

УДК 57.087

УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ ПОДХОД К РЕГИСТРАЦИИ И АНАЛИЗУ ПОВЕДЕНИЯ УХАЖИВАНИЯ У ДРОЗОФИЛЫ

Н. Г. Камышев¹, Н. Г. Беседина¹, А. А. Панова², Ю. В. Брагина¹, Е. А. Камышева¹,
Е. А. Тимофеева¹, Л. В. Даниленкова¹

¹Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный университет

Поведение ухаживания у дрозофилы широко используется в исследованиях по нейрогенетике. С тем чтобы сделать его анализ более информативным с точки зрения обнаружения возможных генетически обусловленных нарушений сенсорных, моторных и интегративных механизмов, создана компьютерная программа, позволяющая осуществлять регистрацию элементов поведения одновременно у самца и самки в ухаживающей паре при многократных замедленных просмотрах видеозаписи. Программа проводит статистическую обработку сопряженных этограмм самца и самки, используя в том числе нетрадиционные методы. С русским интерфейсом программа распространяется бесплатно.

Ключевые слова: дрозофила, ухаживание, взаимодействие особей, компьютерная программа, регистрация поведения, этограмма, статистический анализ.

Введение. Плодовая мушка дрозофила (*Drosophila melanogaster*) является модельным видом насекомых, который широко и плодотворно используется в исследованиях по генетике с начала XX-го в. Начиная с инициативы Сеймура Бензера, известной как программа «от гена к поведению», изучение роли отдельных генов в определении особенностей поведения и функций нервной системы развилось в мощную область исследований, которую стали называть нейрогенетикой дрозофилы [5; 6]. Секвенирование генома дрозофилы обнаружило среди прочего, что примерно для 60% предсказанных методами биоинформатики генов функция не известна [2]. Многие из этих генов могут оказаться «поведенческими», т.е. их функция может быть установлена изучением особенностей поведения у генетически модифицированных мух-дрозофил.

Ухаживание является наиболее сложным поведением у дрозофилы. Оно включает взаимный обмен множественными сенсорными сигналами между самцом и самкой, моторные программы, реализуемые в виде различных элементов ритуала ухаживания, и интегративные механизмы, обеспечивающие пластичность поведения ухаживания в зависимости от приобретенного индивидуального опыта [3; 4]. Будучи столь богатым по вовлеченности различных физиологических (и, соответственно, молекулярных) механизмов, ухаживание идеально подходит для обнаружения максимального потенциала поведенческих отклонений у мутантов и других генетически модифицированных линий дрозофилы с помощью всего лишь одной тест-системы. Это, однако, требует усовершенствованного подхода к регистрации и детальному анализу поведения ухаживания. Такой подход позволяет реализовать созданная нами компьютерная программа для регистрации и анализа сопряженных этограмм самца и самки на основе видеозаписи ухаживающей пары мух-дрозофил – DCVA – *Drosophila courtship video analysis*.

Запись видео. Самца и самку помещали в плексиласовую экспериментальную камеру (диаметр 15 мм, высота 5 мм), и процесс ухаживания снимали в течение 300 с цифровой видеокамерой Sony DCR-TRV730E (18-кратное оптическое увеличение) с записью файла на жесткий диск компьютера в формате MPEG-I со скоростью 25 кадров в секунду. Размер файла (50,8 Мб) обеспечивал достаточное качество для после-

дующего анализа видеозаписи и позволял сохранять большое число видеофайлов на диске длительное время.

Описание программы. Программа состоит из регистрирующего и нескольких анализирующих модулей.

Регистрирующий модуль. Видеофайл в формате MPEG-1 открывается из меню «Файл», и в раскрывающемся отдельном окне показывается его первый кадр. Меню «Режим» позволяет установить один из шести режимов. Первый предназначен просто для просмотра видеозаписи. Скорость просмотра, равная 1, 2,5, 5, 10, 15, 20 или 25 кадрам в секунду, устанавливается из меню «Скорость». Просмотр может начинаться с любого произвольного кадра, устанавливаемого ползунком указателя текущего кадра. Можно также просматривать видеозапись кадр за кадром в прямом и обратном направлении, используя клавиши со стрелками, или перемещаться сразу на 10 кадров вперед или назад с помощью клавиш PgUp и PgDn. Эти функциональные возможности сохраняются и во всех остальных режимах.

Второй режим используется для регистрации этограммы самца. Основными элементами, составляющими ритуал ухаживания самца и выполняемыми преимущественно в указанном ниже порядке, являются: (1) ориентация, когда самец замирает, располагая свое тело головой в сторону самки; (2) преследование ухаживающим самцом убегающей самки; (3) вибрирование крыльями – исполнение самцом видоспецифичной импульсной песни ухаживания, которое может происходить как в положении ориентации, перемежаемом короткими перебежками самца вокруг самки, так и на бегу в ходе преследования самки; (4) лапанье, когда самец обхватывает передними ногами брюшко самки, ощущая ее кутикулярные феромоны и приходя в еще большее половое возбуждение; (5) предкопуляционное поведение – лизание самцом гениталий самки; (6) попытка копуляции или успешная копуляция. Кроме элементов ухаживания самец, естественно, выполняет и элементы поведения, не имеющие отношения к ухаживанию, которые являются общими для самцов и самок. Это – просто побежка, просто покой, а также прининг – трение ногой о ногу или ногами о другие части тела. Прининг может иметь как сигнальное значение, являясь средством отпугивания других особей, так и использоваться по прямому назначению – для чистки тела. Поэтому при регистрации поведения мы различаем направленный на полового партнера прининг передними ногами, направленный прининг задними ногами и ненаправленный прининг. Проявлением агрессии является лягание соседа. Если муха совершает его первой, то это атака, если в ответ на агрессивные действия другой особи, – это отражение атаки. Редкими средствами взаимодействия особей являются три следующих: отставление мухой одной из ног (держа ногу в горизонтальном положении, муха контролирует индивидуальную дистанцию); отмах назад сложенными приподнятыми крыльями (используется для отпугивания другой особи, зашедшей сзади); ножницеобразные движения сложенными крыльями (возможно, также являются средством отпугивания).

Экспериментатор фиксирует точные моменты начала элементов поведения самца нажатием на соответствующие клавиши. Раскладка клавиатуры постоянно видна в программном окне (рис. 1, справа). В ходе просмотра видеозаписи нажатие на эти клавиши немедленно отображается в виде обозначения соответствующего элемента поведения в легенде текущего поведения самца (рис. 1, слева внизу). Если до этого уже была создана этограмма самки, то изменения в ее поведении отображаются в легенде текущего поведения самки. Если во время демонстрации видеозаписи в этом режиме наблюдатель нажимал на значимые клавиши, то программа делает запрос, следует ли сохранить эту информацию в этограмме самца. Этограмма сохраняется в файле в виде последовательности записей, каждая из которых включает код элемента поведения и номер кадра, соответствующего моменту его начала. Экспериментатор может выполнять повторные перезаписи этограммы, начиная с любого кадра и заканчивая любым кадром. Соответствующая часть этограммы автоматически переписывается после диалога подтверждения. Конец этограммы, соответствующий моменту прекращения наблюдения, устанавливается нажатием кнопки «Последний кадр».

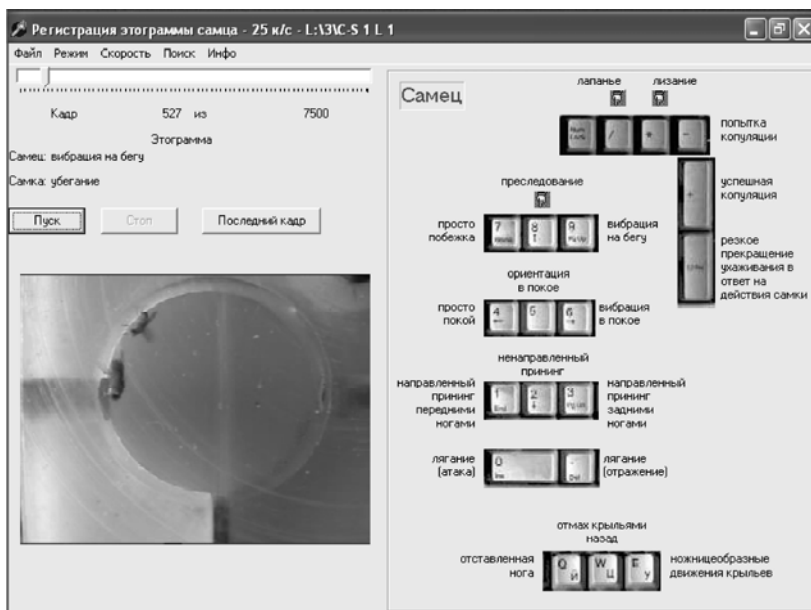


Рис. 1. Программа DCVA (Drosophila courtship video analysis) – режим регистрации этограммы самца

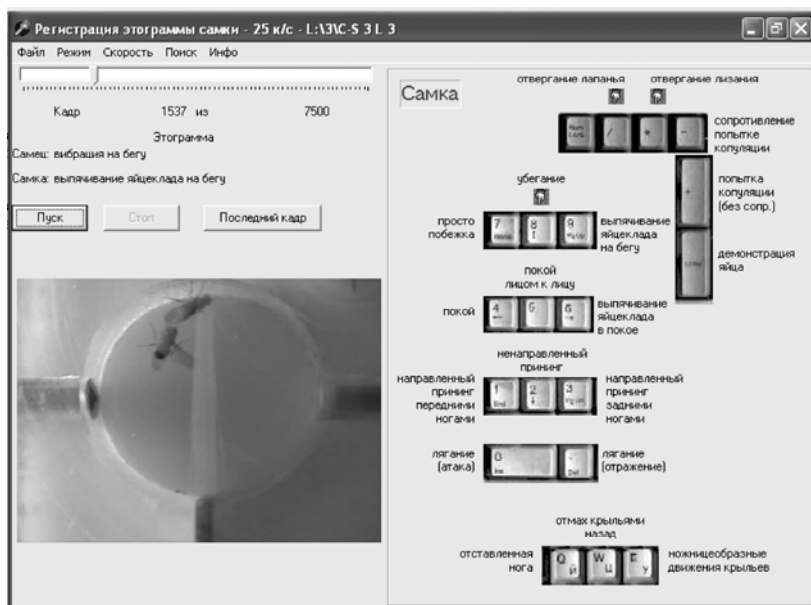


Рис. 2. Программа DCVA – режим регистрации этограммы самки

Третий режим – для регистрации этограммы самки. Он полностью аналогичен второму, за исключением, естественно, набора элементов поведения, присущих самке (рис. 2). К ним, в частности, относится убегание от преследующего самца и выпячивание самкой яйцеклада как средство отвергания ухаживания.

Четвертый режим – для ревью этограмм. При просмотре видеозаписи в этом режиме записанные этограммы самца и самки одновременно визуализируются про-

граммой, и экспериментатор имеет возможность оценить их соответствие реальному поведению ухаживающей пары. При необходимости внесения небольших исправлений в этограммы используются режимы 5 и 6 для их поккадрового редактирования: наблюдатель выбирает необходимый кадр и нажимает клавишу для элемента поведения самца (режим 5) или самки (режим 6). Это позволяет сдвинуть время начала элемента ухаживания в этограмме на один или несколько кадров. Повторное занесение в этограмму одного и того же элемента без другого элемента поведения в качестве разделителя никак не учитывается: в этограмме сохраняется только то одноименное событие, которое случилось раньше.

К дополнительным чертам интерфейса регистрирующего модуля программы относится меню «Поиск», позволяющее моментально находить нужный кадр по его номеру и обнаруживать последовательные вхождения интересующего элемента поведения в этограммах.

Этограммы сохраняются в той же папке и имеют то же название, что и соответствующие видеофайлы, но с разными расширениями: «mal» – для самцов и «fem» – для самок. Именно эти файлы используются далее разными инструментами анализа.

Сравнение этограмм. Сравнение этограмм включает сравнение трех типов параметров: (1) выраженной в процентах доли времени, занятого определенным элементом поведения; (2) частоты инициализации элемента поведения в пересчете на 100 с наблюдения; (3) длительности отдельных эпизодов, исчисляемой в секундах, от начала исполнения заданного элемента поведения до начала исполнения любого другого элемента. При исчислении длительности элементы поведения, занимающие в этограмме первую и последнюю позиции, отбрасываются как эпизоды с неопределенным моментом их начала или завершения. Указанные типы параметров вычисляются не только для тех элементов поведения, которые подвергались непосредственной регистрации и видны на рис. 1 и 2, но и для их определенных комбинаций. Пожалуй, главной из них у самцов является комбинация любых элементов ухаживания, т.е. ухаживание в целом без его подразделения на отдельные элементы. Эпизод ухаживания начинается с началом любого элемента ухаживания и заканчивается с началом любого элемента поведения, не связанного с ухаживанием. Процент времени, занятого ухаживанием, называют также индексом ухаживания. К другим важным комбинациям элементов поведения у самцов относятся перерывы в ухаживании (комбинация любых элементов, не связанных с ухаживанием), локомоция (просто побежка, преследование, вибрация на бегу), перерывы в локомоции. Кроме того, представляют интерес такие комбинации, как ориентация + преследование, вибрация в покое и на бегу, суммарный прининг. У самок к рассчитываемым комбинациям элементов относятся локомоция (просто побежка, убегание, выпячивание яйцеклада на бегу), перерывы в локомоции, суммарный покой, суммарный прининг, выпячивание яйцеклада в покое и на бегу.

При выборе опции «Сравнение этограмм» из меню главного окна программы инициализируется диалог открытия файлов первой (контрольной) экспериментальной группы. Далее пользователю предоставляется возможность выбора файлов дополнительных экспериментальных групп, число которых не ограничено. Из меню «Сравнение» можно выбрать два варианта: «Сравнить как независимые экспериментальные группы» и «Сравнить как зависимые экспериментальные группы». Зависимыми экспериментальные группы являются в случае последовательных наблюдений за одними и теми же особями. Например, при выработке условно-рефлекторного подавления ухаживания, когда самец снижает интенсивность своего ухаживания за всеми последующими самками после приобретения опыта ухаживания за нерцептивной оплодотворенной самкой, интерес могут представлять наблюдения за одним и тем же самцом в начале и конце тренировки, а также в тесте с другой самкой. В обоих случаях в текстовый файл и в окно программы тут же выводятся сначала результаты анализа этограмм самцов, а затем результаты анализа этограмм самок. Каждый из этих двух разделов

содержит следующую информацию: список исходных файлов для каждой экспериментальной группы, пронумерованный список элементов поведения и вышеупомянутых комбинаций для самца или самки. В соответствии с номерами в этом списке получают название сравниваемые параметры. У самцов T1 – T29 – это доли времени, занятого элементом поведения или определенной комбинацией элементов; F1 – F29 – соответствующие частоты их инициализации; D1 – D29 – соответствующие длительности. В табличной форме в отдельных строках для каждого файла выводятся значения T1– T29 и F1 – F29. Данные могут быть скопированы и легко перенесены в любую другую программу для дальнейшей статистической обработки и построения графиков. Потом для всех этих параметров выводятся средние значения, выборочные дисперсии, стандартные ошибки и размер выборки. Для удобства построения разных типов графиков используется два типа вывода этих данных. В первом случае данные сортируются сначала по экспериментальным группам, а в пределах каждой группы – по обрабатываемым параметрам, например, от T1 до T29. Во втором случае сначала выполняется сортировка по параметрам, а в пределах каждого параметра – по экспериментальным группам. Этот порядок вывода удобен для визуализации результатов сравнения разных экспериментальных групп. Затем для каждого параметра представляются результаты сравнения выборочных дисперсий между всеми экспериментальными группами с использованием двустороннего F-критерия. В случае независимых экспериментальных групп далее представляются результаты взаимного сравнения средних значений по группам с использованием двустороннего t-критерия для независимых выборок. При равенстве дисперсий используется объединенная дисперсия, при неравенстве – t-критерий Уэлча. В случае зависимых экспериментальных групп используется парный t-критерий. Во всех случаях для каждого сравнения выводится значение t-критерия, степени свободы и вероятность нулевой гипотезы, сопровождаемая пометкой одной, двумя или тремя звездочками (соответственно для $P < 0,05$, $P < 0,01$ и $P < 0,001$). Сравнение длительностей несколько отличается от сравнения долей времени и частот инициализации. При сравнении независимых экспериментальных групп длительность эпизодов элементов поведения вычисляется не для отдельных особей, а для всей группы в целом. Соответственно размер выборки определяется не числом особей, а суммарной встречаемостью эпизода определенного поведения в группе. Поэтому программа выводит не отдельные значения длительностей, а лишь их средние значения по группе. Для реализации парного t-критерия при сравнении зависимых экспериментальных групп производится вычисление средней длительности эпизода для каждой особи.

Другие инструменты анализа. К некоторым другим инструментам анализа, которые не могут быть подробно описаны из-за ограниченности объема данной статьи и которые постоянно развиваются и дополняются, относятся следующие.

Прежде всего, это инструменты, обеспечивающие анализ сопряженных этограмм самца и самки в одной экспериментальной группе. Первым инструментом является возможность оценить влияние любого действия самки на интенсивность ухаживания самца. Для этого вычисляется так называемый моментальный индекс ухаживания (индекс ухаживания, вычисляемый для крайне ограниченного времени наблюдения, по умолчанию равного 3 с) непосредственно до выполнения данного действия самкой и сразу после него. Эффект действия самки вычисляется как разность «после-до» для всего массива данных и статистически оценивается парным t-критерием.

Другой инструмент позволяет увидеть, какие же действия самца, начались во время исполнения определенного действия самкой, и наоборот. Например, на рис. 3 видно, что наиболее часто исполнение самкой направленного прининга передними ногами совпадает с совершением самцом ориентации и вибрации в покое.

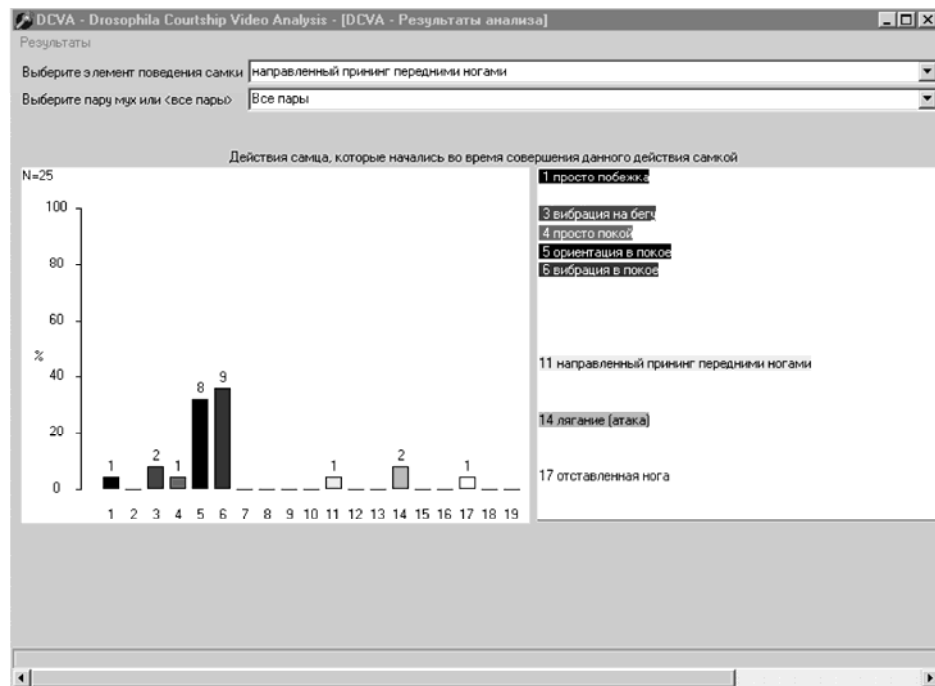


Рис. 3. Один из инструментов анализа сопряженных этограмм самца и самки в пределах одной экспериментальной группы. Показана гистограмма частот действий самца, которые начались во время исполнения самкой направленного прининга передними ногами

Важную информацию могут представлять таблицы частот переходов от одного элемента поведения к другому у самцов и самок. Наконец, используются и довольно специфические методы анализа. Например, нам удалось показать, что самцы дикого типа снижают интенсивность ухаживания после исполнения ими попытки копуляции, причем достоверное снижение происходит только в том случае, если во время попытки копуляции самка выпячивает яйцеклад [1].

Возможности использования программы. С русским интерфейсом программа вместе с исходными кодами в Delphi 7.0 предоставляется бесплатно при запросе на адреса электронной почты nkamster@gmail.com или nkam@pavlov.infran.ru в существующем на момент запроса виде. Возможно предоставление модифицированных версий программы по согласованию с авторами (Н. Г. Камышев). Платформа для использования программы – разные версии Windows.

Благодарности. Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-00997, программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов», научной программой Санкт-Петербургского научного центра РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беседина Н.Г., Илиади К.Г., Илиади Н.Н., Брагина Ю.В., Камышева Е.А., Соболева С.А., Камышев Н.Г. Новые мутации, нарушающие память у дрозофилы: Поведенческая характеристика Р-инсерционного мутанта по локусу *Ent2* // Генетика. 2008. (в печати).

2. Adams M.D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster* // Science. 2000. V. 287. P. 2185–2195.
3. Greenspan R.J., Ferveur J.F. Courtship in *Drosophila* // Annu. Rev. Genet. 2000. V. 34. P. 205 – 232.
4. Mehren J.E., Ejima A., Griffith L.C. Unconventional sex: fresh approaches to courtship learning // Curr. Opin. Neurobiol. 2004. V. 14. P. 745 – 750.
5. Sokolowski M.B. *Drosophila*: genetics meets behaviour // Nat. Rev. Genet. 2001. V. 2. P. 879 – 890.
6. Vosshall L.B. Into the mind of a fly // Nature. 2007. V. 450. P. 193 – 197.

REFINED APPROACH TO REGISTER AND ANALYZE COURTSHIP BEHAVIOR IN *DROSOPHILA*

N.G. Kamyshev¹, N.G. Besedina¹, A.A. Panova², J.V. Bragina¹, E.A. Kamysheva¹,
E.A. Timofeeva¹, L.V. Danilenkova¹

¹ Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg

² St. Petersburg State University, St. Petersburg

Courtship in Drosophila is widely used in studies on neurogenetics. To make its analysis more informative while investigating possible genetic influences on sensory, motor and integrative physiological mechanisms, the computer program is developed, which allows to register behavioral elements simultaneously in courting male and female using repeated slow viewing of video records. The program performs statistical treatment of conjugate male and female ethograms using, among others, unconventional approaches. The program has only Russian interface and is distributed as freeware.