

METODE PREPARIRANJA IN KONSERVIRANJA GENITALNIH ORGANOV IN DRUGIH HITINIZIRANIH DELOV ŽUŽELK

Stanislav GOMBOC
Beltinci

Strukture ženskih in moških spolnih organov so eden pomembnih taksonomskih kriterijev, še posebej v primerih, zelo sorodnih in sestrskih vrst, kjer so ostali morfološki znaki domala identični. Priprava preparatov genitalnih organov je v tovrstnih primerih neizogiben postopek, od katerega je pravilna določitev vrste v mnogih primerih tudi najbolj odvisna.

V prispevku so predstavljene različne metode za pripravo tovrstnih preparatov ter prednosti oz. slabosti posameznih metod.

Pregled genitalnih organov brez preparacije

Na podlagi izkušenj in prakse, je v mnogih primerih mogoče preiskati genitalne organe brez predhodne maceracije in ločitve genitalij od same žuželke. Postopek je mogoč le pri svežih, redkeje tudi pri suhih žuželkah. Pri metuljih samcem pregledamo uncus in valve, samicam pa okolico kopulacijske vrečke. Pred tem s konca zadka s finim čopičem očistimo luskice in ščetine, ki prekrivajo genitalne organe v dolžini, ki nam omogoča dober pregled. Pri kobilicah ta manipulacija ni potrebna in lahko genitalne organe preiščemo kar neposredno s povečevalnim steklom ali stereomikroskopom. Če so deli genitalnih organov potegnjeni v zadek, si pomagamo tako, da s pomočjo pincete narahlo stisnemo del zadka tik za genitalijami, tako da te spet potisnemo iz zadka. Pri tem si lahko pomagamo še z iglo in drugimi pripomočki.

Pri uporabi tovrstne metode je nujno že v naprej poznati morfološke razlike, po katerih lahko vrste določimo, sicer nas ta metoda lahko vodi do napačnih zaključkov, zaradi omejenega pregleda nad strukturami genitalnih organov. Zato gre v teh primerih le za vrste, katerih zgradbo genitalnih organov in taksonomske kriterije le-teh poznamo na podlagi izkušenj ali iz literature. V vseh ostalih primerih pa je nujno pripraviti preparate genitalnih organov po enem od spodaj navedenih postopkov.

Prednosti te metode so, da je kratkotrajna, genitalije ostanejo pri žuželki, možnost izgube oz. zamenjave je s tem izključena, prihranimo pa tudi kemikalije in ostali material, v katerem hranimo tovrstne preparate.

Slabost metode pa je, da so nadaljnji pregledi genitalij pri že suhih žuželkah oteženi ali povsem nemogoči, zaradi deformacij nastalih pri sušenju žuželke in na ta način tudi nadaljnje primerjave s pozneje zbranim materialom, vidni pa so le zunanji deli genitalnih organov, ki v mnogih primerih za primerjave niso dovolj.

Prepariranje genitalnih organov

Znanih je več različnih načinov za pripravo genitalnih preparatov žuželk. Začetni postopki so ponavadi vsem identični, razlikujejo se le v končnih izvedbah. Izbira metode je prepuščena posamezniku, glede na to katero sam izbere za najprimernejšo in jo najlažje uporablja pri svojem delu. V tem primeru bo njegov učinek in zadovoljstvo tudi največje.

V ta namen so v prispevku predstavljene različne metode za pripravo tovrstnih preparatov, saj enotnega pravila še zmeraj ni, saj ima vsaka od njih svoje prednosti in pomanjkljivosti.

Pri izbiri ustrezne metode se moramo v prvi vrsti držati naslednjih pravil:

- genitalije morajo biti preparirane na način, ki omogoča preprost pregled vseh struktur v njihovi naravni obliki in legi,
- preparacijski postopek mora biti preprost in hiter, da ne predstavlja omejitve pri obdelavi večjega števila žuželk,
- konservacija genitalij mora biti primerna, da ob vsakem času omogoča hiter ponovni pregled v vseh željenih oblikah, ki omogoča trodimenzionalno primerjavo preparata s preparati drugih osebkov, kar je za zanesljivost determinacije velikega pomena, - genitalni organi novih taksonov naj bodo predstavljeni dovolj podrobno in na način, ki v različnih perspektivah omogoča različne primerjave, z genitalnimi preparati drugih osebkov.

Do sedaj široko rabljene metode temu kriteriju ustrezajo le deloma, ali pa tudi ne, zato napačne določitve in sinonimi niso nobena redkost. Poraba časa pri takih metodah je tudi razmeroma velika in je čas pomemben omejitveni dejavnik pri delu s temi metodami.

Skoraj vse pomanjkljivosti v neustrezni predstavitvi takih preparatov izvirajo v glavnem iz dveh, pogosto rabljenih postopkov:

- a) zaradi fiksiranja preparata na objektno stekelce, pri čemer izgubimo na trodimenzionalnosti,
- b) s fotografsko in nerisano predstavitvijo genitalij, kjer se pogosto pomanjkljivo vidijo taksonomsko pomembni znaki.

Še kar naprej je v uporabi maceracija v kalijevem hidroksidu (KOH) ali v kateri od podobno delujočih raztopin, kjer pri kuhanju v lugu pride do hidrolize beljakovinskih struktur in se ohranijo le hitinske. Pri tem pride tudi do razbarvanja. Nato sledi izločitev vode iz samega preparata, tako da le-tega peljemo preko alkoholne vrste, z zmeraj višjo koncentracijo alkohola v ksilol (xylol) in ga na koncu fiksiramo v enem od trdih medijev (canada balsam, sintetično steklo ipd.). To je najbolj razširjen način konzervacije, ki pa ga spremlja več tehnično pomembnih pomanjkljivosti:

1. Taki genitalni preparati izgubijo trodimenzionalnost, saj so stisnjeni med objektnim in krovnim stekelcem. S tem izgubijo prvotno naravno obliko, kjer je pogosto prikrita lega pomembnih struktur. Pomembna pomanjkljivost pri tem je, da sta vrsta in stopnja deformacije v večini primerov pogojeni z naključjem, iz česar sledi, da med dvema isti vrsti pripadajočima primerkoma pogosto pride do opaznih razlik v preparatih in s tem napačna določitev.

2. Ker so ti genitalni preparati konservirani v fiksni obliki, jih lahko opazujemo in fotografiramo samo z določenega zornega kota. Takšna pomanjkljivost je omejujoča še posebej v primeru, če so pri dveh primerjujočih preparatih skriti pomembni taksonomski znaki.

3. Tako pripravljene genitalni preparati so ločeni od osebkov v zbirkah (čeprav so možne tudi druge izvedbe) in se zato lahko izgubijo ali zamenjajo. Lahko pride tudi do loma objektnega in krovnega stekelca in s tem do poškodbe preparata.

4. Postopek zahteva razmeroma veliko časa, zato se raziskovalec lahko zadovolji le z razmeroma omejenim številom preparatov in s tem pogosto ne zajame celotne variacijske širine neke vrste, podvrste ali populacije in so zato njegovi zaključki lahko napačni.

Vendar ima metoda tudi nekaj dobrih lastnosti. Tako fiksirani genitalni organi so neposredno pripravljene za pregled in primerjave, brez posebnih priprav. Postavimo jih enostavno pod mikroskop. V trdem mediju fiksirani posamezni deli genitalnih organov so stalno skupaj in ni bojazni, da bi se po večjih pregledih lahko izgubili ali zamenjali, kot npr. v tekočih medijih hranjeni preparati. Taki preparati so tudi lažje prenosljivi pri primerjavah z drugimi zbirkami ipd.

Nekatere slabosti navedene metode lahko odpravimo z metodo, ki je preprostejša od prejšnje in ne zahteva veliko praktičnega znanja in izkušenj. Uporabna je za najrazličnejše sistematske skupine žuželk, od prejšnje pa se razlikuje le v načinu trajnega hranjenja pripravljenih preparatov. Pri tej metodi po maceraciji preparate shranimo v glicerinu in ne v trdem mediju, kot je to primer pri prvi metodi.

1. Priprava genitalij za maceracijo

Pri še svežih - neotrdelih žuželkah, je v mnogih primerih pri samcih genitalne organe mogoče ločiti od zadka, ne da bi tega posebej poškodovali. Teh potem tudi ni nujno macerirati, temveč jih lahko kar tako nalepimo na minucij, vložimo v alkohol ipd. V tem primeru moške spolne organe s pomočjo pincete ali igle potisnemo iz zadka, ter s skalpelom ali škarjicami prerežemo mišičje, s katerim je ta pritrjen k zadku. Pri samicah je tovrstna manipulacija mogoča le v nekaterih primerih, npr. pri ovničih (*Zygaenidae*), saj so pri njih genitalije znotraj zadka, kjer so dobro zavarovane.

Pri suhih žuželkah genitalij na tak način ni mogoče ločiti od zadka, saj bi pri tem polomili celo žuželko in poškodovali genitalije. Zato v tem primeru s pomočjo ostrih škarij ali skalpela odrežemo nekaj zadnjih zadkovih členkov, ali kar ves zadek od preiskovane žuželke (pri samčkih metuljev odrežemo 1/3-1/2 zadka, pri samicah pa 1/2-2/3 zadka saj se kopolacijska vrečka pri njih razteza daleč v notranjost zadka). Pri nekaterih žuželkah, kot so npr. hrošči se zadnji zadkovi členki ne odstranijo, temveč jih pustimo nepoškodovane. Genitalni aparat pa izvlečemo s pomočjo fine, na konici upognjene igle, če pa to ni mogoče, razpremo pokrovke in zadnje zadkove hrbtovine in potem izvlečemo genitalni aparat (običajno samo penis). Suho prepariranim žuželkam, preden jih odrežemo del zadka, zadek lahko nekoliko omehčamo v vodnih hlapih, da ne bi polomili cele žuželke. Pri večjih žuželkah, kot so npr. nekateri metulji je dobro, da od suho preparirane žuželke odломimo cel zadek, ki ga potem omehčamo v vodnih hlapih, da postane mehak kot v svežem stanju, nakar genitalni aparat ločimo od zadka. Ker je vlaženje na tak način dolgotrajno, si lahko pomagamo z raztopino amonijaka, ki jo s pomočjo tanke injekcijske igle previdno injiciramo v zadek blizu genitalnega aparata. Zadek nato neprodušno zapremo za nekaj časa, da se omehča in nato od njega ločimo genitalni aparat. Na koncu preostali del zadka nalepimo nazaj k preiskovani žuželki. Na tak način se izognemo, da bi pri prerezu suhega zadka zlomili celo žuželko, kar se pogosto dogaja.

Takoj po ločitvi zadka od žuželke je pomembno, da oba takoj ustrezno obeležimo, da pozneje ne pride do zamenjav. Te številke ali kode naj spremljajo žuželko in genitalni aparat skozi ves proces maceracije in po potrebi tudi pozneje. Kodo si zabeležimo še v zvezek da povečamo varnost pred morebitnimi zamenjavami, posebno, če pripravljamo več preparatov hkrati.

2. Maceracija

Za hidrolizo mišičnega in maščobnega tkiva s hitiniziranih delov genitalnega aparata uporabimo 5-20 % raztopino kalijevega (KOH), ali natrijevega hidroksida (NaOH), (v nadalnjem besedilu luga). Koncentracija hidroksida je v navedenih mejah brez večjega pomena, vendar pri večjih, bolj hitiniziranih in otrdelih žužlekah običajno uporabljamo višje koncentracije luga. Bolj koncentrirane luge lahko tudi večkrat zaporedoma uporabimo, ne da bi zamenjali raztopino, medtem ko se manj koncentrirani hitreje iztrošijo. Najpogosteje so v prodaji 5 mm velike kroglice KOH, ki jih dobimo v trgovinah s kemikalijami. Vzamemo 2-6 kroglic, ki jih raztopimo v 5 ml destilirane vode. Raztopino nato natočimo v epruvete, v katerih bomo opravili maceracijo. Za maceracijo enega genitalnega aparata povprečno velike žuželke zadošča že 1 ml take raztopine, vendar je raje nalijmo nekoliko več. Glede na čas imamo pri maceraciji dve izbiri:

a) Odvisno od velikosti in trdote žuželke, zadek pustimo v hidroksidu 5-20 ur pri sobni temperaturi. Če se tkiva, razen hitina, v tem času še ne razgradijo, maceracijo ponovimo.

b) Če povečamo temperaturo reakcije, maceracijo skrajšamo na nekaj minut, s tem da epruveto postavimo v vročo vodno kopel in ne neposredno na izvor toplote, da se nam ta ne pregreje in bi nam v tem primeru iz epruvete brizgnil vroč KOH. Temperatura vodne kopeli naj se giblje od 80-100° C; pri tem maceracija poteče v času 5-10 minut. Če se vsa nezaželjena tkiva v tem času niso razgradila, maceracijo ponovimo. Vendar je že samo po sebi umevno, da moramo večje in bolj otrdele zadke macerirati dlje, kot zadke manjših živali.

Zaradi jedkosti luga delo z njim zahteva previdnost. Ne sme nam priti v stik s kožo, še posebej v oči, ker pri tem lahko oslepimo. Če nam le pride v oči, ga hitro speremo pod tekočo vodo. Lug posebno rad brizgne iz epruvet pri pregretju, kjer se nenadoma sprosti večja količina par, ki povzroči eksplozijo luga. Zato preden epruveto postavimo v vodno kopel, to zamašimo z mehkim svitkom vate, prijemljemo pa jo le s prijemalkami za epruvete in ne z golimi rokami. Pri kuhanju morajo epruvete stati obrnjene v stran od nas. Bruhanje vročega luga lahko prepreči tudi kosček lesa npr. vžigalice, ki ga pred kuhanjem postavimo v epruveto. Če je v kopeli več epruvet hkrati, naj bodo te ustrezno obeležene, da ne pride do zamenjav.

3. Ločitev genitalnega aparata od zadka

Po maceraciji objekt s pinceto ali iglo prestavimo iz luga v petrijevko z vodo, kjer s preparacijsko iglo iz njega iztisnemo preostanek hidroksida. Nato s pomočjo dveh tankih igel, pod lupo ali stereomikroskopom, ločimo luske, dele prebavnega trakta, maščobno tkivo in dele zadka od genitalnega aparata. Vse te manipulacije opravljamo v vodni kopeli, saj se preparat pri tem ne sme izsušiti. Nekateri avtorji pustijo genitalije nekaj ur v vodni kopeli; s kuhanjem v vodi lahko ta proces prav tako skrajšamo na nekaj minut, da se te bolj presvetlijo. Pri nekaterih objektih lahko dosežemo boljše presvetlitev s postavitvijo preparata v očetno kislino, ki obenem nevtralizira kalijev hidroksid. Če se voda pri tem močneje umaže, jo zamenjamo, nakar pri metuljih ločimo še oedeagus od ostalega dela genitalnega aparata. Pri manjših žužlekah je pri ločitvi genitalnega preparata potrebna

večja previdnost, saj se nežne strukture hitro poškodujejo in so pozneje neuporabne. V primeru, da se genitalnega aparata še držijo odvečna tkiva, maceracijo v lugu ponovimo.

4. Barvanje genitalnega aparata

Po potrebi lahko preparate dodatno obarvamo z barvili za suhe preparate, da dobimo večjo preglednost nad strukturami genitalnega preparata. Saj se pri kuhanju v lugu, zaradi hidrolize, barvila, posebno pri majhnih objektih, povsem razgradijo. Za barvanje lahko uporabimo naslednja barvila: fuksin, kongo rdeče, eosin, mercurocrom ipd., ki jih raztopimo v 50-70 % raztopini etanola, ali v vodi. Koncentracijo barvila določimo na podlagi izkušenj. V večini primerov pa zadošča 2-3 % raztopina barvila. Preparat v tej raztopini pustimo, dokler se v celoti ne obarva, nekako 5-10 minut. Zatem ga prestavimo za 10-15 min v 70 % etanol, kjer se izpere odvečno barvilo. Dodatno lahko posodico s preparatom nekoliko stresamo.

V širši praksi genitalnih preparatov navadno ne barvamo, barvanje pa uporabljamo v primerih natančnejših preiskav genitalij, kadar jih želimo izrisati, fotografirati ipd.

5. Pregled preparatov

Že takoj po maceraciji in ločitvi od zadka je genitalni aparat mogoče preiskati pod lupo ali stereomikroskopom. Preiskave pa lahko opravimo tudi po vseh nadaljnjih postopkih, ki sledijo pri metodah konserviranja preparata za dolgotrajno hranjenje, zato so posamezne posebnosti tovrstnih pregledov predstavljene pri teh metodah.

6. Metode priprave trajnih preparatov

a) Kot vsestransko uporabna metoda, še posebej pri večjih, močnejše hitiniziranih žuželkah, je lepljenje maceriranih genitalnih aparatov z vodotopnim lepilom na minucije (kartončke za hrošče), ki jih nabodemo na entomološko iglo k pripadajoči živali. Slaba stran te metode je le, da moramo pred vsakim ponovnim pregledom takega preparata, tega najprej sprati iz lepila. Najprimernejši način za to je kratko kuhanje preparata skupaj z minucijem v vodi, ali kar v hidroksidu, pri čemer hrati s ponovno omočitvijo izginejo nastale deformacije. Ta metoda je primerna predvsem za serijske preiskave, saj pri tem prihranimo čas, stekleničke in kemikalije.

b) Pri v alkoholu ali drugih konservacijskih medijih hranjenih žuželkah, genitalni aparat priložimo pripadajoči žuželki v isto stekleničko, ali pa v posebno manjšo stekleničko z glicerinom, ki jo potem vložimo v večjo stekleničko k žuželki. Vendar pa maceracija genitalnih aparatov v tekočih medijih hranjenih žuželk pogosto ni niti potrebna, saj je genitalni aparat mogoče preiskati kar neposredno, brez maceracije.

c1) Če želimo genitalni aparat shraniti v eni od oblik trdih preparatov, moramo iz njega najprej sprati vodo, tako da peljemo objekt preko alkoholne vrste (kolone). Pri tem dosežemo tudi večjo trdnost hitina. Obnese se naslednji postopek:

Genitalni aparat v vodni kopeli postavimo na objektno stekelce v željeno obliko in ga prekrijemo s krovnim stekelcem. Vzamemo ga iz vodne kopeli in na eni strani pristavimo pivnik, ki vpija vodo iz preparata. Na drugi strani pa s pomočjo pipete dokapavamo 70 %

etanol. Tako je preprečeno, da objekt pride v stik z zrakom, saj se pri tem v njem naberejo mehurčki, ki otežujejo nadaljnje postopke. Po približno 20-minutnem učinku etanola je preparat utrjen.

Nato objekt prestavimo v epruveto s 70 % etanolom in ga v njej vodimo do vedno višje koncentracije etanola. Po 70 % sledi kopel v 80 % raztopini etanola in nazadnje še v 96 % raztopini etanola. V prvih dveh koncentracijah ostane preparat najmanj 15 minut, v zadnji pa nekaj ur. Nekateri avtorji izpustijo 80 % raztopino, da tako nekoliko pridobijo na času. Čas lahko skrajšamo še s stresanjem preparata v epruvetah, v katerih ga namakamo. Izpustimo lahko tudi odvođenitev na objektu stekelcu in objekt iz vode takoj prestavimo v 70 % etanol. Pri menjanju koncentracije moramo biti previdni, da ne izgubimo pos. delov genitalnega aparata, zato je dobro, da raztopine izmenjamo s pomočjo pipete kar v isti epruveti, da objekt čim manj prestavljamo.

Zatem sledi 15-minutno namakanje objekta v ksilolu, kjer ta dokončno otrdi in postane lepo prosojen. Pred postavitvijo v ksilol je zato pomembno, da ima ta naravnano ustrezno lego, saj jo pozneje le težko predrugačimo. Če ksilol postane moten, pomeni, da je bila odvođenitev preparata nezadostna in jo moramo ponoviti. Namesto ksilola lahko uporabimo še nageljnovno olje, ki ima to prednost, da pri stiku z vodo, ki jo morebiti še vsebuje objekt, ne postane motno. Pri vseh teh postopkih pazimo, da ne izgubimo pos. delov genitalnega aparata. Tako je aparat pripravljen za fiksiranje v enega od trdih medijev.

c2) S pinceto vzamemo objekt iz ksilola ali nageljnovnega olja in ga na kratko položimo na pivnik, ki vpije odvečni ksilol. Nato ga položimo na objektno stekelce, v večjo kapljico kanada balsama ali caedaxa, durobalsama, europarala in podobnih medijev. Pri tem oedeagus postavimo ločeno pod ostali del genitalnega aparata v isto kapljico kanada balsama. Pri tem pazimo, da v objekt ne prodrejo zračni mehurčki, ki motijo izgled in pogosto varajo. Zatem celoten objekt prekrijemo s krovnim stekelcem. Kapljica kanada balsama naj bo velika, da povsem izpolni prostor med objektom in krovnim stekelcem. Če ga je premalo, ga dokapamo na rob krovnega stekla, da nam steče do preparata. Odvečni kanada balsam po večmesečnem sušenju previdno odstranimo s konico skalpela ali žiletke. Če je genitalni aparat debelejši, potem pod krovno stekelce postavimo ustrezne distančnike iz plastike, stekla ali kartona, ki omogočijo enakomerno naleganje krovnega stekla. Pri pritisku krovnega stekla na objekt obstaja nevarnost, da pri izpodrivanju kanada balsama izpodrinemo še posamezne dele genitalnega aparata na rob krovnega stekelca. To lahko preprečimo s položitvijo majhnih koščkov stekla na posamezne dele objekta in v kanada balsam, ki so v kanada balsamu po strditvi povsem nevidni. Tako dokončan preparat zatem 10-14 dni sušimo v neprašnem prostoru, pri sobni temperaturi, da se kanada balsam povsem strdi, čeprav prava strditev nastopi šele čez nekaj mesecev. Pred tem preparat ustrežno obeležimo s kodo in etiketo, kateri vrsti in živali pripada. Take preparate hranimo v škatlah za mikroskopske preparate.

d) Prej omenjene preparate hranimo ločeno od pripadajočih živali, kar ima svoje prednosti in pomanjkljivosti. Za premostitev teh težav je bila med entomologi v Gradcu razvita t.i. graška metoda priprave trajnih preparatov (Habeler, 1966). Metoda je hitra, pripravljeni preparati pa so shranjeni na igli skupaj z žuželko. Tako ni potrebno dolgotrajno iskanje, najprej preparata in nato pripadajoče žuželke.

Za fiksiranje objekta metoda uporablja dva različna medija, z enakima lomnima koeficientoma - kanada balsam in nitro lak.

Nosilec preparata izdelamo iz kartončka velikega 9x15 mm ali ustreznega minucija. Na enem koncu kartonček preluknjamo z luknjačem ϕ 5 mm. Nato iz krovnege stekelca 18x18 mm pripravimo 4 manjša, 9x9 mm. Za preparat potrebujemo dve taki stekelci. Z enim zapremo luknjico od spodaj, tako da na na spodnji rob kartončka, ob luknjici, z iglo naneseemo brezbravni nitrolak in nato nanj položimo stekelce, ki se na ta način sprime s kartončkom. Spoj stekelca samo na eni strani namreč prepreči lom ob morebitnih zvijanjih kartončka. Raba nitrolaka izvira iz potrebe, da ga v primeru ponovnega izpiranja objekta iz preparata, brez težav raztopimo v enem od ksilol vsebujočih medijev. Več takih nosilcev preparatov je dobro izdelati na zalogo.

Postopek do ksilola je isti, kot pri prvi metodi (c1). Iz ksilola objekt postavimo na spodnje krovno stekelce, na katerega v sredini - znotraj luknjice kartona, naneseemo progo nitrolaka, da nanjo postavimo genitalni aparat in ga na njej naravnamo v željeno lego. Oedeagus postavimo ločeno, ob ostalem delu genitalnega aparata. Na strditiv laka ni potrebno čakati, saj to lahko dosežemo z nanosom nekaj ksilola na sam objekt. Zatem iz preparata, s pomočjo igle, odstranimo vse mehurčke zraka, ki motijo pri pregledu struktur. Na še s ksilolom omočeni objekt nato naneseemo enega od fiksirnih medijev (kanada balsam ipd.). Preparat še zgoraj prekrijemo s krovnim stekelcem in pustimo, da se preparat strdi v neprašnem prostoru. Pripravljen preparat ustrezno obeležimo ter ga po strditvi ali že pred tem, nabodemo k pripadajoči žuželki.

V trdih medijih hranjene preparate lahko pozneje po potrebi speremo iz njih, tako da preparat prelijemo z zadostno količino ksilola, ki stopi strjeni medij. Nitrolak, ki ga uporabljamo pri tej metodi, na koncu še speremo v nitru razredčilu (amilacetatu ali acetonu) in objekt je spet prost. Za spiranje lahko uporabimo tudi druga nepolarne topila, ki ne poškodujejo preparata

e) Poenostavljen postopek za manjše objekte je razvil tudi dr. G. Friese (Koch, 1976):

Po maceraciji v lugu (točka 2) in ločitvi genitalij od zadka, objekt prestavimo iz luga v nasičeno raztopino fenolklorohidrata. Ta raztopina nevtralizira bazo in nekoliko presvetli objekt. Po pol do dveh urah pri 50° C v termostatu, ali 3-5 urah pri sobni temperaturi, je objekt popolnoma prepojen. Stresanje objekta pri tem nekoliko pospeši postopek.

Iz fenolklorohidrata prestavimo genitalije na objektno stekelce v kapljico berlesejeve raztopine, ki se v tem primeru sestoji iz:

- 30 g arabske gume (gumi arabicum - smolika),
- 50 g kloralhidrata,
- 20 g glicerina,
- 50 g destilirane vode.

Objekt zatem prekrijemo s krovnim stekelcem, nakar sledi sušenje preparata 8-14 dni v vodoravni legi, da se prepreči morebitni iztok tekočine in premikanje preparata. Po treh do štirih tednih odstranimo čez krovno stekelce štrleče ostanke berlesejeve raztopine. Okrog stekelca zatem s finim čopičem naneseemo lak (v terpentinovem olju raztopljen laneno-oljni lak), tako, da je objektno stekelce neprodušno zaprto.

Pri tem postopku odpade izpiranje luga v vodi in vodenje objekta preko alkoholne vrste do ksilola in s tem utrjevanje objekta. Tako je proces nekoliko olajšan in kratkotrajnejši.

f) Ena, v sodobnem času zmeraj pogosteje rabljenih metod, je shranjevanje genitalnih aparatov v glicerinu.

Pri tej metodi prav tako peljemo objekt preko alkoholne kolone do glicerina, kjer preparat pozneje hranimo. Tako shranjen preparat lahko potem kadarkoli pregledujemo, s katerimkoli mikroskopom. Pri pregledih majhnih objektov se najbolje obnese objektivno stekelce z vboklino, v katerega kapnemo kapljico glicerina in nato v njej pregledujemo preparat, sicer lahko uporabljamo urno steklo, petrijevko idr., z ustrežno količino glicerina. Zaradi velike viskoznosti glicerina lahko genitalne preparate, še posebej pa manjše strukture postavimo v različno lego, ki jo ohranijo do naslednje manipulacije z njimi. S tanko entomološko iglo lahko tak položaj dodatno fiksiramo na kartonček, ki ga položimo pod preparat. Na ta način lahko objekt fotografiramo ali izrišemo v poljubni legi.

Po zaključku preiskav preparate vložimo v majhne stekleničke ali miniaturne epruvete, ki vsebujejo le kapljico glicerina (najmanjše imajo premer 1,5 mm in so dolge 6 mm. Epruvete zapremo z zamaškom iz plute ali umetne mase in jih skozi zamašek nabodemo na entomološko iglo, kjer je že pripadajoča žuželka. (Ker pri nas tovrstnih epruvet ni na razpolago, namesto teh uporabljam plastične cevčice različnih dimenzij, ki jih na obeh koncih zamašim z zamaški iz silikonskega kita. Cevčico z genitalnim aparatom nato nalepimo na minucij, ki ga ustrežno obeležimo in nabodemo na iglo k žuželki.) Na ta način prihranimo na ločeni zbirki samih genitalnih preparatov in obenem tudi težje prihaja do zamenjav, zaradi morebitnega kodiranja ipd. Zaradi nizkega parnega tlaka glicerina, je izsušitev tako hranjenih preparatov, četudi zamašek ne tesni najboljše povsem izključena. Tudi za vse nadaljnje preiskave so tako shranjeni preparati stalno na razpolago; za primerjave z nadaljnjimi in to s kakršnega koli zornega kota. Deformacije namreč tudi po večletni konservaciji ne nastopijo.

Predstavljene metode so uporabne za domala vse skupine žuželk in ne le za preparacijo genitalnih, temveč tudi ostalih hitiniziranih delov žuželk. Težave nastopijo le pri zelo majhnih žuželkah, z majhnimi in slabo hitiniziranimi telesnimi deli. Če je genitalni aparat le dovolj velik in še zadovolji preiskavi pri optičnih zmožnostih stereomikroskopa (meja je nekje pri 200 x povečavi), je tudi v tem primeru najprimernejši pregled in hranjenje preparatov v glicerinu, pri čemer pri maceraciji genitalnega aparata ne ločimo od žuželke. Zato maceriramo celo žuželko in jo kot tako tudi hranimo v glicerinu ali trdem mediju, npr. uši in bolhe. S tem preprečimo, da bi se posamezni deli preparata, zaradi majhne velikosti, v primeru ločitve lahko izgubili. Če pri preiskavi preparata potrebujemo večje povečave od stereomikroskopa, moramo le-tega pripraviti, kot fiksiran mikroskopski preparat na objektnem stekelcu, čeprav s tem izgubimo več drugih ugodnosti, vendar boljših rešitev zaenkrat ni.

Dodatno težavo predstavljajo morfološke preiskave genitalnih preparatov pri zelo majhnih metuljih. Zaradi taksonomske pomembne razporeditve luskic na krilih, maceracija cele živali ne pride v poštev, zato maceriramo le zadek. Če pri pregledu potrebujemo večjo povečavo od 200 x, je nujno izdelati trajni mikroskopski preparat na objektnem stekelcu, še posebej, ko moramo v ustrežno lego postaviti vse najmanjše strukture genitalnega aparata, ki jih pri tem ločimo od celote in bi se v primeru konservacije v glicerinu lahko hitro izgubile. Vsekakor pa pri večini metuljev izdelava mikroskopskih preparatov, vsaj v veliki večini primerov, ni nujna.

Hranjenje gen. preparatov v trdih medijih izbiramo le v skrajnem primeru. Poleg tega je potem najbolje uporabljati vodotopna fiksacijska sredstva, od katerih imajo nekatera odličen lomni koeficient in se bistveno več let ne spremenijo. Pri vodotopnih fiksacijskih sredstvih se pojavijo le minimalne in reverzibilne deformacije, izpiranje preparata iz takega medija je mnogo lažje izvedljivo, prihranimo pa tudi čas in kemikalije. Kjer je le mogoče, odvisno od potrebne povečave, se poslužujemo preiskav in izrisov preparatov v glicerinu in šele nato vložimo preparat v enega od trdih medijev.

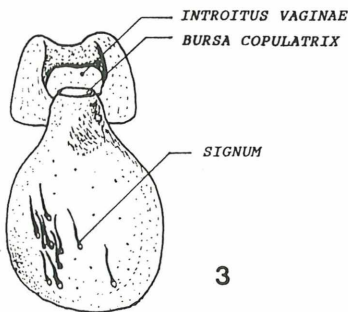
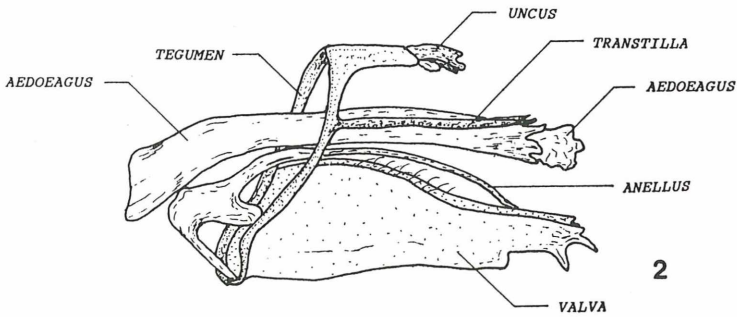
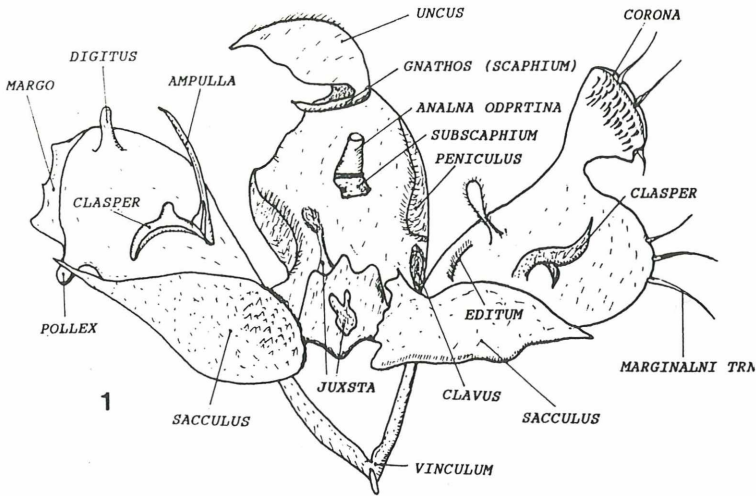
Katero metodo uporabljamo, ni odvisno le od vrste žuželke, temveč še posebej od tega, ali opravljamo morfološke preiskave gen. organov zgolj kot rutinski postopek, za določitev že znane vrste, ali povsem novega ali nezadostno opisanega taksona. Vsekakor pa je izbira metode prepuščena vsakemu posamezniku. Poleg tega so pri hranjenju genitalnega aparata holotipa, glede na varnost, postavljena stroga merila. Zato pri tipih izberemo posebno skrbne in kompromisne rešitve med najzanesljivejšimi in s stališča preiskav ter predstavitev najprimernejšimi metodami hranjenja genitalnih preparatov.

Glavni vzrok za mnoge taksonomske zmede predstavlja pomanjkljiva predstavitev taksonomsko relevantnih struktur, še posebej v znanstvenih prispevkih. Fotografška predstavitev je v velikem številu primerov povsem neuporabna metoda, saj pogosto prikrije taksonomsko pomembne, izpostavi pa taksonomsko nepomembne morfološke znake. Edino risba omogoča selektivno predstavitev struktur, s poudarkom na taksonomsko pomembnih znakih in izpustitvijo tistih, ki vodijo do pogostih zmot. Le za reprodukcijo najfinejših struktur je fotografija največkrat metoda izbire, vendar ima ta, glede na zmožnosti svetlobnega mikroskopa, tudi v tem primeru podrejeno vlogo. Veliko večjo predstavitveno vrednost imajo elektronsko-mikroskopski posnetki, s presenetljivimi možnostmi predstavitve najfinejših struktur. Vendar ta precej draga izkušnja, tako danes, kot tudi v bodoče, zaradi visoke cene, najbrž nikoli ne bo dobila pravega pomena, še posebno pri rutinskih preiskavah in pri amaterjih. Tako je dobra risba, za predstavitev morfološko značilnih struktur genitalnega aparata - pri čemer gre izključno za taksonomska vprašanja, še najboljša alternativa fotografiji. Čeprav bo fotografija v bodoče, še posebej ob podpori računalniške obdelave, vse bolj pridobivala na pomenu, kot objektivna metoda dokumentacije v prihodnosti.

Literatura

- Aspöck, H.** (1971): *Grundsätzliche Bemerkungen zur Methodik der Präparation, Konservierung und Darstellung von Insekten-Genitalien.*— Entomologisches Nachrichtenblatt, Wien. 2(23) s. 62-65.
- Habeler, H.** (1966): *Rasche und einfache Dauerpräparat-Herstellung bei der Artdiagnose nach dem Kopulationsapparat.*— Zeitschrift der Wiener Entomologischen Gesellschaft. 51, s. 90-93.
- Koch, M.** (1976): *Wir bestimmen Schmetterlinge.*— 2. Auflage, Neumann Verlag Leipzig - Radebeul. 311 s.

Naslov avtorja
Stanislav Gomboc
Gančani 110
SLO-69231 Beltinci



sl. 1 in sl. 2
Zgradba in poimenovanje posameznih struktur namišljenega genitalnega aparata pri samcih metuljcv. (orig.)

sl. 3
Zgradba in poimenovanje posameznih struktur namišljenega genitalnega aparata pri samicah metuljcv. (orig.)