

УДК 595.773.4 : 591.16

© Е. Б. Виноградова

СПОСОБЫ ВРЕМЕННОГО ХРАНЕНИЯ КУЛЬТУРЫ СИНЕЙ МЯСНОЙ МУХИ *CALLIPHORA VICINA* R.-D. (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)

[E. B. VINOGRADOVA. METHODS OF TEMPORARY STORAGE OF THE BLOW FLY *CALLIPHORA VICINA* R.-D. (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) CULTURE]

Синяя мясная муха *Calliphora vicina* давно зарекомендовала себя перспективным модельным объектом для широкого спектра исследований. Этому способствовали простота культивирования, крупные размеры и наличие детального описания внутреннего и внешнего строения всех стадий ее развития (Lowne, 1890—1895). Каллифора давно нашла применение в практике физиологических исследований всех систем органов насекомых, и особенно в области эндокринологии, органов чувств, физиологии и энергетики полета (Виноградова, 1984). Недавно были обнаружены целительные свойства личинок этой мухи. Из них выделены биологически активные пептиды, названные аллоферонами, которые повышают антивирусный иммунитет человека, на их основе уже создан препарат «Аллоидин» для лечения герпеса и папиллом (Черныш, 2006). Каллифора широко распространена по всей Голарктике и является обязательным компонентом комплекса синантропных двукрылых в умеренной и субтропической зонах. Ее сезонно-циклические адаптации, имагинальная (репродуктивная) и личиночная диапаузы и их фототермический контроль хорошо изучены (Виноградова, 1984, 1991). Репродуктивная диапауза свойственна всем 20 изученным популяциям из разных частей ареала от 69° до 38° с. ш. и от 10° до 85° в. д. Главная роль в индукции диапаузы принадлежит температуре, а фотопериодизм имеет второстепенное значение. Однако фотопериодизм участвует в формировании материнского влияния — короткий день, опосредованный материнским организмом, детерминирует в потомстве повышенную склонность к личиночной диапаузе, а длинный — к бездиапаузному развитию. Материнское влияние реализуется в пределах определенных температур (ниже 14°), при которых развиваются личинки. Кроме экологических факторов, в формировании диапаузы участвуют и факторы внутреннего порядка, возраст самки (Nesin et al., 1995) и эндогенные процессы в цепочке поколений мух, развивающихся в константных условиях (Vinogradova, Reznik, 1999, 2002).

Широкое использование каллифоры как лабораторного объекта делает актуальным вопрос о временной консервации культуры в случае необходимости. В настоящей статье рассматриваются способы хранения культуры *Calliphora vicina* на разных стадиях развития.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В настоящей работе использованы экспериментальные данные, полученные в 2007—2008 гг. и ранее. Всего исследованы культуры каллифоры, происходившие из 21 пункта в разных частях ее ареала. Хотя методика разведения этой мухи описана давно (Зиновьева, Виноградова, 1972), детализируются некоторые параметры, связанные с временным хранением культуры. Для получения диапаузирующих имаго только что отродившихся особей сначала 5 дней содержали при 12-часовом освещении и 20° и кормили углеводами (сахар), необходимыми для формирования резервных питательных веществ, а потом переводили в холодильник (6° и темнота). О физиологическом состоянии самок судили путем периодического вскрытия 25—40 особей; диапаузирующими считались самки с фолликулами на I стадии развития.

Диапаузирующих личинок получали от мух, содержащихся в условиях короткого дня (12 ч света) и 20°. Мухи охотно откладывали яйца на рыбу, печень и тому подобное на влажной фильтровальной бумаге. Групповые яйцекладки, отложенные в течение 5—6 ч, помещали в условиях короткого дня при 12° до отрождения и сразу после отрождения личинок переносили в низкую температуру 6 или 2—3°, так как даже кратковременное пребывание их при 12°, и особенно при 20°, могло существенно снизить долю диапаузирующих личинок. При низкой температуре личинки развивались до диапаузирующей стадии. В течение первых 1—1.5 месяцев личинки по мере необходимости подкармливались белковым субстратом (рыба, мясо, печень и т. п.). В качестве субстрата для содержания личинок использовали слегка увлажненные опилки. Слишком влажные опилки, получавшиеся вследствие питания личинок и разложения субстрата, создавали иногда неблагоприятные условия, и личинки стремились выползти из контейнера, эта ситуация разрешалась добавлением сухих опилок. После окончания питания и опустошения кишечника личинок переносили в чистые опилки, в которых они хранились и по мере подсыхания периодически увлажнялись. В качестве контейнеров для содержания личинок использовали 0.5- или 1-литровую банку, закрытую сверху плотной тканью. Для получения большого количества диапаузирующих личинок можно использовать контейнеры большей емкости.

Для изучения динамики холодовой реактивации диапаузирующих личинок каллифоры выборки личинок (4—5 выборок по 100 личинок) из 2—3° в разные сроки перемещали в условия 12° и темноты, где ежедневно подсчитывали число пупарииев.

Для времени пупаризации статистическая обработка включала определение медианы, нижнего и верхнего квартилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальные данные о сезонных адаптациях каллифоры предполагают возможность реализации трех способов сохранения (временной консервации) культуры этой мухи, при этом каждый из способов имеет свои преимущества и недостатки. Рассмотрим их детально.

ХРАНЕНИЕ МАТЕРИАЛА В ВИДЕ ДИАПАУЗИРУЮЩИХ САМОК

В индукции репродуктивной диапаузы каллифоры главная роль принадлежит температуре, тогда как фотопериод имеет меньшее влияние. Понижение температуры от 20 до 12 и 6° значительно увеличивает фракцию диапаузирующих особей. Например, у каллифоры из Мурманска и Санкт-Петербурга при 12-часовом освещении и 12° на 20—30-й дни после отрождения диапаузируют около 60 % самок, у которых к 50—70-му дню диапауза уже прекращается вследствие прошедшей спонтанной реактивации (Виноградова, 1988). Выраженность диапаузы в этих условиях изменяется у разных географических форм каллифоры и в разных поколениях непрерывно развивающейся культуры в результате проходящих в них эндогенных процессов (Виноградова, 1991; Vinogradova, Reznik, 1999, 2002). Культуры каллифоры разного географического происхождения отличают-

Таблица 1

Изменение фракции диапаузирующих самок каллифоры (%) в условиях 6° и темноты [по материалам Виноградовой (1989, 1997)]

Пункты, координаты	Дни					
	30	60	90	120	150	180
Мурманск, Россия, 69° с. ш., 39° в. д.	95	95	90	90	51	45
Санкт-Петербург, Россия, 60° с. ш., 30° в. д.	97	70	44	19	7	—
Москва, Россия, 56° с. ш., 38° в. д.	100	100	54	18	2	—
Днепропетровск, Украина, 48° с. ш., 36° в. д.	100	100	57	43	—	—
Ялта, Украина, 44° с. ш., 34° в. д.	100	47	35	8	—	—
Сухуми, Грузия, 43° с. ш., 41° в. д.	100	100	44	42	2	—
Актиоз, Таджикистан, 43° с. ш., 76° в. д.	100	48	35	23	10	0
Шафиркан, Узбекистан, 40° с. ш., 64° в. д.	98	81	56	40	—	—
Душанбе, Таджикистан, 39° с. ш., 69° в. д.	—	44	9	4	—	—
Ашхабад, Туркмения, 38° с. ш., 58° в. д.	100	100	100	95	95	56

ся размахом и общим уровнем изменчивости доли диапаузирующих самок. Например, у каллифоры из Санкт-Петербурга, Москвы, Днепропетровска и Ашхабада в 4-м поколении на 30-й день диапаузирующие самки составляли 35, 4, 16 и 4 %, а в 5-м — 55, 10, 12 и 10 % соответственно. У каллифоры из Санкт-Петербурга и Ашхабада фракция диапаузирующих особей на протяжении 9—11-го последовательных поколений варьировала от 0 до 56 %, у остальных форм размах изменчивости был меньше, от 0 до 16 %. Температура 6° на фоне темноты индуцировала диапаузу уже у всех мух. Данные для 10 географических форм представлены в табл. 1. Все мухи в возрасте 30 дней диапаутировали, в дальнейшем их спонтанная реактивация осуществлялась разными темпами. Для выхода из состояния диапаузы им было необходимо от 2 до 6 месяцев. Относительно прочная диапауза наблюдалась не только у форм из северной и средней (Мурманск, Санкт-Петербург, Москва), но и из более южных (Ашхабад, Сухуми) частей ареала. Таким образом, прямой связи между прочностью репродуктивной диапаузы и географическим происхождением культуры не отмечено.

В отличие от других видов мух у каллифоры репродуктивная диапауза не сопровождается существенной гипертрофией жирового тела. При 6° от 22 до 82 % особей имеют 1-ю, начальную, стадию ожирения, поэтому для обеспечения жизнедеятельности они нуждаются в систематическом углеводном и белковом питании. Как показывают вскрытия, все мухи питаются углеводами, а 21—65 % еще и белками. В результате длительного пребывания мух при пониженной температуре часть их реагирует, а другая — погибает. Определенный интерес представляет возможность развития яиц у части реактивированных самок даже при такой низкой температуре, как 6°.

Реактивацию диапаузирующих мух в любой момент можно индуцировать повышением температуры. Так, после перемещения диапаузирующих мух из 6° в условия 12-часового освещения и 12° диапауза у всех мух прекращается в течение 30 дней, а в условиях 20° — через 10—17 дней (Виноградова, 1989).

Таким образом, культуру каллифоры можно сохранять в виде диапаузирующих самок при 6° и темноте в течение 2—3 месяцев, а некоторые ее фор-

мы и до 5—6 месяцев. Мух в течение первых 5 дней жизни следует держать при 12-часовом освещении и 12° на углеводном питании для накопления минимальных резервных запасов. В дальнейшем для пополнения резервов каждые 20 дней мух следует доставать из холодильника и подкармливать 3—4 ч при 20° белками и углеводами. Перевод культуры в активное состояние достигается повышением температуры содержания мух до 20°.

ХРАНЕНИЕ МАТЕРИАЛА В ВИДЕ РЕПРОДУКТИВНО АКТИВНЫХ САМОК

Экспериментально показано, что яйцекладущие самки не способны к резорбции яиц и переходу в неактивное состояние под воздействием соответствующих фототермических условий (Виноградова, 1989). Если мух, начавших яйцекладку при 20 или 12°, перевести в условия низкой температуры (6°), они не прекращают питание и могут продолжать периодически откладывать яйца на протяжении 46—80 дней. Такой способ хранения живого материала является более краткосрочным, но зато позволяет в случае необходимости быстро восстановить культуру, так как такие мухи начинают откладывать яйца спустя 2—3 дня после перевода их в условия длинного дня на фоне 20—23°.

ХРАНЕНИЕ МАТЕРИАЛА В ВИДЕ ДИАПАУЗИРУЮЩИХ ЛИЧИНОК

Установлено, что в контроле личиночной диапаузы каллифоры участвует материнский организм, а главным фактором, регулирующим материнское влияние, выступает фотопериодизм. Например, у каллифоры из Беломорска доля личинок, находящихся в состоянии диапаузы при 12-часовом освещении и 12°, на 45-й день после отрождения уменьшается адекватно сокращению длины дня, действующей на самок, и составляет 100, 82, 19 и 4 % при длине фотофазы, равной 12, 16, 17 и 20 ч (Виноградова, 1991). Для получения максимального количества диапаузирующих личинок мух-родителей следует содержать в условиях короткого дня, причем его длина будет различаться в зависимости от географического происхождения материала и может быть предварительно установлена экспериментальным путем. В большинстве случаев для этого используют 12-часовое освещение. Следует отметить, что фотопериодизм, опосредованный материнским организмом, определяет не только долю диапаузирующих личинок, но и свойства самой диапаузы, более короткие фотопериоды индуцируют более прочную диапаузу (Saunders, 1987; Виноградова, 1991).

У каллифоры часть личинок от короткодневных мух диапаузирует уже при 12°, но более эффективными температурами для индукции диапаузы являются 5—6° и даже 2—4°, совсем близкие к порогу развития (Виноградова, 1991). Фотопериодизм в этом случае уже не имеет значения, личинок можно держать в темноте. Продолжительность хранения материала в виде диапаузирующих личинок определяется сроками их пупариации в результате спонтанной реактивации при данной температуре. Данные о пупариации личинок, развивавшихся при 6 и 12°, приведены в табл. 2. Они представлены в виде медианы, т. е. времени (в днях), необходимом для пупариации 50 % особей. Разные географические формы различаются по этому параметру. Из 13 приведенных форм только две самые южные (Ашхабад и Кульяб) имеют медиану 40—50 дней, у трех других (Рыбачий, Москва, Ялта) она составляет 80—99 дней, а у остальных колеблется от 111 до 190 дней. Вторая половина личинок прекращает диапаузу еще позже и может храниться более 6 месяцев. Именно последних из

Таблица 2
Медианы, отражающие пупариацию личинок *Calliphora vicina*,
развивавшихся в разных фототермических условиях
[по материалам Виноградовой (1991)]

Пункты, координаты	Медиана, дни	
	12 ч, 12°	темнота, 6°
Санкт-Петербург, Россия, 60° с. ш., 30° в. д.	100	190
Рыбачий, Россия, 56° с. ш., 20° в. д.	69	90
Москва, Россия, 56° с. ш., 38° в. д.	77	80
Белая Церковь, Украина, 50° с. ш., 30° в. д.	110	149
Днепропетровск, Украина, 48° с. ш., 36° в. д.	52	111
Ялта, Украина, 44° с. ш., 34° в. д.	22	99
Сухуми, Грузия, 43° с. ш., 41° в. д.	100	163
Актюб, Казахстан, 43° с. ш., 77° в. д.	99	190
Баку, Азербайджан, 40° с. ш., 50° в. д.	20	131
Ереван, Армения, 40° с. ш., 45° в. д.	20	120
Кондара, Таджикистан, 39° с. ш., 69° в. д.	40	135
Ашхабад, Туркмения, 38° с. ш., 58° в. д.	18	50
Куляб, Таджикистан, 38° с. ш., 70° в. д.	16	40

упомянутых форм наиболее целесообразно хранить в виде диапаузирующих личинок.

Выращивание диапаузирующих личинок можно проводить и при более низкой температуре — 2—3°. В этом случае время их питания и развития до диапаузирующей стадии увеличивается примерно до 30 дней, но зато заметно увеличиваются и сроки их хранения, до 8—9 и даже 12 месяцев. Конечно, это зависит от географического происхождения материала. В конце этого периода могут появляться единичные пупарии, но массовой пупариации, как правило, не наблюдается, так как эта температура слишком низка для морфогенеза.

Перевод культуры из неактивного в активное состояние осуществляется путем повышения температуры до 12, 20 или 25°. Темпы пупариации личинок, развивавшихся при 6°, иллюстрирует табл. 3. Три географические формы из северной и средней (Мурманск и Томск) и южной (Шафиркан) частей ареала различаются темпами пупариации как при 6, так и при 12°. Личинки южной формы превращаются в пупарии гораздо быстрее двух других. Например, в режиме «6—12°» 95 % пупариев южной формы появляется в течение 20 дней, тогда как у двух других такой результат (75—80 %) получается только в течение 100—120 дней. В режиме «6—20°» процесс пупариации осуществляется в течение всего 5 дней, исключением является каллифора из Мурманска, у которой первые 35 % пупариев появляются только через 10 дней, а их число увеличивается до 77 % в течение 11—28-го дней. Самой высокой активирующей силой обладает температура 25°, при которой пупариация у всех трех форм происходит особенно дружно — в течение первых трех дней доля пупариев достигает 78—84 %, а к 5-му — 95—100 %. Если при 12 и 20° географические различия в динамике пупариации проявляются, то при 25° они нивелируются. В исходной темпе-

Таблица 3

Пупаризация разных по происхождению диапаузирующих личинок *Calliphora vicina* (%) при постоянном (6°) и переменных температурных режимах

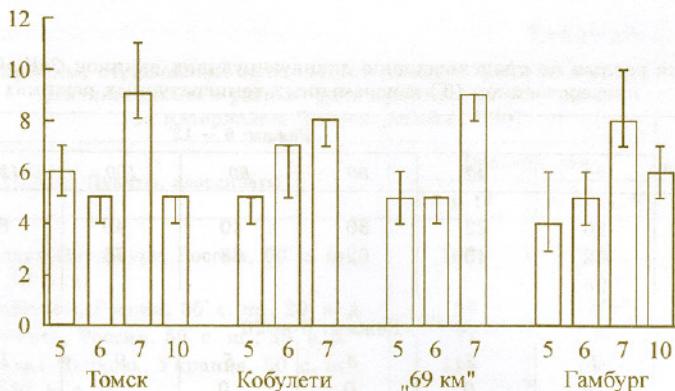
Место происхождения	Режим: $6 \rightarrow 12^{\circ}$						
	20	40	60	80	100	120	
Мурманск	20	22	30	40	49	80	
Томск	32	45	62	68	75		
Шафиркан	95						
Режим: $6 \rightarrow 20^{\circ}$							
	1	2	3	5	9	10	28
Мурманск	0	0	0	0	0	35	77
Томск	0	46	77	94	100		
Шафиркан	2	80	84	100			
Режим: $6 \rightarrow 25^{\circ}$							
	1	2	3	4	5		
Мурманск	0	59	82	90	95		
Томск	0	60	78	90	96		
Шафиркан	0	12	84	100			
Режим: 6° постоянная							
	40	60	80	100	140	180	200
Мурманск	0	0	11	25	45	55	83
Томск	0	0	18	54	67	76	85
Шафиркан	0	10	16	84	100		

Примечание. Курсивом выделены дни.

ратуре 6° небольшое количество пупариев начинает появляться в течение 60—80-го дня, и этот процесс растягивается до 200 дней.

В специальных опытах с культурами из Гамбурга (53° с. ш., 10° в. д., Германия), Кобулети (42° с. ш., 41° в. д., Грузия), Томска (56° с. ш., 85° в. д.) и поселка «69 км» (60° с. ш., 30° в. д., Ленинградская обл.) исследованы сроки холодовой реактивации личинок. С этой целью личинки, находившиеся в состоянии диапаузы при $2-3^{\circ}$ разное время, в возрасте от 5 до 10 месяцев переносились в условия 12° и темноты (см. рисунок). Несмотря на низкую предпоследнюю температуру, личинки быстро превращались в пупарии. Медиана для всех четырех форм варьировала от 4 до 9 дней, но в большинстве случаев (8 из 14) составляла 4—6 дней. Изменчивость этого параметра в пределах каждой культуры, возможно, обусловлена некоторой разнокачественностью отдельных поколений мух (разные годы опыта). Существенных различий между разными географическими формами не наблюдается. Правда, во всех случаях выборка личинок в возрасте 7 месяцев характеризуется самым высоким значением медианы, что, скорее, вызвано какой-то общей причиной, возможно, более низкой конечной температурой. Полученные данные свидетельствуют о том, что реактивация диапаузирующих личинок при $2-3^{\circ}$ завершается довольно быстро, по крайней мере для названных форм достаточно 5—6 и даже менее месяцев, их последующая пупариация тормозится слишком низкой температурой, но она быстро осуществляется при переносе личинок в более высокую температуру.

Таким образом, при хранении культуры в виде диапаузирующих личинок при низких температурах перевод их в активное состояние не со-



Пупариация диапаузирующих личинок *Calliphora vicina*, развивавшихся при $2-4^{\circ}$ и темноте, в ответ на перемещение в условия 12° и темноты.

По оси абсцисс — пребывание при низкой температуре (месяцы) и место происхождения культуры; по оси ординат — медиана (дни). 7 и 10 месяцев нахождения при низкой температуре — опыты 2007 г., 5 и 6 месяцев — опыты 2008 г.

ставляет особой трудности, особенно если использовать температуру $20-25^{\circ}$, в этих условиях мухи отрождаются из пупариев примерно через 10 дней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании многочисленных экспериментальных данных, полученных на 21 культуре каллифоры из разных частей ареала, предлагается 3 способа временной консервации культуры мух.

Культуру каллифоры можно сохранять в виде диапаузирующих самок при 6° и темноте в течение 2—3 месяцев, а иногда и более (в зависимости от географического происхождения популяции). Первые 5 дней жизни мух следует держать на углеводном питании при 12-часовом освещении и 12° , а затем поместить в условия низкой температуры. Для поддержания жизнедеятельности во время искусственной зимовки каждые 20 дней мухам следует предоставлять возможность питаться углеводами при 20° (3—4 ч). Реактивацию диапаузирующих мух в любой момент можно осуществить перемещением их в условия температуры 20° , в которых яйцекладка начинается через 10—17 дней.

При хранении культуры в виде активных, яйцекладущих мух они предварительно содержатся при $20-23^{\circ}$ и длинном дне на углеводном и белковом питании, где начинают яйцекладку, после чего переводятся в условия 6° и темноты. Им также необходима периодическая подкормка при 20° . В таком виде мух можно сохранять до 1—2.5 месяцев, яйцекладка начинается через 2—3 дня после возвращения мух в условия 20° .

Подготовка мух для хранения в виде диапаузирующих личинок включает следующие этапы. Содержание мух-родителей при коротком дне и 20° на углеводном и белковом субстратах, получение групповой яйцекладки, отложенной в течение 5—6 ч, помещение ее в условия 12-часового освещения при 12° до отрождения личинок и перевод только что отродившихся личинок в условия низкой температуры (5—6 или 2—3°). Там они питаются и достигают диапаузирующей стадии. Диапаузирующих личинок можно хранить 8—9 и даже 12 месяцев (в зависимости от их географического происхождения и температуры). Перевод культуры в активное состояние

происходит под воздействием температуры 20—25°, когда пупариация осуществляется в течение 3—5 дней, а вылет имаго происходит через 8—10 дней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Виноградова Е. Б. Мясная муха *Calliphora vicina* — модельный объект физиологических и экологических исследований. Л., 1984. 272 с.
- Виноградова Е. Б. Зимние адаптации мясных мух *Protophormia terraenovae* и *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae) из северной Европы и Сибири: сравнительный экспериментальный анализ // Связи энтомофаун северной Европы и Сибири. Л., 1988. С. 31—36.
- Виноградова Е. Б. Имагинальная диапауза синей мясной мухи *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera, Calliphoridae) и ее экологический контроль // Энтомол. обозр. 1989. Т. 68, вып. 2. С. 262—271.
- Виноградова Е. Б. Диапауза мух и ее регуляция. СПб., 1991. 255 с.
- Виноградова Е. Б., Богданова Т. П. Эндогенные циклические изменения тенденции к диапаузе в непрерывной культуре мясных мух (Diptera), развивающихся в константных условиях // Энтомол. обозр. 1980. Т. 59, вып. 1. С. 26—38.
- Зиновьева К. В., Виноградова Е. Б. Регуляция сезонного развития паразитов мясных мух. Экологическая регуляция зимних адаптаций у *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera, Calliphoridae) // Хозяйно-паразитные отношения у насекомых. Л., 1972. С. 90—99.
- Черныш С. И. Как лечить то, что не лечится? // Санкт-Петербургский государственный университет. 31 октября 2006 г. С. 32—37.
- Lowne B. T. The anatomy, morphology and development of the blowfly, *Calliphora vicina* // London. 1890—1892. Vol. 1. 350 p. 1893—1895. Vol. 2. 351 p.
- Nesin A. P., Simonenko N. P., Numata H., Chernysh S. I. Effect of photoperiod and parental age on the maternal induction of larval diapause in the blowfly, *Calliphora vicina* // Appl. Ent. Zool. 1995. Vol. 30, N 2. P. 351—356.
- Saunders D. S. Maternal influence on the incidence and duration of larval diapause in *Calliphora vicina* // Physiol. Ent. 1987. Vol. 12, N 3. P. 331—338.
- Vinogradova E. B., Reznik S. Ya. Endogenous changes of the tendency to diapause in the blowfly, *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae) // Proc. Zool. Inst. Russian Acad. Sci. 1999. Vol. 281. P. 151—155.
- Vinogradova E. B., Reznik S. Ya. Endogenous changes of the tendency to larval diapause in laboratory generations sequences of the blowfly, *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera, Calliphoridae) // Int. J. Dipterol. Res. 2002. Vol. 11, N 1. P. 3—8.