Handleiding bij de cursus genitaalpreparaten maken

(versie februari 2022)

Rob de Vos
Naturalis Biodiversity Center, Leiden

Inleiding

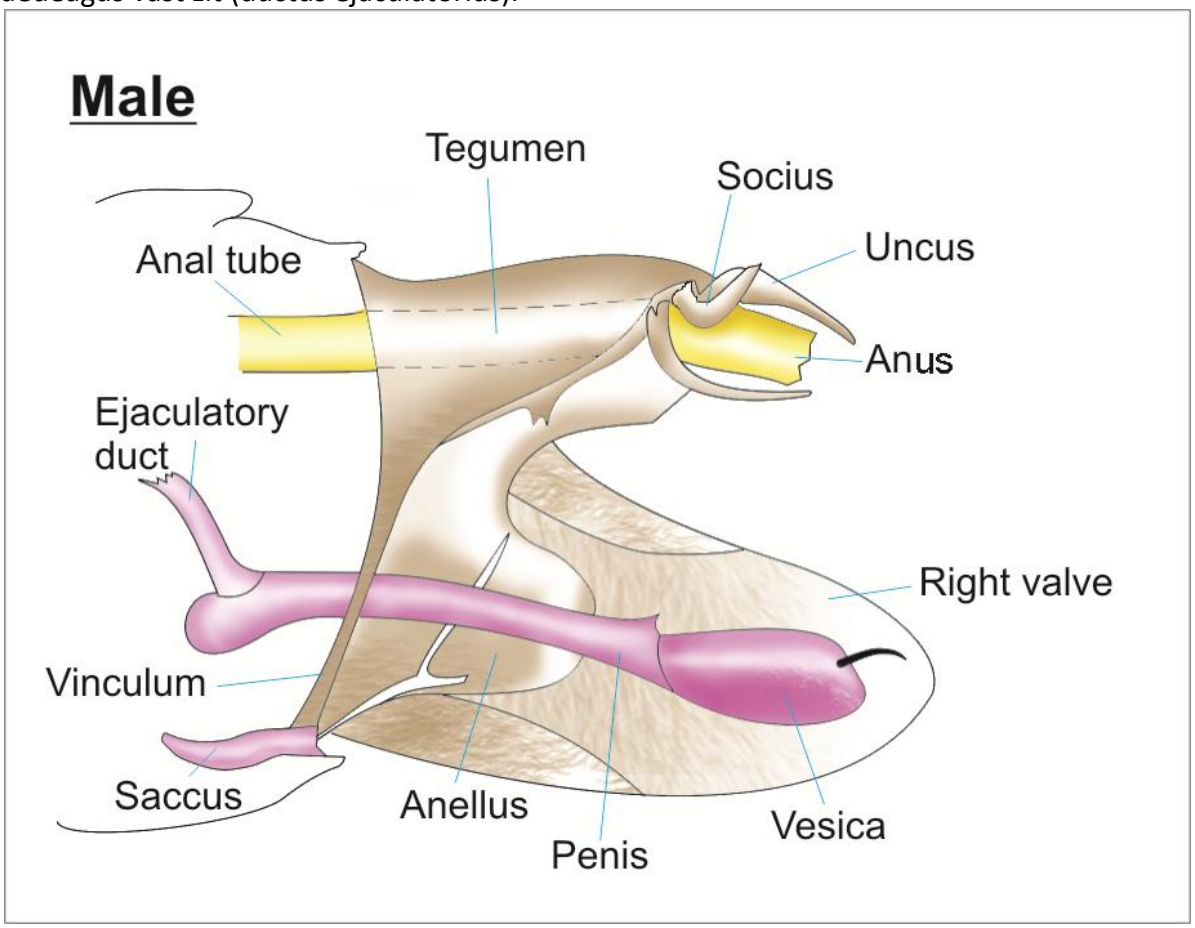
Als voorbeeld worden hier vlinders gekozen, maar in principe geldt onderstaande ook voor andere insecten, al zal dit in detail verschillen.
Bij onderzoek aan vlinders voor determinatie en verwantschappen (systematiek en evolutie) worden behalve vleugelvormen en –patronen en DNA ook vaak de genitalia van vlinders bestudeerd.
Mannelijke genitalia van vlinders bevatten veelal harde (chitine) structuren en zijn soortspecifiek, waardoor ze uitermate geschikt zijn voor determinatie. Ze bestaan meestal uit een frame, waaraan verschillende structuren zijn opgehangen, zoals een uncus en twee valven (soort tangetje, waarmee het vrouwelijk genitaal wordt vastgehouden) die meestal kenmerkende structuren en vormen hebben. Bovendien is er een aedeagus (= penis) die ook grotendeels uit harde chitine bestaat en waarin zich allerlei diagnostische kenmerken kunnen bevinden, zoals een vesica met cornuti (enkelvoud cornutus).
Het vrouwelijk genitaal is zachter van structuur, maar bevat tóch kenmerkende structuren, zoals een ostium, antrum, bursa copulatrix en verharde signa (enkelvoud signum).
Het prepareren van een mannelijk of vrouwelijk genitaal vereist beide aparte technieken, hoewel de basis (macereren, schoonmaken, kleuren, inleggen) hetzelfde blijft.
In deze inleiding wordt in een notendop uitgelegd hoe men een genitaalpreparaat maakt, maar het belangrijkste is het zelf en vaak doen, zodat je ervaring krijgt.
Belangrijk is dat je alles van tevoren klaarlegt wat nodig is, de gereedschappen en de chemicaliën. En ook niet onbelangrijk, werk netjes en schoon en neem er vooral de tijd voor. Met haast kun je geen goed preparaat maken.

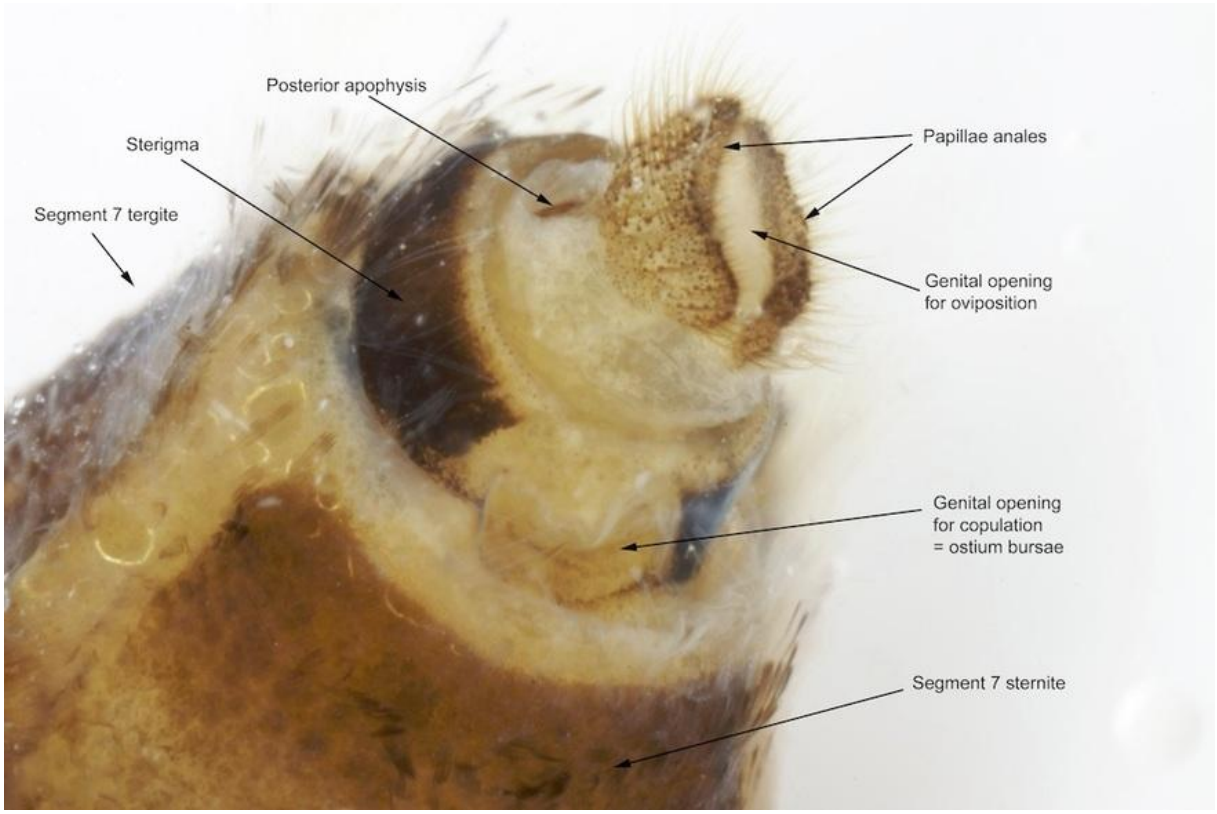
Waar en wat?

Om een genitaal van een vlinder of ander insect op een correcte manier uit te prepareren is enige kennis nodig over de anatomie van, in dit geval, de vlinder. Het genitaal zit aan het uiteinde van het achterlijf, maar er zijn structuren die bij het genitaal horen die tot ver naar voren in het abdomen kunnen doorlopen. Het is dus altijd noodzakelijk om het HELE abdomen af te breken en voor het uitprepareren te gebruiken. Er zullen enige termen de revue passeren. Daarom volgt hierna ook een lijst met terminologie om de namen van de onderdelen die jullie tegenkomen te leren kennen.

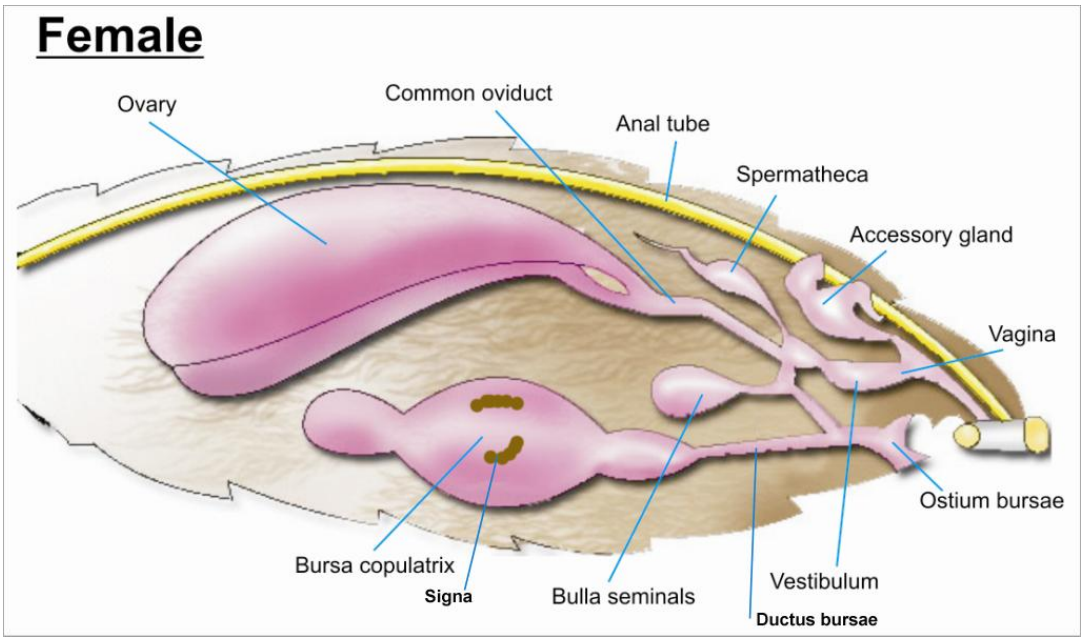
Het zal je niet verbazen dat ook bij insecten het mannelijk genitaal anders gebouwd is dan het vrouwelijk genitaal. Beide moeten daarom ook op een andere manier worden uitgeprepareerd.
In deze handleiding zullen de handelingen vaak in schematische tekeningen (“doodles”) worden aangegeven.

Mannelijk genitaal: Het genitaal van het mannetje bestaat vooral uit een frame, waaraan twee klepjes (de valven) hangen en een haakvormige structuur (de uncus). De eigenlijke penis (aedeagus) hangt tussen spieren en vliezen in het midden van het frame (tegumen en vinculum). Het enige dat van het mannetje ver het abdomen in kan reiken is een uitsteeksel (saccus) van het onderste deel van het frame (vinculum) en een vliezige buis dat aan de aedeagus vast zit (ductus ejaculatorius).





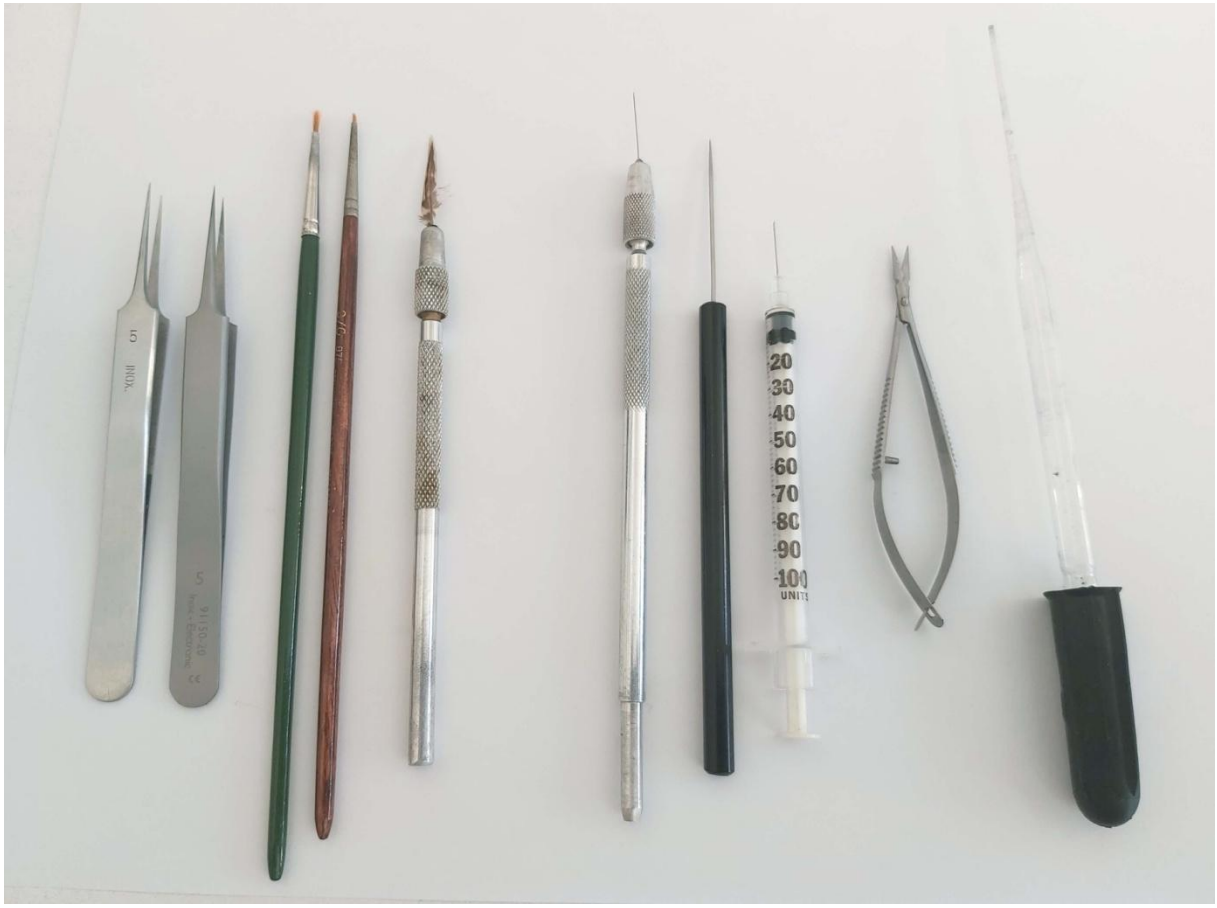
Vrouwelijk genitaal: Het vrouwelijk genitaal bestaat uit veel zachte structuren en is daarom moeilijker uit te prepareren. Ook zijn de vormen van de structuren minder duidelijk, waardoor het determineren aan de hand van vrouwelijke genitalia lastiger is, maar er zijn altijd harde onderdelen in het genitaal aanwezig die een kenmerkende vorm kunnen hebben, zoals in de ductus bursae en de signa. In onderstaand schema staat veel meer ingetekend dan in een preparaat bewaard wordt. Het hele bovenste gedeelte, inclusief ovaria, wordt niet bewaard, omdat dit zeer vliezig is en niet voor determinatie geschikt is. Het onderste deel vanaf de papillae analis (zie foto hierboven) tot en met de bursa copulatrix wordt wel bewaard en is na behandeling met KOH 10% (maceratie-proces) nog goed zichtbaar.



Terminologie

Abdomen = achterlijf
Aedeagus = penis
Bulla seminalis = bij het vrouwelijk genitaal, een zakje waarin van man ontvangen sperma in bewaard wordt
Bursa copulatrix = een zakvormige structuur waarin eieren en sperma bewaard worden
Caudaal = uiteinde naar de kopkant toe
Cervix bursae = voorkamer van de bursa copulatrix, vergelijkbaar met baarmoederhals
Coecum = achterkant van de aedeagus
Cornuti = (meervoud van cornutus) harde vaak doornachtige structuren op de vesica
Distaal = uiteinde naar de punt van het abdomen (genitaal) toe
Dorsaal = rugzijde
Ductus bursae = buis tussen het distale deel van het vrouwelijk genitaal en bursa copulatrix
Ductus ejaculatorius = buis aan de aedeagus naar spermavormende organen
Ductus seminalis = dun buisje aan de cervix bursae in het vrouwelijk genitaal naar de bulla seminalis (waarin sperma ontvangen van mannetje wordt opgeslagen)
Lateraal = zijkant
Segment = verharde (chitine) geleding van het insect, verbonden met andere geledingen
Setae = diep gewortelde haren (vast), niet te verwarren met haarschubben (los)
Signa = (meervoud van signum) harde kenmerkende structuren op de bursa copulatrix
Spermatofoor = een lange trompetvormige structuur in de bursa copulatrix, gevormd door mannelijk eiwit om de sperma te geleiden
Sterniet = buikplaat (van lichaamssegment)
Stigma = ademopening aan de laterale zijde van het abdomen in de zachte filamenten
Tegumen = bovenste (distale) helft van het mannelijke genitaalframe
Tergiet = rugplaat (van lichaamssegment)
Thorax = borststuk
Tracheeën = een netwerk van dunne en dikkere transparante adembuisjes
Uncus = anker, haakt in het vrouwelijk genitaal, zit op de top (dorsaal) van het genitaal
Ventraal = buikzijde
Vesica = uitstulpbare ballon in de aedeagus, waarop vaak cornuti zitten
Vinculum = onderste (caudale) helft van het mannelijke genitaalframe

Gereedschappen



Per persoon is een aantal soorten gereedschap essentieel. Goed gereedschap is het halve werk. Er is veel in de handel verkrijgbaar (o.a. bij www.vermandel.com), maar sommige instrumenten kun je of moet je zelf maken. Onderstaande instrumenten worden toegelicht:

- **twee fijne puntpincetten**

Voor microscopisch werk zijn fijne puntpincetten nodig, in elk geval twee stuks. Brede pincetten of verenstaal pincetten zijn niet geschikt voor dit werk. Bij www.vermandel.com kun je prima “microscopie-pincetten” kopen. De beste zijn van het Zwitserse Dumont, maar zijn erg duur.

- **twee fijne penseeltjes (liefst marterhaar) en vogelveerpenseeltje**

Voor het poetswerk, maar ook om breekbare structuren te hanteren, zijn heel fijne penseeltjes essentieel. Deze moeten van goede kwaliteit zijn, omdat je constant in alcohol werkt. Synthetische haren zullen dan gaan kroesen of afbreken, dus gebruik marterhaar. Voor het allerfijnste werk kun je een duimveertje van een watersnip gebruiken, die zijn zeer bekend bij kunstschilders. Dit zeer fijne en duurzame veertje gebruik je om de laatste hardnekkige schubben van een genitaal te poetsen. Voor het veertje moet je wel zelf een houder maken (bijvoorbeeld van een afgeknipt penseeltje).

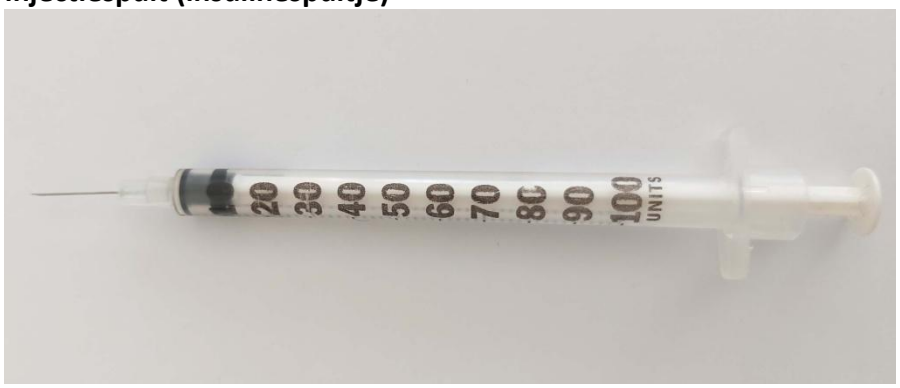
- **een normale en fijne prepareernaald (gemaakt van een insectenspeld)**

Voor sommige handelingen is een scherpe en dunne prepareernaald nodig, bijvoorbeeld een gaatje prikken of scheuren of in positie leggen van een object. Een zeer fijne prepareernaald kan gemaakt worden van een insectenspeld in een penseelhouder.

- **microschaartje (soms nodig om weefsel door te knippen)**

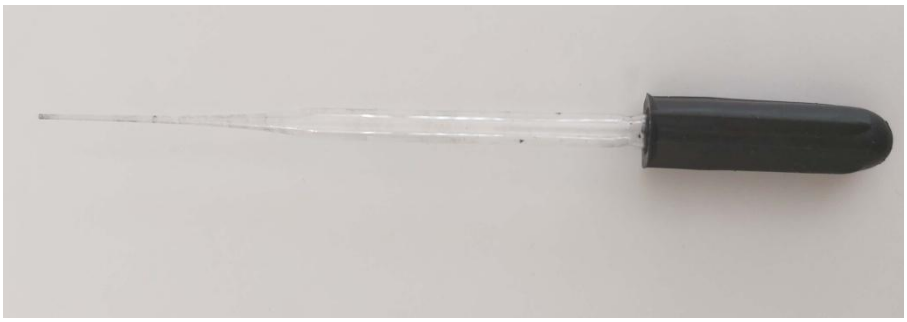
Voor het lateraal openknippen van het abdomen (alleen nodig bij erg grote achterlijven) is een microschaartje ideaal. Soms ook om ander weefsel door te knippen.

- **fijne injectiespuit (insulinespuitje)**



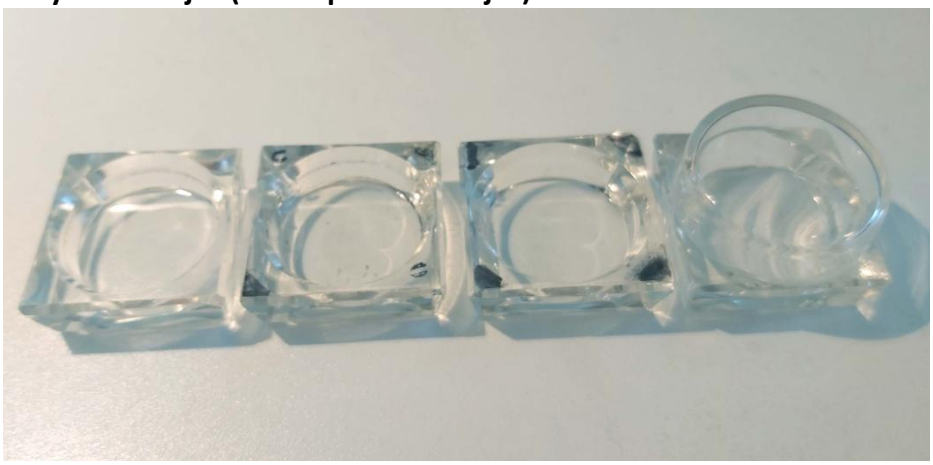
Een fijne injectienaald is nodig om de vesica van de aedeagus uit te blazen. De fijnste die in de handel voor redelijke prijs (of gratis) te verkrijgen is zijn insulinespuitjes. Dit kan alleen als de aedeagus dik genoeg is.

- **pipet**



Een pipet is nodig om enkele druppels chlorazol black aan de 30% alcohol toe te voegen. Als de chlorazol black in een druppelflesje zit heb je geen pipet nodig.

- **4 embryo-schaaltjes (kleine petrischaaltjes)**



Zonder deze schaaltjes kun je niet prepareren. In principe zijn alle kleine glazen schaaltjes goed, maar ze moeten niet te klein (geen werkruimte) of te groot (drijft alle kanten op) zijn. Gebruik geen plastic, omdat dit snel krast en mat of dof wordt door de alcohol.
Merk de verschillende schaaltjes met een markeerstift om de verschillende stoffen uit elkaar te houden.

- **objectglaasjes (preparaatglaasjes)**

De meest gebruikte objectglaasjes zijn vlak, maar er zijn ook dikkere glaasjes met één of twee uithollingen. Deze kun je gebruiken voor dikkere objecten, bijvoorbeeld van grote vlinders. Het voorkomt dat alle euparal wegloopt onder het dekglaasje vandaan. Pas wel op voor ingesloten lucht, de holte moet dus helemaal zijn opgevuld met euparal.

- **dekglaasjes (18 mm)**

Dekglaasjes komen bovenop het preparaat om het geheel voor de eeuwigheid goed af te dekken. Ze moeten schoon en helder zijn, want hierdoor kijk je door een microscoop naar het preparaat. De meest gangbare maat voor dekglaasjes is 18 mm. Ze zijn vierkant of rond verkrijgbaar. Het maakt niet uit welke vorm je gebruikt, maar onder vierkante dekglaasjes is meer ruimte. Wél moet je dan oppassen dat de bij het harden terugtrekkende euparal de hoeken niet blootlegt, dus regelmatig bijtanken totdat de hoeken gesloten blijven.

- **fijne markeerstift of glaskras-pen**

Om een voorlopig nummer op het preparaat te schrijven gebruik je een watervaste markeerpen of een glaskras-pen (een metalen pen met diamantstof of glas te krassen).

HOUD JE INSTRUMENTEN SCHOON! Om te voorkomen dat je door het werken met euparal of euparal-essence kleverige pincetten of vingers krijgt was je ze schoon met 95% alcohol. Wacht nooit te lang om dit te doen, want anders verpest je je gereedschap.
LET OP! Penselen gebruik je **NOOIT** in de euparal, uitsluitend in de alcohol! In euparal (essence) werk je uitsluitend met metalen gereedschap, zoals pincetten en prepareernaalden.

Chemicaliën

Bij het prepareren van genitalia zijn enkele chemicaliën onmisbaar. Werk altijd in een goed geventileerde omgeving en werk schoon. In het laboratorium gebruik je een puntafzuiging. Zet flesjes en schaaltjes op een veilige afstand van armen en ellebogen, want je bent soms met meerdere dingen tegelijk bezig, waardoor een ongelukje snel gebeurd is en vervelende gevolgen kan hebben. De volgende chemicaliën zijn onmisbaar voor een goed resultaat:

- Kaliumhydroxide (KOH) 10% (opgelost in water)
- Alcohol 30% (ruime hoeveelheid)
- Alcohol 95%

- Euparal Essence
- Euparal
- Chlorazol Black (of mercury-chroom of eosine) [let op: GIFTIG!]

Bewaar alles in goed sluitende verpakkingen.

Werking van de chemicaliën

KOH 10%: De eerste stof die je gebruikt is KOH 10%. Deze stof kun je als korrels in de handel kopen (meestal als gootsteenontstopper). Je verdunt het tot 10% door één deel korrels in 9 delen water op te lossen. Let op, dit moet je ruim vóór gebruik doen, omdat de verse KOH in water erg heet wordt en belletjes gaat vormen. Pas de volgende dag is de oplossing bruikbaar. KOH macereert de chitine (maakt het doorschijnend en zacht) en lost vetten en spierweefsel op. Je kunt KOH zowel koud als warm gebruiken. Met koude KOH moet een abdomen gemiddeld een nachtje tot 24 uur staan om zijn werk te doen, au-bain-marie opgewarmde KOH werkt sneller, maar is ook destructiever voor tere weefsels en wordt dus afgeraden voor delicaat en serieus werk. Als je KOH op je vingers of handen krijgt moet je dit direct afwassen, want het lost ook langzaam je eigen huid op, het voelt dan glad en zeepachtig aan. KOH mag (in kleine hoeveelheden) gewoon door de gootsteen worden weggespoeld met ruim water, het wordt immers ook gebruikt als gootsteenontstopper.

Alcohol 30%: Deze sterk met water verdunde alcohol wordt gebruikt om het abdomen met genitaal vanuit KOH te spoelen en schoon te maken. Het neutraliseert direct de macererende werking van KOH en het maakt het abdomen aan de buiten- en binnenkant schoon bij het poetsen van de vlinderschubben. Het voordeel boven puur water is dat de oppervlaktespanning van de vloeistof met alcohol minder is, het abdomen met vetresten (lichter dan water) komen dan minder naar bovendrijven. Er moet wel één of een paar keer alcohol worden ververst vanwege het vet en vuil dat van het abdomen loskomt.
Ook wordt 30% alcohol gebruikt om chlorazol black in op te lossen (zie onder).

Alcohol 95%: Absolute alcohol (95-100%) wordt gebruikt om het preparaat te fixeren. Het is sterk hygroscopisch (onttrekt water van het preparaat) en droogt het preparaat dus uit. Het schoongemaakte preparaat wordt in de juiste stand voor enkele minuten hierin gelegd om deze stand vast te houden. Je kunt in dit stadium beter niet meer poetsen, want dan kan het preparaat gaan scheuren of breken, de chitine wordt namelijk harder en bros. Euparal lost op in 95% alcohol, dus gemorste euparal aan vingers, instrumenten of tafel kan hiermee worden weggepoetst. Wél daarna goed de handen wassen, want alcohol 95% is licht carcinogeen.

Euparal Essence: Dit goedje ruikt erg sterk en daarom moet er goed geventileerd worden wanneer het wordt gebruikt. Het zit meestal in een druppelflesje. Het is het bad voor het preparaat tussen alcohol 95% en euparal in, de feitelijke eindbestemming. Het zorgt ervoor dat het preparaat de laatste lucht en alcohol kwijtraakt en maakt het oppervlak van het preparaat klaar voor euparal. Als euparal-essence wordt overgeslagen heb je kans dat er grote luchtbellen ontstaan in het preparaat die er niet of lastig uitgaan, en dat kan een preparaat volledig verpesten. Dek het schaaltje (het bad) met euparal-essence altijd goed af, anders ruikt de hele ruimte ernaar. Gebruik een puntafzuiging!

Euparal: Euparal is een soort kunsthars op basis van natuurlijke stoffen, zoals eucalyptus- en kruidnagelolie. Ook euparal ruikt sterk, maar minder dan euparal-essence. Het heeft een goede lichtbreking en is daarom geschikt voor microscopische preparaten. Nadeel van euparal is dat het erg lang duurt voordat het hard geworden is. Afhankelijk van de gebruikte hoeveelheid kan het wel een maand tot zelfs een jaar duren voordat de kleverige en stroperige massa niet meer druipt en dus rechtop bewaard kan worden. Beter is het daarom om preparaten altijd horizontaal te bewaren (dus met de preparaatdozen rechtop als een boek).

Chlorazol black: Als een preparaat gekleurd moet worden, vanwege doorzichtig en zeer dun weefsel, dan wordt chlorazol black aangeraden. Dit kleurt dun weefsel blauw en laat de

geelbruine chitine ongemoeid. Mercury chrome is fel oranje en kleurt behalve het dunne weefsel donker oranje ook de chitine oranje. Het hangt er dus vanaf wat je gekleurd wilt hebben. Beide stoffen zijn nogal giftig en mogen niet door de gootsteen gespoeld worden.

Handelingen stap voor stap

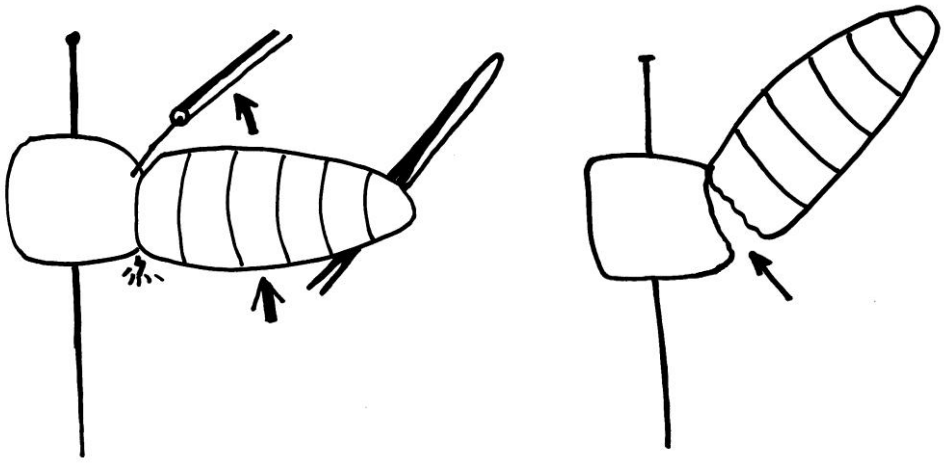
HANDELING 1: abdomen afbreken

De allereerste handeling bij het prepareren is van de geselecteerde vlinder het HELE abdomen afbreken, dus niet alleen het laatste gedeelte waarin het feitelijke genitaal zit. Dat moet, omdat je van tevoren niet kunt weten hoe ver het genitaal met onderdelen in het lichaam reikt, sommige delen kunnen net zo lang zijn als het hele abdomen!

Voor het afbreken van een abdomen van een opgezette vlinder prik je de vlinder zo diep mogelijk in een laag piepschuim of itex. Probeer langsliggende poten niet mee af te breken.

Het abdomen zit met een schuin schot verbonden met de thorax. Bij het afbreken moet het abdomen daarom naar boven toe geduwd worden, want daar zit het “draaipunt”. Als je het naar beneden toe beweegt duw je tegen het schot aan en heb je kans dat het abdomen beschadigd of dat zelfs een deel van de thorax (metathorax) afbreekt met achtervleugels en al. In sommige gevallen gebeurt dat evengoed, ook wanneer je het naar boven toe duwt. In zulke gevallen moet je wat rigoureuzer te werk gaan (vraag assistentie) en moet je abdomen en metathorax van elkaar scheiden met pincet en prepareernaald.

- Houd een prepareernaald of pincet op het draaipunt (dorsale verbinding tussen thorax en abdomen) en duw met een andere prepareernaald of pincet aan de ventrale kant het abdomen omhoog. Als het goed is laat het abdomen makkelijk los en het laatste stukje trek je los met een pincet.
- Het abdomen stop je in een afsluitbaar potje of buisje waarin zich KOH 10% bevindt. Bij koude KOH (aanbevolen) wacht je ongeveer 12-24 uur (al naar gelang de afmeting) voordat je het abdomen gaat schoonmaken.



HANDELING 2 (de volgende dag): stoffen klaarzetten

Zet allereerst 4 spoelbadjes (embryoschaaltjes of petrischaaltjes) klaar met de stoffen die je nodig hebt. Zet ze op een veilige afstand van je armen vandaan, zodat ze niet per ongeluk worden omgestoot.

- 1^{e} schaaltje bevat 30% alcohol

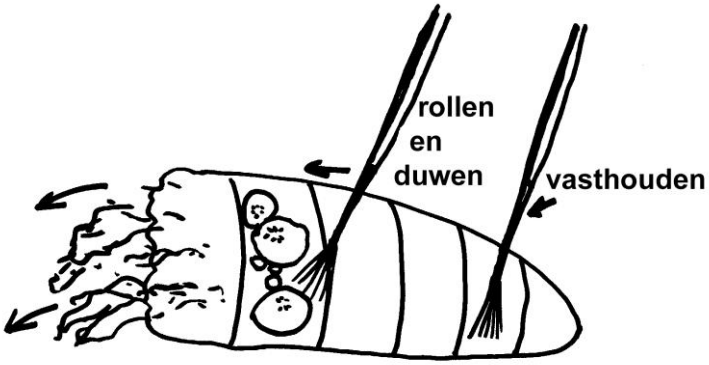
- 2e schaaltje bevat 95% alcohol (merk het met een stift om verwarring te voorkomen)
- 3e schaaltje bevat 30% alcohol met twee druppels chlorazol-black
- 4e schaaltje bevat euparal essence, afgedekt met een dekseltje tegen de geur

Zorg dat je voldoende 30% alcohol in een spuitfles hebt, want hier gebruik je het meest van.

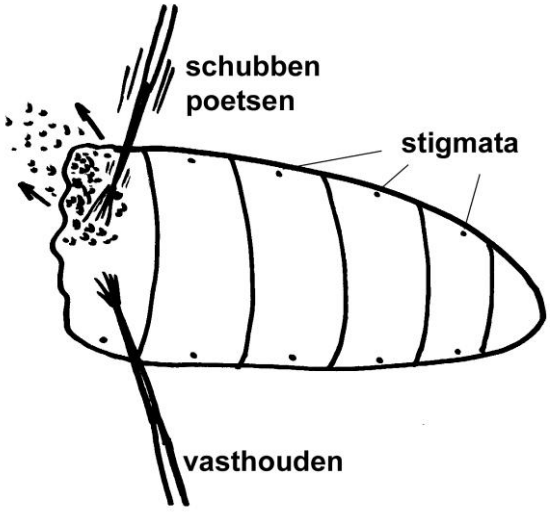
HANDELING 3: Schoonmaken

Pak met een pincet het inmiddels gemacereerde abdomen uit het potje met KOH en leg het in het 1e schaaltje (30% alcohol). Het maceratieproces is nu gestopt.

- Onder de microscoop met doorvallend licht (van onderen) werk je eerst met de twee penselen de luchtbellen en het meeste overtollige vet en smurrie van distaal naar caudaal door te rollen, kloppen en te duwen.



- Daarna begin je met ontschubben. Let er op dat de stigmata (ademopeningen) aan de zijkant zitten. Doe één kant tegelijk en per segment, keer daarna het abdomen om. Je poetst voorzichtig met de fijne penseel de schubben er zoveel mogelijk af, met de andere penseel houd je het abdomen vast op hetzelfde segment als waar je gaat poetsen, doe dit niet met de pincet, want dan beschadig je het abdomen. Soms laten schubben makkelijk los (soms zelfs in plakken tegelijk), maar er zijn ook heel hardnekkige schubben. Probeer het al zichtbare genitaal nog met rust te laten, hooguit poets je al wat lange haren weg.



- Als de alcohol te vies is geworden van de schubben en het vet kun je het verschonen. Eerst het abdomen uit het schaaltje vissen en in een tijdelijke omgeving brengen, bijvoorbeeld een dopje of potje met alcohol 30%. Maak dan het oorspronkelijke

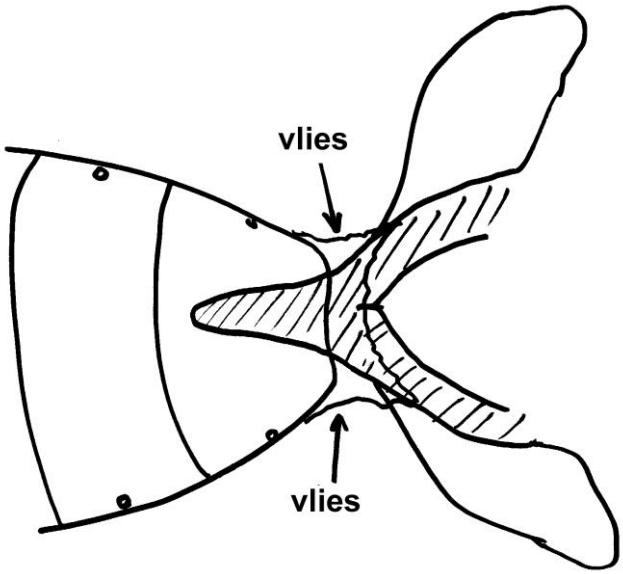
glaasje schoon en doe er verse alcohol 30 % in. Leg daarna het abdomen terug om weer verder te gaan.

HANDELING 4: scheiden van genitaal en abdomen

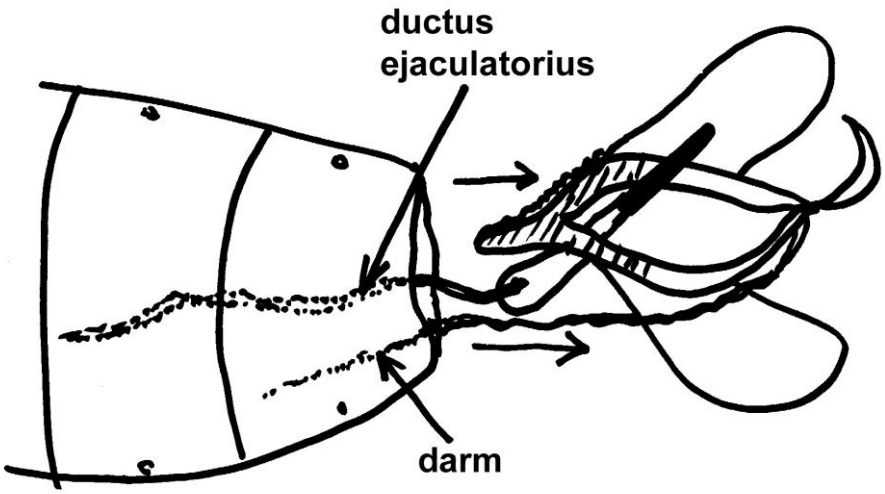
Als alle of zoveel mogelijk schubben verwijderd zijn gaan we het genitaal van het abdomen scheiden. Neem nu twee puntpincetten in je handen. Het scheiden van abdomen en genitaal gaat langs de natuurlijke zwakke verbindingen, namelijk de zachte filamenten tussen de segmenten in.

Bij mannelijke genitalia:

- Pak met een pincet zo dicht mogelijk bij het genitaal het abdomen beet, liefst onder de rand van het vinculum. Prik met de andere puntpincet door het vlies wat vinculum en abdomen met elkaar verbindt en probeer voorzichtig de scheur groter te maken. Je zult zien dat het vlies langs de rand van het vinculum afscheurt. Doe dit langs de hele rand en help het scheuren waar nodig een beetje.



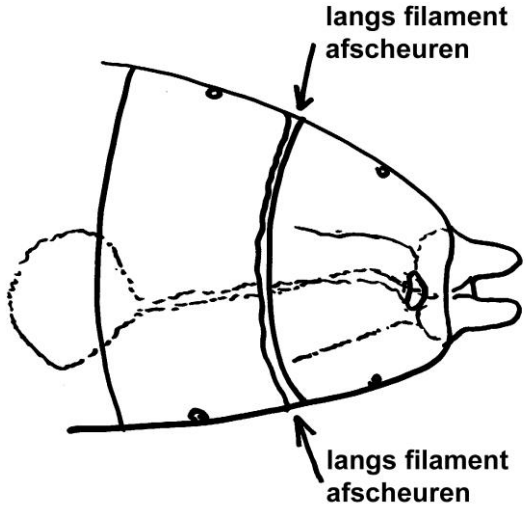
- De lange darm en de ductus ejaculatorius zijn het enige dat nu nog in het abdomen zitten, maar die trek je er gewoon helemaal uit. De darm, die verbonden zit aan de achterkant van de uncus, verwijder je met de puntpincetten aan de basis van de uncus. De darm wordt niet in het preparaat bewaard.



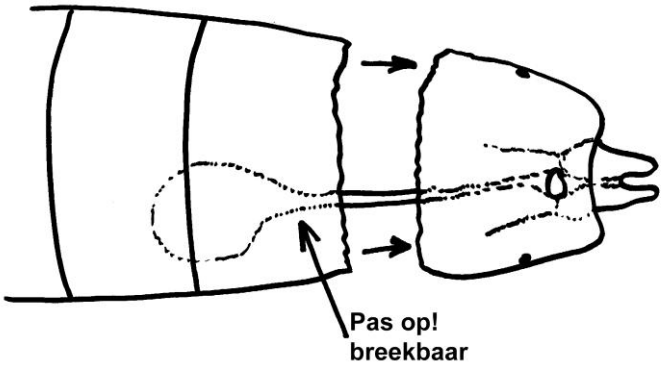
- Poets nu met de vogelveer de schubben weg die eventueel nog op het genitaal zitten. Diepgewortelde haren (setae) laat je zitten, die horen daar. Bij hardnekkige schubben gebruik je de fijne penseel.

Bij vrouwelijke genitalia:

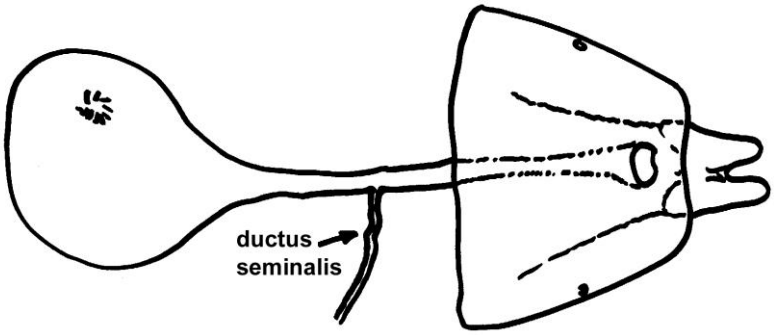
- Pak met een pincet het laatste distale segment lateraal zo dicht mogelijk aan de caudale segmentrand beet. Pak met de andere pincet het voorlaatste segment daar tegenover beet aan de distale rand, daar waar ook een stigma-opening zit. Maak voorzichtig een scheurtje en scheur het filament dan als een ritssluiting verder open langs de rand van beide segmenten en volg de rand rondom. Je mag het best even loslaten om te herpakken (bij het omdraaien van het abdomen), maar ga verder daar waar je gebleven was!



- Als je het rondom hebt afgescheurd zit alleen de ductus bursae met de bursa copulatrix nog in het abdomen. Die trek je er voorzichtig en met beleid uit. Als de bursa erg groot is en niet door de opening past (dat komt voor), maak je een extra lateraal scheurtje in de zachte filamenten of je knipt het iets in met het microschaartje.



- Verwijder vet en vuilresten die eventueel nog aan het genitaal kleven. Er bevinden zich nog veel tracheeën en andere buisjes (darmresten, e.d.) die verwijderd moeten worden. Pas op dat je niet de ductus bursae en vooral ook niet de ductus seminalis aan de cervix bursae verwijderd of beschadigd. De aanhechting hiervan is namelijk diagnostisch voor de soort.



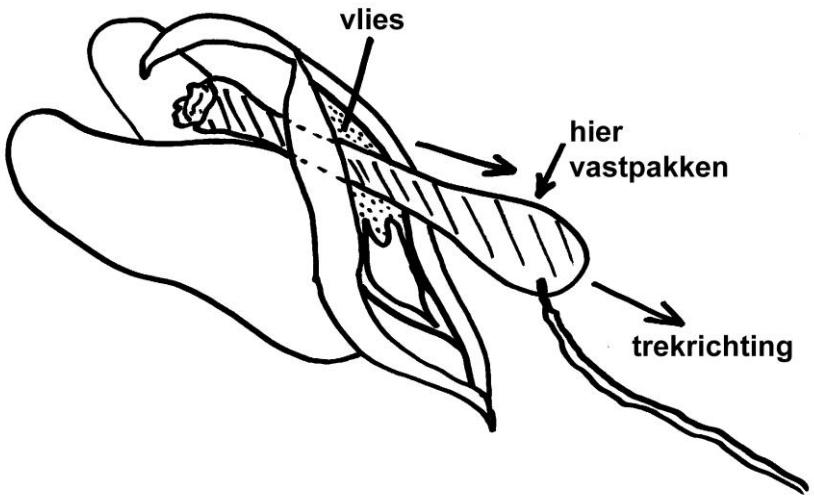
- Ook in de bursa copulatrix zit vaak nog “rommel” die we liever niet in het preparaat zien, zoals spermatoforen, eiwitresten en vliezen. Deze moeten verwijderd worden (zie Handeling 7).

In het algemeen geldt zowel bij mannetjes als vrouwtjes dat na het verwijderen van het genitaal het abdomen nog verder schoongemaakt moet worden. Buitenkant poetsen en schubvrij maken met penselen en vogelveer, binnenkant leeghalen (tracheeën, vetresten) met puntpincet. Eventueel jetspoelen met injectiespuit met alcohol 30%, maar dit werkt vaak niet zo goed.

HANDELING 5: scheiden van mannelijk genitaal en aedeagus

Bij de mannetjes is het scheiden van genitaal en abdomen niet voldoende. Ook de aedeagus moet los van de rest van het genitaal.

- Pak de aedeagus met een puntpincet aan de achterkant (het coecum) voorzichtig beet, NOOIT aan de ductus ejaculatorius! Met de andere, geopende pincet (met aedeagus er tussenin) houd je het genitaal tegen wanneer je de aedeagus voorzichtig naar achteren trekt. In de meeste gevallen gaat dit vrij gemakkelijk. Er is natuurlijk enige weerstand, want je probeert iets los te trekken, maar normaal gesproken breken of scheuren alleen de vliesjes eromheen los.

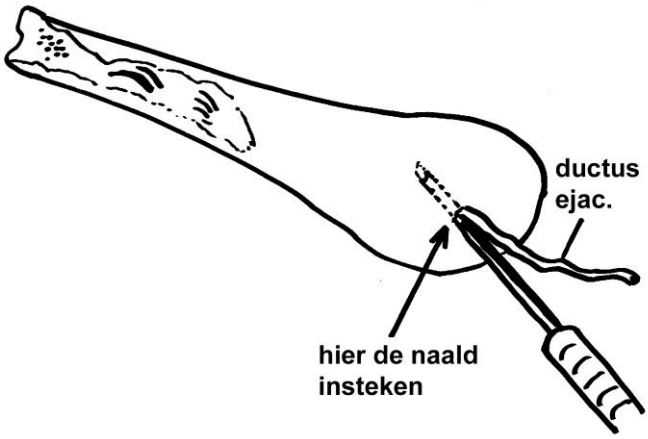


- Meestal zitten er nog zeer dunne tracheeën om de ductus ejaculatorius heen gewonden die het een vuil uiterlijk geven. Die stroop je er voorzichtig met de vogelveer af. Niet teveel of te hard vegen, anders breekt de ductus af en dat is zonde. Grijzige dichte strengen die uit de plooien van de ductus komen zijn strengen sperma. Ook die probeer je zoveel mogelijk te verwijderen want die kunnen je preparaat vertroebelen.

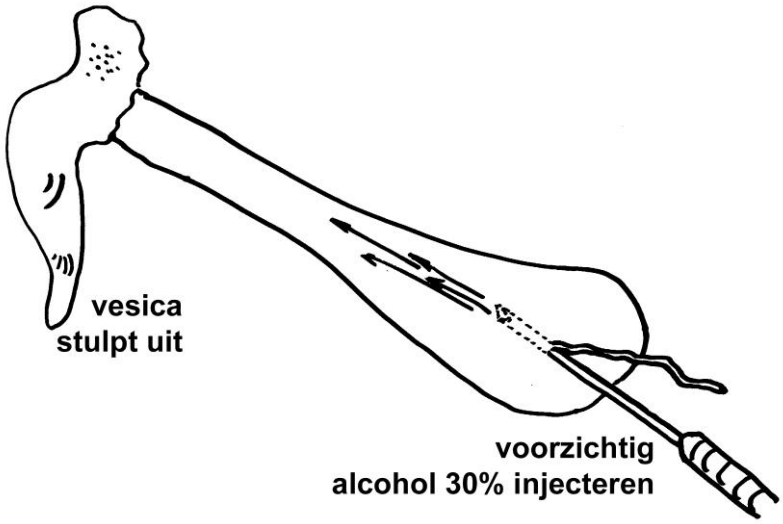
HANDELING 6: uitstulpen van de vesica (van aedeagus)

De vesica in de aedeagus bij mannelijke genitalia bevat vaak kenmerkende chitine structuren, cornuti genaamd. Meestal betreffen dit doornachtige, naaldvormige of kegelvormige structuren met een kenmerkende vorm, grootte of aantal. Ook kunnen er zich grote velden met zeer kleine chitine pukkeltjes op bevinden, waarvan dan met name de vorm en plaats van de velden belangrijk zijn. Om dit goed te kunnen zien moet de vesica uitgestulpt worden. Normaal gesproken zit de vesica opgevouwen in de buis van de aedeagus. Die dit uitstulpen alleen bij aedaegi die groot genoeg zijn voor de naald van de spuit, anders maak je de aedeagus stuk. Bij een té kleine aedeagus laat je de vesica zitten.

- Vul de insuline-injectiespuit met schoon 30% alcohol. Spuit de grote luchtbel voorin weg (het bekende rechtop tikken en spuiten).
- Houd de aedeagus vast met een puntpincet, maar knijp de aedeagus niet dicht
- Breng met je andere hand de punt van de injectienaald voorzichtig binnen aan de achterkant van de aedeagus, onder de opening daar waar de ductus ejaculatorius naar buiten treedt



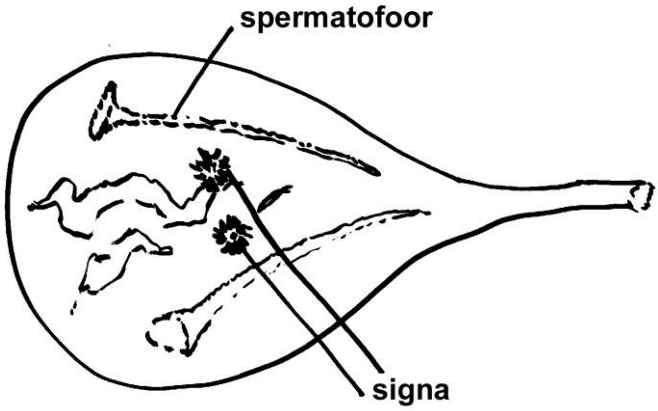
- Spuit voorzichtig wat 30% alcohol in de aedeagus, maar druk de spuit niet helemaal leeg, want er zitten allerlei kleine luchtbelletjes aan het eind die dan in de vesica gaan zitten en er nooit meer uitkomen!



- Als het goed gaat stulpt de vesica als een ballon naar buiten met alle cornuti goed zichtbaar.
- Trek dan voorzichtig de injectienaald weer uit de aedeagus
- Mocht de vesica wel bewegen, maar ergens vast lijken te zitten (bijvoorbeeld door cornuti), dan kun je overwegen het uitstulpen iets te helpen en voorzichtig met een puntpincet de vesica naar buiten te trekken, steeds een klein stukje en dan weer met de spuit.
- Zit er helemaal geen beweging in de vesica, dan kan hij helemaal vastzitten door verkleving of weerstand van cornuti, of de vesica is lek door een klein gaatje. In zo'n geval overweeg je of je met een puntpincent misschien tóch een handje kan helpen door de ingestulpte ballon er voorzichtig uit te trekken. Dat moet je nooit met één keer trekken doen, want de ballon is immers ingestulpt en moet dus ook stukje voor stukje met de plooien mee naar buiten worden "gerold". Dit is vervelend werk dat veel inzicht vraagt van hoe zo'n vesica in elkaar zit en hoe je die er het beste uit kan halen, een echte uitdaging.

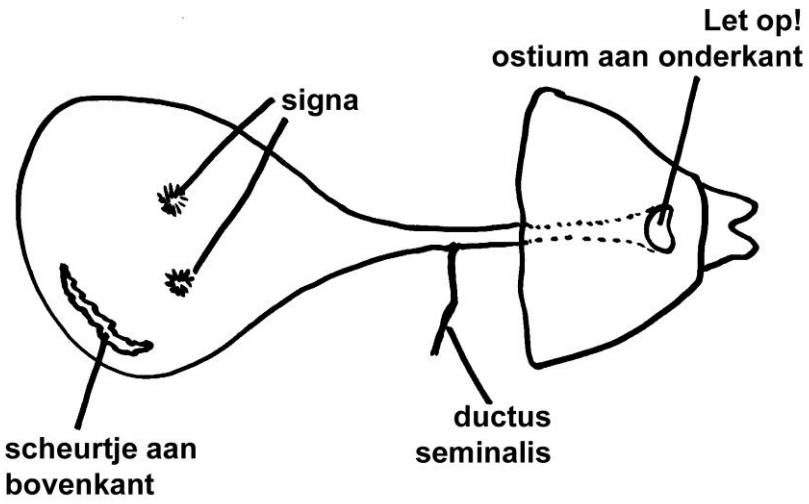
Bovenstaande is chirurgisch werk wat veel geduld en handvastheid vereist. Durf je het niet, begin er dan ook niet aan. Later kan iemand anders altijd nog het werk afmaken, zelfs als het preparaat is ingelegd.

HANDELING 7: leeghalen en schoonmaken van bursa copulatrix



Zoals gezegd is bij het vrouwtje na het scheiden van genitaal en abdomen de bursa copulatrix vaak nog vol met “rommel”. Dit zijn behalve de soms duidelijk aanwezige spermatoforen, ook gestolde eiwitten (vliezige flarden) en andere structuren die we niet in het preparaat willen hebben, omdat die het zicht op de werkelijke kenmerkende structuren storen. Signa laten we uiteraard heel, die zijn uitermate belangrijk!

- Leg het overigens aan de buitenzijde volledig schoongemaakte genitaal op de ventrale zijde, dus met het ostium aan de onderkant.
- Er moet een scheurtje in de dorsale wand van de bursa copulatrix gemaakt worden, omdat deze kant op het preparaat minder goed zichtbaar is. Pas op dat je niet dwars door of vlak langs een signum scheurt!



- Gebruik een scherpe punt van een dunne prepareernaald of puntpincet om in de bursa te prikken. Soms komt er al gelijk allerlei “rommel” uit. Maak de scheur niet té groot, maar wel groot genoeg om de grootste elementen, zoals de spermatoforen, er uit te trekken.
- Trek voorzichtig spermatoforen, eiwitvliezen, e.d. via de scheur naar buiten.

- Pomp de resten en dikke eiwitvloeistof met een penseeltje of vogelveerpenseel voorzichtig naar buiten door te deppen.
- Als je denkt dat alles eruit is, hervorm dan zo goed als mogelijk de bursa en duw de scheur zo mogelijk dicht.

HANDELING 8: kleuren

Zowel het mannelijk als het vrouwelijk genitaal moet na het schoonmaken in 30% alcohol vaak nog gekleurd worden om de doorzichtige structuren zichtbaarder te maken. De handeling is bij mannelijk en vrouwelijk genitaal hetzelfde.

- Het petrischaaltje met de chlorazol black in 30% alcohol staat klaar
- Neem met de pincet of het penseeltje het abdomen en het genitaal (bij het mannetje in twee onderdelen: armatuur en aedeagus) uit de 30% alcohol en leg het in de chlorazol black oplossing. Dompel de onderdelen met een penseeltje helemaal onder. Onder de microscoop zie je wat je doet, dus werk liever met de binoculair.
- Werk met een penseeltje eventueel ingesloten heldere alcohol of luchtbellen in het abdomen of genitaal naar buiten, zodat de kleurstof zijn werk goed kan doen.
- Wacht ongeveer 1-3 minuten met eruit halen, afhankelijk van de grootte van het genitaal.
- Daarna leg je de onderdelen met pincet (gebruik binoculair!) of penseeltje weer terug in schone 30% alcohol.
- Dep met een penseeltje overtollige kleurstof uit het abdomen en genitaal

HANDELING 9: fixeren

Fixeren gebeurt in 95-100% alcohol. Door de hygroscopische werking van de sterke concentratie alcohol wordt water onttrokken aan het preparaat en wordt het hard en bros. Schoonmaken is er in dit proces dus niet meer bij, want anders kan het preparaat scheuren of breken! Onderdelen moeten minimaal 3-5 minuten (liefst langer) in de alcohol blijven fixeren.

- Zet met een pincet of penseel het abdomen over van de 30% alcohol naar 95% alcohol. Je zult zien dat onderdompelen niet nodig is, het zinkt direct op de bodem van het petrischaaltje.
- Ook het vrouwelijk genitaal en de mannelijke aedeagus kun je daarna zonder meer overzetten van 30 naar 95% alcohol. Let bij de bursa copulatrix van het vrouwtje wel op dat de flap van de scheur dicht blijft, anders wordt deze in de open stand gefixeerd en dat is geen fraai gezicht in het uiteindelijke preparaat.
- Het mannelijke genitaalarmatuur moet met de valven open gespreid gefixeerd worden. Dat vergt enige voorbereiding. Kijk in de 30% alcohol hoe flexibel de valven open gespreid kunnen worden. Als er vliezen aanwezig zijn die open spreiden verhinderen kun je die beter nog verwijderen of inscheuren. De binnenkant van de valven moeten uiteindelijk zichtbaar worden.
- Pak met een pincet in de 30% alcohol het armatuur zodanig vast dat de valven open gespreid blijven, ingeklemd in de bek van de pincet. Op deze manier verplaats je het armatuur naar 95% alcohol en dompel je het onder, terwijl je het genitaal vast blijft

houden. Eventueel help je iets met een penseeltje. Houd deze positie vast voor ongeveer een minuut. Doe je dit niet, dan fixeert het genitaal in de verkeerde (dichte) stand.

- Na ongeveer een minuut kun je het genitaal loslaten en je zult zien dat de valven open blijven staan, maar toch iets naar binnen willen buigen. Zolang het niet helemaal terugspringt is het niet erg, maar je kunt eventueel de valven nog wat langer open laten staan door ze met een penseeltje open te drukken op de bodem van het petrischaaltje en nog even langer vasthouden.
- Op het oppervlak van alle ondergedompelde onderdelen ontstaan luchtbelletjes, als gevolg van het onttrekken van water en zuurstof. Deze kun je met een penseeltje eenvoudig wegpoetsen.

HANDELING 10: euparal essence

Euparal essence is een met oplosmiddel verdunde Euparal en ruikt daarom bijzonder sterk. Als je met deze vloeistof werkt, zorg dan dat je er niet met je neus vlak boven zit en ventileer de ruimte goed. In het laboratorium gebruik je een puntafzuiging, thuis zet je een raam open of de afzuiger aan. Het goedje is het laatste bad voordat het preparaat wordt ingelegd in euparal op een objectglaasje. Als deze stap wordt overgeslagen kunnen er grote luchtbellen ontstaan in het preparaat die niet of moeilijk weg te krijgen zijn. Euparal essence onttrekt dus zuurstof en restanten alcohol aan het preparaat en het heeft een verbazend ophelderend effect voor structuren in het genitaal. Gebruik hierbij uitsluitend metalen gereedschap (pincetten en prepareernaalden), geen penselen of vogelveerkwastjes!

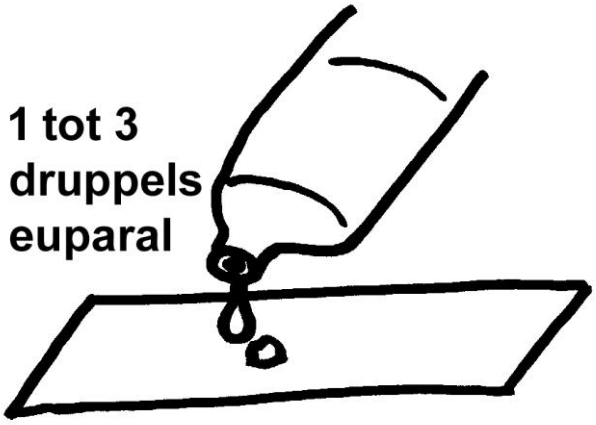
- Zet van groot (abdomen) naar klein (aedeagus) de onderdelen één voor één over van 95% alcohol naar euparal essence. Je zult zien dat de oppervlakte spanning van beide vloeistoffen totaal verschillend is (door de heftige draaiende beweging van de onderdelen)
- Dompel alle drijvende onderdelen met een prepareernaald helemaal onder en pomp voorzichtig met een prepareernaald of pincet ingesloten alcohol naar buiten. Ook eventuele luchtbellen duw je naar buiten.
- Laat de onderdelen minstens 5 minuten (liefst langer) ondergedompeld in de euparal essence liggen.

HANDELING 11: inleggen in euparal

De laatste fase van het genitaalpreparaten maken is natuurlijk het inleggen in het medium Euparal op het objectglaasje. Ook dit moet in stappen gedaan worden. Gebruik hierbij uitsluitend metalen gereedschap (pincetten en prepareernaalden), geen penselen of vogelveerkwastjes!

- Al tijdens het ophelderen van de preparaatobjecten in euparal-essence kun je voorbereidingen treffen voor het inleggen in Euparal. Allereerst neem je een geschikt objectglaasje, d.w.z. met of zonder uitholling in het midden. Een uitholling is nodig als het object nogal groot is, driedimensionaal. Maak deze goed schoon met een tissue, zodat er geen vuil-, vet- of stofresten op zitten.
- Bepaal of het abdomen en het genitaal bij elkaar onder één dekglaasje passen (18 mm breed). Indien het niet past moet je besluiten twee dekglaasjes te gebruiken.

- Bij gebruik van één dekglaasje druppel je uit het druppelflesje met Euparal één tot twee druppels precies in het midden van het objectglas. Bij gebruik van twee dekglaasjes verdeel je de afstand van de twee druppelplaatsen, zodanig dat er straks twee dekglaasjes naast elkaar kunnen.



- Maak van de druppel(s) Euparal een vierkantje met een puntpincet of prepareernaald, ongeveer even groot als het dekglaasje dat er bovenop moet.

- Kijk onder de microscoop of er geen luchtbellen of vuil (tissueresten) in de Euparal zit. Tissueresten verwijder je, luchtbellen laat je rustig uitgroeien en openbarsten, dat kan even duren. De allerkleinste luchtbellen blijven het langst hangen, maar die kun je negeren. Ze verdwijnen uiteindelijk vanzelf.

- Leg de objecten met een puntpincet één voor één en van groot naar klein, dus abdomen, genitaalarmatuur en aedeagus, op de juiste plaats (zie tekening) in de Euparal op het objectglas. Geeft niet als er nog iets scheef ligt, je hebt alle tijd om het te corrigeren.

- Let op! Bij zowel mannelijk als vrouwelijk genitaal moet de ventrale zijde naar boven wijzen. Dus, valven (man) met de binnenzijde naar boven, ostiumingang (vrouw) naar boven. De aedeagus (man) wijst met de distale kant (daar waar de vesica uitstulpt) naar links.
- Onder de microscoop fatsoeneer je de posities van de onderdelen met een prepareernaald of pincet, maar grijp niks vast, duw alleen in positie.
- Laat het natte preparaat, dus nog zonder dekglas, één of twee dagen in een afgesloten vlakke doos op een rustige plaats staan. De Euparal wordt zo plakkerig en de kleinste objecten (aedeagus) zullen dan niet wegdrijven bij het straks plaatsen van het dekglas. Zorg ervoor dat de preparaten vlak liggen, anders drijft alles naar één kant.

HANDELING 12: dekglas plaatsen

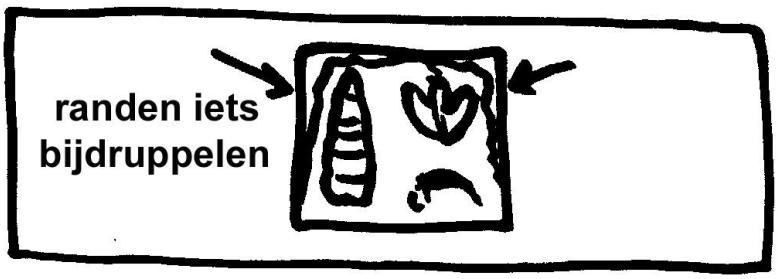
Als laatste moeten de objecten op het objectglas afgedekt worden met een dekglaasje. Er zijn twee typen in de handel, ronde en vierkanten. Op zich maakt het niet uit welk type je gebruikt, maar onder een vierkant dekglas is meer ruimte. Standaard is 18 mm breed, maar er zijn tal van andere (duurdere!) maten, die behandel ik hier niet. Raak een dekglaasje in principe niet met je vingers aan, alleen met een pincet oppakken.

- Pak met een puntpincet voorzicht een dekglaasje uit het doosje, kijk goed (eventueel onder de microscoop) of je er echt wel één hebt en niet twee of drie tegelijk, ze zijn erg dun.

- Als het dekglas optisch schoon is (kijk onder de microscoop) hoef je niet te poetsen, maar als er stof of vet (vingers!) op zit kun je het proberen schoon te maken tussen twee vingers waarin een tissue geklemd zit. Het glaasje raak je dus niet met je vingers aan, maar met de tissue. Maak dan voorzichtig een wrijvende beweging met de vingers en de tissue over het dekglaasje, eventueel geholpen met wat adem.
- Kijk goed of er geen tissueresten op het glaasje liggen (microscoop). Leg het dekglaasje even weg op een veilige en schone plaats.
- Druppel met het druppelflesje Euparal één tot drie druppels (naar gelang de grootte van het object) op de objecten en de plakkerig geworden Euparal op het objectglas. Kijk onder de microscoop of er geen luchtbellen in zitten en wacht dan even tot ze zijn verdwenen. Zeer kleine luchtbellen verdwijnen vanzelf, ook als het dekglas er straks op zit. Eventueel kun je nu nog een laatste correctie doen aan de positie van scheefgedraaide objecten, maar wees heel voorzichtig, het kan misschien al te vast liggen.
- Pak met de puntpincet het klaarliggende dekglaasje. Druppel met het druppelflesje Euparal één of twee druppels in het midden van het dekglaasje. Kijk onder de miscroscoop of er grote luchtbellen in zitten en leg het dan voorzichtig vlak neer, zodat de luchtbellen tijd hebben om te verdwijnen. Na enkele minuten moet dat zeker het geval zijn. Als er geen luchtbellen zijn, ga dan door met het volgende punt.
- Pak nogmaals het dekglaasje vast met de puntpincet en keer het in één beweging helemaal om, met de natte Euparal kant dus aan de onderkant. Omdat het Euparal behoorlijk kleverig is zal het (bij één of twee druppels) niet direct gaan druipen. Houd het glaasje niet schuin, want dan loopt de Euparal er wel direct af!
- Het objectglas met de objecten ligt onder de microscoop. Leg het dekglas precies in het midden over de objecten en begin met één kant (bijvoorbeeld aan jouw kant) met neerleggen en laat dan de andere kant gewoon vallen.

- Als het goed is zie je de Euparal een weg zoeken onder het dekglas en uiteindelijk zal de ruimte zich helemaal vullen tot de rand. Als dit niet het geval is, is er iets te weinig Euparal gebruikt, maar dat is niet erg. Je kunt dan het volgende doen:
- Duw voorzichtig met een schone puntpincet of prepareernaald iets op het dekglas (NIET TE HARD DUWEN!) en kijk of dat voldoende is om de ruimte onder het dekglas te vullen met Euparal. Zo niet, dan moet er euparal worden toegevoegd.

- Voor het toevoegen van euparal ga je druppel voor druppel langs een rand van het dekglas druppelen. Kijk na elke druppel of het voldoende is. Voeg nooit meer toe dan nodig is, anders wordt het een kliederboel en gaat de Euparal van het objectglas druipen.



- Ga naar HANDELING 13 en leg het preparaat dan in een afgesloten doos weg op een vlakke ondergrond. Het droogproces van Euparal kan zeer lang duren, soms weken of maanden. Je moet hiervoor dus geen haast hebben. Vaak kan er tussentijds wel al een foto worden gemaakt van het preparaat onder een microscoop, maar het mag in de droogperiode (en eigenlijk ook erna) nooit rechtop worden gezet.
- Vaak krimpt de Euparal in het begin nog iets in door het verdampen van gassen. Controleer dus regelmatig of het drogen goed gaat. Als het inkrimpen storend is (grote ruimte vormt of onderdelen blootlegt) voeg je weer iets euparal toe zoals vermeld.

HANDELING 13: etiketteren en registreren

Als je tevreden bent met het resultaat voeg je een nummer aan het preparaat toe. Vóór de digitalisatie gebruikte elke preparateur zijn eigen preparaatnummers met initiaal, en hield dat bij in een logboek van preparaten. Tegenwoordig gebruiken we liever een museumregistratienummer dat dus zowel onder de vlinder als op het genitaalpreparaat te vinden is. Aangezien zo'n nummer uniek is weten we wat bij wat hoort.

- Een definitief etiket plakken we pas op het preparaat als het al aardig droog is, je moet er dus eerst een voorlopig nummer op zetten. Doe dat met een onuitwisbare dunne stift of een glaskras-pen. Het nummer is uiteraard hetzelfde nummer als onder de vlinder staat. Elke gegenitaliseerde vlinder heeft dus een registratienummer (RMNH.INS.).

- Registreer in CRS de vlindergegevens, zodat de gegevens straks ook weer terug te vinden zijn, of houd in een Excelfile een voorlopig logboek bij met de vlindergegevens.
- Na het drogen van het preparaat plak je op het objectglaasje twee etiketten, zoals afgebeeld. Al deze informatie moet op het etiket worden vermeld.

- Plaats het preparaat in een preparaatdoos en registreer nu ook het doosnummer (en standplaats) in CRS of Excelfile. Bewaar de preparaatdoos altijd rechtop, zodat de preparaten in de doos vlak liggen. Dit voorkomt dat de nog altijd stroperige Euparal heel langzaam toch wegdruipt en je preparaat verpest.