

**HET PROEFSCHRIFT:
BEHAVIOURAL AND NEUROBIOLOGICAL ASPECTS OF DART SHOOTING
IN THE GARDEN SNAIL *HELIX ASPERSA***

Dr. Joris M. Koene
Department of Biology, McGill
University, 1205 Dr. Penfield Ave.,
Montréal (Québec), H3A 1B1 Canada

Sinds de tijd van Swammerdam heeft de wonderlijke liefdespijl, die door sommige soorten slakken tijdens de paring wordt geschoten, tot de verbeelding gesproken. Niet op zijn minst vanwege de overeenkomst met de pijl van Cupido, waar het zijn naam aan dankt. In mijn proefschrift staan twee vragen centraal: Ten eerste, waarom perforereert de tuinslak *Helix aspersa* de huid van de partner met een liefdespijl? Ten tweede, hoe reguleert het centraal zenuwstelsel dit gedrag?

Wat is de functie van de liefdespijl?

Nadat twee sexueel actieve slakken elkaar hebben ontmoet, begint een uitgebreid voorspel waarbij ze elkaar veelvuldig met de voelspriet en lippen beroeren. Tijdens deze introductie wordt langzaam een deel van de genitaliën zichtbaar als een witte uitstulping aan de rechter zijde van beide slakken (genitale eversie). De slakken zijn simultaan hermaphrodiët en vervullen in één paring tegelijkertijd de mannelijke en vrouwelijke rol. Wanneer een maximale genitale eversie is bereikt wordt de liefdespijl geschoten. De pijl vliegt echter niet door de lucht maar wordt krachtig door de huid van de partner heen geduwd, en blijft daar meestal achter (Figuur 1). Nadat beide slakken hun pijl hebben geschoten, gaan ze over tot de copulatie waarbij elk een spermatofoor aan de partner doneert. Slakken paren meestal met meerdere partners voordat ze eieren leggen, paring is dus niet direct

gekoppeld aan eileg. Ontvangen sperma kan dan ook meer dan een jaar worden opgeslagen in de spermatheca.



Figuur 1: Twee tuinslakken in de copulatiefase. Een witte liefdespijl steekt uit de linkerzijde van één van de slakken. Deze pijl is afkomstig van de partner en was zo krachtig in de rechterzijde geschoten, dat hij de ontvanger doorboorde.

De negen millimeter lange liefdespijl wordt in de pijlzak geproduceerd van een kristalvorm van calciumcarbonaat (Figuur 2). Het uitdrijven van de pijl geschiedt door de eversie van de gespierde pijlzak, via de genitale opening, waarbij de pijl loslaat en in het doelwit blijft steken. Een nieuwe pijl wordt in 6 dagen geregenereerd. De pijlzak is geassocieerd met een paar vingervormige klieren die de pijl op het moment van schieten van een laag slijm voorziet.

Een van de hypothesen die voorgesteld is om het fenomeen van de liefdespijl te verklaren, is gebaseerd op het calcium waar de pijl van gemaakt is. Calcium is cruciaal voor zowel de groei als de voortplanting van huisjesslakken. Het slakkenhuis wordt

van dit element gemaakt en de eierschaal wordt van calciumkristallen voorzien. De zich ontwikkelende embryo's zijn afhankelijk van het calcium in de eierschaal voor het vormen van hun embryonale slakkenhuis. Door calcium te doneren zou een slak dus kunnen bijdragen aan de productie van eieren van de partner. Het geven van soortgelijke giften (nuptial gift) komt veel voor bij insecten.



Figuur 2: Een zij-aanzicht en een dwarsdoorsnede van de liefdespijl van de tuinslak *Helix aspersa*. De stippellijn geeft de plaats aan waar de dwarsdoorsnede is gemaakt. De negen millimeter lange pijl is gemaakt van calciumcarbonaat en wordt voor het schieten van een laag slijm voorzien.

Voor deze hypothese wordt aangenomen dat de pijl door de ontvanger wordt opgenomen in de lichaamsholte. Het blijkt echter dat dit vrij weinig voorkomt. Slechts 6.3% van de geschoten pijlen komt permanent in de ontvanger terecht. In de meeste gevallen perforereert de pijl de huid van de ontvanger en blijft er tijdelijk in steken, maar valt uiteindelijk op de grond. Calciummetingen tonen aan dat de hoeveelheid calcium in één pijl ongeveer overeenkomt met de hoeveelheid die benodigd is voor de productie van één ei. Aangezien slakken gemiddeld 59 eieren per broedsel leggen kan de hoeveelheid calcium in de pijl geen significante bijdrage leveren aan de productie van een broedsel. Bovendien zijn de slakken hermaphrodit en schieten beiden een pijl, derhalve kan geen van beide partners profiteren van de uitwisseling van een gelijke hoeveelheid calcium.

Een tweede verklaring voor het schieten van de liefdespijl is dat een bio-actieve stof in de partner wordt geïntroduceerd. Deze hypothese gaat samen met de bevinding dat de meeste pijlen de huid perforeren. De bio-actieve stof wordt verondersteld zich in het secreet van de vingervormige klieren te bevinden. Voorgaand onderzoek van Adamo & Chase heeft aangetoond dat het slijm van deze klieren zich op de pijl bevindt en ook inderdaad in het bloed van de ontvanger belandt. Experimenten waarbij het slijm kunstmatig werd geïntroduceerd, konden echter slechts een marginaal effect op het gedrag van het dier aantonen. Een effect is echter niet noodzakelijk zichtbaar in het gedrag, de bio-actieve stof kan bijvoorbeeld direct de interne organen beïnvloeden. Om dit te testen heb ik gebruik gemaakt van een *in vitro* preparaat van de geïsoleerde voortplantingsorganen. Door extracten van de vingervormige klieren toe te voegen, kon zo het effect van de bio-actieve stof in het kliersecreet direct worden gemeten.

Het toedienen van het slijm brengt twee effecten teweeg. Ten eerste veroorzaakt het een contractie van het copulatiekanaal. Dit is het kanaal waar de penis van de partner wordt ingebracht en dat naar de bursa copulatrix en het bursa tract diverticulum leidt. De spermatofoor wordt in het diverticulum ontvangen. In de bursa copulatrix worden overtollige spermatozoa en de spermatofoor afgebroken. De contractie van het copulatiekanaal zorgt ervoor dat de toegang tot de bursa copulatrix wordt afgesloten en dat het diverticulum toegankelijker wordt. Ten tweede veroorzaakt het slijm peristaltiek in het diverticulum, wat hoogstwaarschijnlijk voor een snellere opname van de spermatofoor zorgt. Deze bevindingen suggereren

dat de afbraak van spermatozoa wordt afgeremd. Om de spermatheca te bereiken, moeten de spermatozoa (langs de ingang van de bursa copulatrix) een heel eind door de vrouwelijke organen afleggen. Derhalve bereikt gemiddeld slechts 0.05% van de spermatozoa uit de spermatofoor het opslagorgaan.

Het slijm van de liefdespijl lijkt dus de kans op bevruchting van de partner te vergroten. Recentelijk onderzoek toont aan dat dit ook inderdaad het geval is. Meer spermatozoa bereiken de spermatheca (Rogers & Chase) en dit resulteert in de bevruchting van meer nakomelingen (Landolf, Green & Chase). Het effect van de pijl speelt dus een belangrijke rol in seksuele selectie en is voor twee interpretaties vatbaar. Het kan hier om een manipulatie van de partner gaan (intra-seksuele selectie) of om een partnerkeuze van de ontvanger (inter-seksuele selectie). Om een onderscheid te maken tussen deze twee hypothesen heb ik de evolutionaire speltheorie toegepast. Deze theorie voorspelt verschillende uitkomsten voor de manipulatie- en partnerkeuze-hypothesen. In het geval van partnerkeuze is het altijd voordeliger om de pijl te schieten (d.w.z. altijd schieten is de evolutionair stabiele strategie of ESS). Voor manipulatie van de partner, waar de partner kosten ondervindt van de manipulatie, kan de voorspelde ESS een mix van wel en niet schieten zijn. In dit geval is het afhankelijk van de omstandigheden of de pijl geschoten wordt. De slak schiet een pijl bij een overheersende interesse in het bevruchten van de partner (mannelijk reproductief succes); niet schieten gaat gepaard met een voorkeur voor het bevrucht worden (vrouwelijk reproductief succes). Experimenten tonen aan dat slakken niet tijdens elke paring hun pijl

gebruiken. De manipulatiehypothese lijkt dus de juiste uitleg te geven voor het schieten van de liefdespijl.

In het dierenrijk zijn meerdere voorbeelden te vinden van bio-actieve stoffen die direct in een soortgenoot worden geïntroduceerd om het gedrag of de fysiologie te manipuleren. Vaak worden zulke stoffen via de seminale vloeistof overgebracht, zoals bijvoorbeeld in de fruitvlieg. Onderhuidse injectie van een substantie, met behulp van gespecialiseerde mannelijke tanden, treedt op bij sommige soorten salamanders. Net als de bio-actieve stof die door de liefdespijl wordt geïntroduceerd, worden deze substanties niet zintuiglijk waargenomen maar hebben een direct effect op de doelwitorganen. Om zulke stoffen te onderscheiden van hormonen en feromonen, stel ik voor om de nieuwe term allohormonen te gebruiken.

Hoe controleren de hersenen het paringsgedrag?

Het vrij simpele centrale zenuwstelsel van de slak bestaat uit meerdere ganglia die door connectieven met elkaar in verbinding staan. Elk ganglion bestaat uit een beperkt aantal neuronen. De cerebrale ganglia vertonen een links-rechts asymmetrie omdat het rechter anteromediale deel (mesocerebrum) groter is. De neuronen van het rechter mesocerebrum innervieren de voortplantingsorganen, die zich tevens in het rechter deel van het dier bevinden. Chase & Li hebben aangetoond dat het rechter mesocerebrum waarschijnlijk een belangrijke rol speelt in het paringsgedrag, vooral bij de controle van het naar buiten brengen van de penis en de pijlzak. Gebaseerd op immuno-cytochemische resultaten stelden zij voor dat deze twee

componenten van het paringsgedrag worden gemedieerd door, respectievelijk, de neuropeptiden APGWamide en FMRFamide.

Om de rol van het mesocerebrum in het paringsgedrag direct te testen heb ik gebruik gemaakt van een electrofysiologische techniek waarbij de activiteit van meerdere neuronen kan worden afgeleid en gemanipuleerd in het intacte dier. Voor deze *in vivo* techniek werd een electrode op het rechter mesocerebrum geïmplanteerd. Elektrische stimulatie van de mesocerebrale neuronen, via de geïmplanteerde electrode, veroorzaakt een gedeeltelijke eversie van de genitalia. Voor de eversie van de penis en de pijlzak is, in combinatie met de elektrische stimulatie, tactiele stimulatie van de huid door de partner noodzakelijk. Tijdens natuurlijk optredend paringsgedrag vertoont het rechter mesocerebrum een verhoogde activiteit. Met behulp van een computerprogramma (ontwikkeld door Jansen & Ter Maat) zijn de individuele neuronale signalen uit de opname geselecteerd. De individuele neuronen zijn actief tijdens eversie van de penis en/of tijdens het schieten van de liefdespijl. Tevens ontvangen de meeste neuronen sensorische input van de huid.

Injecties met neuropeptiden tonen aan dat de genitale eversie wordt gemedieerd door APGWamide. FMRFamide blijkt echter niet het schieten van de liefdespijl te mediëren maar lijkt de genitale eversie (veroorzaakt door APGWamide) juist af te remmen. Niet alleen bij landslakken, maar ook in de verwante zeeslak *Aplysia californica* en de poelslak *Lymnaea stagnalis* is hetzelfde hersengebied verantwoordelijk voor genitale eversie. Ook bij deze soorten wordt APGWamide als mediërend neuropeptide gebruikt, ondanks dat

deze slakken zeer verschillende paringsgedragingen hebben ontwikkeld. Het anteromediale deel van het rechter cerebrale ganglion blijkt dus een evolutionair sterk geconserveerd deel van de hersenen voor de controle van het paringsgedrag in slakken.

Met dank aan R. Chase, R.F. Jansen en A. ter Maat voor hun bijdragen als co-auteurs van de verschillende hoofdstukken. De tekst van mijn proefschrift is te vinden via mijn website (<http://huizen.dds.nl/~jkoene/index.htm>).

Referenties

- Koene, J.M. & Chase, R. 1998. The love dart of *Helix aspersa* Müller is not a gift of calcium. *J. Moll. Stud.* **64**: 75-80
- Koene, J.M. & Chase, R. 1998. Changes in the reproductive system of the snail *Helix aspersa* caused by the mucus covering the love dart. *J. Exp. Biol.* **201**: 2313-2319
- Koene, J.M., Jansen, R.F., Ter Maat, A. & Chase, R. 1999. An *in vivo* electrophysiological study of mating behaviour in the snail *Helix aspersa*. *Invert. Reprod. Dev.* **36**: 123-127
- Koene, J.M., Jansen, R.F., Ter Maat, A. & Chase, R. 2000. A conserved location for the central nervous system control of mating behaviour in gastropod molluscs: Evidence from a terrestrial snail, *J. Exp Biol.* **203**: 1071-1080