

Prepareren van het genitaal van kevers

Gert van Ee

Sektie Everts, 7 maart 2015



Inleiding

Waarom onderzoek aan de geslachtsorganen van kevers? Omdat in veel gevallen deze belangrijke kenmerken hebben om de soort op naam te brengen. Dit gaat bij veel soorten in het bijzonder op voor de mannetjes, maar bij een aantal soorten zeker ook bij vrouwtjes. Bij veel soorten zijn uiterlijke kenmerken variabel en weinig verschillend of is er overlap. Een voorbeeld hiervan is zichtbaar bij twee soorten snuitkevers, die recent nieuw in ons land zijn gevonden en veel lijken op elkaar en op enkele andere soorten van het genus *Otiorhynchus*: *O. armadillo* (Rossi, 1792) en *O. salicicola* Heyden, 1908 (figuur 1) (Heijerman & Hellingman, 2008).



Figuur 3. *Otiorhynchus armadillo*, mannetje.
Figure 3. *Otiorhynchus armadillo*, male.



Figuur 4. *Otiorhynchus armadillo*, vrouwtje.
Figure 4. *Otiorhynchus armadillo*, female.



Figuur 5. *Otiorhynchus salicicola*, mannetje.
Figure 5. *Otiorhynchus salicicola*, male.



Figuur 6. *Otiorhynchus salicicola*, vrouwtje.
Figure 6. *Otiorhynchus salicicola*, female.

Figuur 1. *Otiorhynchus armadillo* (boven links m.; boven rechts vr.) en *O. salicicola* (onder links m.; onder rechts vr.). Foto's: Theodoor Heijerman. Bron: Heijerman en Hellingman, 2008

Door het uitprepareren van het mannelijk geslachtsorgaan, de aedeagus (meervoud aedeagi) (figuur 2) en de vrouwelijke kenmerkende spermatheca (meervoud spermatecae) (figuur 3) zijn de verschillen echter beter zichtbaar.



Figuur 2. Aedeagi van *Otiorhynchus armadillo* (links) en *O. salicicola* (rechts). Foto's: Theodoor Heijerman.



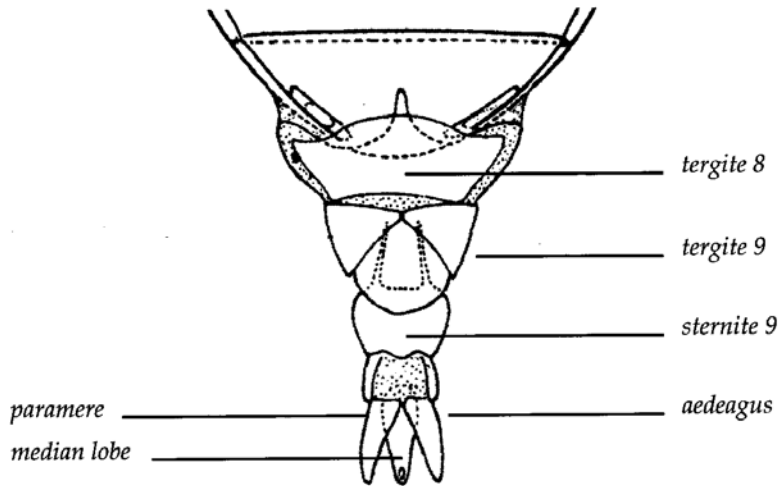
Figuur 3. Spermathecae van *Otiorhynchus armadillo* (links) en *O. salicicola* (rechts). Foto's: Theodoor Heijerman.

Bouw van de geslachtsorganen

Mannetje

De aedeagus of aedeagophore is het geslachtsorgaan van het mannetje. De aedeagus kan heel simpel van vorm zijn (veel Dytiscidae), maar ook heel ingewikkeld met complexe structuren (bijvoorbeeld bij een aantal *Hydraena* soorten) en is vaak grotendeels gechitiniseerd.

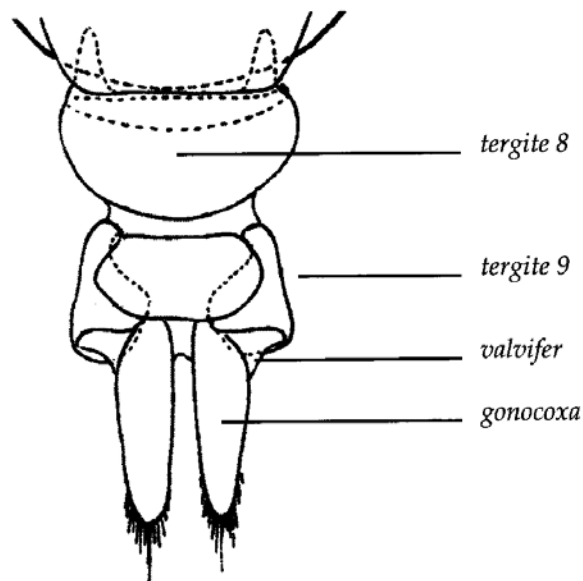
Figuur 4 is een schematische afbeelding van het laatste deel van het achterlijf en de aedeagus. De aedeagus ligt meestal in de laatste twee segmenten van het achterlijf. De aedeagus bestaat vaak uit een basaal deel, een mediane lob (penis), waarin een intrekbaar deel kan zitten. Om deze mediane lob zitten aan de basis vaak twee langwerpige lobben: de parameren. Deze kunnen identiek zijn, maar ook totaal van elkaar verschillen en hebben vaak bijzondere onderscheidende kenmerken.



Figuur 4. De aedeagus, schematische weergave naar Crowson (1956). Bron: Duff 2012.

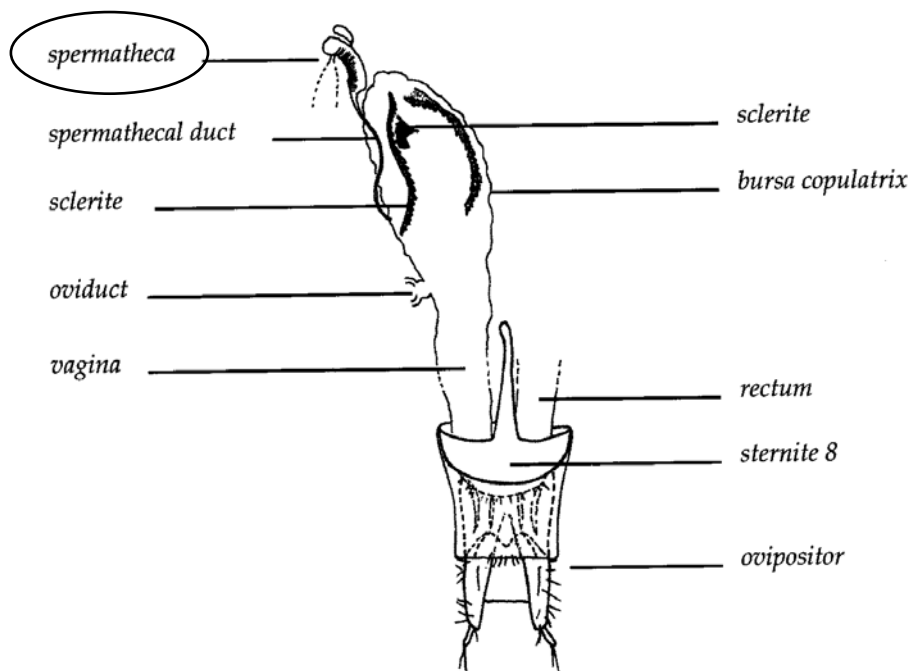
Vrouwtje

Bij het vrouwtje bevindt het voortplantingsorgaan zich ook in het achterlijf. Vaak steken uit het achterlijf twee eenvoudig gebouwde uitsteeksels: de gonocoxae (figuur 5). Deze bevatten soms ook belangrijke kenmerken en zijn behalve aan het uiteinde zwak of niet gechitiniseerd maar vliezig.



Figuur 5. De vrouwelijke genitale segmenten schematisch uit het achterlijf van de kever naar Crowson (1956). Bron: Duff 2012.

Een veel gebruikt onderdeel is de zogenaamde spermatheca (meervoud: spermathecae). Dit kleine orgaan is vaak sterker (donkerder) gekleurd en gechitiniseerd (figuur 6).



Figuur 6. De vrouwelijke genitaliën van *Trogoderma variabile* (Dermestidae) naar Peacock 1993. Bron: Duff 2012.

Voorbeelden waar de spermatheca belangrijk kan zijn bij de determinatie zijn bijvoorbeeld bladkevers (Chrysomelidae), snuitkevers (Curculionidae) en kortschilden (Staphylinidae).

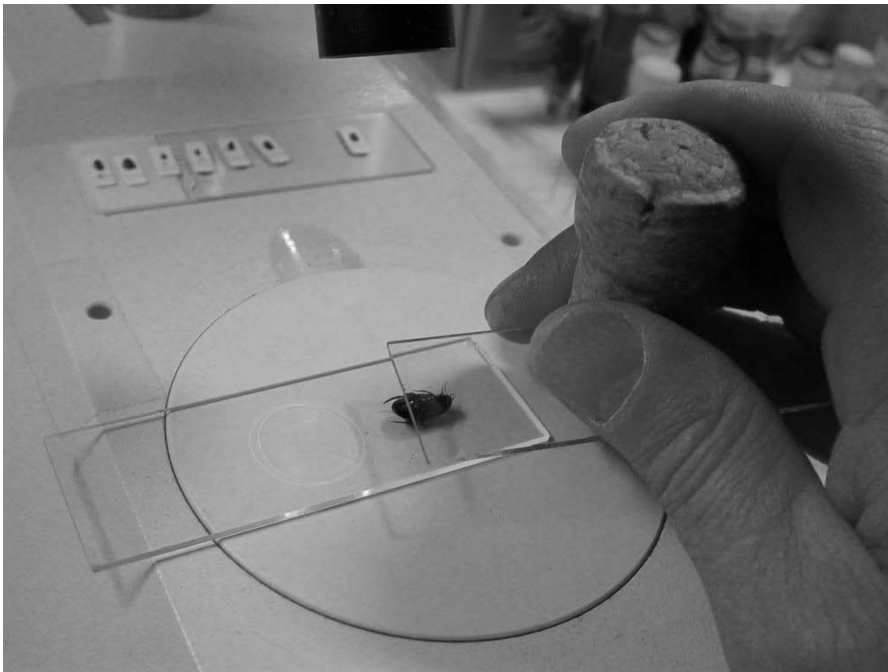
Prepareren

De kevers zijn bij voorkeur nog redelijk vers en gedood in ethylacetaat (azijnether), waar ze minimaal 24 uur in hebben gezeten zodat de spieren zijn verslapt. Ze kunnen daarna worden geprepareerd of worden bewaard in alcohol 70%. De dieren blijven dan voldoende soepel en kunnen gemakkelijk later worden geprepareerd. Bij oudere en droge exemplaren is het moeilijker, maar er bestaan veel mogelijkheden om ze zachter te maken en vervolgens het genitaal netjes uit te prepareren. Mogelijkheden zijn bijvoorbeeld het opweken in water met een scheutje (huishoud)azijn, een tijdje laten staan in pepsine (enzym uit de maag dat eiwitten afbreekt) of in verwarmd, zachtjes kokend water opweken (op bijvoorbeeld een spiritusbrander).

Beginners kijken vaak op tegen het uitprepareren van genitalia. Het is echter niet moeilijk om het genitaal van het mannetje, de aedeagus, of die van het vrouwtje (spermatheca) er uit te halen. Met geduld en wat handigheid is het heel goed mogelijk om na de operatie de kever intact te laten en te prepareren. Het mannetje en het vrouwtje zijn soms aan uiterlijke kenmerken van elkaar te onderscheiden, maar niet altijd. Dan rest er niets anders dan voorzichtig een kijkje te nemen tussen het laatste achterlijfsterneet en -tergiet.

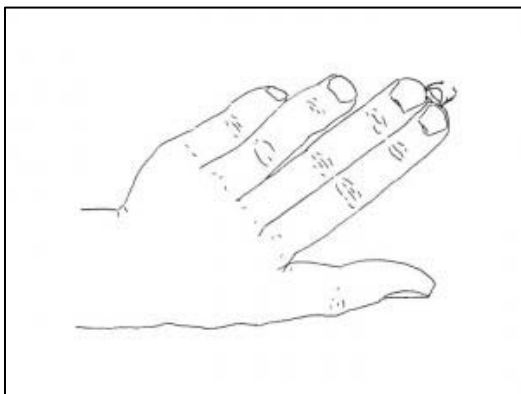
Er zijn veel manieren om het genitaal te verwijderen. En er is geen enig juiste manier van werken. Iedereen ontwikkelt een eigen manier, waarbij het er natuurlijk om gaat de kever gaaf te houden en het genitaal in zijn geheel onbeschadigd te verwijderen. In de literatuur is op veel plaatsen wel iets te vinden. Door meerdere boeken naast elkaar te leggen maar vooral door zelf te oefenen kom je al gauw tot een eigen meest geschikte werkwijze. Ik gebruik bijvoorbeeld graag een zelf gemaakt objectglas met een kurk er op gelijmd om de

kever vast te houden (figuur 7). Dan kan ik het genitaal gemakkelijk verwijderen zonder de kever te beschadigen. De kever ligt dan op een ander objectglas (met een uitholling in het



Figuur 7. Het fixeren van de kever met behulp van een objectglas waarop een kurk is bevestigd.

midden met een druppel water) en wordt onder lichte druk op zijn plek gehouden. Het genitaal gaat direct na het verwijderen in een druppel water. Voor het verwijderen gebruik ik een fijn pincet of een insectenspeld die aan het uiteinde is kromgebogen (door deze bijvoorbeeld een keer hard op een glasplaatje te stoten). Maar ook gebruikelijk is om met duim of wijsvinger de kever op zijn plaats te houden en enige druk uit te oefenen op het achterlijf waarbij het genitaal er uit wordt geduwd.



Figuur 8. Door met de hand druk uit te oefenen op de kever komt uit het achterlijf het genitaal dan vrij gemakkelijk is te verwijderen. Afbeelding: <http://marktelfer.co.uk/beetles/techniques-for-studying-beetles/>

Materialen en methoden

De meeste materialen zijn al in het bezit van iemand die kevers bestudeerd of anders gemakkelijk te bestellen of zelf te maken (figuur 9).

- fijne pincetten, bij voorkeur horlogemaker pincet
- een aantal insectennaalden (nr 1 is geschikt)
- een objectglas (met uitholling is handig voor een druppel water), dekglasjes
- een pipet en flesje water
- PVP
- opplakkartonnetjes, lijm
- kevers, bij voorkeur redelijk vers in alcohol.
- filtreerpapier (koffiefilter is ook prima) en schaartje
- objectglasje met kurk
- Loog (natronloog (NaOH), kaliloog (KOH))
- Spiritusbrander of een kookplaatje

In deze minicursus wordt niet alles uitputtend behandeld. Iedere keversoort of geslacht vraagt om een eigen benadering. Vaak is het de vorm van de penis of de parameren die kenmerkend is voor een soort, maar soms gaat het ook om (chitineuze) onderdelen die binnen in de penis aanwezig zijn, bijvoorbeeld bij Donaciinae, rietkevers. Soms gaat het verwijderen van de aedeagus uit het achterlichaam vrij gemakkelijk. En bij andere soorten is het beter het achterlijf in zijn geheel er af te halen en vervolgens de onderste en bovenste delen via de zijkant voorzichtig los te maken met een scherpe naald of mesje en de inhoud in een druppel water te doen. Daarna met een fijn pincet en een dunne naald voorzichtig de boel uit elkaar trekken zonder veel kracht. Bij vrouwtjes is het zaak voorzichtig het materiaal uit het achterlijf te halen en in een druppel water zoeken naar de spermatheca. Dit is een vaak wat donkerder gekleurd steviger gekromd klein orgaantje.

Wanneer er veel resten en vliezen aanwezig zijn is het mogelijk deze te verwijderen met loog (natronloog, kaliloog) of met melkzuur. Bijvoorbeeld door de aedeagus met vliezen en aanhangend materiaal in warm 10% KOH te plaatsen en na ca. 5 minuten er uit te halen en verder uit te prepareren. Ook kan dit door het een dag te laten staan met het genitaal er in; dan zijn veel resten al opgelost of heel gemakkelijk te verwijderen en ook de vliezen zijn dan gemakkelijker weg te halen. Om het genitaal te 'wassen' kan het na de loog bijvoorbeeld in azijn (neutraliseren) en vervolgens gewassen worden in schoon water alvorens het te prepareren en op te plakken of zoals ook wel gebeurt in micropotjes met glycerine te bewaren. Dit micropotje kan bij de geprepareerde kever aan dezelfde speld worden gedaan. Dit gebeurt vooral als de vorm van de aedeagus bij drogen kan veranderen.



Figuur 9. Overzicht van prepareermateriaal met linksonder een objectglas met kurk.

Insluiten of opplakken

Wanneer het genitaal is uitgeprepareerd en eventueel is behandeld met loog, kruidnagelolie, of andere middelen om het op te helderen en doorzichtig te maken moet het bij de kever blijven. Dat kan door het in heel kleine buisjes te doen in glycerine en aan de speld te prikken bij de kever. Nadeel hiervan is dat glycerine altijd 'lekt' en een vettige aanslag geeft. Beter is om PVP te gebruiken en het genitaal op hetzelfde kartonnetje achter de kever te plakken. Heel kleine organen kunnen worden ingebed, grotere (bijv. bij veel loopkevers) kunnen worden vastgeplakt zodat ook de vorm kan worden bekeken onder de microscoop zonder het te hoeven losmaken. Bij het opplakken is het handig om met een fijne pincet en een insectenspeld te werken waarbij in het pincet een weinig water aanwezig is zodat het PVP goed aansluit bij het orgaan dat zo goed ingebed wordt. PVP lost heel gemakkelijk op in water zodat het indien nodig ook gemakkelijk losgemaakt en weer vastgeplakt kan worden (zie bijlage 1 voor meer informatie over PVP). Het insluiten in preparaten (objectglas en dekglas) in insluitmiddelen (Euparal, DMHF) is ook een mogelijkheid; nadeel is dat op lange duur de kever en de preparaten vaak gescheiden raken.

Webadressen voor materialen

<http://www.nev.nl/everts/links.html>

<http://www.vermandel.com/>

<http://www.vosmedisch.nl/contents/nl/d380.html>

<https://www.bioform.de/>

http://www.insectnet.eu/glue_boards.php

<http://www.entowinkler.at/>

<http://www.angleps.com/>

<http://www.angleps.com/coleoptera.php>

<http://thewcg.org.uk/>

<http://www.entosphinx.cz/en/?lang=en>

<http://www.bioquip.com/default.asp>

Literatuur

Cooter, J., 1991. Examination of coleopterous genitalia. In: J. Cooter, A Coleopterous Handbook, 3rd edition. The Amateur Entomologists' Society: 53-65.

Duff, A. G., 2012. Beetles of Britain and Ireland. Volume 1. Sphaeriusidae to Silphidae. West Runton, Norfolk. 496 p.

Heijerman, Theodoor & Silvia Hellingman, 2008. *Otiorhynchus armadillo*, een invasieve snuitkever, gevestigd in Nederland (Coleoptera: Curculionidae). Nederlandse Faunistische Mededelingen 29: 37-48.

Nuttige websites

<http://markgtelfer.co.uk/beetles/techniques-for-studying-beetles/>

BIJLAGE 1: Bereiding van PVP

PVP staat voor polyvinylpyrrolidon, dat in poedervorm te koop is. Het blijft helder doorzichtig en is zeer snel oplosbaar in water. Dit maakt het zeer geschikt als inbedmiddel voor genitaliën van kevers.

Het recept werd in 1986 gepubliceerd in de Entomologische Blätter, Bd. 82, Heft 1-2, p. 119 en later in Band 12 van Lohse en Lucht (Käfer Mitteleuropas).

Het recept luidt als volgt (in gewicht %):

50 % Water - als oplosmiddel

40 % Polyvinylpyrrolidon (PVP) Molgew. ca. 25.000 – het eigenlijke inbedmiddel.

5 % Glycerine - als weekmaker

5 % Sorbitol - is hygroscopisch en reguleert het watergehalte (in drogisterij of apotheek verkrijgbaar als vervanger van suiker voor diabetici)

Bereiding: PVP poeder in water oplossen door krachtig te roeren; pas daarna glycerine en sorbitol toevoegen. De luchtbelletjes die er in komen met het krachtige roeren verdwijnen vanzelf bij het staan na een dag of twee. Om schimmelvorming te voorkomen kan men bijvoorbeeld thymol 0,3% toevoegen, maar dit stinkt enorm en ik doe dit niet en heb nog nooit schimmelvorming gehad.

Als er teveel water in de oplossing zit dan komen er na het drogen op het kartonnetje vaak scheuren in de PVP. Teveel water verdwijnt vanzelf bij het open laten staan van het potje.