

УДК 57.024+084.1+087.3+089.64+24:575.858

РОЛЬ АКУСТИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ В ПОВЕДЕНИИ УХАЖИВАНИЯ *Drosophila virilis*

© 2016 г. Е. Г. Белкина*[@], О. Е. Лазебный*, В. Ю. Веденина**

*Институт биологии развития РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

**Институт проблем передачи информации РАН, 127051 Москва, Большой Каретный пер., 19, стр. 1

[@]E-mail: ellida69@mail.ru

Поступила в редакцию 15.03.2016 г.

Исследована роль акустического сигнала самца в поведении ухаживания у *Drosophila virilis* методом видеотипирования. Поставлены три серии экспериментов: тесты с интактными мухами, с бескрылыми самцами и интактными самками, с интактными самцами и самками с удаленными аристами. Показано, что самыми длительными элементами ухаживания самцов были ошупывание и лизание. Отмечено, что удаление крыльев у самцов или арист у самок приводило к увеличению длительности практически всех элементов брачного ритуала (преследования, ошупывания, лизания, пения и кружения) и к значимому снижению доли успешных копуляций. Установлено, что в экспериментах с самками без арист структура ухаживания менялась в большей степени, чем в тестах с бескрылыми самцами.

DOI: 10.7868/S0002332916060047

Брачное поведение — один из важнейших факторов репродуктивной изоляции, предотвращающих гибридизацию и обмен генами между близкородственными видами. Поведение ухаживания у дрозофилы представляет собой обмен сигналами различной модальности (химическими, акустическими, зрительными и тактильными). При исследовании видов группы *Drosophila virilis* в основном изучали сигналы двух типов: акустические, издаваемые самцом (Hoikkala, Lumme, 1987; Hoikkala, Aspi, 1993; Suvanto *et al.*, 1994; Aspi, Hoikkala, 1995; Päällysaho *et al.*, 2003; Klappert *et al.*, 2007), и химические, получаемые самцом во время ошупывания и лизания самки (Bartelt *et al.*, 1986; Oguma *et al.*, 1992; Liimatainen, Jallon, 2007). В частности, показано, что “песни” самцов, генерируемые в результате вибрации крыльев, различаются у близкородственных видов как по амплитудно-временным параметрам (длительности пульсов и межпульсовых интервалов), так и по несущей частоте. В экспериментальных исследованиях поведения была выявлена важная роль различных параметров песни самца в выборе самки (Hoikkala, Aspi, 1993; Aspi, Hoikkala, 1995; Hoikkala *et al.*, 1998; Ritchie *et al.*, 1998; Päällysaho *et al.*, 2003; Saarikettu *et al.*, 2005b; Klappert *et al.*, 2007).

Брачный ритуал в группе *D. virilis* существенно отличается от такового у *Drosophila melanogaster*. Если для последних характерна относительно строгая последовательность элементов брачного

ритуала в процессе ухаживания, а сами элементы достаточно непродолжительны, то в группе *D. virilis* несколько элементов, как правило, совершаются одновременно, само ухаживание более продолжительно и представляет собой гораздо менее жесткую и стереотипную последовательность элементов (Spieth, 1951; Vedenina *et al.*, 2013). Кроме того, последовательности основных актов ухаживания также различаются в этих группах дрозофил: например, самцы *D. melanogaster* вначале ошупывают брюшко самки передней парой ног, затем издают акустический сигнал, после чего лижут гениталии самки (Sawamura, Tomaru, 2002). Самцы *D. virilis* ошупывают и лижут брюшко самки почти одновременно и только потом издают акустический сигнал (Spieth, 1951; Vedenina *et al.*, 2013). У *D. melanogaster* самый длительный элемент брачного поведения — песня самца (Lasbleiz *et al.*, 2006), тогда как у *D. virilis* — лизание (Saarikettu *et al.*, 2005a; Vedenina *et al.*, 2013).

Несмотря на то что акустические сигналы в группе *D. virilis* подробно исследовались, мало внимания уделялось тому, как влияет выключение акустического канала связи на выбор самки, поведение ухаживания в целом и на отдельные его элементы. Например, при избирательном выключении рецепторов одной модальности исследовали лишь влияние хирургического удаления органов на результат осеменения самок, но видеотипирования поведения ухаживания не проводили (Hoikkala, 1988). Недавно было исследо-

вано влияние выключения акустического канала на организацию дуэта у *D. virilis* (LaRue *et al.*, 2015). Необходимо отметить, что в группе *D. virilis* в отличие от группы *D. melanogaster* акустические сигналы генерируются не только самцом, но и самкой. Однако было показано, что пение самки необязательно для копуляции, но способствует спариванию (Satokangas *et al.*, 1994). Вместе с тем, удаляя крылья у самцов или аристы (орган слуха) у самок, исследователи оценивали долю копулирующих пар, тогда как влияние этих хирургических операций на отдельные акты ухаживания изучено не было (LaRue *et al.*, 2015).

Большинство исследователей используют для описания брачного поведения дрозофил так называемые кинетографы, иллюстрирующие переходы между различными элементами ухаживания самца и соответствующего поведения самки (Manning, 1959; Brown, 1965; Cobb *et al.*, 1985, 1989; Liimatainen, Hoikkala, 1998; Hoikkala, Crossley, 2000; Saarikettu *et al.*, 2005a; Dankert *et al.*, 2009). Этот метод описания ухаживания позволяет представить относительную частоту каждого элемента и перехода между ними. Однако такой метод основан на допущении последовательной смены элементов. Между тем показано, что даже у *D. melanogaster*, вида, известного своим достаточно стереотипным брачным поведением, некоторые элементы проявляются одновременно (Lasbleiz *et al.* 2006). В группе *D. virilis* по крайней мере три различных элемента могут выполняться одновременно. Поэтому в данной работе принцип построения диаграмм ухаживания (Vedenina *et al.*, 2013) отличается от использованных другими авторами (Manning, 1959; Brown, 1965; Cobb *et al.*, 1985, 1989; Liimatainen, Hoikkala, 1998; Hoikkala, Crossley, 2000; Saarikettu *et al.*, 2005a; Dankert *et al.*, 2009).

Цель исследования – выяснение роли акустического сигнала самца в поведении ухаживания и распознавании полового партнера *D. virilis* методом видеотипирования, а также изучение влияния удаления крыльев самцов и арист самок на поведение ухаживания и на эффективность ухаживания в целом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линия № 102 *D. virilis* взята из коллекции ИБР РАН. Свое начало эта линия берет от взрослых особей, выловленных в 1967 г. в Берлине (Германия). Мухи содержались на манно-дрожжевом корме в пробирках высотой 100 и диаметром 25 мм (5–10 мл корма) в термостатируемом помещении при суточном цикле 12 ч света/12 ч темноты. Имаго в возрасте 1–2 сут после линьки обездвигивались с помощью холода и разбирались по полу. Виргинные самки и неспарившиеся самцы содержались отдельно в пробирках указанного разме-

ра со стандартным кормом. Тесты проводились в таких же пробирках. Каждая особь принимала участие только в одном тесте. Крылья самцов или аристы самок удаляли микрохирургическими ножницами. Обе процедуры щадящие, и после них имаго обоего пола остаются активными. Удаление крыльев и арист осуществляли за 2–3 сут до постановки поведенческих тестов. Сами тесты проводили по достижении мухами двухнедельного возраста.

Поведение ухаживания регистрировали методом видеотипирования: все взаимодействия между самкой и самцом записывались на видеокамеру Sony HDR-SR 12E (Япония), а далее анализировались с помощью компьютерной программы Virtual Dub 1.10.3. Если самец не выказывал интереса к самке в течение 30 мин после начала эксперимента, мухи рассаживались. В случае ухаживания поведение регистрировали вплоть до копуляции или в течение 30 мин после начала ухаживания. Для каждой пары измеряли общую длительность каждого поведенческого акта и общую длительность ухаживания от начала первого акта до начала копуляции, исключая долгие паузы. Мы фиксировали восемь элементов ухаживания: преследование самцом самки, ощупывание самцом брюшка самки, лизание самцом гениталий самки, пение самца и пение самки, кружение самца вокруг самки, попытку копуляции и копуляцию (табл. 1). К попыткам копуляции мы относили те активные действия самца, которые не заканчивались копуляцией.

Длительности латентных периодов (время от начала ухаживания до начала каждого элемента) и самих элементов ухаживания были рассчитаны с помощью программы Microsoft Excel. Анализ данных проводился двумя исследователями. Сравнение полученных ими результатов не выявило достоверных различий. Полученные данные статистически обрабатывались с помощью программ Microsoft Excel и Statistica.

Были проведены три серии экспериментов: тесты с интактными мухами (контроль), с бескрылыми самцами и интактными самками, с интактными самцами и самками без арист. В каждой серии экспериментов было проведено 30 ссаживаний (табл. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Три элемента ухаживания (ощупывание, лизание и пение самца) были зафиксированы у каждой тестируемой пары в контроле (интактные мухи) и в серии с самками без арист (табл. 1). Преследование было отмечено примерно в половине тестов с интактными мухами и чаще в тестах с бескрылыми самцами и с самками без арист. Различия эти, однако, были незначимы. Самцы, уха-

Таблица 1. Частота встречаемости элементов ухаживания *Drosophila virilis* в трех сериях тестов

Вариант теста	Объем выборки, число тестов	Число (доля, %) тестов, в которых проявились элементы ухаживания							
		преследование	ощупывание	лизание	песня самца	кружение	попытки копуляции	копуляция	песня самки
♀ + ♂ интактные	30	17 (53.1)	30 (100)	30 (100)	30 (100)	12 (40)	9 (30)	26 (86.7)	29 (96.7)
♀ интактные + ♂ без крыльев	30	18 (60)	30 (100)	30 (100)	–	15 (50)	11 (36.7)	19 (63.3)	30 (100)
♀ без арист + ♂ интактные	30	23 (76.6)	30 (100)	30 (100)	30 (100)	24 (80)	16 (53.3)	18 (60)	30 (100)

Таблица 2. Длительность элементов брачного поведения *Drosophila virilis* в различных вариантах тестирования

Вариант ссаживания	Параметр	Преследование	Ощупывание	Лизание	Песня самца	Кружение	Попытки копуляции	Копуляция	Песня самки
Контроль – самцы без крыльев	<i>t</i>	–1.4	–2.13	–2.57	–	–0.8	–0.89	–1.03	–0.83
	df	58	58	58	28	58	58	58	58
	<i>p</i>	0.17	0.04*	0.01*	–	0.43	0.38	0.31	0.41
Контроль – самки без арист	<i>t</i>	–3.24	–1.95	–2.19	–3.63	–3.02	–1.61	–0.79	–2.35
	df	58	58	58	58	58	58	58	58
	<i>p</i>	0.002*	0.06	0.03*	0.0006*	0.004*	0.11	0.43	0.02*
Самцы без крыльев – самки без арист	<i>t</i>	–1.69	0.45	0.53	–	–2.06	–0.66	0.23	–1.38
	df	58	58	58	28	58	58	58	58
	<i>p</i>	0.1	0.65	0.6	–	0.04*	0.51	0.82	0.17

Примечание. *t* – критерий Стьюдента, df (degrees of freedom) – число степеней свободы, *p* – вероятность, “–” – отсутствие данного элемента брачного поведения в связи с отсутствием крыльев: для табл. 2 и 3.

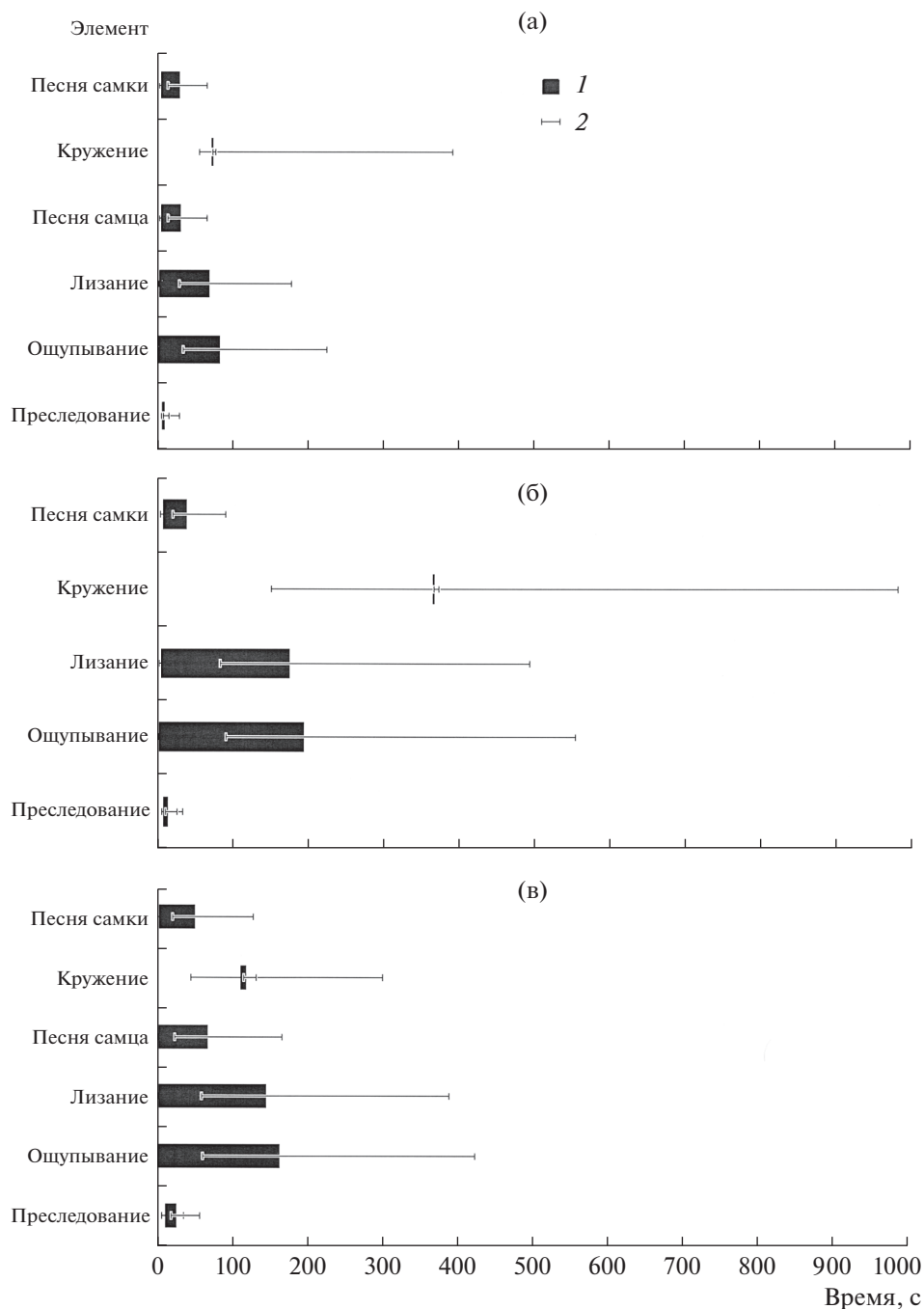
* $p < 0.05$; для табл. 2 и 3.

живающие за самками без арист, значимо чаще демонстрировали кружение по сравнению с бескрылыми и контрольными самцами (точный тест Фишера: $p = 0.0017$, с учетом поправки на False Discovery Rate $q = 0.033$ – скорректированное значение вероятности). Число копуляций было значимо выше в контроле, чем в тестах с бескрылыми самцами и самками без арист ($p = 0.036$ и 0.02 соответственно, с учетом поправки на False Discovery Rate $q = 0.05$ – скорректированное значение вероятности для множественных сравнений).

Во всех тестах самыми длительными элементами ухаживания были ощупывание и лизание (рисунки). Ощупывание и лизание осуществлялись почти одновременно, и на фоне этих актов самец

и самка издавали акустические сигналы. Длительность пения, однако, была значимо меньше, чем длительность ощупывания или лизания (табл. 2). В тестах с бескрылыми самцами и с самками без арист длительность ощупывания и лизания была значимо больше, чем в контроле. Более того, в тестах с самками без арист самцы дольше пели, преследовали самок и кружились, чем самцы в контроле; самки без арист также дольше пели, чем самки в контроле.

Длительности латентных периодов ощупывания не различались в разных вариантах тестирования (табл. 3). Интактные самцы в парах с самками без арист в среднем начинали петь быстрее, чем самцы в контроле, тогда как бескрылые самцы начинали кружиться позже по сравнению с



Латентный период и длительность элементов брачного поведения исследованных видов-двойников *Drosophila virilis* в различных вариантах тестирования. а – интактные мухи; б – тесты с бескрылыми самцами и интактными самками; в – тесты с интактными самцами и самками без арист. 1 – средняя продолжительность элемента, 2 – 95%-ный доверительный интервал.

интактными самцами. Также бескрылые самцы начинали позже лизать и кружиться, чем интактные самцы в тестах с самками без арист.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Частичное блокирование звукового канала путем удаления крыльев у самцов или арист у самок

D. virilis, проведенное в данном исследовании, привело к снижению эффективности ухаживания, а именно к увеличению числа попыток копуляции и значимому уменьшению числа успешных копуляций. Эти результаты соответствуют данным, полученным недавно на *D. virilis* другими авторами (LaRue *et al.*, 2015). Таким образом, песня самца необходима для успешного ухаживания.

Таблица 3. Длительность латентного времени элементов брачного поведения *Drosophila virilis* в различных вариантах тестирования

Вариант ссаживания	Параметр	Преследование	Ощупывание	Лизание	Песня самца	Кружение	Песня самки
Контроль – самцы без крыльев	<i>t</i>	–0.13	–0.74	–1.29	–	–2.44	–0.42
	df	33	58	58	28	25	57
	<i>p</i>	0.9	0.46	0.2	–	0.02*	0.68
Контроль – самки без арист	<i>t</i>	–0.67	1.31	1.34	2.78	–0.73	1.55
	df	38	58	58	58	33	57
	<i>p</i>	0.51	0.2	0.18	0.007*	0.47	0.13
Самцы без крыльев – самки без арист	<i>t</i>	–0.49	1.89	2.82	–	3.17	1.92
	df	39	58	58	28	36	58
	<i>p</i>	0.62	0.06	0.007*	–	0.003*	0.06

ния. В то же время оценка числа осемененных самок в экспериментах, в которых в течение 24 ч бескрылые самцы находились с интактными самками либо интактные самцы – с самками без арист, показала, что удаление арист у самок имело более критические последствия, чем удаление крыльев у самцов (Hoikkala, 1988). Этот факт, по всей видимости, отражает важность звукового контакта для самки и недостаточность сигналов другой модальности, осуществляемых самцом. В наших экспериментах с самками без арист структура ухаживания также менялась в большей степени, чем в тестах с бескрылыми самцами: самцы преследовали самок и кружились вокруг самок чаще и дольше, а самки больше пели. В то же время вопрос о том, почему удаление арист у самок оказывает большее воздействие на процесс ухаживания, чем удаление крыльев у самцов, остается открытым для исследования. Можно предположить, что в результате удаления арист самка перестает воспринимать не только акустический сигнал самца, но и другие низкочастотные колебания среды, вызываемые, например, кружением самца вокруг самки. Кроме того, удаление арист может быть более травматической для дрозофил процедурой, чем удаление крыльев, что сказывается на поведении самки в целом.

Повышенная акустическая активность самки в отсутствие песни самца, показанная нами и также отмеченная в другой работе (LaRue *et al.*, 2015), объясняется значимостью акустического дуэта для успеха ухаживания. Авторы этого исследования также отметили важность пения самки: отсутствие песни в экспериментах с бескрылыми самками снижало долю успешных ухаживаний. В то же время функция акустического сигнала самки остается не очень ясной и требует дальнейших исследований.

Основной результат нашего исследования состоит в том, что частичное блокирование акусти-

ческого канала связи приводит к увеличению длительности практически всех элементов ухаживания. Это согласуется с данными, полученными Хойккала и Аспи (Hoikkala, Aspi, 1993) на трех других видах этой группы (*D. littoralis*, *D. montana* и *D. ezoana*) при измерении общей длительности ухаживания, которая увеличивалась у бескрылых самцов по сравнению с контролем.

Роли акустических сигналов в брачном поведении у разных видов из группы *D. virilis* неодинаковы (Hoikkala, 1988; Hoikkala, Aspi, 1993). Например, у *D. littoralis* в отсутствие акустического сигнала самца доля копуляций снижается лишь незначительно, тогда как у *D. montana* элиминация акустического сигнала снижает эту долю до нуля (Hoikkala, Aspi, 1993). В дальнейшем мы планируем исследовать влияние удаления крыльев самцов и арист самок на поведение ухаживания на других видах-двойниках из этой группы дрозофил.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aspi J., Hoikkala A. Male mating success and survival in the field with respect to size and courtship song characters in *Drosophila littoralis* and *D. montana* (Diptera: Drosophilidae) // J. Insect Behav. 1995. V. 8. P. 67–87.
- Bartelt R.J., Arnold M.T., Schaner A., Jackson L.L. Comparative analysis of cuticular hydrocarbons in the *Drosophila virilis* species group // Comp. Biochem. Physiol. 1986. V. 83. P. 731–742.
- Brown R.G.B. Courtship behavior in the *Drosophila obscura* group. Pt II: Comparative studies // Behavior. 1965. V. 25. P. 281–323.
- Cobb M., Burnet B., Connolly K. The structure of courtship in the *Drosophila melanogaster* species sub-group // Behavior. 1985. V. 97. P. 182–212.
- Cobb M., Burnet B., Blizard R., Jallon J.-M. Courtship in *Drosophila sechellia*: its structure, functional aspects, and relationship to those of other members of the *Drosophila melanogaster* species subgroup // J. Insect Behav. 1989. V. 2. P. 63–89.

- Dankert H., Wang L., Hoopfer E.D., Anderson D.J., Perona P. Automated monitoring and analysis of social behavior in *Drosophila* // Nat. Meth. 2009. V. 6. P. 297–303.
- Hoikkala A. The importance of different courtship stimuli in the mating behavior of European species of the *Drosophila virilis* group // Ann. Zool. Fennici. 1988. V. 25. P. 257–263.
- Hoikkala A., Aspi J. Criteria of female mate choice in *Drosophila littoralis*, *D. montana* and *D. ezoana* // Evolution. 1993. V. 47. P. 768–777.
- Hoikkala A., Crossley S.A. Copulatory courtship in *Drosophila*: behavior and songs of *D. birchii* and *D. serrata* // J. Insect Behav. 2000. V. 13. P. 71–86.
- Hoikkala A., Lumme J. The genetic basis of evolution of the male courtship sounds in the *Drosophila virilis* group // Evolution. 1987. V. 41. P. 827–845.
- Hoikkala A., Aspi J., Suvanto L. Male courtship song frequency as an indicator of male genetic quality in an insect species, *Drosophila montana* // Proc. Roy. Soc. L. B. 1998. V. 265. P. 503–508.
- Klappert K., Mazzi D., Hoikkala A., Ritchie M.G. Male courtship song and female preference variation between phylogeographically distinct populations of *Drosophila montana* // Evolution. 2007. V. 61. P. 1481–1488.
- LaRue K.M., Clemens J., Berman G.J., Murthy M. Acoustic duetting in *Drosophila virilis* relies on the integration of auditory and tactile signals // eLife 4: e07277. 2015.
- Lasbleiz C., Ferveur J.-F., Everaerts C. Courtship behaviour of *Drosophila melanogaster* revisited // Anim. Behav. 2006. V. 72. P. 1001–1012.
- Liimatainen J.O., Hoikkala A. Interactions of the males and females of three sympatric *Drosophila virilis*-group species, *D. montana*, *D. littoralis*, and *D. lummei*, (Diptera Drosophilidae) in intra- and interspecific courtships in the wild and in the laboratory // J. Insect Behav. 1998. V. 11. P. 399–417.
- Liimatainen J.O., Jallon J.M. Genetic analysis of cuticular hydrocarbons and their effect on courtship in *Drosophila virilis* and *D. lummei* // Behav. Genet. 2007. V. 37. P. 713–725.
- Manning A. The sexual behavior of two sibling *Drosophila* species // Behavior. 1959. V. 15. P. 123–145.
- Oguma Y., Nemoto T., Kuwahara Y. (Z)-11-Pentacosene is the major sex pheromone component in *Drosophila virilis* (Diptera) // Chemoecology. 1992. V. 3. P. 60–64.
- Päällysaho S., Aspi J., Liimatainen J.O., Hoikkala A. Role of X chromosomal song genes in the evolution of species-specific courtship songs in *Drosophila virilis* group species // Behav. Genet. 2003. V. 33. P. 25–32.
- Ritchie M.G., Townhill R.M., Hoikkala A. Female preference for fly song: playbacks confirm correlational evidence of the targets of sexual selection // Anim. Behav. 1998. V. 56. P. 713–717.
- Saarikettu M., Liimatainen J.O., Hoikkala A. Intraspecific variation in mating behavior does not cause sexual isolation between *Drosophila virilis* strains // Anim. Behav. 2005a. V. 70. P. 417–426.
- Saarikettu M., Liimatainen J.O., Hoikkala A. The role of male courtship song in species recognition in *Drosophila montana* // Behav. Genet. 2005b. V. 35. P. 257–263.
- Satokangas P., Liimatainen J.O., Hoikkala A. Songs produced by the females of the *Drosophila virilis* group of species // Behav. Genet. 1994. V. 24. P. 263–272.
- Sawamura K., Tomaru M. Biology of reproductive isolation in *Drosophila*: toward a better understanding of speciation // Popul. Ecol. 2002. V. 44. P. 209–219.
- Spieth H.T. Mating behavior and sexual isolation in the *Drosophila virilis* species group // Behavior. 1951. V. 3. P. 105–145.
- Suvanto L., Hoikkala A., Liimatainen J.O. Secondary courtship songs and inhibitory songs of *Drosophila virilis* group males // Behav. Genet. 1994. V. 24. P. 85–94.
- Vedenina V.Y., Ivanova T.I., Lazebny O.E. Analysis of courtship behaviour in closely related species of *Drosophila virilis* group: a new approach arises new questions // J. Insect Behav. 2013. V. 26. P. 402–415.

The Role of Acoustic Signals in Courtship Behavior of *Drosophila virilis*

E. G. Belkina^{a,*}, O. E. Lazebny^a, and V. Yu. Vedenina^b

^aInstitute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

^bInstitute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Bol'shoi Karetnyi per. 19, building 1, Moscow, 127051 Russia

*e-mail: ellida69@mail.ru

The role of the male acoustic signal in courtship behavior in *Drosophila virilis* was studied by a video-typing method. Three series of the experiments were performed: tests with intact flies, with wingless males and intact females, and with intact males and females with the aristas removed. It was demonstrated that touching and licking were the most prolonged elements of the male courtship. It was noted that removal of the wings in males or aristas in females resulted in an increase in the duration of almost all elements of the courtship behavior (following, touching, licking, singing, and circling) and in a significant decrease in the portion of successful copulations. It was demonstrated that the courtship structure in the experiments with females without aristas changed to a greater extent than in tests with wingless males.