

RYSZARD SZADZIEWSKI

**Szybka metoda sporządzania totalnych preparatów
mikroskopowych z drobnych muchówek ***

Tradycyjne metody sporządzania preparatów totalnych z drobnych muchówek długoczułkich (*Diptera*, *Nematocera*) w balsamie kanadyjskim często prowadzą do uszkodzenia delikatnych części ciała. Macerowanie w zasadzie potasowej czy sodowej, a następnie stopniowe odwadnianie w alkoholu i ksylenie jest czasochłonne i wymaga oddzielenia skrzydeł, a tym samym preparowania każdego okazu osobno.

Obecnie omawiana metoda oparta na fenolu i balsamie kanadyjskim została opracowana i spopularyzowana przez Wirtha i Marstona (1968). Polega ona na zamknięciu w mieszaninie balsamu i fenolu muchówek uprzednio odwodnionych i prześwietlonych w alkoholowym roztworze fenolu. Zalet tej metody, oprócz tych wynikających ze stosowania balsamu kanadyjskiego (Warchałowski 1977), jest wiele: chityna jest elastyczna i łatwa do preparowania, szczecinki i łuski nie ulegają uszkodzeniom, skrzydła nie muszą być oddzielane od reszty owada, duża liczba okazów może być trzymana w tym samym naczyniu, a w roztworze fenolu można je trzymać nieograniczenie długo. Przy pewnej wprawie metodą tą można wykonać 60-100 preparatów totalnych w ciągu jednego dnia.

Stale preparaty mikroskopowe dla celów taksonomicznych oparte o fenol i balsam kanadyjski stosuje się zwykle przy preparowaniu *Ceratopogonidae*, *Chironomidae* i *Cecidomyiidae*. Autor niniejszego artykułu stosuje z powodzeniem tę metodę do wszystkich imagines *Diptera Nematocera* oraz do larw.

* Referat wygłoszony na III Sympozjum Sekcji Dipterologicznej PTE, Łódź, 15-16 III 1984 r.

Przygotowanie sprzętu i odczynników

Do preparowania potrzebna jest zagięta i nieco sklepana igła preparacyjna, którą można wykonać ze szpilki entomologicznej nr 2. Osadzamy ją w oprawce do igieł preparacyjnych lub zatapiamy na gorąco w plastikowej obsadce do zwykłych piór. Oprócz tego potrzebne są dwie krótko ucięte i osadzone szpilki entomologiczne nr 1 lub 2, a także łopatką wykonaną ze sklepanej i wyostrzonej szpilki entomologicznej oraz dwie bagietki.

Etykietowane szkiełka przedmiotowe przygotowujemy wcześniej. Zaleca się stosowanie dwóch jak największych etykietek kwadratowych lub prostokątnych naklejanych przy obu końcach szkiełka. Na etykietce znajdującej się po lewej stronie umieszczamy informacje standardowe dotyczące miejsca zebrania itd., na prawej zaś dotyczące oznaczenia, pomiarów itp. Sporo kłopotów dostarcza dobranie odpowiedniego kleju, który na trwale przyklei karton czy zwykły papier etykietkowy do szkła. Dobrym klejem do tego celu jest Hermol oraz kleje białkowe. Etykietki w większej liczbie można wykonać kserograficznie lub wydrukować. Gorszym wyjściem jest pieczętka z zaznaczonymi ramkami i powtarzającym się tekstem, ponieważ tusz stemplarski po kilku latach blaknie.

Bardzo rzadko do preparatów entomologicznych potrzebne są duże szkiełka nakrywkowe w wymiarach oferowanych przez nasz handel. W związku z tym najlepiej jest pociąć je na mniejsze kwadraty czy prostokąty korundem umocowanym w oprawce do igieł preparacyjnych. Kamyczki korundowe można oderwać lub odkleić z gruboziarnistego papieru ściernego.

Jeżeli preparowane są muchówki ze zbioru suchego na szpilkach entomologicznych, to należy przygotować prostokąty z przezroczystego plastyku używanego do usztywniania koszul (Borowiec 1982), które jako „szkiełka przedmiotowe” nakłuwają się na szpilki. Można również do tego celu wykorzystać prostokąty wycięte ze szkiełek nakrywkowych naklejonych na kartoniki.

Fenol (kwas karbolowy, C_6H_5OH) jest bezbarwną, krystaliczną substancją o temperaturze topnienia $45^{\circ}C$. Zwykle w handlu pojawia się w butelkach jednolitrowych. Po podgrzaniu na łaźni wodnej płynny fenol wlewa się do kilku czy kilkunastu mniejszych naczyń (doskonale do tego celu nadają się penicylinówki), napełniając je co najwyżej do połowy. Słoik z resztą fenolu oraz na razie nie używane penicylinówki umieszczamy w lodówce, gdyż fenol wystawiony na działanie światła szybko różowieje. Do penicylinówki z krystalicznym fenolem wlewamy nieco absolutnego alkoholu etylowego, tyle, żeby po wytworzeniu roz-

tworu nasyconego połowa fenolu pozostała nie rozpuszczona. Tak przygotowany roztwór można trzymać przez wiele tygodni, aż zmieni kolor. Aby nastąpiło to jak najpóźniej, należy wstawić penicylinówkę do ciemnego cylindra z plastyku lub z tektury. Dobrze do wymiarów tego naczynia pasuje tekturowe opakowanie od żarówek mikroskopowych.

Stosunkowo rzadki balsam kanadyjski mieszamy w stosunku 1:1 z nasyconym alkoholowym roztworem fenolu. Mieszanina ta stosunkowo szybko ciemnieje, dlatego należy ją przygotowywać w dniu stosowania. Po trzech tygodniach nie nadaje się już do użycia. Mieszaninę zamykającą można przygotowywać na szkiełku przedmiotowym tuż przed zamknięciem w niej owada, przenosząc bagietką kroplę balsamu, a następnie odpowiednią ilość fenolu. Im delikatniejsze struktury chitynowe, tym większy powinien być udział fenolu.

Preparowanie okazów przechowywanych w alkoholu

Muchówki konserwowane w 70 - 75% alkoholu są umieszczane w mieszaninie zamykającej bezpośrednio po odwodnieniu i rozjaśnieniu w fenolu.

Z alkoholu przenosimy okazy do roztworu fenolu. W sumie liczba owadów nie powinna przekraczać 1/4 objętości roztworu. Pozostawiamy je tutaj 1 - 24 godz. w zależności od tego, jaki czas jest potrzebny do ich prześwietlenia. Niezwykle delikatne okazy można umieścić w mieszaninie fenolu i 70% alkoholu na około 5 min przed przeniesieniem ich do roztworu standardowego, co zabezpiecza je przed zniekształceniami. Owady mogą pozostawać w fenolu przez czas nieograniczony; jeżeli fenol skryształizuje, to należy dodać 100% alkoholu.

Nanosimy kroplę balsamu i fenolu na szkiełko przedmiotowe i umieszczamy w niej okaz z roztworu fenolu, a następnie preparujemy w zależności od grupy i potrzeb.

Samicom *Ceratopogonidae* czy *Chironomidae* odcinamy szpilkami preparacyjnymi głowę i odwracamy twarzą do góry. Następnie odcinamy u nasady skrzydło i odwłok, który odwracamy stroną brzuszną do góry. Samcom odcinamy skrzydło, głowę oraz aparat kopolacyjny, który układamy stroną wentralną ku górze.

W przypadku *Cecidomyiidae* oddzielamy oba skrzydła, głowę i aparat kopolacyjny samca. Skrzydła umieszczamy u góry z prawej strony, głowę u góry z lewej strony, a reszta ciała u dołu z nogami skierowanymi do środka. Aparat kopolacyjny samca umieszczamy w górnej części preparatu.

Aby uniknąć przesunięć odpowiednio ułożonych części owada przy zamykaniu preparatu szkiełkiem nakrywkowym, należy kłaść je ukośnie z tej strony, gdzie znajdują się bardziej płaskie elementy. Można stosować podkłádki dystansujące z drobnych fragmentów szkiełka nakrywkowego, które umieszczamy zwykle obok tułowia, co zabezpiecza preparat przed nadmiernym spłaszczeniem i zniekształceniem w czasie wysychania. Skrzydła, wici czułek, nogi czy głaszczki szczękowe mogą być umieszczone, jeżeli zachodzi taka potrzeba, pod osobnym szkiełkiem nakrywkowym. Na jednym szkiełku przedmiotowym umieszczamy zawsze po jednym okazie. Przy niezwykle delikatnych gatunkach zachodzi konieczność rozcieńczania mieszaniny zamykającej dodatkowym fenolem. W skrajnych przypadkach owad może być zamknięty w czystym fenolu, bez balsamu, żeby uniknąć kureczenia delikatnych części. Mieszaninę balsamu i fenolu wprowadzamy wtedy wzdłuż szkiełka nakrywkowego w miarę jak wysycha fenol.

Po zaetykietowaniu preparat suszy się w temperaturze pokojowej lub w cieplarni przy 45 - 55°C, uzupełniając przez kilka pierwszych dni odparowany fenol balsamem kanadyjskim czystym lub z dodatkiem fenolu. Omawiana mieszanina zamykająca polimeryzuje znacznie wolniej niż czysty balsam. Susząc preparaty w temperaturze pokojowej jeszcze po kilku miesiącach należy uważać, żeby nie układać szkiełek w stosy.

W razie potrzeby można rozmontować preparat, umieszczając go w ksylenie (benzenie lub toluenie). Balsam z fenolem rozpuszcza się w tych odczynnikach stosunkowo szybko, szybciej niż czysty balsam. Bezpośrednio z ksylenu zamykamy preparat w czystym balsamie kanadyjskim, a jeżeli umieścimy obiekt w fenolu, to chityna na powrót staje się elastyczna i nadaje się do dalszego preparowania.

Preparowanie okazów suchych lub silnie zeszkleryzowanych

Czasami zachodzi konieczność preparowania muchówek przechowywanych na sucho lub takich, które podeschły, zanim zostały umieszczone w alkoholu. O ile okazy z silnie zeszkleryzowanym szkieletem zewnętrznym, konserwowane w alkoholu, mogą być preparowane według sposobu już opisanego, to okazy suche, zwykle zniekształcone w czasie wysychania, należy koniecznie wyługować, aby odzyskały odpowiednie kształty.

Okazy przeznaczone do ługowania umieszczamy na 5 - 10 min w 10-procentowej zasadzie potasowej podgrzanej do 90 - 95°C. Należy uważać, żeby okazy uskrzydłone nie przetrzymywać za długo w KOH, gdyż

skrzydła utracą swą sztywność i będą sprawiały duże trudności przy dalszym preparowaniu. Niekiedy, zwłaszcza przy okazach szczególnie cennych, zachodzi konieczność oddzielenia skrzydeł przed umieszczeniem ich w roztworze macerującym. Po ługowaniu przenosimy owady na krótko do 70 - 75-procentowego alkoholu, a następnie do standardowego roztworu fenolu, gdzie nie mogą być przetrzymywane dłużej niż 3 - 4 godz., gdyż fenol powoduje, że ługowane skrzydła stają się lepkie i nie dają się rozprostować. W 70 - 75-procentowym alkoholu okazy można przetrzymać dłużej, około 30 min, aż wytworzone ciśnienie wewnątrz owada spowoduje, że odwłok, głowa i przydatki osiągną odpowiedni turgor. To zjawisko jest szczególnie przydatne przy gatunkach mających teleskopowe pokładelka. Delikatne owady należy z alkoholu przenieść na 10 min do 70-procentowego roztworu fenolu i alkoholu przed umieszczeniem ich w standardowym roztworze fenolu. Na szkiełku przedmiotowym umieszczamy owada w kropli fenolu i preparujemy jak opisano już tu. Gdy fenol odparowuje, uzupełniamy raczej mieszaniną balsamu i fenolu niż czystym balsamem.

PIŚMIENNICTWO

- Borowiec L. 1982. Szybkie wykonywanie preparatów genitalnych u chrząszczy dla celów diagnostycznych. *Wiad. Entomol.*, 3: 3 - 4: 149 - 150.
- Warchałowski A. 1977. Totalne preparaty mikroskopowe w entomologii. *Biul. Inf. PTE*, 21: 3 - 16.
- Wirth W. W., Marston N. 1968. A method for mounting small insects on microscope slides in Canada balsam. *Ann. Ent. Soc. Am.*, 61: 783 - 784.