

УДК: 575.224.23:57.022:57.024:57.017.68:595.787

### **Влияние пигментных мутаций пород тутового шелкопряда на некоторые поведенческие признаки**

**В.В.Костенко, Н.С.Филипоненко, Д.С.Григорьев, Л.И.Воробьева**

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)  
kostenkoviktoria88@rambler.ru*

Изучено влияние пигментных мутаций тутового шелкопряда на локомоторную активность имаго самцов и высоту завивки гусениц. Установлено достоверное влияние пигментных мутаций на локомоторную активность имаго самцов. Показано достоверное влияние пола и генотипа на высоту завивки гусениц.

**Ключевые слова:** *тутовый шелкопряд, пигментные мутации, признаки поведения.*

### **Вплив пігментних мутацій порід шовковичного шовкопряду на деякі ознаки поведінки**

**В.В.Костенко, Н.С.Філіпоненко, Д.С.Григор'єв, Л.І.Воробйова**

Вивчено вплив пігментних мутацій шовковичного шовкопряду на локомоторну активність имаго самців і висоту завивання гусениць. Встановлено достовірний вплив пігментних мутацій на локомоторну активність имаго самців. Показаний достовірний вплив статі і генотипу на висоту завивання гусениць.

**Ключові слова:** *шовковичний шовкопряд, пігментні мутації, ознаки поведінки.*

### **The influence of pigment mutations on some behavior traits of silkworm stocks** **V.V.Kostenko, N.S.Filiponenko, D.S.Grigor'yev, L.I.Vorobyova**

The influence of pigment mutations on locomotor activity of adult males and height of larvae pupation of silkworm has been studied. The significant effect of pigment mutations on locomotor activity of adult males has been observed. The significant influence of gender and genotype on the height of larvae pupation has been shown.

**Key words:** *silkworm, pigment mutations, behavior traits.*

#### **Введение**

Тутовый шелкопряд (*Bombyx mori* L.) уже более 3000 лет используется человеком как объект сельскохозяйственного производства. Искусственным отбором выведены многие породы шелкопряда, различающиеся по шелконостности, продуктивности, морфологическим и физиологическим признакам. Тутовый шелкопряд используется также как модельный объект для изучения многих генетических задач. У насекомого исследован весь хромосомный набор, выявлено более 400 видимых мутаций, локализованных в конкретных локусах хромосом, в том числе гены, отвечающие за синтез различных пигментов.

У представителей отряда Lepidoptera, к которому относится тутовый шелкопряд, набор пигментов является интересным с точки зрения эволюции, поскольку был сформирован под действием естественного отбора. Известно, что оммохромы являются большой группой пигментов в мире насекомых, влияющих на окраску яиц (грены), глаз и тела (Osanai-Futuhashi et al., 2012). Также установлено, что пигмент меланин отвечает за окрашивание наружных покровов насекомых (Qialo et al., 2012). У тутового шелкопряда пигменты флавоноиды и каротиноиды проявляют себя в окрашивании коконов в разные оттенки желтого, красного и зеленого цветов (Tabunoki et al., 2004). Согласно данным литературы, цвет глаз имаго тутового шелкопряда бывает черным (норма), белым, красным, розовым и он может совпадать или нет с цветом грены, которую получают от бабочек с определенным цветом глаз. Учеными G.X.Quan с соавт. были выделены у тутового шелкопряда гомологи генов *white*, *scarlet*, *cinnabar* и *vermilion* дрозофилы, которые ответственны за синтез пигментов (Quan et al., 2002). Мутации, возникающие в данных генах, не только приводят к нарушению нормальной пигментации, но и также вызывают блокировку синтеза (на разных этапах) нейрoактивных веществ, таких как серотонин, допамин, октопамин. В работах сотрудников кафедры генетики и цитологии ХНУ имени В.Н.Каразина было показано, что мутации в генах *white*, *scarlet*, *cinnabar* и *vermilion*, и ряд других пигментных мутаций у дрозофилы приводят к нарушениям

двигательной и половой активности имаго (Волкова, Воробьева, 2005; Гадяка, Воробьева, 2011). Однако у тутового шелкопряда подобные исследования ранее не проводили.

Таким образом, цель настоящей работы – изучить влияние разных пигментных мутаций тутового шелкопряда на поведенческие признаки, такие как локомоторная активность имаго самцов и высота завивки гусениц.

### Материалы и методы

Эксперименты по изучению влияния пигментных мутаций на поведенческие признаки тутового шелкопряда были выполнены на биологической станции Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина в с. Гайдары Змиевского района Харьковской области в период с 2008 по 2010 гг.

Инкубацию грены и коконов тутового шелкопряда, выкормку гусениц, а также папильонаж проводили по стандартной методике разведения шелкопрядов.

Локомоторную активность (ЛА) оценивали у самцов, поскольку, находясь в состоянии полового возбуждения, они перемещаются в поисках самки. Для этого виргинную самку помещали на достаточно отдаленном расстоянии во избежание полового контакта. Наблюдение за движущимся самцом проводили в течение 10 минут на специально расчерченной на квадраты бумаге (5×5 см и общей площадью 25 см<sup>2</sup>), определяя суммарную длину его пробега. Также нами была оценена ЛА имаго самцов тутового шелкопряда в процессе старения. Для этого показатель ЛА измеряли каждый день с момента выхода имаго до его биологической смерти.

Высоту завивки гусениц (ВЗГ) определяли как расстояние от нижней части кокона, прикрепленного на коконнике, к нижней поверхности коконника (высота коконника составляет 50 см). Нами также было изучено влияние пола на показатель ВЗГ. Пол определяли на стадии куколки после окончательного формирования коконов и проведения замеров ВЗГ. Также была проведена оценка смертности на стадии куколки.

В работе были использованы породы тутового шелкопряда из коллекции кафедры генетики и цитологии, которые характеризуются различными пигментными мутациями.

#### Характеристика пород тутового шелкопряда (*Bombyx mori* L.):

Советская-5: гусеницы белые, слабо перепелиные, коконы белые, округлые. Грена мечена по полу. Характеризуется отсутствием пигмента в серозной оболочке грены, из которой выходят гусеницы-самцы, и наличием пигментации в грене самок.

Белококонная: китайская порода, получена из КНР. Гусеницы светло-серые, с маской. Кокконы овально-круглые, белые без перетяжки.

Зеленая: порода японской селекции, завезенная из Китая в 1956 г. Гусеницы светло-серые, коконы салатные с перетяжкой.

Украинская селекционная-5 (Ус-5): старая порода украинской селекции. Мураши черные, гусеницы белые без маски, коконы белые с голубишной без перетяжки, бабочки белые

Украинская селекционная черные бабочки (Ус-ч/б): гусеницы имеют светлую пигментацию, коконы белые, бабочки черные.

Полученные в ходе эксперимента данные были обработаны статистически. Для оценки влияния особенностей генотипа на изучаемые показатели ЛА, ВЗГ и смертность на стадии куколки использовали дисперсионный анализ. Силу влияния оценивали по методу М.Снедекора (Лакин, 1990). Для статистической обработки данных использовали программу STATISTICA 8.0.

### Результаты

Для оценки локомоторной активности имаго тутового шелкопряда использовали самцов, так как именно они проявляют двигательную активность в присутствии самки, реагируя на половые аттрактанты, которые она выделяет.

Как видно на рис. 1, анализ ЛА у самцов пород Белококонная, Зеленая, Ус-ч/баб и Ус -5 достоверно между собой не отличаются, хотя и показывают наивысшие результаты – 392,1±59,67, 484,81±58,82, 475,5±98,86 и 538,04±56,9 соответственно.

Уровень ЛА имаго породы Советская-5 существенно ниже. Кроме того, самцы внутри этой породы отличаются друг от друга пигментацией глаз. Нами установлено, что самцы с белыми глазами имеют более чем в два раза выше уровень локомоторной активности в сравнении с самцами, имеющими черные глаза, – 160,75±27,3 и 67,83±16,77 соответственно.

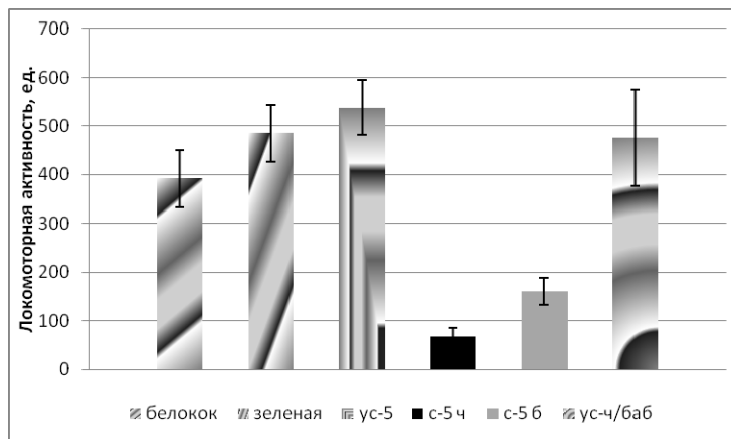


Рис. 1. Локомоторная активность самцов *Bombyx mori*

Для определения роли генотипа в формировании признака «локомоторная активность самцов» использовали однофакторный дисперсионный анализ. В результате статистической обработки данных мы получили достоверное влияние генотипа на ЛА насекомого, а именно сила влияния фактора составила 16,78% ( $p < 0,05$ ).

На рис. 2 представлены данные по изучению влияния старения на локомоторную активность самцов имаго разных пород *Bombyx mori*.

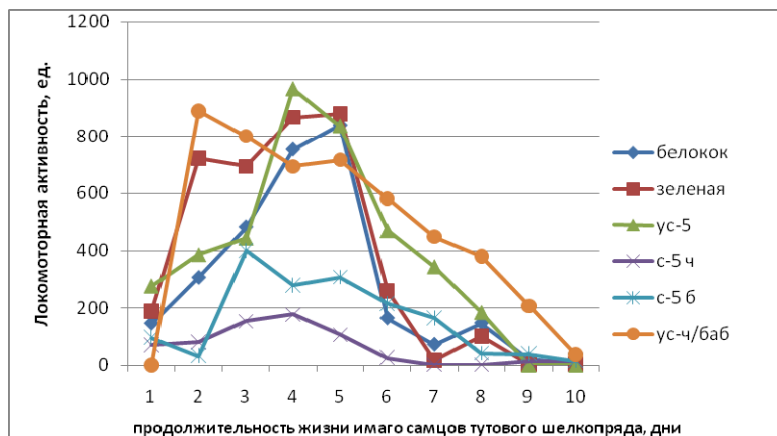


Рис. 2. Влияние старения имаго на изменчивость локомоторной активности самцов тутового шелкопряда

Полученные результаты показали, что для линий Белококонная, Зеленая и Украинская селекционная-5 максимум ЛА в период жизни имаго приходится на 4–5 день после выхода из куколки, в то время как пик локомоторной активности породы, в генотипе которой присутствует ген *mln* (Украинская селекционная, черные бабочки), соответствует 2 суткам жизни имаго. Что касается породы Советская-5, то четко выраженных пиков ЛА не наблюдается, как для особей с генотипом  $w^+$ , так и для мутантов по этому гену –  $w$ . Для всех пород характерно снижение ЛА, начиная с пятого дня жизни имаго, и далее, пока они не погибли.

Следует отметить, что такой короткий период жизни имаго тутового шелкопряда обусловлен повышенной во время проведения эксперимента температурой окружающей среды – выше  $34^{\circ}\text{C}$ , что соответствует некоторым литературным данным (Михайлов, Гершензон, 1958).

При изучении высоты завивки гусениц у разных пород тутового шелкопряда (рис. 3) установлено, что максимальная ВЗГ характерна для породы Советская-5, в частности, для особей с белыми глазами. Минимальное значение ВЗГ наблюдали для особей породы Украинская селекционная, черные бабочки.

В результате разделения куколок шелкопряда на самок и самцов нами была проведена оценка связи пола с высотой завивки гусениц (табл. 1). Установлено, что для всех изученных пород ВЗГ самок превосходит ВЗГ самцов, за исключением породы Украинская селекционная, черные бабочки, у которой ВЗГ самцов достоверно выше, чем ВЗГ самок.

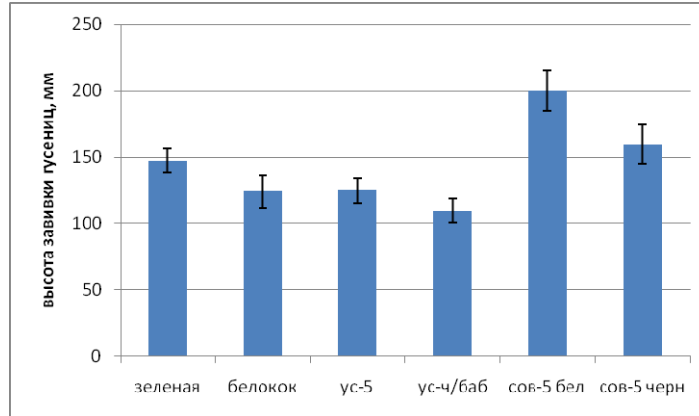


Рис. 3. Высота завивки гусениц у разных пород тутового шелкопряда

При изучении показателя смертности на стадии куколки показано, что минимальное значение данного показателя характерно для породы Белококонная. Остальные изученные породы имеют достоверно значимый больший процент леталей на стадии куколки, но между собой не различаются по этому показателю (см. табл. 1).

Таблица 1. Показатели ВЗГ и % леталей на стадии куколки у разных пород тутового шелкопряда

Порода	ВЗГ, мм		ВЗГ общ., мм	% леталей на стадии куколки
	самки	самцы		
Зеленая	150,09±12,19	126±15,48	146,99±8,84	21,11±4,3
Белококонная	138,86±18,01	106,47±18,08	123,67±12,09	6,25±3,49
Ус-5	169±18,52*	99,25±14,64	124,46±9,65	27,18±0,21
Ус-ч/баб	87,94±18,39**	131,66±12,16	109,55±9,06	25,68±5,08
Сов.-5 б.гл.	212,94±13,95*	179,11±18,93	200,06±15,21	23,4±6,17
Сов.-5 ч.гл.	222±19,81*	113±22,99	159,45±14,74	31,9±6,79

Примечания: \*значения ВЗГ самок достоверно превышают показатели самцов ( $p < 0,05$ ); \*\*значения ВЗГ самок достоверно уступают показателям самцов ( $p < 0,05$ ).

Для определения роли влияния генотипа и пола на ВЗГ использовали двухфакторный дисперсионный анализ. В результате было установлено, что сила влияния генотипа составила 25,04% ( $p < 0,05$ ), а пола – 12,46% ( $p < 0,05$ ). Также было показано совместное влияние факторов пол и генотип на изучаемый признак – 18,45% ( $p < 0,05$ ).

### Обсуждение

Следует отметить, что хотя разница по ЛА пород Белококонная и Зеленая является не достоверной, самцы с мутацией в локусе *Gb* характеризуются большей подвижностью и более высокими показателями ВЗГ. Возможно это связано с тем, что флавоноиды, которые участвуют в окрашивании коконов в зеленый цвет, модифицируются в организме шелкопряда с помощью фермента глюкозилтрансферазы таким образом, что передают остаток глюкозы в С-5 гидроксиположение кверцетину и, как следствие, образующееся соединение повышает приспособленность организма и увеличивает антиоксидантное состояние тканей к различным стресс-факторам (Daimon et al., 2010; Tabunoki et al., 2004). Можно также предположить, что различия между породами по всем изученным показателям связаны с тем, что во время стадии куколки в период метаморфоза

происходят количественные изменения в соотношении D-серина и L-серина, которые являются аналогами L-метионина (Kaskoos et al., 2012). По-видимому, если изменяется количественное отношение данных веществ (например, увеличивается или уменьшается их концентрация), то это может влиять как на признаки приспособленности, так и на поведение.

Полученные данные по изучению ЛА самцов разных пород тутового шелкопряда позволяют предположить, что присутствие в генотипе породы мутации в гене *mln* приводит к снижению данного показателя. Известно, что пигмент меланин образуется из аминокислоты тирозин, который под действием тирозиназы превращается в ДОФА, который затем трансформируется в допамин (Qialo et al., 2012; Zhan et al., 2010). Следует отметить, что тирозин совместно с ДОФА являются предшественниками медиаторов нервной системы, и блокировка синтеза нейроактивных веществ на разных его этапах приводит к накоплению ряда веществ, которые отрицательно влияют на приспособленность организма.

Высокие значения показателей поведенческих признаков, полученные для породы Советская-5, имеющей мутацию в гене *white*, по-видимому, связаны с тем, что накопление промежуточных метаболитов кинуренинового пути обмена в тканях тутового шелкопряда оказывает иное действие на функционирование нервной и мышечной систем по сравнению с действием на организм дрозофилы (Костенко, Воробьева, 2012).

Таким образом, нами показано влияние пигментных мутаций тутового шелкопряда на поведенческие признаки, что подтверждают данные дисперсионного анализа. Характер влияния пигментных мутаций не однозначен и зависит от того, на какой стадии развития организма данная мутация имеет более выраженное фенотипическое проявление.

#### Список литературы

- Волкова Н.Е., Воробьева Л.И. Влияние генных мутаций хромосом 1 и 2 на половое поведение *Drosophila melanogaster* // Вісник Одеського національного університету. Серія: біологія. – 2005. – Вип.5. – Т.10. – С.115–124.
- Гадяка А.В., Воробьева Л.И. Анализ компонентов приспособленности линий *Drosophila melanogaster* с нарушением системы АВС-транспортер // Вестник Харьковского университета имени В.Н.Каразина. Серія: біологія. – 2011. – Вип.14, № 971. – С. 92–97.
- Костенко В.В., Воробьева Л.И. Влияние аллелей локуса *white* и генетического фона на локомоторную активность имаго *Drosophila melanogaster* // Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина. Серія: біологія. – 2012. – Вип.16, №1035. – С. 90–96.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – Москва: Высшая школа, 1990. – 351с.
- Михайлов Е.Н., Гершензон С.М. Биология тутового и дубового шелкопрядов. – М.: Сельхозгиз, 1958. – 208с.
- Kaskoos R.A., Ali Mohd., Javed N.K. Phytochemical investigation of the silk cocoons of *Bombyx mori* L. // IRJP. – 2012. – Vol.3. – P.180–183.
- Daimon T., Hirayama C., Kanai M. et al. The silkworm *Green b* locus encodes a quercetin 5-O-glucosyltransferase that produces green cocoons with UV-shielding properties // PNAS. Genetics. – 2010. – P. 1–6.
- Osanai-Futuhashi M., Tatematsu K., Yamamoto K. et al. Identification of the *Bombyx* red egg gene reveals involvement of a novel transporter family gene in late steps of the insect ommochrome biosynthesis pathway // The Journal of Biological Chemistry. – 2012. – Vol.287. No21. – P. 17706–17714.
- Qialo L., Li Y., Xiong G. et al. Effects of altered catecholamine metabolism on pigmentation and physical properties of sclerotized regions in the silkworm melanism mutant // PLoS ONE. – 2012. – Vol.7. – P. 1–14.
- Quan G.X., Kim I., Komoto N. et al. Characterization of the kynurenine 3-monooxygenase gene corresponding to the white egg 1 mutant in the silkworm *Bombyx mori* // Mol. Genet. Genomics. – 2002. – Vol.267, №1. – P. 1–9.
- Tabunoki H., Higurashi S., Ninagi O. et al. A carotenoid-binding protein (CBP) plays a crucial role in cocoon pigmentation of silkworm (*Bombyx mori*) larvae // FEBS Letters. – 2004. – Vol.567. – P. 175–178.
- Zhan S., Guo Q. et al., Li M. Disruption of an N-acetyltransferase gene in the silkworm reveals a novel role in pigmentation // Development. – 2010. – Vol.137, No23. – P. 4083–4090.

Представлено: Ю.В.Ляшенко / Presented by: Yu.V.Lyashenko

Рецензент: В.В.Навроцька / Reviewer: V.V.Navrotska

Подано до редакції / Received: 01.04.2014