

## Morfologia plemników ropuchy szarej *Bufo bufo* (L.) i ropuchy zielonej — *Bufo viridis* (Laur.)

### WSTĘP

Plemniki płazów tak jak i innych kręgowców zbudowane są z główki, wstawki i wici. Terentiew (1950) stwierdza, że plemniki żaby zbudowane są z główki i wici (ogonka), mają różny kształt i budowę u różnych gatunków. Dokładniej poznano budowę plemników u płazów ogoniastych, głównie traszek (Juszczak 1967, 1974), oraz ich przeżywalność w różnych temperaturach (Zamachowski i Zamachowska 1971). Juszczak (1967, 1974) podaje dokładny opis plemników traszek (*Triturus*). W plemniku traszki oglądanym pod mikroskopem optycznym z łatwością wyróżnić można główkę i witekę. Dodatkowym tworem plemników płazów ogoniastych jest błonka falująca, ciągnąca się wzdłuż witki. Błonka ta w żywym plemniku znajduje się w ciągłym ruchu.

W literaturze nie spotkano dokładnego opisu plemników ropuch krajowych, a szczególnie danych dotyczących ich wielkości i morfologii. Brak również dokładnych metod dotyczących utrwalania i barwienia plemników płazów bezogonowych (*Anura*).

W związku z powyższym, celem niniejszej pracy było przedstawienie morfologii plemników ropuchy szarej — *Bufo bufo* (L.) i ropuchy zielonej — *Bufo viridis* Laur., oraz ustalenie metod utrwalania i barwienia plemników, które dawałyby zadowalające efekty.

### MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzone na plemnikach pobranych od 10 samców ropuchy szarej — *Bufo bufo* (L.) i 6 samców ropuchy zielonej — *Bufo viridis* Laur. złowionych w okresie godowym (kwiecień i maj 1972 r.) w stawach w okolicach Skawy i Wolbromia, leżących w pasie Wyżyny Krakowsko-Częstochowskiej oraz w stawach w okolicach Oświęcimia.

W celu pobrania plemników, zwierzęta zabijano przez zniszczenie centralnego systemu nerwowego. Po otwarciu powłok wypreparowywa-

no pęcherzyki nasienne i jądra. W czasie badań mikroskopowych w cieczy pobranej z pęcherzyków nasiennych i kloaki nie stwierdzono obecności plemników, mimo że były to samce godujące i posiadające wykształconą szatę godową. Do badań pobierano plemniki z jąder. Przygotowanie roztworu cieczy nasiennej z jąder polegało na zmiżdżeniu i wypłukaniu jąder w kropli wody. W celu stwierdzenia obecności plemników kroplę nasienia oglądano nad małym, a następnie średnim powiększeniem mikroskopowym. Oceniano również ruchliwość plemników. Stwierdzono, że plemniki poruszały się z różną szybkością, a liczba plemników nieruchomych była niewielka. Wskazuje na to fakt, że plemniki znajdowały się na różnym etapie dojrzałości. Roztwór cieczy nasiennej pochodzącej od każdego osobnika utrwalano w 4% formalinie.

Z tak przygotowanego i utrwalonego roztworu plemników wykonywano rozmazy na szkiełkach podstawowych, podsuszano i suchy rozmaz barwiono.

Wykonano 100 preparatów plemników ropuchy szarej i 60 preparatów plemników ropuchy zielonej. Ze względu na brak odpowiednich metod barwienia plemników płazów wykonano wiele prób barwienia i utrwalania plemników, w celu znalezienia najodpowiedniejszej metody. W dostępnej literaturze podawane są metody barwienia plemników ssaków (Bagiński 1951, Pawlikowski 1967), które w zastosowaniu do barwienia plemników płazów nie dają dobrych rezultatów.

Bardzo istotne znaczenie miał dobór właściwego utrwalacza, który by wyróżniał się szybką zdolnością przenikania, zachowując pierwotny wygląd morfologiczny plemników oraz nadawał im pewne właściwości umożliwiające selektywne barwienie.

Zastosowano szereg metod utrwalania i barwienia plemników. Poniżej przedstawiono niektóre z nich.

1. Rozmazy żywych plemników utrwalano alkoholem metylowym ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) przez 2 min., a następnie odczynnikiem Giemzy (10 kropli odczynnika Giemzy na 5 ml wody destylowanej) przez 20 min. Po spłukaniu preparatu wodą i wysuszeniu oglądano go pod mikroskopem. Otrzymano następujący wynik barwienia — główki plemników wybarwiły się na fioletowo, witki i błonka fałująca pozostawały niewybarwione (bezbarwne). Stwierdzono, porównując preparaty utrwalone alkoholem metylowym i preparaty nieutrwalone, ujemny wpływ utrwalacza na plemniki. Witki ich ulegały silnemu skręceniu, tak że nie można było na tych plemnikach wykonać żadnych pomiarów.

2. Barwienie roztworem tuszu czarnego. Wysuszone rozmazy plemników barwiono roztworem tuszu (stosując różne jego stężenia), następnie płukano w wodzie destylowanej i suszono na powietrzu. Po zasto-

sowaniu tej metody uzyskano następujący wynik: główki plemników wybarwiły się na kolor czarny, witki i błonka falująca pozostawały nie-wybarwione.

3. Rozmazy plemników utrwalano w 4% formalinie, a następnie barwiono hematoksyliną Delafielda. Stosowano różny czas barwienia, a mianowicie 5, 10, 20 i 30 min, po określonym czasie barwienia preparaty płukano w bieżącej wodzie. Wyniki barwienia: po 5 i 10 min barwienia główki plemników wybarwiały się na kolor fioletowy, witki i błonka falująca pozostawały bezbarwne. Po 20 i 30 min barwienia główki wybarwiały się na fioletowo, witki również na kolor fioletowy. Błonki falujące nie wybarwiły się i były niewidoczne.

4. Rozmazy plemników wykonywano z uprzednio utrwalonego roztworu w 4% formalinie i barwiono hematoksyliną Delafielda i eozyną. Barwiąc plemniki w hematoksylinie Delafielda stosowano różne czasy wybarwiania. Następnie płukano w wodzie destylowanej, stale kontrolując proces wypłukiwania pod mikroskopem. Dobrze wypłukane preparaty zanurzano w wodnym 0,25% roztworze eozyny na okres od 1 do 3 min, następnie płukano w wodzie destylowanej i suszono na powietrzu.

Najkorzystniejsze wyniki uzyskano przy barwieniu hematoksyliną Delafielda przez 10 min i eozyną przez 2 min. W tak wybarwionych preparatach główki plemników wybarwiały się na fioletowo, witki na czerwono, a błonki falujące na kolor różowy. Stosując wodny roztwór formaliny (roztwór 4%) jako utrwalacza, uzyskano niezmienny kształt plemników, a szczególnie witek. Nie stwierdzono szkodliwego wpływu na błonki falujące.

Wyżej podana metoda utrwalania i wybarwiania plemników była najkorzystniejsza. Dobór właściwego czasokresu barwienia zabezpieczał przed przebarwieniem lub niedobarwieniem, co w konsekwencji dawało obraz przejrzysty z wyraźnie zróżnicowanymi częściami plemnika. Bardzo istotne znaczenie miało płukanie preparatów. Odbывало się ono pod kontrolą mikroskopową, dzięki czemu można było przerwać proces wypłukiwania w momencie najstosowniejszego zabarwienia poszczególnych części plemnika. Również sposób utrwalania okazał się najprostszymi i jednocześnie najkorzystniejszym.

Przygotowane powyższą metodą preparaty plemników poddawano obserwacji mikroskopowej, a następnie mierzono długość poszczególnych części plemnika. Długość główek i wysokość błonki falującej plemników mierzono przy użyciu mikrometru okularowego. Ze względu na ułożenie witek na preparatach, ich długość mierzono metodą pośrednią. Przy użyciu aparatu rysunkowego wykonano rysunki witek plemników, które następnie mierzono i znając powiększenie przeliczano na wielkość rzeczywistą. W powyższy sposób wykonano pomiary 150 plemni-

ków ropuchy szarej i 150 plemników ropuchy zielonej. Dla każdej części plemnika wyznaczano średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe i współczynnik zmienności. Wykonano również szereg rysunków plemników przedstawiając zasadnicze typy ich budowy. Rysunki wykonano przy użyciu rysunkowego aparatu Abbego i mikroskopu.

Obserwacje plemników ropuch prowadzono przy użyciu mikroskopu świetlnego przy powiększeniu 600 razy. Przy tym powiększeniu widoczna jest wyraźnie główka oraz witka z błoną falującą.

#### WYNIKI BADAŃ

##### MORFOLOGIA PLEMNİKÓW ROPUCHY SZAREJ — *BUFO BUFO* (L.)

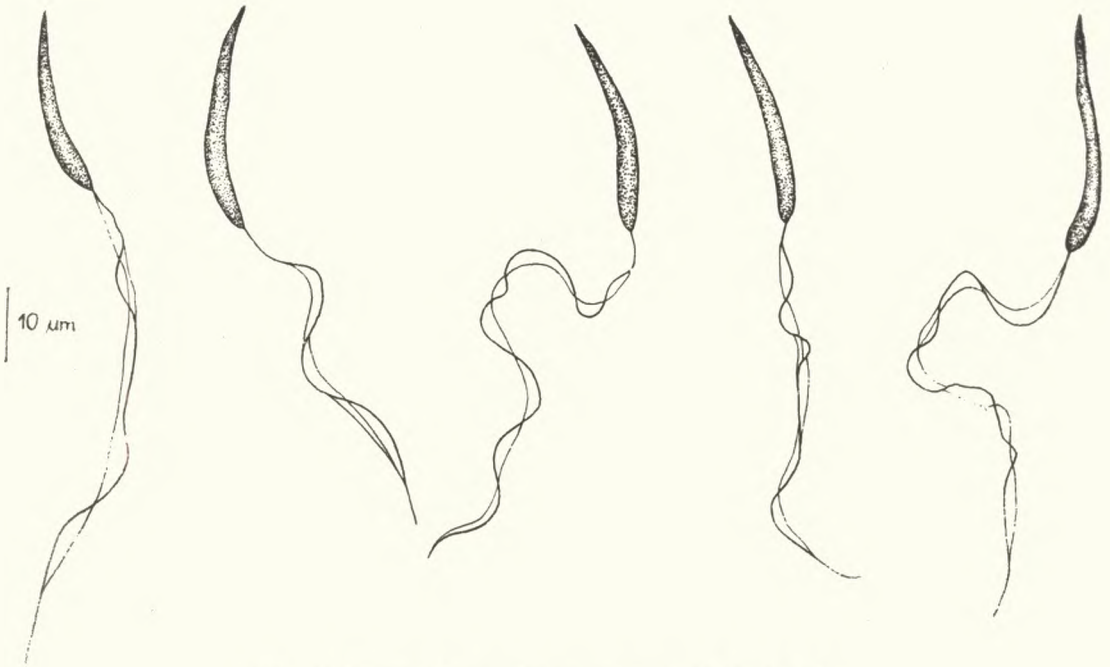
Plemniki ropuchy szarej charakteryzują się znacznym zróżnicowaniem, zarówno w wielkości jak i w kształcie oraz proporcjach poszczególnych części. Długość ich waha się od 65  $\mu\text{m}$  do 125  $\mu\text{m}$ . Średnia długość plemnika wynosi 84  $\mu\text{m}$   $\pm$  10,8, przy współczynniku zmienności 12,9%. Wśród przebadanych plemników około 40% miało wielkość poniżej średniej wartości. Około 10% plemników osiągało wielkość powyżej 100  $\mu\text{m}$ .

Wśród badanych plemników przeważają plemniki o główkach dużych, wydłużonych i ostro zakończonych (ryc. 1). Inny typ plemników charakteryzuje się główką mniejszą, na szczycie łukowato zagiętą i zaostrzoną. Średnia długość główki wynosi 25,5  $\mu\text{m}$   $\pm$  3,1, najmniejsza główka miała długość 14  $\mu\text{m}$ , a największa 32  $\mu\text{m}$ . Współczynnik zmienności dla główki plemnika wynosi 12,1%. Główka plemnika ropuchy szarej jest co najmniej 2 razy mniejsza od średniej długości witki.

Wielkość witek waha się od 48  $\mu\text{m}$  do 108  $\mu\text{m}$ , przy średniej długości 60  $\mu\text{m}$   $\pm$  11,8 i współczynniku zmienności 19,6%. Zmienność długości witki jest bardzo duża, co znacznie wpływa na wielkość plemników.

Na witce plemnika ropuchy szarej znajduje się błona falująca (ryc. 1). Błona falująca u ok. 70% przebadanych plemników zaczyna się tuż za główką i biegnie wzdłuż całej witki, łagodnie przechodząc ku końcowi witki. U ok. 15% plemników bierze początek w odległości ok. 14  $\mu\text{m}$  od główki i gwałtownie zanika przed końcem witki. U pozostałych plemników przebieg błonki falującej jest bardzo nieregularny. Maksymalna wysokość błonki falującej wynosi 2  $\mu\text{m}$ , minimalna 1  $\mu\text{m}$ , zaś średnia wysokość 1,6  $\mu\text{m}$   $\pm$  0,2. Współczynnik zmienności — 15,5%.

Pobieżna obserwacja plemników sugeruje istnienie kilku typów morfologicznych ich budowy, dokładniejsze badania pozwalają jednak na wyróżnienie dwóch zasadniczych typów plemników, mianowicie plemników o główkach dużych i ostro zakończonych oraz plemników o główkach mniejszych z wierzchołkiem łukowato zagiętym i ostro zakończonym (rys. 1).



Ryc. 1. Plemniki ropuchy szarej — *Bufo bufo* (L.)



Duża zmienność wielkości plemników wynika ze znacznej rozpiętości długości główek, a głównie witek.

#### MORFOLOGIA PLEMNIKÓW ROPUCHY ZIEŁONEJ — *BUFO VIRIDIS* LAUR.

Podobnie jak plemniki ropuchy szarej, również i plemniki ropuchy zielonej charakteryzują się dużą różnorodnością budowy. Niemniej jednak można wyróżnić dwa zasadnicze typy ich budowy. Jeden typ plemników charakteryzuje się główką silnie wydłużoną o ostrym lub łagodnie zakończonym wierzchołku. Drugi typ ma główkę większą o kształcie pałczkowatym i łagodnym zakończeniu (ryc. 2).

Wszystkie typy główek plemników ropuchy zielonej łączy wspólna cecha, a mianowicie szerokość główek jest znacznie mniejsza (ok. 10 razy) od ich długości. Podobnie jak kształt, również wielkość główek plemników jest różna. U tego samego samca obok plemników o małych główkach (długości 13  $\mu\text{m}$ ), znajdują się plemniki, których główki przekraczają długość 20  $\mu\text{m}$ . Długość najmniejszej główki badanych plemników wynosi 12  $\mu\text{m}$ , największej 24  $\mu\text{m}$ , przy średniej długości 19,5  $\mu\text{m} \pm 2,6$  i współczynniku zmienności 13,5%.

Długość witki poszczególnych plemników waha się w granicach od 26  $\mu\text{m}$  do 80  $\mu\text{m}$ . Średnia długość witki wynosi 46  $\mu\text{m} \pm 8,4$ , a współczynnik zmienności 18,2%.

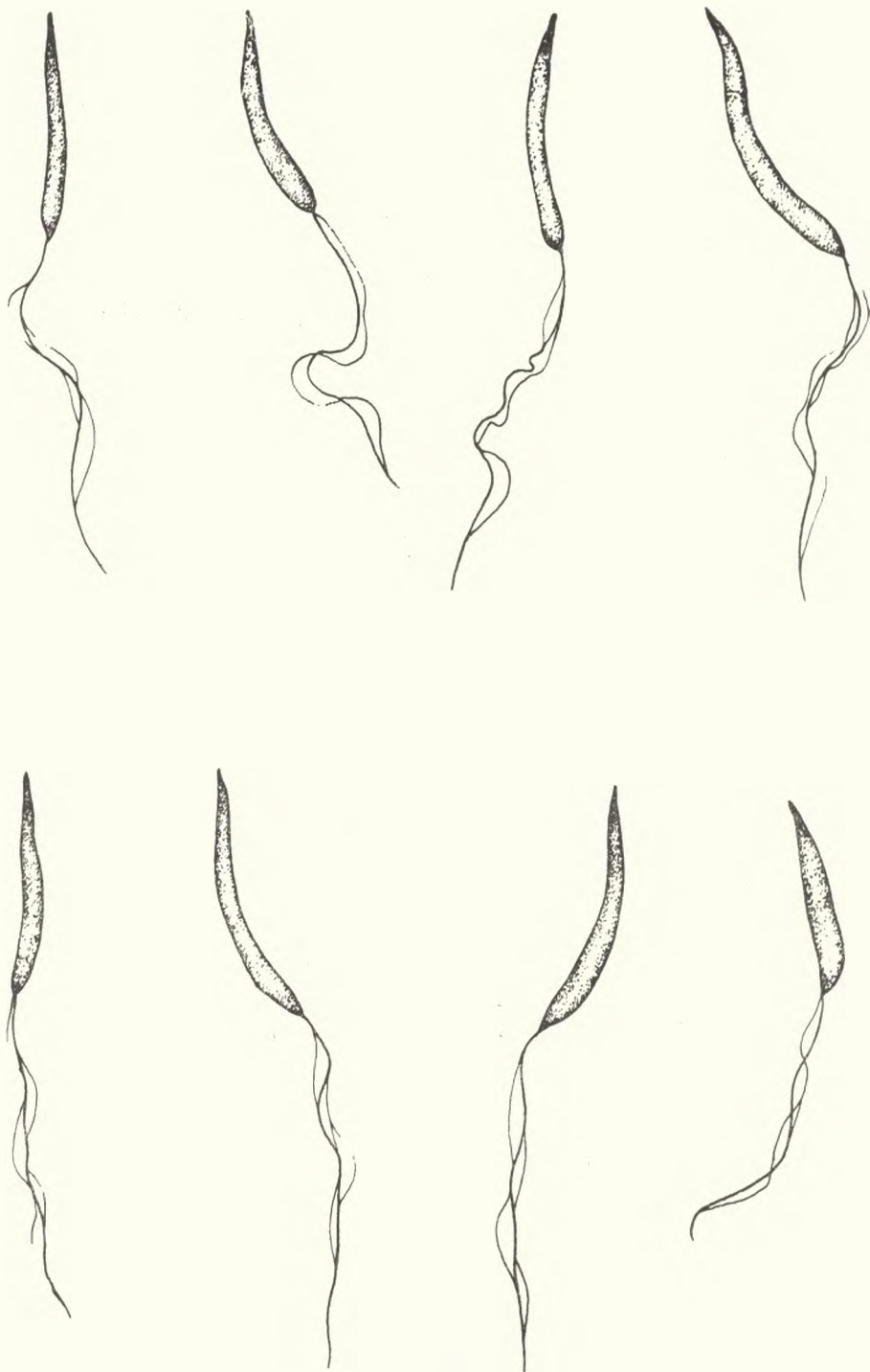
Na witce plemników występuje błonka falująca (ryc. 2). Około 40% plemników ma błonkę falującą wzdłuż całej witki, u pozostałych plemników zaczyna się ona w różnej odległości od główki, jednak nie większej od 1/3 długości witki. U niektórych plemników przebieg błonki falującej jest trudny do prześledzenia ze względu na jej ułożenie w różnych płaszczyznach. Błonka falująca ułożona w płaszczyźnie prostopadłej do obserwowanej powierzchni widoczna jest w postaci cienkiej linii. U takich plemników nie można zmierzyć jej wysokości.

Maksymalna wysokość błonki falującej wynosi 2  $\mu\text{m}$ , a minimalna 1  $\mu\text{m}$ , zaś średnia wynosi 1,4  $\mu\text{m} \pm 0,2$ . Współczynnik zmienności 14%.

Wśród badanych plemników ok. 40% stanowią plemniki duże o główkach pałczkowatych. Plemniki o główkach wydłużonych i ostro zakończonych charakteryzują się małymi wymiarami. Ogólnie można stwierdzić, że średniej długości główka plemnika jest ok. 2 razy mniejsza od długości witki.

#### DYSKUSJA

Jak wynika z przeprowadzonych badań, plemniki obu badanych gatunków ropuch różnią się szeregiem cech morfologicznych. Dotyczą one zarówno wyglądu główki plemnika, jak również wielkości poszczególnych jego części. Plemniki ropuchy zielonej — *Bufo viridis* Laur.

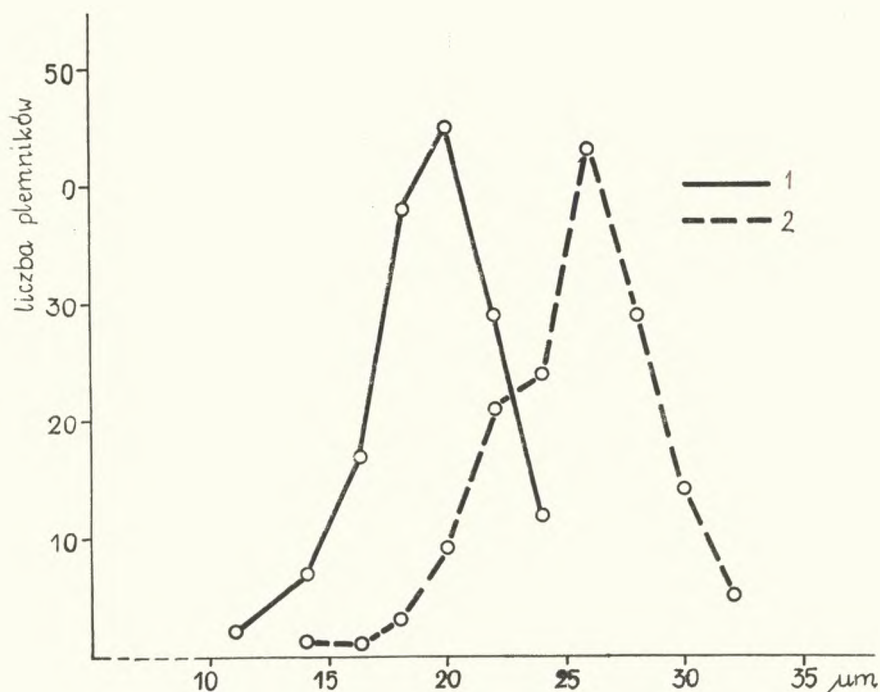


Ryc. 2. Plemniki ropuchy zielonej — *Bufo viridis* Laur.

mają główki wydłużone o ostrym lub łagodnym szczycie, bądź w kształcie pałeczek bądź kształtu wrzecionowatego. Wśród plemników ropuchy szarej — *Bufo bufo* (L.), przeważają plemniki o główkach dużych wydłużonych i ostro zakoczonych, inne mają główkę mniejszą, na szczycie łukowato zagiętą i zaostrzoną.

Charakterystyczną cechą plemników obu badanych gatunków jest występowanie u nich główek, których długość jest kilka razy większa od szerokości.

Średnia długość główek plemników ropuchy zielonej wynosi  $19,5 \mu\text{m} \pm 2,6$ . Główki plemników ropuchy szarej są większe niż ropuchy zielonej (ryc. 3).



Ryc. 3. Zmienność długości główki plemników ropuchy zielonej — *Bufo viridis* Laur. (1) i ropuchy szarej — *Bufo bufo* (L.) (2)

Średnia długość główek plemników ropuchy szarej wynosi  $25,5 \mu\text{m} \pm 3,1$ . Zakres zmienności długości główek plemników obu badanych gatunków jest podobny, o czym świadczy współczynnik zmienności (tabela 1).

Terentiew (1950) podaje wielkości główek plemników żaby wodnej — *Rana esculenta* (L.) i żaby trawnej — *Rana temporaria* (L.). Długość główek plemników żaby wodnej waha się w granicach od 15 do



Tabela 1

DLUGOŚĆ POSZCZEGÓLNYCH CZĘŚCI PLEMNIKÓW ROPUCHY SZAREJ — BUFO BUFO (L.) I ROPUCHY ZIEŁONEJ — BUFO VIRIDIS LAUR.  
(Przebadano po 150 plemników obu gatunków. Odchylenie standardowe — SD)

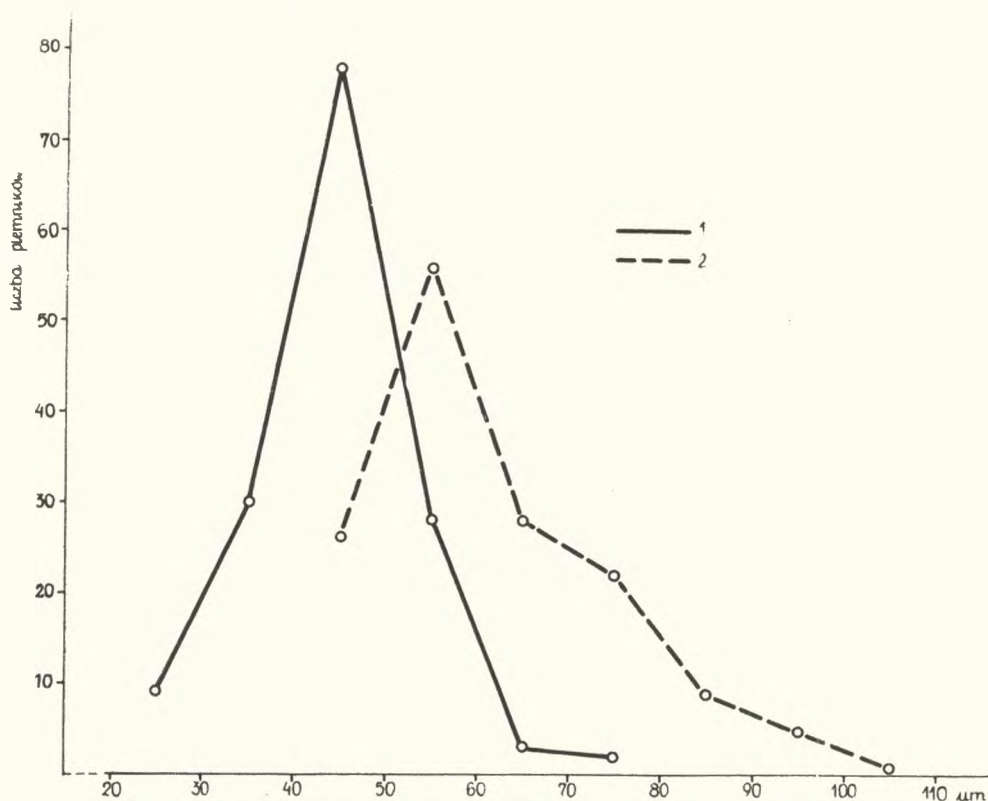
Część składowa plemnika	Ropucha szara — Bufo bufo (L.)				Ropucha zielona — Bufo viridis Laur.			
	długość w $\mu\text{m}$		średnia $\pm$ SD	współczynnik zmienności w %	długość w $\mu\text{m}$		średnia $\pm$ SD	współczynnik zmienności w %
	najmniejsza	największa			najmniejsza	największa		
Plemnik (długość całkowita)	65,0	125,0	84,0 $\pm$ 10,8	12,9	48,0	98,0	69,0 $\pm$ 12,4	18,0
Główka (długość)	14,0	32,0	25,5 $\pm$ 3,1	12,1	12,0	24,0	19,5 $\pm$ 2,6	13,5
Witka (długość)	48,0	108,0	60,1 $\pm$ 11,8	19,6	26,0	80,0	46,0 $\pm$ 8,4	18,2
Błonka falująca (wysokość)	1,0	2,0	1,6 $\pm$ 0,2	15,5	1,0	2,0	1,4 $\pm$ 0,2	14,0

20  $\mu\text{m}$ , przy czym spotyka się plemniki duże o główce długości 31  $\mu\text{m}$ . Plemniki żaby trawnej są o wiele większe, o długości główek od 51 do 60  $\mu\text{m}$ .

Z porównania długości główek plemników wyżej wymienionych żab wynika, że plemniki ropuch są małymi w porównaniu do plemników żaby trawnej.

Od główki plemnika odchodzi witka, która rozpoczyna się od zróżnicowanej części tzw. szyjki lub wstawki. Długość witki jest różna u badanych ropuch. U ropuchy zielonej średnia jej długość wynosi 46,0  $\mu\text{m} \pm 8,4$ . U ropuchy szarej witki plemników są znacznie dłuższe, a ich średnia długość wynosi 60,1  $\mu\text{m} \pm 11,8$ . Wśród badanych plemników ropuchy szarej przeważają takie, które mają witki dłuższe niż średniej długości witki plemników ropuchy zielonej (ryc. 4).

Charakterystyczną cechą badanych plemników jest występowanie na wtkach błonki falującej. Błonka falująca jest charakterystycznym tworem plazmatycznym witek plemników traszek (Juszczak 1967, 1974). Przyrasta ona u plemników traszek wzdłuż witki.

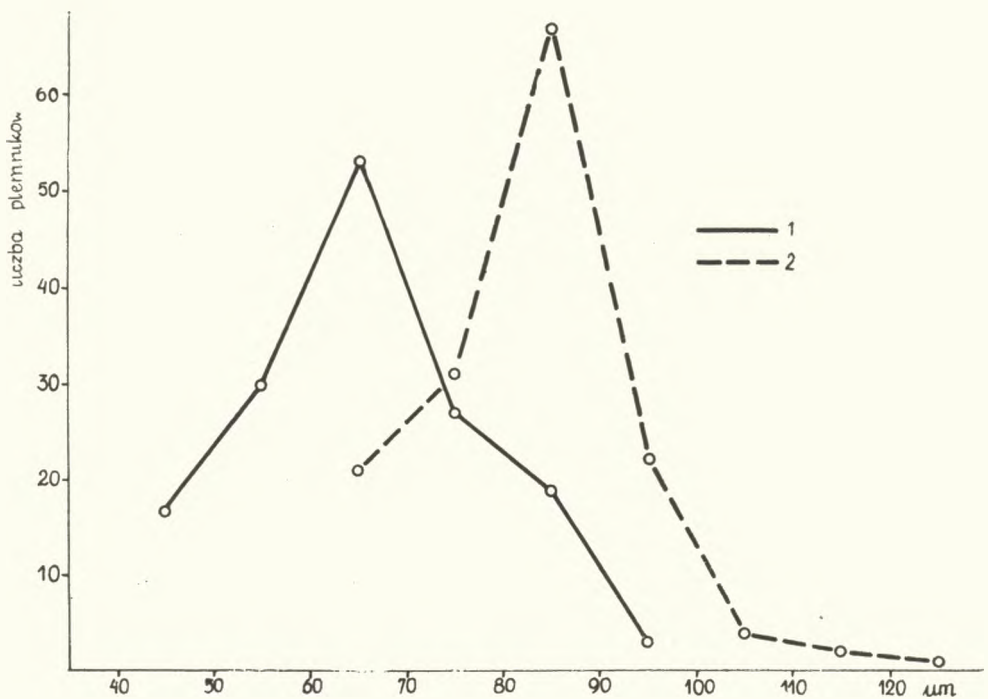


Ryc. 4. Zmienność długości witki plemników ropuchy zielonej — *Bufo viridis* Laur. (1) i ropuchy szarej — *Bufo bufo* (L.) (2)

U żywych plemników obu gatunków ropuch błonka falująca znajdowała się w ciągłym ruchu. Witki poruszały się tylko nieznacznie. Ruch plemnika następował głównie na skutek ruchu błonki falującej, chociaż u plemników poruszających się z większą szybkością obserwowano również energiczne ruchy witek.

Wysokość błonki falującej jest w zasadzie proporcjonalna do długości witki. I tak plemniki ropuchy szarej są dłuższe niż ropuchy zielonej, a wysokość błonki falującej wynosi odpowiednio  $1,6 \mu\text{m} \pm 0,3$  i  $1,4 \mu\text{m} \pm 0,3$ . Z analizy przebiegu błonki falującej wynika, że ok. 40% plemników ropuchy zielonej posiada błonkę falującą wzdłuż całej długości witki, u pozostałych zaczyna się ona za główką w odległości nie większej niż  $1/3$  długości witki. U 70% plemników ropuchy szarej błonka falująca bierze początek tuż za główką i biegnie wzdłuż całej długości witki. U pozostałych plemników przebieg błonki jest nieregularny.

Całkowita długość plemników ropuchy zielonej wynosi średnio  $69,0 \mu\text{m} \pm 12,4$  zaś plemników ropuchy szarej  $84,0 \mu\text{m} \pm 10,8$ . Przeciętnej długości plemnik ropuchy zielonej jest znacznie mniejszy od



Ryc. 5. Zmienność długości całkowitej plemników ropuchy zielonej — *Bufo viridis* Laur. (1) i ropuchy szarej — *Bufo bufo* (L.) (2)

plemnika ropuchy szarej, mającego średnią długość. Zróżnicowanie wielkości plemników jest większe u ropuchy zielonej, o czym świadczy wysoki współczynnik zmienności wynoszący 18,0%.

Z przeprowadzonej analizy porównawczej wynika, że plemniki ropuchy zielonej są bardziej zróżnicowane tak pod względem wielkości (ryc. 5), jak i kształtu główek. Są mniejsze od plemników ropuchy szarej (ryc. 5) a ich budowa bardziej zróżnicowana. Duże zróżnicowanie plemników jest być może wywołane tym, że plemniki, które obserwowano, pobrane były z jąder, znajdowały się zatem na różnym etapie dojrzałości. Niemniej jednak badano wyłącznie te plemniki, które nie były zdeformowane i wykazywały normalną budowę, i tylko te, które się poruszały.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Bagiński S., 1951. *Technika histologiczna*. Warszawa, 41—95. PZWL.
2. Juszczak W., 1967. *Traszkki*. Warszawa, 43—46. PZWS.
3. Juszczak W., 1974. *Plazy i gady krajowe*. Warszawa, 89—100. PWN.
4. Pawlikowski T., 1967. *Podręcznik histologii*. Warszawa, 466—476. PZWL.
5. Terentiew P. W., 1950. *Laguzka*. Moskwa. Sowietskaja Nauka.
6. Zamachowski W., Zamachowska M., 1971. *The effect of temperature on motility and survival of spermatozoa of the common newt (*Triturus vulgaris* L.)*. Acta biol. crac. Ser. Zool. 14, 1—8.

Władysław Zamachowski, Helena Rogowska

### Morphology of spermatozoa of the common toad — *Bufo bufo* (L.) and the green toad — *Bufo viridis* Laur.

In this study of spermatozoa with the morphological standpoint collected during the breeding season from testes of green toad (*Bufo viridis* Laur.) and common toad (*Bufo bufo* L.) were examined. It was stated that the best results of spermatozoa staining were obtained using Delafield's hematoxyline for 10 min. and 0.25% solution of eosin for 2 min.

It was also found that spermatozoa of common toad are significantly larger their length balanced from 65 to 125  $\mu\text{m}$ , whereas the length of spermatozoa of green toad balanced from 48 do 98  $\mu\text{m}$ . The spermatozoa of both species of toads have extension heads with sharply tips and they are of bacilliform or fusiform. There is an undulation membrane on cilliums of spermatozoa which run and height are different in both species.