

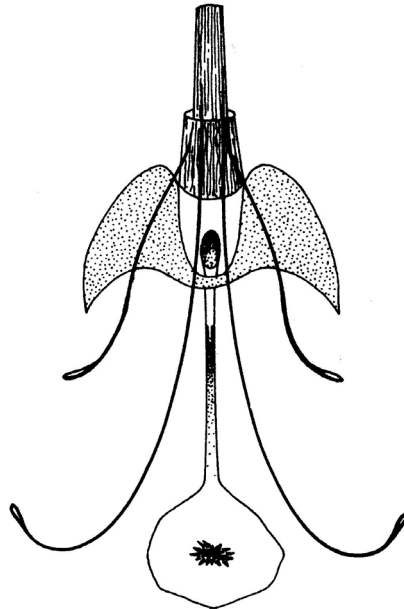


Entomobrochure 1

(tweede editie – volledig herwerkt)

Genitalia van Lepidoptera prepareren en afbeelden

Willy De Prins



2007

Vlaamse Vereniging voor Entomologie – Antwerpen

Inhoud

1. Inleiding	3
2. Benodigdheden	4
2.1. Prepareermateriaal	4
2.2. Chemicaliën	6
3. Prepareermethode	8
3.1. Verwijderen van het achterlijf	8
3.2. Maceratie	8
3.3. Uitprepareren	9
3.4. Ontwateren	9
3.5. Insluiten	9
3.6. Alternatieve prepareermethoden	10
3.6.1. Macereren	10
3.6.2. Ontwateren	11
3.6.3. Insluiten	11
3.7. Prepareren van kleine exemplaren	12
3.8. Kleuren	12
4. Etikettering en verzameling	14
4.1. Etikettering	14
4.2. Een preparatenverzameling	15
5. De delen van een genitaalapparaat	16
5.1. Mannelijke genitalia	16
5.2. Vrouwelijke genitalia	18
6. Fotograferen en tekenen	20
6.1. Foto's van preparaten	20
6.2. Tekeningen van preparaten	22
6.3. Enkele praktische wenken	24
6.3.1. Lijnen	24
6.3.2. Punten	25
7. Literatuur	26

1. Inleiding

In haast alle moderne werken over Lepidoptera komt men afbeeldingen van genitalia van vlinders tegen. Dikwijls kan men slechts met behulp van een genitaalonderzoek zijn materiaal determineren zonder op het etiket een vraagteken te moeten zetten. Jammer genoeg bekijken nog teveel lepidopterologen de genitaalafbeeldingen in de diverse publicaties met een hoogst onbegrijpende blik, hoewel de preparatie en bestudering ervan helemaal niet zo moeilijk zijn als op het eerste gezicht misschien wel lijkt. Het komt erop aan "het eens gedaan te hebben".

Uiteraard is een zekere investering in prepareermateriaal nodig, maar met een beetje fantasie kan veel van het benodigde materiaal zelf in elkaar geknutseld worden, behalve natuurlijk een prepareermicroscop. Voor het prepareren van grotere exemplaren (Noctuidae bij voorbeeld) volstaat een eenvoudig model of zelfs een groot vergrootglas op statief. Een ander obstakel was vroeger het gebrek aan goede afbeeldingen in de entomologische literatuur, al zijn de laatste determineerwerken steeds voorzien van afbeeldingen van mannelijke en vrouwelijke vlinder genitalia. Vroeger waren dergelijke afbeeldingen dikwijls verspreid over tientallen artikels in soms moeilijk te traceren entomologische tijdschriften.

Maar als men eenmaal over het nodige materiaal beschikt, dan is het helemaal niet zo moeilijk meer om de studie van de genitalia van vlinders aan te vatten. Deze brochure richt zich dan ook vooral tot mensen die weinig of geen ervaring met het prepareren van dergelijke genitalia hebben en die er toch mee zouden willen beginnen. Anderzijds worden er enkele tips gegeven die de reeds gevorderde entomoloog kunnen interesseren.

De tekst van deze tweede editie van *Entomobrochure 1* (De Prins 1981), is aangepast aan de nieuwe ontwikkelingen, bevindingen en technieken van het prepareren en afbeelden van genitalia van Lepidoptera. Bij het schrijven van de eerste editie was er nog helemaal geen sprake van computers en ook de digitale fotografie was toen nog een toekomstdroom. De hoofdstukken 4 en 6 werden in deze tweede editie dan ook volledig herwerkt. Ook zijn meer alternatieve prepareer- en kleuringmethoden opgenomen in deze tweede uitgave. Moge deze tweede editie een aansporing zijn voor vele entomologen om aan dit boeiende aspect van de lepidopterologie wat meer aandacht te schenken.

2. Benodigheden

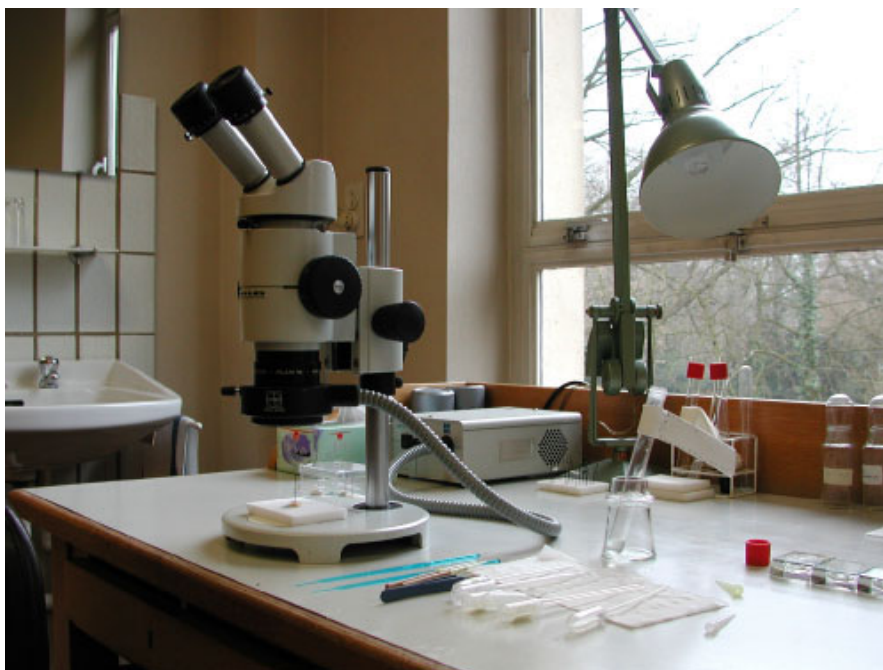
Vooraf moet opgemerkt worden dat er verschillende methoden bestaan om de genitalia van vlinders te prepareren en afhankelijk van de methode zal men ander prepareermateriaal nodig hebben. Sommige auteurs (o.a. Aspöck 1971, van Doesburg 1980) beschrijven een methode om de genitalia in glazen of plastic buisjes te bewaren. Deze tubes worden dan aan de speld van het desbetreffende exemplaar geprikt. Een voordeel is dat met het apparaat in zijn drie dimensies kan bestuderen, maar dat is dan meestal ook alles. Soms leest men wel eens dat deze methode minder verwisselingen tot gevolg heeft omdat het preparaat en de vlinder steeds samen blijven. Het tegendeel is echter waar. Als men een bepaalde groep bestudeert, zal men ook de genitalia willen nakijken. Die moeten dus van de speld genomen worden. De tubes zelf zijn (meestal) niet geëtiketteerd en de genitalia al helemaal niet, met alle gevolgen van dien! Het wordt wel erg gevaarlijk als men twee preparaten naast elkaar wil vergelijken... Bovendien laten dergelijke tubes weinig plaats voor de etiketten onder het exemplaar, wat nadelig is voor de leesbaarheid ervan. Ten slotte kan deze methode nuttig zijn voor grotere exemplaren, maar voor de tere en erg kleine genitalia van b.v. Nepticulidae, Gracillariidae en Pterophoridae is deze methode af te raden. Dit is ook het geval voor de methode waarbij het apparaat, al dan niet tussen twee dekglasjes, op een kartonnetje onder het exemplaar wordt geplaatst. In deze brochure wordt dus hoofdzakelijk de methode beschreven waarbij een permanent preparaat wordt gemaakt waarbij het genitaal tussen een objectglasje en een dekglasje wordt ingesloten. Meer literatuur over het vervaardigen van genitaalpreparaten van insecten in het algemeen en Lepidoptera in het bijzonder kan men o.a. vinden bij Bourgogne 1963–1964, Cribb 1974, De Prins 1974, Fernández-Rubio 1980, Font-Bustos 1979–1980, Kroon 1973, Robinson 1976 en Sattler 1972.

2.1. Prepareermateriaal

Al kan een goed en voldoende groot vergrootglas (6× tot 10×) op statief zijn diensten bewijzen bij het prepareren van de genitalia van grotere soorten, dan nog zal men in de meeste gevallen een echte prepareermicroscoop verkiezen. Zeker als men kleinere soorten (*Eupithecia*, *Idaea*, Microlepidoptera) wil bestuderen, is de aanschaf van zulk een toestel een absolute noodzaak. De voordelen van een prepareermicroscoop zijn dat die toestellen voorzien zijn van een dubbel oculair, waardoor een dieptebeeld ontstaat, en ook draait zo'n microscoop het beeld niet om zoals een gewone microscoop dat wel doet. Voor het prepareren van vlinder genitalia heeft men vergrotingen nodig van 10× tot 60×. In sommige gevallen, en zeker tijdens het bestuderen van de genitalia na preparatie, is het zelfs nodig om nog verder te vergroten, tot 120× of meer. Uitzonderlijk wil men nog sterkere vergrotingen voor het bestuderen en fotograferen van zeer kleine, morfologische details zoals de cornuti in de fallus en dan moet men zijn toevlucht nemen tot een gewone microscoop met vergrotingen tot 500×.

Vele preparatoren werken met een prepareermicroscoop met verwisselbare objectieven (1,5×, 3× en 6×) en oculairs (10× en 20×) zodat vergrotingen mogelijk zijn van 15, 30, 60 en 120×. Prepareermicroscopen die uitgerust zijn met een zoomobjectief geven uiteraard tal van intermediaire vergrotingen en men moet niet steeds lenzen verwisselen, maar hun prijs ligt uiteraard merkelijk hoger.

Bij de aankoop van een prepareermicroscoop moet men verder nog op enkele dingen letten: de grootte van het kijkveld, de afstand tussen object en objectief en de belichting. Sommige microscopen hebben een zeer klein kijkveld; dit maakt hun gebruik bijzonder lastig omdat men met een aangepaste vergroting toch weinig te zien krijgt van het object. Het kijkveld is voldoende groot als men bij een vergroting van 15× een cirkel ziet met een oppervlakte van minstens 1,5 cm².



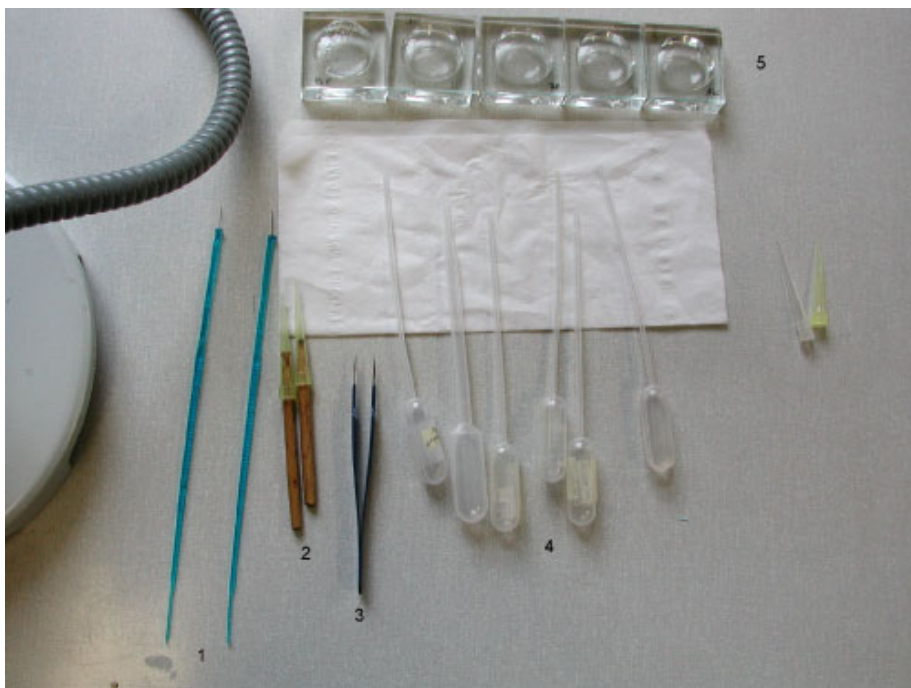
Figuur 1. Prepareermicroscoop met zoommogelijkheid (6× tot 50×).

Er moet voldoende afstand zijn tussen de plaat waarop het object rust en het objectief, zoniet heeft men moeilijkheden tijdens het manipuleren van pincetten en prepareernaalden omdat men overal tegenaan stoot. Het gemakkelijkst prepareert men met opvallend licht. De prepareermicroscoop kan dan gewoon vlak op de werktafel rusten. Het is wel noodzakelijk een lichte, matte objectplaat te gebruiken die het opvallend licht zeker niet weerkaatst in de microscoop. Als lichtbron volstaat een gewone bureaulamp, maar natuurlijk zijn speciale lichtbronnen waarvan men de breedte van de lichtbundel en de lichtsterkte kan veranderen beter. Voor het maken van foto's van genitaalpreparaten wordt meestal met doorvallend licht gewerkt. De prepareermicroscoop wordt op een statief geplaatst waaronder een draaibare spiegel is gemonteerd die de lichtstralen van een sterke lichtbron weerkaatst naar het objectief toe. Het preparaat moet nu op een glazen plaat gelegd worden. Meer hierover in hoofdstuk 6.

Het andere prepareermateriaal is heel wat goedkoper dan de prepareermicroscoop. Een nikkelen kroesje moet dienen om het achterlijf te koken in kaliumhydroxide. Men kan in sommige winkels kroesjes kopen die voorzien zijn van een handvat, maar het vervaardigen van dergelijk hulpmiddel met ijzerdraad en een houten plankje vergt geen speciale vaardigheden. Het kroesje moet wel van nikkel zijn omdat andere metalen zeer vlug door kaliumhydroxide worden aangetast. Het koken kan eveneens gebeuren in een porseleinen schaalte en ook, zij het met meer kans op spatten, in een glazen proefbuisje.

Het verwarmen van kaliumhydroxide gebeurt best boven een kleine vlam. Een alcoholbrandertje is niet duur en levert een uitstekende warmte. Verder heeft men enkele glazen proefbuisjes nodig, een horlogeglas met een doormeter van ongeveer 5 cm en een klein porseleinen schaalte.

Voor het afknippen van het abdomen heeft men een fijn schaalte nodig; het best voldoet een schaalte met een kromme punt. Nog beter zijn de schaaltes gebruikt voor de oogchirurgie; die zijn echter moeilijker te vinden en bovendien erg duur. Om het preparaat vast te nemen, heeft men een pincet nodig met fijne punten, al dan niet gebogen. Verder moet men beschikken over enkele dunne glazen of plastic staafjes om de diverse chemicaliën aan te brengen. Dit kan eveneens gebeuren met plastic pipetten. Ten slotte heeft men voorwerp- en dekglasjes nodig om het preparaat in te sluiten. Een blad vloeipapier en enkele doekjes komen eveneens van pas.



Figuur 2. Prepareermateriaal

- 1.– Prepareernaalden vervaardigd uit een plastic heft en minutienaaldjes.
- 2.– Prepareernaalden met beschermhoesje.
- 3.– Zeer fijn pincet.
- 4.– Pipetten voor het toevoegen van verschillende reagentia.
- 5.– Potjes voor het ontwateren, kleuren, e.d.

2.2. Chemicaliën

De chemicaliën variëren eveneens volgens de toegepaste prepareermethode. Hier worden diegene vermeld die nodig zijn bij de methode beschreven in hoofdstuk 3. Daar zullen tevens alternatieve werkwijzen behandeld worden.

Vooreerst heeft men kaliumhydroxide (KOH) nodig, en wel een oplossing van 10%. Die kan men zo klaargemaakt kopen (bij voorbeeld een fles van een halve liter), maar het is eenvoudig, en goedkoper, om zelf deze kaliumhydroxide te maken door pastilles KOH op te lossen in gedistilleerd water. De voorraad pastilles moet in een goed gesloten bus of pot bewaard worden omdat ze sterk hygroscopisch zijn. Indien men ze vrij weglegt, trekken ze zoveel water aan tot ze een geconcentreerde oplossing vormen die veel schade kan veroorzaken aan organisch materiaal (b.v. kleding).

Voor het afspoelen kan men gerust leidingwater gebruiken al is gedistilleerd water beter. Het ontwateren van het preparaat gebeurt in ijsazijn van 80 of 90% en het insluiten in entellan die met xylol kan worden verdund. En... vergeet geen brandalcohol voor het alcoholbrandertje. Overzichtelijk samengevat wordt het dus:

Benodigheden:

- prepareermicroscop
- nikkelen kroesje
- proefbuisjes
- horlogeglas
- fijn schachtje
- porseleinen of glazen schachtje
- pincet
- prepareernaalden
- glazen of plastic staafjes

Chemicaliën:

- vloeipapier
- voorwerp- en dekglasjes
- kaliumhydroxide (oplossing van 10%)
- ijsazijn (80 à 90%)
- xylol (= xyleen)
- entellan
- gedistilleerd water
- brandalcohol

3. Prepareermethode

Hieronder wordt een eenvoudige prepareermethode beschreven die weinig tijd vergt en toch bevredigende resultaten oplevert. Daarna komen enkele alternatieve werkwijzen aan bod met hun voor- en nadelen. Kort samengevat komt de methode hierop neer:

- verwijderen van het achterlijf
- maceratie in kaliumhydroxide
- uitprepareren
- ontwateren
- insluiten

3.1. Verwijderen van het achterlijf

Met het fijne schaartje wordt het laatste deel van het achterlijf afgeknipt, bij mannetjes ongeveer 1/3, bij wijfjes 2/3. Vooral bij gedroogde exemplaren uit een collectie kan dit nogal eens problemen opleveren omdat de chitine en de anders weke organische delen verdroogd en verhard zijn. Soms breekt dan het hele achterlijf af en soms—en dat is meestal veel erger—springt het afgeknipte deeltje weg. Daarom knipt men best boven een doos met hoge wanden zodat het eventueel wegspringende deeltje wordt opgevangen. Verder is het ook mogelijk om het achterlijf vóór het afknippen iets weker te maken. Dit gebeurt door met een penseeltje alcohol van 70% op het achterlijf te strijken en dit gedurende enkele minuten te laten inwerken; geregeld alcohol bijstrijken. In plaats van alcohol kan men ook een speciale oplossing gebruiken die als volgt wordt samengesteld:

- 275 delen gedistilleerd water
- 452 delen alcohol van 95%
- 145 delen ether
- 35 delen benzeen

Het is in sommige gevallen beter het hele achterlijf te prepareren omdat op de segmenten zelf kenmerkende structuren voorkomen, of omdat de genitalia tot ver in het achterlijf reiken. Het eerste is o.a. het geval bij het genus *Coleophora* (Coleophoridae), het tweede o.a. bij de wijfjes uit het genus *Gnophos* (Geometridae). Het achterlijf wordt dan naast het genitaalapparaat in hetzelfde preparaat ingesloten. Indien men het hele achterlijf wil prepareren is het helemaal niet nodig om het schaartje te gebruiken. Het achterlijf wordt van de rest van het lichaam verwijderd door het met een fijn pincet op en neer te bewegen totdat het afbreekt.

3.2. Maceratie

Het achterlijf of het afgeknipte deeltje wordt dan in het nikkelen kroesje gebracht waarin men vooraf enkele ml kaliumhydroxide heeft gegoten. Boven het alcoholbrandertje wordt het kaliumhydroxide langzaam aan het koken gebracht. Omdat KOH bij het koken erg spat, verdient het aanbeveling het kroesje voortdurend lichtjes heen en weer te schudden. Spatten er toch nog druppeltjes KOH weg, dan moeten deze goed geïnspecteerd worden omdat het wel eens gebeurt dat precies het stukje achterlijf mee wegspat. Verder moeten die druppeltjes onmiddellijk opgeruimd worden omdat ze de kleding, het tafeloppervlak enz. kunnen beschadigen.

De duur van het koken is sterk afhankelijk van de grootte van het achterlijf. Kleine stukjes moeten ongeveer 2 minuten koken, maar achterlijven van grote Noctuidae of Nymphalidae moeten soms 5 tot 10 minuten aan de kook gehouden worden. Door de ondervinding leert men al vlug welke soorten lang en welke minder lang moeten gekookt worden. Te kort koken heeft voor gevolg dat een deel van de weke, organische resten in het achterlijf niet volledig opgelost zijn. Dit merkt men dan als men het preparaat onder de prepareermicroscoop bekijkt. Het volstaat in zulk geval enkele minuutjes verder te koken. Te lang koken geeft daarentegen nadelige gevolgen omdat de chitine—en daarmee de belangrijke morfologische details—zelf wordt aangetast. De fijne structuren van het genitaalapparaat worden dan vervormd of zelfs helemaal opgelost en het preparaat wordt waardeloos.

3.3. Uitprepareren

Na het koken wordt het achterlijf met een pincet uit het nikkelen kroesje gevist en in een proefbuisje gebracht. Hierin giet men water, bij voorkeur gedistilleerd water, en men schudt enkele malen om het kaliumhydroxide zoveel mogelijk af te spoelen. Daarna wordt het achterlijf in een horlogeglas onder de prepareermicroscoop gebracht. In plaats van een horlogeglas te gebruiken, kan men objectglaasjes nemen met een uitholling. Vooral voor het werken met kleine preparaten is dit handig. Bij een onderbreking van de preparatie kan de holte tijdelijk afgesloten worden met een dekglasje wat een snelle verdamping van de vloeistoffen enigszins tegenhoudt.

Nu moet het eigenlijke genitaalapparaat van de rest van het abdomen gescheiden worden. Hiervoor gebruikt men twee prepareernaalden. In de ene hand houdt men de gebogen naald en hiermee drukt men het achterlijf plat op het horlogeglas. Met de andere hand, die de rechte prepareernaald vasthoudt, trekt men het genitaalapparaat uit het achterlijf. Soms moeten daarbij fijne vliezen worden doorgescheurd. In elk geval moet men er goed op letten het apparaat zelf niet te beschadigen. Met enige ondervinding weet men vlug waar precies men wat meer druk kan uitoefenen, en waar men uiterst voorzichtig moet te werk gaan. Men dient ook alle overvloedige schubben of haren van het preparaat te verwijderen omdat anders de kenmerkende structuren verborgen blijven. Op sommige apparaten zijn echter stevige borstelharen of haken ingeplant; deze moeten uiteraard wel op hun plaats blijven.

3.4. Ontwateren

Nadat men aldus het genitaalapparaat heeft vrijgemaakt, wordt dit opnieuw gespoeld in een proefbuisje met water. Daarna moet het preparaat ontwaterd worden. Dit gebeurt door het eerst eventjes op een blaadje vloeipapier te drukken zodat het meeste water reeds verwijderd is alvorens het preparaat in een porseleinen of glazen schaalteje te leggen waarin men een weinig ijsazijn (80 à 90%) heeft gegoten. Naargelang de grootte van het preparaat moet het 5 tot 10 minuten in deze vloeistof blijven liggen. Tijdens dit ontwateren moet het schaalteje afgedekt worden met een kartonnetje of glazen plaatje omdat ijsazijn een scherpe geur verspreidt en schadelijk is voor de slijmvliezen van de neus en voor de ogen.

3.5. Insluiten

Terwijl het genitaalapparaat ontwaterd wordt, legt men onder de prepareermicroscoop een objectglaasje klaar dat men eerst grondig heeft gereinigd, eventueel met alcohol. Hierop brengt men met behulp van een glazen of plastic staafje enkele druppels xylol. Met een fijn pincet vist men het preparaat nu uit de ijsazijn en dept het op een reepje vloeipapier zodat de overvloedige ijsazijn wordt weggenomen. Onmiddellijk daarna wordt het preparaat op het objectglaasje gebracht, in de druppel xylol.

Nu moet het genitaalapparaat in de gewenste houding gelegd worden alvorens het te fixeren. Hierbij moet men vooral weten hoe het preparaat moet bestudeerd worden: lateraal of ventraal (fig. 3). In beide gevallen moeten de valven opengespreid worden. Soms moet men enkele vliesjes doorscheuren. Bij sommige groepen dienen dan de uncus en het tegumen ventraal geprepareerd worden (b.v. *Adscita*, *Lycaeides*, *Polyommatus*, *Scotopteryx*), bij andere lateraal (b.v. *Catoptria*, *Crambus*, *Hipparchia*, *Melitaea*, *Pyrgus*). Verder moet men door drukken met de prepareernaalden alle eventuele luchtbelletjes uit het genitaalapparaat verwijderen.



Figuur 3. Ventraal of lateraal prepareren

1. Ventraal preparaat van *Melitaea athalia* Rottemburg; de linker valva is niet getekend.
2. Lateraal preparaat van *Hipparchia fagi* Scopoli; de linker valve is weggesneden en elders in het preparaat ingesloten (niet getekend).

Wanneer het preparaat volledig klaar is om ingesloten te worden, neemt men de eventueel overtollige xylol weg met het puntje van een blaadje vloeipapier of met de gebogen punt van de prepareernaald. Doet men dit niet, dan bestaat de mogelijkheid dat de entellan te sterk verdund wordt. Tijdens het opdrogen ontstaan dan holten onder het dekglasje. Een weinig xylol moet evenwel overblijven omdat er anders luchtbelletjes ontstaan in het preparaat.



Figuur 4. Het dekglasje wordt met één rand in aanraking gebracht met het insluitingsmiddel; dan laat men het glasje langzaam zakken om het ontstaan van luchtballen te voorkomen.

Nu moet met een tweede glazen staafje een druppel entellan op het genitaalapparaat gedruppeld worden; bij grote, dikke apparaten mogen het er gerust twee of drie zijn. Ten slotte bedekt met het apparaat met een dekglasje. Om de vorming van luchtbelletjes te voorkomen, zet men dit dekglasje schuin op het objectglasje zodat het in contact komt met de druppel entellan en laat het dan langzaam zakken (fig. 4).

3.6. Alternatieve prepareermethoden

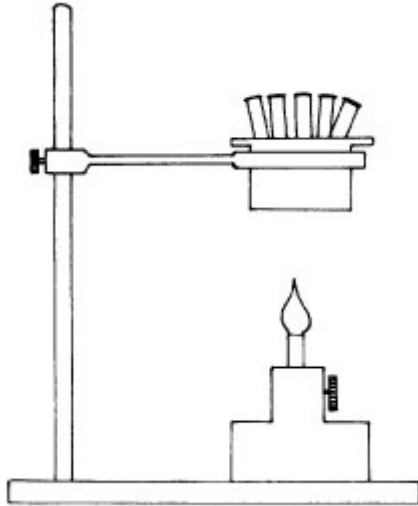
3.6.1. Macereren

In plaats van het achterlijf in een nikkelen kroesje te koken, is het ook mogelijk dit in een ander recipiënt te doen. Sommige mensen gebruiken een gewoon proefbuisje. Het nadeel hiervan is dat het kaliumhydroxide dan gewoonlijk erg spat en voortdurend schudden is dan ook noodzakelijk. Het risico dat het achterlijf mee wegspat, is hier veel groter dan met een nikkelen kroesje. Verder is het ook best mogelijk het achterlijf te koken in een porseleinen schaalje.

Prepareert men uitsluitend grote dieren, waarbij lang koken nodig is, dan kan men het nikkelen kroesje of een porseleinen schaalje op een statief bevestigen. Door de vlam van het alcoholbrandertje en de hoogte van het recipiënt te variëren, kan men een ideale verwarming bereiken, waarbij het spatten tot een minimum wordt beperkt. Omdat het nu niet nodig is het kookstel voortdurend in de hand te houden, kan men tijdens het koken reeds iets anders

doen. Om daarbij te lang koken te vermijden is het raadzaam een keukenklokje af te stellen op 10 of 15 minuten, zoniet kon men wel eens met een waardeloze chitinebrij blijven zitten.

Een gelijkaardige werkwijze houdt in dat op het statief een kan of een pannetje, gevuld met water, verwarmd wordt tot het water lichtjes kookt. In het pannetje kunnen nu verscheidene proefbuisjes geplaatst worden met daarin telkens één achterlijf (fig. 5). Op deze manier is het dus mogelijk enkele preparaten tegelijk te macereren. Uiteraard moeten de proefbuisjes zorgvuldig genummerd worden zodat verwisselingen van abdomens uitgesloten zijn.



Figuur 5. Kookstelletje op statief. Verscheidene preparaten worden tegelijkertijd "au bain marie" gekookt.

Wie helemaal niet van koken houdt, kan de weke organische weefsels uit het abdomen ook zonder verwarmen verwijderen. Het kaliumhydroxide werkt ook op kamertemperatuur, zij het veel trager. Men kan dan tevens een hele reeks preparaten tegelijk behandelen. De abdomens plaatst men in genummerde proefbuisjes met kaliumhydroxide en men laat die gewoon staan, 8 tot 24 uur naargelang de omvang van het achterlijf. Om het proces te versnellen kan men sterkere concentraties kaliumhydroxide (b.v. 20%) gebruiken, maar voorzichtigheid is hierbij geboden omdat, zoals reeds eerder vermeld, ook de chitine kan worden aangetast en het preparaat wordt dan volstrekt waardeloos. Voor Microlepidoptera en de meeste Geometridae, die meestal een fijne chitinestructuur bezitten, mag men deze sterker geconcentreerde kaliumhydroxide dus nooit gebruiken.

3.6.2. Ontwateren

Een andere manier om het preparaat te ontwateren is het door een reeks alcoholbaden te voeren. Men begint met alcohol van 70% en naargelang de grootte van het preparaat moet het hier een kwartier tot een uur in blijven liggen. Deze tijd mag gerust overschreden worden, want het preparaat is in alcohol onbepaald houdbaar. Nadien brengt men het preparaat in alcohol 95%, waarin het weer enkele uren moet blijven liggen en ten slotte komt het preparaat in xylol. Sterk geconcentreerde alcohol maakt het preparaat hard en dus moet het reeds voordien in de goede houding worden gelegd.

3.6.3. Insluiten

In plaats van het preparaat in te sluiten in entellan, kan men ook verschillende andere insluitingsmiddelen gebruiken. Enkele daarvan kunnen gewoon de entellan vervangen zonder dat men iets anders aan de prepareermethode moet wijzigen; o.a. depex of canadabalsem. Canadabalsem is van organische oorsprong en daarom meestal veel duurder dan de overige insluitmiddelen.

Het insluitingsmiddel dat door de preparatoren van o.a. het Natural History Museum te Londen wordt gebruikt, is euparal, en hierbij moet de prepareermethode na de ontwatering enigszins aangepast worden. Men mag nu geen xylol gebruiken. Nadat het objectglasje gereinigd is,

brengt men er ineens één of twee druppels euparal op aan en hierin komt het ontwaterde preparaat. Eventueel moet men het eerst in enkele ml eucalyptol leggen, het oplosmiddel van euparal. Het preparaat wordt dus onmiddellijk in de insluitingsvloeistof in de juiste houding gelegd. De rest van de preparatie gebeurt zoals bij entellan.

Nog een ander insluitingsmiddel is glycerine-gelatine. Het grote voordeel van deze bewaarvloeistof is dat ze water kan bevatten en de fase van het ontwateren valt dus gewoon weg. Glycerine-gelatine kan men best zelf bereiden. Eén deel gelatine wordt opgelost in 6 delen gedistilleerd water. Deze oplossing laat men 2 uur staan, waarna men er 7 delen zuivere glycerine aan toevoegt. Op 100 delen van dit mengsel voegt men dan 1 g fenol toe, terwijl men lichtjes verwarmt en roert. Men brengt enkele druppels van het bewaarmiddel op het objectglasje en onmiddellijk daarin komt het preparaat; het kan meteen in de goede houding worden gelegd. Het overtollige water in het preparaat wordt met een absorberend papiertje verwijderd. Het nadeel van glycerine-gelatine is echter dat het niet onbeperkt houdbaar is zonder de randen van het preparaat volledig luchtdicht af te sluiten. Na enkele dagen uitharden moet het overtollige insluitingsmiddel worden verwijderd met een borsteltje en wat water. Het water moet zorgvuldig opdrogen en de randen van het dekglasje worden dan dichtgesmeerd. Dit kan met allerlei producten gebeuren: entellan, depex, euparal, en zelfs gewone vernis, nagellak, autolak enz. De tijd die men wint door het ontwateringsproces over te slaan, verliest men dus weer door het preparaat luchtdicht te maken.

3.7. Preparaten van kleine exemplaren

De genitalia van kleine exemplaren (sommige Geometridae, verscheidene Microlepidoptera) zijn dikwijls zo klein dat men ze niet op dezelfde manier kan behandelen als hierboven beschreven. Schubben en haartjes worden niet met de prepareernaalden, maar wel met fijne penseeltjes of met een vogelpluim verwijderd.

Bij de zeer kleine soorten (*Nepticula*, *Phyllonorycter* enz.) is het bovendien af te raden om de genitalia in verschillende recipiënten te plaatsen. Ze zouden gemakkelijk verloren kunnen geraken. Na de maceratie komt het preparaat onmiddellijk op een objectglasje in een druppel gedistilleerd water. Schubben, haartjes en andere overbodige structuren worden voorzichtig verwijderd met penseeltjes, veertjes of een haarfijn, met de hand geslepen pincet. Het overtollige water wordt weggezogen met een absorberend papiertje of met een injectienaald. Dan brengt men met een glazen staafje een druppel ijsazijn aan en omdat dit product nogal snel verdampt, moet men deze handeling geregeld herhalen, al is zo'n klein preparaat natuurlijk sneller ontwaterd dan een groot.

Het overtollige ijsazijn wordt na de ontwatering eveneens weggezogen met een absorberend papiertje en dan wordt een druppel xylol op het preparaat gebracht. Nu wordt het genitaalapparaat in de goede houding gelegd, waarna men het insluit met het gewenste middel. Het preparaat zelf blijft dus steeds op dezelfde plaats.

3.8. Kleuren

In sommige gevallen is het aangeraden de preparaten te kleuren; vooral bij vele Microlepidoptera en bij de wijfjes van sommige Geometridae zijn de chitine-structuren zo fijn dat ze onduidelijk te zien zijn. Het is dan onmogelijk om er foto's van te maken. Het kleuren kan met verschillende producten gebeuren. In het Natural History Museum te Londen gebruikt men o.a. een oplossing van 1% chlorazol black E opgelost in alcohol 70%. Het voordeel van dit product is dat het vlug kleurt, maar dit heeft dan weer tot gevolg dat een preparaat nogal vlug te donker wordt en het is haast onmogelijk om het preparaat opnieuw helderder te krijgen.

Een andere kleurstof die geregeld wordt toegepast is methyleenblauw. Deze kleurstof maakt men klaar door 25 g methyleenblauwkristallen op te lossen in 250 ml ethanol, enkele malen flink te schudden en dan te laten bezinken. De zuivere kleuroplossing (opletten voor het bezinksel) wordt nu aangelengd met gedistilleerd water, ongeveer 1 deel kleurstof op 10 delen water. Het preparaat wordt in een druppel kleurstof gelegd gedurende 10 tot 30 minuten; af en

toe schudden. Methyleenblauw kleurt niet zo vlug als chlorazol black E en als het preparaat toch te donker geworden zou zijn, kan het zonder veel moeite ontkleurd worden door het in alcohol te spoelen.

Een nog beter resultaat geeft echter mercurochroom. Ook deze kleurstof kan men zelf bereiden, maar de flesjes die gebruikt worden om wonden te ontsmetten, voldoen uitstekend. Mercurochroom kleurt weer sneller dan methyleenblauw, al is dit alles natuurlijk sterk afhankelijk van de concentraties waarin men de kleurstoffen gebruikt. Het kleuren gebeurt na het uitprepareren en afspoelen van een preparaat en voor het ontwateren. In een porseleinen of glazen schaalje komt een druppel mercurochroom en hierin wordt het te kleuren preparaat gelegd. Af en toe beweegt men het heen en weer met een prepareernaald. Bij sterke concentraties van de kleurstof moet het preparaat vrij vlug afgespoeld worden omdat het anders te donker wordt. Daarom is het meestal beter met zwakke concentraties te werken, zeker voor Microlepidoptera (*Tinea*, *Phyllonorycter* enz.). Hierdoor is het steeds mogelijk de kleurintensiteit te controleren en het preparaat op het gepaste ogenblik uit de kleurstof te verwijderen. Bij *Phyllonorycter* duurt het kleuren tussen 5 en 10 minuten. Een bijkomend voordeel van zwak geconcentreerde kleuroplossingen is dat men de kleine preparaten er gemakkelijk in terug vindt. Na het kleuren wordt het preparaat afgespoeld in water en dan volgt het ontwateringsproces. Tijdens dit proces worden de preparaten trouwens terug iets ontkleurd. Ze mogen dus tamelijk intensief gekleurd worden alvorens de ontwateringsprocedure aan te vatten.

Er bestaan uiteraard nog een hele reeks andere kleurmiddelen (o. a. Eosin B, $C_{20}H_6N_2O_9Br_2Na_2$) maar het zou hier te ver voeren om die allemaal afzonderlijk te bespreken en hun voor- en nadelen tegen elkaar af te wegen.

4. Etikettering en verzameling

4.1. Etikettering

Het preparaat moet onmiddellijk na het prepareren voorzien worden van een etiket om eventuele verwisselingen te voorkomen. Dit kan met velerlei hulpmiddelen gebeuren, maar de eenvoudigste manier, die ook de netste resultaten oplevert, is de gegevens met een laserprinter op zelfklevende etikettes te printen, die men links en rechts van het preparaat op het objectglas kleeft. Eventueel kan men de gegevens ook met Oost-Indische inkt schrijven. Een balpen met gewone inkt is af te raden omdat die inkt in de loop der jaren verkleurt en na een hele poos onleesbaar wordt.

Op deze etikettes dient het volgnummer van het preparaat voor te komen. Het eenvoudigst is gewoon de numerieke volgorde te volgen (1, 2, 3...), maar men kan ook per jaar nummeren (2007/1, 2007/2, 2007/3...) of zelfs per datum (25-10-07/01...). Hetzelfde nummer moet onmiddellijk op een kaartje geschreven worden en onder het betreffende exemplaar aan dezelfde speld worden aangebracht. Hierdoor blijft het te allen tijde mogelijk het preparaat bij de juiste vlinder te plaatsen.

Het zelfklevende etiket op het objectglas dient verder te vermelden:

- de naam van de soort (indien bekend)
- het genusteken (♂ of ♀)
- de naam van de preparator
- de datum van de preparatie (ev. alleen het jaar)

Men vermeldt best ook het insluitingsmiddel op dit etiket. Mocht het later noodzakelijk zijn om het preparaat terug open te maken, om het te verleggen of dergelijke, dan weet men welk oplosmiddel moet gebruikt worden.



Figuur 6. Etiketten bij preparaten

1.– Volledig afgewerkt preparaat.

2.– Etiketje om aan de speld onder het geprepareerde exemplaar te bevestigen.

Op een tweede etiket vermeldt men de faunistische gegevens van het exemplaar, zoals die voorkomen op het etiket dat onder de vlinder zelf is aangebracht.

Wie veel genitaalpreparaten van soorten uit verschillende families maakt, kan best een register bijhouden, zoniet raakt men na verloop van tijd verstrikt in een wirwar van cijfers, namen en andere gegevens, zeker als daar nog preparaten bijzitten die voor andere entomologen bestemd zijn, of indien met preparaten krijgt door andere entomologen vervaardigd. Zo'n register kan uiteraard best opgebouwd worden door middel van een eenvoudige databank. Microsoft® Access of Microsoft® Excel zijn hier uitstekend voor geschikt. Hierdoor is het trouwens erg gemakkelijk om de bestaande informatie te sorteren op allerlei velden en om er bepaalde gegevens uit te filteren, iets wat met vroegere kaartenbaksystemen een hele klus was.

De nodige velden in zo'n databank bestaan uit (fig. 7):

- Nummer van het preparaat
- Familie van het dier in kwestie

- Genusnaam
- Soortnaam
- Datum van de preparatie
- Naam van de preparator
- Plaats waar het preparaat zich bevindt
- Vindplaats (land, provincie, gemeente + lokaliteit, ev. hoogte en coördinaten)
- Verzameldatum
- Legitnaam

4.2. Een preparatenverzameling

Vooraleer men de preparaten in dozen rangschikt, moeten ze goed drogen. Op kamertemperatuur duurt dat bij canadabalsem minstens een maand. Men kan beter wat langer wachten dan overhaast te werk te gaan want als men de preparaten te vlug verticaal opstelt, kunnen er verschuivingen en zelfs vervormingen van het genitaalapparaat ontstaan. Eventueel kan men het droogproces versnellen door de preparaten op een warme plaats te leggen. Sommige insluitingsmiddelen hebben een zeer korte droogtijd. Zo is entellan reeds na enkele uren droog. De preparaten die met dit product ingesloten zijn, kunnen dan ook de dag na de preparatie reeds verticaal weggeborgen worden.

Als men met het prepareren van genitaalapparaten begint, biedt het opbergen ervan helemaal geen problemen. Maar indien men er enkele honderden, of duizenden moet klasseren, liggen de zaken enigszins anders. Men kan uiteraard de preparaten in hun oorspronkelijke, numerieke volgorde in de speciaal daarvoor vervaardigde dozen bewaren. Ze zijn dan altijd redelijk snel met de hoger besproken databank terug te vinden.

Indien men echter van een bepaald genus een studie wil maken, dan heeft men liefst al deze preparaten bij elkaar. Het is dan onpraktisch en tijdrovend om uit de verschillende dozen de gewenste preparaten te selecteren. Gemakkelijker is dat alle preparaten van een genus bij elkaar zitten. Binnenin de doos zitten de preparaten wel zoveel mogelijk op numerieke volgorde. Op de rug van de dozen komt een etiketje met de naam van het genus of de familie.

Genitalia preparations - Microlepidoptera

Preparation number	00378
Original number	DP 3690
Species	Phyllonorycter melanosparta (Meyrick, 1912) New
Specimen status	▼
Sex	☒ Male ☐ Female
Preparation date	24/11/2006
Preparator	Jurate De Prins New
Label data	KENYA, Kakamega Forest, 1590 m Pheromone trap 28.iii.2003, leg. J. & W. De Prins
Comments	

Edit
Delete
New
◀
▶
⏪
⏩
Reports
STOP

Figuur 7. Computerscherm van een eenvoudige databank voor het opslaan, bewaren en opzoeken van genitaalpreparaten van Lepidoptera.

5. De delen van het genitaalapparaat

Vooraf moet opgemerkt worden dat met de besproken prepareermethode enkel de gechitiniseerde delen van het genitaalapparaat worden bewaard. Daarnaast bestaan er vele weke orgaantjes (ovaria, ei- en zaadleiders enz.) die wel een belangrijke rol spelen in de voortplanting van de vlinders, maar geen praktisch nut hebben voor het onderscheiden van de soorten. Ze worden trouwens opgelost tijdens het koken in kaliumhydroxide.

Het is helemaal niet de bedoeling om in dit hoofdstuk een overzicht te geven van alle in de literatuur gebruikte namen om de diverse onderdelen van de vlinder genitalia aan te duiden. Een dergelijke lijst vindt men o.a. bij Klots (1970). Hier worden slechts die namen opgesomd die men geregeld tegenkomt in de artikels over genitalia van Lepidoptera. Zie verder www.dissectiongroup.co.uk/page44.html voor benamingen van de onderdelen van vlinder genitalia en talrijke afbeeldingen van de genitalia van verschillende soorten.

5.1. Mannelijke genitalia (fig. 8)

De mannelijke genitalia bij vlinders worden gevormd door het negende en tiende segment van het abdomen. Dorsaal van het insect bevindt zich een kapvormige structuur: het tegumen. Meestal is dit tegumen voorzien van een uncus. Aan de basis van deze uncus kan een gepaard, meestal sterk behaard orgaan voorkomen: de socius (meervoud: socii). Onder de socii bevindt zich de gnathos, eveneens een gepaard orgaan, dat evenwel in sommige gevallen kan vergroeid zijn tot één geheel. De beide zijanten van het tegumen zijn verbonden met het vinculum, een U-vormige band, gevormd door de negende sterniet. Het vinculum draagt soms een kort of lang, buisvormig aanhangsel: de saccus. Een vlies sluit het achtereinde van het abdomen af. Het is verbonden met het tegumen, het vinculum en de valven. Soms draagt dit vlies (het diafragma) versterkende chitinedelen: de fultura superior, de fultura inferior, de anellus, de transtilla of de juxta.

Zijwaarts van de ring gevormd door het tegumen en het vinculum bevinden zich de valven. In sommige gevallen zijn deze vrij eenvoudig gevormd, maar meestal bezit een valve een hele reeks insnijdingen, uitstulpingen en aanhangsels die de meest uiteenlopende namen dragen (digitus, ampulla, pollex, clavus, corona enz.). De drie namen die men meestal tegenkomt om delen van de valven aan te duiden zijn: costa, apex en sacculus.

De fallus of penis is omringd door een chitinebuis: de aedoeagus. Aan de penis hangt de weke, uitstulpbare vesica, die dikwijls karakteristieke chitinedeeltjes draagt: de cornuti (enkelvoud: cornutus). In de meeste preparaten zit de vesica in de aedoeagus, al kan het voorkomen dat hij uitgestulpt werd. Sinds enkele jaren bestaat de techniek van het prepareren erin om deze vesica actief uit de aedoeagus te blazen met een fijne injectienaald. Deze techniek wordt o.a. bij Noctuidae toegepast. Soms kunnen de cornuti verloren gegaan zijn bij de paring. Ook op de aedoeagus zelf kunnen chitineplaatjes voorkomen die belangrijk zijn voor de determinatie.

Dikwijls zijn er andere structuren die bij het determineren van pas kunnen komen (fig. 9). Zo bezitten de meeste soorten uit het genus *Hipparchia* (Nymphalidae, Satyrinae) een Julliëns orgaan, gevormd door enkele doornen ingeplant op de rand van het achtste segment. Een gelijkaardig fenomeen komt voor bij het genus *Epirrita* (Geometridae): op de rand van het achtste segment staan twee uitstulpingen waarvan de onderlinge afstand en de grootte kenmerkend zijn voor de soorten. Bij het genus *Eupithecia* (Geometridae) komt een ventraalplaatje voor dat met succes kan gebruikt worden bij het determineren. In vele gevallen is dit plaatje slechts zwak gechitiniseerd en moet er dus goed op gelet worden dat het niet verloren raakt tijdens het prepareren. Op de onderkant van elk abdominaal segment van de *Coleophora*-soorten (Coleophoridae) staan twee groepjes doornen, die meestal specifieke eigenschappen bezitten. Bij *Caloptilia*-soorten (Gracillariidae) en bij haast alle soorten uit de subfamilie Phycitinae (Pyralidae) komen diverse haarbosjes en borstels voor die niet onmiddellijk bij het genitaalapparaat horen, maar die toch kunnen gebruikt worden bij het determineren. Het spreekt vanzelf dat al deze structuren mee moeten geprepareerd worden.



Figuur 8. Mannelijke genitalia

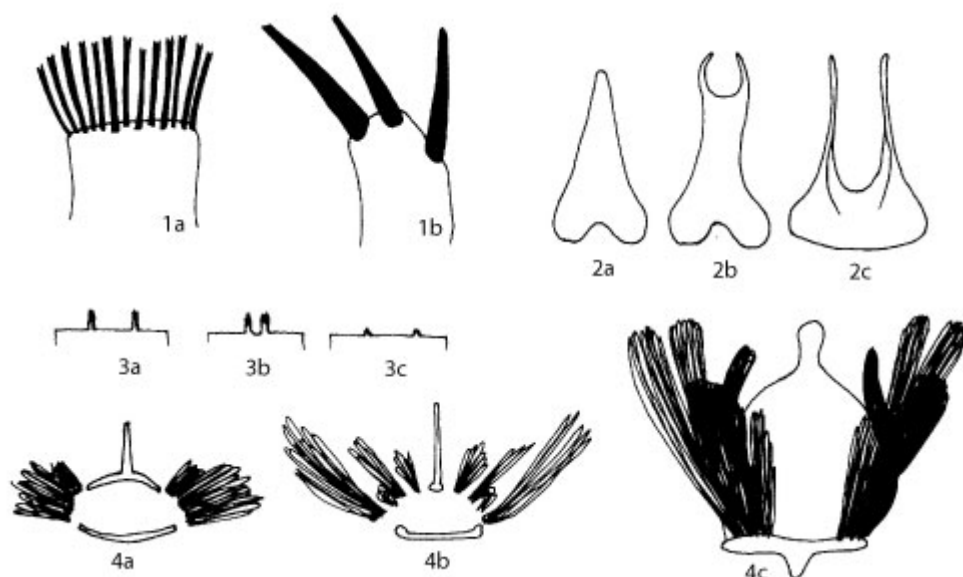
1. Schematische tekening van een lateraal preparaat.

2. Schematische tekening van een ventraal preparaat.

3–12. Lijntekeningen van verschillende preparaten, de vergroting is niet telkens dezelfde. Telkens werd de linker valve weggelaten.

3.– *Plebeius argus* (Lycaenidae), 4.– *Erebia tyndarus* (Nymphalidae), 5.– *Pyrgus fouquieri* (Hesperiidae), 6.– *Adscita globulariae* (Zygaenidae), 7.– *Hoplodrina alsines* (Noctuidae), 8.– *Chilodes maritima* (Noctuidae), 9.– *Alcis repandata* (Geometridae), 10.– *Catoptria permutatella* (Crambidae), 11.– *Monopis fenestratella* (Tineidae), 12.– *Cochylis dubitana* (Tortricidae).

13. Het asymmetrische genitaalapparaat van *Emmelina monodactyla* (Pterophoridae).

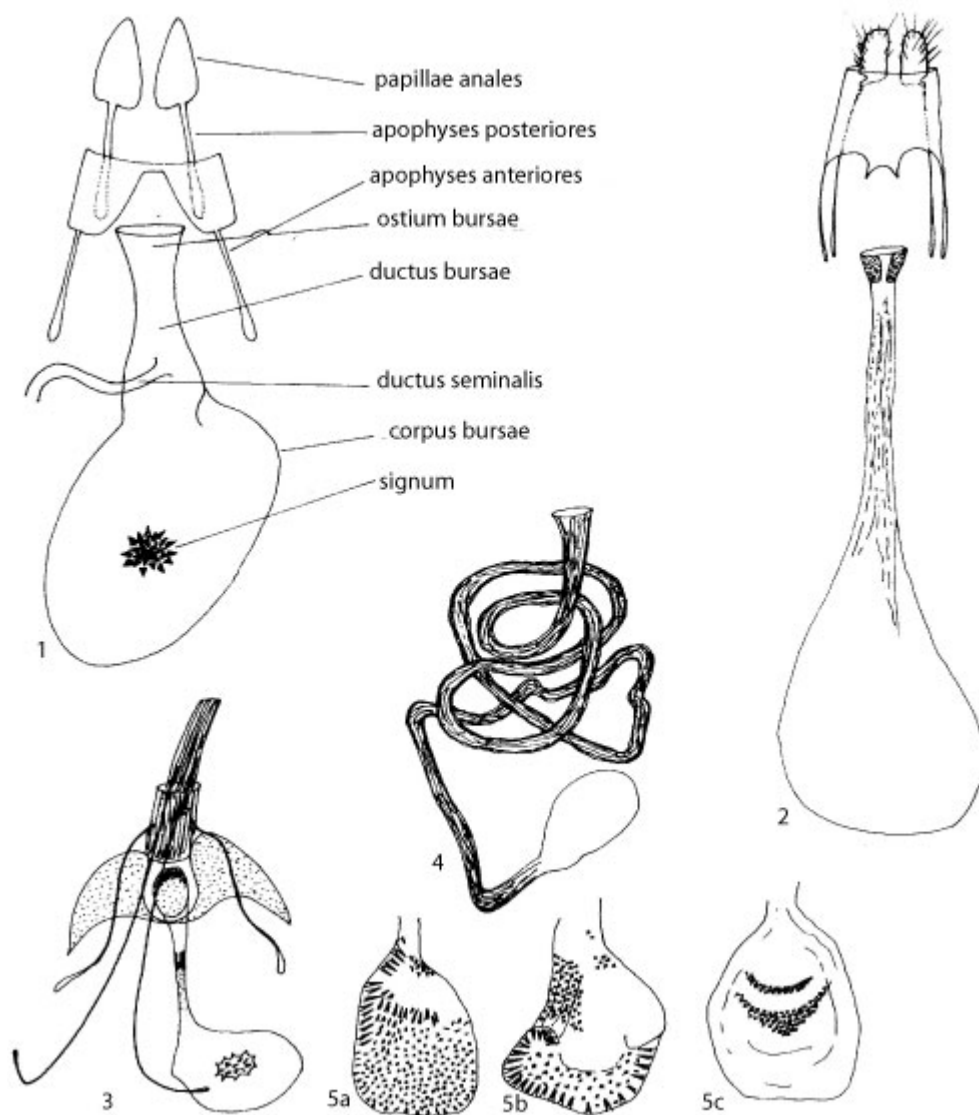


Figuur 9. Andere structuren op het achtste segment van mannelijke Lepidoptera:

1. Julliëns orgaan van a.– *Hipparchia alcyone*, b.– *Hipparchia fagi* (Nymphalidae, Satyrinae).
2. Ventraalplaatje van a.– *Eupithecia vulgata*, b.– *E. virgaureata*, c.– *Pasiphila rectangularata* (Geometridae).
3. Haakjes op het achtste segment van a.– *Epirrita dilutata*, b.– *E. autumnata*, c.– *E. christyi* (Geometridae).
4. Culcita van a.– *Ephestia kuehniella*, b.– *E. elutella*, c.– *Gymnancyla canella* (Pyrilidae).

5.2. Vrouwelijke genitalia (fig. 10)

Aan het uiteinde van het abdomen ziet men twee lamellen (de papillae anales) die samen de legbuis (ovipositor) vormen. Deze lamellen dragen de apophyses posteriores. De tergiet van het achtste segment draagt de apophyses anteriores. De onderlinge lengte van deze aanhangsels kan dikwijls gebruikt worden bij het determineren. Het ostium bursae is de genitaalopening langswaar het wijfje wordt bevrucht. Het geeft toegang tot de bursahals (ductus bursae) en die leidt tot in het corpus bursae, een zakvormige chitinestructuur, dikwijls gewoon bursa genoemd. Deze bursa kan soms aanhangsels hebben en is in vele gevallen voorzien van sterk gechitiniseerde plaatjes, tandjes of doorns; zij vormen het signum (meervoud: signa). Vanuit het corpus bursae, maar meestal vanuit de ductus bursae, vertrekt de ductus seminalis, een vrij zwak gechitiniseerd kanaal. Ook hierin kunnen zich gechitiniseerde structuren bevinden die belangrijk zijn voor de determinatie, maar hoofdzaak is de plaats waar deze ductus seminalis vertrekt. Rond het ostium bursae komen in vele gevallen de meest uiteenlopende chitinestructuren voor, die meestal aangeduid worden met de namen: genitaalplaat of sterigma.



Figuur 10. Vrouwelijke genitalia

1. Schematische tekening van de voornaamste onderdelen.

2. Preparaat van *Gnophos fuvata* (Geometridae).

3. Preparaat van *Ectropis crepuscularia* (Geometridae).

4. Preparaat van *Pedaria fascelinella* (Crambidae).

5. Corpus bursae van a.– *Eupithecia vulgata*, b.– *E. virgaureata*, c.– *Pasiphila rectangularata* (Geometridae).

6. Fotograferen en tekenen

In sommige gevallen zal men graag een afbeelding maken van het preparaat; dit kan door fotograferen of tekenen. Een foto van een genitaalapparaat heeft het voordeel dat er alles op te zien is zoals men het ook onder de microscoop ziet. In bepaalde gevallen is dit echter tevens een nadeel omdat belangrijke kenmerken gedeeltelijk bedekt worden door structuren die erover liggen. Soms ook kunnen de structuren onduidelijk zijn op de foto door de sterke beharing van het preparaat. In zulke gevallen is een tekening duidelijker omdat men daar het overbodige (beharig, plooien in vliezen, schaduwen enz.) kan weglaten, terwijl men anderzijds de belangrijke structuren of de kenmerkende verschillen kan accentueren. Vergelijk de afbeeldingen in figuur 11–2 en met figuur 13. Voor verdere literatuur over het afbeelden van vlinder genitalia kan men o.a. terecht bij Razowski & Swiecinski 1971 en Sattler 1972.

6.1. Foto's van preparaten (fig. 11–13)

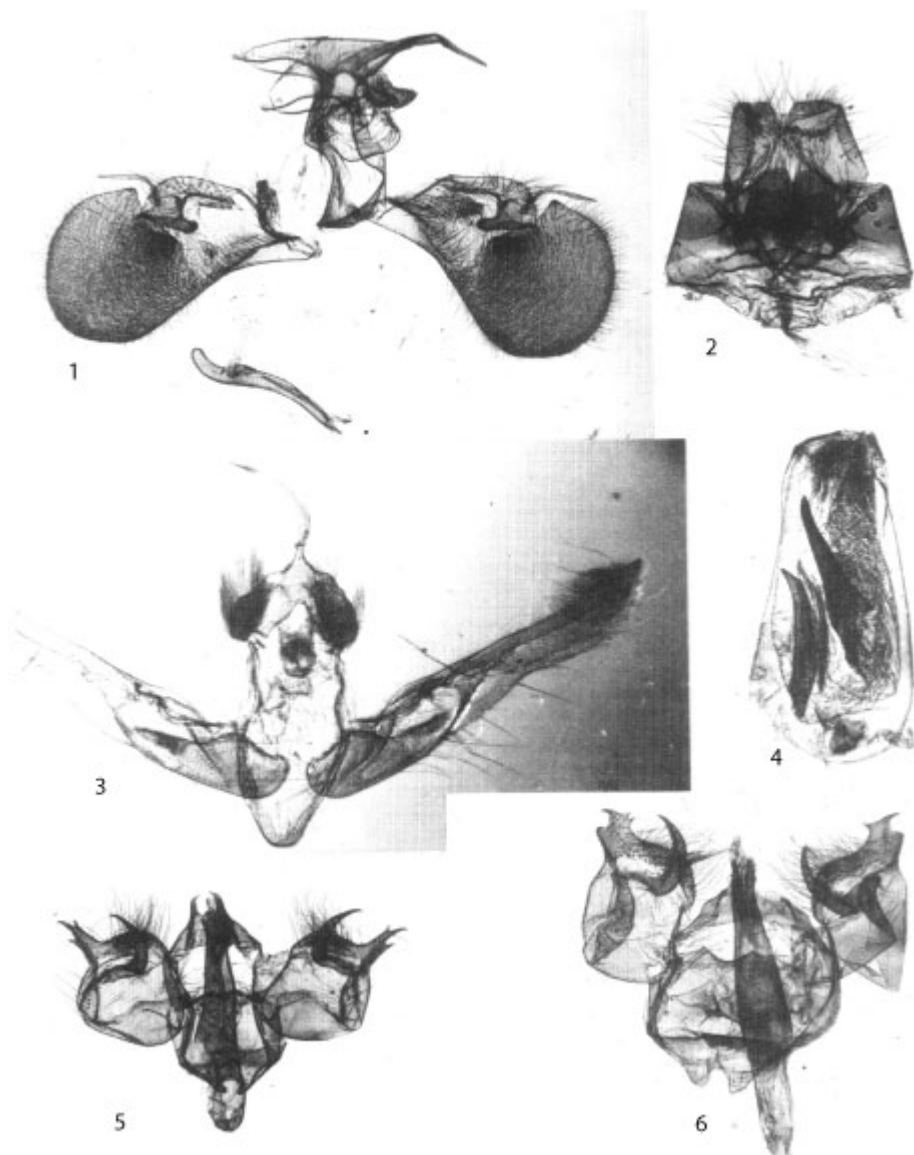
Het fotograferen van genitaalpreparaten doorheen een prepareermicroscoop was vroeger een lastige klus, die enkel kon geklaard worden door gebruik te maken van dure spiegelreflexcamera's, fototubes en allerlei andere hulpstukken. Bovendien was men dan nog niet onmiddellijk zeker van een goed resultaat omdat men op zijn minst een hele tijd moest wachten vooraleer de film ontwikkeld was en de foto's afgedrukt. Veel is verbeterd door de komst van digitale camera's. Zeker als men geen te hoge eisen stelt aan de kwaliteit van de foto, kunnen met een tamelijk eenvoudig toestel reeds behoorlijke resultaten bereikt worden, gewoon door te fotograferen doorheen het oculair, en dus zonder gebruik te maken van enig bijkomend hulpstuk. De kwaliteit van dergelijke foto's is waarschijnlijk redelijk laag en de foto's zijn enkel bruikbaar voor een print waarmee men de soort kan determineren.

Met digitale reflexcamera's, waarbij het objectief van de camera kan worden verwijderd, zodat die op een fototubus van de prepareermicroscoop kan worden aangesloten, bereikt men uiteraard betere resultaten. Enkel foto's gemaakt op deze wijze zijn geschikt om gebruikt te worden in publicaties.

Tegenwoordig bestaan er speciale digitale camera's die uitsluitend zijn ontworpen voor microfotografie. Zij worden rechtstreeks op de fototubus van microscopen aangesloten en leveren uiterst scherpe foto's. Zulke foto's zijn zonder meer bruikbaar, niet alleen voor determinatie, maar ook voor publicatie in wetenschappelijke artikels.

Bij het gebruik van digitale camera's vallen een deel van de vroegere belichtingsproblemen weg want dergelijke camera's zijn veel lichtgevoeliger en ze geven meestal ook wel de gewenste resultaten. De ingebouwde verlichting van de meeste microscopen is voldoende om er digitale foto's mee te kunnen maken. Anderzijds kan zeer nuttig gebruik gemaakt worden van koude lichtbronnen met twee of meer lichtarmen. Als men de foto later wil gebruiken voor publicaties, is het aan te raden om een zo groot mogelijke resolutie in te stellen.

Het voordeel van digitale foto's is dat men ze nog enigszins kan bijwerken. Zo kunnen eventuele stofdeeltjes of luchtbelletjes in het preparaat weggewerkt worden. Met de verschillende tekenpakketten kan het contrast vergroot of verlaagd worden om zo de meest geschikte foto te verkrijgen.



Figuur 11: Foto's van genitaalpreparaten gemaakt met een conventioneel fototoestel en afgedrukt op fotopapier.

1. *Pyrgus foulquieri* (Hesperiidae), ♂, Spanje, Catalonia, Esblada, 600 m, 05.viii.1973, leg. G. De Prins (prep. 432).
2. *Pyrgus malvoides* (Hesperiidae), ♀, Spanje, Catalonia, Solsona, 600 m, 06.viii.1973, leg. G. De Prins (prep. 431).
3. *Chilodes maritima* (Noctuidae), ♂, België, Antwerpen, Arendonk, 20.vi.1976, leg. J. Schuurmans (prep. 993).
4. *Eupithecia sobrinata* (Geometridae), ♂, aedeagus, België, Luxemburg, Restaigne, 07.viii.1975, leg. G. De Prins (prep. 579).
5. *Melitaea athalia* (Nymphalidae), ♂, Oostenrijk, Tirol, Schochenalptal, 1400 m, 21.vii.1972, leg. G. De Prins (prep. 278).
6. *Melitaea aurelia* (Nymphalidae), ♂, België, Luxemburg, Daverdisse, 24.vi.1973, leg. G. De Prins (prep. 387).

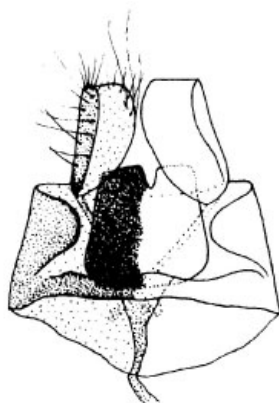


Figuur 12: Foto's van genitaalpreparaten van Tortricidae gemaakt met een digitaal fototoestel (niet bewerkt).

1. *Eugnosta percnoptila* (Meyrick, 1933), Holotype ♂.
 2. *Argyroplote hormoterna* (Meyrick, 1938), Lectotype ♂.
 3. *Geita bjoernstadi* Aarvik, 2004, Paratype ♀.
 4. *Eucosma regionalis* (Meyrick, 1934), Lectotype ♀.
- (preparaties Leif Aarvik, foto's Jurate De Prins).

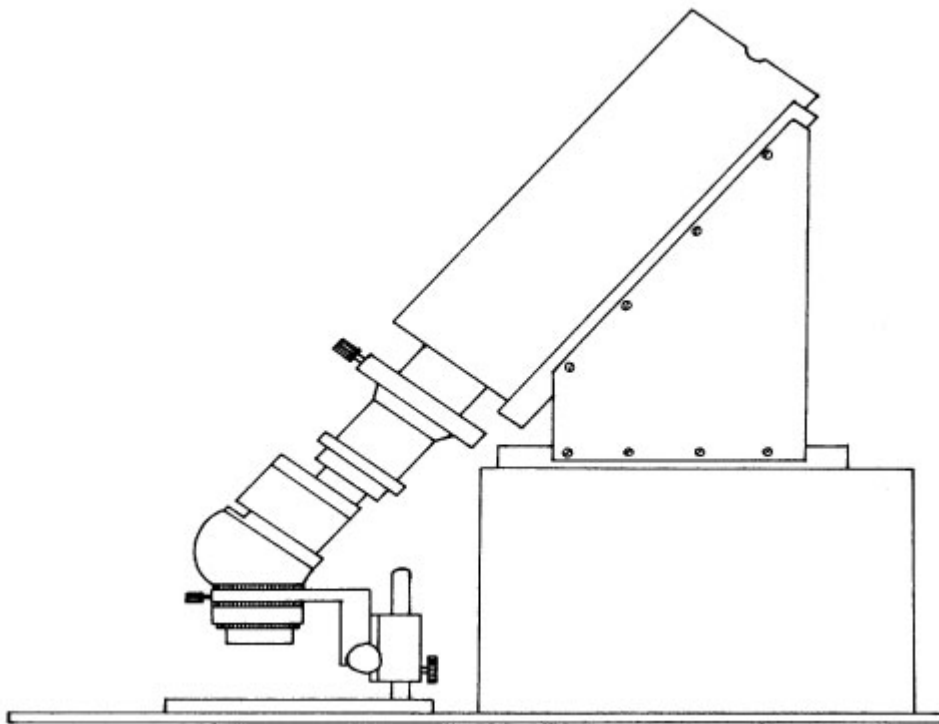
6.2. Tekeningen van preparaten

Wie een beetje kunstzinnig is aangelegd kan redelijk eenvoudig goede tekeningen van vlinder genitalia maken die uitstekend geschikt zijn om vergelijkingen te maken met gepubliceerde afbeeldingen en die zelfs gebruikt kunnen worden voor eigen publicaties. Zeker als het genitaal beschadigd is geraakt tijdens het prepareren, en men geen goede foto meer kan maken, is een tekening een uitstekend alternatief. Een grote moeilijkheid bij het tekenen van genitaalpreparaten is de omtrek en de grote vormen in hun juiste verhoudingen op papier te krijgen. Eens dat er zulke schets op papier staat, is het vrij eenvoudig om er de fijnere structuren bij te tekenen door rechtstreeks in de prepareermicroscop te kijken.



Figuur 13. Vrouwelijk genitaalapparaat van *Pyrgus malvoides* (Hesperiidae). Het linkerdeel van het preparaat werd met puntjes geschaduwd en het rechterdeel werd zeer schematisch gehouden. Vergelijk met nummer 2 in figuur 11.

Er bestaan verschillende hulpmiddelen om zulke omtrektekeningen te maken. Eentje daarvan is een oculair met een raster te gebruiken en het genitaal op geruit papier over te tekenen. Zulke oculairs zijn meestal erg duur. Bij grote preparaten is het mogelijk om een vel millimeterpapier onder het preparaat te leggen en zo de omtrek van het genitaal op geruit papier over te tekenen. Verder kan men het preparaat in een projector (een epidiascoop) stoppen en het projecteren op een blad papier. Opletten voor een te grote verhitting van het preparaat door de lamp van de projector! Verder kan men tekenspiegels gebruiken of tekenlenzen. Deze worden in de plaats van het oculair op de prepareermicroscoop bevestigd en zij geven een simultaan beeld van het preparaat en het blad papier. Het is echter nogal moeilijk om een goede belichting te krijgen van deze twee beelden. Wil men het preparaat goed zien, dan mag het papier niet te sterk verlicht worden en hoe minder men dit papier verlicht, hoe slechter men ziet waar de punt van het potlood blijft. Het vraagt dus wel enige ervaring om met deze hulpmiddelen behoorlijk te kunnen werken. Bovendien zijn ze duur en moeilijk te vinden en kunnen uitstekende resultaten evengoed verkregen worden met minder gesofisticeerde middelen. Zo is het b.v. best mogelijk een apparaat in elkaar te knutselen dat aangesloten wordt op het oculair van de prepareermicroscoop (fig. 14). Het toestel zelf is ongeveer 35 cm lang en op het einde rust een glazen plaat (10 × 15 cm) waarop een blad papier wordt gelegd. De belichting gebeurt langs onder. Het genitaalapparaat wordt zodoende op het blad papier geprojecteerd. De gewenste vergroting wordt geregeld door verschillende objectieven te gebruiken en door de afstand van de glazen plaat en het oculair te variëren. De binnenkant van dit toestel wordt mat zwart geschilderd om zoveel mogelijk strooilicht en weerkaatsingen te weren. Verder kan men best in een verduisterde kamer werken.



Figuur 14. Tekenapparaat op onderstel, aangesloten op het oculair van een prepareermicroscoop voor het tekenen van genitaalpreparaten. Het geheel staat op een glazen plaat waaronder een lichtbron is opgesteld.

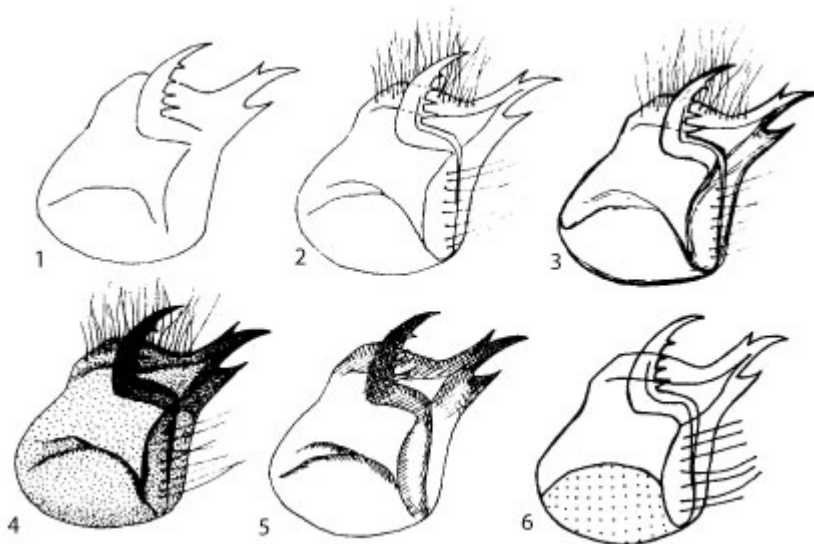
Veruit de gemakkelijkste manier echter is eerst een digitale foto van het preparaat te maken zoals hierboven besproken en dan via een print van deze foto de tekening af te werken. Zeker als het preparaat zelf niet al te best "gelukt" is, als bepaalde onderdelen afgebroken zijn en niet meer op de juiste plaats liggen, kan men het genitaal via een tekening weer volledig samenstellen. De foto zelf moet niet van de allerbeste kwaliteit zijn en kan gewoon doorheen het oculair worden genomen. Tijdens het printen kan men de gewenste vergroting kiezen.

6.3. Enkele praktische wenken

Wie genitaalpreparaten tekent, moet goed weten wat hij eigenlijk op papier zet. Een goede tekening is altijd subjectief; zij legt de nadruk op belangrijke kenmerken, terwijl storende lijnen en vlakken kunnen weggelaten worden. In de meeste gevallen worden tekeningen gemaakt van preparaten die reeds ingesloten zijn en waarvan de driedimensionale vorm tot twee dimensies wordt herleid. Uiteraard is het best mogelijk, en in sommige gevallen zelfs aangeraden, om tekeningen te maken van genitaalapparaten vóór het insluiten. Het insluiten veroorzaakt in de meeste gevallen immers een bepaalde vervorming van de driedimensionale structuren.

Zo bezit de bursa van de meeste *Eupithecia*-soorten talrijke inwendige doorns die belangrijk zijn voor de determinatie. Bij platdrukken vervormt de bursa enigszins de ligging van deze doornvelden en dikwijls komen chitineplooiën het geheel verwarren. In zulke gevallen legt men de bursa in een uitgeslepen objectglaasje waarin zich gedistilleerd water bevindt en men tekent ze, eventueel dorsaal, ventraal en lateraal, en sluit ze pas in na het tekenen. Sommige entomologen gebruiken onderaan in het water een laagje van zeer kleine glazen bolletjes of gewassen zand om het preparaat enigszins te kunnen vastzetten.

Het tekenen houdt in dat men vlakken en driedimensionale structuren voorstelt door lijnen en punten. De tekenaar werkt met zwarte inkt op wit papier en door enkele technieken te gebruiken kan hij met deze lijnen en punten toch een driedimensionale indruk geven of op zijn minst wat contrast in de tekening aanbrengen (fig. 15).



Figuur 15. Valve van *Melitaea athalia* (Nymphalidae) op verschillende manieren getekend.

1. Schematische figuur zoals ze op het tekenapparaat getekend wordt.
2. Dezelfde figuur, aangevuld met lijnen die de structuren vervolledigen en met beharing.
3. De structuur werd verduidelijkt met lengtelijnen.
4. Schaduw door punten.
5. Schaduw door dwarslijntjes.
6. Verkeerde tekentechniek: alle lijnen even dik, beharing stomp uitlopend, inplantingspunten niet aangeduid, rastervormige punktering.

6.3.1. Lijnen

De omtrek van het genitaalapparaat zal meestal door een lijn worden voorgesteld. Om nette tekeningen te krijgen, moet deze dun zijn en niet noodzakelijk overal even dik. Schaduwen tekent men door lange, dunne lijnen bij te zetten in dezelfde richting als de vorm van de structuren. Ook is het mogelijk om sterk gechitiniseerde delen aan te duiden door korte dwarslijntjes, loodrecht op de richting van de structuren. Nog sterkere contrasten krijgt men als men beide lijnsoorten gaat combineren. Er ontstaat dan een soort netwerk dat er donkerder uitziet naarmate men de lijntjes dichter bij elkaar tekent.

Het werken met lijnen geeft meestal op korte afstanden sterke contrasten en men kan er moeilijk fijne structuren, of overgangen van licht naar donker mee voorstellen. Men zal ze dus enkel gebruiken als men een bepaalde vorm wil doen uitkomen.

6.3.2. Punten

Met punten kan men kleine structuren voorstellen zoals een kuiltje waarin een doorn is ingeplant. Verder kan men er geleidelijke overgangen van licht naar donker mee aanduiden, door het aantal puntjes per oppervlakte-eenheid te vergroten. De puntjes moeten willekeurig verspreid staan en mogen dus niet in evenwijdige rijen worden neergezet. Men begint steeds met een afstand van 1 à 2 mm tussen elk punt. Voor zwak gechitiniseerde delen is dit reeds voldoende. Waar de chitine dikker is, zet men nieuwe puntjes in de open ruimten tussen de bestaande puntjes. Waar het nog donkerder moet, zet men weer puntjes bij enz.

Een nadeel van deze techniek is wel dat het oppervlak van het preparaat een ruw, gegranuleerd uiterlijk krijgt, terwijl het in feite effen is, althans in de meeste gevallen. Bovendien zijn de inplantingspunten van de haren niet meer zo duidelijk herkenbaar.

Met fijn tekenmateriaal bereikt men de netste resultaten. De tekeningen van figuur 15 werden gemaakt met een tekenpen van 0,15 mm dikte, behalve nr. 6 die met een 0,30 mm dikke pen getekend werd. In deze laatste tekening werden bovendien enkele veel voorkomende fouten begaan. Alle lijnen zijn even dik getekend. Wat boven ligt, moet dikker en met doorlopende lijn getekend worden, wat verstopt ligt onder andere chitinestructuren moet dun en liefst met streepjes- of puntlijnen worden getekend. De beharing is eveneens foutief aangebracht: geen groeipunt, de lijn is over haar hele lengte even dik, terwijl een haar op niets uitloopt. Ook de contrastaanduiding is foutief omdat de punten alle in evenwijdige rijen naast elkaar staan.

In figuur 15 staat voorgesteld hoe een tekening kan groeien. In het begin staat er slechts een omtrektekening, waarop hoogstens de belangrijkste structuren worden aangeduid. Deze schets is in potlood, en ontstaat op een van de methoden in punt 6.2. beschreven. De meer volledige tekeningen zijn gemaakt door rechtstreeks in de prepareermicroscop te kijken. Voor determinaties van het materiaal door vergelijking met foto's of tekeningen in artikels en boeken, zijn de figuren 2 en 3 meestal ruim voldoende. De tekening in figuur 4 gelijkt het meest op het reële preparaat en vertoont het best alle details, maar voor deze tekening was meer tijd nodig dan voor alle andere tekeningen samen.

7. Literatuur

- Aspöck, H. 1971. Grundsätzliche Bemerkungen zur Methodik der Präparation, Konservierung und Darstellung von Insekten-Genitalien. — *Zeitschrift der Arbeitsgemeinschaft Österreichischer Entomologen* **23**(2): 62–65.
- Bourgogne, J. 1963–1964. La préparation des armures génitales des lépidoptères. — *Alexandria* 3: 61–70, 111–118, 153–164, 195–206.
- Cribb, P. W. 1972 [1974]. An amateur's guide to the study of the genitalia of Lepidoptera. — *Amateur Entomologists' Society Leaflet* **34**: 1–16.
- De Prins, W. 1974. Genitaalpreparaten van vlinders. — *Phegea* **2**(2): 20–21.
- De Prins, W. 1981. Genitalia van Lepidoptera prepareren en afbeelden. — *Entomobrochure* **1**: 1–32.
- Fernández-Rubi, F. 1980. Contribución a la técnica de disección, preparación y tinción de las armaduras genitales (Genitalia) de los lepidópteros. — *Butlletí de la Societat catalana de Lepidopterologia* **28**: 11–18.
- Font-Bustos, J. M. 1979 [1980] – 1980 [1981]. El aparato reproductor de los insectos. — *Shilap, Revista de lepidopterologia* **7**(28): 279–285; **8**(29): 51–55, (30): 123–126, (32): 266.
- Klots, A.B. 1970. Lepidoptera. – In: Tuxen, S. L. (ed.), *Taxonomist's glossary of genitalia in Insects, second and enlarged edition*. — Copenhagen, chapter pagination 115–130.
- Kroon, D. M. 1973. A beginner's guide to elementary genitalic slide preparations. — *Entomologist's Record and Journal of Variation* **85**: 215–216.
- Razowski, J. & Swiecinski, J. 1971. Illustrations of genital armatures of insects in scientific publications. — *Acta zoologica cracoviensia* **1971**: 267–289.
- Robinson, G. S. 1976. The preparation of slides of Lepidoptera genitalia with special reference to the Microlepidoptera. — *Entomologist's Gazette* **27**: 127–132.
- Sattler, K. 1972 [1973]. Bemerkungen zur Behandlung und Darstellung von Lepidopteren-Genitalien. — *Zeitschrift der Arbeitsgemeinschaft österreichischer Entomologen* **24**(1–2): 86–88.
- van Doesburg, P. H. 1980. Genitalia vials from PVC tube. — *Entomologische Berichten, Amsterdam* **40**(12): 177–178.
- Venable, G. L. 1984. Scientific illustration and its reproduction: a self-help overview. — *Bulletin of the Entomological Society of America* **30**(1): 9–15.

