



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



ПРИНЦИПЫ СОДЕРЖАНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЛИНИЙ НАСЕКОМЫХ

Беньковская Г.В.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия, e-mail: bengal2@yandex.ru

Резюме

Приводятся правила содержания в лабораторных условиях линий и выборок насекомых – комнатной мухи *Musca domestica* L. и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. Описан метод селекции в линиях комнатной мухи по признаку продолжительности жизни. Включен раздел по соблюдению биобезопасности и техники безопасности при работе с лабораторными насекомыми.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лабораторные линии, культура насекомых, комнатная муха, *Musca domestica*, колорадский жук, *Leptinotarsa decemlineata*.

Введение

Эффективная исследовательская работа практически во всех областях наук о жизни, и особенно – биологических наук, невозможна без создания, закрепления и развития экспериментальной материальной базы, в которой значительную роль отводят коллекциям живых организмов. Коллекции лабораторных животных, в частности насекомых, необходимы не только как объекты фундаментальных научно-исследовательских работ, но и как источники тест-объектов, используемых в прикладных исследованиях не только биологического профиля. Культуры насекомых позволяют осуществлять массовый скрининг самых разнообразных химических и физических агентов, активно воздействующих на живой организм, и на протяжении уже многих десятилетий насекомых используют в космических экспериментах [Ohnishi, 2016].

Коллекции лабораторных насекомых включают генетические линии видов с известными геномами, детально охарактеризованными генотипами, чаще всего встречаются линии дрозофилы. Однако в мировой научной практике немалое место отводится линиям, созданным на основе массовой культуры вида, как правило, сформированной при сборе в природных популяциях. Способы поддержания культур и линий насекомых в условиях лаборатории обуславливают быстрые изменения образа жизни, что сопровождается изменениями многих качеств

культуры [Монастырский, Горбатовский, 1991]. Экспериментальные работы с поддерживаемыми лабораторными линиями насекомых требуют периодического мониторинга состояния линий [Butler et al., 2013].

Мы представляем набор правил содержания, разведения, селекции и контроля качества для линий комнатной мухи и культуры колорадского жука при организации содержания на третьем уровне изоляции [Монастырский, Горбатовский, 1991]. Насекомые содержатся как выборки небольших объемов в специальных садках и контейнерах при строгом контроле плотности и численности и раздельном содержании на разных стадиях онтогенеза. Это позволяет при соблюдении всех правил обеспечить максимальное сохранение и поддержание лабораторных линий и культур даже при отсутствии возможности содержания в отдельных помещениях насекомых разных видов. Правила, изложенные в наборе описаний стандартных операционных процедур (СОП) в соответствии с Рекомендациями ВОЗ, размещены на сайте ИБГ УНЦ РАН в разделе ЦКП «Коллекция лабораторных насекомых».*

* Работа выполнена в рамках дополнительной темы Государственного задания «Коллекция лабораторных животных для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований»

I. Комнатная муха *Musca domestica* Содержание и селекция по признакам продолжительности жизни и срокам массовой репродукции

Подготовка посуды и материалов

Для содержания имаго комнатной мухи следует использовать садки объемом 250-3000 см³. Материалы для садков (капроновая ткань, металлические каркасы, пластиковые поддоны и контейнеры) необходимо вымыть с моющим средством и высушить. Чистые материалы хранить в специально отведенном месте. Стеклянные стаканы для откладки яиц и флаконы и колбы для поилок обязательно после мытья и сушки стерилизовать в жарочном шкафу (50 минут при +140 °С). Вата для фильтров к поилкам должна быть пастеризована (60°С, 6 часов). Сухие пшеничные отруби для субстрата стерилизовать в жарочном шкафу в закрытом стеклянном контейнере (50 минут при +140 °С). Отруби до стерилизации хранить в отдельном помещении или небольшими порциями в морозильной камере. Сухую молочную смесь для кормления имаго и приготовления молочного корма для личинок хранить в специальной стерилизованной посуде в холодильнике. Инструменты для работы (пинцеты, ножницы, ложки, скальпели) мыть сразу после окончания работы и хранить в закрытом контейнере. Для выполнения отдельных операций использовать специально предназначенные инструменты.

Подготовка садков для содержания комнатной мухи

Садок для содержания имаго сшить из прозрачной ткани (капроновое сито, мельничный газ с ячейкой 0.3-0.5 мм²) в форме мешка с учетом размеров каркаса и предполагаемой численности насекомых (рис. 1).



Рис. 1. Общий вид садков для содержания имаго комнатной мухи

Надетый на каркас садок должен иметь длинный рукав для обеспечения работы с насекомыми. Подготовить фиксатор для выхода (эластичная резина или прочный шнур).

В садок для имаго поместить:

- корм (сухая молочная смесь) в чистом контейнере с невысоким бортом
- поилку с ватным фильтром и чистой водой
- стеклянный стакан с увлажненными (заваренными кипятком) отрубями для откладки яиц.

Размещение насекомых в садках

В садках объемом 150-250 мл оптимально содержать от 1 пары до 10 особей. В стандартных садках с металлическим каркасом объемом 3000 см³ содержат до 300 особей [Рославцева, 1978]. Садки устанавливают на полках, избегая прямого солнечного освещения, но при этом нужно обеспечить рассеянный свет с длительностью светлого периода не менее 10 часов. Температура в помещении не должна резко меняться. Оптимальная температура для содержания комнатной мухи +23-+27°С. Вода и корм должны быть в садках постоянно. Воду в поилках желательно заменять полностью не реже 1 раза в 5 суток.

Мониторинг развития на преимагинальной стадии

Стаканы с увлажненными отрубями проверять на наличие кладок яиц чистым, специально отведенным пинцетом не реже 2 раз в неделю. При значительном (более 10-15 кладок на 50 мл субстрата) количестве яиц стакан заменять. Поверхность субстрата не должна пересыхать и образовывать корку. При проверке стакана (2 раза в неделю) субстрат при необходимости сбрызнуть чистой водой. Стакан с субстратом и яйцами накрыть специальной чистой тканевой крышкой с резиновым фиксатором. Для содержания стаканов следует выделить отдельную полку, вдали от нагревательных приборов и прямого солнечного освещения. После появления в стаканах пупариев в верхнем слое субстрата стакан стараться не открывать до появления имаго. Стакан с вылетевшими имаго поставить в садок с соответствующей маркировкой. Стаканы с субстратом для развития следующего поколения нужно ставить в садки не раньше, чем через 4-5 суток после вылета имаго.

Ведение регистрационного журнала линий

Для контроля состояния линий следует вести отдельный журнал. Для каждой линии выделяется свое место в журнале и отдельный файл в электронном каталоге. В журнале для каждой линии записывают ее происхождение, даты откладки яиц и выхода из пупариев имаго, даты гибели последней особи в садке, в специальных таблицах вносят биометрические данные – массу личинок, пупариев, имаго, результаты оценки плодовитости,

выживаемости, устойчивости к различным воздействиям.

Этикетирование садков и стаканов

Садки с имаго маркировать этикетками, на которых должны быть следующие надписи:

- Название (или шифр) линии
- Номер поколения
- Дата начала выхода имаго соответствующего поколения, даты выхода из следующих стаканов того же поколения, если их ставят в тот же садок.
- Допускается делать на этикетке пометки о времени смены субстрата для откладки яиц, проведении специальных учетов, объединении или ликвидации садков. На стеклянных или пластиковых стаканах с субстратом для откладки яиц до помещения в садок записывают шифр линии, номер поколения, к которому будут относиться яйца, дату смены субстрата.

Селекция по признакам продолжительности жизни и срокам массовой репродукции в линиях комнатной мухи.

Начальный этап работы предполагает решение следующих задач:

- выделение субпопуляционных групп комнатной мухи, различающихся по продолжительности жизни имаго;
- сравнение показателей продолжительности преимагинального развития в группах с различной продолжительностью жизни имаго.
- сравнение показателей динамики репродуктивных процессов в этих группах.

Характеристика селекционируемой группы

Исходную линию, для которой предполагается селекция по признакам продолжительности жизни (ПЖ) и срокам массовой репродукции, нужно охарактеризовать. Для наблюдений сформировать группу синхронно развивающихся особей. Для стадии имаго – в садок выпустить имаго, вышедших из пупария с разницей не более 6 часов. Ежедневно удалять из садка погибших особей, регистрируя количество самок и самцов. Для определения начала периода репродукции ставить в садок стакан с субстратом для откладки яиц, начиная с первого дня. Проверять стакан ежедневно, регистрируя количество отложенных кладок. Все регистрируемые показатели получают при закладке экспериментов не менее чем в 3х-кратной повторности.

Для экспериментов по оценке ПЖ и длительности репродуктивного периода в каждом из 3-х садков должно быть не менее 40-50 особей, число самок не менее 20. При использовании малых групп (4-5 пар в 1 садке) число повторностей увеличить до

6-10. Наблюдения и регистрацию смертности имаго и репродукции продолжать до смерти последней особи в каждом садке. Полученные данные обработать с применением расчета средней, минимальной и максимальной ПЖ отдельно для самок и самцов [Беньковская, 2010; Никоноров, Беньковская, 2013]. Представить результаты в виде кривых дожития. Рассчитать ежедневные показатели плодовитости (количество отложенных яиц в пересчете на 1 самку). Представить данные в виде графиков динамики плодовитости. Для оценки значимости различий между линиями и внутрилинейными группами использовать тесты Вилкоксона, Каплана-Мейера, Стьюдента.

Массовая селекция

Из исходной культуры методом отбора на раннее и позднее репродуктивное усилие можно выделить массовые линии с сокращенной и увеличенной ПЖ, достоверно различающиеся по показателю средней продолжительности жизни имаго, если при характеристике линии обнаружены соответствующие группы особей. Для создания линии с сокращенной ПЖ из исходной линии на протяжении трех поколений отбирать яйца, отложенные в течение первых двух недель со дня вылета имаго. Для создания линии с увеличенной ПЖ из исходной линии отбирать яйца, отложенные не ранее, чем через 25-28 суток со дня вылета имаго. Начиная с 4-го поколения прекратить добавление яиц из исходной линии в селекционируемые группы. Продолжать отбор в каждом последующем поколении. Каждое поколение содержать изолированно. Показатели ПЖ регистрировать для каждого поколения.

Селекция потомства пар по показателю ПЖ

Для дальнейшей гомогенизации линий с последующей генетической характеристикой целесообразно предпринимать индивидуальный отбор по показателю ПЖ на базе полученных массовых линий. Из каждой линии для отбора выделить по 30 -50 пар виргинных особей. Пары содержать изолированно до гибели, регистрируя частоту овипозиции, длительность репродуктивного периода и продолжительность жизни. Все полученное потомство каждой пары далее содержать как отдельную линию. Кроме показателей ПЖ важна выживаемость на всех преимагинальных стадиях, поэтому наблюдения следует продолжать на протяжении двух поколений потомства. Для дальнейшего разведения гомогенизированных линий оставить те, в которых ПЖ максимально соответствует поставленной задаче. Как показали наши наблюдения, жизнеспособность и стабильность в таких линиях резко снижена, и в большинстве

случаев репродукция прекращается через 2-4 поколения [Никонов, Беньковская, 2013; Маркина, Беньковская, 2015]. Линия может считаться стабильной не ранее чем после 20 поколений разведения с сохранением фенотипических характеристик.

Все процедуры, связанные с процессом селекции, регистрировать в журнале и соответствующих файлах.

Контроль качества в поддерживаемых линиях комнатной мухи

При оценке качества линий комнатной мухи используют общие критерии (степень приспособленности к условиям разведения – показатели выживаемости, продолжительности развития, плодовитости, соотношение полов, биометрические показатели) и целевые критерии – показатели продолжительности жизни (ПЖ) и репродукции имаго, эффективность репродукции, показатели устойчивости к факторам селекции.

Регистрация показателей продолжительности развития

Для оценки сроков развития и выживаемости на отдельных стадиях онтогенеза учитывают: 1) выживаемость на эмбриональной стадии в виде % вышедших из яиц личинок; 2) длительность личиночной стадии до момента образования пупария; 3) длительность всего преимагинального развития; 4) длительность стадии пупария; 5) время репродуктивного созревания – от выхода имаго до появления первой кладки яиц; 6) выживаемость на стадии личинки и пупария в отдельности; 7) выживаемость в ходе всего онтогенеза - по отношению количества вылетевших имаго к количеству яиц. Кроме того, как важный показатель сравнивают средние значения веса одного пупария для всех линий. В каждой из трех-пяти повторностей эксперимента по оценке сроков развития и выживаемости в ходе онтогенеза в стеклянный стакан помещают синхронизированные кладки с количеством яиц на стакан не менее 100.

Регистрация ПЖ и репродуктивных показателей

Показатели продолжительности жизни регистрируют в каждом поколении линий как период от выхода имаго до смерти последнего имаго в садках общего содержания. Контрольное определение ПЖ и показателей плодовитости, продолжительности репродукции проводится через каждые 10 поколений в специальном эксперименте, предусматривающем трехкратную повторность наблюдений. Оценку показателей приспособленности имаго проводят для

каждой селективируемой линии. При этом определяют: 1) длительность жизни имаго, 2) длительность репродуктивного периода имаго; 3) плодовитость; 4) чистую величину репродукции – количество имаго в потомстве одной самки.

Контроль численности

Численность на каждой стадии развития комнатной мухи должна соответствовать оптимальным показателям, определяемым по литературным данным и в ходе собственных наблюдений. Оптимальная численность имаго соответствует для разных объемов садков от 2х-4х до 150-300 особей. Соблюдение оптимальной численности позволяет сохранить основные показатели приспособленности и целевые показатели, достигаемые при селекции, без резких колебаний.

Нарушение оптимальной численности имаго может выражаться в следующих изменениях: быстрая гибель насекомых; резкое снижение плодовитости или замедление начала репродукции. Нарушение оптимальной численности личинок в стаканах может выражаться как замедление развития на стадиях личинки и пупария, реже – как резкое ускорение развития на стадии личинки и снижение средних значений массы пупариев; нарушение развития на стадии пупария, что сопровождается снижением числа выходящих имаго и впоследствии отражается на их ПЖ и репродуктивном потенциале.

Контроль численности имаго должен сопровождаться оценкой соотношения полов в наблюдаемой генерации. Сдвиг соотношения 1:1 в сторону преобладания самцов в нескольких поколениях линии может быть свидетельством неблагоприятного состояния линии, что может привести к ее полному вымиранию.

Оценка эффективности репродукции

Для оценки эффективности репродукции в цикле характеристики для каждой линии следует периодически составлять таблицы выживаемости, для чего проводят серию наблюдений с оценкой выживания на всех стадиях развития, начиная от яйца до выхода имаго из пупария. По данным таблицы с применением уравнения Холдейна можно оценить смертность в онтогенезе. При учете соотношения полов в двух последовательных генерациях и учете отложенных каждой самкой яиц и числа вышедших в потомстве имаго можно рассчитать чистую величину репродукции. Значения, определенные для линии в серии экспериментов, не должны существенно различаться при последующей периодической оценке качества линий.

Коррекция нарушений качества лабораторных линий комнатной мухи

Коррекция нарушения качества линий комнатной мухи может проводиться в случаях:

1. отклонений целевых показателей (ПЖ, репродуктивных показателей, устойчивости к определенным факторам) от фенотипической нормы;
2. отклонений численности и плотности от оптимальных значений, проявляющихся нарушений биометрических и демографических показателей;
3. появления признаков эпизоотии либо локальных признаков инфекции.

Систематический отбор по фенотипу в лабораторных линиях

Проводится для коррекции отклонений от фенотипической нормы целевых показателей. При повышении фенотипического разнообразия целесообразно провести внутри линии разделение на пары и отбор потомства пар, показатели которых максимально соответствуют целевым значениям.

Изменение численности и плотности при содержании

При повышенной плотности личинок в стаканах с субстратом возможна попытка части особей выйти из стакана. Стакан, в котором личинки не скрыты в субстрате, а передвигаются по стенкам и крышке, следует открыть и содержимое разделить между 2 или более стаканами, дополнив их свежим субстратом. При повышенной плотности имаго и для предотвращения превышения оптимальной плотности стакан, из которого начали вылетать имаго, не оставлять в садке больше чем на сутки, переставляя в следующий новый садок с соответствующей маркировкой. При пониженной плотности личинок в стаканах и замедлении их развития, что может быть связано с недостаточным эффектом группы, возможно пересаживание личинок в меньшие по объему емкости с субстратом. Пониженная плотность имаго, особенно на начальных этапах селекции, может привести к недостаточно эффективной репродукции. В этих случаях допустимо объединение в одном садке имаго из последовательных генераций. Маркировка стаканов с потомством должна проводиться с учетом преобладающего в садке поколения.

Соблюдение асептики при разведении

Изменение состояния субстрата в стаканах с личинками, появление пигмента на ватных фильтрах в поилках и на поверхности субстрата, обнаружение личинок с признаками изменения цвета, подвижности, погибших имаго с вздутием или изменением цвета брюшка, параличом конечностей – признаки инфекционных заболеваний. При появлении этих признаков следует усилить профилактику распространения патогенов и соблюдение всех правил асептики.

II. Лабораторная культура колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata*

Основу лабораторной культуры составляют выборки перезимовавших имаго и имаго летнего поколения, ежегодно пополняемые сборами в агроценозах. Эти выборки используются в первую очередь для токсикологического мониторинга резистентности к химическим инсектицидам [Новожилов, 2006; Беньковская и др., 2013].

Подготовка посуды и материалов

Для содержания колорадского жука отвести отдельные полки. Имаго и личинки колорадского жука, прошедшие обработку токсичными соединениями или патогенами, должны содержаться в отдельном шкафу. Для яиц и личинок колорадского жука отобрать пластиковые чистые чашки Петри, в которые положить гигроскопичную бумагу. Корм для личинок и имаго – свежие листья картофеля перед помещением в контейнер тщательно вымыть. Для развития яиц в чистую чашку Петри на смоченную вату поместить свежий лист картофеля нижней стороной вверх. Инструменты для работы (пинцеты, ножницы, ложки, скальпели) мыть сразу после окончания работы и хранить в закрытом контейнере. Для выполнения отдельных операций использовать специально предназначенные инструменты.

Подготовка контейнеров для содержания колорадского жука

Имаго колорадского жука содержать в пластиковых или стеклянных контейнерах с тканевыми крышками. На дно контейнера поместить несколько слоев гигроскопичной бумаги. Тканевую крышку и фиксатор подобрать по размеру контейнера. Вымытые листья картофеля помещают в контейнер, опустив черешок листа в сосуд с водой (гигростат) (рис.2).



Рисунок 2. Содержание имаго колорадского жука в пластиковом контейнере.

Размещение насекомых в контейнерах

В контейнер объемом 150-250 мл и чашку Петри диаметром 9 см поместить не более 10 имаго, или личинок 3-4 возрастов, 20 личинок младших возрастов или 1 кладку яиц на листе. Контейнеры с имаго размещать в светлой части помещения, избегая прямого солнечного освещения. Для размножающихся имаго нужно обеспечить длину светового дня не менее 16 час. Контейнеры с личинками и яйцами можно разместить на неосвещенных полках и в шкафах. Оптимальная температура для содержания колорадского жука +23 - +25°C. Для максимального сохранения в период зимнего покоя (диапаузы) имаго рассадить в чашки Петри с 4-6 слоями бумаги. Поилки с ватными фильтрами в период зимнего покоя обновлять не реже 1 раза в 10 дней. Для синхронизации развития личинок яйца можно накапливать, помещая в холодильник на срок до 5-7 дней.

Мониторинг развития на преимагинальной стадии

Контейнеры и чашки Петри с личинками и яйцами проверять ежедневно. Корм сменять ежедневно, не допускать отсутствие дольше чем на 1-2 часа. В чашках Петри с развивающимися яйцами ватный плотик смачивать, не допуская пересыхания. В контейнерах и чашках Петри с личинками проверять прохождение линек на каждый следующий возраст. Предкуколки (личинки 4 возраста, переставшие питаться и подготовившиеся к окукливанию) переносить в чистые чашки с бумагой и микропробиркой с водой и ватным фильтром. Вышедших молодых имаго после завершения отщелывания и потемнения покровов (2-е сутки) переносить в чистые контейнеры со свежим кормом. При садковом содержании на растениях картофеля своевременно удалять кладки с листьями.

Сбор и транспортировка насекомых

Для сбора имаго подготовить сухие чистые пластиковые бутылки объемом 1-1,5 литра с вентиляционными отверстиями маленького диаметра. В сосуд поместить сложенную гармошкой сухую газетную или оберточную бумагу. Сбор имаго проводить в сухую погоду, до наступления наиболее жаркого времени дня.

Имаго в сосудах перевозить, не допуская перегревания. В бутылку объемом 1 л можно собрать 200 особей. После перевозки рассадить насекомых в чашки Петри с поилками и оставить на 1-2 суток для сбора спонтанно отмирающих особей.

Ведение записей и этикетирование контейнеров

Для регистрации выборок ведется отдельный регистрационный журнал, в котором записывается дата сбора, генерация, район и точное место сбора (желательно с указанием геокоординат), количество

собранных особей. На контейнерах указывается номер выборки в соответствии с регистрационным журналом, при необходимости точное количество и пол имаго. На чашках Петри с личинками записывается дата откладки яиц, дата отрождения личинок, даты линек на каждый следующий возраст, исходное число яиц и число личинок каждого возраста. Эти данные суммируются в рабочем журнале.

Контроль качества в поддерживаемых выборках колорадского жука

Регистрация показателей продолжительности жизни и развития

Продолжительность жизни имаго колорадского жука с учетом вероятного наступления диапаузных состояний может колебаться в лабораторных условиях от 1 месяца до 2х- 3х лет. Для достоверного определения ПЖ имаго следует соблюдать маркировку выборок, включающую год формирования выборки. При оценке продолжительности развития, выживаемости на стадии яйца, личинки, куколки необходимо регистрировать все резкие колебания условий содержания выборок (резкие изменения температуры, влажности). При оценке выживания в периоды окукливания и выхода имаго обязательно фиксировать все случаи проявления морфологических отклонений.

Контроль распространения патогенов

При регистрации смертности в контейнерах с личинками обращать внимание на проявления инфекционных заболеваний:

- бактериальные заболевания прижизненно определяются у личинок старших возрастов по изменению окраски внутренних органов и гемолимфы – появляются крупные темные пятна под кутикулой, в полости тела (рис. 3,А).
- микозы, вызванные энтомопатогенными грибами, прижизненно определяются у личинок старших возрастов по появлению большого количества черных пятен на покровах (рис. 3, Б).



А



Б

Рис. 3. Симптомы инфекционных заболеваний у личинок колорадского жука:

А – бактериоз, видны черные сгустки в полости тела и спином сосуде; Б – ранняя стадия микоза, видны черные пятна на покровах.

Вирусные заболевания у личинок старших возрастов могут проявляться как наступление паралича, сопровождающееся увеличением объема брюшка.

Погибшие при бактериальной инфекции куколки и имаго колорадского жука отличаются быстрым потемнением покровов и разложением мягких частей тела (рис.4).



Рис. 4. Гибель имаго колорадского жука с симптомами бактериоза.

Гибель при микозах у куколок и имаго может сопровождаться мумификацией всего тела и посмертным прорастанием гифов гриба на сочленениях покровов (рис.5).

Оценка эффективности репродукции

Для лабораторной культуры колорадского жука определяется плодовитость самок в каждой конкретной выборке за время сезона репродукции. Для оценки эффективности репродукции в цикле характеристики для каждой линии следует периодически составлять таблицы выживаемости, для чего проводят серию наблюдений с оценкой выживания на всех стадиях развития, начиная от яйца до выхода имаго из пупария. По данным таблицы с применением уравнения Холдейна можно оценить смертность в онтогенезе.

Коррекция нарушений качества лабораторных выборок колорадского жука.

Оптимизация условий содержания лабораторных выборок

Снижение жизнеспособности имаго и их репродуктивной активности может быть обусловлено при оптимальной численности содержания недостатками температурного режима, влажности, освещения или особенностями кормовых растений. При повышенной температуре в помещении содержания следует обеспечить хорошую вентиляцию помещения. В этих условиях недопустимо прямое солнечное освещение контейнеров и чашек Петри с насекомыми. При

пониженной температуре (ниже 20°C) возможно прямое освещение солнечным светом контейнеров с тканевыми крышками на непродолжительное (2-3 часа) время. Недостаток влажности следует компенсировать количеством свежего корма и постоянным присутствием поилок (гигростатов). Особенности кормовых растений (сорта картофеля) могут изменять жизнеспособность и репродуктивные показатели колорадского жука. При нарушении размножения, снижении количества откладываемых яиц, повышении смертности на стадии яйца, личинки, молодых имаго следует сменить сорт кормового растения. Для обеспечения успешного прохождения периодов летней и зимней диапаузы необходимо поддерживать в контейнерах и чашках Петри влажность, помещая гигростаты и периодически их заменяя. На время диапаузы следует обеспечить содержание в затемненном помещении или камере (шкафу).

Соблюдение асептики

Появление признаков инфекции в отдельных контейнерах или чашках Петри должно сопровождаться немедленной изоляцией зараженной группы и ее ликвидацией с последующей стерилизацией посуды и дезинфекцией места содержания. Пополняемая культура предполагает возможность заноса инфекционных агентов из природных выборок колорадского жука, что требует обязательного карантинного содержания в специально отведенном месте с частым осмотром, выявлением больных и зараженных особей, их ликвидацией.

III. Соблюдение правил биобезопасности и техники безопасности при работе с лабораторными насекомыми

Использование средств личной безопасности

Перед началом работ в помещении обязательно включить вытяжной шкаф. Помещение должно быть обеспечено проточной водой, электричеством и канализацией. При работе с насекомыми в лабораторном помещении обязательно использовать рабочий халат. Халаты и полотенца обязательно менять не реже 1 раза в неделю. Осмотр садков с мухами, уборку комнаты, подготовку к мытью посуды и садков проводить с использованием перчаток и простых 2-х-слойных тканевых или марлевых масок. Не допускать использование перфорированных перчаток, масок при работе. Для работ с применением кипятка и горячих предметов (стекло, металл) в помещении иметь многослойные прихватки и рукавицы.

Изоляция насекомых

Изоляция групп и отдельных насекомых – обязательное условие содержания лабораторных линий комнатной мухи и культуры колорадского жука. Для обеспечения изоляции линий строго соблюдать соответствие маркировки стаканов и садков при осмотре садков, смене стаканов с субстратом и высаживании вылетевших имаго. При потере маркировки и невозможности ее восстановления стакан подлежит ликвидации. Для надежной изоляции имаго комнатной мухи садки проверять на целостность тканевого футляра при систематическом осмотре (не реже 2х раз в неделю). Выходной рукав садка прочно фиксировать с использованием резиновых или тканевых шнуров. При работе с комнатной мухой садок перед открытием размещать на рабочем столе задней стенкой в сторону наиболее яркого света. У имаго мухи выражен фототаксис, и при таком размещении садка снижается вероятность вылета в помещение. Вылетевшие в помещение насекомые должны быть ликвидированы в самое короткое время. Использование в помещении химических средств ликвидации насекомых запрещается. Допустимо использование ловчих клейких лент без инсектицидных добавок.

Для исключения переноса яиц и личинок комнатной мухи между линиями после проверки каждого стакана с яйцами или личинками обязательно промывать рабочий инструмент (пинцет, скальпель, шпатель) проточной водой.

Для надежной изоляции имаго и личинок колорадского жука при ежедневном осмотре тщательно контролировать целостность контейнеров, тканевых крышек, фиксаторов. При осмотре чашек Петри и контейнеров с имаго и личинками колорадского жука пользоваться специальным поддоном. Все особи, обнаруженные вне контейнеров, должны быть ликвидированы, если есть опасность смешивания разных групп (выборок).

Асептика при содержании насекомых в лаборатории

Постоянное содержание насекомых в искусственных условиях повышает опасность распространения патогенных микроорганизмов – вирусов, бактерий, грибов. Микроорганизмы могут присутствовать постоянно и распространяться с током воздуха в помещениях, а также могут быть занесены с вновь поступившими в лабораторию насекомыми. Система мероприятий, направленных на предупреждение появления и распространения инфекционных заболеваний в лабораторных культурах насекомых, включает профилактику и прямое подавление микроорганизмов. Для профилактики

распространения инфекции в помещении, где содержатся насекомые, следует отвести для карантинного содержания отдельный шкаф или камеру. Все используемые садки и контейнеры перед употреблением проверять на целостность.

Чистую посуду, садки, контейнеры, инструментарий хранить в постоянных специально отведенных местах, периодически подвергающихся уборке и дезинфекции моющими средствами и гипохлоритом натрия.

При осмотре стаканов и контейнеров с личинками комнатной мухи обращать внимание на появление больных особей и нарушение нормальной структуры субстрата, гнилостный запах, возникновение бактериальных пленок или колоний грибов на поверхности и у стенок стаканов. Для определения возбудителей заболеваний можно пользоваться определительной таблицей [Монастырский, Горбатовский, 1991, с. 160-161]. Обнаруженные больные насекомые подлежат немедленной выбраковке и ликвидации. Для ликвидации отводится специальный контейнер, впоследствии стерилизуемый сухим жаром или кипячением.

Поверхность субстрата в стакане с личинками и яйцами комнатной мухи при появлении грибных колоний можно обработать фунгистатиком (нистатин, 0.03%; бензойная, сорбиновая кислоты – см. справочник Монастырского и Горбатовского, 1991). Для ликвидации бактериального заражения можно использовать 0.02% раствор тетрациклина. При значительном количестве погибших особей весь контейнер подлежит ликвидации.

Уборка в помещении (мытьё пола, рабочих столов) проводится не реже 3х раз в неделю. Дезинфекция полок и шкафов для содержания садков и контейнеров с насекомыми проводится не реже 1 раза в 2 недели. Для мытья посуды разного назначения необходимо выделить отдельные емкости.

Тканевые футляры, крышки контейнеров, фиксаторы перед стиркой замочить с гипохлоритом натрия в горячей воде на 30 минут. Сменить на воду с добавкой средства с ПАВ, после стирки тщательно прополоскать, высушить и пастеризовать в термостате. Для тканевых крышек и малых садков использовать разные емкости для хранения.

Пластиковые контейнеры и чашки Петри, поилки, кормушки перед мытьем замочить с гипохлоритом натрия и средством для мытья с ПАВ. После тщательного полоскания высушить и пастеризовать в термостате (+65°C, не менее 6 часов).

Стеклопосуду и металлические инструменты мыть горячей водой со средством для мытья. После просушки стерилизовать в жарочном шкафу.

Ликвидируемые остатки корма, субстрата, ватные фильтры упаковать в целые пластиковые мешки соответствующего объема. Не допускать хранение грязной посуды в открытом виде. Всю собранную при осмотре садков и стаканов посуду, освобожденные садки, стаканы и контейнеры мыть немедленно после завершения осмотра либо помещать в закрытую емкость с дезинфицирующим раствором, если мытье проводится на следующий день.

Список литературы

1. Беньковская Г.В. Возможности и ограничения изменений продолжительности жизни в лабораторном эксперименте // Успехи геронтологии. 2010. Т.23. №3. С. 442-446.
2. Беньковская Г.В., Никоноров Ю.М., Китаев К.А. и др. Мониторинг резистентности к пестицидам в популяциях вредных членистоногих. Методические рекомендации. СПб-Пушкин: ВИЗР. 2013. С. 144-148.
3. Маркина Т.Ю., Беньковская Г.В. Механизмы поддержания гомеостаза в лабораторных популяциях насекомых // Экология. 2015. №4. С. 294-299.
4. Монастырский А.Л., Горбатовский В.В. Массовое разведение насекомых для биологической защиты растений: Справочник. М.: Агропромиздат, 1991. 240 с.
5. Никоноров Ю.М., Беньковская Г.В. Механизмы поддержания полиморфизма по продолжительности жизни в лабораторных линиях комнатной мухи //

Успехи геронтологии. 2013. Т.26. №4. С. 594-600.

6. Новожилов К.В. (ред.). Технология и методы оценки побочных эффектов от пестицидов (на примере преодоления резистентности колорадского жука к инсектицидам). СПб. 2006. 52 с.
7. Рославцева С.А. Методы определения инсектоакарицидной активности и методы разведения биотестов в лабораторных условиях. М.: НИИТЭХИМ, 1978. 32 с.
8. Рекомендации ВОЗ по разработке СОП внедрения контроля качества для лабораторных исследований (<http://extranet.who.int/lqsi.ru>)
9. Butler S.M., Moon R.D., Hinkle N.C. et al. Gonotrophic development and survival in field populations of *Musca domestica* (Diptera: *Muscidae*) at dairies in California, Minnesota, and Georgia, and the relationship of fly age to relative abundance of (Z)-9-tricosene (muscalure) // J. Med. Entomol. 2013. V. 50. No.4. P. 748-757.
10. Ohnishi T. Life science experiments performed in space in the ISS/Kibo facility and future research plans // J. Radiat. Res. 2016 Aug; 57(Suppl 1): i41-i46.
11. Reed D.H., Bryant E.H. The evolution of senescence under curtailed life span in laboratory populations of *Musca domestica* (the housefly) // Heredity. 2000 V. 85 (Pt 2). P. 115-121.
12. Reed D.H., Bryant E.H. Phenotypic correlations among fitness and its components in a population of the housefly // J. Evol. Biol. 2004 V.17. No.4. P. 919-923.

PRINCIPLES OF MAINTAINING THE LABORATORY STRAINS OF INSECTS

Benkovskaya G.V.

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Centre of RAS, Ufa,
e-mail: bengal2@yandex.ru

Resume

The rules presented of maintaining the strains and excerpts of house fly and Colorado potato beetle under the laboratory conditions. The method of selection in the strains of house fly by the sign of life span described. Section included of adherence the biosafety and self-safety methods during the manipulations with laboratory insects.

KEY WORDS: laboratory strains, insect culture, housefly, *Musca domestica*, Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*