

УДК 595.772.59082

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДИКИ ИЗУЧЕНИЯ СТРОЕНИЯ ГЕНИТАЛЬНОГО АППАРАТА СЛЕПНЕЙ (DIPTERA: TABANIDAE)

© 2020 г. В. В. Агасой ^{a, *}

^a Псковский государственный университет,
пл. Ленина д. 2, г. Псков, 180000, Россия
* e-mail: veraagaso1@ Rambler.ru

Поступила в редакцию 03.10.2019 г.

После доработки 20.01.2020 г.

Принята к публикации 20.01.2020 г.

В модификации методики препарирования и хранения генитального аппарата слепней предлагается для размягчения мышц и связок гениталий, наряду с КОН, использовать 70 % спирт, а для тотальных препаратов – монтирующую среду Cytoseal™ 60 (USA) вместо канадского бальзама.

Ключевые слова: слепни, техника приготовления, генитальный аппарат, биологические коллекции, идентификация вида

DOI: 10.31857/S123456780601006X

Особенности строения генитального аппарата используются для уточнения видовой диагностики в различных семействах двукрылых. При этом, если при определении видовой принадлежности представителей семейства Tabanidae, для самок используют строение их терминалий (Виолович, 1968; Олсуфьев, 1977; Lyneborg, 1961; Trojan, 1979), то изучение морфологии гениталий самцов слепней, для этих же целей, пока не нашло широкого применения. В частности, особенности строения генитального аппарата самцов как один из систематических признаков был использован Олсуфьевым (1977) лишь для незначительного числа видов слепней. Кроме этого, сведения об изучении строения мускулатуры генитального аппарата самцов и его отдельных элементов встречаются в крайне незначительном количестве работ (Овчинникова, 1989; Trojan, 1979; McAlpine, 1981; Sinclair, 2000) на протяжении последних 30–40 лет.

В связи с вышеизложенным, нами в 2011 г. были начаты комплексные исследования по изучению фауны, биологии и экологии слепней, которые охватывают все основные районы Псковской области (Агасой и др., 2019).

В ходе работы определения видовой принадлежности слепней проводились по традиционной методике, включающей в себя анализ внешних морфологических признаков (лобной полоски, нижней и средней лобной мозолей, концевого членика щупика, усиков, нотоплевров, тергитов). Однако использование в качестве критерия только внешних

морфологических признаков не всегда позволяет точно идентифицировать видовую принадлежность насекомого. В связи с этим, для уточнения видовой принадлежности обычно используют особенности строения генитального аппарата слепней. У самок учитывают форму гонопофиза (8-го стернита брюшка), церок и сперматек, а у самцов – церок, эпандрия, гипандрия и 8-го тергита (Штакельберг, Тертерян, 1953; Шевченко, 1960; Олсуфьев, 1962; Mackerras, 1954; Lyneborg, 1961; Trojan, 1979).

При исследовании генитального аппарата согласно методике Олсуфьева (1962), у свежеемерщвленных экземпляров самок, ещё не успевших подсохнуть, пальцами сдавливают брюшко в дорсовентральном направлении, вследствие чего его кончик выдвигается наружу и становится видимым 8-й стернит и церки. В таком положении самок слепней подсушивают и затем от вытянутого кончика брюшка отрезают ножницами 1/3 от концевой части. Отрезанную часть кипятят в течение 2–3 мин в 1 % растворе КОН (гидроксид калия), отмывают дистиллированной водой и далее препарируют на часовом стекле под стереомикроскопом или бинокулярной лупой (Скуфьин, 1973).

При изучении генитального аппарата самцов методика, используемая для самок, является не очень удобной. Это связано с тем, что строение этого отдела у самцов существенно сложнее, чем у самок, т.к. он состоит из большого числа отдельных элементов и сложного мышечно-связочного аппарата (Овчинникова, 1989). Поэтому сдавливание пальцами брюшка в дорсовентральном направлении приводит к значительному смещению отдельных частей генитальной области, что затрудняет их дальнейшее препарирование. При изучении сложно устроенного мышечного и связочного аппаратов зачастую возникают повреждения отдельных частей генитального аппарата при их разделении. Поэтому, для более успешного препарирования, желательнее как можно сильнее размягчить связки и мышцы. Для этого, по общепринятой методике, заднюю часть брюшка в течение 2–3 мин вываривают в 1 % растворе КОН. В процессе такой обработки, как у самцов так у самок, зачастую, происходит потеря окраски генитальных сегментов. Это может затруднить снятие морфометрических показателей для видовой диагностики из-за малой контрастности контуров этих сегментов. Особенно сильно указанный недостаток проявляется при работе с постоянными препаратами терминалий обработанных традиционным методом при вываривании их в КОН.

Отпрепарированные части генитального аппарата традиционно хранят в микропробирках с глицерином. Кроме того, с целью сохранения гениталий на длительный срок предлагают изготавливать тотальные препараты путем их заключения в канадский бальзам (Олсуфьев, 1962).

Цель статьи – модификация методики препарирования генитальных структур слепней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Для устранения вышеописанных недостатков традиционные методики нами были модифицированы. При сборе материала большого объема часть особей, с целью сохранения, сразу после отлова фиксировались в 70 % спирте. Эти слепни в дальнейшем препарировались без выдерживания в КОН. В ходе препарирования оказалось, что их мышцы и связки размягчаются значительно лучше, чем при вываривании в КОН, что существенно облегчало последующее разделение частей генитального аппарата. Кроме того, выдерживание в спирте не изменяло окраски отпрепарированного материала.

С целью подбора оптимальной методики препарирования генитального препарата замороженных или свежесушенными (не более одного года) слепней их терминалии, первоначально, без предварительного выдерживания в спирте, сразу помещали в термостат в 1%-й раствор КОН при температуре 25–30 °С, где выдерживали в течение суток. Последующее препарирование обработанных таким образом частей генитального аппарата показало, что мышцы и связки достаточно хорошо размягчаются, однако мембраны, связывающие тергиты между собой, размягчаются значительно хуже, что при разделении тергитов зачастую приводит к повреждению последних.

Поэтому свежесушенных (до одного года) или замороженных слепней, предварительно, с целью размягчения покровов, накалывали на полипропиленовые пластинки или пенопласт и помещали на 2–3 ч в эксикатор, заполненный горячей водой. После этого от слепней отрезали ножницами 1/3 концевой части брюшка, помещали её в пробирку (объемом 12 мл), на 1/6 заполненную 70%-м спиртом. Через 10–12 ч эту часть брюшка вынимали из пробирки и препарировали на часовом стекле в 70 % спирте с использованием микроскопа МБС-9. У самцов, помимо церок с эпандрием, 8-го тергита, а также гипандрия, аккуратно отделяли 7-й тергит и 8-й стернит. В этом случае наряду с мышцами и связками достаточно хорошо размягчались и мембраны, что снижало вероятность повреждения тергитов при их разделении.

Для препарирования генитального аппарата слепней, хранящихся в сухом виде более одного года, вышеописанная методика не подходит, так как их связки, мышцы и мембраны трудно размягчаются, что затрудняет разделение частей аппарата. С целью исключения повреждения препаримуемых частей генитального аппарата за счет лучшего размягчения мышц, связок и мембран, вначале сухие экземпляры слепней помещали на 2–3 ч в эксикатор, заполненный горячей водой. Затем от брюшка слепней отрезали ножницами 1/3 от концевой части и переносили в пробирку с 70%-м спиртом на сутки, после чего спирт заменяли на 1%-й раствор КОН. Пробирку с материалом не кипятили, согласно методике Олсуфьева (1962), а помещали в термостат с температурой 25–30 °С на сутки. Через сутки пробирку вынимали из термостата и приступали к препарированию. В результате подобной обработки препарирование существенно облегчается, что позволяет отделить части генитального аппарата без повреждений.

Для изготовления тотальных препаратов генитального аппарата слепней и ротового аппарата их личинок нами впервые была опробована монтирующая среда Cytoseal™ 60 (USA), которая широко применяется в настоящее время при подготовке гистологических препаратов, постоянных препаратов мелких насекомых и других членистоногих (Espinasa et al., 2015; Long, 2018). Эта прозрачная бесцветная жидкость, вязкость которой легко регулировать ксилолом. Она не меняет свой цвет с течением времени, а содержащиеся в ней антиоксиданты препятствуют выцветанию препарата. Положительные качества среды – она быстро растекается, что практически исключает образование пузырьков, и быстро затвердевает (в течение 20–30 мин).

Перед изготовлением постоянного препарата предметные и покровные стекла, с целью обезжиривания, заранее помещали в смесь раствора спирта с эфиром в соотношении 1:1. В процессе приготовления препарата на обезжиренное предметное стекло наносили небольшую каплю монтирующей среды Cytoseal™ 60 (USA) и тонким слоем распределяли ее на небольшом участке стекла. Затем на этом участке в необходимом порядке раскладывали отдельные части полового аппарата, предварительно выдержанные в 100 % спирте для удаления остатков воды. Стекла с терминалиями выдерживали в течение 20–30 мин, в результате чего объекты, размещенные на тонком слое монтирующей среды, приклеивались к стеклу, что в дальнейшем исключало их

смещение. После этого, на подготовленные таким образом части генитального аппарата повторно наносили необходимое количество монтирующей среды, целиком покрывающей их. Таким образом, объемные элементы аппарата сохраняли свою форму и размеры, что крайне важно для дальнейшего их анализа. Через 20–30 минут, после затвердевания смолы на нее наносили необходимое количество монтирующей среды и покрывали всё покровным стеклом. Изготовленному препарату присваивали код, который указывали на этикетке под сухим экземпляром слепня, а также делали видовую и географическую этикетки.

Приготовленные таким образом препараты, в ходе изучения генитального аппарата слепней, можно многократно использовать без опасения их повреждения. Кроме того, прозрачность монтирующей среды позволяет производить качественную съемку препаратов (рис. 1–4) и использовать полученные снимки в дальнейшей работе.

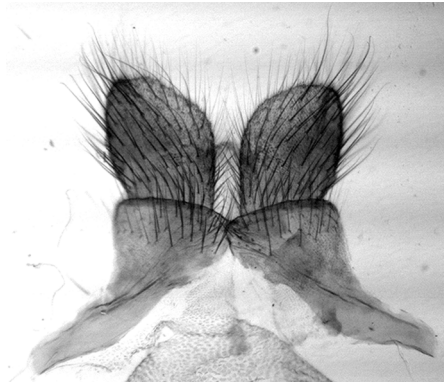


Рисунок 1. Церки и эпандрии самца *Hybomitra muehlfeldi* (Brauer, 1880).

Figure 1. Cercus and epandrium male *Hybomitra muehlfeldi* (Brauer, 1880).

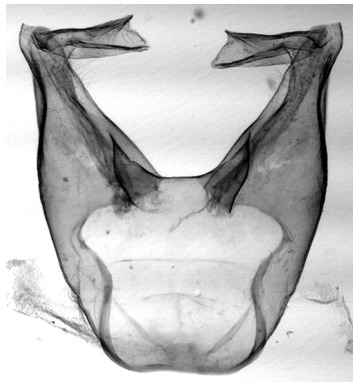


Рисунок 2. Гипандрий самца *Hybomitra muehlfeldi* (Brauer, 1880).

Figure 2. Hypandrium male *Hybomitra muehlfeldi* (Brauer, 1880).

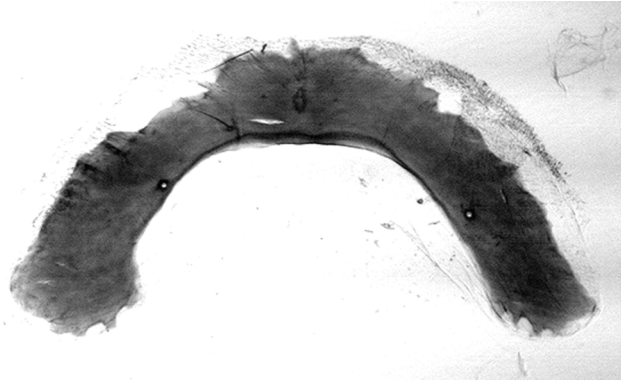


Рисунок 3. 8-й тергит самца *Hybomitra muehlfeldi* (Brauer, 1880).
Figure 3. 8th tergite of male *Hybomitra muehlfeldi* (Brauer, 1880).

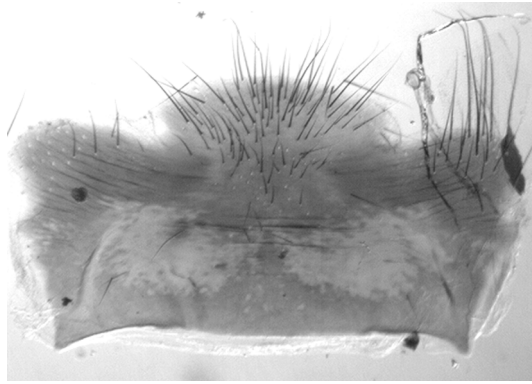


Рисунок 4. 7-й тергит самца *Hybomitra ciureai* (Seguy, 1937).
Figure 4. 7th tergite of male *Hybomitra ciureai* (Seguy, 1937).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью хранения генитального аппарата слепней для последующего их анализа традиционно используют несколько методик (табл. 1). В частности части генитального аппарата хранят в глицерине в микропробирках. Такой способ хранения позволяет извлекать эти фрагменты для их изучения. В силу малых размерах пробирок и собственно элементов генитального аппарата при многократном и извлечении и помещении в нее высока опасность их повреждения. Поэтому с целью длительного хранения элементы генитального аппарата слепней заключают в канадский бальзам. Кроме того, при изготовлении тотальных препаратов наземных членистоногих, в том числе и двукрылых, в качестве монтирующих сред используют синтетическую смолу Euparal (Крупницкий, 2016) и жидкость Фора – Берлезе (Нестерова, 2008). Однако использование канадского бальзама, Euparal и жидкости Фора – Берлезе в качестве монтирующих сред при исследовании генитального аппарата слепней имеет ряд недостатков (табл. 2), поэтому мы предлагаем для приготовления тотальных препаратов терминалий слепней и ротовых аппаратов их личинок, в качестве альтернативы, использовать монтирующую среду Cytoseal™ 60 (USA).

Таблица 1. Сравнение традиционной и предлагаемой методик препарирования генитального аппарата слепней
Table 1. Comparison of traditional and proposed methods of preparation of the genital apparatus of horseflies

Особенности методики	Традиционная методика (Олсуфьев, 1962)	Предлагаемая методика		
		для свежемороженого и свежесушенного материала (хранение до 1 года)		для сухого материала (хранение более 1 года)
Время нахождения в эксикаторе	Не применяется	Не применяется	2–3 ч	2–3 ч
Время экспозиции в спирте	Не применяется	Не применяется	10–12 ч в 70 %-м спирте	24 ч в 70 %-м спирте
Время экспозиции в щелочи	Кипячение 2–3 мин	24 ч в термостате при 25–30 °С	Не применяется	24 ч в термостате при 25–30 °С
Изменение окраски терминалий	Отмечается обесцвечивание	Не наблюдается	Не наблюдается	Не наблюдается
Отделение мышц	Без затруднений	Без затруднений	Без затруднений	Без затруднений
Отделение связок и мембран	Затруднено, можно повредить терминалии при их разделении из-за уплотненных связок и мембран	Затруднено, можно повредить терминалии при их разделении из-за уплотненных связок и мембран	Без затруднений, связки и мембраны легко отделяются	Без затруднений, связки и мембраны легко отделяются

Таблица 2. Сравнительная характеристика монтирующих смол
Table 2. Comparative characteristics of the resins of the installer

Канадский бальзам	Cytoseal™ 60 (USA)	Euparal	Жидкость Фора – Берлезе
Медленно сохнет (не менее суток); темнеет с течением времени; показатель преломления 1.5447 (показатель преломления покровного стекла 1.505); очень дорого стоит	Быстро сохнет (20–30 мин); прозрачный; не меняет окраску препарата с течением времени; показатель преломления 1.495+0.005; имеет доступную цену	Длительное высыхание препарата (в течение месяца); показатель преломления 1.483; мало доступен в России	Время приготовления раствора 2–3 дня; длительное время сушки препарата (2–3 недели); необходимость окантовки лаком для предотвращения высыхания тотального препарата

Предлагаемая методика была нами опробована не только для препарирования и приготовления тотального препарата терминалий имаго слепней, но и для частей ротового аппарата их личинок (рис. 5, 6).

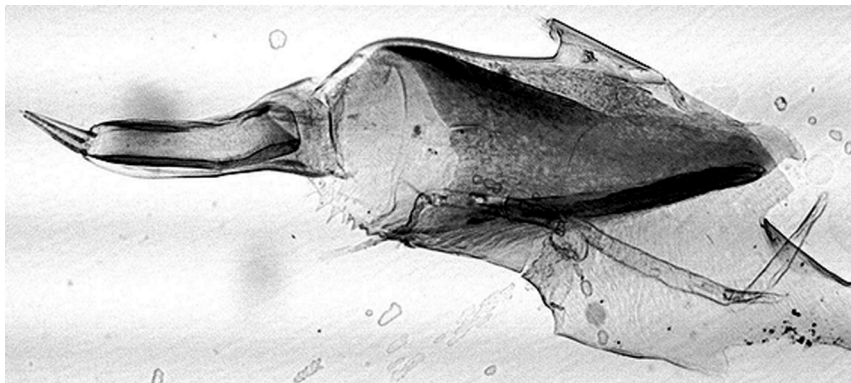


Рисунок 5. Усик личинки *Hybomitra lundbecki lundbecki* (Lyneborg, 1960).
Figure 5. Antennae of the larva *Hybomitra lundbecki lundbecki* (Lyneborg, 1960).

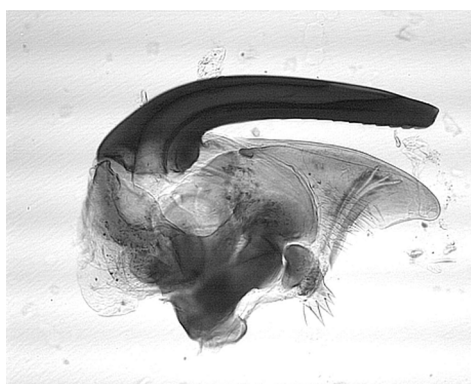


Рисунок 6. Мандибула и максилла личинки *Hybomitra lundbecki lundbecki* (Lyneborg, 1960).
Figure 6. Mandibula and maxilla of the larva *Hybomitra lundbecki lundbecki* (Lyneborg, 1960).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Агасой В.В., Прокофьев В.В., Медведев С.Г. 2019. Биологические особенности слепней (Diptera, Tabanidae) и ландшафтное зонирование Псковской области. *Паразитология* 53 (5): 379–398.
- Виолович Н.А. 1968. Слепни Сибири. Новосибирск, Наука, 281 с.
- Крупницкий А.В. 2016. Филогенетические связи и систематика палеарктических представителей рода *Callophrys* Billberg, 1820 (Lepidoptera, Lycaenidae). Дис. ... канд. биол. наук. М., 250 с.
- Нестерова О.Л. 2008. Методика изготовления тотальных микроскопических препаратов насекомых и клещей в жидкости Форэ – Берлезе и использование многомерного дискриминантного анализа морфометрических данных в диагностике таксономической принадлежности трудноразличимых видов животных. Учебно-методическое пособие. Минск, БГУ, 18 с.
- Овчинникова О.Г. 1989. Мускулатура гениталий самцов двукрылых Brachycera – Orthorrhapha (Diptera). Ленинград, ЗИН АН СССР, 167 с.

- Олсуфьев Н.Г. 1962. О диагностическом значении строения гениталий самок в группе *Tabanus* (*Tylostipia*) *tropicus* Pz. (Diptera, Tabanidae). В сб.: Вопросы общей зоологии и медицинской паразитологии. М., 524–529.
- Олсуфьев Н.Г. 1977. Слепни. Сем. Tabanidae. В кн.: Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Л., Наука, т. 7, вып. 2., 208–210.
- Штакельберг А.А., Тергерян А.Е. 1953. О морфологическом строении придатков полового аппарата самок слепней (Diptera, Tabanidae). ДАН Армянской ССР 16 (2): 53–64.
- Скуфьин К.В. 1973. Методы сбора и изучения слепней. Ленинград, Наука, 102 с.
- Шевченко В.В. 1960. О таксономическом значении особенностей строения гениталий некоторых палеарктических видов слепней подсемейства Chrysopsinae (Diptera, Tabanidae). Труды Института зоологии Академии Наук КазССР 2: 157–172.
- Espinosa L., Bartolo N.D., Sloat S. 2015. A new epigean species of the genus *Anelpistina* (Insecta: Zygentoma: Nicoletiidea) from Sierra de El Abra, Taninul, Mexico. European Journal of Taxonomy 156: 1–7.
- Long S. M. 2018. A novel protocol for generating intact, whole-head spider cephalothorax tissue sections. Bio Techniques 64: 163–164.
- Lyneborg L. 1961. On *Tabanus tropicus* and other Linnean species of Palearctic Tabanidae (Diptera). Entomologiske Meddelelser 31: 97–103.
- Mackerras I. 1954. The classification and distribution of Tabanidae (Diptera). 1. General review. Austral. Journal of Zoology 2 (3): 431–454.
- McAlpine J.F. 1981. Morphology and terminology. adults. In: McAlpine J.F., Petersen B.V., Shewell, G.E., Teskey H.J., Vockeroth J.R., Wood D. M. (eds.). Manual of Nearctic Diptera, Agriculture Canada, Research Branch, Vol. 1, 9–63.
- Sinclair B.J. 2000. Morphology and terminology of adult of Diptera male genitalia. In: Papp L. and Darvas B. Manual of Palaearctic Diptera. Vol. 1. 53–47.
- Trojan P. 1979. Tabanidae Slepaki (Insecta: Diptera). Warszawa, Polska Akademia Nauk, Instytut Zoologii, 308 p.

MODIFIED TECHNIQUE TO STUDY THE GENITAL APPARATUS STRUCTURE OF HORSEFLIES (DIPTERA, TABANIDAE)

V. V. Agaso

Keywords: horseflies, methods of study of the genital apparatus by preparation and manufacture of total preparations

SUMMARY

The technique of preparation and storage of the genital apparatus of horseflies is developed. It is proposed to use 70 % alcohol along with the KOH (potassium hydroxide) to enforce softening of the muscles and ligaments of the genital structures. For the total preparations of the genital structures it is proposed to use CytosealTM 60 (USA) as the mounting medium instead of Canadian balm.