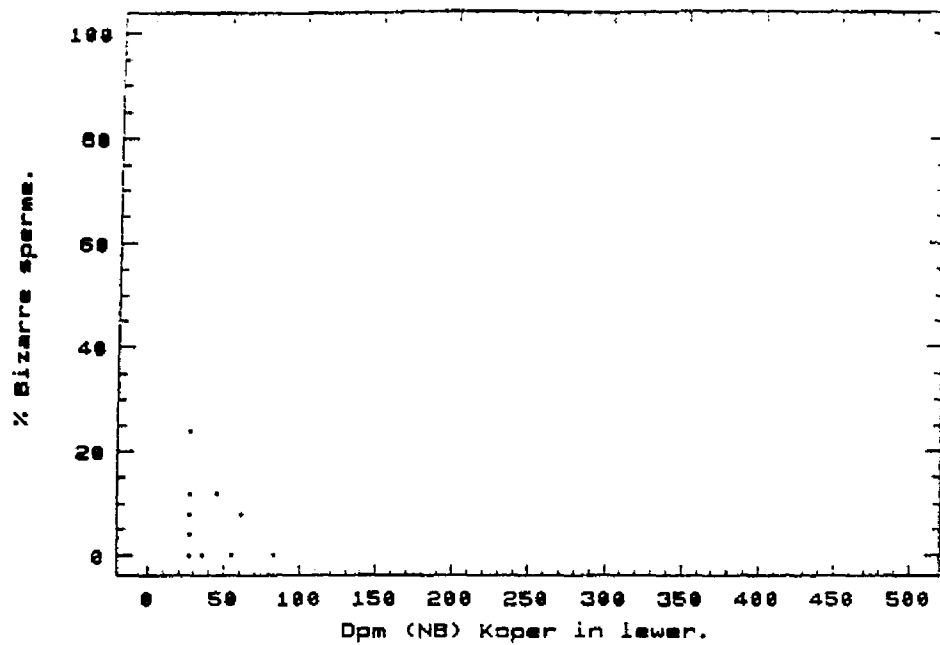
'n Verspreidingsdiagram van die persentasie abnormale nuklei, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 20 rooibokke.



**Fig. 5.10 : Eksperiment**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie abnormale nuklei, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 44 rooibokke.

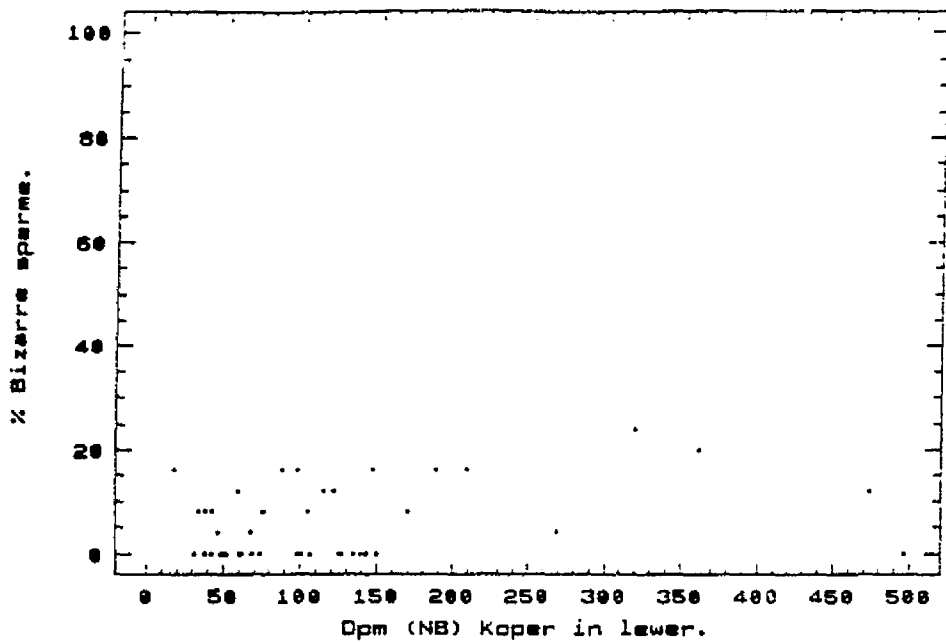
'n Visuele ondersoek van die verspreiding van die data toon geen korrelasie tussen die twee veranderlikes nie en daarom is daar nie gepoog om 'n kromme te pas nie. Hierdie stelling is ook geldig vir die volgende verspreidingsdiagramme van die eksperiment se veranderlikes (Fig. 5.12, 5.22, 5.24, 5.26).



**Fig 5.11** Kontrole

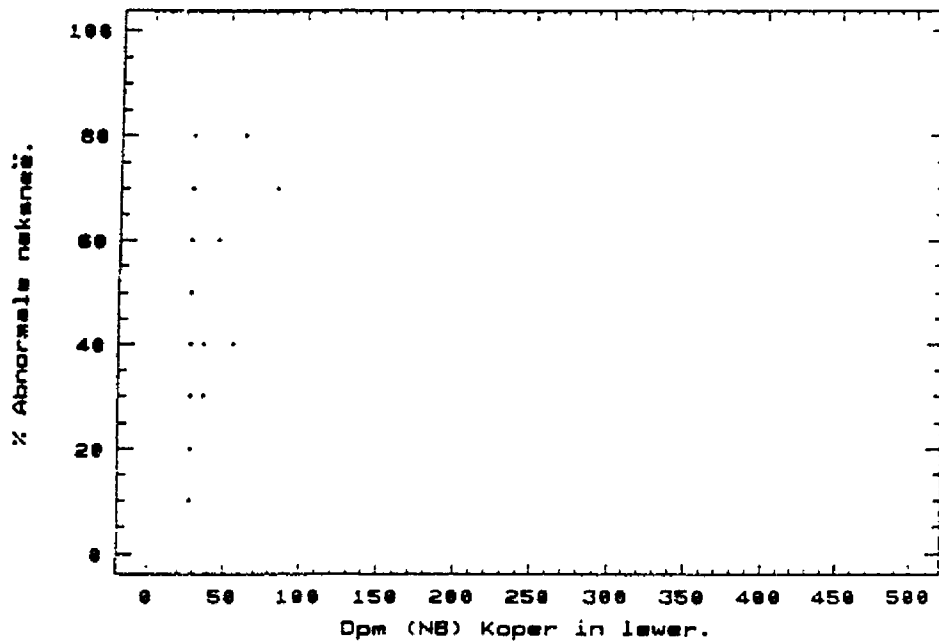
'n Verspreidingsdiagram van die persentasie bizarre sperme, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 20 rooibokke.





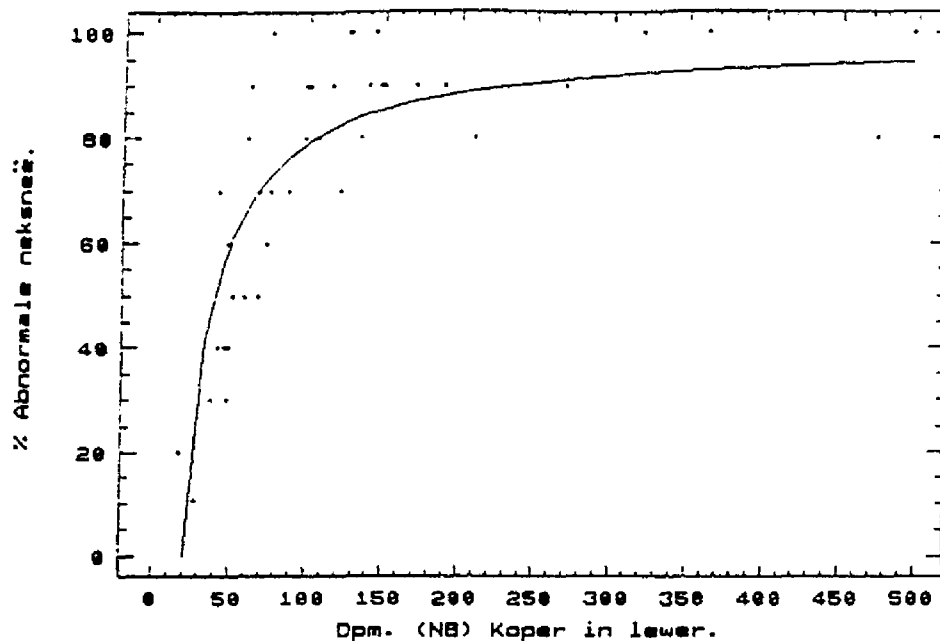
**Fig. 5.12 : Eksperiment**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie bizarre sperme, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 44 rooibokke.



**Fig. 5.13 : Kontrole**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie abnormale melksneë, gestip teenoor die coreenkomsige lewerkoperkonsentrasie van 20 rooibokke.



**Fig. 5.14 : Eksperiment**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie abnormale melksneë (Y), gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie (X) van 44 rooibokke. Die formule,  $y = a(1 - bc^x)$ , ( $a = -1943.88858$ ,  $b = 98.45397$ ) is die wiskundige funksie van die kromme (soliede lyn), wat by die data gepas is.

Die  $R^2$  van 65.0% dui op 'n goeie korrelasie tussen die twee veranderlikes..

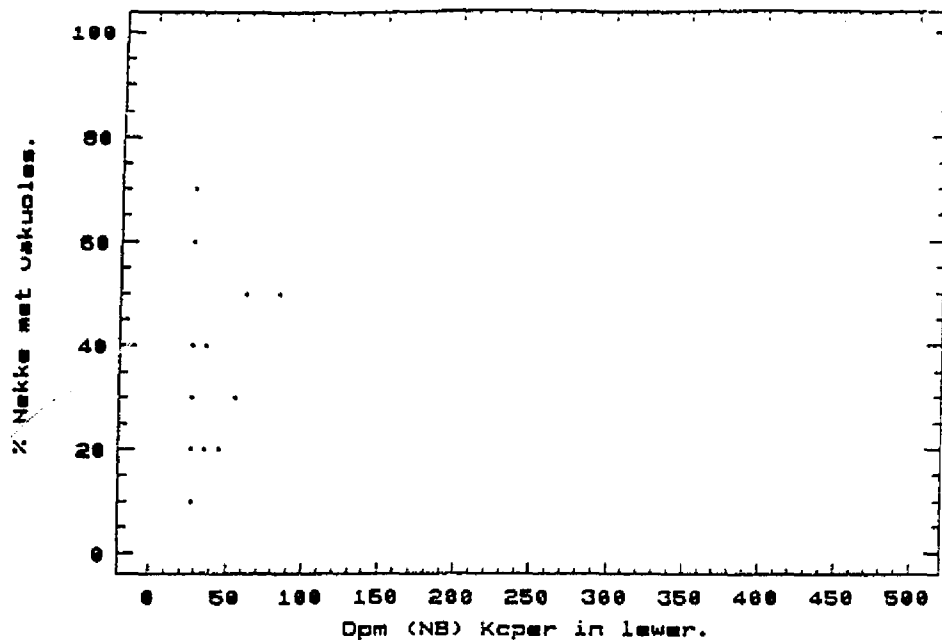
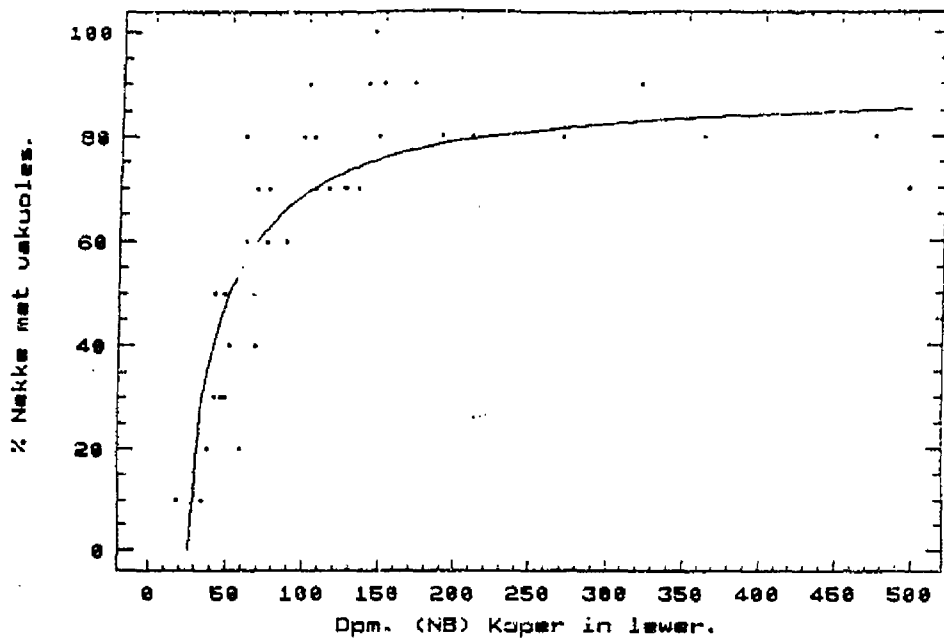


Fig. 5.15 : Kontrole

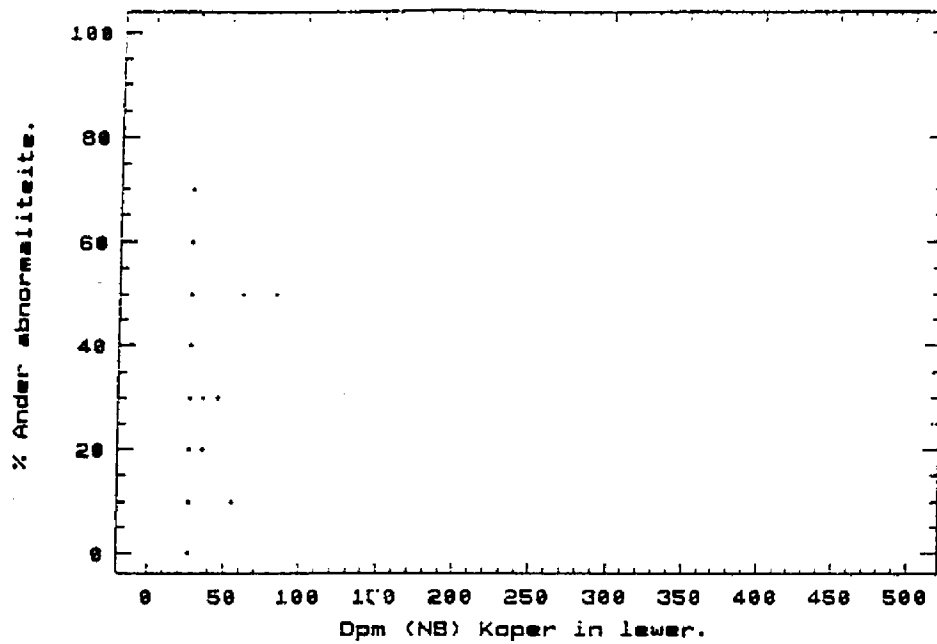
'n Verspreidingsdiagram van die persentasie nekke met vakuoles, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 20 rooibokke.



**Fig. 5.16 : Eksperiment**

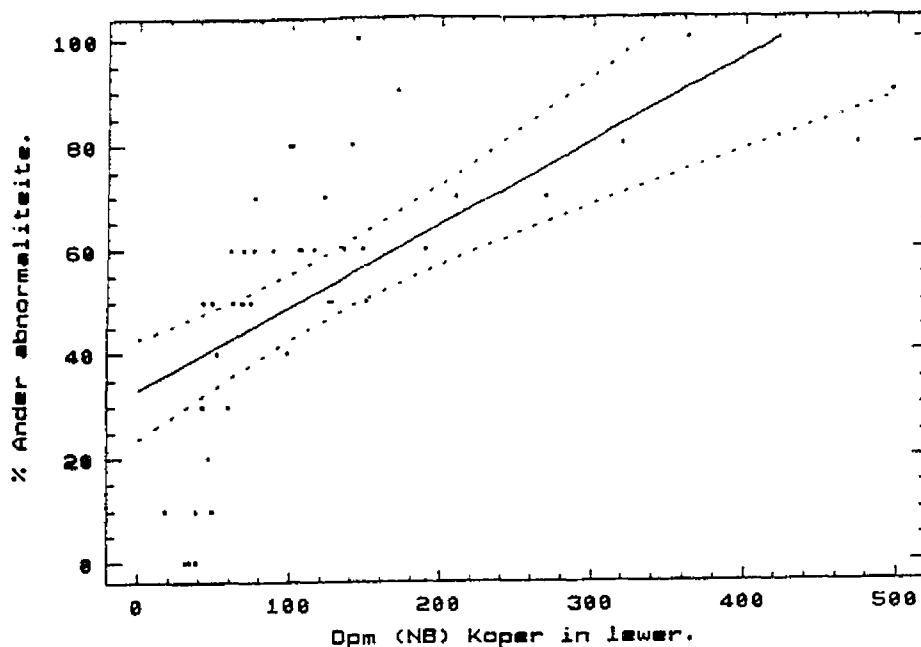
'n Verspreidingsdiagram van die persentasie nekke met vakuoles (Y), gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie (X) van 44 rooibokke. Die formule,  $y = a(1 - bc^x)$ , ( $a = -2032.86071$ ,  $b = 89.30113$ ) is die wiskundige funksie van die kromme (soliede lyn), wat by die data gepas is.

Die  $R^2$  van 66.27% dui op 'n goeie korrelasie tussen die twee veranderlikes.



**Fig. 5.17 : Kontrole**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie ander abnormaliteite van die neksneë, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 20 rooibokke.

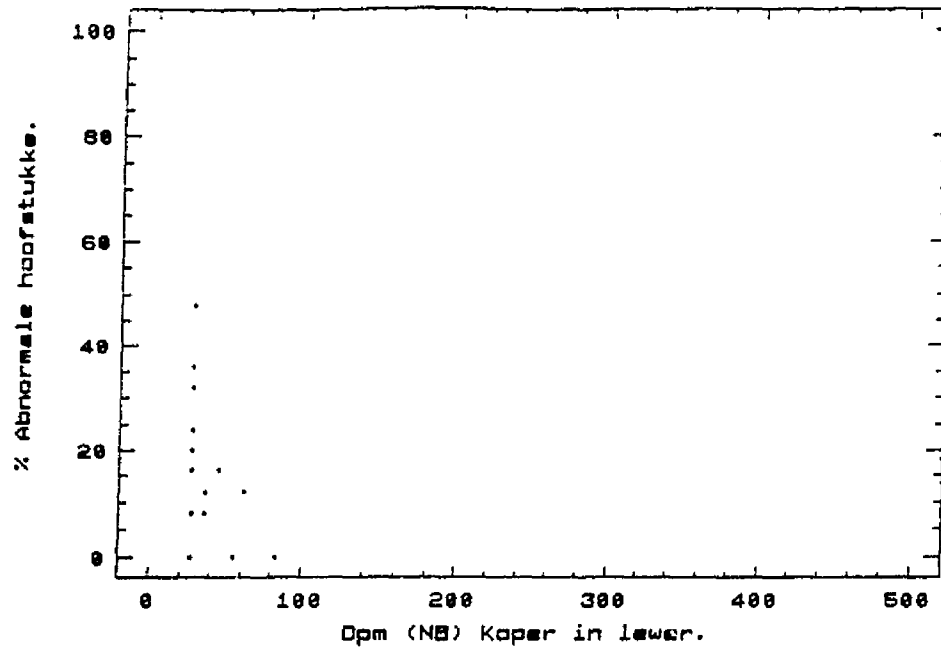


**Fig. 5.18 : Eksperiment**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie ander abnormaliteite van die neksneë (Y), gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie (X) van 44 rooibokke. 'n Lineêre kromme (soliede lyn),  $Y = a + bX$ , ( $a = 33.129$ ,  $b = 0.15813$ ) is gepas en die stippellyne dui op 'n 95% vertrouensinterval van die passing van die data.

Toetsing van die nulhipotese, dat daar geen korrelasie tussen die twee veranderlikes is nie, is met behulp van 'n F-toets gedoen. 'n Oorskrydingswaarskynlikheid (p) van 0.00000 is gevind. Dus kan die nulhipotese verwerp word met 'n waarskynlikheid van 0.000% vir 'n foutiewe verwerping.

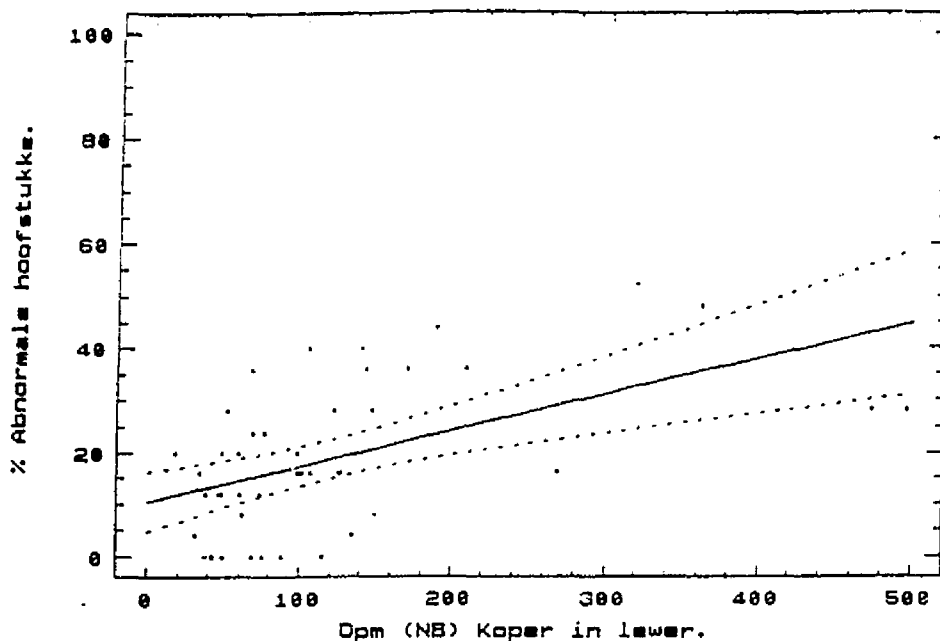
Die  $R^2$  van 41.38% dui egter net op 'n redelike korrelasie tussen die twee veranderlikes.



**Fig. 5.19 : Kontrole**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie abnormale hoofstukke, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 20 rooibokke.



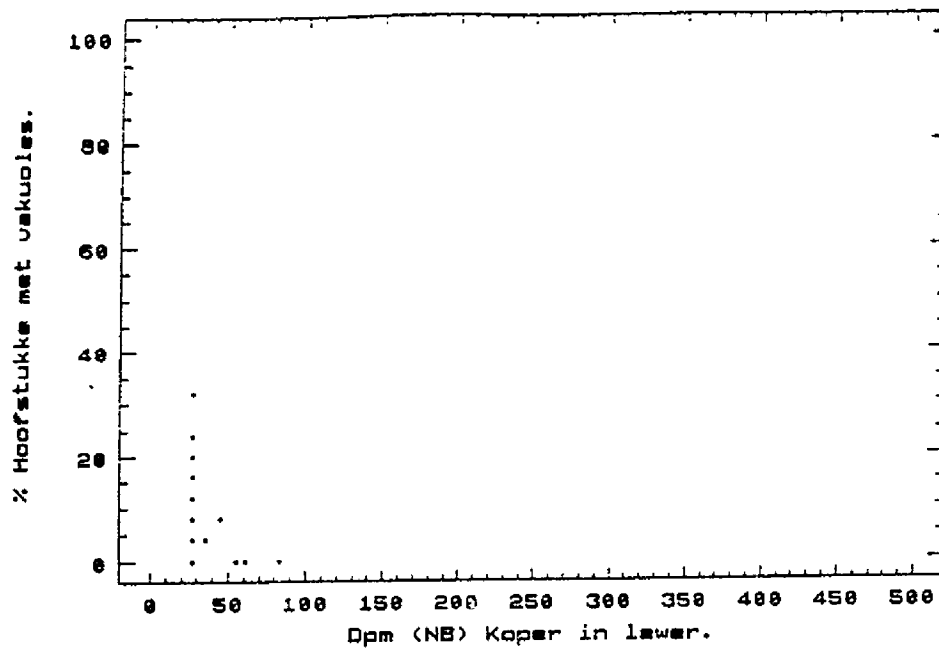


**Fig. 5.20 : Eksperiment**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie abnormale hoofstukke (Y), gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie (X) van 44 rooibokke. 'n Lineêre kromme (soliede lyn),  $Y = a + bX$ , ( $a = 9.53823$ ,  $b = 0.083918$ ) is gepas en die stippellyne dui op 'n 95% vertrouensinterval van die passing van die data.

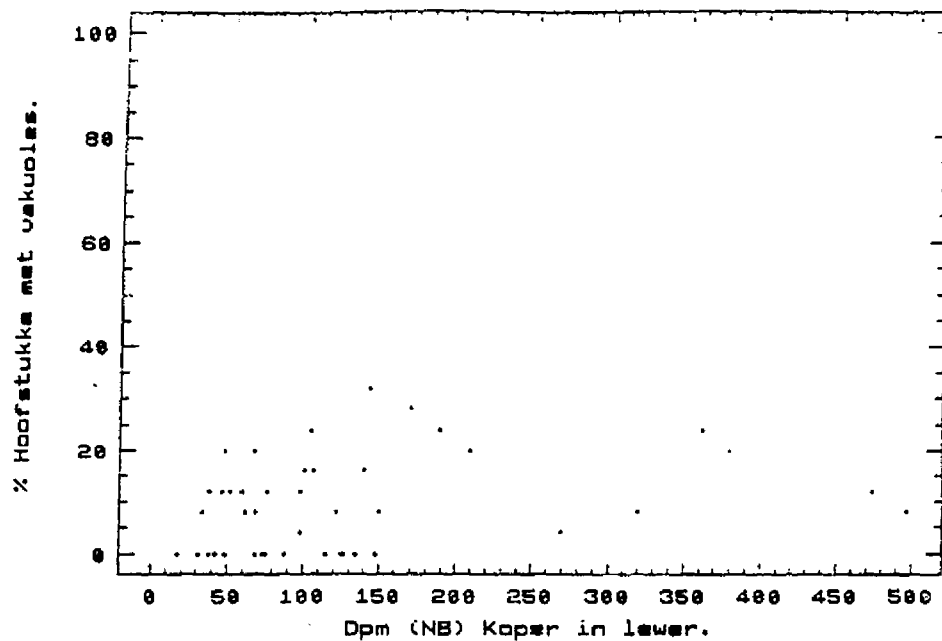
Toetsing van die nulhipotese, dat daar geen korrelasie tussen die twee veranderlikes is nie, is met behulp van 'n F-toets gedoen. 'n Oorskrydingswaarskynlikheid (p) van 0.0027 is gevind. Dus kan die nulhipotese verwerp word met 'n waarskynlikheid van 0.27% vir 'n foutiewe verwerping.

Die  $R^2$  van 27.32% dui op 'n redelike goeie passing.



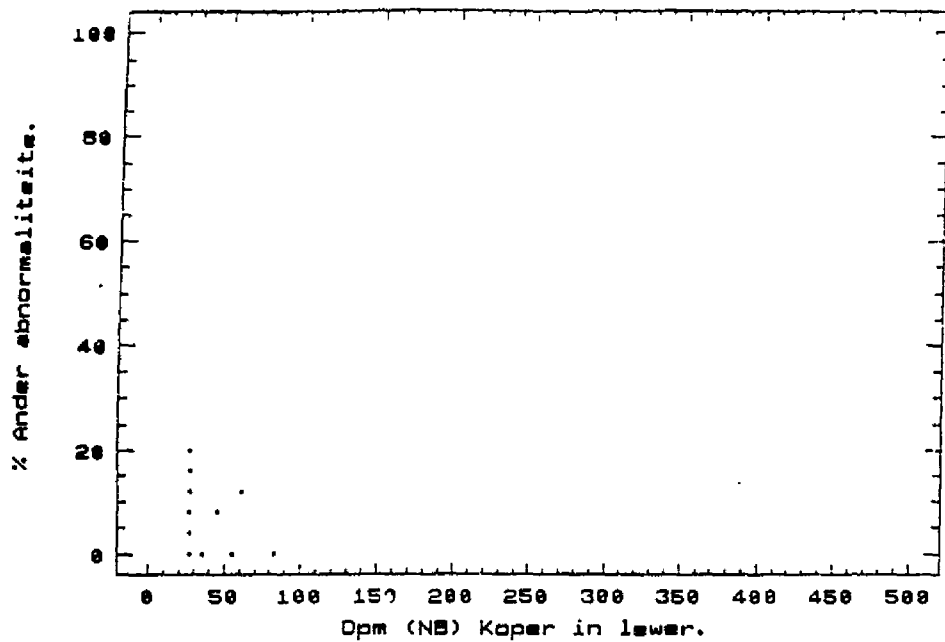
**Fig. 5.21 : Kontrole**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie hoofstukke met vakuoles, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 20 rooibokke.



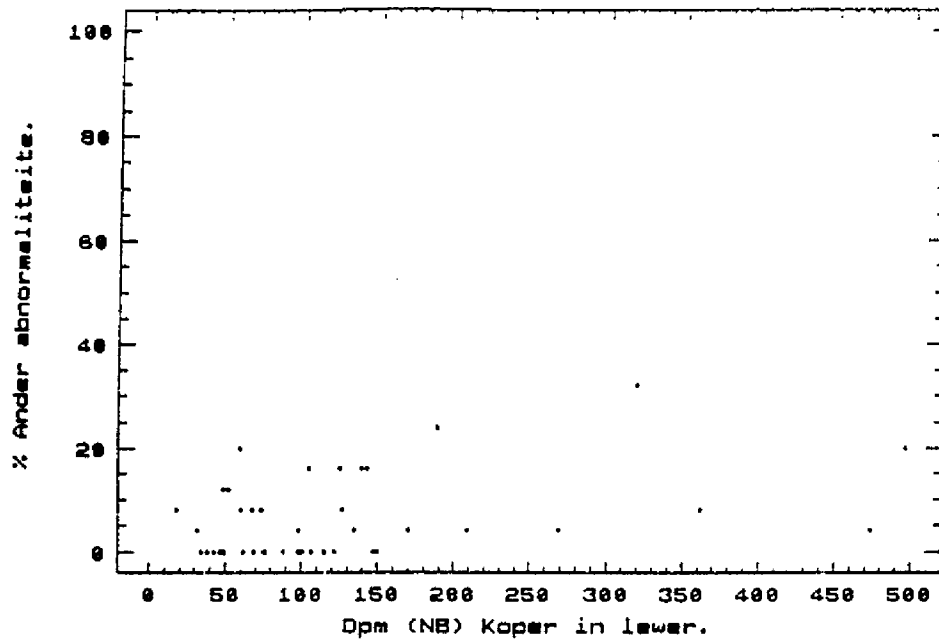
**Fig. 5.22 : Eksperiment**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie hoofstukke met vakuoles, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 44 rooibokke.



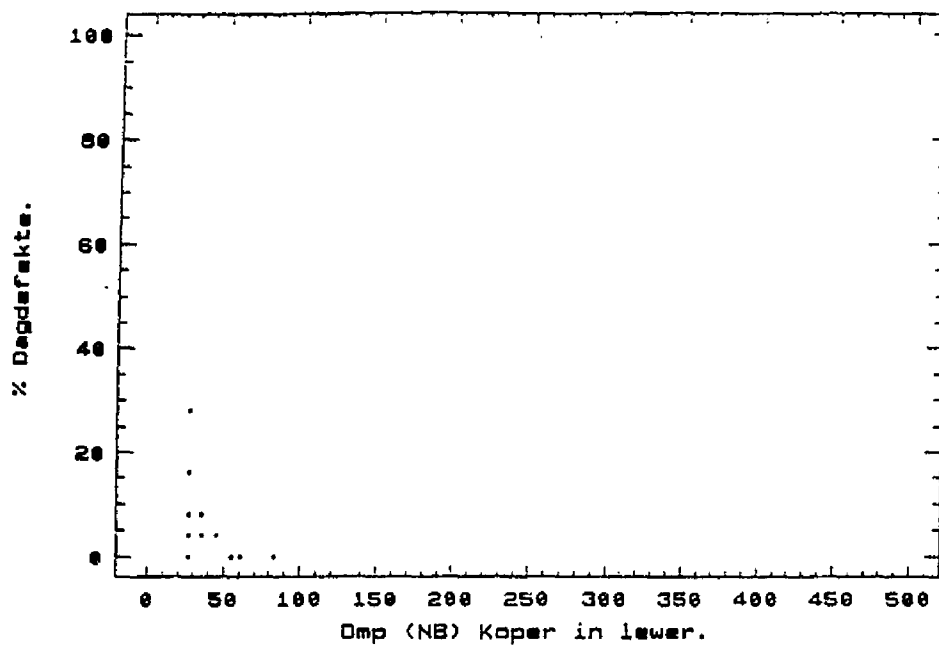
**Fig. 5.23 : Kontrole**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie ander abnormaliteite van die hoofstuk, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 20 rooibokke.



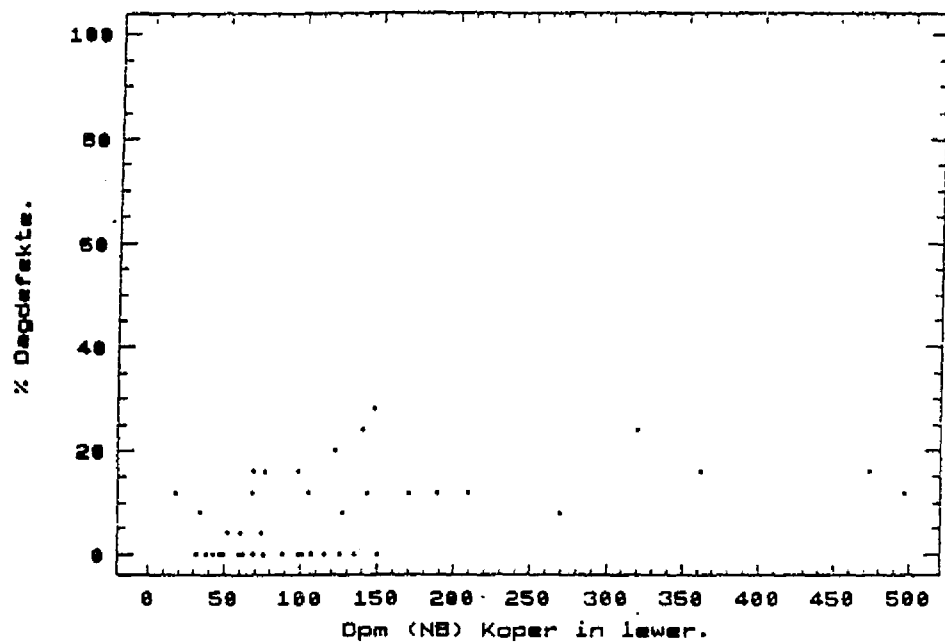
**Fig. 5.24 : Eksperiment**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie ander abnormaliteite van die hoofstuk, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 44 rooibokke.



**Fig. 5.25 : Kontrole**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie Dagdefekte, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 20 rooibokke.



**Fig. 5.26 : Eksperiment**

'n Verspreidingsdiagram van die persentasie Dagdefekte, gestip teenoor die ooreenkomstige lewerkoperkonsentrasie van 44 rooibokke.

### **5.3 Bespreking**

#### **5.3.1 Kwantitatiewe analise (SEM)**

'n SEM-studie van die uitwendige morfologie van die rooiboksperm het getoon dat 91.6% van die sperme van diere wat nie blootgestel was aan voedsel met 'n verhoogde koperinhoud nie (Kontrole), normaal voorgekom het. By rooibokke wat aan koperbesoedelde voedsel blootgestel was (Eksperiment), is gevind dat 93.4% van die sperme normaal vertoon het. Aangesien daar feitlik geen verskil tussen die twee groepe diere se gemiddelde persentasie ten opsigte van normale sperme was nie en die gemiddelde koperwaarde in die lewer van die eksperiment 104.1 dpm (NB) was, teenoor dié van die kontrole se 37.9 dpm (NB), kan afgelei word dat 'n verhoogde koperwaarde in die lewer van rooibokke nie 'n waarneembare invloed op die persentasie normale sperme wat met behulp van SEM bestudeer is, gehad het nie. Dit moet beklemtoon word dat bogenoemde stelling net geldig is ten opsigte van die uitgesoekte makro-spermabnormaliteite wat vinnig en met gemak met behulp van SEM geïdentifiseer kan word.

#### **5.3.2 Kwantitatiewe analise (TEM) en bespreking van Wilcoxon-toetse**

Die Nasionale Parkeraad van Suid-Afrika het hierdie studie goedgekeur met die voorbehoud dat materiaal van rooibokke van goedgekeurde navorsingsprojekte wat reeds in die Krugerwildtuin aan die gang was, gebruik kon word. Hierdie beslissing het sekere beperkinge op die beplanning van 'n ideale proefuitleg gehad, maar was vir etiese redes 'n verantwoordelike besluit.



Rooibokke nader aan Phalaborwa, op veld wat nie met koper besoedel was nie, sou 'n beter kontrole gewees het. Sulke diere is ten tye van die veldwerk van hierdie studie te Mahlangene op 'n ongereelde basis geskiet en was dus vir hierdie en ander praktiese redes nie beskikbaar nie. Indien die groepe diere (EP, ES, KN, KS) wat wel van verskillende navorsingsprojekte beskikbaar was, se data van tabel 5.1 en 5.2 deur middel van Wilcoxon-toetse met mekaar vergelyk word, is die bevinding die volgende:

**a KN / KS (Tabel 5.3)**

As gevolg van die groot p-waarde (0.4246), moet die gevolgtrekking gemaak word dat daar ten opsigte van die persentasies neksneë met vakuoles, nie 'n verskil tussen die kontrole-groepe (KN = 30% en KS = 35%) is nie. Dieselfde stelling geld vir die res van die p-waardes, behalwe wat die hoofstuksneë (totaal) betref ( $P = 0.0220$ ). Hierdie waarde weerspieël egter die kumulatiewe data van die hoofstuk se verskillende abnormaliteite wat nie betekenisvol verskil het nie.

Aangesien daar ten opsigte van die resultate van die abnormaliteite wat vir hierdie studie van belang is nie statisties betekenisvolle verskille was nie, is besluit om die monster te vergroot deur die KN- en KS-groep soos in tabel 5.1 saam te voeg en as die kontrole te beskou.

**b EP / ES (Tabel 5.4)**

Die groot p-waarde (0.3884), ten opsigte van die persentasies neksneë met vakuoles, dui daarop dat daar vir hierdie abnormaliteit nie 'n betekenisvolle verskil

tussen die data van die eksperimentele groepe is nie (EP = 55.0% en ES = 65.8%).

Die relatiewe klein p-waarde (0.0426) van die neksneë (totaal) word beïnvloed deur die data van die spermneksneë met vakuoles en die ander abnormaliteite van die nek wat in dié klein groepie van 12 diere van die ES-groep meer dikwels in verskillende neksneë waargeneem is as by dieselfde data van die EP-groep (Tabel 5.2) en word derhalwe nie in ag geneem nie.

Die data van die ander abnormaliteite van die hoofstuksneë se p-waarde = 0.0339. Die persentasie-verskil tussen EP = 5.4% en ES = 7.4% is egter so klein dat hierdie p-waarde buite rekening gelaat kan word.

Geen statisties betekenisvolle verskille ( $P \leq 0.05$ ), ten opsigte van die resultate van die abnormaliteite van die EP- en ES-groep wat vir hierdie studie van belang is, is gevind nie. Dus is besluit om dié twee groepe soos in tabel 5.2 saam te voeg en as die eksperiment te beskou.

Bogenoemde twee groepe diere was blootgestel aan voedsel met 'n verhoogde koperinhoud. Dit is insiggewend dat die gemiddelde persentasies vir die neksneë met vakuoles vir die eksperimentele groepe (EP = 55.0% en ES = 65.8%) veel hoër as die van die kontrolegroepe (KN = 30.0% en KS = 35.0%) was. Die gemiddelde lewerkoperwaardes van die eksperimentele groepe (EP + ES = 122.5 dpm) is ook betekenisvol hoër as dié van die kontrolegroepe (KN + KS = 33.86 dpm).

**c ES / KS (Tabel 5.5)**

Die data van die diere in aanhouding te Skukuza toon dat die gemiddelde persentasies neksneë met vakuoles van die ES-groep = 65.8% (het voedsel met 'n verhoogde kopersulfaatinhoud ontvang) en die KS-groep = 35.0% (het voedsel sonder 'n kopersulfaatbyvoeging ontvang), statisties betekenisvol verskil het (P-waarde = 0.0081, Tabel 5.5). Die gemiddelde koperkonsentrasies in die lewer van die ES- en die KS-groep was onderskeidelik 111.8 en 48.7 dpm (NB). Hierdie resultaat is belangrik aangesien dit 'n bewys is dat die byvoeging van kopersulfaat by die voedsel van die ES-groep, gelei het tot 'n verhoogde lewerkoperwaarde. Die betekenisvol hoër gemiddelde persentasie neksneë met vakuoles by hierdie groep hou verband met die verhoogde lewerkoperkonsentrasie. Aangesien beide die groepe diere uit die omgewing van Skukuza afkomstig was en behalwe die byvoeging van kopersulfaat by die voedsel van die ES-groep, dieselfde voedsel in aanhouding ontvang het, moes die kopersulfaatbyvoeging 'n rol in die proses van die vorming van die verhoogde gemiddelde persentasie neksneë met vakuoles by die ES-groep gespeel het.

Die persentasies van ander abnormaliteite van die neksneë en die persentasies abnormale neksneë (totaal) toon p-waardes  $< 0.05$  en dus verskil die data vir hierdie abnormaliteite ook betekenisvol tussen die eksperimentele (ES) en kontrolegroep (KS).

Die res van die p-waardes was  $> 0.05$  en die gevolgtrekking is dat daar geen betekenisvolle verskil ten opsigte van hierdie abnormaliteite se persentasies tussen

die twee groepe was nie.

**d EP / KN (Tabel 5.6)**

Die klein p-waarde (0.0079), ten opsigte van die persentasies neksneë met vakuoles, dui daarop dat daar 'n betekenisvolle verskil tussen die persentasies van die eksperimentele- en kontrole-groep is (EP = 55.0% en KN = 30%).

Die klein p-waarde (0.0299) van die neksneë (totaal) en die ander abnormaliteite van die nek ( $P = 0.0012$ ) is hoofsaaklik veroorsaak deur die invloed van die persentasies neksneë met vakuoles (Kyk kwantitatiewe analiseringsmetode van hoofstuk 2). Bogenoemde resultate toon groot ooreenkomste met die ooreenstemmende data van tabel 5.5. Dus is dit moontlik dat die afleidings wat ten opsigte van tabel 5.5 se data gemaak is, ook geldig vir die data van die EP- en KN-groep is. Vir die EP- en die KN-groep was die gemiddelde koperkonsentrasie in die lewer onderskeidelik 126.5 en 25.8 dpm (NB).

Die res van die p-waardes is  $> 0.05$  en daar is dus geen betekenisvolle verskil tussen die data van die betrokke groepe ten opsigte van hierdie abnormaliteite nie.

**e EP + ES / KN + KS (Tabel 5.7)**

Die KN- en KS-groep saam (Tabel 5.1), met 'n gemiddelde lewerkoperwaarde gelyk aan 33.86 dpm (NB), toon 31.5% neksneë van die kontrolediere met vakuoles. In teenstelling hiermee toon die EP- en ES-groep saam (Tab. 5.2) dat

57.9% van hulle neksneë vakuoles gehad het (Gemiddelde lewerkoperwaarde = 122.5 dpm NB). Hierdie resultate ondersteun ook die gegewens soos weerspieël in figuur 5.16. 'n Klein p-waarde (0.0003) toon dat bogenoemde persentasies statisties betekenisvol verskil (Tabel 5.7).

Die groter monster toon ook dat die data van die betrokke groepe betekenisvol verskil ten opsigte van die persentasies ander abnormaliteite van die nek ( $p = 0.0001$ ) en die persentasies van die totale aantal abnormale neksneë ( $p = 0.0016$ ). Die resultate gedokumenteer in tabel 5.7 (EP + ES / KN + KS) bevestig die gegewens wat in die vergelykings tussen die groepe in tabel 5.5 (ES / KS) en tabel 5.6 (EP / KN) gevind is.

Die res van die abnormaliteite se p-waardes is  $> 0.05$  en daar is dus geen betekenisvolle verskil tussen die gegewens van die kontrole en die eksperiment ten opsigte van hierdie abnormaliteite nie. Geen verband kon dus tussen die gemiddelde persentasies van hierdie abnormaliteite en die koperwaardes in die lewer gevind word nie.

Opsommend is dit duidelik dat indien die gemiddelde persentasies van spermnekke met vakuoles, van die groepe wat blootgestel was aan koperbesoedelde voedsel, vergelyk word met dié van groepe wat nie blootgestel was aan koperbesoedelde voedsel nie, eersgenoemde groepe in al die vergelykings, met behulp van Wilcoxon-toetse, statisties betekenisvol hoër gemiddelde persentasies spermnekke met vakuoles getoon het (Tabel 5.5, 5.6, 5.7).

### 5.3.3 Grafiese data

Die persentasies abnormale neksneë van die kontrolediere in figuur 5.13 se verspreidingsdiagram was soms besonder hoog. Gummow *et al.* (1991) se gemiddelde lewerkoperwaarde van 25.8 dpm (NB)  $\pm$  15.96, is aanvaar vir die diere wat langs die Nwaswitshakaspruit geskiet is (KN-groep). Die standaardafwyking van 15.96 dui egter daarop dat van die diere se koperkonsentrasie in die lewer betekenisvol hoër as 25.8 dpm (NB) kon gewees het. Indien daar 'n oorsaaklike verband tussen lewerkoperkonsentrasie en abnormale neksneë bestaan, kan dit moontlik gedeeltelik die hoër persentasies abnormale neksneë verklaar. Dieselfde redenasie is ook geldig vir figuur 5.15.

Die grafiese analise van die data van tabel 5.2 toon 'n statisties betekenisvolle korrelasie tussen die persentasies abnormale spermneksneë en die koperkonsentrasies in die lewers van rooibokke (Fig.5.14;  $R^2 = 65.0\%$ ). Dieselfde geld ook vir die korrelasie tussen die persentasie spermnekke met vakuoles en die lewerkoperwaardes (Fig. 5.16;  $R^2 = 66.2\%$ ). Aangesien die spermneksneë met vakuoles hoofsaaklik verantwoordelik was vir die persentasie abnormale neksneë, word figuur 5.14 nie verder bespreek nie. Soos reeds bespreek het vakuoles van die spermnek ook die grootste bydrae tot die hoër persentasies ander abnormaliteite van die nek gelewer (Fig. 5.18). Sonder die invloed wat die vakuoles op die gegewens van die ander abnormaliteite van die spermnek uitgeoefen het, sou die gemiddelde persentasie van hierdie afwykings minder as 10% gewees het. Dus word hierdie resultate ook nie verder bespreek nie.

Die kromme van figuur 5.16 toon 'n versnellingsfase vanaf 25.8 dpm Cu in die lewer tot by ongeveer 80 dpm Cu in die lewer. Daarna plat die kromme vinnig af en stabiliseer by ongeveer 80% spermnekke met vakuoles. 'n  $R^2$  van 66.27% dui op 'n statisties betekenisvolle korrelasie tussen die gemiddelde persentasies spermnekke met vakuoles en lewerkoperkonsentrasies van rooibokke. Die verwagting sou wees dat hierdie kromme moontlik by 'n veel hoër persentasie moes afplat. Een van die moontlike redes waarom dit nie gebeur het nie, kan te wyte wees aan die feit dat geskikte lengte of saggitale spermneksnee, om die nekvakuoles met sekerheid te identifiseer, nie dikwels gevind word nie en net 10 per dier ondersoek is. Verder is 'n streng dissipline ten opsigte van die telmetode gehandhaaf. Indien 'n gaping in 'n lengte of saggitale snee van die spermnek nie ten minste gedeeltelik met 'n membraan omsluit was nie, is die gaping nie as 'n vakuool in die nek getel nie. Die moontlikheid bestaan dat sommige van die nekgapings wat waargeneem is, wel vakuoles kon gewees het. Die streng telmetode kon dus 'n bydraende faktor gewees het waarom die vlak van die afplattingsfase van die kromme veel laer was as wat verwag is. Ongeveer 'n jaar na die bepaling van die spermabnormaliteite van tabel 5.1 en 5.2 is 'n hertelling van die spermnekke met vakuoles gedoen en 'n foutfaktor van 1.8% is gevind. Hertellings van die ander abnormaliteite wat gedurende die studie gedoen is, het ook getoon dat die foutfaktor weglaatbaar klein is.

Normale strukture van die spermnek is noodsaaklik vir normale spermmotiliteit (Zamboni, 1992). Nekvakuoles verswak die ultrastruktuur van die spermnek deur bestaande organelle soos die gesegmenteerde kolomme en die verbindingstuk uit posisie te druk, gedeeltes daarvan te vervang of tussen die verbindingstuk en die basisplaat in te wig. Figure 4.72, 4.73, 4.74 en 4.75 demonstreer die destruktiewe rol wat vakuoles

in die spermnek speel. Volgens Zamboni (1991) lei enige abnormaliteit van die verbindingstuk en gesegmenteerde kolomme oor die algemeen tot defektiewe motiliteit wat die vermoë van die spermsel om die lokaliteit van bevrugting te bereik verminder of onmoontlik maak. Die moontlikheid bestaan dus dat nekvakuoles 'n nadelige invloed op die vermoë van die spermsel kan uitoefen om die ovum te bevrug.

Indien die verspreidingsdiagram van figuur 5.8 beskou word, is dit duidelik dat die persentasie Dagdefekte stadig gestyg het met die verhoging van lewerkoperwaardes. By 497 dpm (NB) koper in die lewer, het 44% van D21 se spermkopsneë tekens van 'n Dagdefek getoon. Die data was waarskynlik nie voldoende om hierdie versnellingsfase van die kromme van figuur 5.8 aan te dui nie. Met meer diere waarvan die lewerkoperwaardes > 500 dpm (NB) was, kon die persentasie Dagdefekte moontlik skerp gestyg het. Alhoewel die korrelasie tussen die twee veranderlikes in hierdie geval nie so sensitief reageer as die data van figuur 5.16 nie, is die korrelasie wel statisties betekenisvol ( $P = 0.000$ ).

#### **5.3.4 Algemeen**

Die gemiddelde lewerkoperkonsentrasies van die kontrolerooibokke (KS) in aanhouding te Skukuza ( $Cu = 48.7$  dpm. Tabel 5.1), was hoër as dié van rooibokke wat deur Gummow *et al.* (1991) in die omgewing van Skukuza versamel is ( $Cu = 25.8$  dpm). Aangesien bogenoemde rooibokke almal in dieselfde gebied versamel is en albei die groepe diere se koperwaardes in die lewers bepaal is deur die beamptes van die Onderstepoort Veterinêre Instituut se Toksikologie Seksie, kan 'n rede vir die verskil



nie aangebied word nie. Die lewerkoperwaardes van die KS-groep was in die meeste gevalle eers na maande in aanhouding bepaal. Dit was die enigste verskil tussen die KS-groep en Gummow se diere. Dat sommige van die monsters deurmekaar geraak het of dat die kontrolegroep (KS) koperbesoedelde voedsel gevoer is, is moontlik maar hoogs onwaarskynlik. Aangesien Onderstepoort se koperwaardes van 'n groep duplikaatmonsters net met 4% van die oorspronklike waardes verskil het, moet die waardes van die Toksikologiese Seksie vir hierdie groep aanvaar word. Gummow *et al.* (1991) se resultate vir die diere wat langs die Nwaswitshakaspruit versamel is, word aanvaar (KN-groep =  $25.8 \text{ dpm} \pm 15.96$ , (NB) Cu in lewer).

'n Verdere ontleding van tabel 5.1 en 5.2 se gegewens het ook getoon dat indien die rooibokke van die kontrole en rooibokke van die eksperiment se data ten opsigte van die persentasie sperme met nekvakuoles gepoel en in die onderstaande groepe geplaas word, die volgende persentasie sperme met nekvakuoles in elke groep teenwoordig was:

0 - 49 dpm Cu in lewer	- 27.5% Spermnekke met vakuoles.
50 - 99 dpm Cu in lewer	- 55.6% Spermnekke met vakuoles.
100 en meer dpm Cu in lewer	- 76.5% Spermnekke met vakuoles.

Bogenoemde ontleding ondersteun die resultate van die grafiese analise van figuur 5.16 en die uiteensetting van die data toon ooreenkomste met 'n dosis/respons-toets. In hierdie geval is 20 rooibokke (KN,KS) voedsel sonder kopertoevoegings gevoer en 44 rooibokke was aan voedsel met 'n verhoogde koperinhoud blootgestel (EP ES). Die inname van die koper het tot 'n mindere of meerdere mate 'n verhoging van die

koperwaarde in die lewers van die diere veroorsaak. Die resultaat was dat die lewerkoperkonsentrasies van die 64 diere 'n reeks gevorm het wat gestrek het van ongeveer 10 dpm tot 497 dpm. Indien die lewerkoperkonsentrasie as die dosis aanvaar word, kan die persentasie sperme wat nekvakuoles gevorm het as die respons beskou word. As bogenoemde data as 'n dosis/respons-toets aanvaar word dra dit by tot die bewys dat daar 'n korrelasie tussen die lewerkoperkonsentrasie en die persentasie spermnekke met vakuoles by die rooibok bestaan.

Die stres van die droogte het waarskynlik veroorsaak dat die diere wat op 1992.11.30 te Phalaborwa versamel is, min of geen sperme geproduseer het nie. Dit was ten spyte van die effense verbetering in hulle kondisie as gevolg van die 37.5 mm reën wat gedurende November 1992 geval het. D55 (% Murgvet = 88) en D56 (% Murgvet = 84.2), diere in aanhouding te Skukuza, het op 1992.12.01 (feitlik dieselfde tyd) die normale kwota sperme gelewer. Twee van die drie diere wat terselfdertyd in die omgewing van Skukuza versamel is, nl. D58 en D59 het ook geen sperme gelewer nie. Murgvet-bepalings is nie op die KN-groep gedoen nie maar die twee diere was ooglopend in 'n baie swak kondisie. Die Skukuza-gebied se weiding was ook, tot die eerste reëns in Oktober 1992, in 'n uiters haglike toestand.

Fairall (1971) maak melding van die geleidelike afname in die aktiwiteit van die rooiboktestis (Krugerwildtuin) na die paarseisoen tot in November en die herstel daarvan tot maksimum produksie in April en Mei. Rooibok epididymis spermreserwes van die S. A. Lombard Natuurreservaat naby Bloemhof in Wes-Transvaal, vermeerder seisoenaal tot 'n maksimum gedurende paartyd wanneer die spermgetal 25 keer meer is as gedurende die lente (Skinner, 1971). Skinner (1971) bevind ook dat die

spermgetal in die epididymis van rooibokke in bogenoemde reservaat gedurende November 'n laagtepunt bereik, maar spermproduksie word nie gestaak nie.

Bogenoemde data dui daarop dat dit nie normaal is om gedurende November geen of feitlik geen sperme in die rooibokepiddymis te vind nie en dat voedselskaarste as gevolg van die droogte waarskynlik verantwoordelik was vir die abnormale toestand ten opsigte van rooiboksperme gedurende November 1992 in die Krugerwildtuin.

Daar bestaan ook 'n moontlikheid dat die stres wat die droogte gedurende Oktober 1992 op die diere uitgeoefen het, 'n verhoging in die persentasie spermkopsneë tot gevolg kon gehad het. Indien dit wel gebeur het sal so 'n seisoensgekoppelde veranderlike die interpretasie in terme van van koperbesoedeling bemoeilik en sal dit verdere ondersoek regverdig. 'n In diepte studie van al die tersaaklike tabelle toon egter dat die verhoging van die persentasie spermkopsneë met abnormaliteite van die EP-groep gedurende Oktober 1992, eerder toegeskryf sou kon word aan die buitengewoon hoë lewerkoperkonsentrasies van die diere wat gedurende dié maand te Phalaborwa versamel is

Die abnormale hoë persentasie akrosoomafwykings van sperme van rooibokke wat op 11 Februarie 1993 (D69 = 60%, D70 = 76%, D71 = 80%) en 15 Mei 1993 (D88 = 92%, D89 = 88%, D90 = 92%) langs die Nwaswitshakaspruit (KIN) versamel is, was waarskynlik te wyte aan 'n verouderde fikseermiddel wat per abuis gebruik is (Tabel 5.1; Hayat, 1981). Hierdie waardes het 'n verhoging in persentasie van die akrosoomafwykings en die abnormale spermkopsneë van tabel 5.1 veroorsaak.

Indien hierdie abnormale hoë waardes buite rekening gelaat word, verander die persentasies van bogenoemde as volg:

**Kontrolegroep.**

- a. Die persentasie abnormale spermkopsneë verander van 53.0% na **27.8%** en die normale spermkopsneë van 47.0% na **72.2%** (Tabel 5.1).
- b. Die persentasie akrosoomafwykings verander van 49.6% na **25.2%** en die persentasie normale akrosome van 50.4% na **74.8%** (Tabel 5.1).

Bogenoemde nuwe gegewens strook beter met gegewens wat verwag sal word van gesonde, vrylopende diere in die natuur. Dit versterk ook die argument wat in die bespreking van tabel 5.1 geopper is, nl. dat die verskil tussen die data van die eksperiment se normale spermkopsneë nou ook betekenisvol laer is as die data van die normale spermkopsneë van die kontrole.

**Eksperiment** : Normale spermkopsneë = **43.4%** (Tabel 5.2).

**Kontrole** : Normale spermkopsneë = **72.2%** (Kyk a hierbo).

Die eksperiment (voedsel met verhoogde koperinhoud) se gemiddelde persentasie normale spermkopsneë van **43.4%** is betekenisvol laer as die kontrole s'n en dit dui moontlik op 'n verband tussen die lewerkoperkonsentrasie en die persentasie normale spermkopsneë. Dit is egter nie moontlik om in hierdie geval te bewys dat die verouderde fikseermiddel verantwoordelik was vir die abnormale data nie.

----- oOo -----

## HOOFSTUK 6

### ALGEMENE BESPREKING EN SLOTSOM

Spesiale vermelding moet gemaak word van die rol wat die skandeer- en die transmissie-elektronmikroskope in hierdie studie gespeel het. Sonder die hoogs tegniese vermoëns van dié instrumente sou hierdie projek nie haalbaar gewees het nie.

Uit SEM-studies blyk dit dat die uitwendige morfologie van die rooiboksperm groot ooreenkomste met dié van ander lede van die Bovidae toon. 'n Plat, spaanvormige spermkop is 'n gemeenskaplike kenmerk en kom sover bekend met geringe afwykings by alle lede van bogenoemde familie voor (Saacke en Almquist, 1964a; Morgenthal, 1967; Cummins en Woodall, 1985; Ackerman *et al.*, 1994).

Verskille tussen die waarnemings van Morgenthal (1967), Dott en Skinner (1989) en waarnemings van hierdie studie ten opsigte van rooibokspermmates, is gevind. (Die mates is in  $\mu\text{m}$ ):

	Morgenthal	Dott en Skinner	Dié studie
Koplengte	6.52 $\pm$ 0.02	9.47	7.59 $\pm$ 0.61
Kopwydte	4.13 $\pm$ 0.02	5.96	4.81 $\pm$ 0.49
Middelstuklengte	7.63 $\pm$ 0.02	-	10.39 $\pm$ 0.7
Spermlengte	46.15 $\pm$ 0.2	-	59.23

Alhoewel verskillende metodes vir die bepaling van spermmates gebruik is, kan 'n rede vir die verskille nie aangebied word nie. Vir hierdie studie is die bepaling van spermmates met

behulp van die beeld-analise sisteem van SEM gedoen. Die mates ten opsigte van koplengte, kopwydte, middelstuklengte, middelstukdikte, hoofstukdikte en endstuklengte is met die skale van TEM-mikrograwe bevestig. TEM-lengtesneë van 'n volledige flagellum kom selde of ooit voor en daarom is die bepaling van spermmites geriefliker en vinniger met behulp van SEM se beeld-analise sisteem.

Van der Horst *et al.* (1991) het gevind dat Nomarski differensiële interferensie mikroskopie, ten opsigte van spermmites, betekenisvol groter waardes as SEM lewer. Dit word toegeskryf aan die krimpings effek van kritiese-punt-droging tydens die voorbereiding van sperme vir SEM. Volgens Boyde en Wood (1969) kan die krimpings soveel as 20% wees. Van der Horst *et al.* (1991) meld egter dat meer akkurate metings met SEM gedoen kan word, omdat die resolusie beter as met ligmikroskopie is.

Die aanhangsels van die sitoplasmiese druppel, wat met SEM en TEM redelik gereeld in die omgewing van die spermnek by buffels (Ackerman *et al.*, 1994) en by rooibokke in hierdie studie waargeneem is, se funksionele rol is onduidelik.

'n **TEM-studie** van normale sperme het die SEM-waarnemings bevestig en meer lig op die ultrastruktuur van rooiboksperme gewerp. Die waarde van 'n ultrastrukturele studie van sperme vir 'n evaluasie van hulle bevrugtingsvermoë wen baie veld (Zamboni, 1992). Veral fertilitetsklinieke maak tans al hoe meer van TEM vir spermevaluasies gebruik indien 'n roetine ondersoek met behulp van 'n ligmikroskoop nie voldoende is nie. Dit maak sin omdat daar min dissiplines bestaan waarin elektronmikroskopie 'n belangriker diagnostiese rol speel as in die bepaling van die kwaliteit en funksionele gereedheid van 'n bevolking spermatozoa vir die reprodktiewe proses. Bevrugting berus uitsluitlik op die suksesvolle interaksie van

'n normale ovum en 'n spermsel sonder enige ultrastrukturele abnormaliteite wat die bevrugtingsvermoë daarvan negatief kan beïnvloed. 'n Volledige ultrastrukturele studie van sperme kan alleenlik met behulp van TEM gedoen word (Zamboni, 1991,1992). Zamboni (1991) verklaar dat met inagneming van die diagnostiese en prognostiese belangrikheid van TEM-spermevaluasies, enige weerstand om semen (indien dit nodig is) vir so'n ondersoek voor te lê, nie langer geregverdig kan word nie.

In die lig van bogenoemde moet die belangrike rol wat ligmikroskopie in die bestudering van sperm morfologie speel, nie gering geag word nie. Die informasie wat byvoorbeeld deur middel van gevorderde ligmikroskopiese tegnieke op 'n vinnige, bekostbare wyse veral in fertilitetsklinieke ingewin word, is van groot belang in roetine andrologiese ondersoeke (Menkveld, 1991).

Soos hierdie studie ultrastrukturele ooreenkomste tussen die sperme van die ander soogdiere en sperme van die rooibok bevestig het, is die meeste abnormaliteite van sperme van die mens en ander soogdiere ook by rooiboksperme waargeneem. Die meganismes waarvolgens hierdie abnormaliteite by rooibokke gevorm word, is waarskynlik dieselfde as wat deur Bartoov *et al.* (1980) en Holstein *et al.* (1988) vir sommige spermabnormaliteite by die mens beskryf is. Die aanduidings is dat dieselfde spermabnormaliteit by verskillende soogdierspesies waarskynlik ook dieselfde negatiewe invloed op die spermsel se vermoë om die ovum te bevrug, sal uitoefen (Coubrough en Soley, 1977; Holstein *et al.*, 1988; Oettle en Soley, 1988). Dagdefekte, geknakte flagella, abnormale kondensasie van kernmateriaal, abnormale akrosome, bizarre spermkoppe en afwykings van organelle van die spermnek dien as voorbeelde van abnormaliteite om bogenoemde stelling te illustreer.

Waar die kwantitatiewe analise van die SEM-studie getoon het dat daar geen verband tussen die lewerkonsentrasie en die bestudeerde spermabnormaliteite bestaan het nie, het 'n vergelyking van die data van die eksperiment en die kontrole van die TEM-studie getoon dat daar 'n statisties betekenisvolle verband tussen die koperkonsentrasie in die lewer en die persentasie spermnekke met vakuoles bestaan ( $P = 0.0003$ ).

Hierdie resultaat is bevestig deur die resultaat van die grafiese analise van die eksperiment, wat getoon het dat 'n betekenisvolle korrelasie tussen bogenoemde twee veranderlikes bestaan (Fig. 5.16).

Indien al die data van spermnekke met vakuoles van die kontrole en die eksperiment gepeel word, in groepe verdeel en die gemiddelde persentasies van die groepe vergelyk word met die lewerkonsentrasies, dui die resultaat ook op 'n korrelasie tussen dié abnormaliteit se voorkoms in die spermnek en die koperkonsentrasie in die lewer (0 - 49 dpm Cu in lewer - 27.5% spermnekke met vakuoles; 50 - 99 dpm Cu in lewer - 55.6% spermnekke met vakuoles; 100 en meer dpm Cu in lewer - 76.5% spermnekke met vakuoles).

'n Evaluasie van al die bogenoemde resultate toon dat die ultrastrukturele kwaliteit van rooibokspermnekke as 'n indikator van lewerkoperwaardes, wat in hierdie studie deur 'n verhoogde koperinhoud in die voedsel van die rooibokke veroorsaak is, kan dien. Tydens die studie is ook gevind dat die beskadiging van die ultrastruktuur van die spermnekke van dié diere toenemend waargeneem word voordat akute toksisiteit gediagnoseer kan word. Derhalwe blyk dit dat behalwe sperme se moontlike aanwending in die toetsing van toksisiteit, dit moontlik ook as 'n bio-evalueringsmeganisme op die subanimale vlak gebruik kan word om omgewingskwaliteit te bepaal of om die rol wat negatiewe omgewingsfaktore op die



reproduksieproses speel te evalueer (Reinecke *et al.*, 1995). Verdere studies ten opsigte van die invloed van toksiese omgewingsfaktore op die ultrastruktuur van geskikte terrestriële en akwatiese diere se sperme, word benodig om bogenoemde stelling moontlik te bevestig.

Gummow *et al.* (1991) het in sy studie-area X, suidoos van 'n kopersmeltery naby Phalaborwahek in die Krugerwildtuin, gevind dat die gemiddelde koperwaarde in die lewer van rooibokke 226.67 dpm (NB) was, dié diere se lewers die hoogste koperwaardes getoon het en dat die weiding van die gebied waarskynlik deur lugstrome met koper besoedel is. Tydens sy opnames het beamptes van die Palaborwa Mining Company (Geregistreerde naam) 'n nuwe elektrostatiese presipitator, met 'n verhoogde metallurgiese verrigting, geïnstalleer. Die gemiddelde koperwaardes in die lewer van 42 diere, wat gedurende 1992/1993 in dieselfde gebied versamel is en vir hierdie studie gebruik is, was 123.3 dpm (NB) Cu in die lewer. Dit is ongeveer 45.6% minder as die koperwaarde wat Gummow *et al.* (1991) bepaal het. Dit dui daarop dat die suiweringsaksie van die nuwe presipitators van die Palaborwa Mining Company moontlik verantwoordelik kon wees vir die verlaagde gemiddelde koperwaarde in rooiboklewers in die omgewing suid van Phalaborwahek in die Krugerwildtuin.

Bogenoemde koperwaardes in die lewer is egter nog baie hoog indien dit met Gummow *et al.* (1991) se gemiddelde lewerkoperwaardes van rooibokke in die omgewing van Skukuza (25.8 dpm NB) vergelyk word. Hierdie studie toon ook dat rooibokke met lewerkoperwaardes van > 99 dpm (NB) vakuoles in 76.5% van hulle spermnekke vertoon. Zamboni (1991, 1992) wys daarop dat die patologie van nekorganelle die effektiwiteit van spermotiliteit verminder, aangesien dit veroorsaak dat die spermkop nie in staat is om op 'n wyse wat ooreenstem met die slag van die flagellum te beweeg nie. Dit benadeel dus die

kanse van 'n sperm om die ovum te bevrug. Figure 4.72, 4.73, 4.74, 4.75 en 4.76 toon hoe vakuoles tussen die gesegmenteerde kolomme, die verbindingstukke en die proksimale sentriool van rooiboksperme in die Phalaborwa-omgewing voorgekom het.

Video-opnames wat tydens hierdie studie van die lewende sperme gemaak is, dui op 'n moontlike verband tussen swak motiliteit en 'n hoë persentasie spermnekke met vakuoles wat die stelling van Zamboni (1991, 1992) ten opsigte van nekabnormaliteite moontlik kan bevestig. Die video-opnames is egter nie onder gekontroleerde toestande gedoen nie en veral wisselende temperatuur het 'n groot invloed op die motiliteit en die gehalte van die sperme se beweging uitgeoefen.

Alles inaggenome is dit dus raadsaam dat die bestuur van die Palaborwa Mining Company se pogings om moontlike koperbesoedeling van die lug verder te bekamp, voortgesit sal word.

Hierdie studie het dit moontlik gemaak om die normale en abnormale morfologie en ultrastruktuur van rooiboksperme vir die studiegebied in die Krugerwildtuin te dokumenteer. Daar is aangetoon dat 'n betekenisvolle korrelasie tussen die lewerkoperkonsentrasies en die gemiddelde persentasies spermnekke met vakuoles van dié rooibokke bestaan. Die moontlikheid dat toekomstige navorsing betekenisvolle korrelasies tussen die koperkonsentrasie in die lewer en ander spermabnormaliteite kan bewys, is nie uitgesluit nie. 'n Studie van die invloed van toksiese hoeveelhede ander substansie op terrestriële en akwatiese diersperme sal moontlik in die toekoms aan navorsers 'n geleentheid bied om 'n positiewe en praktiese bydrae tot die toksikologiese, biologiese en ekologiese dissiplines te lewer.

-----oOo-----

## Literatuurverwysings

Ackerman, D.J., Reinecke, A.J. & Els, H.J., 1994. The ultrastructure of spermatozoa of African buffalo (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park. *Anim. Reprod. Sci.*, 36:87-101.

Ayiannidis, A., Argiroudis, S., Spais, A.G., Voulgaropoulos, A., 1991. Some aspects of chronic copper poisoning in sheep. *Journal of trace elements and electrolytes in health and disease*, 5:47-51.

Ahsan, R.K., Farooq, A., Kapur, M.M. & Laumas, K.R., 1976. Effect of intravasal copper on the fertility of rats. *J. Reprod. Fertil.*, 48:271-278.

Baccetti, B., Burrini, A.G., Maver, A., Pallini, V. & Reneiri, T., 1979. "9+0" Immotile spermatozoa in an infertile man. *Andrologia* 11, 6:437-443.

Baccetti, B., Selmi, M.G. & Soldani, P., 1984. Morphogenesis of "decapitated" spermatozoa in a man. *J. Reprod. Fertil.*, 70:395-397.

Baccetti, B., Burrini, A.G., Capitani, S., Collodel, G., Moretti, E., Piomboni, P. & Renieri, T., 1993. Notulae seminologicae. 1. New combinations of Kartagener's syndrome. *Andrologia*, 25:325-329.

Barth, A.D. & Oko, R.J., 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press, Ames, 285 pp.

Barthèlèmy, C., Tharanne, M.J., Lebos, C., Lecomte, P. & Lansac, J., 1990. Tail stump Spermatozoa: morphogenesis of the defect. An ultrastructural study of sperm and testicular biopsy. *Andrologia* 22:417-425.

Barthèlèmy C., Fricot, G., Hamamah, S., Lebos, C., Lansac, J. & Tharanne, M.J., 1992. Ultrastructural comparison of human spermatozoa along a Percoll density gradient. *Int. J. Fertil.*, 37(6):362-367.

Bartoov, B., Eltes, F., Weissenberg, R. & Lunenveld, B., 1980. Morphological characterisation of abnormal human spermatozoa using transmission electron microscopy. *Arch. Androl.*, 5:305-322.

Bertschinger, H.J., 1975. The hereditary occurrence of diploid spermatozoa in the semen of brown Swiss bulls. Theses, University of Zurich, 47 pp.

Bires, J., Kovac, G. & Vrzgula, L., 1991. Mineral profile of serum in experimental copper intoxication of sheep from industrial emissions. *Vet. Hum. Toxicol.*, 33:431-435.

Blom, E., 1963. The galea capitis and apical body in bull sperm and the fertilization process. *Int. J. Fertil.*, 8:447-452.

Blom, E. & Birch-Andersen, A., 1960. The ultrastructure of the bull sperm I. the middle piece. *Nord. Vet.-Med.*, 12:261-279.

Blom, E. & Birch-Andersen, A., 1961. An "Apical Body" in the galea capitis of the normal bull sperm. *Nature*, 190:1127-1128.

Blom, E. & Birch-Andersen, A., 1965. The ultrastructure of the bull sperm II. the sperm head. *Nord. Vet.-Med.*, 17:193-212.

Blom, E. & Birch-Andersen, A., 1970. Ultrastructure of the "decapitated sperm defect" in Guernsey bulls. *J. Reprod. Fertil.*, 23:67-72.

Bonet, S., 1990. Immature and aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. *Anim. Reprod. Sci.*, 22:67-80.

Bonet, S., Britz, M. & Fradera, A., 1993. Ultrastructural abnormalities of boar spermatozoa. *Theriogenology*, 40:383-396.

Booth, N.H. & McDonald, L.E., 1982. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. Fifth ed. Iowa State University Press, Ames, U.S.A., 948-952 pp.

Boyazoglu, P.A., Barrett, E.L., Young, E. & Ebedes, H., 1972. Liver mineral analysis as an indicator of nutritional adequacy. Proceedings of the second World Congress of Animal Feeding. Madrid, Spain, 995-1008 pp.

Boyde, A. & Wood, C., (1969). Preparation of animal tissues for surface scanning electron microscopy. *J. Microsc.*, 90:221.

Brown, A.C. & Fourie, H.O., 1987. Pesticidal poisoning in the Republic of South Africa. *Community Health S. Afr.*, 3:8-10.

Brooks, P.M., Hanks, J. & Ludbrook, J.V., 1977. Bone marrow as an index of condition in African ungulates. *S. Afr. J. Wildl., Res.*, 7(2): 61-66.

Camakaris, J., 1987. Copper transport absorption and storage in animals and man. In: J. McC. Howell, & J.M. Gawthorne (Editors), *Copper in animals and man. Volume 1.* CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 63-77 pp.

Chemes, H.E., Carrere, C., Brugo, S., Lavieri, J.C. & Zanchetti, F., 1987. Dysplasia of the fibrous sheath: an ultrastructural defect of human spermatozoa associated with sperm immotility and primary sterility., *Fertil. Steril.*, 48:664-669.

Coetzee, W.J.C., Bornman, M.S., Du Plessis, D.J. & Van der Merwe, C.F., 1985. Deurstraal-elektronmikroskopie as hulpmiddel in die hantering van die infertiele man. *S. Afr. Med. J.*, 68:25-29.

Conradie, E., Selby, P.J., Coetzee, K. & Menkveld, R., 1988. The comparison of techniques for the preparation of spermatozoa for scanning electron microscopy. *Med. Tech. S. Afr.*, 2(2):152-154.0

Coubrough, R.I. & Barker, C.A.V., 1964. Spermatozoa: An unusual middlepiece abnormality associated with sterility in bulls. V. Congresso internazionale per la riproduzione animale e la fecondazione artificiale, 4:27.

Coubrough, R.I. & Soley, J.T., 1977. An acrosome defect in a subfertile bull. Proc. E. M. Soc. S. Afr., 7:117-118.

Coubrough, R.I. & Soley, J.T., 1981. The "Dag defect" in mammalian spermatozoa. Proc. E.M. Soc. S. Afr., 12:75-76.

Cousins, R.J., 1985. Absorbtion, transport and hepatic metabolism of copper and zink: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. Physiol. Rev., 65: 238-309.

Cummins, J.M. & Woodall, P.F., 1985. On mammalian sperm dimensions. J. Reprod. Fertil., 75:153-175.

Dadoune, J.J., 1988. Ultrastructural abnormalities of human spermatozoa. Hum. Reprod., 3(3):311-318.

Dadoune, J.J. & Fain-Maurel, M.A., 1977. A routine technique for processing human ejaculate spermatozoa for scanning electron microscopy with special reference to their abnormal forms. Biol. Cell., 29:215-218.

De Yi Lui & Baker, H.W.G., 1992. Tests of human sperm function and fertilization *in vitro*. *Fertil. Steril.*, 58(3):465-483.

Dott, H.M. & Skinner, J.D., 1989. Collection, examination and storage of spermatozoa from some South African mammals. *S. Afr. J. Zool.*, 24(2):151-160.

Dulbecco, R. & Vogt, M., 1954. One-step growth curve of western equine encephalomyelitis virus on chicken embryo cells grown *in vitro* and analysis of virus yields from single cells. *J. Exp. Med.*, 99:183-199.

Dunham, K.M. & Murray, M.G., 1982. The fat reserves of impala, *Aepyceros melampus*. *Afr. J. Ecol.*, 20(2):81-87.

Earle, W.R., 1943. Production of malignancy *in vitro*. iv. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, 4:165-169.

Escalier, D. & David, G., 1984. Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum: Axonemal and peri-axonemal anomalies. *Biol. Cell.*, 50:37-52.

Fairall, N., 1971. Die geslagsfisiologie van die rooibok. (*Aepyceros melampus* Licht.) D.Sc (Agric) verhandeling, Fakulteit Landbouwetenskappe, Universiteit van Pretoria, Pretoria. 103 pp.



Fawcett, D.W., 1965. The anatomy of the mammalia, spermatozoon with particular reference to the guinea pig. *Z. Zellforsch.*, 67:279-296.

Fawcett, D.W., 1970. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol. Reprod. (Suppl.)*, 2:90-127.

Fawcett, D.W., 1975. The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.*, 44:394-436.

Fawcett, D.W. & Phillips., D.H., 1964. The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. *Anat. Rec.*, 165:153-184.

Fawcett, D.W. & Phillips, D.H., 1969. Observations on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage through the epididymis. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 6:405-418.

Fléchon, J.E., Kraemer, D.C. & Hafez, E.S.E., 1976. Scanning electron microscopy of baboon spermatozoa. *Folia. Primatol.*, 26:24-35.

Frieden, E., 1980. Caeruloplasmin: a multi-functional metalloprotein of vertebrate plasma. In: *Biological roles of copper*. Elsevier, 93-124 pp.

Fujita, T., Miyoshi, M. & Tokunaga, J., 1970. Scanning and transmission electron microscopy of human ejaculate spermatozoa with special reference to their abnormal forms. *Z. Zellforsch.*, 105:483-497.

Gamcik, P., Bíres, J., Vrzgula, L. & Mesáros, P., 1990. Effect of experimental intoxication with copper from industrial emission on reproductive ability in rams. *Reprod. Dom. Anim.*, 25:235-241.

Gertenbach, W.P.D., 1983. Landscapes of the Kruger National Park. *Koedoe*, 26:9-121.

Gilmore, D.P., Hooker, R.H. & Davis, B.K., 1973. The effect of copper implants in the seminal vesicles on fertility of the rat, rabbit and hamster. *Fertil. Steril.*, 24:60-69.

Gummow, B., Botha, C.J., Basson, A.T. & Bastianello, S.S., 1991. Copper toxicity in ruminants: Air pollution as a possible cause. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 58:33-39.

Hafez, E.S.E. & Kanagawa, H., 1973. Scanning electron microscopy of human, monkey and rabbit spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 24:776-787.

Haidl, G., 1993. Outer dense fibres: functional or structural elements? *Andrologia*, 25:13-17.

Hattingh, J., Pitts, N.I. & Ganhao, M.F., 1988. Immediate response to repeated capture and handling of wild impala. *J. Exp. Zool.*, 248:109-112.

Hattingh, J., Pitts, N. I., Ganhao, M.F. & Charleston, A., 1990. Physiological response to manual restraint of wild impala. *J. Exp. Zool.*, 153:47-50.

- Hayat, M.A., 1981. Fixation for electron microscopy. Academic Press, London, 501 pp.
- Heath, E. & Gupta, R., 1976. Ultrastructure of water buffalo (*Bos bubalis*) spermatozoa. Zbl. Vet. Med. A, 23:106-120.
- Hoadley, L., 1923. Certain effects of the salts of heavy metals on the fertilization reaction in *Arbacia punctulata*. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole, 44:255-280.
- Holland, M.K. & White, I.G., 1982. Heavy Metals and human spermatozoa:II. The effect of seminal plasma on the toxicity of copper metal for spermatozoa. Int. J. Fertil., 27(2):95-99.
- Holstein A.F., 1975. Morphologische Studien an abnormen Spermatiden und Spermatozoen des Menschen. Virch. Arch. A. Path. Anat. Histol., 367:93-112.
- Holstein, A.F. & Roosen-Runge, E.C., 1981. Atlas of human spermatogenesis. Grosse, Berlin, 224 pp.
- Holstein, A.F., Roosen-Runge, E.C. & Schirren, C., 1988. Illustrated pathology of human spermatogenesis. Grosse, Berlin, 278 pp.
- Holstein, A.F., Schill, W.B. & Breuker, H., 1986. Dissociated centriole development as a cause of spermatid malformation in man. J. Reprod. Fertil., 78:719-725.

Howell, J. McC. & Gooneratne, R.S., 1987. The pathology of copper toxicity in animals. In: J. McC. Howell, & J.M. Gawthorne (Editors). Copper in animals and man. Volume 2. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 53-78 pp.

Joubert, S.C.J., 1986. The Kruger National Park - an introduction. *Koedoe*, 29:1-11.

Kesseru, E. & Léon, F., 1974. Effect of different metals and metallic pairs on human sperm motility, *Int. J. Fertil.*, 19:81-87.

Kojima, Y., 1981. Intracellular vacuoles or vesicles and invagination in boar spermatozoa. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 43:37-41.

Kruger, T.F., Menkveld, R., Stander, F.S.H., Lombard, C.J., Van der Merwe, J.P., Van Zyl, J.A. & Smith, K., 1986. Sperm morphology features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 46:1118-1123.

Lacy, D., Pettit, A.J., Pettit, J.M. & Martin, B.S., 1974. Application of scanning electron microscopy to semen analysis of the sub-fertile man utilizing data obtained by transmission electron microscopy as an aid to interpretation. *Micron.*, 5:135-173.

Liakatas, M.D., Williams, A.E. & Hargreave, T.B., 1982. Scoring sperm morphology using the scanning electron microscope. *Fertil. Steril.*, 38(2):227-231.

Linder, M.C. & Munro, H.N., 1973. Iron and copper metabolism during development. *Enzymes*, 15:111-138.

Lillie, F.R., 1921. Studies of fertilization. 10. The effects of copper salts on the fertilization reaction in *Arbacia* and a comparison of mercury effects. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole*, 41:125-143.

Luckey, T.D. & Venugopal, B., 1977. Metal toxicity in mammals. 1. Physiologic and chemical basis for metal toxicity. Plenum Press. New York & London, 238 pp.

Mahadevan, M.H. & Trounson, A.O., 1984. Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. *Fertil. Steril.*, 41(2):287-293.

Mann, T. & Lutwak-Mann, C., 1981. Male reproductive function and semen. Springer, Berlin, 495 pp.

Maynard, P.V., Elstein, M., Chandler, J.A., 1975. The effect of copper on the distribution of elements in human spermatozoa, *J. Prod. Fertil.*, 43:41-47.

Menkveld, R., Stander, F.S.H., Kotze, T.J.v W., Kruger, T.F. & Van Zyl, J.A., 1990. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria, *Hum. Reprod.*, 5:586-592.

Menkveld, R., Swanson, R.J., Oettlé, E.E., Anibal, A.A., Kruger, T.F., Oehninger, S., 1991. Atlas of human sperm morphology. Williams & Wilkens, Baltimore, MD, 121 pp.

Millonig, G., 1961. Advantages of a phosphate buffer for OsO<sub>4</sub> solutions in fixation. *J. appl. Phys.*, 32:1637-1643.

Morgenthal, J.C., 1967. Notes on the spermatozoal morphology of some ungulates. *J. S. Afr. Vet. Med. Ass.*, 38(3):271-273.

Murphy, J.A., 1982. Considerations, materials, and procedures for specimen mounting prior to scanning electron microscopic examination. In: SEM Inc., AMF O'Hare, Chicago, 657-696 pp.

Nicander, L. & Bane, A., 1966. Fine structure of the sperm head in some mammals with particular reference to the acrosome and the subacrosomal substance. *Z. Zellforsch.*, 72:496-515.

Oettle, E.E. & Soley, J.T., 1988. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopy study. *Vet. Med. Rev.*, 59:28-70.

Olsen, G.E. & Winfrey, V.P., 1991. A comparison of mammalian sperm membranes. In: B.S. Dunbar & M.G. O'Rand (Editors), A comparative overview of mammalian fertilization, 3. Plenum Press, New York, 51-62 pp.

Oster, G., & Salgo, M.P., 1977. Copper in mammalian reproduction. *Adv. Pharmacol. Chemother.*, 14:327-409.

Osweiler, G.D., Carsen, T.L., Buck, W.B. & Van Gelder, G.A., 1985. *Clinical and diagnostic veterinary toxicology*. Kendall/ Hunt Publishing Company, Iowa, U.S.A., 494 pp.

Perotti, M.L., Giarola, A. & Gioria., 1981. Ultrastructural study of the decapitated sperm defect in an infertile man. *J. Reprod. Fertil.*, 63:543-549.

Phillips, D.M. & Kalay, D., 1984. Mechanisms of flagellar motility deduced from backward-swimming bull sperm. *J. Exp. Zool.*, 231:109-116.

Poole, D.B.R., 1993. Trace element deficiencies in cattle. *Vet. Surg.*, 15:17-20.

Reinecke, A.J., 1992. A review of ecotoxicological test methods using earthworms. In: P.W. Greig-Smith, H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (Editors), *Ecotoxicology of earthworms*. Intercept, U.K., 7-19 pp.

Reinecke, S.A., Reinecke, A.J. & Froneman, M.L., 1995. The effects of dieldrin on the sperm ultrastructure of the earthworm *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.*, 14(6):961-965.

Roldan, E.R.S., Gomendio, M. & Vitullo, A.D., 1992. The evolution of Eutherian spermatozoa and underlying selective forces: Female selection and sperm competition. *Biol. Rev.*, 67:551-593.

Ross, A., Christie, S. & Edmond, P., 1973. Ultrastructural tail defects in the spermatozoa from two men attending a subfertility clinic. *J. Reprod. Fertil.*, 32:243-251.

Ryder, T.A., Mobberley, M.A., Hughes, L. & Hendry, W.F., 1990. A survey of the ultrastructural defects associated with absent or impaired human sperm motility. *Fertil. Steril.*, 53:556-560.

Ryke, P.A.J., 1982. *Dierkunde, 'n Funkzionele benadering*. Butterworth, Durban/Pretoria, 811 pp.

Saacke, R.G., & Almquist, J.O., 1964a. Ultrastructure of bovine spermatozoa I. The head of normal ejaculated sperm. *Am. J. Anat.*, 115:143-162.

Saacke, R. G., & Almquist, J.O., 1964b. The neck and tale of normal ejaculated sperm II. *Am. J. Anat.*, 115:163-184.

Schill, W., 1991. Some disturbances of acrosomal development and function in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 6(7): 969-978.



Segretain, D. & Roussel, C. 1988. Endocytic origin for periaxonemal vesicles along the flagellum during mouse spermiogenesis. *Gamete Res.*, 21(4):451-463.

Skandhan, K.P., 1992. Review on copper in male reproduction and contraception, *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.*, 87:594-598.

Skinner, J.D., 1971. The Sexual cycle of the impala ram *Aepyceros melampus* Lichtenstein. *Zool. Afr.* 6:75-84.

Skinner, J.D. & Smithers, R.H.N., 1990. The mammals of the Southern African subregion. University of Pretoria, Pretoria, RSA, 771 pp.

Soley, J.T., 1992. A histological study of spermatogenesis in the ostrich (*Struthio camelus*). Ph.D thesis, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria, 187 pp.

Soley, J.T., Tiedt, L.R., Hamilton-Attwell, V.L. & Connoway, L., 1985. Ultrastructural features of abnormal spermatozoa from an infertile bull. *Proc. E. M. Soc. S. Afr.*, 15:177-178.

Suttle, N.F., 1974. Effects of organic and inorganic sulphur on the availability of dietary copper to sheep. *Br. J. Nutr.*, 32:559-568.

Suttle, N.F., 1975. Changes in the availability of dietary copper to young lambs associated with age and weaning. *J. Agric. Sci. Camb.*, 84:255-261.

Suttle, N.F., 1977. Reducing the potential copper toxicity of concentrates to sheep by the use of molybdenum and sulphur supplements. *Anim. Feed. Sci. Tech.*, 2:235-246.

Suttle, N.F., 1978. The accumulation of copper in the liver of lambs on diets containing dried poultry waste. *Anim. Prod.*, 26:39-45.

Suttle, N.F., 1986. Copper deficiency in ruminants; recent developments. *Vet. Rec.*, 119:519-522.

Suttle, N.F., 1988. The role of comparative pathology in the study of copper and cobalt deficiencies in ruminants. *J. Comp. Path.* 99:241-258.

Suttle, N.F. & Field, A.C., 1983. Effects of dietary supplements of thiomolybdates on copper and molybdenum in sheep. *J. Comp. Path.*, 93:379-389.

Theil, E.C. & Calvert, K.T., 1978. The effect of copper excess on iron metabolism in sheep. *Biochem. J.*, 170:137-143.

Thilander, G., Settergren, I. & Plöen, L., 1985. Abnormalities of testicular origin in the neck region of bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 8:151-157.

Tingari, M.D., 1991. Studies on camel semen, III. Ultrastructure of the spermtozoon. *Anim. Reprod. Sci.*, 26:333-344.

Underwood, E.J., 1971. Trace elements in human and animal nutrition. Academic Press, New York, 416-424.

Uzu, G., Courtens, J.L. & Courot, M., 1976. Quantitative analysis of ultrastructural abnormalities of spermatozoa from bulls of different fertility. In: Proc, 8th Int. Congr. Anim. Reprod., Krakow, 4:748-751.

Van der Horst, G., Curry, P.T., Kitchin, R.M., Burgess, W., Thorne, E.T., Kwiatkowski, D., Parker, M. & Atherton, R.W., 1991. Quantitative light and scanning electron microscopy of ferrit sperm. Mol. Reprod. Dev., 30:232-240.

Van Niekerk, J.W., Pienaar, U. de V. & Fairall, N., 1963. Immobilizing drugs used in the capture of wild animals in the Kruger National Park. J. S. Afr. Vet. Med. Ass., 34:403-411.

Venugopal, B. & Luckey, T.D., 1978 Metal toxicity in mammals.2. chemical toxicity of metals and metalloids. Plenum Press. New York and London. 409 pp.

Vierula, M., Alanko, M., Anderson, M. & Vanha-perttula, T., 1987. Tail stump sperm defect in Ayrshire bulls: Mophogenesis of the defect. Andrologia, 19:207-216.

Wild, P., Bertschinger, H.J. & Zerobin, K., 1978. Raster und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von diploiden bovinen Spermien. Zuchthyg., 13:107-112.

Williams, G., 1987. "Tail-stump" defect affecting the spermatozoa of two Cherolais bulls. *Vet. Rec.*, 121:248-250.

Wynberg, R.P., Brown, A.C. & Hole, L., 1989. Inhibition of fertilization in the sea urchin *Parechinus angulosus* by organic pollutants: correlation with molecular valence connectivity indices, *S. Afr. J. Mar. Sci.*, 8:313-317.

Zamboni, M.D., 1987. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil. Steril.*, 48:711-734.

Zamboni, M.D., 1991. Physiology and pathophysiology of the human spermatozoon: The role of electron microscopy. *J. Electron Microsc. Tech.*, 17:412-436.

Zamboni, L., 1992. Sperm structure and its relevance to infertility. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 116:325-344.

Zipper, J., Medel, M. & Prager, R., 1969. Suppression of fertility by intrauterine copper and zink in rabbits: a new approach to intrauterine conception, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 105:529-534.

----- oOo -----