

УДК 595.773.4;575.826;574.24;574.23

МОРФОЛОГИЯ ЛИЧИНОК МУХ-БЕРЕГОВУШЕК *EPHYDRA RIPARIA* И *PARACOENIA FUMOSA* (DIPTERA: EPHYDRIDAE) И АДАПТАЦИЯ ДВУКРЫЛЫХ К ПОВЫШЕННОЙ СОЛЕННОСТИ

© 2023 г. Е. Ю. Яковлева¹*, Е. Б. Наймарк², Д. Д. Сивунова¹,
М. Г. Кривошеина³, А. В. Марков^{1,2}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

²Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка РАН
ул. Профсоюзная, 123, Москва, 117997 Россия

³Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН
Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

*E-mail: e.u.yakovleva@gmail.com

Поступила в редакцию 22.11.2022 г.

После доработки 01.12.2022 г.

Принята к публикации 06.12.2022 г.

Личинки многих видов мух-береговушек (сем. Ephydridae) адаптированы к жизни в воде с высокой, а иногда экстремально высокой соленостью. О морфологических и физиологических основах такой адаптации известно немного. В настоящем исследовании описаны детали морфологии личинок 3-го возраста двух видов мух-береговушек *Ephydra riparia* и *Paracoenia fumosa* (сем. Ephydridae) и приведены их изображения, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). С помощью окрашивания нитратом серебра и СЭМ удалось впервые показать наличие у личинок обоих изучаемых видов анальных органов (АО) — специализированных структур, выполняющих осморегуляторную функцию и отвечающих за транспорт ионов из окружающей среды в гемолимфу личинки (но не в обратном направлении). Проведено сравнение морфологии личинок изученных видов с другими видами мух-береговушек из родов *Ephydra*, *Paracoenia*, *Hydrellia*, *Coenia*, а также с личинками модельного вида *Drosophila melanogaster* (сем. Drosophilidae). Особое внимание уделено морфологии АО, которые, по-видимому, вносят вклад в адаптацию личинок к повышенной солености. У экстремально галофильных эфидрид АО либо вовсе отсутствуют, либо развиты слабо, в то время как у умеренно галофильных эфидрид сильнее развиты признаки, связанные с проницаемостью кутикулы АО и активным транспортом ионов. У пресноводных эфидрид эти признаки получают наибольшее развитие. Активность АО может варьировать за счет формы и площади АО, гладкости или сморщенности кутикулы и наличия наноямок на ней. Обнаруженная изменчивость, вероятно, является адаптивной, поскольку при высокой окружающей солености как проницаемость кутикулы АО, так и активный транспорт ионов из окружающей среды становятся менее полезными или даже вредными.

DOI: 10.31857/S0044459623030077, EDN: BACMGF

Эфидриды — семейство двукрылых, отличающееся высоким видовым разнообразием и насчитывающее около 2000 видов (Pape et al., 2011; Courtney et al., 2017). Их разнообразие связано с чрезвычайно широким спектром адаптаций к самым различным средам, в том числе и экстремальным. Среди них есть виды, предпочитающие высокую соленость, пресные воды, содовые озера и даже нефтяные лужи. Некоторые виды рода *Ephydra* являются, по-видимому, самыми галотолерантными и галофильными среди насекомых, развивающихся в воде. *Ephydra gracilis* и *E. hians* выживают даже в насыщенном солевом растворе,

когда соль выпадает в виде кристаллов (Aldrich, 1912; Beyer, 1939; Herbst, 1988). В столь экстремальных условиях могут процветать немногие многоклеточные, поэтому из-за отсутствия конкуренции эти мухи достигают столь высокой численности (в Большом Соленом озере продукция *E. gracilis* — до 50 г биомассы на 1 м² в год), что служит важным пищевым ресурсом для птиц, а в прошлом и для коренных индейцев (Aldrich, 1912). Водные личинки других эфидрид развиваются в умеренно соленых, солоноватых, а также пресных водоемах. Таковы, например, растительноядные пресноводные личинки южноазиатского ви-

да *Hydrellia pakistanae*, используемые для биологического контроля инвазивного пресноводного растения *Hydrilla verticillata* (Durham, Grodowitz, 2012). Таким образом, эфидриды приспособились к полному спектру соленостей, который может предложить природа.

Удивительно, что столь разные адаптации выработались в пределах одного семейства. Ясно, что это семейство обладает чрезвычайно широкой экологической пластичностью, в том числе по отношению к средам с различающейся соленостью, поэтому это эволюционно молодое семейство (Mathis, Zatzwornicki, 1995) является интересным объектом для изучения адаптивной эволюции. Однако данных по эволюции эфидрид и их адаптации к различной солености немного. Внимание ученых в основном сфокусировано на описании экстраординарных феноменов, таких как приспособление к жизни в асфальтовых лужах у “нефтяной мухи” *Diaemocera petrolei* (Thorpe, 1930; Kadavy et al., 1999), или на изучении биологии хозяйственно важных видов, таких как *H. pakistanae*. Выяснению адаптационных механизмов в этой группе, в том числе связи морфологии личинок с адаптацией к различной солености, посвящено совсем немного работ (Beyer, 1939). При этом изучение эволюционной пластичности требует более цельной картины, основанной в том числе на детальных морфологических данных по личинкам. Есть основания полагать, что в морфологии личинок можно найти указания на адаптацию к тому или иному уровню солености. Например, Байер (Beyer, 1939) показал, что относительная длина дыхательной трубки (сифона) у личинок и куколок *Ephydra* связана с соленостью положительной зависимостью.

Для многих видов двукрылых близких к эфидридам семейств, включая модельный вид *Drosophila melanogaster* (сем. Drosophilidae), характерно наличие рядом с анальным отверстием специализированных органов, выполняющих осморегуляторные функции и называемых, в зависимости как от их строения, так и от традиций морфологических описаний в разных группах двукрылых, анальными органами (АО), анальными папиллами, анальными подушками и др. Размер АО в ряде случаев отрицательно коррелирует с соленостью среды (Wigglesworth, 1933; Te Velde et al., 1988). Уоддингтон (Waddington, 1959) получил обратный результат, но, по-видимому, вместо АО он измерял область, расположенную между АО, непосредственно вокруг анального отверстия, которая неизбежно должна сокращаться вслед за растягиванием АО при понижении солености среды (Te Velde et al., 1988). При этом данных по строению (и даже просто по наличию) АО у эфидрид крайне мало.

В этой работе мы предлагаем описание деталей морфологии и полученные при помощи сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) изображения личинок 3-го возраста двух широко распространенных видов эфидрид, *E. riparia* и *Paracoenia fumosa*, дополняющие опубликованные ранее морфологические данные (Beyer, 1939; Krivosheina, 2003). Ранее личинки этих видов изучались только при помощи световой микроскопии. Более детальные данные по внешней морфологии личинок опубликованы пока лишь для единичных видов эфидрид. Мы обсуждаем эти морфологические данные, в том числе данные по строению АО, в контексте поиска морфологических особенностей, так или иначе связанных с адаптацией к соленой среде и проливающих свет на возможные механизмы такой адаптации.

E. riparia и *P. fumosa* являются типичными обитателями морских побережий, где их личинки встречаются в прибрежных лагунах, мелких заливах и литоральных лужах. Они относятся к умеренно галофильным представителям эфидрид, и при этом они весьма галотолерантны. Их личинки выдерживают широкий диапазон солености — от континентальных водоемов с соленостью до 70‰ (Beyer, 1939) и нормальной морской солености до пресной воды. В пресных водоемах личинки *P. fumosa* могут нормально развиваться, а личинки *Ephydra* выживают, но не могут нормально завершить свое развитие (Krivosheina, 2003). Несмотря на сходный спектр местообитаний и диету (основу которой составляют водоросли и цианобактерии), личинки этих двух видов заметно различаются по образу жизни и морфологии: личинки *E. riparia* — представители эпифауны, активно передвигающиеся по поверхности твердых субстратов при помощи ложных ножек (prolegs) с когтеобразными шипами (spinules), с относительно короткой дыхательной трубкой, тогда как личинки *P. fumosa* — скорее представители инфауны, живущие преимущественно в толще субстрата, без ложных ножек и с более длинной дыхательной трубкой.

В связи с особенностями образа жизни личинок изучаемых видов поверхность их тела покрыта глиной и илом, слизью, бактериальными пленками и диатомовыми водорослями. Для изучения тонких морфологических структур личинок перед нами стояла задача разработать методы их отмывки от загрязнения, чтобы не повредить нежные покровы и внешнюю морфологию. В настоящей работе описание деталей морфологии личинок мух-береговушек *E. riparia* и *P. fumosa* мы сопровождаем протоколом их очистки от органических и неорганических загрязнений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Описание мест обитания мух-береговушек

Личинки 3-го возраста мухи *E. riparia* были собраны у побережья Белого моря вблизи Беломорской биологической станции МГУ им. Н.А. Перцова (66.553° с.ш., 33.090° в.д.) в луже с илистыми черными донными отложениями с высоким содержанием сероводорода. Во время прилива в водоем поступает соленая вода из Белого моря, в то же время в него стекает небольшой пресный ручей из леса, поэтому соленость в водоеме колеблется, и в отдельные моменты вода может быть почти пресной.

Личинки 3-го возраста мухи вида *P. fumosa* были собраны на литорали Белого моря, также вблизи Беломорской биологической станции МГУ им. Н.А. Перцова. Личинки развиваются в черных илистых отложениях с большим содержанием сероводорода. Во время отлива местообитания не покрыты водой, но остаются влажными, во время прилива — высоко покрыты соленой водой Кандалакшского залива.

Описание линий Drosophila melanogaster

В настоящем исследовании АО личинок мух-береговушек сопоставлены с АО личинок лабораторных линий *D. melanogaster*, содержащихся на корме с разной осмолярностью:

— контрольная линия, содержащаяся на нормальном лабораторном корме (60 г инактивированных дрожжей, 35 г манной крупы, 50 г сахара, 45 г измельченного изюма, 8 г агара, 2 г пропионовой кислоты на 1 л корма);

— линия, содержащаяся на соленом субстрате (нормальный корм с добавлением 7% NaCl);

— линия, содержащаяся на корме с пониженной осмолярностью на основе крахмала (60 г инактивированных дрожжей, 30 г крахмала, 8 г агара, 2 г пропионовой кислоты на 1 л корма).

Все три линии содержатся в лаборатории на кафедре биологической эволюции биологического факультета МГУ и берут свое начало от исходной популяции мух *D. melanogaster*, полученной в начале сентября 2014 г. от 30 диких особей, пойманных на юго-западе г. Москвы (Горшкова и др., 2018).

Очистку личинок, изъятых из корма, проводили в полипропиленовых пробирках объемом 25 мл с завинчивающейся плоской крышкой. Живых личинок промывали в проточной воде, ошпаривали горячей водой (80–90°C), охлаждали, затем в течение 3 мин обрабатывали в 5%-м растворе КОН, после чего снова промывали четыре–пять раз проточной водой, а последний раз — споласкивали дистиллированной водой. Далее личинок по-

следовательно фиксировали этанолом (30–50–70%).

Методы очистки личинок мух-береговушек

Очистку личинок проводили в полипропиленовых пробирках объемом 25 мл с завинчивающейся плоской крышкой. Живых личинок 3-го возраста *E. riparia* и *P. fumosa* промывали в пресной воде, затем три раза в растворе детергента (1 : 40) и три–четыре раза ополаскивали пресной водой. На следующем этапе личинки ошпаривались горячей водой (80–90°C), чтобы расслабить мышцы и выправить голову и дыхательную трубку из соответствующих сегментов. Это позволяет изучить микроструктуры на переднем и заднем концах тела личинки. Охлажденные личинки обрабатывались 2%-м раствором пирогосфата в течение 1–1.5 ч при комнатной температуре (20°C), затем 5 мин в ультразвуковой ванне (YA XUN YX2000A с рабочей частотой 42 кГц и мощностью 50 Вт), три–четыре раза промывались пресной водой и обрабатывались 5%-м раствором КОН в течение 5 мин. После обработки КОН удаляли путем промывания личинок пресной водой четыре–пять раз, а последний раз — споласкивали дистиллированной водой. Далее личинок последовательно фиксировали этанолом (30–50–70%).

Данный протокол отмывки личинок мух *E. riparia* и *P. fumosa* был разработан в процессе исследования, так как представленные в литературе подходы к удалению органических и неорганических загрязнений, в то числе с помощью только ультразвука или применения различных концентраций КОН, не позволяли достичь желаемого результата (Schneeberg et al., 2017).

Подготовка препаратов для сканирующей электронной микроскопии

Образцы личинок эфидрид и дрозофил, зафиксированные в 70% этаноле, обезжизивались путем серии проводок: 95.6% этанол, смесь 95.6% этанола и 100% ацетона, 100% ацетон два раза (длительность каждого этапа составляла 30 мин), — и высушивались при критической точке на приборе Hitachi Critical Point Dryer HCP-2 (Hitachi, Япония). Высушенные образцы наклеивались на алюминиевые столики и напылялись сплавом золота и меди (Eiko IB-3, Eiko, Япония). Изображения были получены с помощью сканирующих электронных микроскопов Jeol JSM-7000 (Jeol, Япония) с использованием программного обеспечения JEOL JCM-7000 и TESCAN VEGA-II XMU (Брно, Чехия) и программного обеспечения TESCAN Essence. Изображения обрабатывались в программе GIMP.

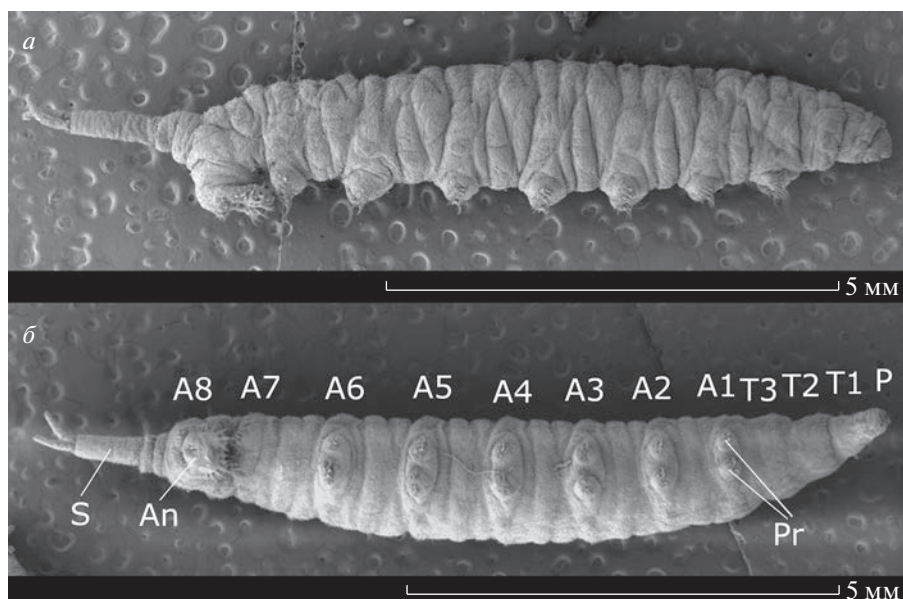


Рис. 1. Личинка 3-го возраста мухи *E. riparia*: а — вид сбоку, б — вид снизу. An — анальное отверстие, A1–A8 — восемь брюшных сегментов, P — псевдоцефалон, Pr — ложные ножки, S — сифон, T1–T3 — три грудных сегмента.

Окрашивание АО нитратом серебра

Анальные органы окрашивали по методу, описанному в статье Глора и Чена (Gloor, Chen, 1950). Живых личинок 3-го возраста *E. riparia* и *P. fumosa* промывали в пресной воде, а затем ошпаривали горячей водой (80–90°C). Охлажденных личинок погружали на 15 мин в 1%-й раствор AgNO_3 и выставляли на солнечный свет на 20–30 мин до окрашивания их анальных органов в чернильный цвет (вместо солнечного света можно помещать образцы на то же время под ультрафиолетовую лампу). После этого личинок промывали в пресной воде, чтобы предотвратить окрашивание всей поверхности тела.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Описание личинки 3-го возраста мухи-береговушки *Ephydra riparia*

Личинка мухи-береговушки *E. riparia* имеет типичную для представителей рода *Ephydra* форму — удлинённую, почти цилиндрическую, сужающуюся к обоим концам. Тело личинки состоит из 12 сегментов: головного сегмента (псевдоцефалона), способного втягиваться в грудные сегменты, трех грудных сегментов (T1–T3), лишенных ложных ножек, и восьми брюшных сегментов (A1–A8), каждый из которых несет пару ложных ножек. Последний сегмент брюшка A8 несет разветвленную дыхательную трубку (сифон) на дорсальной стороне, самую большую пару ложных ножек на вентральной стороне и анальное отверстие позади ложных ножек, окруженное АО (рис. 1).

Длина тела личинки с вытянутой дыхательной трубкой в среднем составляет 11.19 мм (от 9.79 до 12.15 мм, $n = 3$), длина дыхательной трубки — 2.26 мм (от 1.94 до 2.76 мм, $n = 3$), длина тела от головы до конца восьмого брюшного сегмента (там, где заканчиваются АО) в среднем составила 8.94 мм (от 7.72 до 10.22 мм, $n = 3$).

Псевдоцефалон несет сложный набор сенсорных и ротовых структур (рис. 2). Мандибулы (ротовые крючки, oral hooks) обращены концами вниз и движутся сверху вниз во время кормления, что характерно для личинок круглошовных мух (Cyclorhapha). Кончики ротовых крючков сильно зазубрены. Это отличает их от личинок мух *E. hians*, у которых кончики ротовых крючков тупые и закругленные (Cash-Clark, Bradley, 1994) (рис. 2б, в). Область над ротовым отверстием несет многочисленные цирры (ротовые папиллы, oral papillae), уплощенные и гребенчатые на дистальном конце. Цирры расположены горизонтальными рядами, причем каждый ряд имеет немного различную морфологию. Медиально, над ротовыми крючками, расположены три ряда цирр. Самый верхний, расположенный между максиллярными органами (maxillary sensory organs = terminal organs), содержит четыре папиллы с довольно тонкими стебельками и небольшими уплощенными гребенчатыми концами. Второй ряд образован папиллами с более толстыми стебельками и более широкими кончиками; этот ряд расположен латерально, папиллы постепенно уменьшаются дистально от средней линии; под ними по обеим сторонам рта добавляются еще три горизонтальных ряда толстых папилл. Третий

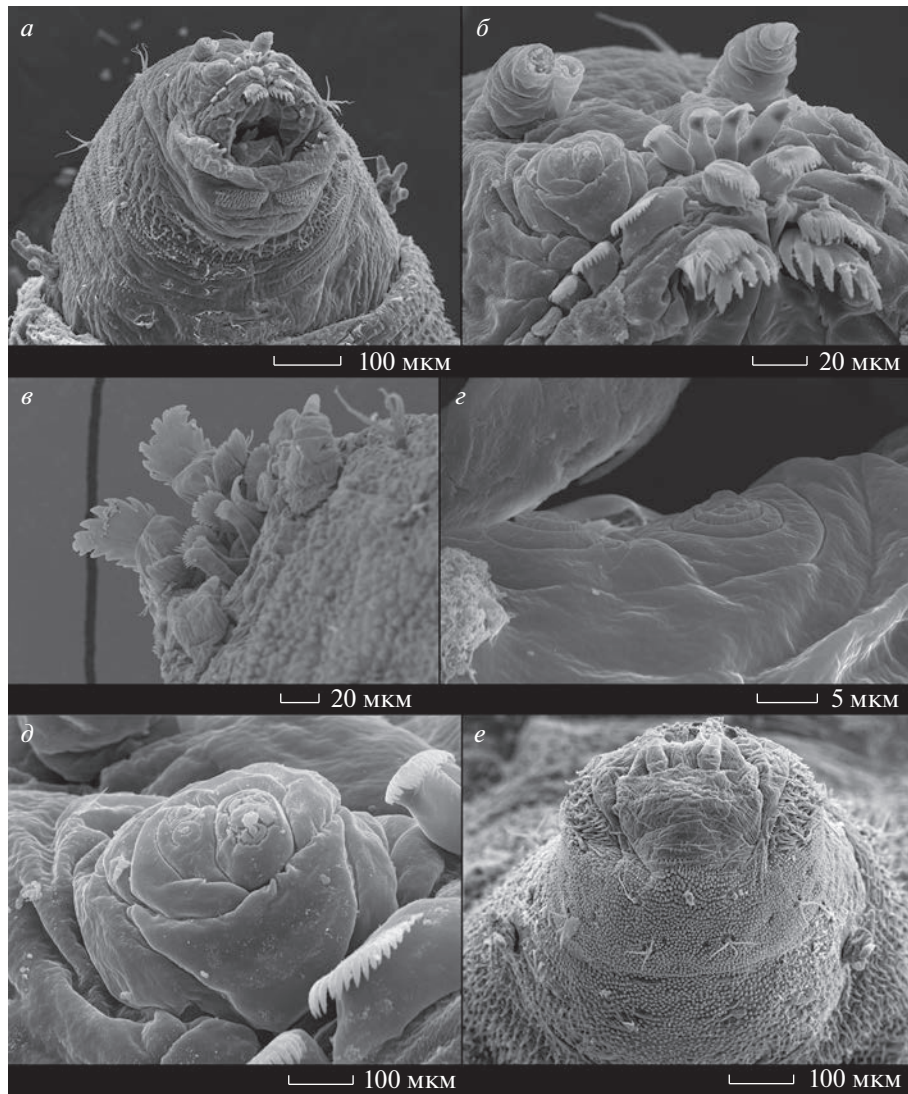


Рис. 2. Псевдоцефалон личинки 3-го возраста мухи *E. riparia*. *a* – псевдоцефалон, вытянутый из грудных сегментов; видны ротовые, сенсорные структуры и передние дыхальца (расположенные на первом грудном сегменте) с тремя пальцевидными выростами. *б* – увеличенный вид верхней части головы; видны антенны, максиллярные органы, три ряда цирр разной формы и зазубренные ротовые крючки под ними. *в* – вид сверху на зубчатый кончик ротовых крючков. *г* – сложные сенсиллы на нижней стороне ротового отверстия. *д* – максиллярный (= терминальный) орган с двумя отчетливыми наборами сенсилл. *е* – вид псевдоцефалона и первого грудного сегмента сверху.

(самый нижний) ряд содержит только две плоские, широкие, гребенчатые папиллы, расположенные непосредственно над ротовыми крючками.

В полости рта на нижней стороне глотки расположены две сложные сенсиллы в форме бугорка, окруженного рядом расширяющихся ободков (рис. 2*г*), по-видимому, это органы вкуса.

Пара максиллярных (терминальных) органов расположена дорсально относительно ротового отверстия (рис. 2*д*). Каждая из органов содержит две группы сенсилл, каждая из которых окружена уплощенным гребнем. Дорсолатеральная группа содержит две сложные сенсиллы (compound sensilla), состоящие из центрального бугорка (central

tubercle) и обода (rim). В вентромедиальную группу входят три сложные сенсиллы и две простые сенсиллы (simple sensilla) – бугорки без ободка. Это отличает максиллярный орган *E. riparia* от максиллярного органа дрозофилы, у которой все семь сенсилл (пять сложных и две простые) расположены вместе и окружены одним кольцевым гребнем (Wipfler et al., 2013; Apostolopoulou et al., 2015).

Антенны, или антеннальные органы (antennal organs), личинок *E. riparia* удлинённые, двухчленные и расположены дорсально относительно пары максиллярных органов, что характерно для эфидрид и отличает их от дрозофил, у которых

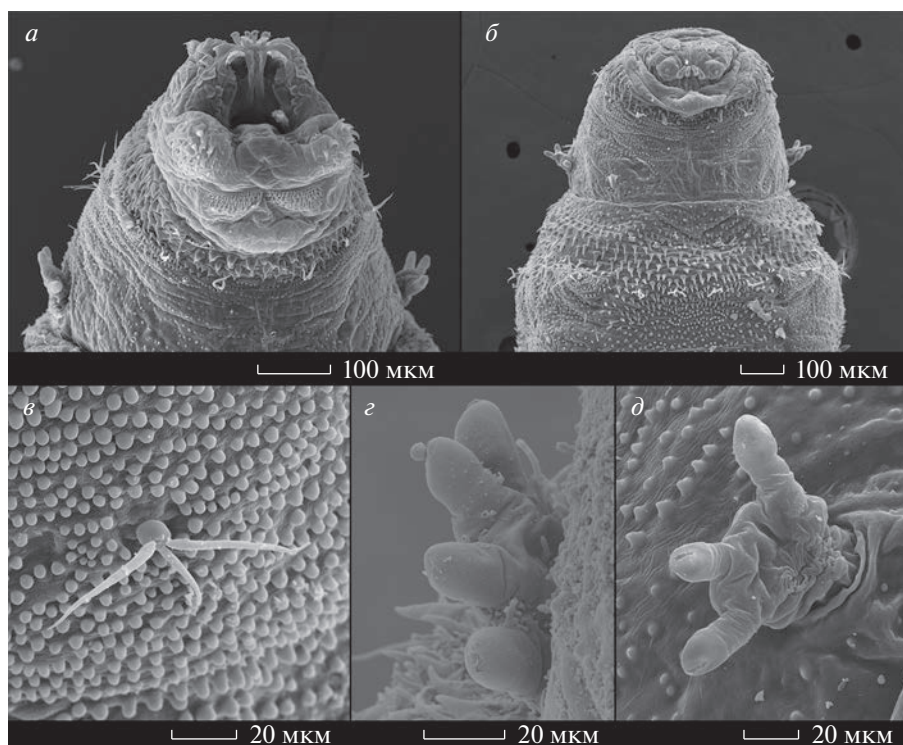


Рис. 3. Личинка 3-го возраста мухи *E. riparia*. *a* — вид снизу вытянутого псевдоцефалона и первого грудного сегмента; видны шипики, ряд лучевидных сенсилл и “трехпалые” дыхальца на первом грудном сегменте. *б* — первый и второй грудные сегменты с вентральной стороны. *в* — увеличенное изображение лучевидной сенсиллы, расположенной на втором грудном сегменте позади дыхальца. *г* — “четырепальное” переднее дыхальце. *д* — “трехпальное” дыхальце со щелевидными отверстиями на конце каждого из пальцевидных выростов.

антеннальные органы короткие, дистальный членик имеет шаровидную форму, а базальный выглядит как невысокая подставка под него (Wipfler et al., 2013; Apostolopoulou et al., 2015) (рис. 2б).

Дорсальная поверхность псевдоцефалона гладкая и покрыта лишь несколькими шипиками (рис. 2е). На вентральной поверхности (видимой, только когда псевдоцефалон полностью вытянут из грудных сегментов) латерально к заднему краю ротового отверстия расположены два участка больших изогнутых заостренных когтевидных шипиков (или щетинок), а также два участка крошечных уплощенных гребневидных направленных вперед шипиков, расположенных позади рта (рис. 3а).

Грудные сегменты лишены ложных ножек, у переднего края каждого сегмента вентрально и латерально расположены довольно крупные заостренные шипики, а в других местах сегментов — более мелкие притупленные шипики, последние более многочисленны дорсально, чем вентрально (рис. 3а, б). На поверхности сегментов расположены многочисленные тонкие структуры (скорее всего, механорецепторы), которые называют или лучевидными сенсиллами (rayed sensilla), или разветвленными щетинками (branched setae) в опи-

саниях других личинок эфидрид (рис. 3в). Лучевидные сенсиллы обычно располагаются в один ряд в передней части каждого грудного сегмента, за исключением дорсальной части первого грудного сегмента, где они располагаются в два ряда. Внешне они напоминают органы Кейлина (Keilin's organs) личинок дрозофилы (хотя обычно на сегмент приходится только одна пара органов Кейлина, расположенных в глубоких кутикулярных ямках), которые функционируют как механорецепторы и считаются гомологичными ногам взрослых особей. Первый грудной сегмент также несет пару передних дыхалец с тремя (иногда четырьмя) пальцевидными выростами и щелью на вершине каждого из них (рис. 3г, д).

Брюшные сегменты несут ложные ножки на вентральной стороне, со спинной стороны личинка покрыта участками плоских пигментированных чешуек, образующих узор (рис. 4а, б). Ложные ножки сегментов А1–А7 несут крупные когтеобразные шипы, загнутые назад (рис. 4в); ложные ножки последнего брюшного сегмента А8 самые крупные, их когтеобразные шипы загнуты вперед (рис. 4г). Это необходимо для того, чтобы личинка могла захватить стебель травы ложными ножками на сегментах А7 и А8 во время окукливания (рис. 1а).

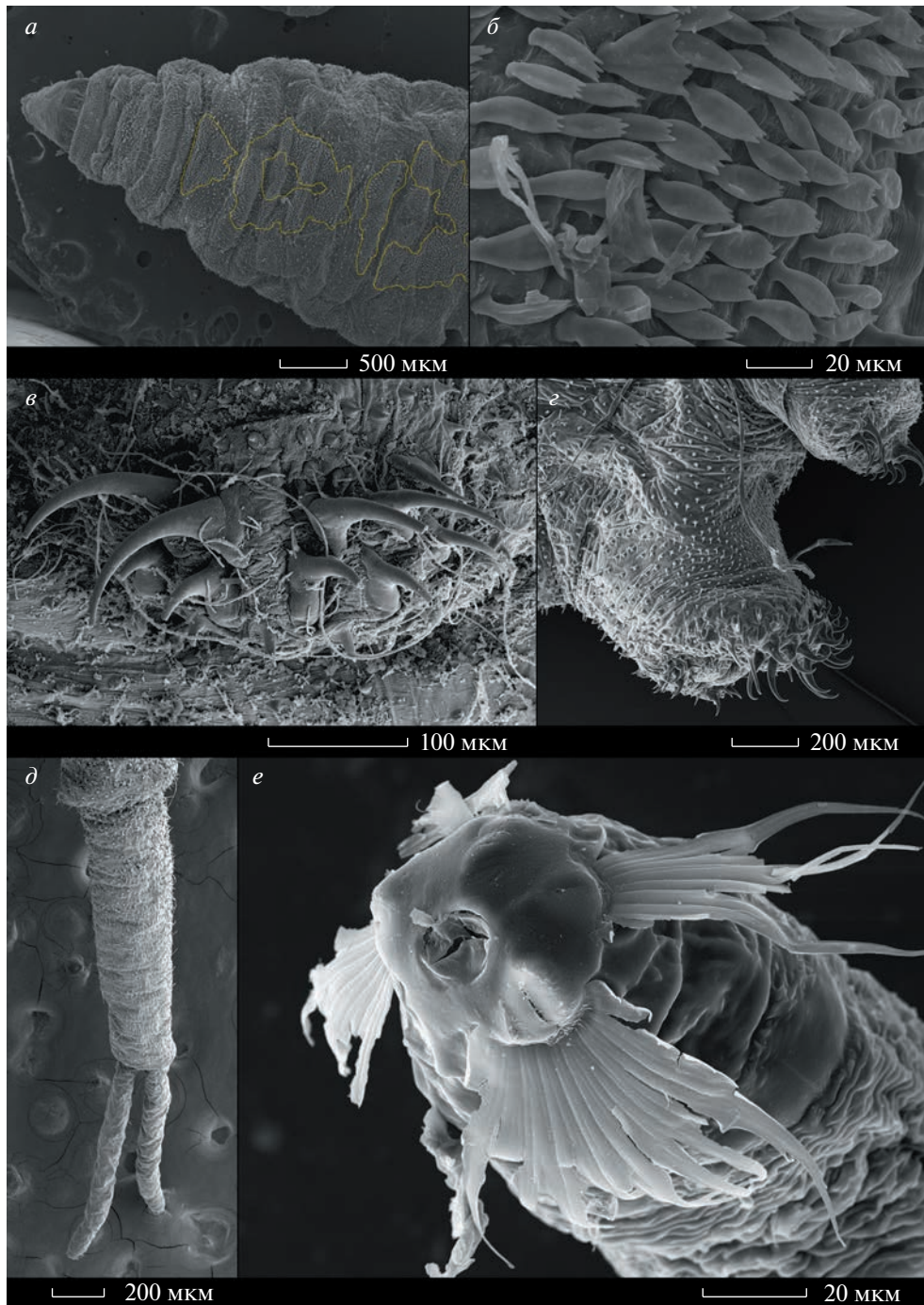


Рис. 4. Личинка 3-го возраста мухи *E. riparia*. *a* — вид передней части тела сверху; участки пигментированных чешуек обведены желтым цветом. *б* — увеличенный вид плоских чешуек на дорсальной стороне брюшного сегмента. *в* — ложная ножка, вид снизу. *г* — вид сбоку на ложные ножки седьмого и восьмого брюшных сегментов; видны когтеобразные шипы, загнутые друг к другу. *д* — дыхательная трубка (сифон). *е* — кончик одной из ветвей разветвленной дыхательной трубки (дыхательная пластинка) с круглым перепончатым отверстием, четырьмя щелями и четырьмя разветвленными пластинками для удерживания на поверхности воды.

Разветвленная дыхательная трубка (сифон) расположена на конце последнего брюшного сегмента A8 и может в него втягиваться. На притупленном, слегка выпуклом конце каждой ветви,

именуемом дыхальцевой пластинкой (spiracular plate), имеется округлое, прикрытое мембраной отверстие и четыре радиально ориентированные щели (рис. 4д). Напротив каждой щели распо-

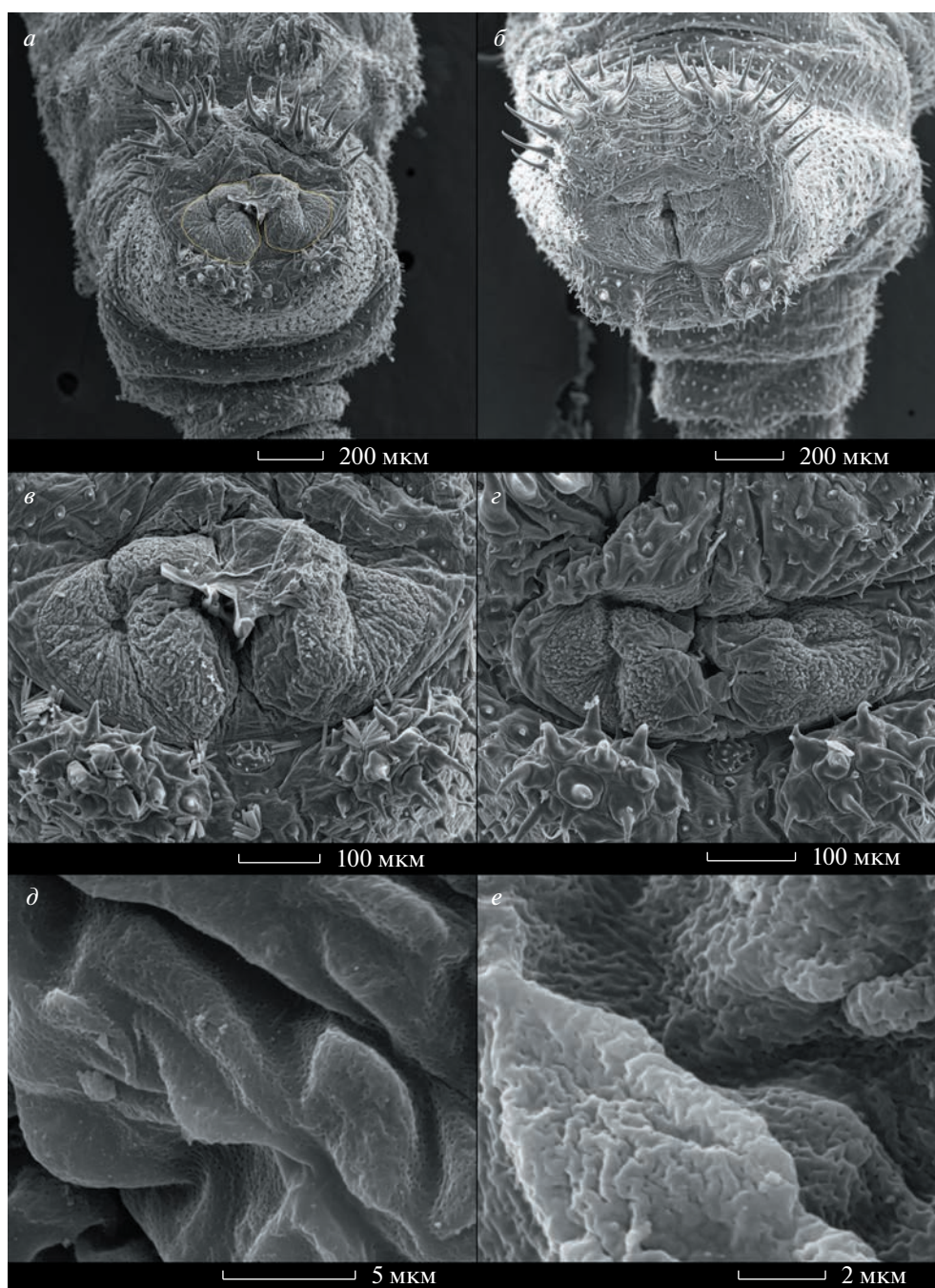


Рис. 5. Анальные органы личинки 3-го возраста мухи *E. riparia*. *a–г* — общий вид; АО обведены желтым на рис. *a*; виден постанальный шиповидный бугорок; на рис. *в* видно несколько диатомовых водорослей, прилипших к кутикуле сзади от АО. *д–е* — наноямки (около 100 нм) на морщинистой поверхности кутикулы АО.

жена плоская, тонкая, ветвящаяся пластинка (branching lamina, также используются термины “palmate seta” или “webbed hydrofuge lamella”), которая служит для удержания кончика дыхальца на поверхности воды (рис. 4е).

Анальное отверстие (иногда называемое анальной щелью у эфидрид и других двукрылых,

поскольку обычно оно имеет щелевидную форму) расположено на последнем брюшном сегменте А8 позади оснований ложных ножек. Два серповидных АО расположены симметрично слева и справа от анальной щели (рис. 5а–г). Чтобы прояснить функции АО, был использован стандартный метод их окрашивания раствором нитрата серебра, который проникает через кутикулу АО,



Рис. 6. Личинка 3-го возраста мухи *P. fumosa*: *a* – вентролатеральная проекция, *б* – вид сверху. An – анальное отверстие, A1–A8 – восемь брюшных сегментов, P – псевдоцефалон, S – сифон, T1–T3 – три грудных сегмента.

связывается с ионами хлора и после облучения солнечным светом и/или ультрафиолетом образует частицы серебра, которые окрашивают АО в темно-чернильный цвет, тогда как другие части тела личинки остаются неокрашенными. Это дает основания предполагать, что у *E. riparia* АО выполняют осморегуляторную функцию (через них происходит транспорт ионов из окружающей воды в АО), как и у дрозофил и многих других двукрылых. Ранее наличие функциональных АО у эфидрид было подтверждено (путем окрашивания серебром) только для мухи *Hydrellia pakistanae*, личинки которой развиваются в пресной воде (Durham, Grodowitz, 2012).

Кутикула АО у *E. riparia* сильно морщинистая (так же, как и у *H. pakistanae*) и имеет многочисленные наноямки диаметром около 100 нм (рис. 5*д*, *е*). Ямки такого же размера и плотности типичны для АО дрозофилы и были замечены у *H. pakistanae*. Вероятно, они связаны с участием АО в ионном транспорте (Jarial, 1987).

Описание личинки 3-го возраста мухи-береговушки *Paracoenia fumosa*

Тело личинки *P. fumosa* имеет веретеновидную форму и состоит из 12 сегментов: перепончатого псевдоцефалона, способного вытягиваться в грудные сегменты, трех безногих грудных сегментов (T1–T3) и восьми безногих брюшных сегментов (A1–A8). Последний брюшной сегмент A8 заканчивается длинной втяжной разветвленной дыха-

тельной трубкой, расположенной дорсально, и анальным отверстием на вентральной стороне. Длина тела личинки с вытянутой дыхательной трубкой в среднем составляет 11.14 мм (от 9.63 до 12.5 мм, $n = 4$), длина дыхательной трубки – 3.56 мм (от 2.88 до 4.65 мм, $n = 3$), длина тела от головы до конца восьмого брюшного сегмента (там, где заканчиваются анальные органы) в среднем составила 7.16 мм (от 6.76 до 7.85 мм, $n = 3$).

Покровы личинки полупрозрачны, благодаря чему видны внутренние пигментированные структуры и система трахей. Кутикула довольно равномерно покрыта мелкими пигментированными шипиками в задней части тела (начиная от сегмента A6 вентрально и примерно от A4 дорсально); на грудных и передних брюшных сегментах шипики приурочены преимущественно к передней вентральной и передней латеральной частям сегмента, остальные части сегментов голые. Все шипики, покрывающие тело личинки, однородные, нет плоских чешуек, формирующих узор. Плотность шипиков постепенно увеличивается от грудных сегментов к заднему концу тела (рис. 6).

Псевдоцефалон разделен на две половины (доли) отчетливой прямой продольной бороздой (рис. 7*а*). Набор органов чувств *P. fumosa* аналогичен таковому у *E. riparia*, максиллярные (терминальные) органы у личинок двух видов имеют сходную морфологию (рис. 2*д* и 7*в*), в то же время *P. fumosa* имеет ряд отличий. Ее антенны трехчлениковые, тогда как у *E. riparia* они двухчленико-

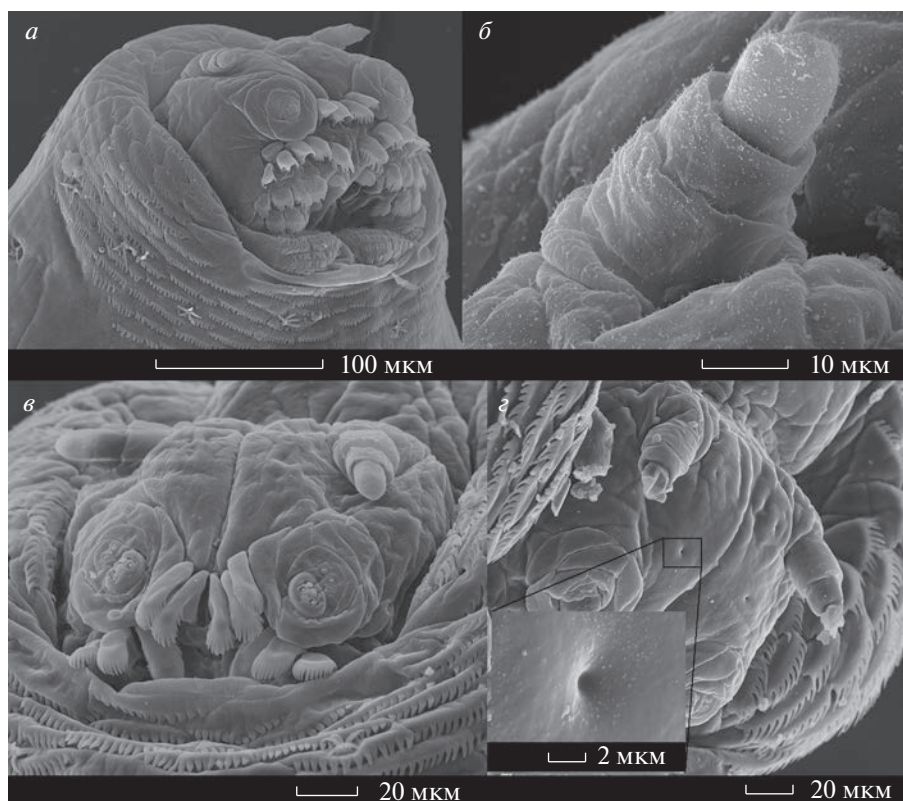


Рис. 7. Личинка 3-го возраста мухи *P. fumosa*. *a* — псевдоцефалон, вытянутый из грудных сегментов; видны ротовые и сенсорные структуры, а также кончики ротовых крючков. *б* — увеличенный вид трехчлениковой антенны. *в* — увеличенный вид верхней части головы, видны антенны, максиллярные органы, два ряда почти одинаковых по форме цирры. *г* — две пары сенсорных ямок на каждой доле лица (увеличенный вид одной из них на вставке).

вые (рис. 7б). Цирры расположены дорсально и дорсолатерально относительно ротового отверстия горизонтальными рядами, но медиально, над ротовыми крючками, имеется всего два ряда цирр. Самый верхний ряд располагается между максиллярными органами и содержит четыре (иногда пять) папилл, как и у *E. riparia*. Второй ряд образован папиллами той же формы, что и предыдущие, а папиллы, расположенные у личинок *E. riparia* непосредственно над ротовыми крючками, отсутствуют (рис. 7а, в).

В отличие от *E. riparia* у личинок *P. fumosa* имеется две небольшие, но хорошо заметные сенсорные ямки на каждой доле головы: одна пара расположена дорсомедиально относительно максиллярного органа, а другая — между антеннами (рис. 7г).

Дорсальная поверхность псевдоцефалона *P. fumosa* гладкая и несет лишь несколько шипиков (рис. 8а). На вентральной поверхности (видимой, только если псевдоцефалон вытянут из грудных сегментов) так же, как и у *E. riparia*, имеются два участка крошечных уплощенных гребенчатых, направленных вперед шипиков, расположенных позади рта (рис. 7а).

Грудные сегменты безногие, несут многочисленные поперечные ряды мелких, направленных назад шипиков в передней части сегмента на брюшной стороне и по бокам, остальная часть сегментов гладкая (рис. 6, 8а, б). Многочисленные лучевидные сенсиллы и редкие колышкообразные, они же розеткообразные, сенсиллы (peg-like rosette sensilla) встречаются преимущественно в передней части грудных сегментов; большинство сенсилл расположены в кутикулярных ямках (в отличие от личинок *E. riparia*, у которых лучевидные сенсиллы обычно располагаются не в ямках, а на плоской поверхности кутикулы) (рис. 8в—д). Также хорошо заметна пара трехлучевых сенсилл, расположенных в двух глубоких ямках на брюшной стороне первого грудного сегмента T1 (вероятнее всего, это органы Кейлина) (рис. 8е).

Первый грудной сегмент несет пару передних дыхалец в виде сдвоенных бугорков с углублением на вершине каждого из них (рис. 8а, б, ж). Их вид сильно отличается от пальцевидных дыхалец личинок *E. riparia* (рис. 3г, д).

Брюшные сегменты безногие, довольно равномерно покрытые шипиками, с вентральными ползательными валиками (creeping welts) на гра-

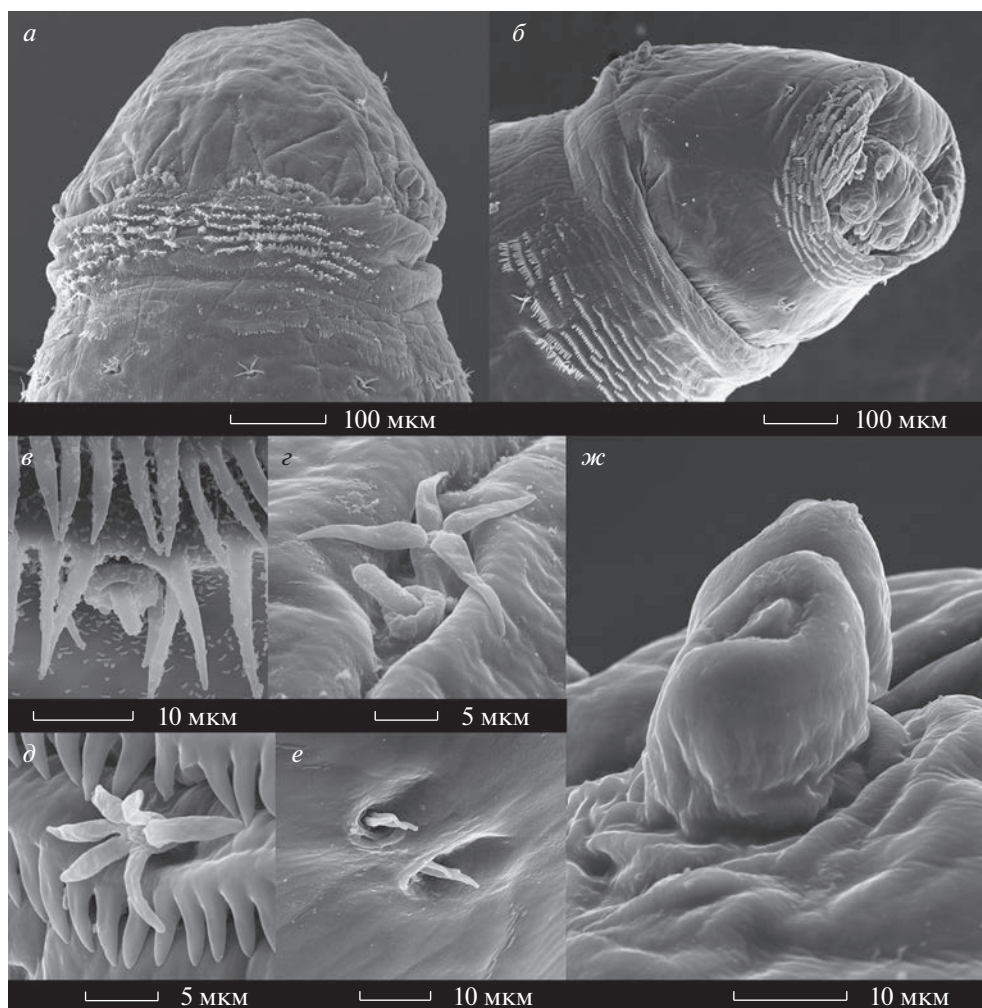


Рис. 8. Личинка 3-го возраста мухи *P. fumosa*. *а* — псевдоцефалон и первый грудной сегмент сверху. *б* — вентролатеральная проекция частично втянутого псевдоцефалона и двух грудных сегментов T1–T2. Видны передние дыхальца (в заднебоковой части T1), пара близко расположенных сенсилл (вероятно, органы Кейлина) на брюшной стороне T1 (около средней линии), поперечные ряды мелких, направленных назад шипиков в передней части грудных сегментов на брюшной стороне. *в–д* — лучевидные сенсиллы и колышкообразные (розеткообразные) сенсиллы. *е* — увеличенный вид органов Кейлина на вентральной стороне T1. *ж* — увеличенный вид передних дыхалец в виде двоянных бугорков с углублением на вершине каждого выступа.

ницах сегментов (рис. 6, 9а). На последнем брюшном сегменте дорсально расположена втягивающаяся разветвленная дыхательная трубка (сифон), более длинная, чем у *E. riparia*, но в остальном схожая с ней по строению (включая строение дыхальцевой пластинки и ветвящихся пластинок, служащих для удержания кончика дыхальца на поверхности воды) (рис. 9а, б).

Анальное отверстие находится на вентральной стороне последнего брюшного сегмента A8, у основания сифона (рис. 6, 9а). Два полукруглых АО вместе образуют приподнятую, выступающую сердцевидную структуру, окружающую задний проход. Их кутикула сильно сморщена и не имеет видимых наноямок на поверхности. Проницае-

мость кутикулы АО подтверждена окрашиванием серебром.

ОБСУЖДЕНИЕ

Личинки многих видов короткоусых двукрылых (Brachycera) развиваются в средах с повышенной соленостью. Например, личинки семейств Coelopidae, Heterocheilidae, Helcomyzidae, личинки рода *Fucellia* (сем. Anthomyiidae) и рода *Orygma* (сем. Sepsidae), представленного единственным видом *Orygma luctuosum*, развиваются в выброшенных на берег водорослях в прибрежной зоне морей и океанов (Aldrich, 1918; Dobson, 1976; McAlpine, 1991). Высокую степень адаптации к повышенной солености демонстрируют многие

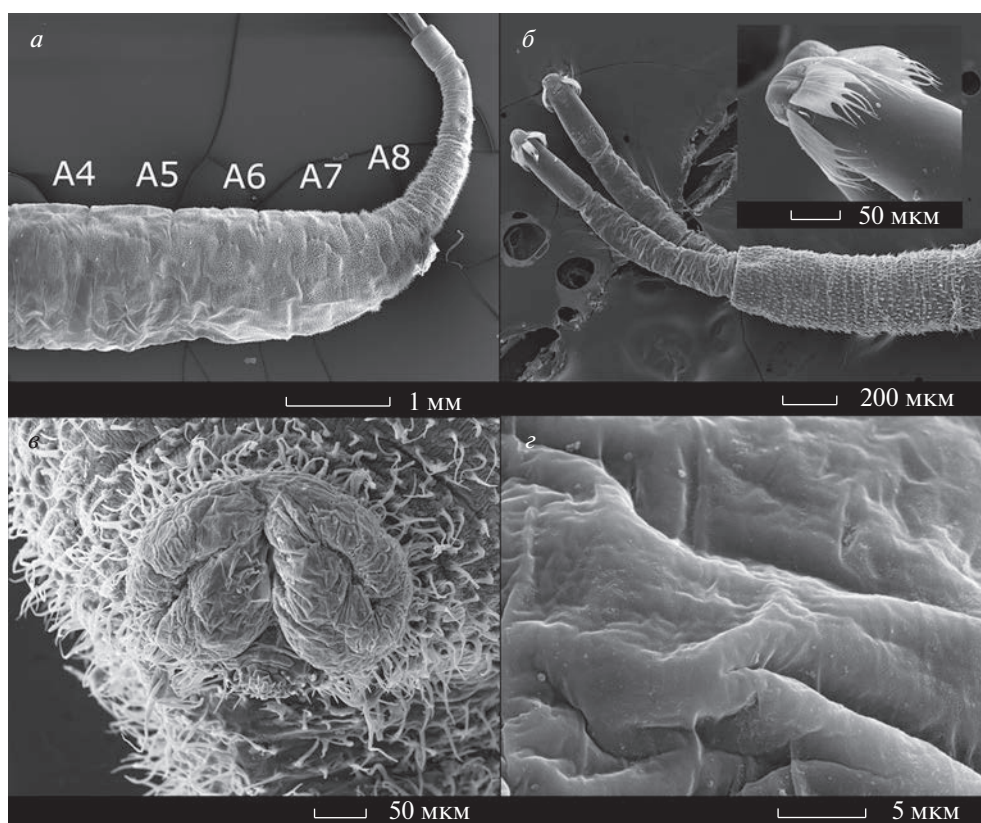


Рис. 9. Личинка 3-го возраста мухи *P. fumosa*. *a* — вид сбоку брюшных сегментов A4–A8; видна постепенно нарастающая плотность шипиков от переднего к заднему концу тела личинки и слегка выступающая вентрально анальная область у основания сифона. *б* — выдвижной сифон с шипиками и несколькими лучевидными сенсиллами (на вставке кончик сифона с дыхальцевой пластинкой со щелями и разветвленные пластинки для удерживания на поверхности воды). *в* — АО сердцевидной формы с постанальным шиповидным буторком. *г* — увеличенный вид сморщенной кутикулы АО; наноямки не видны.

виды мух рода *Lispe* (сем. Muscidae, группа *L. caesia*, группа *L. rigida* и некоторые другие) (Vikhrev, 2020) и мух-береговушек (сем. Ephydriidae). Личинки обозначенных мусцид приурочены к водным местообитаниям и развиваются в мокром песке или иле с высоким содержанием органического вещества, считаются галофильными или эвригалинными (Skidmore, 1985; Zinchenko et al., 2017; Vikhrev, 2021). Некоторые виды рода *Ephydra* являются, по-видимому, одними из самыми солелюбивых и солотолерантных среди насекомых, развивающихся в воде. Личинки этих видов питаются цианобактериями и одноклеточными водорослями (также могут поедать дрожжевые клетки) на дне соленых континентальных водоемов, порой настолько соленых и (или) щелочных, что эти личинки оказываются единственными Metazoa, способными там жить (иногда в компании с солелюбивыми ракообразными *Artemia*). Например, в Большом Соленом озере (США, Юта), в озере Моно (США, Калифорния) и в других очень соленых озерах на западе США в огромном

количестве развиваются личинки *E. gracilis* и *E. hians*.

Адаптации к высокой солености у эфидрид изучались начиная с первой половины XX в., однако прогресс в этой области был очень медленным. Так, Байер (Beyer, 1939) показал, используя данные по популяциям шести видов рода *Ephydra* из водоемов с соленостью от 6–9‰ до насыщенного солевого раствора, что относительная длина дыхательной трубки (сифона) у личинок и куколок *Ephydra* связана с соленостью положительной зависимостью: чем солнее вода, тем длиннее сифон. Это предположительно связано с тем, что у экстремально галофильных личинок растет роль кожного дыхания, а поверхность сифона, вероятно, работает как трахейная жабра (Aldrich, 1912; Beyer, 1939). Байер выяснил, что длина сифона подвержена фенотипической пластичности, подтвердив это в опытах. Он переносил яйца *E. riparia* в воду разной солености и измерял длину сифона у личинок и куколок, показав, что в более соленой воде развиваются личинки и куколки с более длинным сифоном. Кожное дыхание требу-

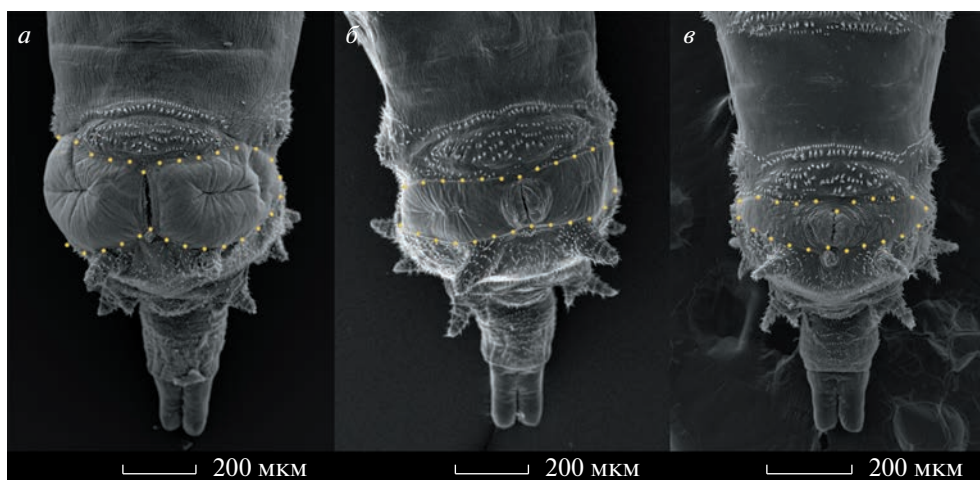


Рис. 10. Уменьшение АО личинок *D. melanogaster* по мере роста солёности/осмолярности среды. Вентральный вид восьмого брюшного сегмента личинок, *a* — выросших на корме с пониженной осмолярностью на основе крахмала, *б* — на стандартном корме, где вместо крахмала содержится сахар, манная крупа и измельченный изюм, *в* — на стандартном корме с добавлением 7% NaCl. Желтыми точками обозначены контуры АО.

ет увеличения поверхности тела путем образования складок и выростов (Beyer, 1939).

Помимо специализированных обитателей соленых субстратов, таких как упомянутые виды эфидрид, среди двукрылых есть виды, которые не живут в соленых субстратах в природе, но способны быстро адаптироваться к ним в условиях лабораторного эксперимента. Широко известны эксперименты по развитию адаптаций к соленой среде у *Drosophila melanogaster*. Адаптация этого вида к соленому корму оказалась удобной экспериментальной моделью. Концентрация соли, превышающая 4%, может быть фатальной для личинок и взрослых особей *D. melanogaster* (Te Velde et al., 1988; Stergiopoulos et al., 2009). Однако лабораторные линии дрозофил способны адаптироваться к концентрациям NaCl до 6–8% в течение нескольких десятков поколений (Waddington, 1959; Te Velde et al., 1988; Arbuthnott, Rundle, 2014; Markov et al., 2015; Dmitrieva et al., 2017, 2019; Горшкова и др., 2018).

Адаптация плодовых мушек к соленому субстрату сопровождается характерным изменением морфологии: у личинок, выращенных на соленом корме, резко уменьшаются размеры анальных органов (АО). Напротив, у личинок, выращенных на пище с низкой осмолярностью, АО становятся больше (по сравнению с личинками, выращенными на стандартном лабораторном корме) (Te Velde et al., 1988).

Анальные органы у дрозофил и некоторых других круглошовных мух (Cycloghapha) называют по-разному: анальными папиллами, анальными подушками, перианальными подушками, анальными пластинками, перианальными пластинками, восстанавливающими серебро органами

или вентральными гиподермальными органами (anal papillae, anal pads, perianal pad, anal plates, perianal plate, silver-reducing organs, ventral hypodermal organs) (Stoffolano, 1970). В отличие от разнообразных длинных выступающих анальных папилл, характерных для многих водных и околотовных личинок Nematocera и некоторых Brachycera (Syrphidae) (Кривошеина, 2005), АО дрозофил представляют собой парные органы, имеющие вид уплощенных или слегка выпуклых подушечек, расположенных на последнем сегменте брюшка по обе стороны от анального отверстия.

АО покрыты относительно тонкой, проницаемой кутикулой, под которой находится слой крупных клеток сложного строения с политенными хромосомами. Их называют хлорными клетками, так как в них нередко бывает повышена концентрация ионов Cl^- . Функция АО связана с ионным обменом. Считается, что они служат для активной транспортировки некоторых ионов, например кальция, из окружающей среды в тело личинки, но не для выведения избыточных ионов в обратном направлении (этот транспорт обеспечивается в первую очередь мальпигиевыми сосудами) (Jarial, 1987). Поэтому представляется логичным, что АО личинок дрозофил увеличиваются при дефиците ионов в окружающей среде и уменьшаются при их избытке; это может быть примером адаптивной фенотипической пластичности (адаптивной модификации) (рис. 10).

Изучение АО у личинок трех видов сем. Muscidae также показало, что к среде с высокой осмолярностью приурочены личинки с меньшими по размеру АО, тогда как в среде с низкой осмолярностью живут личинки с крупными АО (Stoffolano, 1970).

Исходя из этого, логично предположить, что адаптация эфидрид к средам с различной соленостью могла отразиться на строении их АО. Однако имеющиеся в литературе сведения об АО у личинок эфидрид крайне скудны. Отчасти это может быть связано с тем, что АО у личинок короткоусых двукрылых (*Brachycera*) часто незаметны из-за того, что бесцветны и прозрачны, их трудно отличить от окружающей кутикулы, особенно под световым микроскопом.

Классическим методом идентификации АО является окрашивание нитратом серебра (Gloor, Chen, 1950; Jarial, 1987; Te Velde et al., 1988; Durham, Grodowitz, 2012). Личинку помещают в слабый раствор AgNO_3 , после чего освещают ультрафиолетом. Это приводит к окрашиванию АО (но не других частей личинки) в чернильный или темно-чернильный цвет, поскольку ионы серебра проходят через проницаемую кутикулу АО и связываются с хлором, а затем под действием ультрафиолета в толще кутикулы и подстилающем эпителии образуются частицы атомарного серебра, которые и обеспечивают чернильную окраску (Jarial, 1987).

Насколько нам известно, пока единственным видом эфидрид, у личинок которого присутствие АО было подтверждено окрашиванием, является *Hydrellia pakistanae*. У пресноводных личинок этого вида описаны небольшие по размеру, но четко выраженные АО с характерной сильно сморщенной поверхностью и очень мелкими ($D \approx 100$ нм) ямками на поверхности кутикулы (Deonier, 1971; Durham, Grodowitz, 2012).

Напротив, имеющиеся в литературе описания как экстремально галофильных видов (*E. hians*, *E. gracilis*), так и умеренно галофильных (*E. riparia*, *P. fumosa*) либо вообще не содержат упоминаний АО (создавая впечатление, что эти органы у солелюбивых эфидрид отсутствуют), либо упоминают перианальные подушки (perianal pads) различной формы и размера, функциональная общность и гомология которых с АО других двукрылых остается непроясненной. В настоящей работе мы впервые показали окрашиванием и с помощью СЭМ наличие АО у личинок обоих изучаемых видов, *E. riparia* и *P. fumosa*.

Ниже мы сравним детали морфологии личинок двух рассмотренных видов эфидрид с литературными данными по близким видам (по которым есть соответствующие опубликованные данные) и обсудим их в контексте адаптации к различной солености.

Сравнение *E. riparia* и *E. hians*

Насколько нам известно, единственным видом из рода *Ephydra*, морфология которого была подробно изучена (с помощью СЭМ), является

E. hians (Cash-Clark, Bradley, 1994). *E. hians* — гипергалофильный вид из сильносоленых и щелочных озер западной части Северной Америки. Многие морфологические детали личинок 3-го возраста *E. riparia* и *E. hians* сходны, в том числе:

1. Двухчлениковые антенны.
 2. Максиллярные (= терминальные) органы чувств с двумя отдельными группами сенсилл. Эти группы включают дорсолатеральную группу из двух сложных сенсилл и вентромедиальную группу из трех сложных и двух простых сенсилл.
 3. Гребенчатые цирры (mouth brushes), расположенные дорсально и дорсолатерально относительно рта; форма и расположение этих структур практически идентичны у *E. riparia* и *E. hians*.
 4. Ложные ножки с пучками длинных когтеобразных шипов; эти шипы изгибаются назад, за исключением шипов на самой большой паре ложных ножек, расположенных на последнем брюшном сегменте, которые изгибаются вперед. Противопоставленные ложные ножки с шипами на последнем и предпоследнем брюшных сегментах помогают личинке захватывать стебель травы при окукливании.
 5. Небольшой шиповидный бугорок неизменно располагается позади анального отверстия у эфидрид, как и у дрозофил.
 6. Внешнее строение сифона и дыхальцевой пластинки сходно у *E. hians* и *E. riparia*, однако, вероятно, имеется различие в количестве дыхальцевых щелей. На фотографиях дыхальцевой пластинки *E. hians* со сканирующего электронного микроскопа в статье Кэш-Кларка и Брэдли (Cash-Clark, Bradley, 1994) видны три щели, тогда как у *E. riparia* мы наблюдали четыре щели (рис. 4е).
 7. Узор на спинной стороне, образованный расположенными особым образом пигментированными и уплощенными чешуйками (рис. 4а, б), сходен у *E. hians* и *E. riparia*.
 8. Кэш-Кларк и Брэдли (Cash-Clark, Bradley, 1994) сообщают в своей статье о многочисленных лучеобразных сенсиллах (branched setae), распределенных по телу у *E. hians* так же, как и у *E. riparia*. Ни у одного из видов *Ephydra* не было обнаружено колышкообразных (розеткообразных, peg-like) сенсилл, подобных тем, которые описаны у личинок мух рода *Paracoenia*.
- Между личинками мух-береговушек *E. hians* и *E. riparia* есть несколько заметных отличий:
1. У *E. hians* пучки щетинок в задней и вентральной области головы имеют широкое основание, увенчанное несколькими заостренными выступами (Cash-Clark, Bradley, 1994), тогда как у *E. riparia* эти щетинки расположены вентrolатерально относительно ротового отверстия и имеют обычную когтевидную форму с одним изогнутым заостренным выступом (рис. 3а).

2. Передние дыхальца с 4–5 пальцевидными выростами у *E. hians* и с 3–4 – у *E. riparia*.

3. Кончики ротовых крючков тупые и округлые у *E. hians*, зубчатые у *E. riparia*. Это может быть связано с различиями в механизмах сбора пищи и диете, хотя достоверно природа этих различий в настоящее время неизвестна.

4. У *E. hians* анальное отверстие полностью окружено толстой перианальной подушкой. Эта подушка почти круглая, не двулопастная и не разделена на две половины анальной щелью. Ее кутикула выглядит жесткой и сильно морщинистой согласно опубликованным фотографиям и описанию, о наличии наноямок не сообщается (Cash-Clark, Bradley, 1994). У *E. riparia* слева и справа от ануса имеется пара поперечно-вытянутых полуовальных АО. Кутикула АО проницаема для ионов (что подтверждается окрашиванием серебром) и имеет многочисленные крошечные ямки диаметром около 100 нм.

Сравнение *P. fumosa* и *P. bisetosa*

Личинки только одного вида *Paracoenia*, *P. bisetosa*, были ранее описаны с помощью СЭМ. Это неарктический вид, обитающий в разнообразных средах, включая горячие и холодные минеральные источники, а также водоемы от пресноводных до умеренно щелочных и соленых (Zack, 1983).

Личинки 3-го возраста видов *P. fumosa* и *P. bisetosa* очень похожи, особенно с головного конца. У обоих видов трехсегментные антенны и одинаково устроенные максиллярные (терминальные) сенсорные органы (состоящие из 7 сенсилл, разделенных ободками на две группы, 2 + 5). Число рядов гребневидных цирр также одинаково. Тело личинок обоих видов обильно усеяно разнообразными сенсиллами. Остановимся более подробно на отдельных небольших морфологических различиях личинок двух данных видов:

1. Личинки 3-го возраста вида *P. bisetosa* примерно в 1.5 раза крупнее личинок *P. fumosa*: 14.50–18.71 мм против 9.63–12.50 мм. Дыхательная трубка в вытянутом состоянии у *P. bisetosa* составляет примерно половину длины тела, тогда как у *P. fumosa* – от 30 до 37%.

2. Размер и густота шипиков у личинок обоих видов нарастает от головы к концу брюшка, однако если у *P. bisetosa* уже второй брюшной сегмент полностью покрыт шипиками, то у *P. fumosa* такими становятся сегменты только начиная с пятого–шестого брюшного.

3. По бокам тела на дистальном конце первого грудного сегмента у личинок находятся передние дыхальца. У обоих видов они раздвоены, но у *P. bisetosa* они имеют скорее пальцевидную фор-

му, как у *E. riparia*, а у *P. fumosa* дыхальца напоминают невысокие вздутые бугорки (рис. 8ж).

4. У *P. fumosa* АО компактные, округлые, вместе образующие выпуклую площадку сердцевидной формы, с сильно сморщенной поверхностью, без наноямок на кутикуле. Для *P. bisetosa* нет опубликованных фотографий АО со сканирующего электронного микроскопа, есть лишь словесное описание: “Перианальная подушка двухлопастная, полукруглая, гладкая, разделенная посередине анальной щелью, позади которой располагается бугорок с шипиками” (“Perianal pad bilobed, subcircular, glabrous, furrowed by median anal slit, with spinule patch posteromedially”; Zack, 1983, p. 496). В первом приближении оно подходит также и к АО *P. fumosa*, особенно если учесть, что сморщенность поверхности АО становится заметна лишь при большом увеличении. Есть ли наноямки у *P. bisetosa*, также непонятно. Иными словами, мы можем сказать лишь то, что АО двух сравниваемых видов похожи по форме, но их более тонкое строение может различаться.

Сравнение *E. riparia* и *P. fumosa* с *Coenia curvicauda*

Роды *Ephydra* и *Paracoenia* относятся к трибе Ephydrini Zetterstedt, к этой же трибе относится род *Coenia*. Личинки вида *Coenia curvicauda* были описаны с использованием СЭМ. Этот голарктический вид обычно встречается в заболоченных местах со скоплениями разлагающейся органики (Foote, 1990). Сравним морфологию личинок данного вида с личинками, описанными выше:

1. Личинки 3-го возраста *C. curvicauda* заметно меньше по размеру (7.6 мм), чем личинки *P. fumosa* (11.19 мм) и *E. riparia* (11.14 мм).

2. Личинки *C. curvicauda* имеют типичную для личинок эфидрид веретенообразную форму, при этом они безногие, как и личинки *P. fumosa*. Тот факт, что у личинок *Ephydra* есть ложные ножки, а у *Paracoenia*, *Coenia* и *Drosophila* – только ползательные валики, связан с особенностями образа жизни. Личинки *Ephydra* – представители эпифауны, активно передвигающиеся по дну водоемов, а все прочие перечисленные – менее подвижные представители инфауны, живущие погруженными в мягкий, рыхлый субстрат – богатый органикой ил, скопление цианобактерий или нитчатых водорослей и т.п. (*Coenia*, *Paracoenia*), либо это животные, обитающие в высокопитательном полужидком субстрате и передвигающиеся лишь в пределах, например, гниющего плода (*Drosophila*). Возможно, в связи с тем, что личинки *P. fumosa* погружены в субстрат, а личинки *E. riparia* проводят часть времени на его поверхности, у первых есть дополнительные сенсорные органы – две па-

ры ямок между антеннами и максиллярными органами (рис. 7г).

3. Тело личинок *C. curvicauda* покрыто слегка пигментированными шипиками одинаковой формы, которые не образуют рисунка на спинной стороне, что снова сближает их с *P. fumosa* и отличается от *E. riparia*. Однако кольца из пигментированных шипиков *C. curvicauda* представлены уже на грудных сегментах, а начиная с брюшных сегментов уже вся площадь сегментов покрыта шипиками, тогда как пигментированные шипики у *P. fumosa* отчетливо заметны только на задней трети тела, и только с пятого — шестого брюшных сегментов покрытие шипиками сплошное.

4. На грудных и брюшных сегментах *C. curvicauda* можно обнаружить сенсиллы двух типов — лучистые (rayed) и кольшкообразные (или розеткообразные, rosette/peg-like) — как у *P. fumosa* (рис. 8в–д). У личинок *E. riparia* мы обнаруживаем только лучистые сенсиллы и не находим кольшкообразных (рис. 3в).

5. Головной сегмент личинок *C. curvicauda* двухчастный, как у личинок *P. fumosa*. Лицевая часть личинок *E. riparia*, напротив, цельная.

6. Антенны *C. curvicauda* двухсегментные, как у *E. riparia*.

7. Цирры *C. curvicauda*, скорее, напоминают таковые личинок *P. fumosa*, так как над ротовым отверстием располагается два ряда цирр, а не три, как у *E. riparia*. Согласно изображениям в статье Фута (Foote, 1990), цирры личинок *C. curvicauda* характеризуются длинной и пушистой гребенкой на дистальном конце.

8. Дистальный край челюстей *C. curvicauda* гребневидный, как у личинок *E. riparia*, а не гладкий, без зазубрин, как у личинок *P. fumosa*. Сходство ротовых частей может отражать сходные механизмы сбора пищи и сходные диеты, состоящие в основном из одноклеточных водорослей (например, диатомовых) и цианобактерий.

9. Передние дыхальца личинок *C. curvicauda* с 4–6 пальцевидными выростами. Их форма напоминает дыхальца *E. riparia*, хотя, по-видимому, отростков у них больше, чем у *E. riparia*. Напомним, что передние дыхальца личинок *P. fumosa* выглядят как два вздутых бугорка, т.е. значительно отличаются от дыхалец с пальцевидными отростками.

10. Дыхательная трубка на заднем конце тела личинок *C. curvicauda* имеет существенное отличие от дыхательной трубки личинок *E. riparia* и *P. fumosa*: примерно на середине ее длины имеется два мясистых выступа.

11. У *C. curvicauda* АО гладкие, поперечно вытянутые (т.е. похожие по общим очертаниям на АО дрозифил), ограниченные на дистальных концах особыми шипастыми бугорками (spinulose tu-

bercles). У *P. fumosa*, напротив, АО компактные, округлые, вместе образующие выпуклую площадку сердцевидной формы, с сильно сморщенной поверхностью, но без крошечных ямок на кутикуле (есть ли эти ямки у *Coenia*, непонятно). Анальные органы *E. riparia* серповидной формы, их кутикула сильно сморщена и имеет многочисленные ямки диаметром около 100 нм (рис. 5г, д), которые также обнаружены у *D. melanogaster* и *H. pakistanae*. Несмотря на такие значительные различия АО по форме и текстуре кутикулы, позади них у личинок всех пяти видов располагается бугорок с шипиками.

Таким образом, личинки 3-го возраста *C. curvicauda* менее крупные, чем личинки *E. riparia* и *P. fumosa*, более густо покрыты пигментированными шипиками, безногие, с нехарактерными для двух других видов мясистыми выступами на дыхательной трубке. Большая часть отмеченных нами морфологических особенностей сближает *C. curvicauda* с *P. fumosa* (отсутствие ложных ножек, однородность шипиков, сходство сенсилл, двухлопастная лицевая часть), но есть и важные сходства с личинками *E. riparia* (форма кончиков челюстей и передних дыхалец, двухсегментные антенны).

Заключение по АО и по связи морфологических признаков с адаптацией к солёности

У экстремально галофильной *E. hians*, судя по опубликованным фотографиям, выполненным на сканирующем электронном микроскопе, вероятно, нет функциональных АО, а есть только толстая перианальная подушка (thick perianal pad), которая, возможно, не служит для закачивания ионов из окружающей среды или функционирует не так активно, как у менее галофильных видов. У умеренно галофильной мухи *E. riparia* мы видим небольшие по площади, сморщенные, но все же настоящие АО с проницаемой кутикулой, красящиеся серебром, с наноямками, как у дрозифил. У галотолерантных видов *Paracoenia* АО примерно такие же по относительному размеру, тоже сморщенные, но, по-видимому, без наноямок.

У пресноводной *C. curvicauda* АО крупнее, чем у *Ephydra* и *Paracoenia*. У пресноводной *Hydrellia* АО тоже настоящие, подтвержденные окрашиванием серебром, с наноямками, однако они небольшие по площади, сравнимы по этому параметру с *Ephydra* и *Paracoenia*.

У личинок дрозифил по мере роста солёности среды уменьшается площадь АО, их поверхность из гладкой становится сморщенной, наноямки на поверхности кутикулы становятся менее заметны или вовсе исчезают. Это сопровождается дегенеративными изменениями крупных эпителиальных клеток, подстилающих кутикулу АО и служащих для активного транспорта ионов из окружа-

ющей среды в гемолимфу (Jarial, 1987). Такая фенотипическая пластичность, вероятно, является адаптивной, поскольку при высокой окружающей солености как проницаемость кутикулы АО, так и активный транспорт ионов из окружающей среды, скорее всего, становятся менее полезными или даже вредными. Таким образом, кажется естественным, что у экстремально галофильных эфидрид АО либо вовсе отсутствуют, либо развиты слабо, в то время как у умеренно галофильных эфидрид отмечается более выраженное развитие признаков, увеличивающих проницаемость кутикулы АО и клеток, обеспечивающих транспорт ионов через кутикулу. У пресноводных эфидрид все эти признаки или часть их получают наибольшее развитие.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00156, <https://rscf.ru/project/22-24-00156/>.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования на сканирующем электронном микроскопе проводились на оборудовании Центра микроскопии Беломорской биологической станции МГУ, МГУ и Палеонтологического института РАН. Коллектив авторов выражает благодарность Роману Анатольевичу Ракитову и Большакову Федору Васильевичу за помощь в работе на СЭМ, а также Максимовой Ирине Аркадьевне за помощь в сборе полевого материала на Беломорской биологической станции МГУ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием теплокровных животных в качестве объектов экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горшкова А.А., Фетисова Е.С., Яковлева Е.Ю., Наймарк Е.Б., Марков А.В., 2018. Влияние пространственной гетерогенности среды на адаптацию *Drosophila melanogaster* к неблагоприятным кормовым субстратам: результаты эволюционного эксперимента // Журн. общ. биологии. Т. 79. № 1. С. 3–17.
- Кривошеина М.Г., 2005. Строение и роль анальных папилл личинок двукрылых (Diptera) // Зоол. журн. Т. 84. № 2. С. 207–217.
- Aldrich J.M., 1912. The biology of some Western species of the dipterous genus *Ephydra* // J. N. Y. Entomol. Soc. V. 20. № 2. P. 77–99.
- Aldrich J.M., 1918. The kelp-flies of North America (genus *Fucellia*, family Anthomyiidae) // Proc. Calif. Acad. Sci. V. 8. № 5. P. 157–179.
- Apostolopoulou A.A., Rist A., Thum A.S., 2015. Taste processing in *Drosophila* larvae // Front. Integr. Neurosci. V. 9. Art. 50. <https://doi.org/10.3389/fnint.2015.00050>
- Arbuthnott D., Rundle H.D., 2014. Misalignment of natural and sexual selection among divergently adapted *Drosophila melanogaster* populations // Anim. Behav. V. 87. P. 45–51.
- Beyer A., 1939. Morphologische, ökologische and physiologische Studien an den Larven der Fliegen // Kieler Meeresforschungen. Bd. 3. S. 265–320.
- Cash-Clark C.E., Bradley T.J., 1994. External morphology of the larvae of *Ephydra* (*Hydropyrus*) *hians* (Diptera: Ephydriidae) // J. Morphol. V. 219. P. 309–318.
- Courtney G.W., Pape T., Skevington J.H., Sinclair B.J., 2017. Biodiversity of Diptera // Insect Biodiversity: Science and Society / Eds Footitt R.G., Adler P.H. Chichester: John Wiley & Sons. P. 229–278.
- Deonier D.L., 1971. A Systematic and Ecological Study of Nearctic *Hydrellia* (Diptera: Ephydriidae). Washington: Smithsonian Inst. Press. 147 p.
- Dmitrieva A.S., Ivitsky S.B., Markov A.V., 2017. Adaptation of *Drosophila melanogaster* to unfavourable feed substrate is accompanied by expansion of trophic niche // Biol. Bull. Rev. V. 7. № 5. P. 369–379.
- Dmitrieva A.S., Ivitsky S.B., Maksimova I.A., Panchenko P.L., Kachalkin A.V., Markov A.V., 2019. Yeasts affect tolerance of *Drosophila melanogaster* to food substrate with high NaCl concentration // PLoS One. V. 14. № 11. Art. e0224811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224811>
- Dobson T., 1976. Seaweed flies (Diptera: Coelopidae, etc.) // Marine Insects / Ed. Cheng L. Oxford: North Holland Publishing Company; N.Y.: Elsevier. P. 447–464.
- Durham B., Grodowitz M.J., 2012. The anal plates of larval *Hydrellia pakistanae* (Diptera: Ephydriidae) // Florida Entomol. V. 95. № 1. P. 82–88.
- Foote B.A., 1990. Biology and immature stages of *Coenia curvicauda* (Diptera: Ephydriidae) // J. N. Y. Entomol. Soc. V. 98. № 1. P. 93–102.
- Gloor H., Chen P.S., 1950. Über ein Analorgan bei *Drosophila*-larven // Rev. Suisse Zool. V. 57. P. 571–576.
- Herbst D.B., 1988. Comparative population ecology of *Ephydra hians* Say (Diptera: Ephydriidae) at Mono Lake (California) and Abert Lake (Oregon) // Hydrobiology. V. 158. P. 145–166.
- Jarial M.S., 1987. Ultrastructure of the anal organ of *Drosophila* larva with reference to ion transport // Tissue Cell. V. 19. № 4. P. 559–575.
- Kadavy D.R., Plantz B., Shaw C.A., Myatt J., Kokjohn T.A., Nickerson K.W., 1999. Microbiology of the oil fly, *Helaeomyia petrolei* // Appl. Environ. Microbiol. V. 65. № 4. P. 1477–1482. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.4.1477-1482.1999>
- Krivosheina M.G., 2003. To the biology of flies of the genus *Ephydra* Fallén, 1810, with the description of larvae of seven *Palaeartic* species (Diptera: Ephydriidae) // Russ. Entomol. V. 12. № 1. P. 79–86.
- Markov A.V., Ivitsky S.B., Kornilova M.B., Naimark E.B., Shirokova N.G., Perfilieva K.S., 2015. Maternal effect masks the adaptation to adverse conditions and hampers divergence in *Drosophila melanogaster* // Biol.

- Bull. Rev. V. 6. P. 429–435.
<https://doi.org/10.1134/s2079086416050054>
- Mathis W.N., Zatwarnicki T., 1995. World Catalog of Shore Flies (Diptera: Ephydriidae) // Memoires of Entomology, International. V. 4. P. 1–423.
- McAlpine D.K., 1991. Relationships of the genus *Heterocheila* (Diptera: Sciomyzoidea) with description of a new family // Tijdschr. Entomol. V. 134. P. 193–199.
- Pape T., Blagoderov V., Mostovski M.B., 2011. Order Diptera Linnaeus, 1758 // Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (Zootaxa 3148) / Ed. Zhang Z.-Q. Auckland: Magnolia Press. P. 222–229.
- Schneeberg K., Bauernfeind R., Pohl H., 2017. Comparison of cleaning methods for delicate insect specimens for scanning electron microscopy // Microsc. Res. Tech. V. 80. № 11. P. 1199–1204.
<https://doi.org/10.1002/jemt.22917>
- Skidmore P., 1985. The Biology of the Muscidae of the World. Dordrecht: Springer. 550 p.
- Stergiopoulos K., Cabrero P., Davies S.A., Dow J.A., 2009. Salty dog, an SLC5 symporter, modulates *Drosophila* response to salt stress // Physiol. Genomics. V. 37. № 1. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90360.2008>
- Stoffolano J.G., 1970. The anal organ of larvae of *Musca autumnalis*, *M. domestica*, and *Orthellia caesarion* (Diptera, Muscidae) // Ann. Entomol. Soc. Am. V. 63. P. 1647–1654.
- Te Velde J.H., Molthoff C.F.M., Scharloo W., 1988. The function of anal papillae in salt adaptation of *Drosophila melanogaster* larvae // J. Evol. Biol. V. 2. P. 139–153.
- Thorpe W.H., 1930. The biology of the petroleum fly (*Psilopa petrolii*, COQ) // Trans. R. Entomol. Soc. Lond. V. 78. № 2. P. 331–344.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1930.tb00391.x>
- Vikhrev N.E., 2020. *Lispe* (Diptera, Muscidae) of the Palearctic region // Amurian Zool. J. V. 13. № 2. P. 158–188.
<https://www.doi.org/10.33910/2686-9519-2020-12-2-158-188>
- Vikhrev N.E., 2021. *Lispe* (Diptera, Muscidae) of Africa // Amurian Zool. J. V. 13. № 3. P. 369–400.
<https://www.doi.org/10.33910/2686-9519-2021-13-3-369-400>
- Waddington C.H., 1959. Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters // Nature. V. 183. P. 1654–1655.
- Wigglesworth V.B., 1933. The effect of salts on the anal gills of the mosquito larva // J. Exp. Biol. V. 10. № 1. P. 1–15.
- Wipfler B., Schneeberg K., Löffler A., Hünefeld F., Meier R., Beutel R.G., 2013. The skeletomuscular system of the larva of *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae, Diptera) – A contribution to the morphology of a model organism // Arthropod Struct. Dev. V. 42. № 1. P. 47–68.
<https://doi.org/10.1016/j.asd.2012.09.005>
- Zack R.S., 1983. Biology and immature stages of *Paracoenia bisetosa* (Coquillett) (Diptera: Ephydriidae) // Ann. Entomol. Soc. Am. V. 76. № 3. P. 487–497.
<https://doi.org/10.1093/aesa/76.3.487>
- Zinchenko T.D., Golovatyuk L.V., Abrosimova E.V., Popchenko T.V., 2017. Macrozoobenthos in saline rivers in the Lake Elton basin: Spatial and temporal dynamics // Inland Water Biol. V. 10. № 4. P. 384–398.
<https://doi.org/10.1134/S1995082917040125>

Larva morphology of shore flies *Ephydra riparia* and *Paracoenia fumosa* (Diptera: Ephydriidae) and adaptation of Diptera to increased salinity

E. Yu. Yakovleva¹ *, E. B. Naimark², D. D. Sivunova¹, M. G. Krivosheina³, A. V. Markov¹, ²

¹Lomonosov Moscow State University
 Leninskiye Gory, 1, Moscow, 119991 Russia

²Borisyak Paleontological Institute, RAS
 Profsoyuznaya st., 123, Moscow, 117997 Russia

³Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS
 Leninsky prosp., 33, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: e.u.yakovleva@gmail.com

Larvae of many shore fly species (family Ephydriidae) are adapted to living in water with high or extremely high salinity. Little is known about the morphological and physiological foundations of such adaptation. We described the details of the morphology of third-instar larvae of two shore flies: *Ephydra riparia* and *Paracoenia fumosa* and presented the scanning electron microscopy (SEM) images. For the first time, by silver-staining and SEM, we proved that the larvae of both studied species had anal organs (AO) – specialized structures that serve an osmoregulatory function and are responsible for the transport of ions from the environment to the larval hemolymph (but not in the opposite direction). We compared the larvae morphology of the studied species with some other shore fly species from the genera *Ephydra*, *Paracoenia*, *Hydrellia*, and *Coenia*, as well as with larvae of the model species *Drosophila melanogaster* (family Drosophilidae). Special attention was paid to the morphology of AO, which contribute to the adaptation of larvae to increased salinity. Extremely halophilic species either do not have AO, or they are poorly developed, while moderately halophilic shore flies have more developed features connected with the permeability of the AO cuticle and active ion transport. These features are most developed in freshwater shore flies. AO activity can vary due to the shape and area of the AO, the smoothness or wrinkling of the cuticle, and the presence of nanoscale pits on it. Described variability of AO structure is probably adaptive since, at high salinity, both the permeability of the AO cuticle and the active transport of ions from the environment to the hemolymph become less beneficial or even harmful.