

УДК 595.771

**НОВАЯ МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ СКЛЕРИТОВ ГРУДИ
КРОВОСОСУЩИХ КОМАРОВ (DIPTERA: CULICIDAE)
ДЛЯ ТОЧНОЙ ДИАГНОСТИКИ РОДОВ И ВИДОВ**

© А. В. Халин, С. В. Айбулатов

Зоологический институт РАН
Университетская наб., 1, С.-Петербург, 199034
E-mail: hall@freemail.ru; s.v.aibulatov@gmail.com
Поступила 06.06.2012

Охарактеризована оригинальная методика морфологического исследования склеритов груди кровососущих комаров. Под растровым электронным микроскопом и световым микроскопом доступны для изучения общая форма склеритов, а также расположение на них щетинок и чешуек, что важно для диагностики видов сем. Culicidae. Приводятся методические указания по препарированию груди для дальнейшего изготовления микропрепаратов. Рассмотрены перспективы применения метода изучения грудных склеритов для определения родов и видов.

Ключевые слова: кровососущие комары, диагностика, морфология, грудь, склериты, Culicidae.

Кровососущие комары (Diptera Linnaeus, 1758; Culicidae Meigen, 1818) в большей части территории России составляют основную часть комплекса гнуса. Самки многих видов комаров, будучи активными кровососами, доставляют значительные неудобства труду и отдыху человека, особенно в лесных зонах. Кроме того, некоторые виды сем. Culicidae переносят возбудителей опасных заболеваний — комариных лихорадок и энцефалитов. Из комариных лихорадок на территории России хорошо известны лихорадка Западного Нила и карельская лихорадка. Заболевания лихорадкой Западного Нила отмечены в последние годы на территории Волгоградской, Астраханской и Новосибирской областей, а также Краснодарского края (Петров и др., 2001; Федорова и др., 2004; Терновой и др., 2007); показана возможность формирования очагов данного заболевания в Омской и Томской областях (Кононова и др., 2007; Москвитина и др., 2008). Вспышки карельской лихорадки имели место на северо-западе европейской части России (главным образом на территории Карелии, отдельные случаи — в Вологодской и Смоленской областях (Львов и др., 1989)).

Многие возбудители заболеваний, переносимых кровососущими комарами, специфичны к определенным видам переносчиков, поэтому точная видовая диагностика сем. Culicidae очень важна. Для определения самцов

кровососущих комаров используются признаки строения генитального аппарата, видовая диагностика самок основана на внешних признаках, например, хетотаксии груди и брюшка. Чешуйки и щетинки зачастую утрачиваются не только в процессе сборов, но и в процессе жизнедеятельности комара. Так, к середине лета у многих особей чешуйки и щетинки на груди в значительной степени могут отсутствовать.

В связи с этим оказалось необходимым уточнить видовую диагностику самок кровососущих комаров с использованием признаков структур, которые бы не утрачивались во время проведения сборов насекомых. Нами были выбраны склериты груди, поскольку их целостность сохраняется в большинстве случаев при сборах самок кровососущих комаров различными методами. Кроме того, пойманных комаров можно фиксировать в спирт, что более удобно, чем накалывание на булавки или использование ватных матрасиков. При детальном исследовании склеритов груди под оптическим микроскопом хорошо заметны места прикрепления чешуек и щетинок, благодаря чему можно использовать многие признаки хетотаксии (за исключением окраски чешуек).

Таким образом, исследование морфологии грудных склеритов кровососущих комаров методами растровой электронной микроскопии (РЭМ) и световой микроскопии (СвМ) оказалось актуальным. В дальнейшем, разработав методику изучения морфологии склеритов груди, планируется охарактеризовать диагностическую ценность признаков грудных склеритов, сравнив их строение у самцов и самок одного вида, а также у различных видов сем. Culicidae (в том числе у близкородственных видов, диагностика которых затруднена).

ИССЛЕДОВАННЫЙ МАТЕРИАЛ

Работа выполнена в Лаборатории паразитологии Зоологического института РАН (ЗИН РАН). В ходе исследования были использованы материалы фондовой коллекции ЗИН РАН (наколотые комары), а также собственные сборы. Всего нами собрано и выведено из личинок более 2000 экз., относящихся к 11 видам и 4 родам сем. Culicidae. Из них 30 экз., относящихся к 8 видам, исследовано методами РЭМ, а 40 экз., принадлежащих к 3 видам, изучено методами СвМ. Склериты груди исследовались у следующих видов: *Aedes*¹ (*Aedes*) *cinereus* Meigen, 1818; *A. (Aedimorphus) vexans* (Meigen, 1830); *A. (Finlaya) geniculatus* (Olivier, 1791); *A. (Ochlerotatus) cantans* (Meigen, 1818); *A. (O.) caspius* (Pallas, 1771); *A. (O.) communis* (De Geer, 1776); *A. (Stegomyia) flavopictus* Yamada, 1921; *Culiseta (Culisella) morsitans* (Theobald, 1901); *Anopheles (Anopheles) maculipennis* Meigen, 1818.

¹ В настоящей публикации авторы используют классификацию Эдвардса (Edwards, 1932), согласно которой таксон *Ochlerotatus* рассматривается в качестве подрода рода *Aedes*. Представления об объеме рода *Aedes* других исследователей (например, Рейнерта (Reinert, 2000a, b; Reinert et al., 2004, 2006, 2008)) были изложены ранее (Халин, 2005б, 2007, 2011, 2012; Халин, Горностаева, 2008).

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИЗУЧЕНИЯ ГРУДНЫХ СКЛЕРИТОВ

Для детального исследования морфологии груди оказался необходим материал хорошей сохранности, который можно было достоверно определить до вида.² Для этой цели нами применялся метод индивидуального выплода имаго с фиксацией личиночной и куколочной шкурки. Личинки кровососущих комаров отлавливались с апреля по июль 2009—2012 гг. на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской обл. В Санкт-Петербурге сборы проводились во временных и постоянных микроводоемах городских парков (Южно-Приморского, Полежаевского, Сосновой Поляны, Сергиевки и др.). В Ленинградской обл. обследованы водоемы различного типа (лесные лужи, канавы, верховые болота, пруды и т. д.) в лесных биотопах Лужского, Гатчинского, Кингисеппского, Волосовского, Приозерского, Кировского, Волховского и Лодейнопольского районов. Для отлова личинок кровососущих комаров использовался энтомологический сачок из мельничного газа или сито для просеивания муки. Пойманные личинки вымывались из сачка или сита в пластиковых кюветах, переливались вместе с водой из микроводоема обитания в бутылки, которые подписывались и транспортировались в лабораторию. Для индивидуального выплода имаго использовалось подвальное помещение, среднесуточная температура воздуха в котором не превышала 15—20 °С, что оптимально для нормального развития кровососущих комаров. Собранные личинки из бутылок пересаживались поодиночке в небольшие банки (объемом 200 мл), которые сверху накрывались марлей. Каждой банке задавали свой номер с указанием даты и места сбора. При окуклинии личиночная шкурка фиксировалась в 96°-ном этиловом спирте и помещалась в отдельную, объемом 2 мл, пробирку с этикеткой и номером, соответствующим таковому на банке с куколкой. В дальнейшем при окрылении взрослого комара в той же пробирке фиксировались куколочная шкурка и имаго. Благодаря данной методике практически все личиночные и куколочные признаки получают доступными для изучения, что позволяет максимально достоверно определить вид кровососущего комара.

Для детального исследования морфологии грудных склеритов кровососущих комаров нами применялись методы РЭМ и СвМ, совместимые с компьютером. РЭМ позволяет охарактеризовать признаки микрорельефа поверхностей, трехмерной конфигурации микроструктур и их расположение относительно друг друга. СвМ наиболее результативна при изучении строения плоских полупрозрачных объектов, исследование которых затруднено методами РЭМ. Изображение со светового микроскопа «Leica DM5000B» передавалось на персональный компьютер «Core™2» посредством видеокамеры «Leica DFC320». Полученные изображения обрабатывались графическими редакторами «Corel Photo-Paint X5» и «Corel Draw X5».

Для исследования методами СвМ имаго обрабатывалось 10%-ным водным раствором КОН и препарировалось: проводился сагиттальный разрез

² Некоторые виды сем. Culicidae с достоверностью определяются только по личиночным признакам, например, широко распространенные на территории Ленинградской обл. *Aedes communis* (De Geer, 1776) и *A. pionips* Dyar, 1919, *A. punctor* (Kirby, 1837) и *A. hexodontus* Dyar, 1916.

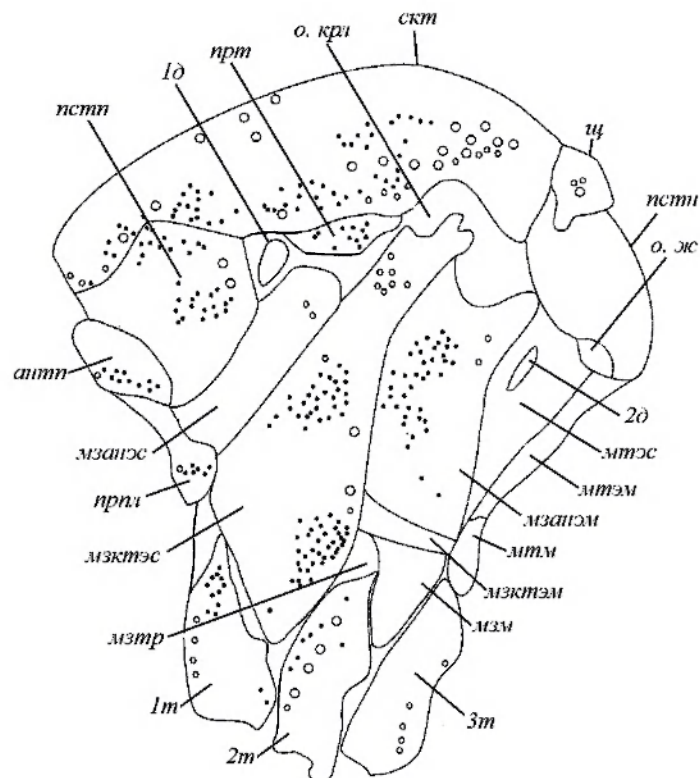


Рис. 1. *Aedes flavopictus* Yamada, 1921, грудь самки сбоку, схема.

Переднегрудь: *антп* и *пстп* — антеро- и постпронотум, *прп* — проплевры. Среднегрудь — тергальная часть: *прт* — паратергит, *пстп* — постнотум, *скт* — скutum, *щ* — щиток. Плевры: *мзанэм* и *мзктэм* — мезоанэпимер и мезокатэпимер, *мзанэс* и *мзктэс* — мезоанэпистерн и мезокатэпистерн, *мзм* — мезомерон, *мзтр* — мезотрохантин. Заднегрудь: *мтп* — метомерон, *мтэм* — метэпимер, *мтэс* — метэпистерн. *1д* и *2д* — 1-е и 2-е грудные дыхальца; *1т*, *2т* и *3т* — тазики 1-й, 2-й и 3-й пар ног; *о. крл* и *о. жс* — основания крыльев и жужжалец [терминология структур груди согласно: Нарчук (2003), Becker et al. (2003)]. Окружностями обозначены основания щетинок, точками — основания чешуек.

Fig. 1. *Aedes flavopictus* Yamada, 1921, female thorax, lateral view, scheme.

груди, разделенные половинки отмывались от остатков внутренних структур и заделывались во временные или постоянные препараты. Для изготовления постоянных бальзамных микропрепаратов объект проводился через спирты возрастающей концентрации, лавандовое масло и ксилол, после чего фиксировался в канадском бальзаме. Временные препараты изготавливались в 70%-ном водном растворе глицерина. На полученных препаратах хорошо различима как форма грудных плейритов, так и места прикрепления щетинок и чешуек (рис. 1; 2, 1, см. вкл.). Исследовать данным методом среднеспинку затруднительно из-за выпуклости данного склерита.

Подготовка объектов исследования под РЭМ производилась по следующей методике. Под бинокулярным микроскопом «Leica MZ95» объекты препарировались вольфрамовыми иглами, заточенными методом электролиза, после чего фиксировались на специальных столиках клеем или двухсторонним скотчем и покрывались платиной в напылительной камере. При изучении методами РЭМ особей, хранившихся в 70°-ном спирте, ис-

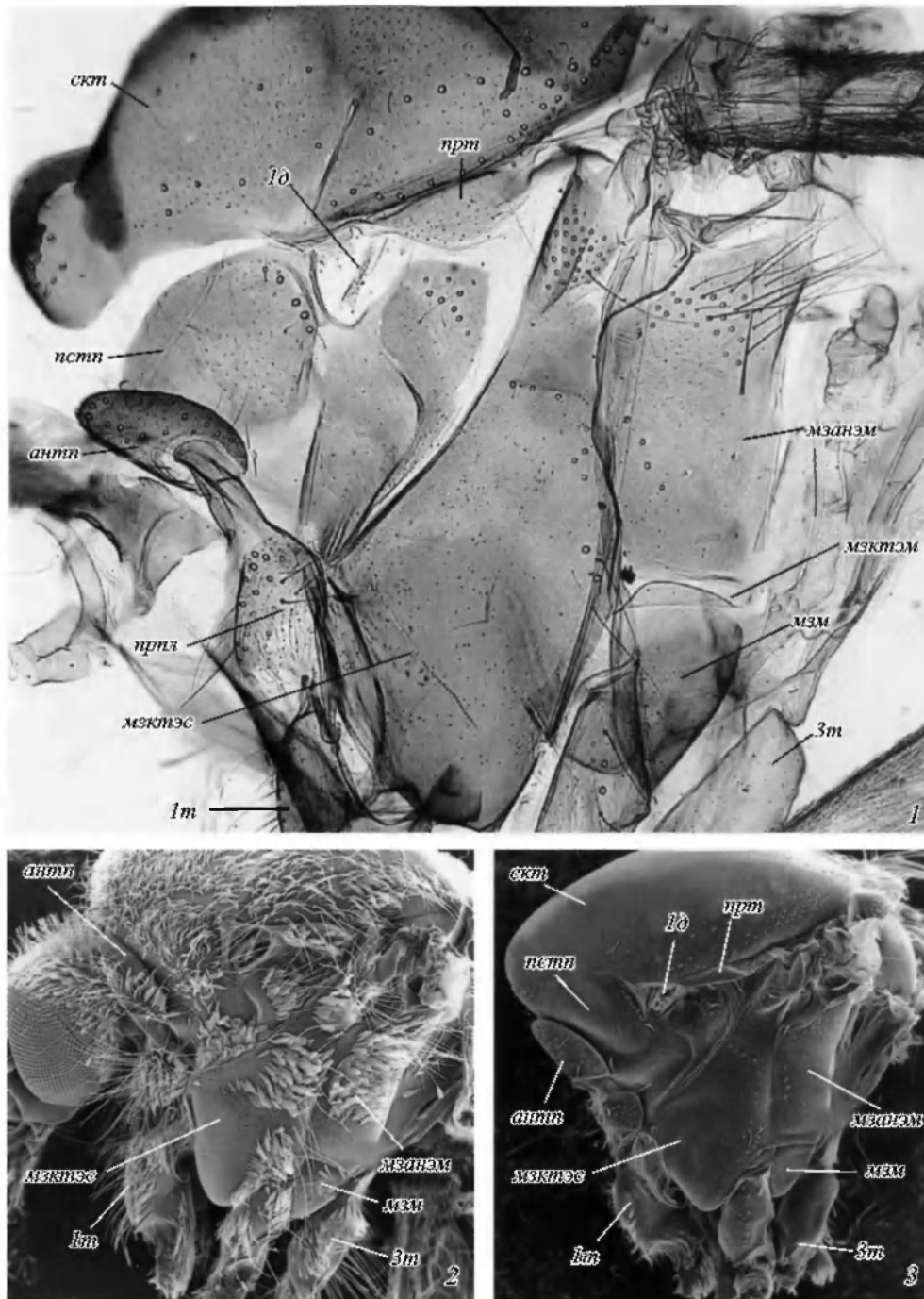


Рис. 2. *Aedes* Meigen, 1818, грудь самки сбоку, $\times 40$.

1 — *A. communis* (De Geer, 1776), бальзамный микропрепарат, под СвМ; 2 — *A. cantans* (Meigen, 1818), под РЭМ; 3 — *A. caspius* (Pallas, 1771), под РЭМ, чешуйки и щетинки удалены. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 2. *Aedes* Meigen, 1818, female thorax, lateral view $\times 40$.

пользовалась просушка объекта в углекислоте методом «критической точки». После этого объект наклеивался на специальный столик двухсторонним скотчем и напылялся платиной. Охарактеризовать общую форму склеритов груди и места прикрепления щетинок и чешуек затруднительно, если не удалить элементы хетотаксии (рис. 2, 2). В связи с этим чешуйки и щетинки удалялись при помощи препаровальных игл, объект повторно напылялся и исследовался. Плейриты груди исследовались сбоку (рис. 2, 3), а среднеспинка — сверху (рис. 3, 1, см. вкл.). Поскольку данный склерит у кровососущих комаров характеризуется заметной выпуклостью, его приходилось изучать под различными ракурсами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИКИ ИЗУЧЕНИЯ ГРУДНЫХ СКЛЕРИТОВ

В ходе исследования разработана методика изучения наружной морфологии плейритов и тергитов груди кровососущих комаров. Следуя данной методике, можно изучить под оптическим микроскопом общую форму склеритов, а также места прикрепления щетинок и чешуек даже в случае их утраты. Метод может быть рекомендован для поврежденного материала, что нередко бывает при проведении сборов.

Для удобства анализа нами проводилась обрисовка склеритов с нанесением мест прикрепления щетинок и чешуек (рис. 1). Места прикрепления щетинок хорошо отличаются от таковых чешуек размером ямки (рис. 3, 2), у щетинок ее диаметр составляет, как правило, более 100 мкм, у чешуек — примерно 30 мкм. Дальнейшее сравнение рисунков склеритов с указанием расположения чешуек и щетинок у различных особей одного вида позволит охарактеризовать внутривидовую изменчивость данного комплекса признаков. Сравнение видов из разных родов сем. Culicidae, а также близкородственных видов поможет оценить диагностическую значимость признаков грудных склеритов. В частности, предлагаемый метод перспективен для изучения морфологии грудных склеритов у близких видов (например, *Aedes hexodontus*, *A. pionips*, *A. punctor*) и видов, плохо диагностируемых при повреждении материала (*A. communis*, *A. diantaeus* Howard, Dyar et Knab, 1913). Например, такие виды как *A. diantaeus* и *A. intrudens* Dyar, 1919 отличаются от многих видов подрода *Ochlerotatus* Lynch Arribalzaga, 1891 размерами мезэпистернального пятна чешуек. Вид *A. communis* отличается от близких видов (*A. punctor*, *A. pionips* и *A. hexodontus*) отсутствием посткоксального пятна чешуек. Даже при небольшом повреждении материала чешуйки легко утрачиваются, что приводит к неверной диагностике. Методика, предлагаемая в данной публикации, позволяет изучать места прикрепления чешуек и щетинок, что делает определение комаров более достоверным.

БЛАГОДАРНОСТИ

За ценные консультации и критические замечания при работе над статьей авторы благодарят главного научного сотрудника Лаб. паразитологии ЗИН РАН доктора биологических наук Н. А. Филиппову.

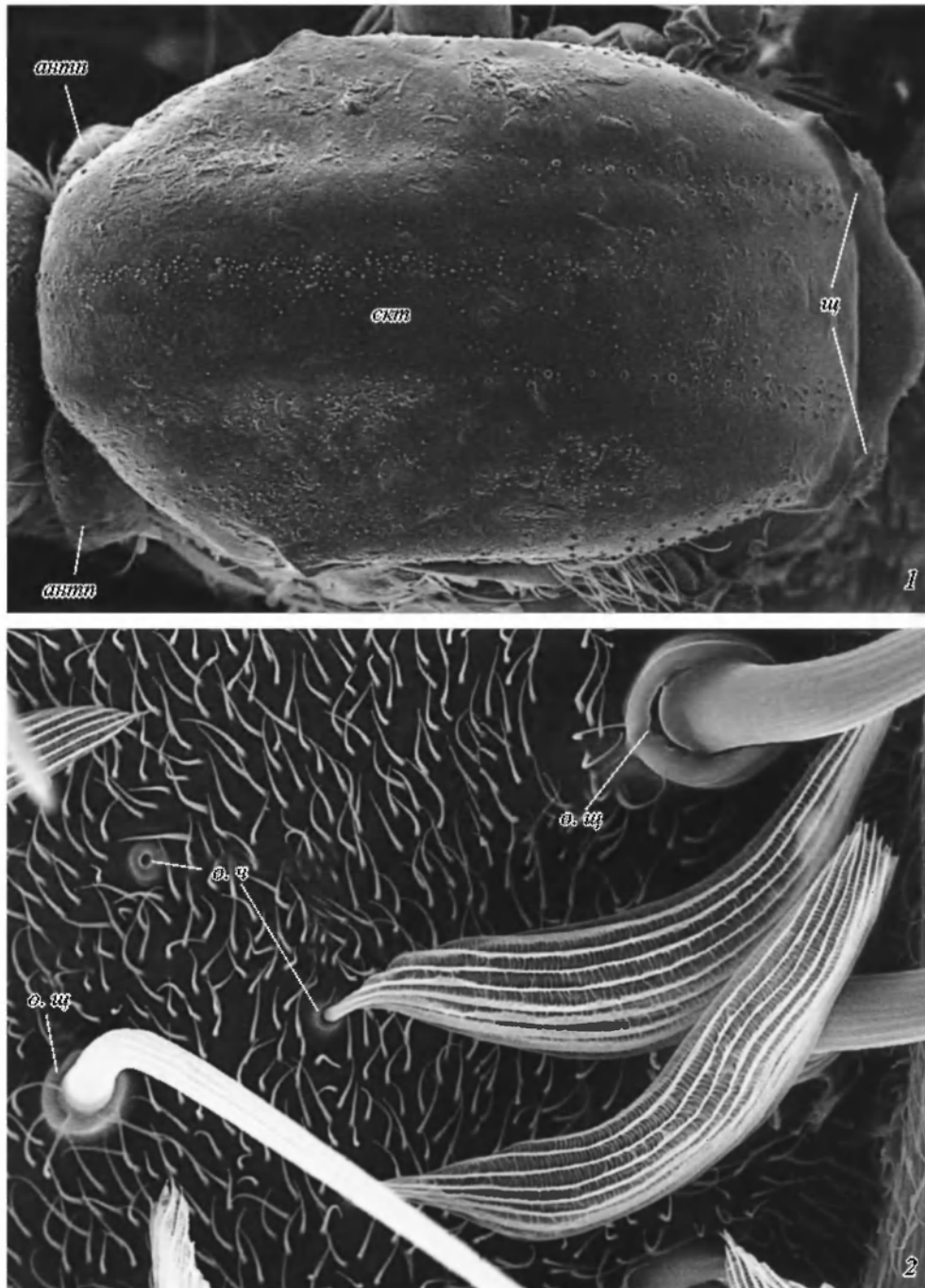


Рис. 3. *Aedes cantans* (Meigen, 1818), грудь самки под РЭМ.
 1 — сверху, $\times 40$; 2 — щетинки и чешуйки постпронотума сбоку, $\times 1000$.
 о. ч и о. ш — основания чешуек и щетинок. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 3. *Aedes cantans* (Meigen, 1818), female thorax in SEM.

Работа выполнена на базе коллекции Зоологического института РАН (ЗИН РАН) (УФК ЗИН рег. № 2-2.20) и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 08-04-00216-а и 11-04-00917-а).

Список литературы

- Кононова Ю. В., Мирзаева А. Г., Смирнова Ю. А., Протопопова Е. В., Дупал Т. А., Терновой В. А., Юрченко Ю. А., Шестопалов А. М., Локтев В. Б. 2007. Видовой состав кровососущих комаров (Diptera, Culicidae) и возможность формирования очагов циркуляции вируса Западного Нила на юге Западной Сибири. *Паразитология*. 41 (6): 459—470.
- Львов Д. К., Клименко С. М., Гайдамович С. Я. 1989. Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М.: Медицина. 334 с.
- Москвитина Н. С., Романенко В. Н., Терновой В. А., Иванова Н. В., Протопопова Е. В., Кравченко Л. Б., Кононова Ю. В., Куранова В. Н., Чаусов Е. В., Москвитин С. С., Першикова Н. Л., Гашков С. П., Коновалова С. Н., Большакова Н. П., Локтев В. Б. 2008. Выявление вируса Западного Нила и его генотипирование в иксодовых клещах (Acari: Ixodinae) в Томске и его пригородах. *Паразитология*. 42 (3): 210—225.
- Нарчук Э. П. 2003. Определитель семейств двукрылых насекомых (Insecta, Diptera) фауны России и сопредельных стран (с кратким обзором семейств мировой фауны). Тр. Зоол. ин-та РАН. 294: 1—251.
- Петров В. А., Алюшин А. М., Жуков А. Н., Филиппов А. Г., Иоанниди Е. П., Лазоренко В. В., Лещинская Е. В., Бутенко А. М., Белан Э. Б. 2001. Клинико-эпидемиологическая характеристика вспышки лихорадки Западного Нила в 1999 г. в Волгоградской области. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 3 (1): 17—21.
- Терновой В. А., Протопопова Е. В., Кононова Ю. В., Ольховикова Е. А., Спиридонова Э. А., Акопов Г. Д., Шестопалов А. М., Локтев В. Б. 2007. Выявление случаев лихорадки Западного Нила в Новосибирской обл. в 2004 г. и генотипирование вируса, вызвавшего заболевания. *Вестн. РАМН*. 1: 21—26.
- Федорова М. В., Лопатина Ю. В., Хуторецкая Н. В., Лазоренко В. В., Платонов А. Е. 2004. Изучение фауны кровососущих комаров (Diptera, Culicidae) г. Волгограда в связи со вспышкой лихорадки Западного Нила в Волгоградской обл. в 1999 г. *Паразитология*. 38 (3): 209—218.
- Халин А. В. 2005б. Диагностические признаки коксита в гениталиях самцов комаров *Aedes caspius* (Pallas), *A. cantans* Meigen и *A. communis* (De Geer) (Diptera, Culicidae). *Энтомол. обозр.* 84 (4): 884—896.
- Халин А. В. 2007. Диагностические признаки комаров рода *Aedes* фауны России (Diptera, Culicidae): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб. 24 с.
- Халин А. В. 2011. Диагностические признаки комаров рода *Aedes*. LAP Lambert Academic Publishing. 321 с.
- Халин А. В. 2012. Строение гениталий самцов рода *Aedes*. Meigen, 1818 (Diptera, Culicidae). LAP Lambert Academic Publishing. 149 с.
- Халин А. В., Горностаева Р. М. 2008. К таксономическому составу кровососущих комаров (Diptera: Culicidae) мировой фауны и фауны России (Критический обзор). *Паразитология*. 42 (5): 360—381.
- Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Dahl C., Lane J., Kaiser A. 2003. Mosquitoes and their control. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Plenum Publishers. 498 p.
- Edwards F. W. 1932. Diptera, fam. Culicidae. Brussels: Desmet-Verteneuil, 258 p. (Genera Insectorum, Fascile. 194).
- Reinert J. F. 2000a. Restoration of Ayurakitia to generic rank in tribe Aedini and a revised definition of the genus. *Journ. of the American Mosquito Control Association*. 16 (2): 57—65.

- Reinert J. F. 2000b. New classification for the composite genus *Aedes* (Diptera: Culicidae: Aedini), elevation of the *Ochlerotatus* to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. *Journ. of the American Mosquito Control Association*. 16 (3): 175—188.
- Reinert J. F., Harbach R. E., Kitching I. J. 2004. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae) based on morphological characters of all life stages. *Zool. Journ. of the Lin. Soc.* 142: 289—368.
- Reinert J. F., Harbach R. E., Kitching I. J. 2006. Phylogeny and classification of *Finlaya* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. *Zool. Journ. of the Lin. Soc.* 148: 1—101.
- Reinert J. F., Harbach R. E., Kitching I. J. 2008. Phylogeny and classification of *Ochlerotatus* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. *Zool. Journ. of the Lin. Soc.* 153: 29—114.

A NEW TECHNIQUE FOR THE STUDY OF THORACIC SCLERITES OF MOSQUITOES (DIPTERA, CULICIDAE) ALLOWING CORRECT IDENTIFICATION OF GENERA AND SPECIES

A. V. Khalin, S. V. Aibulatov

Key words: mosquitoes, diagnostics, morphology, thorax, sclerites, Culicidae.

SUMMARY

A new technique for the study of the external morphology of thoracic sclerites of mosquitoes (Diptera: Culicidae) is elaborated. According to this method, the shape of sclerites and the location of setal and scale bases can be examined under a scanning electron or an optical microscopes even in cases when setae or scales are lost. The method can be recommended for the damaged material, as it often happens while sample collecting. The bases of setae differ significantly from those of scales in the size of the orifice in the socket. The diameter of setal bases usually exceeds 100 microns, while the diameter of scale bases is about 30 microns. The analysis of the structure of sclerites (and the disposition of setae and scales on the sclerites) taken from the different specimens of one species will allow describing intraspecific variations of the given complex of morphological characters. The comparison of species from different genera of family Culicidae, as well as the comparison of closely related species, will presumably help evaluating the diagnostic value of thoracic sclerites as morphological characters.