

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Udoskonalenie techniki obserwacji zwilżenia mączlika szklarniowego (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood)

HENRYK RATAJKIEWICZ¹, JERZY WROCŁAWSKI²

¹UNIwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Entomologii i Ochrony Środowiska

²Serwis Przyrządów Optycznych

Słowa kluczowe: zwilżenie, kąty przylegania, mączlik szklarniowy, *Trialeurodes vaporariorum*

STRESZCZENIE

Hydrofobowe właściwości powierzchni owadów zapewniają ochronę ich organizmów przed zwilżeniem przez wodę. Dzięki tym właściwościom szkodniki roślin uprawnych mogą zmniejszać zwilżenie przez krople rozpylonej cieczy. Celem pracy było udoskonalenie techniki obserwacji zwilżenia mączlika szklarniowego (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) po naniesieniu kropli poprzez opryskiwanie. Badania potwierdziły przydatność wykonanego stolika pochylanego z wbudowanym zwierciadłem płaskim w ocenie zwilżenia *T. vaporariorum*. Obecność obfitych wosków kutykularnych oraz mikrostruktura grzbietowej części puparium i larw mogą wyjaśniać przyczyny ich hydrofobowości. Wraz z obniżeniem napięcia powierzchniowego cieczy zwiększało się zwilżenie owada. Wyznaczenie kątów przylegania cieczy po spontanicznym osadzeniu kropli na puparium *T. vaporariorum* nie przyniosło jednak zadowalających rezultatów z uwagi na kształt powierzchni grzbietowej.

Improving the observation technique of the wettability of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood)

Keywords: wetting properties, contact angles, greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*

ABSTRACT

The hydrophobic properties of insects surface protect their organisms from wetting by water. Thanks to these properties pest may reduce wetting by spray droplets. The aim of this work was to improve observation techniques of wetting the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) after the application of spray droplets. The study confirmed the usefulness of the tilting stage with built-in flat mirror in evaluation of wetting properties of *T. vaporariorum*. The presence of abundant epicuticular waxes and dorsal microstructure may explain the hydrophobicity of pupae and larvae. As the surface tension of the liquid decreased the wetting of the insect increased. Determination of the contact angles after spontaneous deposition of droplets on pupa of *T. vaporariorum* has not produced satisfactory results due to the shape of the dorsal surface.

1. WSTĘP

Zwilżenie płaskich, poziomych, gładkich, jednorodnych powierzchni można dość łatwo zmierzyć i bardzo precyzyjnie charakteryzować [1]. Opracowano szereg metod pomiarowych, które są podstawą wyznaczania kątów przylegania (zwilżenia), jak i napięcia powierzchniowego [2, 3]. Inaczej może być w przypadku materiału biologicznego. Powierzchnia struktur budujących zewnętrzną okrywą organizmów jest heterogeniczna, wzbogacona obecnością utworów kutykularnych i pokryta woskami epikutykularnymi. Taki stan utrudnia, a czasem nawet uniemożliwia pomiary. Powierzchnia owadów jest jednym z lepszych tego przykładów. Wiele gatunków to organizmy szkodliwe, które są rutynowo zwalczane poprzez opryskiwanie. Zarówno zwierzęta, jak i rośliny, wytworzyły podobne mechanizmy chroniące przed zwilżeniem; woski epikutykularne, mikro- i nanostruktura powierzchni są podstawą ich hydrofobowości [4, 5]. Pogłębienie wiedzy o zachowaniu się kropli cieczy o różnych właściwościach fizykochemicznych na powierzchni ciała szkodliwych owadów może dostarczyć cennych informacji umożliwiających doskonalenie aplikacji środków ochrony roślin. Z uwagi na osiadły tryb życia stadiów niedoskonałych i bardzo duże znaczenie gospodarcze w uprawach warzyw i roślin ozdobnych w szklarniach, za przedmiot badań obrano mączlika szklarniowego (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood). Celem

pracy było udoskonalenie obserwacji zwilżenia przez zastosowanie stolika pochylanego z wbudowanym zwierciadłem płaskim i wyznaczenie kątów przylegania na powierzchni stadiów niedoskonałych mączlika szklarniowego (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) po naniesieniu kropli poprzez opryskiwanie.

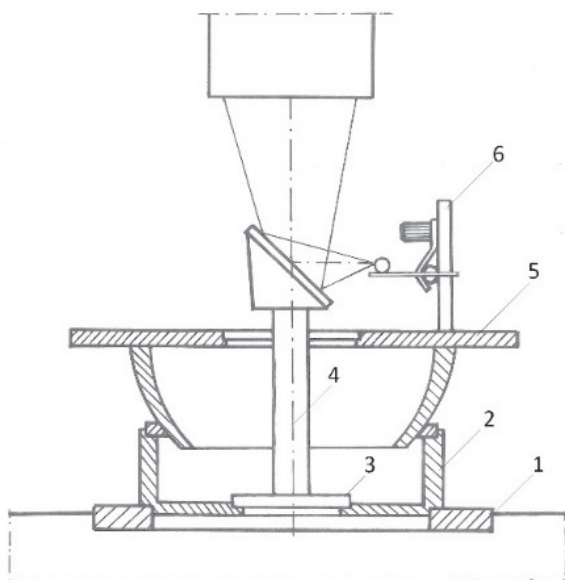
2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

2.1 KONSTRUKCJA STOLIKA POCHYLANEGO Z WBUDOWANYM ZWIERCIADŁEM PŁASKIM

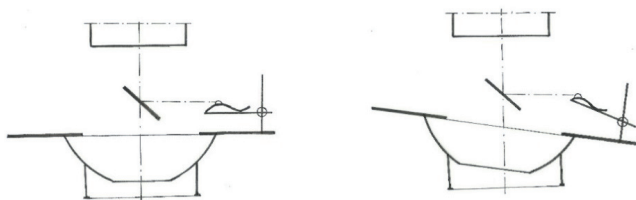
Podstawą prowadzenia obserwacji powierzchni owada było zastosowanie mikroskopu pracującego w świetle odbitym. Założono, że bazą dla takich obserwacji będzie mikroskop o typowej budowie układu optycznego z obiektywem ustawionym w pionowej osi. Do tego celu użyto mikroskopu SteREO Discovery.V12 z modułem sterującym EMS-3, oprogramowaniem AxioVision Rel. v.4.8.2 i kamerą AxioCam ERc 5. Zestaw mikroskopowy umożliwiał automatyczne skalowanie obrazu i wymiarowanie. Mikroskopowe obserwacje kształtu kropli wymagały skierowania osi optycznej na powierzchnię prostopadłą do pionowo ustawionej osi obiektywu. W tym celu zastosowano wysokiej jakości lustro zewnętrzne stosowane w układach optycznych do zmiany kierunku biegu promieni tworzących obraz (Rys. 1). Lustro płaskie ustawiono pod kątem 45° do obiektywu. Uchwyt preparatu umieszczono na stoliku. Różnorodne położenie i ukształtowanie obiektów

(liście, owady) wymagało wykonania konstrukcji stolika umożliwiającej jego pochylanie względem centralnej osi i ustawienie obrazu obiektu zgodnie z założeniami obserwacji. Ruchomy uchwyt i stolik pochylany pozwalały na dopasowanie położenia preparatu w taki sposób, aby możliwe było obserwowanie podstawy kropli cieczy równoległe do poziomemu. Na Rysunku 2 zaznaczono pozycje stolika pochylanego i uchwyty z zamocowanym szkłem nakrywkowym w sytuacji różnego ułożenia owada na liście przymocowanym do szkła. Stolik pochylany z uchwytem i wbudowanym zwierciadłem płaskim umieszczony w statywie mikroskopu SteREO Discovery.V12 przedstawiono na Rysunku 3.

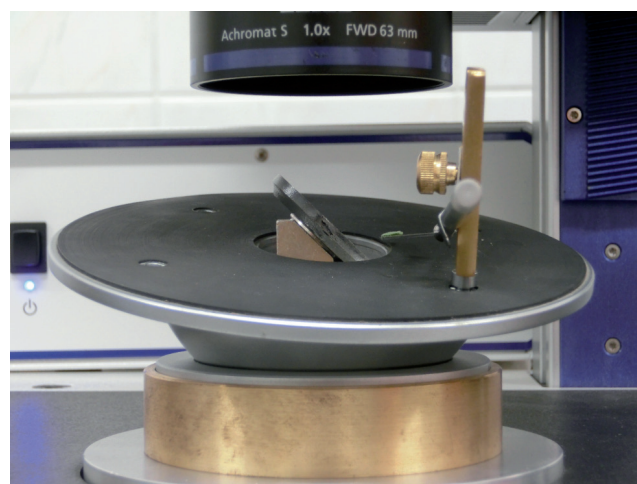
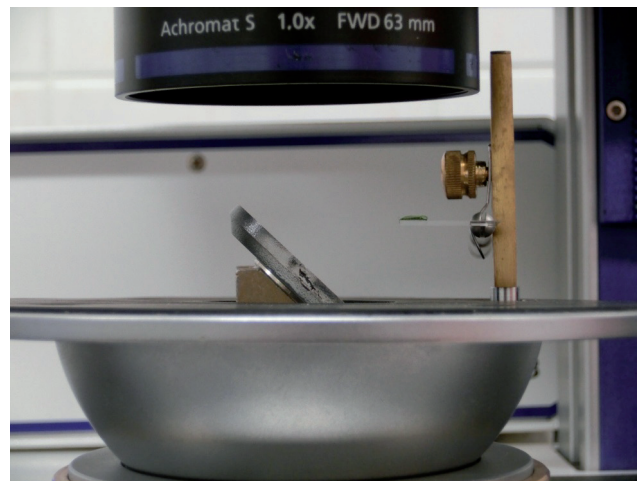
Przystosowanie mikroskopu SteREO Discovery.V12 do badań wykonano w firmie „Serwis Przyrządów Optycznych”.



Rysunek 1 Schemat budowy stolika pochylanego z uchwytem i wbudowanym zwierciadłem płaskim:
1 – pierścień podstawy stolika; 2 – uchwyt stolika pochylanego; 3 – podstawa lustra płaskiego;
4 – uchwyt lustra; 5 – stolik pochylany;
6 – uchwyt preparatu



Rysunek 2 Schemat działania stolika pochylanego z uchwytem i wbudowanym zwierciadłem płaskim do ustawiania obiektów i obserwacji ich powierzchni prostopadle do pionowej osi układu optycznego mikroskopu SteREO Discovery.V12



Rysunek 3 Stolik pochylany z uchwytem i wbudowanym zwierciadłem płaskim w wybranych położeniach

2.2 MATERIAŁ BADAWCZY, OBSERWACJE I POMIARY

Modelowym owadem użytym w badaniach był pluskwiak z podrzędu piersiodziobych: mączlik szklarniowy (Hemiptera, Sternorrhyncha), a ściślej jego nieruchome stadia larwalne oraz puparium. Badania prowadzono również na powierzchni liścia pomidora zwyczajnego (*Solanum lycopersicum*), który służył jako podłoże do hodowli mączlika szklarniowego, a także na parafilmie i szkle. Parafilm jest standardowym podłożem do wyznaczania kątów zwilżenia kropli i napięcia powierzchniowego w badaniach cieczy użytkowej środków ochrony roślin [6]. Ocenę zwilżenia przeprowadzono na powierzchni ciała owadów znajdujących się na liściu, jak i po przeniesieniu na taśmę adhezyjną. Fragment liścia przycinano w możliwie najmniejszej odległości od osobnika i przyklejano do taśmy na brzegu szkła nakrywkowego do badań mikroskopowych, które umieszczano w uchwycie preparatu. W przypadku

puparium poszczególne osobniki przenoszono także na taśmę adhezyjną, co umożliwiało ich odpowiednie ułożenie i prowadzenie obserwacji na kilku owadach jednocześnie. W każdym powtórzeniu przeprowadzono obserwacje na 5 osobnikach, a kombinacja doświadczalna składała się z 3 powtórzeń.

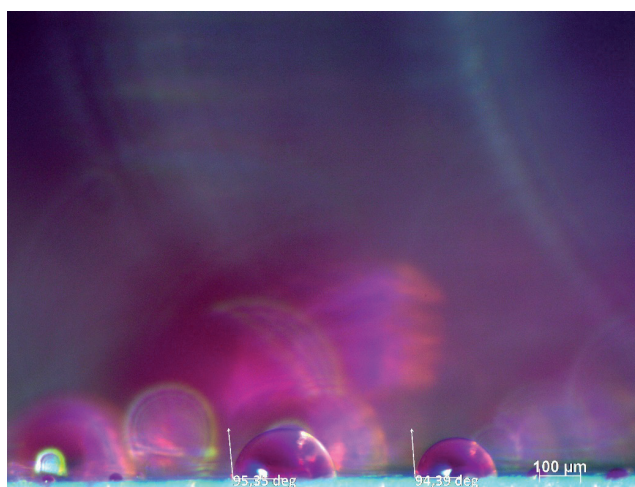
W badaniach użyto następujących cieczy: wodę dejonizowaną, roztwory wodne lignosulfonianu sodowego (0,1%-2%), Glucopon 650 EC (0,1%), Marlowet R 40 (0,1%), Silwet Gold (0,04%). Nanoszenie strumienia kropli odbywało się z pomocą ręcznego atomizera z odległości 10-15 cm od szkiełka z przygotowanym preparatem. Dla podniesienia widoczności kropli, do cieczy dodawano albo fluoresceinę sodową w stężeniu 0,01%, albo koncentrat soku z buraka ćwikłowego w stężeniu 2%. W przypadku fluoresceiny oświetlacz wyposażono w filtr niebieski, a mikroskop w interferencyjny filtr odcinający o $\lambda_{\text{max.}} = 525 \text{ nm}$. Do oświetlenia przedmiotu zdjęcia użyto oświetlacza halogenowego z dwoma światłowodami kształtowanymi w dowolnym kierunku. Przed opryskiwaniem ustawiano ostrość obrazu na jednego lub kilka owadów znajdujących się w polu obserwacji. Następnie automatycznie odsuwano obiektyw do ustalonej pozycji i osłaniano lustro. Po opryskiwaniu, obiektyw wracał automatycznie do ustalonej pozycji, usuwano osłonę lustra i korygowano ostrość obrazu na kontur kropli na owadzie względnie korygowano powiększenie, a następnie wykonywano zdjęcie. Czas trwania tych czynności do chwili wykonania zdjęcia wynosił od 15 do 60 sekund.

Wyznaczenie kątów zwilżenia i rozmiarów kropli odbywało się manualnie w oparciu o standardowe funkcje oprogramowania AxioVision Rel. v.4.8.2. Poprawność wyznaczania kątów zwilżenia zweryfikowano w oparciu o badania porównawcze przeprowadzone na parafilmie z wykorzystaniem tensjometru i oprogramowania firmy KSV, umożliwiających wykonywanie automatycznych pomiarów. Badania porównawcze przeprowadzono w Katedrze Agronomii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Dokumentację mikrostruktury powierzchni grzbietowej mączlika szklarniowego wykonano pod mikroskopem skaningowym Hitachi TM 3000.

3. WYNIKI I ICH DYSKUSJA

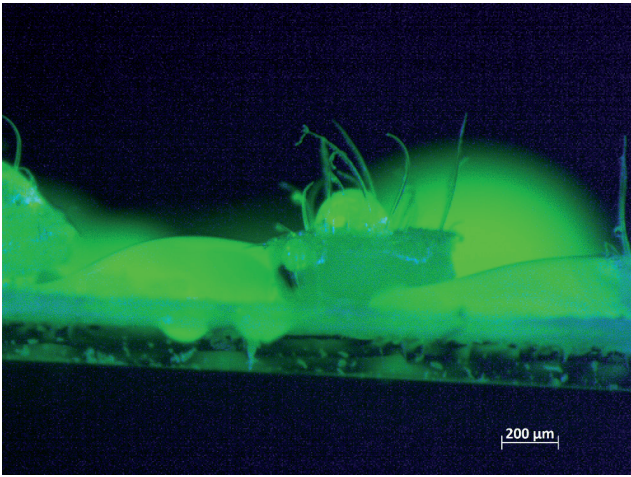
Przystosowanie mikroskopu w oparciu o zastosowane rozwiązanie pozwoliło na poprawne wyznaczenie na płaskiej powierzchni szkła i parafilmu kątów zwilżenia. Wyniki zweryfikowano z wykorzystaniem tensjometru i oprogramowania firmy KSV. Tensjometr umożliwiał wyznaczanie kątów zwilżenia i pomiar napięcia powierzchniowego w funkcji czasu. Przyjęte rozwiązanie techniczne pozwoliło na wyznaczanie kątów zwilżenia w przypadku kropli o podstawie mniejszej niż $500 \mu\text{m}$, zatem o wielkości odpowiadającej kroplom uzyskiwanym podczas rozpylania cieczy użytkowej środków ochrony roślin (Rys. 4).



Rysunek 4 Kąty przylegania kropli roztworu lignosulfonianu sodowego w stężeniu 0,1% na parafilmie

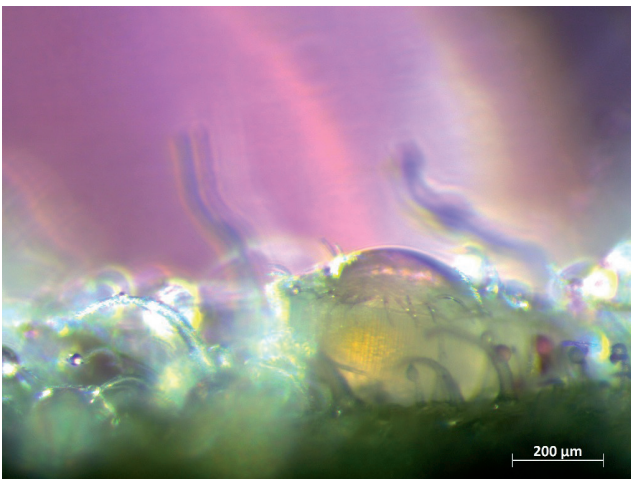
W badaniach prowadzonych na larwach i puparium mączlika szklarniowego założono, że powierzchnia części grzbietowej owada będzie stanowić oczekiwane miejsce osadzania kropli podczas opryskiwania (Rys. 5). W rozwoju postembrionalnym *T. vaporariorum* larwy w drugim i trzecim stadium oraz puparium pozbawione są odnóży i nie przemieszczają się. Larwy pierwszego stadium przemieszczają się bardzo wolno, tym samym stadium niedoskonałe tego gatunku są dobrym materiałem do badań prowadzonych przy życiu.

Mimo znacznej liczby kropli wytwarzanych podczas opryskiwania, skuteczność trafienia owada kroplą o odpowiedniej wielkości w centralną część grzbietowej partii pancerza była bardzo niska, oszacowano ją na poniżej 12% w przypadku puparium. Prawdopodobieństwo trafienia kroplą w owada było związane z wielkością stadiów niedoskonałych i rośło wraz z kolejnymi stadiami.



Rysunek 5 Puparium mączlika szklarniowego z kroplą wody dejonizowanej

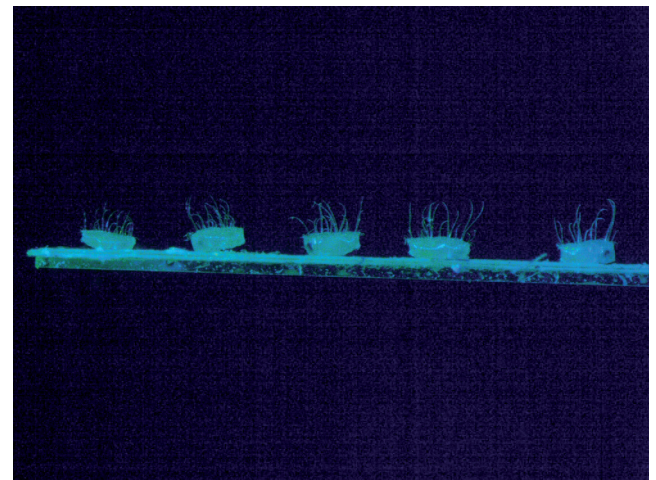
W związku z niską skutecznością trafień zrezygnowano z prowadzenia obserwacji na pojedynczych osobnikach w miejscu ich naturalnego występowania na liściu na rzecz obserwacji owadów ułożonych na taśmie adhezyjnej (Rys. 6). Próby przenoszenia larw nie dały dobrych rezultatów z powodu bardzo częstych uszkodzeń i deformacji ich ciał. Larwy mają małe rozmiary. Według Goszczyńskiego [7] średnia długość osobników wynosi w pierwszym stadium larwalnym 0,29-0,31 mm, w drugim 0,37-0,4 mm, w trzecim 0,5-0,54 mm, podczas gdy puparium 0,7-0,74 mm.



Rysunek 6 Puparium mączlika szklarniowego pozbawione wyrostków grzbietowych z kroplą roztworu lignosulfonianu sodowego w stężeniu 0,5% o napięciu powierzchniowym 58 mN/m

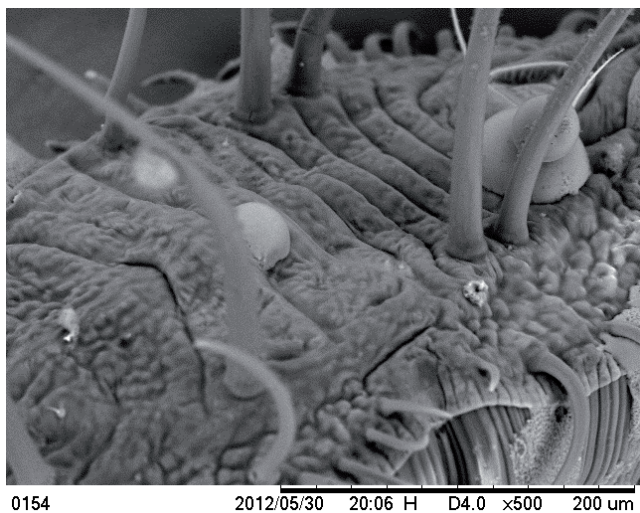
Po opryskiwaniu owadów, ustawienie obrazu i rejestrację zdjęć wykonano w większości przypadków w założonym czasie od 15 do 60 sekund. Obserwacje wskazują, że zwilżenie puparium wzrosło na skutek obniżania napięcia powierzchniowego cieczy (Rys. 5 i 6) i było największe po apli-

kacji roztworu Silwet Gold. Napięcie powierzchniowe badanych roztworów mieściło się w zakresie od 64 mN/m (lignosulfonian sodowy w stężeniu 0,1%) do 22 mN/m (Silwet Gold w stężeniu 0,014%). Wyznaczanie kątów zwilżenia na powierzchni puparium po aplikacji wody i cieczy o niższym napięciu powierzchniowym przyniosło jednak zbyt mało powtarzalne rezultaty. Zidentyfikowano źródła błędów pomiarowych, które związane są z budową morfologiczną owada. Zaliczono do nich przede wszystkim kształt puparium, który zmienia się w różnych fazach jego wzrostu i obecność woskowych wyrostków na grzbietowej powierzchni (Rys. 7). Po usunięciu wyrostków (Rys. 6) budowa i kształt powierzchni grzbietowej, a także układ tergitów, nadal utrudniały wyznaczenie prostej tworzącej podstawę kropli



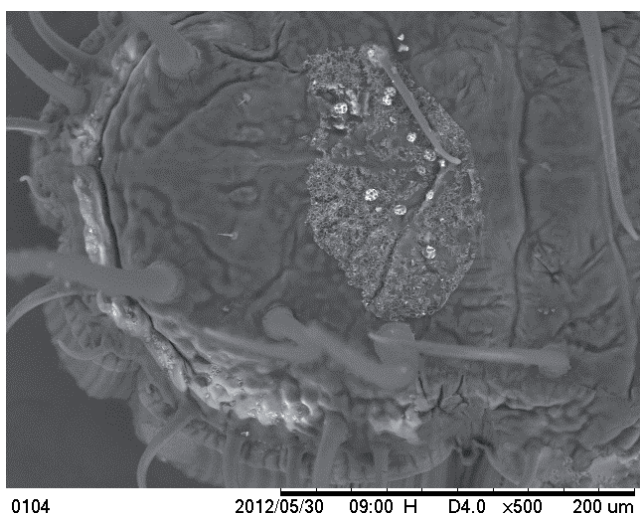
Rysunek 7 Puparia mączlika szklarniowego osadzone na brzegu taśmy adhezyjnej na szkiełku w uchwycie stolika

(Rys. 8). Z uwagi na przypadkowe miejsce osadzenia kropli podstawowym problemem był zmiennej kształt grzbietowej części pancerza puparium (Rys. 6 i 8). Jest możliwe, że metoda osadzonej kropli zastosowana do wyznaczania kątów przylegania wody do powierzchni kutikuli bezskrzydłych skoczogonków (*Collembola*) [5] mogłaby dać lepsze rezultaty. W przypadku mączlika szklarniowego konieczne jest naniesienie kropli o objętości mniejszej niż 0,4 μl. Problemy z poprawnym określeniem kątów zwilżenia związane ze strukturą układu tergitów i ich rzeźbą (Rys. 8) są przeszkodą możliwą do pokonania. Wyznaczona linia podstawy kropli mogłaby być wypadkową zagłębień i wzniesień. Już w 1936 r. [8] określono relację pomiędzy szorstkością i zwilżeniem, a w zastosowaniach materiałowych znormalizowano metody pomiarowe szorstkości powierzchni [9].



Rysunek 8 Układ i rzeźba tergity na grzbietowej powierzchni puparium mączlika szklarniowego

Reguła opisująca zwilżenie na szorstkich powierzchniach wyjaśnia, że hydrofobowość, jak i hydrofilowość powierzchni ulegają wzmocnieniu na skutek jej szorstkości. Obserwacje mikrostruktury tergity pancerza puparium *T. vaporariorum* mogą prowadzić do wniosku, że może ona zmniejszać zwilżenie ciała owada przez wodę. Podstawową rolę ochronną pełnią jednak woski kutykularne. Wyniki badań materiałowych wskazują, że jeśli zakres lokalnych zagłębień i wzniesień na powierzchni mieści się w przedziale 5-10 μm , zwilżenie wodą może wzrastać [10]. Rysunek 9 dokumentuje, że kropla wody dejonizowanej słabo zwilżała mikrozagłębienia grzbietowej części tułowia puparium. Zatem rzeźba tergity może zwiększać hydrofobowość i ułatwiać spływanie cieczy o właściwościach fizycznych podobnych do wody.

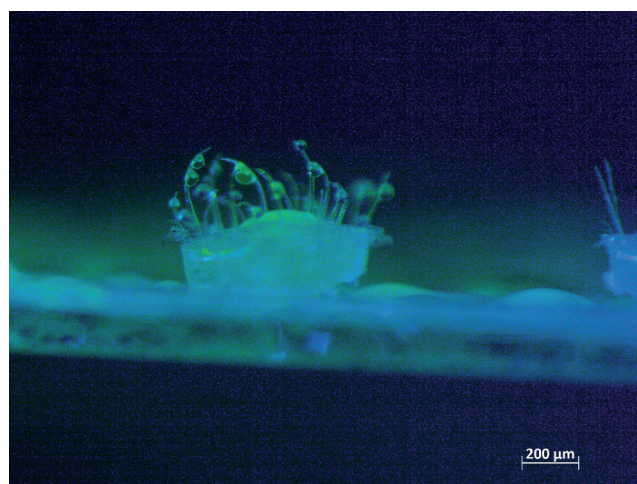


Rysunek 9 Ślad po kropli wody na puparium mączlika szklarniowego wskazuje, że mikrozagłębienia są słabo zwilżane przez wodę

W przypadku puparium i larw *T. vaporariorum* taką cieczą jest wydalina analna, która pojawia się wielokrotnie w ciągu doby na ich powierzchni grzbietowej. Znaczenie dla zwilżenia ma również nanostruktura kutykuli, która dla potrzeb oceny hydrofobowości owadów była zwykle badana na ich skrzydłach [4, 11]. Nanostruktura powierzchni *T. vaporariorum* i jej rola w ochronie owada przed zwilżeniem jest bliżej nieznaną.

Pomimo niepowodzenia w wyznaczaniu kątów zwilżenia przeprowadzone badania wykazały, że makrostruktura puparium również utrudnia efektywne zwilżenie jego korpusu przez krople cieczy podczas opryskiwania. Na uwagę zasługuje obecność wysokich wyrostków grzbietowej części pancerza puparium (Rys. 7-10). Wyrostki są wysycone woskami i mogą się na nich osadzać, jak i rozбивać krople podczas opryskiwania (Rys. 10). Mączlik szklarniowy przebywa na spodniej stronie liścia, zatem wyrostki są zwykle skierowane ku dołowi. Tym samym ryzyko spływania cieczy z wyrostków ku korpusowi jest małe. Wyrostki są wytworem kutykuli i nie pełnią funkcji metabolicznych. W związku z tym ksenobiotyki, które osadziły się na wyrostkach, nie powinny wpływać na żywotność owada. Przypuszczamy, że wskazany mechanizm może nawet wzmacniać system odporności mączlika szklarniowego w stadium puparium na środki ochrony roślin stosowane poprzez opryskiwanie.

Stolik pochylany z wbudowanym zwierciadłem płaskim okazał się również cennym narzędziem podczas wykonywania zdjęć żywych owadów i innych obiektów w różnorodnym położeniu. Z uwa-



Rysunek 10 Puparium mączlika szklarniowego z kroplami osadzonymi na wyrostkach grzbietowych i korpusie

gi na znaczenie stolika w obserwacji, dokumentacji i pomiarach, jego opracowanie przyczyniło się również do podniesienia jakości kształcenia studentów w zakresie przedmiotów związanych z ochroną roślin przed agrofagami.

4. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono przydatność wykonanego stolika pochylanego z wbudowanym zwierciadłem płaskim do obserwacji zwilżenia powierzchni przez krople o wielkościach użytecznych podczas opryskiwania roślin w praktyce ochrony roślin. Opracowany

zestaw umożliwił obserwacje i charakteryzowanie zwilżenia mączlika szklarniowego w stadiach niedoskonałych. Przyjęta metoda spontanicznego osadzania kropli podczas opryskiwania okazała się nieodpowiednia do precyzyjnego wyznaczania kątów przylegania na powierzchni grzbietowej owada.

5. FINANSOWANIE

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego nr N N310 781340 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

LITERATURA

- [1] Šikalo Š., Tropea C., Marengo M., Ganić E. N., Spreading of droplets on horizontal surfaces, *New and Renewable Technologies for Sustainable Development*. Springer US, 2002, 683-692.
- [2] Adamson A. W., *Chemia fizyczna powierzchni*. Warszawa, PWN, 1963, 1-535.
- [3] Yuan Y., Lee T. R., Contact angle and wetting properties, *Surface science techniques*. Berlin, Heidelberg, Springer, 2013, 3-34.
- [4] Nguyen S. H., Webb H. K., Mahon P. J., Crawford R. J., Ivanova E. P., Natural insect and plant micro-/nanostructured surfaces: an excellent selection of valuable templates with superhydrophobic and self-cleaning properties. *Molecules*, 19, 2014, 9, 13614-13630.
- [5] Gundersen H., Leinaas H. P., Thaulow C., Surface structure and wetting characteristics of Collembola cuticles. *PloS One*, 9, 2014, 2, e86783, doi:10.1371/journal.pone.0086783.
- [6] Sobiech L., Idziak R., Woznica Z., Skrzypczak G., Effect of various adjuvants on physicochemical properties and control efficiency of herbicides. *Przemysł Chemiczny*, 93, 2014, 6, 945-947.
- [7] Goszczyński W., *Biologiczne podstawy integrowanego zwalczania mączlika szklarniowego (Trialeurodes vaporariorum Westw.)*. Warszawa, SGGW-AR, 1998, 1-124.
- [8] Wenzel R. N., Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial & Engineering Chemistry*, 28, 1936, 8, 988-994.
- [9] ISO 25178-6 *Specyfikacje geometrii wyrobów (GPS) – Struktura geometryczna powierzchni*, 2011.
- [10] Kubiak K. J., Wilson M. C. T., Mathia T. G., Carval P., Wettability versus roughness of engineering surfaces. *Wear*, 271, 2011, 3, 523-528.
- [11] Sun M., Watson G. S., Zheng Y., Watson J. A., Liang A., Wetting properties on nanostructured surfaces of cicada wings. *Journal of Experimental Biology*, 212, 2009, 19, 3148-3155.