

Monoga(a)mmarus?

Partnerkeuze van *Gammarus pulex*



Geschreven door Anna Hovius (6B) en Otto van Ketwich Verschuur (6C),

Christelijk Gymnasium Sorghvliet, Biologie

Mevrouw Meier, 16/01/2022

Voorwoord

In de zomer van 2021 waren wij, Anna en Otto, samen op vakantie in de regio Auvergne, gelegen in Frankrijk. Hier zijn veel gammarussen te vinden in beekjes en wateren. Ook was Anna's opa, bioloog Miel Hovius, met ons op vakantie. Hij heeft al eerder onderzoek gedaan in de hydrobiologie, en heeft onze interesse op dit vlak gewekt. Wij hebben daarom ons profielwerkstuk over gammarussen geschreven. De onderzoekjes hebben we bij Miel thuis kunnen doen, in Veldhoven. In die omgeving zijn veel gammarussen te vinden die we konden gebruiken voor ons onderzoek. We willen mevrouw Meier ontzettend bedanken voor haar begeleiding en aanmoediging om een zo goed mogelijk werkstuk neer te zetten. Ook willen we Miel bedanken voor zijn deskundigheid, en voor alle tijd en moeite die hij erin heeft gestoken om ons te begeleiden. Wij hebben dankzij de goede begeleiding dit onderzoek met enorm enthousiasme uit kunnen voeren. Bovendien hopen we dat de lezer een goede inkijk krijgt van hoe wij de proefjes hebben uitgevoerd en hoe wij de resultaten hebben uitgewerkt.

Inhoudsopgave

Voorwoord

Samenvatting	4
1. Inleiding	5
1.1 Habitat, niche en uiterlijk van <i>G.pulex</i>	5
1.2 Andere soorten	6
1.3 De koppelvorming van <i>G. pulex</i>	6
1.4 De pre-copula	7
1.5 Het density-effect	8
1.6 Charles Darwin over gammarussen	8
1.7 Onderzoeksvraag en hypothese	9
2. Materiaal en methode	11
2.1 Ethogram	12
2.2 Proefopstelling	14
2.3 Uitvoering	15
3. Waarnemingen en resultaten	20
4. Conclusie	32
5. Discussie	33
5.1 Ongeldigheden	33
5.2 Uitwerking van resultaten van proef 1, 2 en 3	33
5.3 Darwin en hypothese I	34
5.4 Uitwerking resultaten van proef 4 en 5	35
5.5 Darwin en hypothese II	35
5.6 Uitwerking resultaten proef 6	37
5.7 Onzekerheden	38
5.8 Vervolgonderzoek	39
Bronvermelding	40

Samenvatting

In dit profielwerkstuk hebben wij onderzocht of een mannetje van het vlokreeftje *Gammarus pulex* het vrouwtje kan terugvinden nadat het mannetje en het vrouwtje al eerder gekoppeld zijn geweest. Dit hebben wij gedaan door middel van zes verschillende proefjes, waarbij wij de vaardigheden van herkenning van de vlokreeftjes steeds op een andere manier hebben getest.

Wij verwachtten dat het mannetje tot op zekere hoogte het vrouwtje kan herkennen, omdat Charles Darwin dit ooit heeft gesteld in een van zijn boeken. Hoe ver deze herkenning echter gaat, wilden wij dus onderzoeken.

Bij ongeveer de helft van de proeven zijn de originele koppels hersteld. Bij de laatste proeven is er echter vastgesteld dat als er meer gammarussen uit een verbroken koppel aanwezig zijn, het de mannetjes veel minder goed lukt hun "eigen" vrouwtje terug te vinden. Daarom denken wij dat het mannetje niet echt zijn eigen vrouwtje kan herkennen, maar wel kan reageren op bepaalde lokstoffen of handelingen die een vrouwtje, dat net uit een koppel komt, uitscheidt of vertoont. Wat voor soort lokstof of gedraging dit is, weten wij niet. Opvallend bij de detail observaties en de analyse van de ethogrammen van het gedrag is de actieve rol die het vrouwtje speelt bij de acceptatie van het mannetje en dus de totstandkoming van een pre-copula. De rol van het vrouwtje is een nieuwe bevinding die niet in de literatuur voorkomt. Wel sluit het aan bij de opmerking van Charles Darwin: "*the males and females recognize each other and are mutually attached*".

1. Inleiding

Darwin heeft ooit in het boek 'The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex' (1871) gesteld dat het mannetje van het vlokreeftje *Gammarus marinus* het vrouwtje kan terugvinden nadat de eerdere koppeling is verbroken. Dit fenomeen is bekend bij meerdere soorten van het geslacht *Gammarus*. Er is echter nog weinig onderzoek gedaan hoe dat dan in zijn werk gaat. Daarom lijkt het ons interessant om Darwins uitspraak verder te onderzoeken.

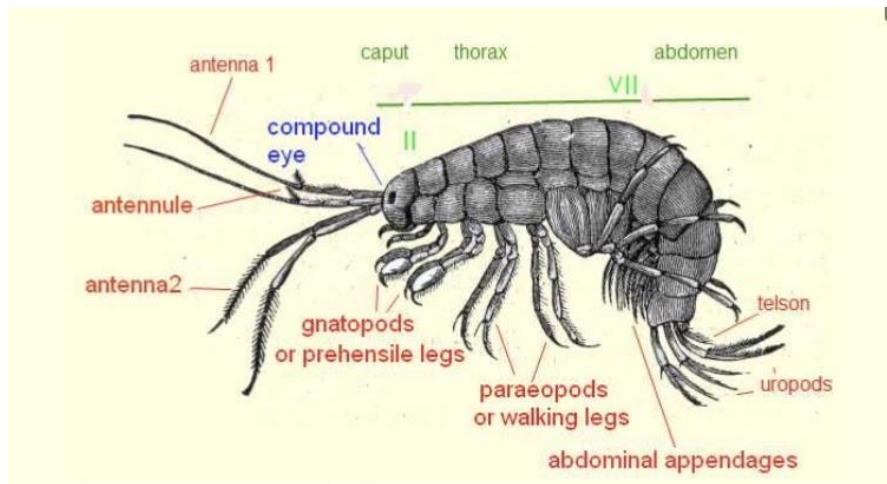
Gammarus pulex (*G. pulex*) is de algemeenste soort van het geslacht *Gammarus*, ofwel vlokreeftjes. De taxonomische indeling van *G. pulex* is als volgt:

Fylum	Arthropoda (geleedpotigen)
Subfylum	Crustacea
Klasse	Crustacea (kreeftachtigen)
Onderklasse	Malacostraca
Superorde	Peracarida
Orde	Amphipoda (vlokreeften)
Suborde	Gammaridea
Familie	Gammaridae
Geslacht	<i>Gammarus</i>
Soort	<i>Gammarus pulex</i> (ofwel <i>G. pulex</i>)

Tabel 1: de taxonomische indeling van de soort *G. pulex* (Mudde, 1988)

1.1 Habitat, niche en uiterlijk van *G. pulex*

De soort *G. pulex* is een zoetwatervlokreeft en komt voor in Azië, Noord-Afrika en Europa (met uitzondering van IJsland). Ze leven voornamelijk in stromend water, maar soms zijn ze ook te vinden in stilstaand water. *G. pulex* komt in Nederland vooral voor in het oosten en in het zuidoosten van het land, evenals in Utrecht (Mudde, 1988). Vlokreeftjes leven op en in de bodem en grazen de waterplanten af op zoek naar voedsel. Ze eten ook organisch afval, zoals verteerde bladeren, op de bodem (Ribot, n.d.).



Afb. 1: benamingen van de verschillende delen van een gammarus (illustratie van Waterwereld)

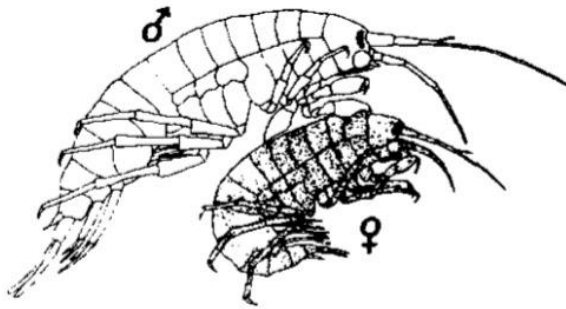
De mannelijke individuen zijn aanzienlijk groter dan de vrouwtjes en kunnen tot 23 mm lang worden. De kleur van *G. pulex* is voornamelijk grijs, met soms wat variatie door verschil in voedsel (Mudde, 1988).

1.2 Andere soorten

Wij zijn tijdens het vangen van de gammariden ook in contact gekomen met andere soorten, zoals *Gammarus roeselii* en *Echinogammarus berriloni*. *Gammarus roeselii* is te herkennen aan de achterste tergieten die in een punt lopen en dus een soort stekels vormen (BRON). *Echinogammarus berriloni* is een wat goud/gelige kleur hebben en hebben hele dunne haren op hun achterzijde. Ook zijn de telsons (achterste 'zwemflipper') wat langer van *E. berriloni*, waarbij *G. pulex* (de meest voorkomende gammarus) voornamelijk vrij grijs van kleur is en geen haren of stekels heeft (Tempelman, 2020).

1.3 De koppelvorming van *G. pulex*

Koppelvorming speelt een grote rol bij de voortplanting van deze soort. Vlokreeftjes kunnen zich pas voortplanten na ongeveer tien vervellingen, waarbij ze na elke vervelling iets groter worden. Als het mannetje en het vrouwtje van *G. pulex* geslachtsrijp zijn, kunnen deze een binding vormen die de pre-copula heet. Hierbij houdt het mannetje het vrouwtje met zijn achterste gnathopoden (schaarpoten) vast achter haar kop en tussen segment 5 en 6 (zie afbeelding 1). In deze houding blijven zij onder correcte omstandigheden vijf tot tien dagen rondzwemmen totdat het vrouwtje vervelt. De ovulatie vindt plaats na deze vervelling en het vrouwtje wordt bevrucht. Ze houdt de eieren drie tot negen weken in haar broedbuidel. De watertemperatuur is een grote invloed op de voortplanting: als het water heel koud is, gaat de voortplanting langzamer (Mudde, 1988).



Afb. 2: gammarussen tijdens de pre-copula (Illustratie uit 'De habitat van Gammarus pulex', Karin Mudde)

Ons onderzoek gaat echter niet over de voortplanting, maar over het daaraan voorafgaande: de koppelvorming. In afbeelding 2 kun je zien hoe een koppelvorming eruit ziet. Er zijn vele factoren die de mate van de koppelvorming kan beïnvloeden. Uit een onderzoek van de Goethe universiteit in Frankfurt is gebleken dat de omgeving van de gammarus invloed heeft op het gedrag. Als een mannetje voor de proef in een omgeving aanwezig was met veel vrouwtjes, zal hij nauwkeuriger en minder snel zijn nieuwe vrouwtje uitzoeken en koppelen. Hetzelfde geldt voor het omgekeerde: een gammarus die in een omgeving aanwezig was met weinig vrouwtjes, zal zich juist snel aan een nieuw vrouwtje binden zonder enige kieskeurigheid (Lipkowski et al. 2019).

Bovenstaand verschijnsel wordt ook wel "precopulatory mate guarding" (PCMG) genoemd, maar waarom treedt dit eigenlijk op? Een vrij recent artikel beschrijft dat beide partners er een energetisch voordeel mee kunnen behalen (Iltis et al. 2017). Hier liggen complexe ecologische en voedselketenverhoudingen aan ten grondslag. Het mannetje eet dan gedurende enkele dagen niet en het vrouwtje juist meer dan als ze los rond zou zwemmen. Het resultaat is dat het vrouwtje een heel hoog reproductiesucces haalt en de populatie snel groeit (Shadrin et al. 2021). De grote populaties Gammariden zijn van groot belang in het ecosysteem, vaak wordt de complete jaarproductie opgegeten. Zo leeft de grijze walvis vrijwel uitsluitend van een soort die het met miljoenen met de speciaal gevormde bek van de bodem hapt (Rice et al. 1971).

1.4 De pre-copula

Als 'proefdier' worden de gammarus al lang benut, bijvoorbeeld voor de studie van gifstoffen in het water (Chaumot et al. 2015; Geffard et al. 2010a). Het is nu vaker dat de duur van de pre-copula of het percentage geslaagde pre-copula's als maat voor het effect van de gifstof genomen wordt. Pascoe ontwikkelde in 1994 de "Gammarus pulex pre-copula separation test (GaPPS)" (Pascoe et al. 1994).

De pre-copula is afhankelijk van de ovariële cyclus. De ovariële cyclus en de vervelling lopen synchroon en de stadia-benoeming heeft daar mee te maken. Het begint met de vervelling. Het zogenaamde *Post-moult stadium* duurt ongeveer 5 dagen waarbij eitjes in de broedbuidel worden geplaatst en tevens het mannetje de pre-copula houding verandert zodat bevruchting kan plaatsvinden. De reeds tot juvenielen uitgegroeide eitjes van de voorgaande cyclus verlaten dan de broedbuidel (een aantal van ongeveer 30). In het *inter-moult stadium* (ca. 15 dagen) zwemt het vrouwtje weer vrij rond en beginnen de embryo's zich te ontwikkelen. In het derde *pre-moult stadium* ongeveer 10 dagen later ontstaat weer de nieuwe pre-copula (Geffard et al. 2010a). Tijdens de vervelling komt er bij het vrouwtje een zogenoemd vervellingshormoon vrij: ecdyson. Het zou kunnen dat het mannetje dit hormoon kan waarnemen en hiermee de ei-ontwikkelingsfase van het vrouwtje kan herkennen (Trapp et al. 2014).

1.5 Het density-effect

De duur van de pre-copula en de snelheid van de vorming van de koppeling in het algemeen (niet de herkoppeling na verbreking) is mede afhankelijk van de dichtheid van de aanwezige mannetjes: het density effect (Iribarne et al. 1995) (Dick and Elwood 1996) (Lipkowski et al. 2019). Het is ook afhankelijk van hoe lang geleden een mannetje een vrouwtje heeft bevrucht, van het stadium van het vrouwtje in de ovariële cyclus en van de grootte van zowel het mannetje als het vrouwtje. (Plaistow et al. 2003) (Dunham et al. 1989). Het laatstgenoemde artikel van Dunham beschrijft dat er vrij veel interactie bestaat tussen het mannetje en het vrouwtje; "*the males invest reproductive cost in order to be able to overcome female resistance*", wat meegenomen moet worden bij de evaluatie van Darwin's statement van "*mutual attachment*" (zie hieronder).

1.5 Charles Darwin over gammarussen

Of het mannetje van de soort *G. pulex* het eerder-gekoppelde vrouwtje ook individueel kan herkennen én opnieuw koppelt, daar is nog weinig over bekend. Darwin heeft dit als eerste gesteld, zelf geen proeven gedaan, maar waarnemingen van de heer Bate aan de zuidkust van Engeland in zijn boek vermeld (Darwin 1871).

Hier vermelden we de passage zoals Darwin die heeft opgeschreven en stellen daarmee onze hypothesen op:

"Mr Bate " ... separated a male sand-skipper, Gammarus marinus from its female, both of whom were imprisoned in the same vessel with many individuals of the same species. The female, when thus divorced, soon joined the others. After a time the male was put again into the same vessel; and he then, after swimming about for some time, dashed into the crowd, and without any fighting at once took away his

wife. This fact shows that in the Amphipoda, an order low in the scale, the males and females recognize each other and are mutually attached. “

Darwin stelt hier een aantal zaken die we willen onderzoeken:

- I. het mannetje is in staat waar te nemen dat ‘zijn’ vrouwtje zich tussen de anderen bevindt, want hij stormt de groep in recht op zijn doel af;
- II. in de laatste zin van het citaat stelt Darwin dat niet alleen het mannetje het vrouwtje herkent, maar ook het vrouwtje het mannetje herkent en dat beiden op die wijze verbonden zijn;

Het mannetje merkt op een afstand waar het vrouwtje zich bevindt. Hoe deze bovenstaande waarnemingen plaatsvinden verlopen is de vraag. Holmes bracht in 1903 zwarte lak op de ogen van de mannetjes van de gammarussen aan om te testen of zicht een rol speelde tijdens het herkennen van zijn vrouwtje. Dit had geen invloed op het vormen van de pre-copula of de snelheid daarvan. Ook werden in een tweede proef de antennes van opnieuw het mannetje afgeknipt (waar het meeste van de reukorganen zit)(Holmes 1903). Ook dit had effect op noch de pre-copula noch de snelheid daarvan. Bij deze proeven wordt het vrouwtje intact gelaten en dus niet getoetst of het vrouwtje ook een rol speelt. We gaan er daarom vanuit dat een factor kan zijn dat er een stofje is wat niet door antennes kan worden waargenomen.

1.6 Onderzoeksvraag en hypothese

Onze onderzoeksvraag luidt als volgt: welke factoren maken het mogelijk dat het mannetje *G. pulex* zijn vrouwtje na ervan gescheiden te zijn terugvindt? In dit profielwerkstuk gaan wij dus onderzoeken onder welke omstandigheden een mannetje *G. pulex* na eerdere koppeling met een vrouwtje haar na de ontkoppeling weer kan terugvinden. Wij doen dit door middel van verschillende proefjes.

Wij veronderstellen dat het mannetje van de soort *G. pulex* het vrouwtje kan terugvinden na ontkoppeling, en ook opnieuw kan koppelen.

Hypothese I. Het mannetje kan tussen andere vrouwtjes zijn eigen vrouwtje vinden en een herkoppeling tot stand brengen. Dit zou een bevestiging zijn van het door Darwin gestelde.

Hypothese II. Er is een lokstof, een nog onbekend stofje, of er zijn bepaalde gedragingen, die een rol spelen bij het terugvinden van het vrouwtje.

In dit verslag zullen wij eerst, voordat we de resultaten laten zien, uitleggen hoe we alles hebben georganiseerd en hoe we de proefjes hebben gedaan: materiaal en methode. Onder het kopje materiaal en methode beschrijven ook we de zes proeven en hoe we hiermee de hypothesen kunnen toetsen, aannemen of verwwerpen.

Na de resultaten zullen we onze conclusie schrijven en onze hypothesen aannemen of verwerpen. Natuurlijk zijn er ook onzekerheden in een biologisch onderzoek, deze zullen we vermelden in de discussie.

2. Materiaal en methode

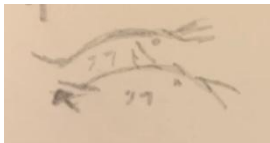

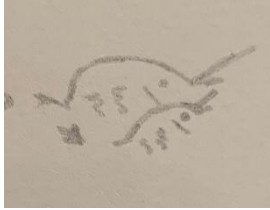
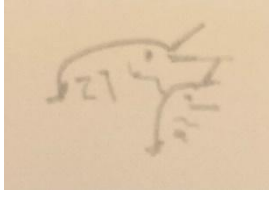
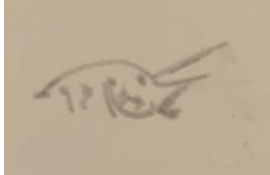

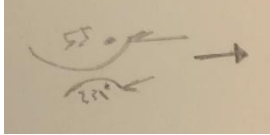
Benodigdheden
Gammarussen (van de soort <i>G. pulex</i>)
Petrischaaltjes
Schalen
Verzamelbakjes
Geaëreerd water
Vangschepjes en -netjes
Nagellak verschillende kleuren
Camera
Stopwatch
Binoculair
Vergrootglas

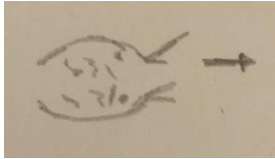

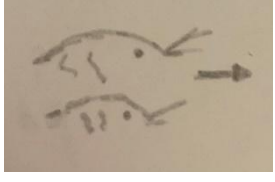
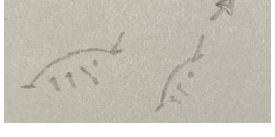

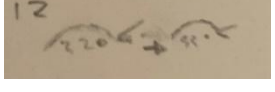
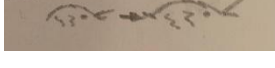
Tabel 2: de benodigdheden voor het uitvoeren van de proefjes

Wij hebben onderzocht of van de soort *Gammarus pulex* het mannetje het vrouwtje kan terugvinden in verschillende omstandigheden door middel van zes verschillende proeven. Alle zes proeven zijn zesmaal herhaald.

Na observatie van het gedrag van de gammarussen in voorbereidende proefjes hebben we een ethogram gemaakt. We hebben in totaal veertien handelingen waargenomen. In de verslaggeving konden we door middel van dit ethogram de gegevens weergeven waarbij we de handelingen van nul tot dertien hebben genummerd. Hierbij het ethogram:

2.1 Ethogram:

Nr.	Foto	Uitleg
0		vrouwtje slaat met staart ('kicks') en maakt zich los
1		goed gekoppeld
2		mannetje slaat met staart op achterkant vrouwtje tijdens koppeling
3		mannetje duwt vrouwtje af en trekt weer terug (tijdens koppeling)
4		dwars koppel
5		contact met antennes tijdens koppeling
6		contact van mannetje-vrouwtje met ruggen tegen elkaar (tijdens zwemmen)

7		contact met de poten
8		frontaal contact met antennes
9		ze zwemmen over elkaar heen
10		wegschieten na kort contact
11		los na goede koppeling
12		mannelijke raakt met antennes achterkant vrouwtje aan
13		vrouwtje raakt met antennes achterkant mannetje aan

Tabel 3: ethogram van de gedragingen van *Gammarus pulex*

Anna hield zich tijdens de experimenten voornamelijk bezig met de praktische zaken en was verantwoordelijk voor de waarnemingen. Tijdens de proeven observeerde zij en gaf ze aan Otto door wat er gebeurde en wat voor interactie er plaatsvond tussen verschillende gammarussen. Hij noteerde dit samen met de tijd van de gebeurtenis. Van alles wat we genoteerd hebben, hebben we later een tabel gemaakt.

Met onze proeven hebben wij de mogelijke herkenning van de eerdere partner van een mannetje van *G. pulex* onderzocht, we gebruikten daarvoor koppeltjes. Meestal hadden we voor een proef ook andere mannetjes of vrouwtjes nodig, soms uit een verbroken koppeling en soms niet. Om het overzichtelijk te maken, zullen we het mannetje en vrouwtje waar de nadruk op ligt, aangeven met een hoofdletter (M en F). Als deze mannetjes en vrouwtjes uit een verbroken koppeling komen, geven wij dat aan met een * (dus M* en F*). De andere mannetjes en vrouwtjes worden aangeduid met m (willekeurig mannetje), f (willekeurig vrouwtje), f* (vrouwtje uit andere

verbroken koppeling dan die met nadruk) of m^{\wedge} en f^{\wedge} (gemengde koppels, voor meer uitleg zie figuur 5A en 5B in de resultaten). Elke proef hebben we zes keer na elkaar uitgevoerd in zes bakjes (petrischalen met een diameter van 15 cm). We hadden dus per proef minimaal zes koppels nodig en bij de meeste proeven meer voor een andere opstelling van de proef. De zes proeven die wij hebben uitgevoerd zijn:

2.2 Proefopstelling:

1. M^* en F^* bevinden zich samen in een schaalpje na onderbroken te zijn. Hoe lang duurt het voordat ze opnieuw gekoppeld zijn? Deze proef is een soort controle: er is maar één keuze voor het mannetje, en het geeft aan of het mannetje weer de pre-copula kan herstellen.
2. Per schaalpje zijn er naast M^* vier f aanwezig samen met F^* , wordt F^* teruggevonden door M^* en f genegeerd? Hier is een keuze voor het mannetje, kiest hij te her-koppelen of koppelt hij willekeurig met de vrij zwemmende vrouwtjes?

Indien de koppeling aan F^* daadwerkelijk de voorkeur heeft, dan besluiten we uit proef 1 en 2 samen dat de M^* zijn "eigen" vrouwtje kan terugvinden.

3. Per schaalpje zijn er vier f^* uit een verbroken koppeling, zonder hun mannetjes, aanwezig, evenals F^* en M^* . Wordt F^* dan teruggevonden door M^* ? In de inleiding is besproken dat in het begin- en eindstadium van de ovariële- en daarmee gebonden vervellingscyclus de koppeling wordt aangeduid als pre-copula. De vraag is dus of het mannetje het onderscheid kan maken tussen f^* en F^* . Deze proef hebben wij tweemaal uitgevoerd, dus met twaalf petrischalen met ieder M^* , F^* en vier f^* .

Indien de koppeling aan F^* daadwerkelijk de voorkeur ten opzichte van f^* heeft, dan zijn de resultaten van proef 3 een extra bevestiging van hypothese I.

4. Per schaalpje zijn er vier niet-gekoppelde m aanwezig samen met F^* uit het verbroken koppel. Hebben de andere m belangstelling voor F^* ? Voor extra observatie scheiden wij na dit getoetst te hebben de eventueel gevormde koppels en plaatsen de F^* in een ander schaalpje met haar originele M^* . Heeft M^* nog belangstelling voor F^* of omgekeerd? Voor deze proef zijn twaalf petrischaaltjes nodig.
5. F^* wordt na eerdere koppeling met M^* samen met één willekeurig m geplaatst. Een uur later kijken we of ze zijn gekoppeld, tussendoor bekijken we het gedrag. Indien ze gekoppeld zijn, halen we het nieuw gevormde koppel uit

elkaar en plaatsen wij F* weer bij (de bekende) M*. Indien dat niet het geval is, plaatsen we F* nog steeds bij M*. Heeft M* dan nog belangstelling voor F* of omgekeerd?

Indien in proef 4 en 5 F* de voorkeur geeft aan M* en minder koppelt aan een van de m, dan besluiten we dat er mogelijk een individuele herkenning tussen M* en F* is, zoals Darwin noemt 'mutually attached' zijn.

De proeven 4 en 5 zijn anders dan proeven 2 en 3 waar de andere f of f* gelijktijdig werden aangeboden. In proef 4 en 5 wordt F* na eventueel gekoppeld te zijn aan een andere m, hiervan weer van ontkoppeld en teruggeplaatst in de petrischaal waar haar 'eigen' M* na ontkoppeling werd gehouden. Dit gebeurt dus niet gelijktijdig.

We doen nog een extra proef om te toetsen hoe sterk een eventuele aantrekking is. Of het de vermoedelijke stof ecdyson van de ovariële/vervellings-cyclus overstijgt, met andere woorden of er een individuele herkenning is van M* door F* en omgekeerd.

6. Vijf verbroken koppeltjes zijn (los) aanwezig in eenzelfde schaalpje. Herstellen de oorspronkelijke koppels, of worden er nieuwe koppels gevormd? Wederom gebruiken we zes schalen, dus in totaal 30 koppels.

2.3 Uitvoering:

We hebben de proeven bij Miel (Anna's opa) in Veldhoven gedaan. In totaal zijn we vier keer naar Veldhoven geweest, waarvoor we steeds twee uur heen en twee uur terug met het openbaar vervoer zijn gegaan. Wij hebben de gammarussen uit een beekje gehaald, de Beekloop in Bergeijk, met de monsterplaatsen allemaal dicht bij elkaar. Miel heeft elke keer de dag van tevoren de gammarussen voor ons gevangen zodat we alle tijd konden besteden aan het uitvoeren van de proeven. De laatste keer dat we naar Veldhoven geweest zijn, zijn we mee geweest met het vangen van de gammarussen.

De gammarussen zijn het best te vangen in laag water met een beetje stroming. Wij hebben ze gevangen door met een dun net over de bodem te schrapen, waarna we het net hebben geleegd in een grote bak met een dun laagje water en planten uit diezelfde beek. Daarna hebben we ze vervoerd in de auto en meegenomen naar onze werkplek. Bij Miel thuis hebben we de gammarussen in bakken met een laag waterniveau met een combinatie van water uit de beek en water uit de kraan. We hebben het water geaëreerd, dit doe je door een buisje in te brengen met een luchtpompje, zodat wat extra zuurstof in het water komt.

Bij elke proef hebben we een vast schema wat we hebben aangehouden. Ten eerste moesten we de koppels vangen uit de bakken die we uitgesteld hadden. Daarna kwam het scheiden van de koppels. Dit deden wij als volgt: de koppels worden op een hand gelegd (in dit geval Anna's hand) en het water werd van de hand afgegoten. Terwijl het water wegstroomt zullen zij door de warmte van de hand loslaten. Otto timede hoe lang het duurde voordat de koppels loslieten. Bij nagenoeg alle proeven waren er meerdere F of meerdere M aanwezig. Om onderscheid te kunnen maken tussen deze verschillende vrouwtjes en mannetjes, hebben we ze gemerkt. Elk vrouwtje in eenzelfde petrischaaltje kreeg een andere kleur nagellak. De nagellak die we gebruikten was allemaal van de Hema of van de Rituals, constant gehouden per proef. Vervolgens heeft Anna met een kwastje, wat we zo geknipt hadden dat het nog maar heel dun was, het uiteinde van de achterpoot van elk vrouwtje (en bij sommige proeven het mannetje) gemerkt.

Voor elke proef hebben we voorbereidingen moeten doen. Hieronder staat per proef beschreven wat dit precies inhield.

Proef 1:

M en F* samen in een schaalte na onderbroken te zijn. Hoe lang duurt het voordat ze gekoppeld zijn?*

Voordat de proef kon beginnen hebben we zes koppeltjes van de soort *G. pulex* gevangen, en hebben we deze in zes verschillende petrischaaltjes geplaatst. Daarna hebben ze twee uur lang kunnen acclimatiseren in deze schaaltes voor het begin van de proef. Na die twee uur hebben we de koppels gescheiden op Anna's hand en deden we het mannetje en het vrouwtje weer terug in hun eigen petrischaaltje. We hebben gekeken naar drie dingen:

- I. Óf het mannetje het vrouwtje überhaupt terugvindt
- II. Hoe lang het duurt voordat ze elkaar vinden
- III. Andere bijzonderheden en ander contact gedurende de proef

We hebben proef 1 zesmaal uitgevoerd. De koppels van proef 1 hebben wij na het experiment niet terug bij de bak met de andere gammarussen gedaan.

Proef 2:

Meerdere f aanwezig in het schaalte samen met F, wordt F* teruggevonden door M*?*

Proef 2 is als het ware een vervolg op proef 1, we hebben dus de koppels en de bakjes van proef 1 hergebruikt. Voor proef 2 waren alleen koppels nodig. De bakjes uit proef 1 waar niet opnieuw een koppel was ontstaan, hebben we nieuwe gammarussen in geplaatst. We plaatsten vier andere vrouwtjes bij het koppel.

Voor deze proef moesten we de verschillende vrouwtjes kunnen onderscheiden. Dit hebben we gedaan door ze te merken. F* werd gemerkt met rode nagellak van de

Rituals. De overige vrouwtjes hebben we, ook op het einde van een achterpoot, gemerkt met kleurloze nagellak, ook van de Rituals. Het merken van F* vond plaats na de scheiding van de koppels, dit gebeurde weer op Anna's hand.

Proef 3:

Meerdere f uit een verbroken koppeling aanwezig, wordt F* dan teruggevonden door M*?*

Voor proef 3 zijn er per petrischaaltje vijf koppels gebruikt. We hebben steeds de twee gammarussen uit een koppel met dezelfde kleur nagellak gemerkt. We hebben deze keer Hema nagellak gebruikt. We scheidde de koppels op Anna's hand, en hebben de mannetjes in het ene bakje en de vrouwtjes in het andere bakje gezet. Hierna voegen we M* toe bij de vrouwtjes uit de eerdere verbroken koppeling om te kijken of hij F* terugvindt. Na een uur zijn we gestopt met observeren.

Proef 4:

Meerdere m aanwezig in het schaalte samen met F uit een verbroken koppel. Hebben de andere m belangstelling voor F*? Voor extra observatie scheiden wij na dit getoetst te hebben de eventueel gevormde koppels en plaatsen de F* in een ander schaalte met haar originele M*. Heeft M* nog belangstelling voor F*? Voor deze proef zijn twaalf petrischaaltjes nodig.*

De gammarussen die wij hebben gebruikt, zijn een dag van tevoren gevangen. Ze hebben een uur kunnen wennen aan hun petrischaaltjes. We hebben de proef zes keer herhaald. Per petrischaaltje voegden we vier willekeurige, ongekoppelde mannetjes van de soort *G. pulex* toe. Tijdens deze proef hebben we de gammarussen niet gemerkt, aangezien het vrouwtje veel kleiner was in vergelijking met de mannetjes en er geen onderscheid gemaakt hoefde te worden tussen de mannetjes. We scheidde het koppel weer op Anna's hand, en voegden het vrouwtje uit dit koppel toe bij het schaalte waarin de vier mannetjes zitten. M* werd in een ander bakje geplaatst.

Proef 5:

F wordt na eerdere koppeling met M* samen met een willekeurig M geplaatst. Een uur later kijken we of ze zijn gekoppeld. Indien dit het geval is, halen we het nieuwgevormde koppel uit elkaar en plaatsen we F* weer bij (de bekende) M*. Indien dat niet het geval is, plaatsen we F* nog steeds bij M*. Heeft M* dan nog belangstelling voor F*?*

De gammarussen zijn een dag van tevoren gevangen, ze hebben een uur kunnen acclimatiseren in de petrischaaltjes. Er hoeft niet gemerkt te worden, het vrouwtje is goed te onderscheiden van de mannetjes en de mannetjes worden nooit in één bakje gedaan.

Proef 6:

Zes verbroken koppeltjes zijn (los) aanwezig in eenzelfde schaalpje. Herstellen de oorspronkelijke koppels, of worden er nieuwe gevormd?

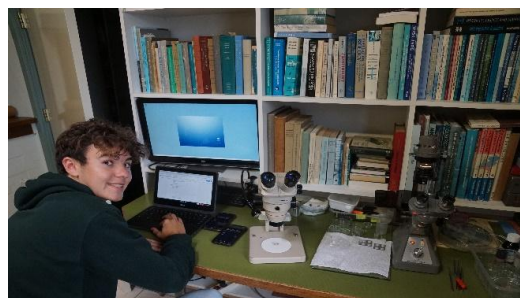
De gammarussen zijn op de dag van de proeven gevangen. Anna heeft de gammarussen gemerkt door een koppeltje op een gevouwen kussensloop te leggen waarna het water daarin trok. Dan kleurde Anna het uiteinde van een achterpoot van zowel het mannetje als het vrouwtje met dezelfde kleur. De kleuren die we hebben gebruikt zijn rood, geel, roze, blauw en groen, allemaal weer nagellak van de Hema. Na het verven werden de koppels gescheiden, als dat niet al gebeurd was, en werden ze eerst in aparte schaalpjes geplaatst. We hebben eerst alle koppels voor elk van de zes herhalingen gelakt en zijn daarna begonnen aan de proef. Zo konden ze een uur voor de proef acclimatiseren. We hebben de proef zes keer herhaald, en voor elke keer hadden we vijf koppels nodig.



Afb. 3, afb. 4 en afb 5: de gammarussen merken en scheiden



Afb. 6: proefjes uitvoeren



Afb 7: verslaggeving van de proefjes



Afb. 8: de Beekloop, hier hebben wij de gammarussen steeds gevangen

In een leefgebied zitten uiteraard meerdere soorten. Bij het vangen namen we dus ook verschillende soorten gammarussen mee. We doen onderzoek met *G. pulex*. Naast *G. pulex* vingen we ook *Gammarus roeselii* en *Echinogammarus berriloni*. Deze twee andere soorten waren makkelijk te onderscheiden van *Gammarus pulex* door uiterlijke kenmerken. Wij hebben de andere twee soorten in onze eigen populatie eruit gevestigd en in een andere bak geplaatst.



Afb 9: petrischaaltjes waarin de proeven zijn uitgevoerd

Het maken van de cirkeldiagrammen (zie resultaten) hebben we met Google Spreadsheets gedaan en de staafdiagrammen hebben we met Graphpad prism gemaakt. We hebben bij de grafieken de standaardfout, een spreidingsmaat vergelijkbaar met de standaarddeviatie, gebruikt.

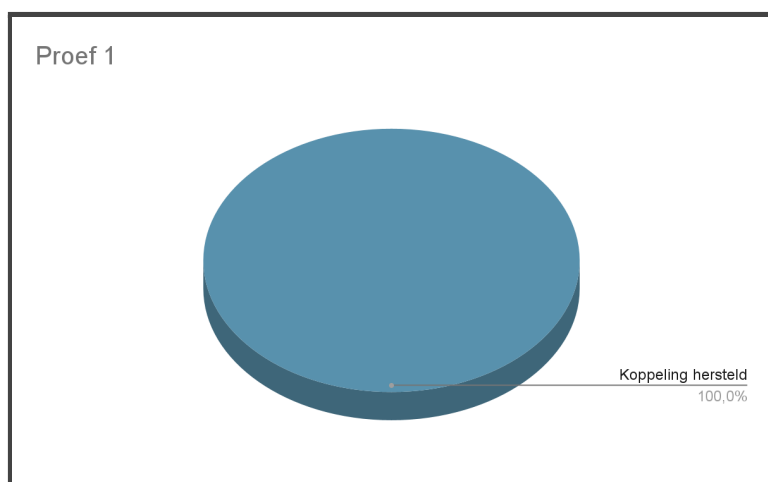
3. Waarnemingen en resultaten

Proef	Herkomst van gamma-russen	Grootte van gamma-russen	Juvenielen aanwezig?	n mannetjes per bakje	n vrouwtjes per bakje	Herstel van koppelingen tussen M* en F*	Andere koppelingen
1	bovenloop*	halfwassen	niet	1	1	(4 van 6) 4 van 4	n.v.t.
2	bovenloop*	halfwassen	niet	1	5	(3 van 6) 3 van 3	2 van 24
3.1	middenloop*	volwassen groot	bij 5 van 6	1	5	1 van 6	3 van 24
3.2	bovenloop*	halfwassen	niet	1	5	4 van 6	2 van 24
4	middenloop*	volwassen groot	niet	4	1	4 van 6	5 van 6
5	middenloop*	volwassen groot	bij 1 van 6	1	1	5 van 6	1 van 6
6	bovenloop*	halfwassen	bij 1 van 6	5	5	5 van 30	15 van 30

Tabel 4: kort overzicht van belangrijke omstandigheden van de proeven, met in de laatste twee kolommen kort de resultaten

(*van de Beekloop in Noord-Brabant)

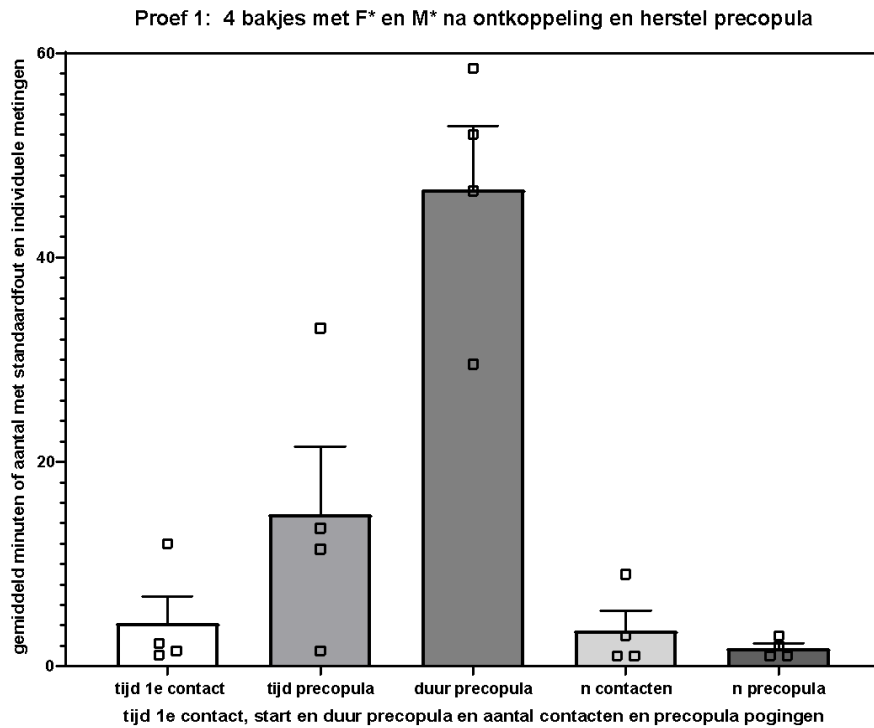
Proef 1: M* en F* samen in een schaalpje na onderbroken te zijn. Hoe lang duurt het voordat ze gekoppeld zijn?



Cirkeldiagram 1: koppeling hersteld of koppeling niet hersteld in procenten weergegeven

Bij proef 1 zijn vier van de vier koppels hersteld na eerdere ont koppeling.

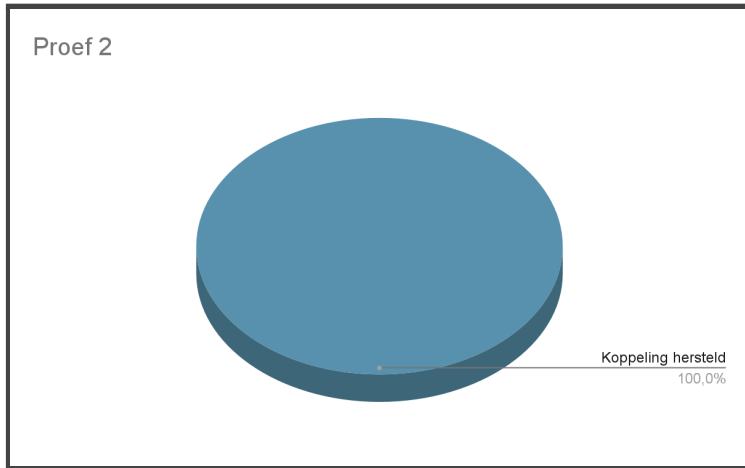
FIGUUR 1:



Figuur 1: waarnemingen uitgezet tegen gemiddeld aantal minuten of gemiddeld aantal

We gaan uit van de vier koppels *G. pulex* man met *G. pulex* vrouw om proef 1 nader te bekijken. We kunnen deze beschouwen als de controleproef, omdat het mannetje (M*) en het vrouwtje (F*) geen alternatieve keuze krijgen aangeboden. We zien dat er al vrij snel contact wordt gezocht, meestal zit F* stil en wordt benaderd door M*, bij drie van de vier binnen drie minuten. De helft van de eerste contacten leiden nog niet tot een koppeling, zie tijd 1e contact en tijd pre-copula. De pre-copula's worden niet altijd direct bij het eerste contact gevormd en zijn niet compleet ononderbroken gedurende de hele proeftijd van 60 minuten. Een enkele keer kan de koppeling mislukken na een minuut of 2 en wordt het even later opnieuw geprobeerd.

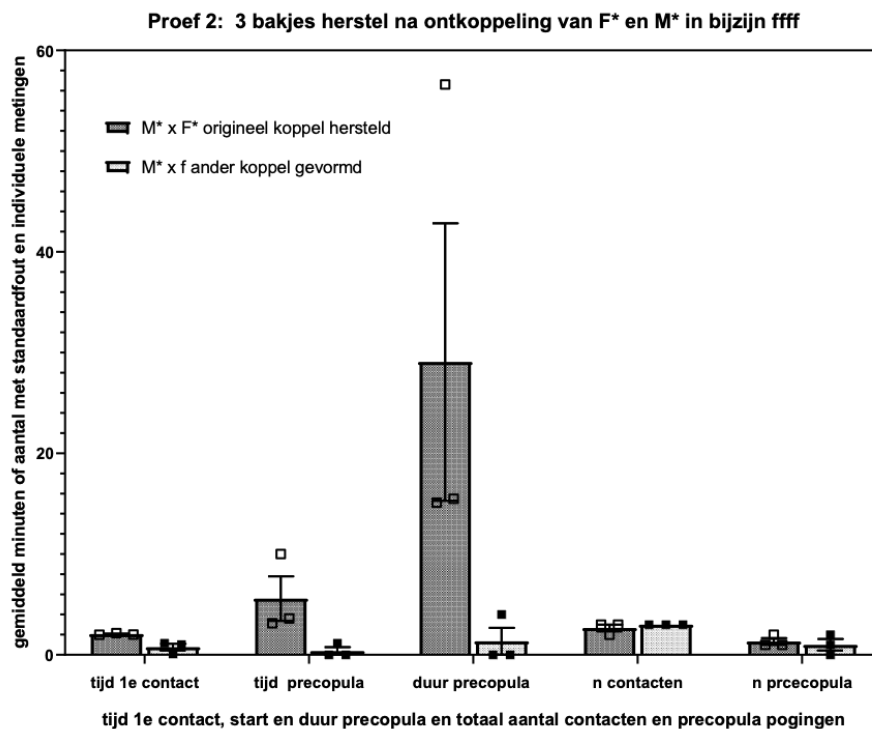
Proef 2: Meerdere f aanwezig in het schaalpje samen met F*, wordt F* teruggevonden door M*?



Cirkeldiagram 2: koppeling hersteld of koppeling niet hersteld in procenten weergegeven

Bij proef 2 zijn er drie van drie oorspronkelijke koppels hersteld.

FIGUUR 2:

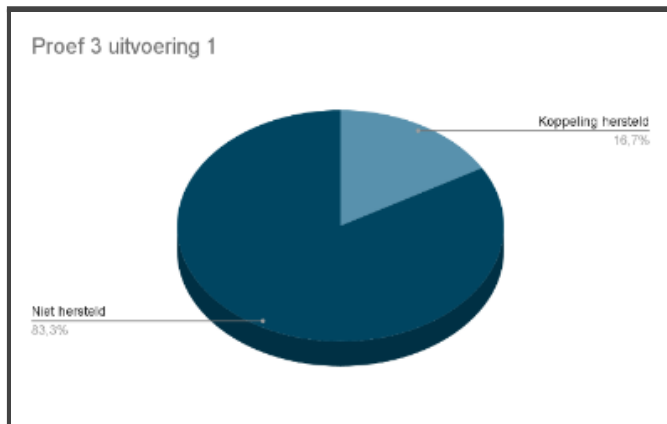


Figuur 2: waarnemingen uitgezet tegen gemiddeld aantal minuten of gemiddeld aantal

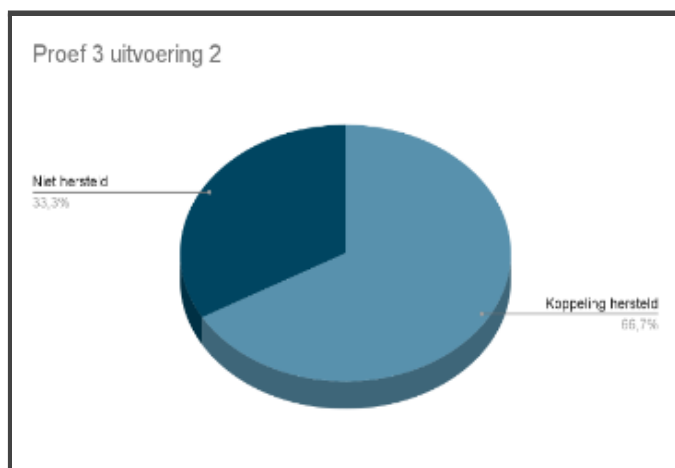
Er zijn steeds in ieder proefbakje 4 keer zoveel f als F* vrouwtjes. De kans dat het mannetje bij willekeurige botsingen tegen een f vrouwtje botst is 4 keer zo groot. Toch is het aantal contacten met F* net zo groot als met f. Die contacten met f leiden niet tot langdurige koppeling (pre-copula). Het contact met de F* is even vaak maar

vaak pas na een paar minuten; zie tijd pre-copula. Het contact met f is als het ware afgekeurd door M* en het contact met F* goedgekeurd.

Proef 3: Meerdere f* uit een verbroken koppeling aanwezig, wordt F* dan teruggevonden door M*?



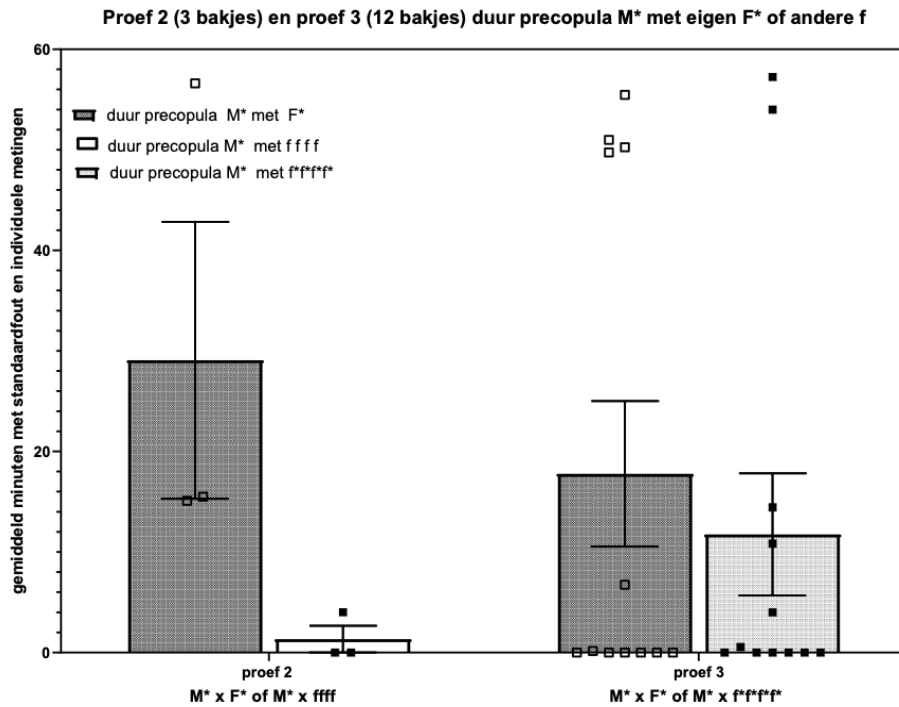
Cirkeldiagram 3A: koppeling hersteld of koppeling niet hersteld in procenten weergegeven



Cirkeldiagram 3B: koppeling hersteld of koppeling niet hersteld in procenten weergegeven

Maar één van de zes koppels van de eerste uitvoering van proef 3 is hersteld. Bij de tweede uitvoering van proef 3 zijn vier van de zes koppels hersteld. Bij uitvoering twee was geen sprake van juvenielen.

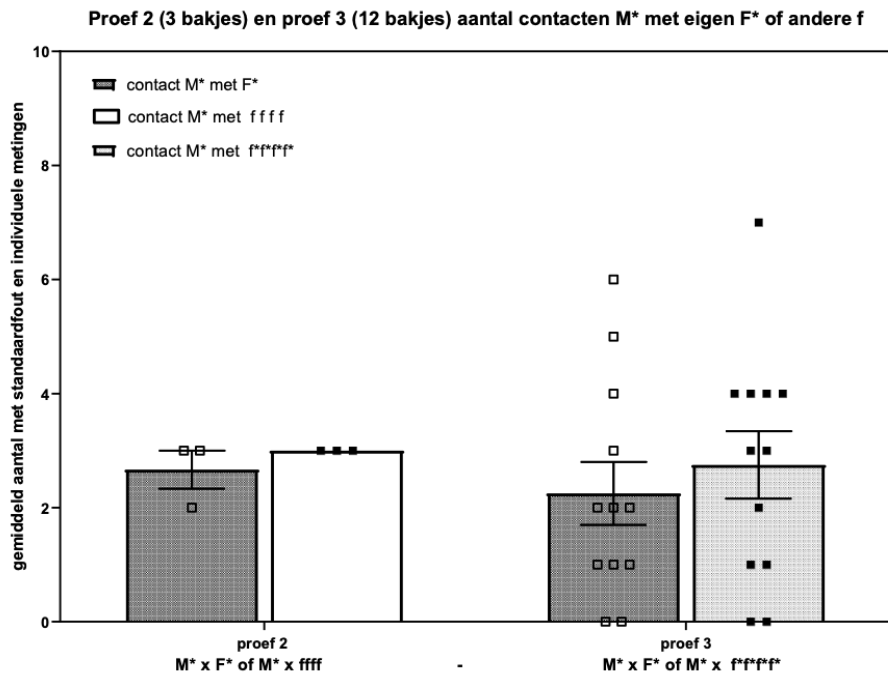
FIGUUR 3A:



Figuur 3A: duur pre-copula M* met F*, M* met ffff of M* met f*f*f*f* uitgezet tegen gemiddelde minuten

Bij proef 2 worden in het bakje vier vrij zwemmende vrouwtjes (ffff) *G. pulex* toegevoegd aan het ontkoppelde vrouwtje (F*), daarna wordt het ontkoppelde mannetje M* toegevoegd en het gedrag ervan waargenomen. Bij proef 3 worden geen vrij zwemmende maar ontkoppelde vrouwtjes (f*f*f*f*) toegevoegd. Het gedrag van de M* is in proef 3 duidelijk anders dan in proef 2. De duur van de pre-copula is even groot voor F* en f* in proef 3 en het aantal gekoppelde is gelijk (5 en 5). Het percentage dat koppelt is niet even groot: van f* ($5/48 \times 100 =$) 10% en van F* ($5/12 \times 100 =$) 42%.

FIGUUR 3B:

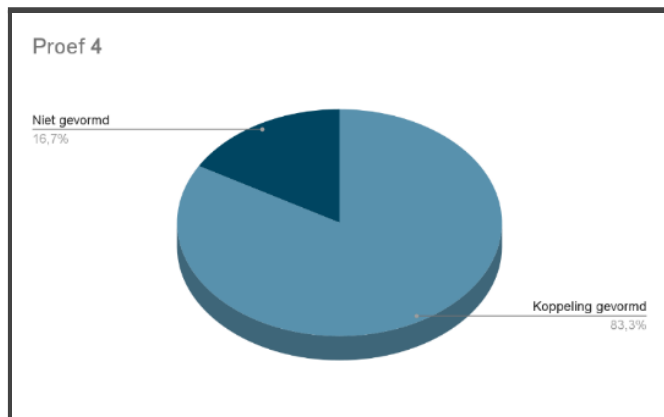


Figuur 3B: contact M* met F*, M* met fff en M* met f*f*f*f* uitgezet tegen gemiddeld aantal minuten

Bij proef 2 is tussen M* en F* 8 keer (3+3+2) contact opgetreden en 9 keer (3+3+3) tussen M* en fff. Bij proef 3 is tussen M* en F* 30 maal (8+5+4+3+3+2+2+1+1+1+0+0) contact opgetreden en tussen M* en f*f*f*f* 28 maal (5+5+4+3+3+2+2+2+1+1+0+0).

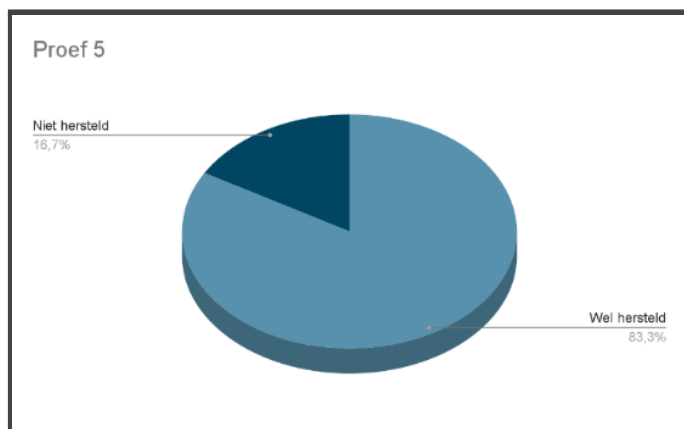
Proef 4: Meerdere m aanwezig in het schaalte samen met F* uit een verbroken koppeling. Hebben de andere m belangstelling voor F*? Voor extra observatie scheiden wij na dit getoetst te hebben de eventueel -gevormde koppels en plaatsen de F* in een ander schaalte met haar originele M*. Heeft M* nog belangstelling voor F* en omgekeerd?

Proef 5: F* wordt na eerdere koppeling met M* samen met een willekeurig M geplaatst. Een uur later kijken we of ze zijn gekoppeld. Indien dat het geval is, halen we het nieuw gevormde koppel uit elkaar en plaatsen we F* weer bij (de bekende) M*. Indien dat niet het geval is, plaatsen we F* nog steeds bij M*. Heeft M* dan nog belangstelling voor F* en omgekeerd?



Cirkeldiagram 4: koppeling hersteld of koppeling niet hersteld in procenten weergegeven

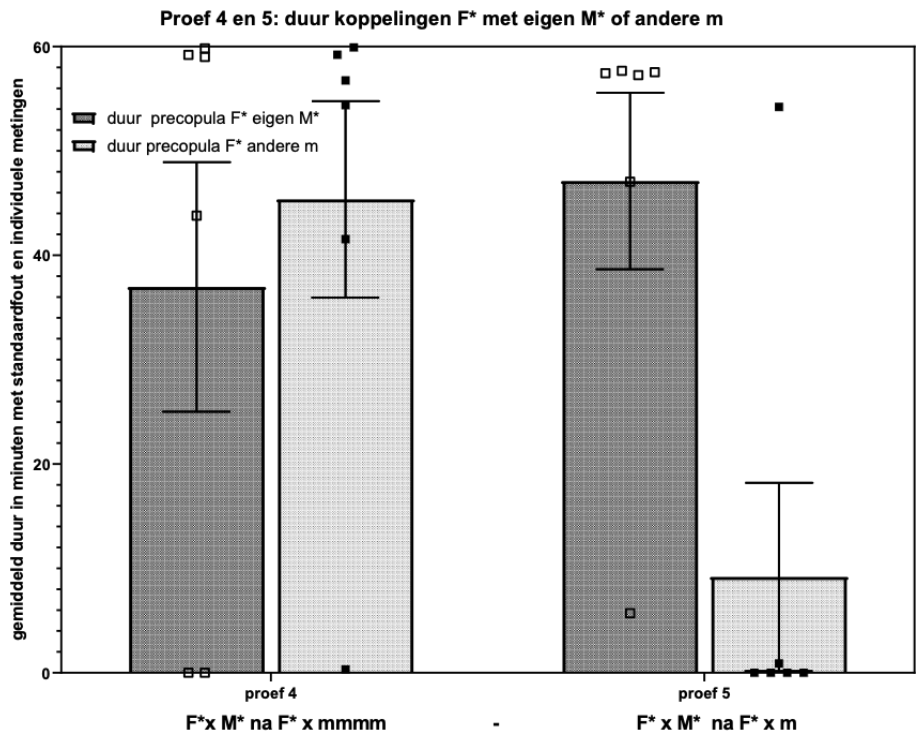
Bij proef 4 is het duidelijk geworden dat 66,7% van de vrouwtjes een nieuwe koppeling heeft gevormd. 33,3% bleef onge koppeld.



Cirkeldiagram 5: koppeling hersteld of koppeling niet hersteld in procenten weergegeven

Bij proef 5 zijn vijf van de zes koppels hersteld na het vrouwtje terug te zetten bij het originele mannetje en twee van de zes vrouwtjes was een koppeling aangegaan met het andere mannetje. Bij één van de zes herhalingen waren juvenielen aanwezig. Daar is toch de koppeling van M* en F* hersteld.

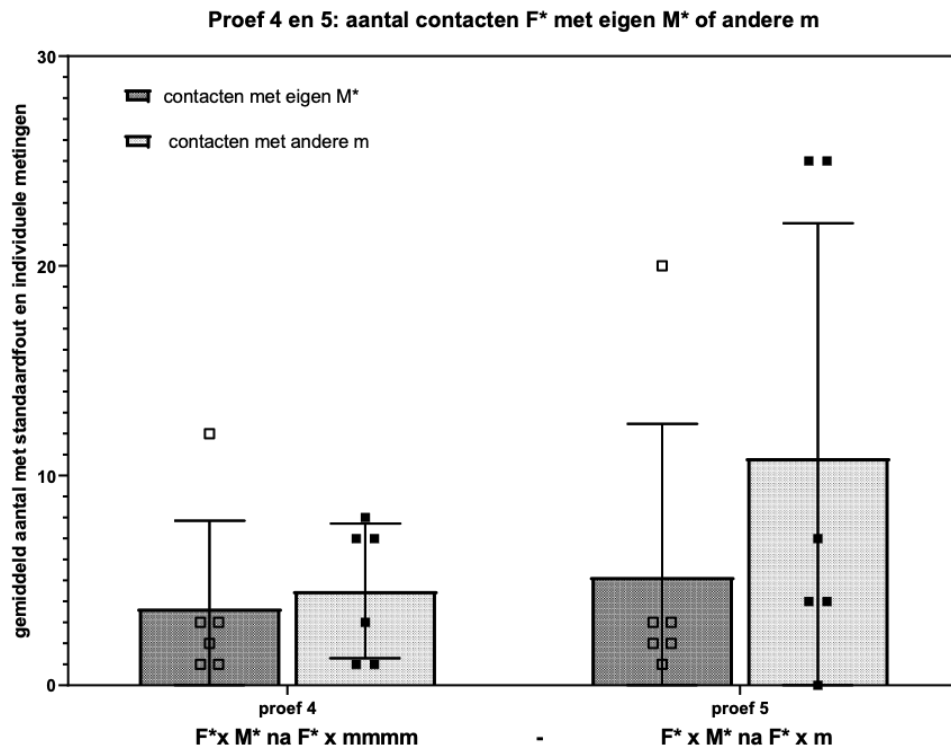
FIGUUR 4A:



Figuur 4A: duur koppeling aan eigen M* of aan andere m uitgezet tegen gemiddelde duur in minuten

Bij proef 4 en 5 wordt het effect op de koppeling van F* en M* waargenomen na het verblijf in een apart bakje van F* bij een andere m (proef 5) dan wel vier andere m (proef 4). Er is een duidelijke aanwijzing dat het verschil tussen de koppeling met een vreemde m veel meer plaatsvindt als er meerdere vreemde m aanwezig zijn (proef 4). Is er maar één m aanwezig dan lukt maar één van de zes mogelijke koppelingen. In proef 4 is aantal en duur van de koppeling van F* met een van de m nagenoeg gelijk aan de daaropvolgende koppeling van F* met M*.

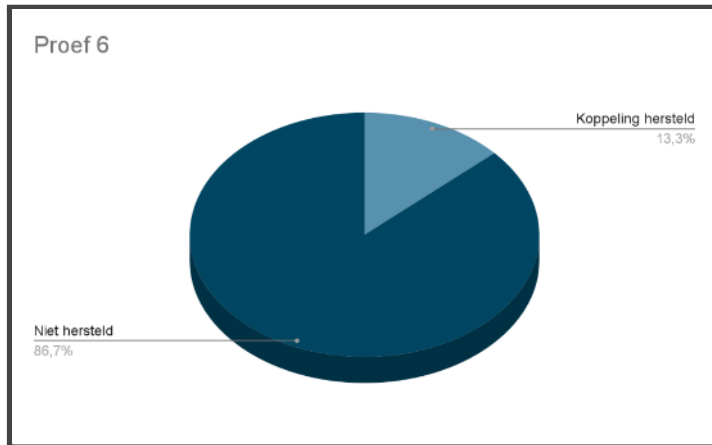
FIGUUR 4B:



Figuur 4B: contacten met eigen M* en contacten met andere m uitgezet tegen gemiddeld aantal

Het aantal contacten nodig om een koppeling te vormen is vooral opvallend groot bij proef 5 als F* bij m geplaatst wordt. Er zijn dan minstens 65 contacten (gemiddeld 11 per m) nodig waarbij maar één langdurige koppeling gevormd wordt. De daarop volgende vijf koppelingen van F* na terugplaatsing bij M* hebben gemiddeld 5 contacten nodig. Bij proef 4 zijn die gemiddelden nauwelijks verschillend; 4 en 3,5. Het aantal koppelingen na terugplaatsing lukt bij proef 4 maar in vier van de zes bakjes, terwijl dat bij proef 5 in vijf van zes is gelukt.

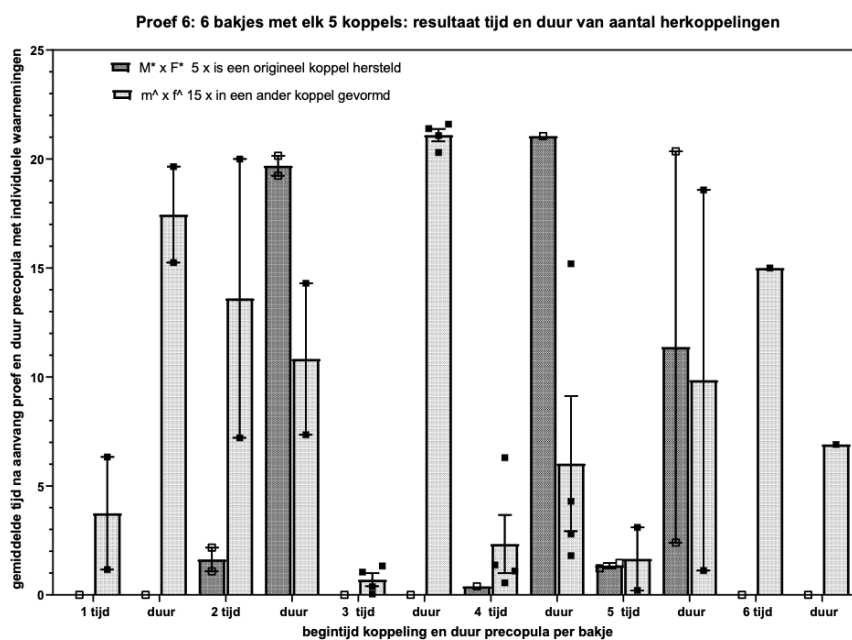
Proef 6: Zes verbroken koppeltjes zijn (los) aanwezig in eenzelfde schaalteje. Herstellen de oorspronkelijke koppels, of worden er nieuwe gevormd?



Cirkeldiagram 6: koppeling hersteld of koppeling niet hersteld in procenten weergegeven

Bij deze proef hebben we gezien dat 13,3% van de koppels is hersteld. Een overgrote meerderheid is dus een andere koppeling of helemaal geen koppeling aangegaan.

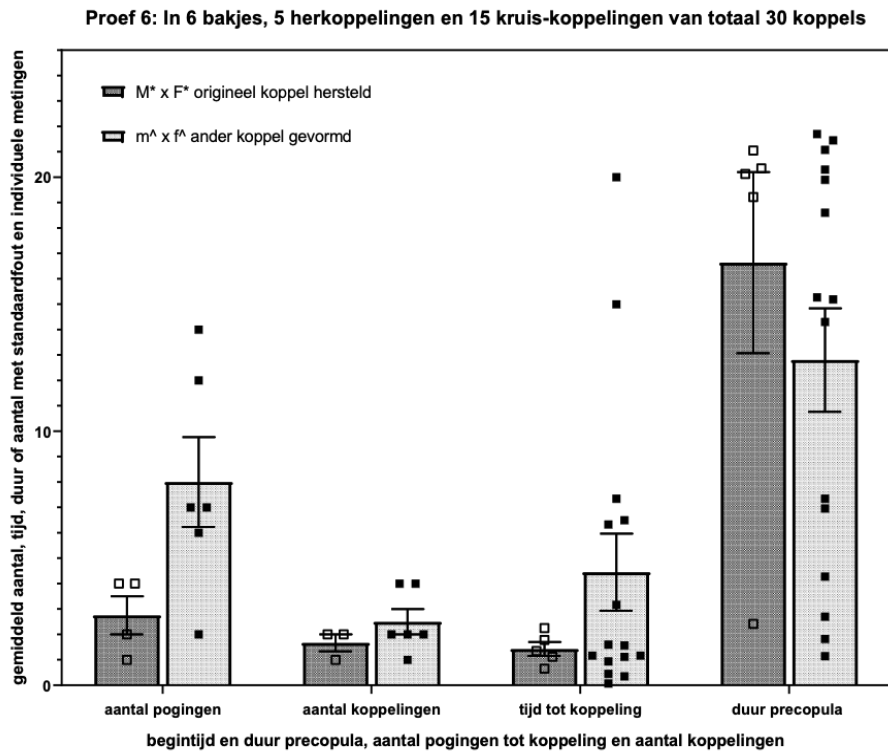
FIGUUR 5A:



Figuur 5A: M x F* hersteld of m^ x f^ koppel ontstaan uitgezet tegen gemiddelde tijd*

Proef 6 is wat anders van opzet: in ieder van zes bakjes worden vijf koppels van vijf kleuren (F* en M*) losgelaten. Nadat de ontkoppelde pre-copula geleverd zijn worden m en f gezamenlijk in het bakje losgelaten. Indien een koppel van gelijke kleur ontstaat wordt dat in de figuur M* x F* genoemd. Gemengde koppels zijn met m^ x f^ aangeduid. Alleen in bakje 2, 4 en 5 ontstaat minstens een M* x F* koppel. In totaal ontstaan vijf M* x F* pre-copula's en vijftien m^ x f^ pre-copula's.

FIGUUR 5B:



Figuur 5B: waarnemingen bij vorming $M^* \times F^*$ of $m^{\wedge} \times f^{\wedge}$ koppel uitgezet tegen gemiddeld aantal, tijd en duur

De twintig gevormde pre-copula's zijn in deze figuur weergegeven voor aantal pogingen en aantal geslaagde koppelingen en de tijd verlopen tot vorming van een geslaagde koppeling en de totale duur van koppeling. Het laatste met een maximum van 25 minuten omdat ruim daarvoor al geen poging meer tot koppeling ondernomen werd. Het aantal pogingen tot koppeling (bij ieder contact werd bij deze proef een koppel poging ondernomen) en het aantal geslaagde koppelingen is zo verschillend tussen $M^* \times F^*$ en $m^{\wedge} \times f^{\wedge}$. Van de 30 koppels is bij gelijk gedrag van de f en m bij de vorming van een $M^* \times F^*$ of een $m^{\wedge} \times f^{\wedge}$ koppel een verhouding van 1 op 4 (1 F^* en 4 andere f^{\wedge}) te verwachten. We zien een verhouding van 1 op 3 (1 koppeling met F^* op 3 koppelingen met f^{\wedge}), iets meer in het voordeel van het $M^* \times F^*$ koppel.

Het aantal koppel pogingen is 11 voor het $M^* \times F^*$ koppel en 48 voor het $m^{\wedge} \times f^{\wedge}$ koppel, een verhouding van ongeveer 1 op 4. Uit de 11 pogingen ontstaan 5 koppels, 2,2 poging per pre-copula. Bij de 48 $m^{\wedge} \times f^{\wedge}$ pogingen zien we 15 slagingen, dat is 3,2 pogingen per pre-copula. Ook de tijd tot geslaagde koppeling is gemiddeld langer bij de $m^{\wedge} \times f^{\wedge}$ koppeling. Dit lijkt vreemd als je de grafiek (figuur 5B) bekijkt. Het is echter toch niet zo verschillend als het lijkt: er zijn maar 6 van de 15 tijden bij $m^{\wedge} \times f^{\wedge}$ die langer duren dan de max 2 minuten bij $M^* \times F^*$.

Tabel 5:

Proef	M* of m of m*	F* of F of f*	Contacten benodigd per prcop F*geslaagd /niet geslaagd	Contacten benodigd per prcop f of f* geslaagd/niet geslaagd	Verwachte verhouding bij willekeurige verdeling	M* en F*	M* f m F*
1	1M*	1F*	3,2 /-		100%	4 van 4 100%	n.v.t.
2	1M*	1F* 4f	2,7 / niet	niet / 3	20%/80%	3 van 3 100%	1 van 12 8%
3	1M*	1F* 4f*	2,2 / 3,6	2,0 / 3,0	20%/80%	5 van 12 42%	5 van 48 10%
4	4m/1M*	1F*/1F*	1,8 / 7,5	4 / 7	100%/100%	4 van 6 67%	5 van 6 83%
5	1m/1M*	1F*/1F*	2,2 / 20	4 / 12,2	100%/100%	5 van 6 83%	1 van 6 17%
6	5M*	5F*	2,2	3,8	20%/80%	5 van 30 17%	15 van 30 50%

Tabel 5: resultaten van de uitgewerkte ethogrammen omgezet als: benodigde contacten per gevormde pre-copula.

Kolom 4 en 5 geven het gemiddeld aantal contacten als een geslaagde of niet geslaagde pre-copula wordt gevormd met F* of met f of f*. Onder een niet-geslaagde pre-copula verstaan wij contact met F*, f of f* wat niet resulteert in een pre-copula. Kolom 6 geeft de te verwachten berekende verhoudingen als de verdeling van de geslaagde pre-copula's overeen zou komen met het aantal F* en f of f*. Kolom 7 en 8 geven de verhoudingen van geslaagde pre-copula's zoals waargenomen in de proeven

Bij proef 2, 3 en 5 valt het verschil van verwachte verhouding en de gevonden verhouding tussen de verschillende koppelmogelijkheden uit in het voordeel van M* x F*. Bij proef 3, 4 en 5 is het aantal contacten voor vorming van M* x F* minder dan voor vorming M* x f* of respectievelijk M* x f* en m x F* (minder moeite bij de totstandkoming). Bij proef 2 worden alleen met M* x F* langdurige contacten gevormd.

Het aantal contacten benodigd om tot een koppeling van M* x F* te komen is ongeveer 3: 3,2 bij proef 1 en 2,7 bij proef 2. Wordt er een alternatief aangeboden, dan is het aantal benodigde contacten minder (proef 3, 4, 5 en 6). Wordt er geen koppeling gemaakt, dan is het aantal contacten groot; vooral bij proef 4 en 5 waarbij F* x m wordt getest is dat zichtbaar.

4. Conclusie

We komen terug op de vraag: welke factoren maken het mogelijk dat het mannetje het vrouwtje terugvindt na onderbreking van de koppeling? Wij kunnen niet zeggen welke factoren de doorslaggevende rol spelen. Wel weten we dat man en vrouw hormonaal gesynchroniseerd zijn ('The attractiveness of the female, whatever the mechanism of its operation, is related to both the ripeness of the ovaries and the stage of the moult cycle' (Hartnoll & Smith 1979)) en dat het vrouwtje een actieve rol speelt in het afwijzen of terugnemen van het mannetje.

Had Darwin dus gelijk met zijn uitspraak over 'mutually attached'? Ja, wij zijn mening van wel.

Hypothese I: 'Het mannetje kan tussen andere vrouwtjes zijn eigen vrouwtje vinden en een herkoppeling tot stand brengen.' Dit kunnen we op basis van de resultaten van proef 1, 2 en 3 aannemen en is dus een bevestiging van het door Darwin gestelde.

Hypothese II: 'Er is een lokstof, een nog onbekend stofje, of er zijn bepaalde gedragingen, die een rol spelen bij het terugvinden van het vrouwtje.' Deze hypothese kunnen we niet aannemen, maar we kunnen het ook zeker niet uitsluiten; uit de proeven lijkt te blijken dat de herkenning aan de ontwikkelingsfase van het vrouwtje ligt.

5. Discussie

5.1 Ongeldigheden

Bij proef 1 hebben we zes koppels gebruikt. Bij twee van de koppels is er iets misgegaan waar we na het uitvoeren van de proef zijn achtergekomen. Bij het ene schaalpje hadden we in plaats van een *G. pulex* mannetje een *E. berriloni* mannetje ingebracht. In het andere schaalpje bleek een *E. berriloni* koppel te zitten waardoor deze twee schaalpjes ongeldig waren en niet belangrijk voor onze resultaten. We praten daarom over vier van vier geslaagde koppelingen bij proef 1. Bij proef 2 was er een soortgelijke situatie. Bij twee van de zes schaalpjes was het stukje rode nagellak op de achterpoot van de vrouwtjes verdwenen, waardoor de F* niet meer te onderscheiden waren van de andere f. In nog een ander schaalpje hebben we per ongeluk in plaats van vier f, drie f en een extra mannetje bijgevoegd. Dat extra mannetje heeft toen aan F* gekoppeld. Drie van de zes bakjes waren dus ongeldig, vandaar dat we praten over drie van drie geslaagde koppelingen bij proef 2.

Proef 3 hebben we twee keer uitgevoerd, omdat bij de eerste uitvoering er bij vijf van de zes F* juvenielen uit haar kwamen. Juvenielen geven een andere fase van de ovariële cyclus aan, dat heeft dus invloed op de aantrekkelijkheid van het vrouwtje (Hartnoll & Smith 1979). De omstandigheden van deze proef waren dus niet gelijk aan die van de andere proeven. Daarom hebben we deze proef nog een keer uitgevoerd en spreken we over twee uitvoeringen en twaalf bakjes in totaal.

5.2 Uitwerking van resultaten van proef 1, 2 en 3

In de resultaten is te zien dat wanneer er één mannetje aanwezig was met zijn ontkoppelde vrouwtje alleen (proef 1) of met meerdere willekeurige, vrij-zwemmende vrouwtjes (proef 2), de koppeling bij de meerderheid werd hersteld. Zodra er andere vrouwtjes uit een verbroken koppeling bij waren (proef 3), was het herstel moeilijker en werd een minder aantal van de oorspronkelijke koppelingen hersteld.

Op grond van het resultaat van proef 3 is in eerste instantie de koppeling met f* net zo vaak als met F*. Maar de verhouding in keuzemogelijkheid is niet gelijk. Er is maar een M* en die moet ofwel de F* of wel de f* kiezen. Zou het 'at random' gaan, dan zou je voor de twaalf bakjes een resultaat in de verhouding van rond de 1 op 4 (er is 1 F* en 4 f*) verwachten, het resultaat is echter 5 op 24 en 5 op 48.

Kijken we naar het gemak waarmee de koppeling tot stand komt, dan zien we dat bij proef 2 de koppeling met f gemiddeld 4,5 contacten nodig heeft en bij proef 3 met f* is dat 5,6. De M* koppelt dus gemakkelijker met een vrouwtje dat in het juiste stadium van broedontwikkeling is (de f*) dan met een vrij zwemmend vrouwtje (f).

Uit proef 1 en 2 valt dus af te leiden dat een ontkoppelde M* met vrij zwemmende vrouwtjes (f) in het algemeen geen koppeling tot stand brengt. Uit proef 3 valt af te

leiden dat de ontkoppelde M* met andere ontkoppelde vrouwtjes (f*) net zo gemakkelijk koppelt als met zijn eigen F*. Dit blijkt ook uit de contacten per pre-copula als M* een succesvolle koppeling maakt: gemiddeld 2,2 contacten met F* en 2,6 contacten met f*. Bij de niet geslaagde koppelingen zijn dat gemiddeld iets meer contacten, gemiddeld 3,6 met F* en 3,0 met f* (zie tabel 5). Bij deze laatste gemiddelden zijn de vier keer dat er nul contacten gemaakt worden (2 bij F* en 2 bij f*) dat natuurlijk niet in een pre-copula resulteert niet meegerekend. In de meeste proefbakjes maakt M* direct een contact en probeert daarna te koppelen. Lukt deze vrij directe koppeling meestal na enkele seconden of minuten dan is er geen contact met een van de f*. Maar bij ongeveer de helft van de contacten waarbij de F* en f* in proef 3 wegschieten, lijken ze het contact met M* tot de vorming van de pre-copula te vermijden. Het lijkt erop alsof een aantal f* maar ook enkele F* de pre-copula met M* niet willen maken. Het heen en weer gaan van M* tussen de vrouwtjes verhoogt het aantal contacten.

5.3 Darwin en hypothese I

In alle proeven weten meerdere M* niet goed direct de koppeling tot stand te brengen. In het algemeen zijn er wel drie pogingen tot koppeling nodig voordat er een stabiele koppeling wordt gemaakt. Zelfs bij proef 1 worden eerst kortdurende koppelingen gemaakt voordat een langer durende koppeling ontstaat. Bij proef 2 is dat ook het geval, maar dan worden de pogingen onderbroken doordat het mannetje ook met andere vrij zwemmende vrouwtjes (f) een korte koppeling maakt. Uiteindelijk komen alle drie geldige koppelingen toch tussen M* en F*. Bij proef 3 zien we hetzelfde patroon, maar komen twee vrijwel directe stabiele koppelingen tot stand, de ene met F* (binnen 1 seconde) en de andere met f* (binnen 11 seconden). Twee keer is heel duidelijk gezien dat het mannetje het verschijnsel, "*dashes into the crowd and picks his own female*", zoals door Darwin beschreven, vertoont. Meerdere malen wordt ook wel gezien dat het mannetje achter zijn eigen vrouwtje aan jaagt maar dat het vrouwtje dan steeds wegschiet.

De bewering van Darwin dat een mannelijke gammarus zijn eigen vrouwtje uit een groep anderen vindt, is alleen voor 100% waar als er zich niet al te veel ontkoppelde vrouwtjes in die groep bevinden.

Hypothese I in de zin zoals door Darwin genoteerd is onder bovenstaande omstandigheden juist.

Onze conclusie komt niet helemaal overeen met de hypothese, aangezien het lastig te bepalen is of het mannetje nu echt het vrouwtje herkent of eerder de fase van ei-ontwikkeling waarin het vrouwtje verkeert. Darwin heeft dit niet nader beschreven en schrijft dat er sprake is van herkenning, letterlijk genomen is dat zo.

5.4 Uitwerking resultaten van proef 4 en 5

Na terugplaatsing van het vrouwtje (F*) bij het eigen mannetje (M*) na een verblijf bij een willekeurig mannetje in een apart bakje (proef 5) vindt in vijf van de zes gevallen een koppeling plaats terwijl dat met het willekeurig mannetje maar in één van de zes gevallen heeft plaatsgevonden. Met meerdere willekeurige mannetjes (proef 4) lukt het één van de mannetjes in vijf van de zes gevallen een langdurige koppeling aan te gaan. Deze koppeling vindt in twee gevallen vrijwel meteen plaats na de ontmoeting van het vrouwtje met de mannetjes. In drie andere gevallen wordt het uitgesteld door onderbreking van een van de andere mannetjes, in het andere geval lukt de pre-copula daarom in het geheel niet.

In contrast hiermee is het verblijf van het vrouwtje in het bakje met een niet eigen mannetje, proef 5. Dan lukt maar één van de zes mogelijke pre-copula's duidelijk door verzet van het vrouwtje zelf. Bij iedere ontmoeting, ook met antenncontact (ethogram 8), schiet het vrouwtje weg en soms met een achtervolging van het mannetje. Eenmaal terug bij het eigen mannetje lukt de pre-copula meestal vrijwel direct zonder achtervolging. In het ene geval dat het (ook) daar niet lukt nemen de contacten voor de pre-copula sterk in aantal toe. Een succesvolle pre-copula tussen F* en M* komt in de proeven 4 en 5 vrijwel direct in de eerste minuten, soms eerste seconden, zonder weerstand van het vrouwtje, tot stand (zie tabel 5).

Uit de resultaten van proef 5 kan geconcludeerd worden dat het vrouwtje na het ontkoppelen van haar eigen mannetje zich verzet tegen een koppeling met een niet eigen mannetje. Bij proef 4 lijkt dat ook zo te zijn, maar zijn de mannetjes mogelijk vanwege het "density-effect", (het aantal vrouwtjes is weinig in verhouding met het aantal mannetjes) volhardender: *"That is, males have some ability to assess the probability of other males taking females into pre-copula and are prepared to guard for longer as this threat of male: male competition increases"* (Dick and Elwood 1996)(Lipkowski et al. 2019). In beide proeven wordt na terugplaatsing van F* bij M*, M* vrijwel direct geaccepteerd.

5.5 Darwin en hypothese II

Het verzet van het vrouwtje tegen koppeling met een niet-eigen mannetje is een mogelijk teken van herkenning. De herkenning van het eigen mannetje zou door een hormoon kunnen zijn dat het mannetje aanmaakt, omdat het aan het vrouwtje merkt dat de vervelling en de eileg nabij is. Het hormoon dat het mannetje heeft kunnen waarnemen aan het vrouwtje kan het ecdyson zijn, dat ook wel het vervellingshormoon genoemd wordt. Naast dit ecdyson blijken vele stofjes zowel bij M* of F* vrij te komen bij de naderende eileg en daaropvolgende bevruchting (Trapp et al. 2014).

Omdat we het gehad hebben over een lokstof en we die niet gemeten hebben kunnen we **hypothese II** zoals we deze van tevoren hebben opgeschreven niet

aannemen. Wel weten we nu dat bepaalde gedragingen van zowel het mannetje als het vrouwtje een rol spelen en ook dat het hormoon ecdyson of wellicht een ander hormoon wat vrijkomt bij de naderende eileg een rol speelt (Trapp et al. 2014).

Het kan er ook toe leiden dat dat het mannetje, door minder verzet van het vrouwtje, gemakkelijker een goed uitgevoerde greep met gnathopoden kan uitvoeren zodat er direct een langdurige pre-copula gevormd wordt. Het lijkt er op dat de dubbele greep van M* op F* en vooral m op F* op segment 1 én 5 niet in één keer uitgevoerd kan worden (Hume et al. 2005). Daardoor zijn er minder contactmomenten als een goede koppeling kan ontstaan zoals duidelijk naar voren komt bij proef 4 en vooral proef 5 (zie tabel 5).

De conclusie dat het vrouwtje het mannetje herkent is nieuw en niet bekend uit de literatuur. Wel wordt beschreven dat het mannetjes soms de weerstand van het vrouwtje moet overwinnen. Het meest waarschijnlijke is herkenning door geurstof die het mannetje vormt als het langdurig in pre-copula verkeert. Het kan zijn dat de verwachte uitstoot van eitjes in de broedbuidel van het vrouwtje het mannetje prepareert op de bevruchting door hormonen of andere stoffen aan te maken die door het vrouwtje worden herkend (Trapp 2014). Er is geen bewijs dat het er een individuele herkenning is door het vrouwtje van het mannetje en omgekeerd. Een nieuwe vinding van ons onderzoek is dus dat het vrouwtje ook een rol speelt bij het vormen van de herkoppeling. Ook dit zouden we in de toekomst verder willen onderzoeken.

Toch geeft proef 3 (een mannetje bij vijf ontkoppelde vrouwtje waaronder het 'eigen' vrouwtje) aanleiding om te vermoeden dat individuele herkenning zou kunnen voorkomen. De koppeling aan het eigen vrouwtje is in verhouding meer dan de verwachte 20% bij willekeur (tabel 5), wat individuele herkenning als oorzaak zou kunnen hebben. De verhoudingen van de waargenomen aantallen zijn verschillend van wat bij een willekeurige verdeling verwacht wordt. Uit de proeven lijkt dus wel dat de ei-ontwikkelingsfase van het vrouwtje door het mannetje herkenbaar is, maar dat was al bekend (Geffard et al. 2010b).

Dat de mannetjes unieke vrouwtjes individueel herkennen is niet zeker aangetoond, maar wel is in het kader van de huidige proefopzet aangetoond dat de onderbroken koppels naar herstel streven met als nieuwe uitkomst dat het mede door het vrouwtje aangestuurd wordt. Zoals Darwin zijn statement dus **bedoeld had** klopt het ook.

Wetenschappelijk historisch is dit interessant; deze conclusies waren gebaseerd op interpretaties die geen rekening konden houden met de uitgebreide kennis die nu bekend is over het voorkomen van specifieke hormonen of eiwitten.

Darwin schrijft: "*the males and females recognize each other and are **mutually attached***" En heeft dit geconcludeerd uit de brief aan hem van de heer C.S. Bate:

“Once I remember separating a male & female Gammarus from each other. they were in a pan with a great many others The female swam immediately towards the mass of others that were congregated together the male dashed fiercely round the pan two or three times & then in amongst the crowd of others & took the same female out from among the mass of others—but there was no fighting for possession of the female. it may have been as I think generally is the case with them that the females were the more numerous”. (Bate C. S., 1868)

In deze brief lijkt al naar voren te komen dat het aantal vrij zwemmende vrouwtjes de overhand heeft, waardoor het mannetje de status van het vervellingsstadium van het vrouwtje kan hebben onderscheiden van andere vrouwtjes. Hierdoor lijkt het dat hij haar individueel heeft herkend.

Reeds in 1903 is het onderzoek naar bovenstaande vraag gestart en pas in de 60 jaren weer opgepakt (Holmes 1903).

5.6 Uitwerking resultaten proef 6

Proef 6 waarbij in zes bakjes vijf ontkoppelde paren gelijktijdig werden geobserveerd of ze hun oorspronkelijke pre-copula zouden herstellen liet geen significante verschillen zien. Er lijkt uit de cijfers wel een lichte voorkeur te zijn dat de niet-oorspronkelijke paren langer over het herstel van de koppeling doen en er iets langer over doen om die koppeling te vormen. Als we de ethogram notities bekijken wordt bij de niet-oorspronkelijk paren ook meer vluchtgedrag van het vrouwtje waargenomen. Hierbij moet worden aangenomen dat het zou kunnen dat de mannetjes net als in proef 4 een density (stressachtige) activiteit vertonen en daardoor waarschijnlijk niet de tijd ‘nemen’ om rustig het eigen vrouwtje te zoeken.

Deze proef is daardoor wat te complex van opzet, want is eenmaal een verkeerd koppel ontstaan dan wordt daarmee de kans op een oorspronkelijk koppel verkleind. De gevormde pre-copula's worden ook vaak spontaan afgebroken, waarna het mannetje of het vrouwtje even later weer een ander koppel vormt, dit in tegenstelling tot de andere proeven waarbij de eenmaal herstelde of nieuwgevormde pre-copula stabiel blijven.

Uit proef 6 kan worden geconcludeerd dat er onder de gammarussen te veel stress gecreëerd was tijdens de proefopzet (het merken), bevestigd door de gedragsobservaties. Dit had het gevolg dat het resultaat van herkoppelingen te laag is, en is misschien een aandachtspunt voor een vervolgonderzoek.

Bij de observaties van de proeven hebben we gezien dat het mannetje actief blijft rondzwemmen en lijkt te zoeken. Komt hij een vrouwtje tegen dan probeert hij een koppeling te maken en als deze niet lukt is het doordat het vrouwtje wegvlucht of de koppeling na enkele seconden tot minuten wordt afgebroken. Mogelijk is de totstandkoming van een geschikte pre-copula geëvolueerd omdat op deze manier door evolutionaire selectie geen tijd verloren gaat aan koppelingen met vrouwtjes die

'er nog niet klaar voor zijn'(nog niet in goed vervellings- en ei-ontwikkelingsstadia zijn). Dit zou zorgen voor een garantie op goede voortplanting.

Met het doel van de pre-copula in gedachte, namelijk de paring, dan is het logisch dat als een vrouwtje al eitjes heeft gemaakt of al juvenielen heeft gebaard ze dus minder aantrekkelijk zou kunnen zijn voor de vorming van de pre-copula. In een onderzoek van Hartnoll en Smith (Hartnoll and Smith 1980) stellen zij dat een vrouwtje met onrijpe eierstokken minder aantrekkelijk is voor het mannetje. Dit komt overeen met het resultaat van onze proeven, ook al is het niet altijd even makkelijk om te bepalen wanneer een vrouwtje in die fase zit.

5.7 Onzekerheden

De populatie waarin de observaties gedaan worden is dus bepalend. De proeven die we voor ons onderzoek hebben gedaan, zijn uitgevoerd op een kleine schaal. We hebben geprobeerd de omstandigheden zo constant mogelijk te houden en hiermee ons onderzoek zo betrouwbaar mogelijk te maken. Er zijn echter wel wat factoren die moeilijk waren constant te houden of die buiten onze macht lagen. Om te beginnen hebben we niet voor elke proef gammarussen uit dezelfde 'batch' gebruikt. Gammarussen verplaatsen zich, dus om steeds dezelfde populatie te vangen is onmogelijk. Om het zo betrouwbaar mogelijk te houden, zijn we wel steeds naar de Beekloop gegaan. Het gebied en de specifieke plek waar ze vandaan komen kan een invloed hebben op het gedrag van de gammarussen, een factor waar wij geen invloed op konden hebben.

Hoewel we geprobeerd hebben alles zo zorgvuldig mogelijk te doen voor de gammarussen, is het uitvoeren van deze proeven uiteraard een vrij stressvolle situatie voor ze. Ze worden vanaf de plek waar ze gevangen zijn vervoerd in bakken met water achterin de auto terug naar huis. Hoe zacht er ook gereden wordt, het is niet te vermijden dat het water in de bakken gaat klotsen. Aangezien gammarussen normaal gesproken in water zitten waar maar een beetje stroming is, was dit hoogstwaarschijnlijk een stressvolle situatie voor hen. Eenmaal thuis aangekomen, worden ze ook nog van de bakken naar andere bakken verplaatst in een kamer waar het licht feller is dan het buitenlicht. Al deze veranderingen zouden ertoe kunnen leiden dat een gammarus zich anders gedraagt dan in zijn normale habitat. Voordat we begonnen aan de proeven hadden de gammarussen iedere keer wel ongeveer een dag kunnen acclimatiseren in een bak met een kartonnen plaat voor verduistering erop. Toch kunnen we niet uitsluiten dat stress geen invloed heeft gehad op het gedrag van de gammarussen.

Voor proef 2, 3 en 6 was het nodig om verschillende vrouwtjes, en bij 6 ook mannetjes, te kunnen onderscheiden. Hiervoor gebruikten wij nagellak. Of de nagellak schadelijk is, weten wij niet. We zagen geen verschil in gedrag met de ongelakte gammarussen, maar hierover is geen conclusie te trekken. Bij proef 6

hadden we een extra factor die meespeelde. Als één van de zes koppels verkeerd koppelt, zijn er gelijk twee koppels die niet meer hersteld kunnen worden. De kans op herstel van de juiste koppeling wordt steeds kleiner met toenemend aantal 'verkeerde' koppelingen.

Aan de grootte van de gammarussen is ongeveer te zien in welke (ei)-ontwikkelingsfase een vrouwtje of mannetje verkeert. Bij het vrouwtje is het ook te zien of ze een broedbuidel heeft of niet en of er juvenielen uit haar komen. Toch is het niet helemaal met zekerheid te zeggen in welke fase ze exact zitten. Dit is een factor die het koppelingsgedrag van de gammarussen erg kan beïnvloeden.

5.8 Vervolgonderzoek

Dit is dan ook meteen een onderzoeksvraag voor een vervolgonderzoek: welke factoren (ontwikkelingsfase) maken het vrouwtje het meest aantrekkelijk voor het mannetje? Maar vooral in verband hiermee: hoe beïnvloedt het vrouwtje de vorming van de pre-copula?

Bronvermelding

- Bate, C. 1868, letter to Charles Darwin 11 february 1868. Darwin Correspondence Project, "Letter no. 5864,"
<https://www.darwinproject.ac.uk/letter/?docId=letters/DCP-LETT-5864.xml>
- Chaumot, A., O. Geffard, J. Armengaud & L. Maltby, 2015. Gammarids as reference species for freshwater monitoring Aquatic Ecotoxicology. Elsevier, 253-280.
- Dick, J. T. & R. W. Elwood, 1996. Effects of natural variation in sex ratio and habitat structure on mate-guarding decisions in amphipods (Crustacea). Behaviour 133(13-14):985-996.
- Dunham, P., A. Hurshman & C. Gavin, 1989. Precopulatory mate guarding in an amphipod, *Gammarus lawrencianus*: Effects of the male post-copulation interval. Marine & Freshwater Behaviour & Phy 14(3):181-187.
- Geffard, O., B. Xuereb, A. Chaumot, A. Geffard, S. Biagianti, C. Noël, K. Abbaci, J. Garric, G. Charmantier & M. Charmantier-Daures, 2010a. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: application for reproductive toxicity assessment. Environ Toxicol Chem 29(10):2249-59
doi:10.1002/etc.268.
- Geffard, O., B. Xuereb, A. Chaumot, A. Geffard, S. Biagianti, C. Noël, K. Abbaci, J. Garric, G. Charmantier & M. Charmantier-Daures, 2010b. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: application for reproductive toxicity assessment. Environmental Toxicology and Chemistry 29(10):2249-2259.
- Goethe University Frankfurt, Choosy amphipods: males are extremely faithful to their mates. Sciencedaily
<https://www.sciencedaily.com/releases/2019/02/190207111306.htm>
- Hartnoll, R. & S. Smith, 1980. An experimental study of sex discrimination and pair formation in *Gammarus duebenii* (Amphipoda). Crustaceana:253-264.
- Holmes, S.J. Sex recognition among amphipods, journals.uchicago.edu,
<https://www.journals.uchicago.edu/doi/pdf/10.2307/1535786>
- Hume, K. D., R. W. Elwood, J. T. Dick & J. Morrison, 2005. Sexual dimorphism in amphipods: the role of male posterior gnathopods revealed in *Gammarus pulex*. Behavioral Ecology and Sociobiology 58(3):264-269.
- Ittis, C., F.-X. Dechaume-Moncharmont, M. Galipaud, J. Moreau, L. Bollache & P. Louâpre, 2017. The curse of being single: both male and female *Gammarus pulex* benefit energetically from precopulatory mate guarding. Animal Behaviour 130:67-72.
- Iribarne, O., M. Fernandez & D. Armstrong, 1995. Precopulatory guarding-time of the male amphipod *Eogammarus oclairi*: effect of population structure. Marine Biology 124(2):219-223.
- Lipkowski, K., M. Plath, S. Klaus & C. Sommer-Trembo, 2019. Population density affects male mate choosiness and morphology in the mate-guarding amphipod

- Gammarus roeselii* (Crustacea: Amphipoda). Biological Journal of the Linnean Society 126(4):899-911.
- Mudde, K. De habitat van *Gammarus pulex*, edepot.nl, <https://edepot.wur.nl/394739>
- Pascoe, D., T. Kidwards, S. Maund, E. Muthi & E. Taylor, 1994. Laboratory and field evaluation of a behavioural bioassay—The *Gammarus pulex* (L.) precopula separation (GaPPS) test. Water research 28(2):369-372.
- Plaistow, S. J., L. Bollache & F. Cézilly, 2003. Energetically costly precopulatory mate guarding in the amphipod *Gammarus pulex*: causes and consequences. Animal behaviour 65(4):683-691.
- Ribot, F. De vlokreeft of *Gammarus pulex*. Waterwereld, <https://www.waterwereld.nu/vlokreeft.php>
- Shadrin, N., V. Yakovenko & E. Anufriieva, 2021. The behavior of *Gammarus aequicauda* (crustacea, amphipoda) during predation on chironomid larvae: Sex differences and changes in precopulatory mate-guarding state. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology 335(6):572-582.
- Tempelman, D. *Echinogammarus berriloni*. waarneming.nl, <https://waarneming.nl/species/27099/>
- Tempelman, D. Stekelrugvlokreeft. waarneming.nl <https://waarneming.nl/species/27098/>
- Trapp, J., 2014. Approches protéomiques pour le développement de biomarqueurs chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*: découverte et caractérisation de protéines impliquées dans la fonction reproductrice. Doctorat, Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation, Lyon I.
- Trapp, J., O. Geffard, G. Imbert, J. C. Gaillard, A. H. Davin, A. Chaumot & J. Armengaud, 2014. Proteogenomics of *Gammarus fossarum* to document the reproductive system of amphipods. Molecular & cellular proteomics : MCP 13(12):3612-25 doi:10.1074/mcp.M114.038851.