

## **Metody specjalne w preparatyce owadów**

### **Preparowanie małych okazów o miękkim ciele**

Preparowanie na sucho polega na naszpileniu bądź przyklejeniu okazu. W przypadku wielu owadów wysuszenie nie powoduje widocznych deformacji ciała, stąd też ta metoda jest tak powszechna. Co jednak robić, kiedy mamy do czynienia z owadem o miękkim ciele, które podczas wysychania kurczy się, zapada, by ostatecznie zmienić się w nieidentyfikowalną skwarę? Nie zawsze odpowiedzią jest przechowywanie zbioru w alkoholu. Są takie grupy owadów, w których pewne cechy można łatwo ocenić na okazie suchym, a trudniej na mokro. Nie wnikając w szczegóły (których byłoby zbyt dużo), podam dwa przykłady. Obydwa dotyczą małych błonkówek, kłopotliwych w preparowaniu i na dodatek sprawiających duże problemy w oznaczaniu.

W olbrzymiej nadrodzinie bleskotek (Chalcidoidea) rekordzistami w miniaturyzacji są Mymaridae. Są to błonkówki bardzo liczne i pospolite, jednak większość entomologów, nawet zawodowców, może ich nigdy w życiu nie zobaczyć w swoich czerpakach. Owady te mają przeważnie 0,5-1 mm długości, smukłe i delikatne ciało, w wielu przypadkach o jasnej barwie. Nawet skupiając się na wyławianiu ich z siatki mamy szansę przeoczyć większość osobników, o ile nie wsypujemy całej zawartości worka do słoja z alkoholem. Te zwiewne i pełne gracji owady oznacza się m.in. na podstawie liczby członów stóp i czułków, i to są cechy najlepiej widoczne w alkoholu, jednak ważne bywają też struktury na powierzchni głowy i tułowia, a te czasami łatwiej ocenić na suchych preparatach. Co więcej, do dokumentacji fotograficznej warto zawsze mieć kilka okazów w postaci ładnych, starannych preparatów suchych. Niestety, Mymaridae zatrute i naklejone na trójkąty w ciągu kilku minut zamieniają się w smętne, poskręcane, pozapadane trupki, na których nie sposób zobaczyć nawet cech rodzinowych...

Drugi, kto wie czy nie lepszy przykład. Eulophidae, bleskotki dominujące liczebnie, a przeważnie i bogactwem gatunków bijące na głowę inne małe parazytoidy. Jeśli oglądacie suche zbiory bleskotek, to możecie wstępnie wytypować Eulophidae bez znajomości kluczowych cech tej rodziny, po prostu na podstawie stanu zachowania - jeśli okaz jest skurczony i zapadnięty, a jego głowa zamieniła się w pogięty naleśnik, to z dużym prawdopodobieństwem będzie to przedstawiciel tej rodziny (choć zapadają się też Trichogrammatidae, małe Encyrtidae, Aphelinidae itp.). Dotyczy to szczególnie bardzo

małych i delikatnych Tetrastichinae, ale i wśród innych podrodzin Eulophidae są fenomenalnie ubarwione, tęczo metaliczne gatunki, których okazy po wyschnięciu stają się obrazem rozpacz. Poza oczywistymi problemami z identyfikacją takiego materiału, można zapomnieć o pięknych zdjęciach wzbogacających publikacje. Tutaj problem jest zresztą dużo głębszy - dawni autorzy, którzy kiepsko preparowali okazy, potrafili w kluczach i diagnozach uwzględniać zachowanie okazu podczas wysychania. Tacy wybitni specjaliści jak Graham czy Bouček w diagnozach nowych gatunków Eulophidae pisali czasem "head collapsed", a w kluczach tezie "ciało bez deformacji" przeciwstawiana była antyteza "ciało zapadnięte"...

Znane są metody pozwalające uzyskać piękne, niezdeformowane preparaty drobnych błonkówek, muchówek i innych delikatnych owadów, nadające się do fotografowania, oznaczania i opisywania. Część z tych metod wymaga drogiego sprzętu, inne ciężkiej chemii. Poniżej wymienione są te, z którymi miałem/mam do czynienia, które sprawdzają się na tyle dobrze, że warte są opisanie. Metody uszeregowano od "profi" po najbardziej amatorskie, tzn. od wymagających akademickiego warsztatu i budżetu, po takie, których można spróbować z powodzeniem w domu. Oczywiście mowa jest o okazach trudnych, małych; o metodach wymagających określonego poziomu staranności, dyscypliny, zdolności manualnych, praktyki.

**1. Suszenie w punkcie krytycznym.** Ten sposób pomijam z prostego powodu - jeśli ktoś ma sprzęt, to wie, jak z niego korzystać; a jeśli ktoś nie dysponuje suszarką w punkcie krytycznym, to opis metody na niewiele mu się zda. Metoda rutynowa w labach nastawionych na mikroblonkówki, ale też bardzo użyteczna dla przygotowania materiału do mikroskopii skaningowej.

**2. Suszenie chemiczne, wariant trudniejszy i lepszy (z użyciem heksametylodisilazanu, w skrócie HEX).**

HEX jest powszechnie używany do suszenia preparatów do SEMa, głównie drobnych larw, przeważnie przez ludzi, którzy nie mają dostępu do suszenia w punkcie krytycznym. Jest to paskudna trucizna i należy unikać wdychania, kontaktu ze skórą oraz spożywania; przy zachowaniu odpowiednich środków ostrożności nie stanowi jednak zagrożenia. **Wszystkie czynności powinno się wykonywać pod wyciągiem; nie próbować w warunkach domowych!** Punktem wyjścia jest materiał przechowywany dowolnie długo w 75% etanolu (okazy świeże wrzucamy do 75% etanolu i startujemy z procedurą najwcześniej na drugi

dzień). Wszystkie operacje wykonujemy na szklanej szalce Petriego, liczba okazów musi być rozsądna, tzn. nie mogą one tworzyć gęstej zupy i po wyschnięciu na dnie szalki powinna leżeć jedna warstwa owadów.

Procedura:

- 2.1.** Alkohol zmieniamy na nową porcję 75% etanolu w celu odpłukania resztek po starym lub rozcieńczonym konserwancie.
- 2.2.** Natychmiast pipetką usuwamy większość etanolu i zalewamy okazy etanolem 85%. Szalkę przykrywamy i zostawiamy w temp. pokojowej na 10-20 min.
- 2.3.** Po tym czasie zbieramy pipetką większość etanolu i zalewamy materiał etanolem 96%. Znowu czekamy 10-20 min.
- 2.4.** Zbieramy ile się da etanolu i zalewamy okazy acetonem (może być techniczny). Aceton szybko paruje, nie można więc zapomnieć o przykryciu szalki. Zostawiamy na 1 h.
- 2.5.** Zbieramy ile się da płynu i zalewamy materiał nową porcją acetonu. Zostawiamy na 1 h.
- 2.6.** Zbieramy płyn i zalewamy okazy HEXem. Przykrywamy, zostawiamy na minimum godzinę (można to robić wieczorem i zostawić okazy na noc, jednak wtedy trzeba wlać tyle HEXa, żeby cały nie wyparował do rana).
- 2.7.** Zbieramy pipetką HEX; zalewamy materiał nową porcją tej samej substancji, zostawiamy w przykrytej szalce 20-60 min. Do tego etapu okazy mogły sobie swobodnie pływać i przemieszczać się w szalce.
- 2.8.** Zbieramy pipetką większość płynu. Na dnie leżą owady w cienkiej warstwie HEXa, już nie mają w czym pływać. Tutaj następuje czynność, którą niestety trudno wykonać pod wyciągiem. Szybko, pod binokulem, za pomocą szpilki, rozkładamy okazy na dnie szalki w taki sposób, żeby po wyschnięciu nie były ze sobą poplątane. Jeśli są to owady ze skrzydłami, trzeba zadbać o to, żeby skrzydła nie były pozaginane. Nie powinno to trwać dłużej niż minutę-dwie, inaczej resztki HEXa nam całkiem odparuje. Odkrytą szalkę zostawiamy do odparowania pod wyciągiem (zwykle kilkanaście minut, można zostawić na noc). O ile szalka była czysta, w stosowanych płynach i w próbce owadów nie było żadnych śmieci, włókien z bibuły itp., to okazy są ładne i czyste. Naklejamy je od razu lub przykrywamy szalkę, opisujemy i odstawiamy na później.

Naklejanie wygląda następująco (wersja dla praworęcznych). Okaz leży na szalce na boku, skrzydełka powinien mieć ustawione poziomo (jak na fotografii poniżej). Do prawej ręki bierzemy szpilkę nr 3, zanurzamy jej czubek w kleju (najlepiej alkohol poliwinylowy). Szpilkę z klejem przekładamy do ręki lewej. Prawą ręką bierzemy pęsetę, pęsetą chwytamy trójkąt za jego podstawę. Czubkiem trójkąta dotykamy kropli kleju na szpilce, po czym natychmiast dotykamy tymże czubkiem odpowiedniego rejonu ciała leżącego na szalce okazu (np. bocznej powierzchni śródtułowia, odwłoka lub samych nóg). Podnosimy trójkąt razem z okazem, odwracamy i kładziemy na płaskiej powierzchni, na której będziemy mogli wbić w kartonik szpilkę (polecam twarde, korkowe podstawki pod czajnik).

W ten sposób można spreparować do fotografii lub SEMa nawet mszyce bez ryzyka zapadnięcia się i skurczenia okazu. Metoda jest o wiele łatwiejsza niż mogłoby się wydawać po przeczytaniu, jednak wymaga wypraktykowania i dobrania doświadczalnie rozmiarów szalek, objętości płynów, liczby obrabianych jednocześnie okazów, narzędzi itp.

**3. Suszenie chemiczne, wariant łatwiejszy, ale mniej przewidywalny (z użyciem samego acetonu).**

Wiele delikatnych okazów można wysuszyć pomijając końcowe etapy wariantu wcześniejszego, tzn. zupełnie rezygnując z HEXa. Całość procedury przeprowadzamy identycznie, jak w metodzie poprzedniej, tylko zamiast HEXem okazy jeszcze raz zalewamy acetonem, dajemy im 20-60 minut popływać pod przykryciem, odciągamy aceton, rozkładamy okazy szpilką i przenosimy otwartą szalkę na kaloryfer. W tym wariantcie okazy muszą schnąć szybko! Po 10-20 minutach można materiał naklejać. Nie zawsze okazy będą tak ładne, jak po HEXie, ale stosowałem ten wariant z powodzeniem do bardzo delikatnych Eulophidae i większość okazów nadawała się do fotografowania i oznaczania, jedynie u niektórych zapadał się nieco odwłok, a czasami niestety również głowa. Jest to jakaś alternatywa dla trującego HEXa, ale trzeba się liczyć z nieprzewidywalnością.

**4. Domowa liofilizacja.**

Metoda z powodzeniem stosowana od lat przez biedniejsze pracownice i amatorów, wymagająca tylko miejsca w zamrażalniku (wystarczy zupełnie zwyczajna zamrażarka w kuchennej lodówce, aczkolwiek im niższa temperatura, tym lepiej). Świeżo uśpione okazy wysypujemy na czystą szalkę Petriego. Okazy z alkoholu przepłukujemy wodą destylowaną

(najlepiej kilka razy) i wylewamy z małą objętością wody na szalkę Petriego. Możliwie jak najwięcej wody odsysamy pipetką, ale okazy mają być ciągle mokre. Przykrywamy szalkę (nie może być szczelnie zamknięta, tylko przykryta!) do zamrażarki i zapominamy o niej na miesiąc lub dwa. Po tym czasie z zamrożonych okazów odparuje woda i pozostaną wysuszone, niezniekształcone owady. Szalkę z lodówki wyjmujemy bez podnoszenia przykrycia i otwieramy dopiero jak jej temperatura wyrówna się z pokojową.

**Uwaga:** nie używać szalek czy innych naczyń plastikowych w żadnej z powyższych metod. Chodzi nie tyle o ryzyko rozpuszczenia plastiku któryś z płynów, a o gromadzenie się ładunków elektrycznych. Martwy okaz wyfruwający nagle z plastikowej szalki może niemiło zaskoczyć; użycie szkła minimalizuje ten problem.

Metodę z acetonem i HEXem lub tylko z acetonem stosuję dość często, z bardzo dobrymi lub dobrymi wynikami. Kiedyś używałem lodówki, ale nie mam dzisiaj takiej potrzeby. Okazy przyklejone nie łąpią wilgoci z powietrza (o ile nie trzymamy gablot w łazience). Mikroskopijne Mymaridae po wysuszeniu HEXem i naklejeniu na trójkąty wyglądają jak na poniższym zdjęciu (okaz ma mniej niż 1 mm długości). Już zniekształcone okazy można rozwinąć w ciepłej wodzie, a po odzyskaniu naturalnych kształtów wysuszyć HEXem i nakleić ponownie; działa to dość dobrze z delikatnymi bleskotkami, aczkolwiek wyniki nigdy nie są takie jak z okazami, które wcześniej nie zostały źle spreparowane na sucho. Gorzej np. z mrówkami, które zostały wysuszone i ich odwłoki się zapadły, w tym przypadku trudniej jest po rozwilżeniu odzyskać naturalne kształty.

