

Daugavpils Universitāte  
Dzīvības zinātņu un tehnoloģijas institūts  
Bioloģiskās daudzveidības departaments

**SERGEJS POPOVS**

**UNPREDICTABILITY AS AN ADAPTIVE BEHAVIORAL  
CHARACTERISTIC OF PREY: THE CASE OF FRUIT  
FLIES (*DROSOPHILA MELANOGASTER*)**

**NEPROGNOZĒJAMĪBA KĀ UPURA ADAPTĪVĀS  
UZVEDĪBAS PAZĪME: AUGĻU MUŠU  
(*DROSOPHILA MELANOGASTER*) PIEMĒRS**

**Summary of the Doctoral Thesis**

for obtaining the doctoral degree (Ph. D.) in Natural sciences  
(Biology branch, Ecology sub-branch)

**Promocijas darba kopsavilkums**

zinātniskā doktora grāda (Ph. D.) Dabaszinātnēs iegūšanai  
(Bioloģijas nozarē, Ekoloģijas apakšnozarē)

**Promocijas darba zinātniskais vadītājs:**

Dr. biol., Prof. Indriķis Krams

**Promocijas darba zinātniskais konsultants:**

Dr. biol., Senior researcher Tatjana Krama

Daugavpils, 2025

**The thesis was performed:** in Latvia, at Daugavpils University, Institute of Life Sciences and Technology, Department of Biodiversity, Laboratory of Animal Ecology and Evolution in 2019 – 2025.

This thesis was supported by the European Social Fund project Nr. 8.2.2.0/20/I/003 and the Latvian Council of Science project Nr. lzp-2024/1-0437

**Type of work:** doctoral thesis (a set of publications) in Natural sciences, Biology branch, Ecology sub-branch.

**Supervisor:** Dr. biol., Prof. Indriķis Krams

**Scientific advisor:** Dr. biol., Senior researcher Tatjana Krama

**Darba recenzenti/Opponents:**

Dr. biol., Academy of Sciences member, Prof. Īzaks Rašals

Dr. biol., Principal investigator Juan A. Sánchez-Alcañiz

Dr. biol., Senior researcher Uldis Valainis

**The head of the Promotion Council:** Dr. biol., prof. Arvīds Barševskis

**Commencement:** Daugavpils Universitātes Bioloģijas zinātņu nozares promocijas padomes atklātā sēdē 2025. gada 28. aprīlī, plkst. 12:00.

The Doctoral Thesis and its summary are available at the library of Daugavpils University, Daugavpils, Parādes ielā 1, and Daugavpils University website: [www.du.lv](http://www.du.lv).

Comments are welcome. Send them to the secretary of the Promotion Council, Daugavpils, Parādes ielā 1, LV-5401; mob. +37126002593; e-mail: [jana.paidere@du.lv](mailto:jana.paidere@du.lv)

Secretary of the Promotion Council: Dr. biol. Jana Paidere, researcher at Daugavpils University

ISBN 978-9934-39-031-9

## PUBLIKĀCIJU SARAKSTS

This thesis is based on the following papers, which are referred to in the text by their Roman numerals. Original papers are reproduced with permissions from the publishers.

Šis promocijas darbs ir izstrādāts uz tematiski vienotas publikāciju kopas pamata, kas tekstā tiek apzīmēta ar romiešu cipariem. Publikāciju izmantošana promocijas darba tekstā ir saskaņota ar izdevniecībām.

- I. Krams, I. A., Krama, T., Krams, R., Trakimas, G., **Popovs, S.**, Jōers, P., Munkevics, M., Elferts, D., Rantala, M. J., Makņa, J., & de Bivort, B. L. (2021). Serotonergic Modulation of Phototactic Variability Underpins a Bet-Hedging Strategy in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.659331>
- II. Krama, T., Munkevics, M., Krams, R., Grigorjeva, T., Trakimas, G., Jōers, P., **Popovs, S.**, Zants, K., Elferts, D., Rantala, M. J., Sledevskis, E., Contreras-Garduño, J., de Bivort, B. L., & Krams, I. A. (2023). Development under predation risk increases serotonin-signaling, variability of turning behavior and survival in adult fruit flies *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2023.1189301>
- III. Krama T., Bahhir D., Ots L., **Popovs S.**, Bartkevičs V., Pugajeva I., Krams R., Merivee E., Must A., Rantala M.J., Krams I., Jōers P. (2023). A diabetes-like biochemical and behavioral phenotype of *Drosophila* induced by predator stress. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 290(2002): 20230442. DOI: 10.1098/rspb.2023.0442.
- IV. **Popovs, S.**, Munkevics, M., Krama, T., Krams, R., Sledevskis, E., Trakimas, G., Zants, K., Grigorjeva, T., Mizers, V., Kolbjonoks, V., Jōers, P., & Krams, I. (2024). Explaining the survival of the sickest: Altered walking patterns are linked with improved adult survival in *Drosophila melanogaster* grown with predators during larval development. *Behaviour*, 161(2), 133–148. <https://doi.org/10.1163/1568539X-bja10254>

### **Autora ieguldījums publikāciju tapšanā:**

- I PUBLIKĀCIJA
  - apmēram 35 % no visa darba apjoma
- II PUBLIKĀCIJA
  - apmēram 30 % no visa darba apjoma
- III PUBLIKĀCIJA
  - apmēram 40 % no visa darba apjoma
- IV PUBLIKĀCIJA
  - apmēram 55 % no visa darba apjoma

## SATURS

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| PUBLIKĀCIJU SARAKSTS .....                                                                        | 3  |
| Pētījumu rezultātu aprobācija starptautiskās zinātniskajās konferencēs .....                      | 6  |
| 1. IEVADS.....                                                                                    | 9  |
| 1.1. Fenotipiskās adaptācijas mehānismi mainīgās vides apstākļos.....                             | 9  |
| 1.2. Likmju izkliedes pieeja adaptāciju izpētē .....                                              | 9  |
| 1.3. Stresa izraisītās izmaiņas uzvedībā un metabolismā.....                                      | 10 |
| 1.4. Serotonīns un paredzamība .....                                                              | 11 |
| 1.5. Mērķi un uzdevumi .....                                                                      | 12 |
| 2. MATERIĀLI UN METODES.....                                                                      | 14 |
| 2.1. <i>Drosophila</i> audzēšana un barība (I, II, III, IV) .....                                 | 14 |
| 2.2. Ķīmisko vielu ietekmes izpēte (I) .....                                                      | 14 |
| 2.3. Neiromediatoru ietekmes izpēte (II) .....                                                    | 15 |
| 2.4. Barošanās eksperimenti (III).....                                                            | 15 |
| 2.5. Izdzīvošana plēsēju klātbūtnē (II, III, IV).....                                             | 16 |
| 2.6. Badošanās panesamības mērījumi (III).....                                                    | 17 |
| 2.7. Fototaksis pētījuma aprīkojums (I).....                                                      | 17 |
| 2.8. Pagriešanās uzvedība (II) .....                                                              | 18 |
| 2.9. Kustību aktivitātes pētījumi (III).....                                                      | 18 |
| 2.10. Augļu mušu gaitas parametri (IV).....                                                       | 19 |
| 2.11. Augļu mušu kustības bez pārvietošanās (IV).....                                             | 20 |
| 2.12. Western analīze (III) .....                                                                 | 21 |
| 2.13. Metabolītu analīzes (III).....                                                              | 22 |
| 2.14. Izdalītās ogļskābās gāzes un patērētā skābekļa attiecība (III) .....                        | 23 |
| 2.15. Datu analīze un statistiskās metodes (I, II, III, IV) .....                                 | 23 |
| 3. REZULTĀTI .....                                                                                | 25 |
| 3.1. Gaismas izvēles varbūtība (I).....                                                           | 25 |
| 3.2. Mainīgums aiz paredzamības limitiem (I, II).....                                             | 26 |
| 3.3. Priekšroka vienai ķermeņa pusei un pagriezienu skaits Y-labirintā (II) .....                 | 28 |
| 3.4. Kataboliskā pāreja uz tauku oksidāciju plēsēja stresa ietekmē (III).....                     | 30 |
| 3.5. Kopējā enerģijas līmeņa samazināšanās plēsēju stresa ietekmē (III) ....                      | 32 |
| 3.6. Glikozes uzņemšanas kavēšana (III).....                                                      | 32 |
| 3.7. Serotonīns uzlabo vielmaiņas disfunkciju (III) .....                                         | 33 |
| 3.8. Plēsēju izraisīta stresa ietekme uz kustību aktivitāti (III, IV) .....                       | 34 |
| 3.9. Mušu izdzīvošana plēsēju klātbūtnē (II, III, IV) .....                                       | 35 |
| 4. DISKUSIJA .....                                                                                | 39 |
| 4.1 Ģenētisko faktoru un vides ietekme uz <i>D. melanogaster</i> fototaktisko mainīgumu (I) ..... | 39 |
| 4.2. Serotonīnērgiskā regulācija un izvairīšanās no plēsējiem stratēģijas regulācija (II) .....   | 43 |

|                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3. Metabolisma un uzvedības adaptācijas plēsonības stresam (III) .....                         | 46  |
| 4.4. Uzvedības mainīgums un vielmaiņas traucējumi kā reakcija uz<br>plēsonības stresu (IV) ..... | 47  |
| SECINĀJUMI .....                                                                                 | 49  |
| PATEICĪBAS .....                                                                                 | 50  |
| LITERATŪRAS SARAKSTS .....                                                                       | 105 |

## Pētījumu rezultātu aprobācija starptautiskās zinātniskajās konferencēs

1. Spanish Drosophila Meeting 2024, Sant Joan d'Alacant, Spain.  
Stenda referāts "A diabetes-like biochemical and behavioral phenotype of *Drosophila* induced by predator stress".  
Krams I., Krama T., **Popovs S.**, Krams R, Jōers P.
2. Latvijas Universitātes 82. Starptautiskā zinātniskā konference, Rīga, Latvija.  
Mutisks ziņojums "Altered walking patterns connection with improved survival in fruit flies (*Drosophila melanogaster*) grown with predators during larval development".  
Kolbjonoks V., **Popovs S.**, Munkevics M., Krama T., Krams R., Sledevskis E., Trakimas G., Zants K., Grigorjeva T., Mizers V., Joers P., Indriķis Krams.
3. Latvijas Universitātes 82. Starptautiskā zinātniskā konference, Rīga, Latvija.  
Mutisks ziņojums "Link between serotonin concentration changes and the lateral movements of fruit flies (*Drosophila melanogaster* Meigen, 1830)".  
Grigorjeva T., Kotova A., Maļutina V.V., Krama T., **Popovs S.**, Munkevics M., Zants K., Krams R., Joers P., Trakimas G., Krams I.
4. 27th European Drosophila Research Conference, Lyon, France.  
Stenda referāts "Fear Me Not: Adaptive Metabolic and Behavioural Responses to Predator-Induced Stress in *Drosophila melanogaster*".  
Munkevics M., Krama T., **Popovs S.**, Krams R., Zants K., Grigorjeva T., Krams I.
5. Daugavpils Universitātes 65. starptautiskā zinātniskā konference, Daugavpils, Latvija.  
Mutisks ziņojums "Biochemical and behavioral phenotype of fruit flies (*Drosophila melanogaster* Meigen, 1830) induced by predator stress".  
**Popovs S.**, Krama T., Bahhir D., Ots L., Bartkevičs M., Pugajeva I., Grigorjeva T., Munkevics M., Zants K., Krams R., Merivee E., Must A., Rantala M.J., Krams I., Joers P.
6. Daugavpils Universitātes 65. starptautiskā zinātniskā konference, Daugavpils, Latvija.

Mutisks ziņojums “Effects of predator presence and 5-HT signaling on behavioral lateralization and survival in *Drosophila melanogaster*”.

Trakimas G., Krama T., Munkevics M., Krams R., Grigorjeva T., Joers P., **Popovs S.**, Zants K., Sledevskis E., de Bivort B.L., Krams I.

7. Daugavpils Universitātes 65. starptautiskā zinātniskā konference, Daugavpils, Latvija.

Mutisks ziņojums “What is personality?”.

Krams I., **Popovs S.**, Krams R., Zants K., Munkevics M., Trakimas G., Grigorjeva T., Sledevskis E., Krama T.

8. Daugavpils Universitātes 65. starptautiskā zinātniskā konference, Daugavpils, Latvija.

Mutisks ziņojums “The effect of serotonin concentration changes on the lateral movements of fruit flies (*Drosophila melanogaster* Meigen, 1830)”.

Grigorjeva T., Kotova A., Maļutina V.V., Krama T., **Popovs S.**, Munkevics M., Zants K., Krams R., Joers P., Krams I.

9. Latvijas Universitātes 81. Starptautiskā zinātniskā konference, Rīga, Latvija.

Mutisks ziņojums “Phototactic behavior of fruit flies (*Drosophila melanogaster* Meigen, 1830) study with the automated system”.

Grigorjeva T., Maļutina V.V., Kotova A., Krama T., Munkevics M., **Popovs S.**, Krams R., Krams I.

10. 11th International Conference on Biodiversity Research, Daugavpils, Latvija.

Mutisks ziņojums “Threat of predation alters *Drosophila melanogaster* movement patterns”.

**Popovs S.**, Munkevics M., Trakimas G., Krama T., Krams R., Grigorjeva T., Krams I.

11. 11th International Conference on Biodiversity Research, Daugavpils, Latvija.

Mutisks ziņojums “Use of automated system to study the effect of serotonin concentration changes on the behaviour of fruit flies (*Drosophila melanogaster* Meigen, 1830)”.

Grigorjeva T., Maļutina V.V., Kotova A., Krama T., Munkevics M., **Popovs S.**, Krams R., Krams I.

12. The evolution of personality in animals and humans, Erice, Italy.  
Mutisks ziņojums “High-throughput devices to study serotonin-dependent phototactic personality, behavioral lateralization, and explorative activity in *Drosophila melanogaster*”.  
Krams I., Krama T., Krams R., **Popovs S.**
  
13. The evolution of personality in animals and humans, Erice, Italy.  
Stenda referāts “Serotonergic Modulation of the Variability in Phototactic Personality Underpins a Bet-Hedging Strategy in *Drosophila Melanogaster*”.  
**Popovs S.**, Krams I., Krama T.
  
14. Daugavpils Universitātes 63. starptautiskā zinātniskā konference, Daugavpils, Latvija.  
Mutisks ziņojums “Neurotransmitter Serotonin Acts as a Suppressor of Phototactic Choice Variability in *Drosophila Melanogaster*”.  
Krams R., **Popovs S.**, Krams I., Krama T., Munkevics M., Elferts D., Makna J.
  
15. Latvijas Universitātes 79. Starptautiskā zinātniskā konference, Rīga, Latvija.  
Mutisks ziņojums “Predator Stress Represses Systemic Glucose Use Through Serotonin-Dependent Effect”.  
Krams I., Krams R., **Popovs S.**, Munkevics M., Krama T., Joers P.
  
16. Latvijas Universitātes 79. Starptautiskā zinātniskā konference, Rīga, Latvija.  
Mutisks ziņojums “Spider Odors Induce Changes in Body Carbon and Nitrogen Concentrations in *Drosophila Melanogaster*”.  
Munkevics M., Krams R., **Popovs S.**, Krams I.

## 1. IEVADS

### 1.1. Fenotipiskās adaptācijas mehānismi mainīgās vides apstākļos

Organismi un to populācijas nepārtraukti saskaras ar dažādiem mainīgiem biotiskiem un abiotiskiem faktoriem. Lai reaģētu uz mainīgajiem apstākļiem, organismi un to populācijas attīsta dažādas adaptācijas un izdzīvošanas stratēģijas. Organismiem ir jāapstrādā informācija par vides izmaiņām, lai varētu reaģēt atbilstoši, palielinot savu adaptivitāti un izvairoties no izmiršanas riska. Galvenie fenotipiskās adaptācijas mehānismi ir adaptīvas mainības veidošanās dabiskās atlases ceļā, adaptīvais fenotipiskais plastiskums un likmju izkliede.

Jau vairāk nekā pirms gadsimta Čārlzs Darvins izvirzīja ideju par adaptīvo mainību kā izdzīvošanas mehānismu (1859). Lai gan šis mehānisms uzlabo populācijas dzīvotspēju, tas ir ierobežots individuālā līmenī. Lai arī vairumu pazīmju iespējams uzturēt ar ģenētiskās mainības līdzsvaru, ko nodrošina mutāciju un atlases mijiedarbība, jaunu pazīmju rašanās ir salīdzinoši lēns process, īpaši strauju vides pārmaiņu gadījumā (Tufto, 2015).

Plastiskums ir vēl viena fenotipiskās adaptācijas forma. Organismu fenotipiskās pazīmes veidojas, ietekmējoties gan no ģenētiskiem, gan vides faktoriem, kā arī to kombinācijām. Ekoloģiskais un fizioloģiskais plastiskums tiek uzskatīts par ļoti elastīgu mehānismu, tomēr arī tam ir ierobežojumi, kas var limitēt organismu spēju adaptēties vides un evolūcijas faktoru ietekmē. Galvenā problēma ir tā, ka plastiskums attīstās ģēnu un vides mijiedarbības rezultātā individuālas attīstības procesā, savukārt, dabiskā atlase notiek arī pēc individuālās attīstības posma beigām (Gavrilets & Scheiner, 1993).

Trešais fenotipiskās adaptācijas mehānisms ir likmju izkliede – riska sadalīšanas stratēģija, kas dažādo atšķirīgus fenotipus populācijā nejaušā veidā (Morawska et al., 2022). Lai arī adaptīvais plastiskums un likmju izkliede dažreiz tiek uzskatīti par konkurējošām izdzīvošanas un vairošanās stratēģijām heterogēnā vidē (Draghi, 2023), visi trīs minētie fenotipiskās adaptācijas mehānismi var līdzāspastāvēt mainīgā vidē.

### 1.2. Likmju izkliedes pieeja adaptāciju izpētē

Vide reti ir stabila, tāpēc organismiem jāizstrādā sarežģītas stratēģijas, lai maksimāli palielinātu izdzīvošanas un vairošanās iespējas. Kad tādi kritiski faktori kā temperatūra, nokrišņi, pārtikas pieejamība un plēsonības risks mainās neprognozējami, apdraudēti var kļūst būtiski bioloģiski procesi, piemēram, vairošanās sekmes un pēcnācēju attīstība. Tas veicina likmju izkliedes pieejas attīstību: lai mazinātu risku, organismi sadala savus resursus, neieguldot tos tikai vienā stratēģijā, kas mainīgos apstākļos varētu būt neveiksmīga. Šādā veidā tie

laika gaitā uzlabo izdzīvošanas iespējas kopumā (Chirgwin et al., 2015; Merilä & Hendry, 2014; Trakimas et al., 2019).

Likmju izkliedes pieeja neaprobežojas tikai ar reproduktīvajām stratēģijām; tā attiecas arī uz citām pazīmēm, tostarp uzvedības formām. Piemēram, organismi var pielāgot savu uzvedību tā, lai tā kļūtu mainīga un neparedzama, tādējādi samazinot vides izmaiņu, piemēram, temperatūras svārstību vai plēsonības izraisītā stresa, negatīvo ietekmi. Šajā kontekstā uzvedības elastīgumu var uzskatīt par adaptīvu reakciju uz vides apstākļu neparedzamību (Olofsson et al., 2009; Siepielski et al., 2017).

### **1.3. Stresa izraisītās izmaiņas uzvedībā un metabolismā**

Plēsonības ietekme un tās gala rezultāts neaprobežojas tikai ar upura nāvi. Plēsonība var izraisīt ilgstošu bailēs balstītu stresu, kas ietekmē arī izdzīvojušos individuus (Hossie et al., 2010; Lehmann et al., 2014). Bailes stimulē bēgšanas un slēpšanās reakcijas, kas izraisa morfoloģiskas un fizioloģiskas pārmaiņas organismā (Janssens & Stoks, 2014). Stresa ietekme pēc neletālām saskarēm ar plēsējiem izraisa ilgtermiņa fizioloģiski smagas sekas (Zanette et al., 2019). Metabolisma izmaiņas bieži izraisa uzvedības un morfoloģiskā fenotipa pārmaiņas. Līdzīgas stresa reakcijas agrāk novērotas arī cilvēkiem, kur hronisks stress bieži vien izraisa insulīna rezistenci (Beaupere et al., 2021).

*Drosophila melanogaster* gadījumā hronisks stress nozīmē organisma pārslēgšanos uz alternatīvajiem enerģijas avotiem. Samazinātā spēja metabolizēt glikozi, kas mušām ir galvenais enerģijas avots, liek tām pāriet uz paaugstinātu tauku izmantošanu. Šī promocijas darba ietvaros veiktie pētījumi ir parādījuši, ka centrālās regulējošās kināzes Akt aktivitātes samazināšanās būtiski ietekmē glikozes metabolismu (Huang et al., 2018).

Tas, ka glikoze nieklē audos, kas to varētu metabolizēt, var būt adaptīva reakcija, kas izraisa bioķīmiskas izmaiņas un sagatavo organismu iespējamam nākotnes stresam (Roosendaal, 2002). Tomēr hronisks stress, kas ierobežo glikozes izmantošanu, izraisa sistēmiskā metabolisma pārorientēšanos uz tauku izmantošanu (Tennessen et al., 2011). Tas var samazināt metabolisko elastību un līdz ar to arī dzīvotspēju, jo samazinās ATF sintēze un pasliktinās rezistence pret barības kvalitātes un pieejamības izmaiņām.

Metabolisma traucējumi skaidri ietekmē arī kustību aktivitāti. Enerģijas taupīšanas nolūkos mainās ne tikai kustību intensitāte, bet arī visas kustības un nekustēšanās periodu raksturs. Ierastā kustību aktivitāte tiek aizstāta ar pēkšņiem, īsiem skrējieniem, un atpūtas pauzes kļūst neregulāras. Atpūtas periodos mušas, kas pakļautas hroniskam plēsonības stresam, var negaidīti sākt izšķīst enerģiju haotiskām kustībām, tā vietā, lai atpūtos un gatavotos nākamajam gājienam vai skrējenam. Šāds kustību modelis bieži saistīts ar

patoloģiskām fizioloģiskām izmaiņām, ko raksturo tādi simptomi kā, piemēram, trauksme, haotiska higiēniskā uzvedība un koncentrēšanās spējas zudums (Hart, 1988).

Tradicionāli tiek uzskatīts, ka plēsēji dod priekšroku viegli iegūstamiem upuriem, piemēram, jaunajiem, nepieredzējušajiem vai slimiem indivīdiem (Genovart et al., 2010). Mūsu pētījumi rāda, ka augļu mušas, attīstoties stresa apstākļos, sāk uzvesties līdzīgi slimiem indivīdiem. Tomēr “slimo” mušu izdzīvošanas rādītāji ir daudz augstāki nekā kontrolgrupās. Tas varētu būt tādēļ, ka neparedzamās kustības, kas raksturīgas stresa apstākļos augušiem upuriem, maldina plēsējus par to turpmākajām kustībām un kustības virzienu (Bilecenoglu, 2005; Card & Dickinson, 2008; Eifler & Eifler, 2014; Yager et al., 1990). Tāpat ir iespējams, ka daži plēsēji izvairās no inficētiem upuriem (Gutierrez et al., 2022; Hamilton & Zuk, 1982; G. A. Jones et al., 2005; Meyling & Pell, 2006).

#### 1.4. Serotonīns un paredzamība

Likmju izkliede jeb uzvedības mainīgums var būt nozīmīga stratēģija, lai adaptētos mainīgajai videi un izvairītos no plēsējiem. Šajā pētījumā pierādīts, ka serotonīns ir būtisks adaptācijas procesa elements. Iepriekšējie pētījumi liecina, ka serotonīns regulē fototaksi – būtisku reakciju, kas ļauj mušām reaģēt uz neparedzamiem apstākļiem. Evolucionārie modeļi atklāj, ka uzvedības mainīgums nav nejaušs, bet gan apzināti izvēlēta izdzīvošanas stratēģija, kurā serotonīns pastiprina adaptācijas spējas (Kain et al., 2015).

Šī adaptācija ir īpaši būtiska mainīgā klimatā un kļūst vēl nozīmīgāka plēsonības apstākļos. Saskare ar plēsējiem kritiskos attīstības posmos maina serotonīna signālus, palielinot uzvedības mainīgumu un, iespējams, arī izdzīvošanas izredzes (Krama et al., 2023; Maloney, 2021). Tas liecina, ka serotonīns ne tikai ietekmē garastāvokli un vispārējo uzvedību, bet tam ir arī būtiska loma specifisko aizsardzības reakciju pret plēsējiem nodrošināšanā.

Serotonīns ir iesaistīts dažādos neiroķīmiskajos un metabolajos procesos, un tam ir būtiska loma *Drosophila* bioloģijā. Tas regulē mierīga stāvokļa uzvedību, ietekmē telpisko atmiņu un ar smaržām saistīto mācīšanos, kā arī fototaksi un orientēšanās spējas (Anaka et al., 2008; Diegelmann et al., 2006; Kain et al., 2012; Zhang & Odenwald, 1995). Serotonīns ir svarīgs arī citu uzvedības veidu gadījumā, pārklājoties ar citu neirotransmiteru, piemēram, dopamīna un oktopamīna, funkcijām (Kaplan et al., 2008). Tā daudzpusīgā loma neironu tīklos bieži dublē citu neirotransmiteru funkcijas. Serotonīnērgiskie neironi izvietoti tuvu insulīna sintezējošiem neironiem centrālā nervu sistēmā, un abas šīs sistēmas savstarpēji mijiedarbojas (Al-Zoairy et al., 2017). Paaugstināts serotonīna līmenis uzlabo metabolo līdzsvaru, veicina glikozes

homeostāzi un palielina pieejamās enerģijas daudzumu, tādējādi palīdzot izdzīvot bada periodus.

Turklāt pētījumi par izmaiņām kustību parametros un ātrumā saistībā ar izdzīvošanu atklāj papildu adaptācijas, kas uzlabo reakcijas pret plēsonības risku. Pazemināts serotonīna līmenis izraisa būtiskas izmaiņas uzvedībā – piemēram, samazinātu kustību ātrumu, ilgāku apstāšanos un lielāku uzvedības neparedzamību, kas var samazināt plēsēju iespējas uzbrukt un tādējādi uzlabo mušu izdzīvošanu. Serotonīns darbojas kā regulators plašā adaptāciju spektrā, sākot no metaboliskiem procesiem līdz pat uzvedības aspektiem, apstiprinot tā nozīmi adaptējoties mainīgiem un nelabvēlīgiem vides apstākļiem un pastiprinot aizsardzības spējas pret plēsējiem.

### 1.5. Mērķi un uzdevumi

Šī promocijas darba galvenais mērķis ir noskaidrot, vai neparedzamība, pati par sevi, var būt adaptīva stratēģija, ko upuris izmanto, lai izvairītos no plēsējiem, un vai tā kalpo par būtisku mehānismu, kas nosaka uzvedības neparedzamību.

*D. melanogaster* izceļas ar augstu individuālo mainību fototaksēs uzvedībā. Pirmais mērķis šajā darbā bija izpētīt iespējamo saikni starp uzvedības neparedzamību un serotonīna regulāciju (I). Ņemot vērā, ka augļu mušas ir izplatītas dažādos klimatiskajos reģionos, tika pārbaudīts, kā populācijas no dažādiem klimatiskajiem apstākļiem veic gaismas vai tumsas izvēli savā fototaktiskajā uzvedībā. Tika izvirzīta hipotēze, ka mušas no stabila klimata zonām izrāda augstu uzvedības paredzamību un paaugstinātu serotonīna koncentrāciju. Saskaņā ar šo pieņēmumu, serotonīna inhibitoriem ir jāpalielina izvēļu mainīgumu mušām, kas augušas stabilā ekvatoriālā klimatā.

Mainīgie klimata apstākļi rada lielu stresu organismiem, taču dabiskajā vidē organismiem jāsaskaras arī ar citiem stresa faktoriem, no kuriem būtiskākais ir plēsonība. Darba otrais mērķis bija noskaidrot, vai pakļaušana neletālam plēsonības stresam mušu ontogēnēzē var ietekmēt šādu mušu uzvedības paredzamību (II). Tika izvirzīta hipotēzē, ka šāds stress var veicināt augstu kustības virziena izvēlēs mainīgumu, tādējādi palielinot izdzīvošanas iespējas brīžos, kad plēsonības risks ir augsts. Tika pieņemts, ka šos procesus regulē serotonīna signālkaskāde.

Hronisks stress ir faktors, kas ietekmē dzīvnieku vielmaiņu. Tā kā *Drosophila* serotonīnerģiskie neironi atrodas ļoti tuvu insulīnu sintezējošajiem neironiem, nākamais promocijas darba mērķis bija noskaidrot, cik spēcīgi gan stress, gan serotonīna trūkums var ietekmēt augļu mušu vielmaiņu (III). Tika pieļauts, ka serotonīnam ir nozīmīga loma glikozes vielmaiņas regulēšanā, kas ietekmē *Drosophila* dzīvotspēju. Tika izvirzīta hipotēze, ka plēsonība samazina izturību pret badu un pieejamās enerģijas (glikozes) līmeni.

Augsta individuālo atšķirību pakāpe, neparedzamība kustību virzienu izvēlē un samazināta enerģijas pieejamība, iespējams, izraisa izmaiņas uzvedības modeļos. Darba ceturtais mērķis bija izprast, kā hronisks stress ietekmē *Drosophila* kustības un vai tas varētu pozitīvi ietekmēt izdzīvošanu (IV). Balstoties uz iepriekšējo eksperimentu datiem, tika prognozēta augļu mušu kopējās aktivitātes samazināšanās. Tomēr rezultāti atklāja, ka mušas izrādīja pastiprinātu atpūtas uzvedību un investēja ievērojamus resursus haotiskās kustībās. Tika izvirzīta hipotēze, ka šāda uzvedība rada viltus signālus plēsējiem par mušu turpmākajām kustībām un kustību trajektoriju, tādējādi palielinot upura neparedzamību un, iespējams, uzlabojot izdzīvošanas iespējas.

## 2. MATERIĀLI UN METODES

### 2.1. *Drosophila* audzēšana un barība (I, II, III, IV)

Pētījumā tika izmantotas augļu mušu (*D. melanogaster*) savvaļas līnijas Oregon-R-modENCODE (nr. 25211) un *w<sup>1118</sup>*, kas iegūtas no Bloomington *Drosophila* krājumu centra, Indiānā, ASV. Mušas turēja inkubatoros temperatūrā  $23 \pm 1$  °C, 12:12 stundu gaismas un tumsas cikla apstākļos..

Lai mušas vairotos, 10 mātītes un 5 tēviņus ievietoja mēģenēs (24,5 × 95 mm), kas piepildītas ar 18 ml speciāli sagatavotas barības. Šajās mēģenēs mušām bija iespēja pāroties un dēt olas. Tēviņi un mātītes tika turēti kopā 24 stundu laikā, pēc kā tēviņus no mēģenēm izņēma.

*Drosophila* barības sastāvs bija šāds: 500 ml ūdens, 20 g dekstrozes, 15 g saharozes, 10 g alus rauga, 35 g kukurūzas miltu un 4,5 g agara. Pelējuma veidošanai novēršanai pievienoja 12,5 ml 10% Tegosept šķīduma (metil-p-hidroksibenzoāta). Noteiktām eksperimentālajām grupām barība tika papildināta ar metformīnu vai 5-hidroksitriptofānu (5-HTP) koncentrācijās attiecīgi 20 mM un 5%, pēc tam, kad maisījums bija atdzesēts līdz zemāk par 65 °C.

Mēģenes ar *Drosophila* olām tika ievietotas plastmasas burkā (10 cm augstums × 12 cm diametrs). Eksperimentos ar plēsēju klātbūtni katrā burkā ievietoja vienu parastu vilkzirnekļu (*Pirata piraticus*), ļaujot tam brīvi iekļūt augļu mušu mēģenēs un medīt *Drosophila* kāpurus.

Bioķīmiskajām analīzēm pieaugušās mušas tika savāktas 5-7 stundas pēc eklozijas un uzglabātas -80 °C temperatūrā. Metabolītu analīzēm paredzētās mušas tika ievāktas 2-3 dienu vecumā.

Barības uzņemšanas ātrumu noteica, mušām piedāvājot barību ar pievienotu Zilo FCF krāsvielu. Krāsvielas uzņemšana tika kvantificēta ar spektrofotometrisko analīzi, tādējādi nosakot patērētās barības daudzumu. Mušas sākotnēji uzturēja standarta pārtikas pudelēs un pēc tam pārnese uz barību ar vai bez krāsvielas piedevas. Homogenizētu mušu supernatanta absorbciju mērīja pie 650 nm, un vērtības no mušām, kas turētas uz barības bez krāsvielas, tika izmantotas kā atskaites punkts.

### 2.2. Ķīmisko vielu ietekmes izpēte (I)

Tika veikti novērojumi trīs eksperimentālajās grupās katrā ģeogrāfiskajā vietā: mušas (tēviņi un mātītes), kas audzētas bez papildus ķīmiskajām vielām, mušas, kas audzētas uz barības, kas papildināta ar 5-HTP, un mušas, kas audzētas uz barības, kas papildināta ar serotonīna sintēzes blokatoru αMW (Dasari et al., 2007; Dierick & Greenspan, 2007; Hu et al., 2020; Majeed et al., 2016; Neckameyer, 2010; Ries et al., 2017). Vielas tika iemaisītas un izšķīdinātas

*Drosophila* sausajā barībā maisījuma. Grupās, kas tika eksponētas pret ķīmiskajām vielām, F0 mušas olas dēja ķīmiskās vielas saturošajās barotnēs. Pēc izšķīlšanās pieaugušās F1 mušas tika testētas otrajā – trešajā dzīvības dienā. Ķīmisko vielu šķīdumi tika samaisīti ar Vorteksa maisītāju un pievienoti barības pulverim. 5-HTP galīgā koncentrācija bija 50 mM, bet  $\alpha$ MW galīgā koncentrācija bija 20 mM (Huber, 2004; Kain et al., 2012).

### 2.3. Neiromediatoru ietekmes izpēte (II)

Eksperimentā tika novērotas divas galvenās *D. melanogaster* grupas: mušas, kas audzētas kopā ar plēsējiem, un mušas, kas audzētas bez plēsējiem. Katra no šīm grupām tika sadalīta trīs apakšgrupās: mušas, kas audzētas uz barības ar pievienotu 5-HTP, mušas, kas audzētas uz barības ar pievienotu  $\alpha$ MW, un mušas, kas audzētas uz barības bez papildu ķīmikālijām (Dasari et al., 2007; Dierick & Greenspan, 2007; Hu et al., 2020; Krams et al., 2021; Majeed et al., 2016; Neckameyer, 1996; Ries et al., 2017).

Ķīmisko vielu šķīdumi tika samaisīti ar vorteksa maisītāju un pievienoti barības pulverim. 5-HTP un  $\alpha$ MW tika izšķīdināti Cal Tech barībā (United States Biological, Salem, MA, USA). Galīgā 5-HTP koncentrācija bija 50 mM, bet  $\alpha$ MW – 20 mM (Kain et al., 2012; Krams et al., 2021). Uzvedības eksperimenti tika veikti ar 5–7 dienas vecām mušām. Dierick un Greenspan (2007), izmantojot HPLC, pierādīja, ka barošana ar 5-HTP būtiski paaugstina 5-HT koncentrāciju mušu smadzenēs 3 dienu laikā pēc eksperimentu sākuma, savukārt  $\alpha$ MW lietošana ievērojami samazina 5-HT līmeni 4 dienu laikā. Honegger et al. (2020) ar ELISA pieeju novēroja līdzīgus efektus (aptuveni 8× samazinājumu, lietojot  $\alpha$ MW, un apmēram 20× pieaugumu, lietojot 5-HTP).

### 2.4. Barošanās eksperimenti (III)

Lai novērtētu barošanās ātrumu, mušām tika piedāvāta barība, kas papildināta ar zilo krāsvielu (Blue FCF krāsviela, Acros Organics A0373695, ThermoFisher Scientific). Krāsvielas daudzums mušās tika kvantificēts spektrofotometriski no parauga homogenāta. Katrā eksperimentā 140 kontrolgrupas mušas un 140 mušas no plēsēju stresa grupas tika ievietotas divās atsevišķās standarta barības pudelēs un atstātas atgūties nakti pēc CO<sub>2</sub> iedarbības. Nākamajā dienā mušas bez gāzes tika pārceltas uz jaunu standarta barību vai uz barību, kas papildināta ar 1% Blue FCF krāsvielu.

Pēc 1,5 stundām 20 mušas tika savāktas un homogenizētas uz ledus, samaļot tās un sastampājot piestā kopā ar 800  $\mu$ l fosfāta buferšķīduma (PBS). Homogenāts tika centrifugēts pie 10 000 g spēka 10 minūtes 4 °C temperatūrā. 400  $\mu$ l no šķīduma augšējās daļas tika pārvietoti uz divām spektrofotometra 96

ligzdu plāksnes iedobēm (katra saņēma pa 200  $\mu$ l). Absorbance tika mērīta pie 650 nm viļņa garuma, un mērījumi no mušu lizātiem, kas baroti bez zilās FCF krāsvielas, tika izmantoti kā atskaites punkts.

## 2.5. Izdzīvošana plēsēju klātbūtnē (II, III, IV)

Lai novērtētu plēsēju un farmakoloģisko manipulāciju ietekmi uz *Drosophila* izdzīvošanu, tika izstrādāts eksperiments ar dažādiem apstākļiem, iesaistot plēsējus un ķīmisko vielu papildinājumu. Pētījums ietvēra sešas eksperimentālās grupas, lai novērtētu divu zirnekļu sugu ietekmi uz trim dažādiem ķīmisko vielu radītajiem apstākļiem: (1) augļu mušu tēviņi, audzēti bez zirnekļu klātbūtnes un bez ķīmiskā papildinājuma, (2) tēviņi audzēti bez zirnekļiem, uz barības ar pievienotu 5-HTP, (3) tēviņi audzēti bez zirnekļiem, uz barības ar pievienotu  $\alpha$ MW, (4) tēviņi audzēti *P. apacheanus* zirnekļu klātbūtnē bez ķīmiskā papildinājuma, (5) tēviņi audzēti ar *P. apacheanus* zirnekļiem uz barības ar pievienotu 5-HTP, un (6) tēviņi audzēti ar *P. apacheanus* zirnekļiem uz barības ar pievienotu  $\alpha$ MW.

Izdzīvošanas testiem katrai eksperimentālajai grupai tika izmantotas desmit Plexiglas burkas (katra burka 10 cm augsta un 12 cm diametrā), katrā burkā ievietojot desmit augļu mušas, kopā 480 mušas 48 burkās. Eksperimenta laikā burkas tika turētas dienas apgaismojumā 12 stundas. Lai simulētu plēsēju stresa ietekmi, katrā burkā kopā ar barības mēģeni ievietoja vienu jaunu, aptuveni 6–7 mēnešus vecu *P. apacheanus* zirnekli. Zirnekļiem tika nodrošināts ūdens, taču pirms eksperimenta sākuma tie 10 stundas tika atstāti bez barības, lai nodrošinātu vienmērīgus bada apstākļus; katrs zirneklis tika izmantots tikai vienu reizi.

Papildus, lai novērtētu diabētam līdzīgā fenotipa adaptīvo vērtību plēsēju klātbūtnē, izveidojām 20 grupas (10 eksperimentālās un 10 kontroles), katrā no tām bija 10 augļu mušu tēviņi. Šīs grupas tika izvietotas plastmasas konteineros (20 cm platums, 10 cm dziļums, 10 cm augstums). Līdzīgi kā iepriekš, katrā konteinerā ievietoja vienu plēsēju – Floridas lēcējzirnekli vai vilka zirnekli – un *Drosophila* barības mēģeni, kas sastāvēja no kukurūzas miltu, dekstrozes, saharozes un rauga agara barotnes. Uz konteineru grīdas tika novietots filtrpapīra slānis, un augša tika pārklāta ar smalku sietu. Zirnekļiem pirms testiem tika radīts 12 stundu barības liegums ar pieeju dzeramajam ūdenim. Pēc 12 stundām tika saskaitītas izdzīvojušās mušas, lai novērtētu plēsēju ietekmi un mušu fizioloģiskās reakcijas fenotipa adaptīvās vērtības noteikšanai.

## 2.6. Badošanās panesamības mērījumi (III)

**Hroniskas bada tolerances tests:** mušas tika turētas mēģenēs ar 1% agaru, katrā mēģenē pa 10 indivīdiem. Izdzīvošana tika novērota ik pēc 3 stundām. Nāve tika definēta kā pēdējais aktivitātes laika punkts katrai mušai, kad netika novērota turpmāka kustība.

**Akūtas bada tolerances tests:** mušas tika badinātas mēģenēs ar filtrpapīru, kas bija samitrināts dejonizētā ūdenī; katrā mēģenē bija 10 indivīdi. Lai kontrolētu papīra mitruma līmeni, ūdens tika pievienots reizi dienā, izmantojot šļirci.

## 2.7. Fototakses pētījuma aprīkojums (I)

F1 augļu mušu fototakses uzvedības mainīguma tika pētīta, izmantojot FlyVac iekārtu, kas ļauj vienlaikus kvantificēt vairāku atsevišķu mušu fototakses uzvedību (Kain et al., 2012). Detalizēta informācija par FlyVac darbības principiem pieejama literatūrā (Kain et al., 2012). FlyVac ir ierīce, kas izstrādāta ātrai fototakses uzvedības kvantifikācijai. Katrā eksperimentā, līdz 32 atsevišķām augļu mušām tika ievietotas fototakses moduļos, no kuriem katrs sastāv no T-veida labirinta, kurā muša var izvēlēties starp apgaismotu (LED) un tumšu (nepagaismotu LED) stimulu - koridoru. T-veida labirinta abos zaros ir uzstādīti LED, bet katrā izmēģinājumā nejauši tiek apgaismota tikai viena no diodēm.

Fototakses sesija tiek uzsākta, aspirējot atsevišķas mušas no kultivēšanas mēģenes un ievietojot mušu T-veida labirinta vertikālajā sākuma caurulē. Muša, reaģējot uz negatīvo ģeotaksi, kāpj pa vertikālo cauruli augšup, līdz sasniedz izvēles punktu labirintā. Sasniedzot izvēles punktu, muša var izvēlēties vienu no diviem virzieniem – izgaismoto vai tumšo koridoru T-labirintā. Izvēli fiksē optisks sensors, kas reģistrē mušu kustības virzienu attiecībā pret apgaismotās LED pozīciju un aktivizē vakuumu, lai mušu atgrieztu – aspirētu starta koridorā.. Katrā izmēģinājumā nejauši tiek iedegta viena no divām gaismas diodēm.

Pēc 40 izmēģinājumu pabeigšanas fototakses modulis tiek deaktivizēts, un mušas paliek modulī līdz izņemšanai. Ja muša dažu stundu laikā nepabeidz visus 40 izmēģinājumus, tā tiek izņemta no moduļa un tiek veikta turpmāka analīze. Pirms eksperimenta sākuma FlyVac ierīce tika pārbaudīta, lai pārliecinātos, ka tā pati par sevi neietekmē mušu uzvedību. Veicot vairāku pārbaudi sēriju ar divām ieslēgtām un divām izslēgtām diodēm, iegūtie rezultāti neatšķīrās no nejauša binomiālā sadalījuma, tādējādi apstiprinot FlyVac neitralitāti attiecībā uz mušu uzvedību.

## **2.8. Pagriešanās uzvedība (II)**

Lai pētītu mainīgumu kā vienu no fenotipa pazīmēm, nepieciešami lieli paraugu apjomi (Caballero et al., 2021). Uzvedības izpētei tika pielietots augstas caurlaidības eksperimentāla iekārta, kas ļāva izsekot atsevišķu mušu uzvedībai Y-veida labirintos (Ayroles et al., 2015; Buchanan et al., 2015). Mušas tika ievietotas Y-labirintu masīvā, kas sastāvēja no 95 atsevišķiem Y-labirintiem, un katrs labirints sastāvēja no trim simetriskiem koridoriem (katrs 12 mm garš), kas bija izgatavoti no akrila plāksnes. Y-koridori akrila plāksnēs tika izgriezti ar lāzera palīdzību. Labirintu masīvs tika apgaismots no apakšas ar 100 baltās gaismas LED (5500K, Knema) spuldzītēm, kas atradās zem akrila difuzoriem.

Lai reģistrētu uzvedību, labirintu masīvu filmēja ar 2MP digitālajām kamerām (Point Grey), un katras mušas centroīda X-Y pozīcijās tika automātiski izsekota un ierakstīta, izmantojot LabView pielāgotu programmatūru (National Instruments, ASV) (Buchanan et al., 2015). Eksperimentos tika reģistrēta 3–6 dienu vecu mušu pagriešanās uzvedība, kas ir standarta vecums šādu uzvedības mērījumu veikšanai, un uzvedība tika novērota divu stundu garumā. Dati no indivīdiem, kuri veica mazāk par 30 pagriezieniem, tika izslēgti no analīzes. Katru mušu eksperimentā izmantoja tikai vienreiz.

Lai kvantitatīvi noteiktu pagriezienu paredzamību (pagriezienu novirzes mainīgumu starp indivīdiem), tika aprēķināta MAD vērtība, kas ir vidējā absolūtā novirze no grupas vidējās vērtības (Buchanan et al., 2015). MAD ir izkliedes rādītājs, kas ir noturīgs pret novirzēm. MAD vērtība tika aprēķināta katrai eksperimentālajai grupai.

## **2.9. Kustību aktivitātes pētījumi (III)**

Kā jaunas arēnas atsevišķu mušu kustību aktivitātes reģistrēšanai tika izmantoti sterili Petri trauki, kas izgatavoti no caurspīdīga polistirola (60 × 15 mm; Flystuff, El Cajon, ASV). Katrā testa traukā tika ievietota tikai viena muša. Vienlaikus (vienas video kameras skatu laukumā) tika reģistrēta sešu mušu lokomotorā aktivitāte ar izšķirtspēju 1920 × 1080 pikseļi un ātrumu 5 kadri sekundē, izmantojot video izsekošanas sistēmu ar Logitech HD Pro Webcam C920 (Logitech Inc., Newark, CA, ASV), kas nostiprināta 25 cm augstumā virs arēnām, un programmatūru Debut Video Capture (NCH Software, Greenwood Village, CA, ASV). Lai paātrinātu eksperimenta norisi, tika sagatavotas divas identiskas video izsekošanas sistēmas, kas ļāva vienlaikus izsekot 72 mušas. Video izsekošana ilga 15 minūtes, un katrai minūtei tika aprēķināts mušu vidējais ātrums.

Arēnas tika apgaismotas ar izkliedētu gaismu no augšas, izmantojot četras MR 16 LED lampas (12 V, 6 W, 400 lm, 3000 K), kas atradās 0,9 m virs arēnām.

Apgaismojuma intensitāte arēnu līmenī (3000 luksu) tika mērīta ar TES-1335 digitālo gaismas mērītāju (TES Electrical Electronic Corporation, Taipei, Taivāna). Visi video ieraksti tika veikti laboratorijā temperatūrā no 21 °C līdz 22 °C un relatīvajā mitrumā no 35% līdz 40%.

Lai kvantificētu lokomotorās aktivitātes galveno parametru – pārvietošanās ātrumu, tika izmantota ātruma robeža (sākuma ātrums  $> 0,20 \text{ mm/s}^{-1}$ ; apstāšanās ātrums  $< 0,20 \text{ mm/s}^{-1}$ ), un attālums tika aprēķināts vienas minūtes intervālos. Pārvietošanās ātrums tika iegūts no ierakstītajiem video failiem bezsaistē, izmantojot programmatūru EthoVision XT Version 11 (Noldus Information Technology, Wageningen, Nīderlande). Pārvietošanās ātrumi tika izmantoti ātruma aprēķināšanai, kas atspoguļo attāluma un laika integrālo vērtību.

## 2.10. Augļu mušu gaitas parametri (IV)

Šim pētījumam tika izgatavota plāksne ar Y formas labirintiem (Buchanan et al., 2015; Krama et al., 2023). Katra plāksne sastāvēja no diviem slāņiem: augšējais slānis tika izgatavots no cietas caurspīdīgas plastmasas, savukārt apakšējais slānis, kurā ar lāzeru iegravēti 60 labirinti, bija izgatavots no melnas matētas plastmasas, lai mazinātu gaismas atspulgos. Katrs labirints sastāvēja no trim koridoriem, kas tika novietotas 120 grādu leņķī viena pret otru; katra koridora platums bija 3 mm, bet garums – 12 mm. Katra atzara galā bija aplis ar 5 mm diametru. Katrs labirints tika noslēgts ar plāna stikla trīsstūri, ko no augšas uzlika uz labirinta virsmas tā, lai muša varētu staigāt zem segstikla. Stikla virsma tika pārklāta ar Sigmacote (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ASV), lai padarītu to slīdošu un novērstu mušu apgriešanos un staigāšanu pa griestiem. Katra labirinta augstums bija 2 mm, nodrošinot pietiekami daudz vietas mušām, lai brīvi pārvietotos, bet neļaujot tām apgriezties un palēnināt ātrumu.

Labirintu plāksne tika apgaismota no apakšas, izmantojot biezu matētu plastmasu, lai nodrošinātu kontrastējošu virsmu mušu kustību fiksēšanai. Ierakstīšana notika tumšā telpā (bet ar ieslēgtām LED gaismām), lai izvairītos no gaismas atspīdumiem uz stikla, kas varētu traucēt precīzu kustību analīzi. Virs plāksnes tika uzstādīta Basler Ace kamera ar 1/1.8 collu sensoru (Basler, Ahrensburga, Vācija) un Kowa F1.6/4.4-11 mm objektīvu (Kowa Optimed Germany GmbH, Diseldorfā, Vācija). Iestatījumi tika pielāgoti, lai nodrošinātu maksimālu precizitāti un minimālus izkropļojumus.

Katra muša tika uzmanīgi ievietota atsevišķā labirintā, izmantojot īsu oglekļa dioksīda anestēziju. Pēc pamošanās visām mušām tika dotas vismaz 25 minūtes, lai atgūtos. Pēc tam sekoja divu stundu nepārtraukta augļu mušu kustību reģistrēšana. Katra muša piedalījās tikai vienā izmēģinājumā. Video faili tika augšupielādēti programmatūrā Noldus EthoVision XT v.15.0 (Noldus Information Technology, Wageningen, Nīderlande) un analizēti, izmantojot

šādus parametrus: pārvietošanās attālums (mm), augsta paātrinājuma stāvokļa biežums un ilgums, maksimālais paātrinājums ( $\text{mm/s}^2$ ) un kustības pārtraukumu (stāvēšanas) biežums un ilgums. Šie parametri ir būtiski kukaiņu kustības raksturošanai (Nilsson & Renshaw, 2004; Russig et al., 2003; Winberg et al., 1993). Katram mērījumam tika aprēķināta vidējā vērtība katram indivīdam.

Paātrinājuma mērījumi tika izmantoti, lai identificētu straujas kustības periodus. Augsta paātrinājuma stāvoklis tika reģistrēts, kad objekta vidējais paātrinājums pārsniedza  $2,5 \text{ mm/s}^2$  sliekšni. Sliekšņa vērtība tika pielāgota, izmantojot EthoVision XT integrēto vizualizācijas rīku. Tika izmantots vidējais intervāls 2, lai novērstu nejaušu ātruma izmaiņu ietekmi starp secīgiem paraugiem, kas varētu izraisīt kļūdainas pārejas uz augsta paātrinājuma stāvokli. Optimālais stāvokļa ilguma sliekšnis tika noteikts kā 0,5 sekundes, lai izslēgtu īslaicīgus paātrinājumus, kas saistīti ar ķermeņa vibrācijām vai nelielām kustībām, kuras varētu radīt kameras vibrācijas. Augsta paātrinājuma stāvokļa biežums tika aprēķināts kā visu vērtību mediāna katrai grupai.

Maksimālais paātrinājums tika aprēķināts kā visu vērtību mediāna katrai grupai. Pirms paātrinājuma aprēķināšanas tika nodrošināts, ka zaudēto paraugu īpatsvars bija mazāks par 1%.

Pārvietošanās attāluma mērījumi tika veikti divu stundu intervālā, izmantojot izlases ātrumu ar 6 datu punktiem (saskaņā ar Noldus ieteikumiem). Augstāki izlases ātrumi var radīt kļūdainus rādījumus un attāluma pārvērtēšanu, savukārt zemāki izlases ātrumi var izlaist nelielas kukaiņa centrālā punkta kustības (Pham et al., 2009).

## **2.11. Augļu mušu kustības bez pārvietošanās (IV)**

Kustība bez pārvietošanās (jeb "Mobilitāte" Noldus programmatūrā) apraksta objekta ķermeņa kustību intensitāti, pat ja centrālais punkts telpiski nevirzās. Tas nozīmē, ka mērījumi tiek veikti tikai tad, ja kukaiņa centrālais punkts horizontālajā plaknē paliek nemainīgs. *Drosophila* mušām bieži novērojama tāda uzvedība kā "kustība uz vietas". Šo kustību raksturošanai nav nepieciešamas  $x$  un  $y$  koordinātes, bet gan tiek izmantotas izmaiņas atsevišķu pikseļu pozīcijās. Šis parametrs ir būtisks, lai novērtētu kukaiņa kustību intensitāti neatkarīgi no tā pārvietošanās pa  $x$  un  $y$  asīm. Klasisks šī parametra piemērs ir kukaiņa tīrīšanās uzvedība: lai gan kukaiņa ekstremitātes un ķermenis ir aktīvi, kukainis pats paliek vienā un tajā pašā telpas punktā.

Kustības bez pārvietošanās biežums (jeb "Ļoti mobilais" saskaņā ar Noldus programmatūru) tika novērtēts, izmantojot 50% izmaiņu sliekšni pikseļu skaitā, kas attēlo objektu. Tika izmantots noklusējuma vidējās vērtības intervāls – 1 datu punkts, kas nozīmē, ka mērījumi netika izlīdzināti pirms vērtību noteikšanas.

Viens no kustības bez pārvietošanās parametra ierobežojumiem ir tā atkarība no pikseļu skaita, kas veido analizējamo objektu, un tādējādi arī no kameras izšķirtspējas. *Drosophila* mušas ir nelieli objekti, kas sastāv no aptuveni  $100 \pm 20$  pikseļiem, tādēļ tika noteikts augsts kustības sliekšnis – 50%. Tas nozīmē, ka kukaiņa kustība tika reģistrēta tikai tad, ja 50% pikseļu mainīja savu pozīciju, tādējādi samazinot nepatiesu nolasījumu iespējamību. Lai izvairītos no neprecīziem datiem, netika ziņots par nekustīguma rādītāju šajā kontekstā.

## 2.12. Western analīze (III)

30 mušu paraugi tika homogenizēti ar piestu uz ledus, izmantojot 300  $\mu$ l Western lizēšanas bufera (PBS ar 1,5% Triton X-100), kam pievienoti proteāžu un fosfatāžu inhibitoru maisījumi (Roche Complete Mini, nr. 11836170001 un PhosSTOP, nr. 04906845001), ievērojot ražotāja protokolus. Lizāti tika inkubēti uz ledus 15 minūtes un pēc tam centrifugēti pie 13 000 g 15 minūtes pie 4 °C, lai atdalītu sārņus. Supernatanta proteīnu koncentrācija tika noteikta, izmantojot Bradforda analīzi (Thermo, nr. 1856209), un uz Bio-Rad Criterion AnyKD gradienta gēliem tika ievietoti 70  $\mu$ g apjoma paraugi. Elektroforēze tika veikta ProSieve EX darbības buferī (Lonza).

Proteīni tika pārnesti uz Amersham Protran nitrocelulozes membrānu (nr. 10600020) ProSieve EX pārsūtīšanas buferī (Lonza), izmantojot BioRad Criterion Transfer kameru ar 35 V spriegumu 50 minūtšu laikā. Membrānas tika bloķētas 1 stundu ar 5% BSA šķīdumu TBS / 0,05% Tween buferī un pēc tam inkubētas pa nakti 4 °C temperatūrā tajā pašā buferī ar primārajām antivielām. Antivielu koncentrācijas bija šādas: Akt (1:5000, Cell Signaling, nr. 9272), fosfo-Akt (1:5000, Cell Signaling, nr. 4054), ACC (1:5000, Cell Signaling, nr. 3676), HRP-konjugētā anti-akt (1:10 000, PI-1000-1).

Pēc membrānu trīskārtējas skalošanas (katra 15 minūtes) ar TBS / 0,05% Tween, tās 1 stundu istabas temperatūrā tika inkubētas ar mēru peroksidāzes (HRP) konjugētu sekundāro antivielu pret trušu antivielām. Pēc papildu trīs skalošanas reizēm, kā aprakstīts iepriekš, signāls tika vizualizēts, izmantojot BioRad ChemiDoc XR detekcijas sistēmu. Kvantitatīvās noteikšanas nolūkos paraugi no kontrolgrupas un plēšēju grupā audzētām mušām tika palaisti uz viena gēla ar četriem bioloģiskiem atkārtojumiem katrā grupā.

Lai normalizētu olbaltumvielu daudzumu katrā joslā, membrānas tika iekrāsotas ar Ponceau S šķīdumu (0,1% Ponceau S 5% etiķskābē), īsi noskalotas ar ūdeni un dokumentētas ar BioRad ChemiDoc XR sistēmu. Signāls tika kvantificēts, un dati tika analizēti, izmantojot ImageQuant programmatūru.

## 2.13. Metabolītu analīzes (III)

### Ogļhidrātu mērījumi

Desmit mušas tika homogenizētas 400 µl PBS un inkubētas 5 minūtes 70 °C temperatūrā. No kopējā lizāta 40 µl tika pārnesti uz četrām atsevišķām Eppendorf mēģenēm, kurām tika pievienots 1 U amiloglikozidāzes no *Aspergillus niger* (Sigma, kopējais glikozes mērījums), 2× PBS (brīvās glikozes un fona mērījumam) un 5 mU cūku nieru trehalāzes (Sigma T8778, trehalozes mērījumam). Visas reakcijas tika inkubētas 2 stundas 37 °C temperatūrā, pēc tam centrifugētas, un 30 µl supernatanta tika pārnesti uz 96 kuvešu mikrotitra plāksnēm. Visām reakcijām tika pievienots 100 µl glikozes analīzes reaģenta (Sigma G3293), izņemot vienu PBS apstrādātu lizātu, kam pievienoja 100 µl PBS fona signāla noteikšanai. Reakcijas tika inkubētas 37 °C temperatūrā 30 minūtes, pēc tam absorbance tika mērīta pie 340 nm. Brīvā glikoze, glikogēns un trehaloze tika aprēķināti, atņemot attiecīgos fona rādījumus no mērījumu vērtībām. Glikozes standarta līkne tika ģenerēta, izmantojot 1–20 µg glikozes (uz kuveti). Rezultāti tika normalizēti, izmantojot olbaltumvielu daudzumu, ko noteica ar Bradforda testu (Thermo nr. 1856209).

### Triglicerīdu mērījumi

Desmit mušas tika homogenizētas 800 µl PBS ar 0,1% Tween 20 un inkubētas 5 minūtes 70 °C temperatūrā. No katra lizāta tika pārnesti 20 µl uz trim Eppendorf mēģenēm ar pievienotām sastāvdaļām: 20 µl triglicerīdu reaģenta (Sigma T2449, kopējam glicerīda mērījumam) un 2 × 20 µl PBS (brīvā glicerīda un fona mērījumam). Visas reakcijas tika inkubētas 30 minūtes 37 °C temperatūrā, pēc tam centrifugētas, un 30 µl supernatanta tika pārnesti uz 96 kuvešu mikrotitrāžas plāksnēm. Visām reakcijām tika pievienots 100 µl brīvā glicerīda reaģenta (Sigma F6428), izņemot vienu PBS apstrādātu lizātu, kam pievienoja 100 µl PBS fona noteikšanai. Reakcijas tika inkubētas 37 °C temperatūrā 5 minūtes, pēc tam absorbance tika mērīta pie 540 nm. Triglicerīdu koncentrācija tika aprēķināta, atņemot brīvā glicerīda vērtību no kopējā glicerīna mērījuma. Glicerīda standarta līkne tika aprēķināta, izmantojot 0,5–3 µg glicerīda (uz kuveti). Rezultāti tika normalizēti, izmantojot olbaltumvielu daudzumu, ko noteica ar Bradforda testu (Thermo nr. 1856209).

### ATF koncentrācijas mērījumi

ATF koncentrācija tika noteikta, izmantojot ATF noteikšanas komplektu (ThermoFisher Scientific). Trīsdesmit mušas tika homogenizētas ATF izolācijas buferī (6 M guanidīna-HCl, 4 mM EDTA, 100 mM Tris/Cl, pH 7,8), pēc tam strauji sasaldētas šķidrā slāpekļī un vārītas 5 minūtes. Atkritumi tika nosēdināti, centrifugējot pie 10 000 g 10 minūtes 4 °C temperatūrā. No supernatanta, kas

atšķaidīts 12,5 reizes, tika paņemti 5  $\mu$ l un pievienoti 100  $\mu$ l ATF reakcijas maisījuma (Thermo Fisher; sagatavots saskaņā ar ražotāja norādījumiem). Mērījumi tika veikti ar Tecan luminometru, izmantojot Greiner polipropilēna plāksnes (nr. 655207). Rezultāti tika normalizēti, izmantojot olbaltumvielu daudzumu, ko noteica ar Bradforda testu (Thermo nr. 1856209).

### **Piruvāta koncentrācijas mērījumi**

Piruvāta koncentrācija tika noteikta, izmantojot BioVision komplektu (nr. K709) un modificētu ražotāja protokolu. Piruvāta mērījumiem 20 mušas tika homogenizētas 200  $\mu$ l piruvāta analīzes buferī uz ledus un pēc tam centrifugētas pie 10 000 g 10 minūtes pie 4 °C. Piecpadsmi mikrolitri supernatanta tika sajaukti ar 35  $\mu$ l piruvāta testa buferšķīduma 96 kuvešu mikrotitrēšanas plāksnes kuvetē. Piecdesmi mikrolitri reakcijas maisījuma (saskaņā ar ražotāja norādījumiem) tika pievienoti katrai kuvetē, kas saturēja supernatantu, un to inkubēja 30 minūtes istabas temperatūrā; pēc tam tika mērīta absorbcija pie 570 nm. Paralelas fona reakcijas tika veiktas, sajaucot supernatantu ar fona maisījumu, kas sagatavots saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Rezultāti tika normalizēti attiecībā pret olbaltumvielu daudzumu, kas noteikts ar Bradforda testu (Thermo nr. 1856209).

## **2.14. Izdalītās ogļskābās gāzes un patērētā skābekļa attiecība (III)**

Elpošanas apmaiņas koeficients (RER) tika aprēķināts kā mušu radītā CO<sub>2</sub> un izmantotā O<sub>2</sub> attiecība. O<sub>2</sub> patēriņš atsevišķām mušām tika mērīts ar kulometrisko respirometriju nepārtrauktā O<sub>2</sub> kompensācijas sistēmā nemainīgā temperatūrā un mitrumā (23 °C un 55% relatīvais mitrums). Mušas tika ievietotas mērkamerās, un mērījumi tika uzsākti, kad mušas pārstāja kustēties un tika sasniegta minimālā gāzes apmaiņas vērtība. CO<sub>2</sub> līmeņi tika noteikti, izmantojot LI-700 diferenciālo CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O analizatoru (LiCor, Linkolna, Nebraska, ASV).

## **2.15. Datu analīze un statistiskās metodes (I, II, III, IV)**

Datu analīzē tika izmantots Puasona vispārinātais lineārais modelis (GLM) ar logaritmisko saistības funkciju, kur atkarīgais mainīgais bija pozitīvo gaismas izvēļu skaits. Šis modelis ietvēra ģeogrāfisko atrašanās vietu (Somija, Kenija), pievienoto ķīmisko vielu grupas (kontrolē, 5-HTP,  $\alpha$ MW) un dzimumu kā neatkarīgos mainīgos, kā arī mijiedarbības terminu starp dzimumu un vielu grupām. Kad tika konstatēts, ka dzimums būtiski neietekmē rezultātus, tas tika izņemts no modeļa, tādējādi izveidojot vienkāršotu GLM, kas fokusējās uz ģeogrāfiskās atrašanās vietas un vielu grupu mijiedarbību. Fototaktiskās izvēles mainīgums tika novērtēts, izmantojot pārmērīga mainīguma metriku (VBE), kas

iegūta no datu vidējās absolūtās novirzes no mediānas, pielāgojot to paredzamajai izlases kļūdai. VBE standarta kļūdas tika aprēķinātas, veicot individuālu mušu atkārtotu izvērtēšanu (5000 atkārtojumi).

Papildu statistiskā analīze ietvēra permutācijas testus, lai salīdzinātu uzvedības vidējās absolūtās novirzes (MAD) starp grupām, izmantojot  $P$  vērtības, kas iegūtas, nejauši sajaucot datu tabulas un salīdzinot nejaušās grupas ar sākotnējiem datiem. Pieaugušo mušu izdzīvošanas izmaiņas plēsēju klātbūtnē saistībā ar attīstības apstākļiem un ķīmiskajām piedevām tika novērtētas ar divu faktoru ANOVA, kam sekoja Tukey testu vairākkārtēju salīdzinājumu veikšanai, kā arī Kruskala-Vallisa un Manna-Vitnija  $U$  testiem, lai analizētu tādas uzvedības pazīmes kā pagriezienu tendence un kustības ātrums.

Visas analīzes tika veiktas R vidē (versija 4.1.0). Lai novērstu viltuspozitīvu rezultātu iespējamību vairākkārtējiem salīdzinājumiem tika piemērota Benjamini-Hochberg metode (Benjamini & Hochberg, 1995). Bioloģisko atkārtojumu skaits svārstījās no četriem līdz desmit, individuālie datu punkti tika attēloti diagrammās, un statistiskā nozīmīguma sliekšnis tika noteikts pie  $P < 0,05$ .

Lokomotorās aktivitātes un izdzīvošanas datu analīzei tika izmantoti gan vispārīnātie lineārie, gan nelineārie regresijas modeļi, pielāgojot saistības funkciju atbilstoši datu sadalījumam. Šajā analīzē tika izmantotas gamma un kvazi-Puasona sadalījumi, lai novērtētu faktorus, kas ietekmē tādas pazīmes kā maksimālais paātrinājums un bieža augsta paātrinājuma stāvokļa frekvence. Dzīvildzes analīze plēsēju vidē tika veikta, izmantojot binomiālo sadalījuma modeli, un visos modeļos statistiskā nozīmīguma sliekšnis tika noteikts pie  $P < 0,05$ .

Grafisko attēlojumu un statistisko aprēķinu veikšanai tika izmantota programmatūra GraphPad Prism, ietverot divpusējos Stjudenta  $t$ -testus kontroles un plēsēju grupu salīdzināšanai, kā arī Mantel-Cox testus dzīvildzes analīzēm. Lai precīzāk interpretētu kustību datus, tika izmantota Lowess trajektorijas izlīdzināšanas metode.

### 3. REZULTĀTI

#### 3.1 Gaismas izvēles varbūtība (I)

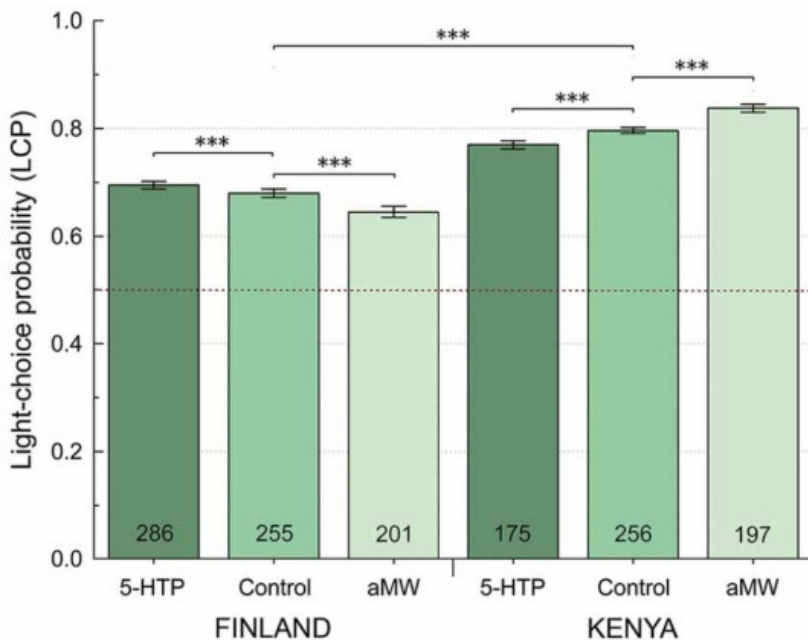
Mušu mātīšu un tēviņu LCP (izvēles daļa virzienā uz apgaismoto LED) būtiski neatšķīrās ne Somijā, ne Kenijā (Puasona GLM ar log saiti, Wald Chisq<sub>1</sub> = 0,66,  $P > 0,4$ ), tāpēc dzimumu dati tika apvienoti turpmākai LCP analīzei. Noskaidrots, ka ģeogrāfiskā atrašanās vieta bija nozīmīgs gaismas izvēles varbūtības prognozētājs (Puasona GLM ar log saiti, Wald Chisq<sub>1</sub> = 290,8,  $P < 0,0001$ ). Mušas izrādīja fotopozitivitāti gan Kenijā, gan Somijā, izvēloties gaismu attiecīgi 80% un 68% gadījumu (1. tabula; 1. attēls). Kenijas mušas bija ievērojami fotopozitīvākas nekā Somijas mušas ( $P < 0,001$ ; 1. tabula; 1. attēls).

Kaut arī izpētes grupas galvenajam efektam uz gaismas izvēli nebija būtiskas ietekmes (Poisson GLM ar log saiti, Wald Chisq<sub>2</sub> = 0,449,  $P = 0,8$ ), tika konstatēta nozīmīga mijiedarbība starp ģeogrāfisko atrašanās vietu un izpētes grupu (Poisson GLM ar log saiti, Wald Chisq<sub>2</sub> = 40,93,  $P < 0,0001$ ). Kenijas mušām αMW barošana ievērojami palielināja LCP, savukārt 5-HTP barošana to samazināja (1. tabula; 1. attēls). Somijas mušām, turpretī, αMW barošana samazināja LCP, bet 5-HTP palielināja to. Tomēr Somijas mušu LCP, kas tika barotas ar 5-HTP, joprojām bija zemāks nekā Kenijas mušu LCP (1. tabula; 1. attēls).

1. tabula

LCP un VBE aprakstošie statistikas dati ± SE tika iegūti, izmantojot bootstrapping metodi ar 5000 replikātiem

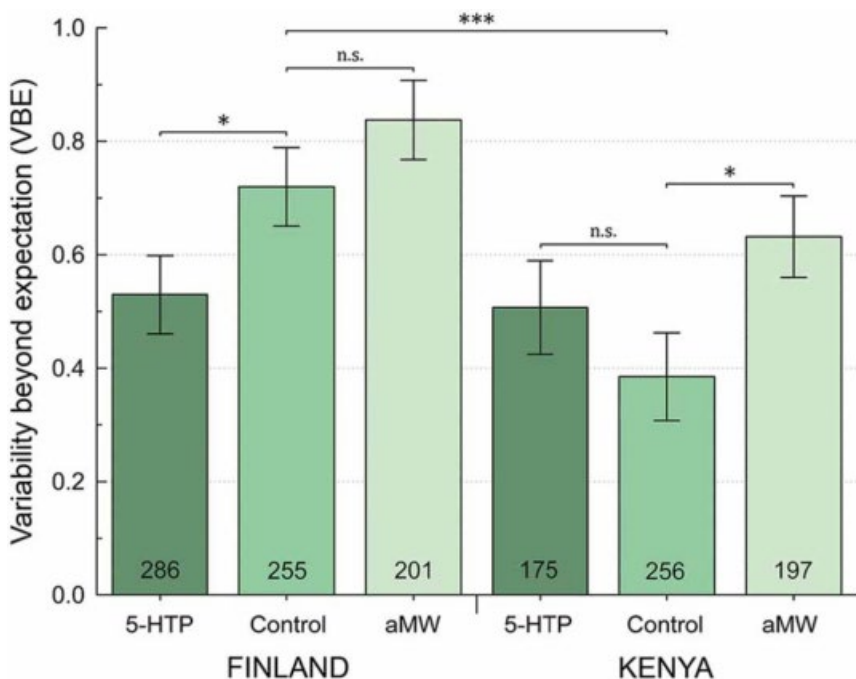
| Geographic location | Treatment | <i>n</i> | Light choice probability (LCP) ± SE | Variability beyond expectation (VBE) ± SE |
|---------------------|-----------|----------|-------------------------------------|-------------------------------------------|
| Finland             | 5-HTP     | 286      | 0.695 ± 0.00665                     | 0.5278 ± 0.06943                          |
| Finland             | Control   | 255      | 0.6798 ± 0.00779                    | 0.7225 ± 0.0703                           |
| Finland             | αMW       | 201      | 0.6454 ± 0.00977                    | 0.8394 ± 0.07307                          |
| Kenya               | 5-HTP     | 175      | 0.7673 ± 0.00745                    | 0.5458 ± 0.085                            |
| Kenya               | Control   | 256      | 0.7964 ± 0.00564                    | 0.3839 ± 0.07685                          |
| Kenya               | αMW       | 197      | 0.8379 ± 0.00663                    | 0.6392 ± 0.07468                          |



1. attēls. Gaismas izvēles varbūtība atkarībā no ģeogrāfiskās vietas un farmakoloģiskās ietekmes. Kļūdu joslas attēlo  $\pm 1$  SE; tās aprēķinātas, izmantojot bootstrapping metodi. \*\*\* $P < 0.001$ .

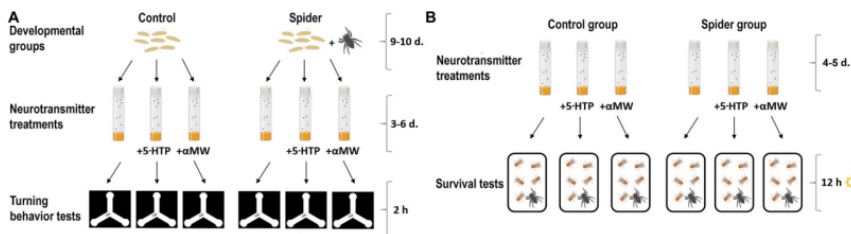
### 3.2 Mainīgums aiz paredzamības limitiem (I, II)

Mušu mātītēm un tēviņiem fototaktiskās atšķirības starp indivīdiem, ko novērtē, izmantojot VBE, Somijā un Kenijā bija līdzīgas (visi bootstrapped sadalījumi,  $P > 0,05$ ), tāpēc dzimumi tika apvienoti turpmākajām VBE analīzēm. Somijas augļu mušām bija ievērojami lielāks VBE nekā Kenijas mušām ( $P < 0,001$ ; 1. tabula; 2. attēls). Somijas mušām  $\alpha$ MW barošana neietekmēja VBE, savukārt 5-HTP pievienošana barībai ievērojami samazināja VBE ( $P = 0,023$ ). Kenijas mušām  $\alpha$ MW barošana ievērojami palielināja VBE, bet 5-HTP uz to neietekmēja (1. tabula; 2. attēls). Svarīgi, ka 5-HTP barošana padarīja Somijas mušu VBE līdzīgu Kenijas mušu VBE (1. tabula; 2. attēls).

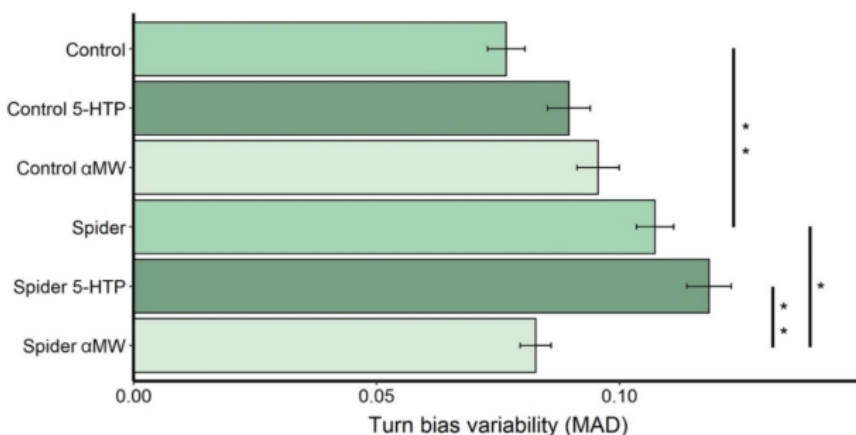


2. attēls. Uzvedības mainīguma, kas pārsniedz statistisko varbūtību (VBE), atkarībā no ģeogrāfiskās vietas un farmakoloģisko vielu ietekmes. Logaritma (bāze 2) līkne ar  $VBE = 0$  norāda uz normālu mainīgumu, nepārsniedzot statistisko varbūtību, savukārt  $VBE = 1$  norāda uz divkārtu statistiskās varbūtības pārsniegšanu. Kļūdu joslas ir  $\pm 1$  SE, aprēķinātas, izmantojot bootstrapping metodi; n.s.,  $P > 0,05$ ; \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$  norāda vienpusēju statistisko nozīmīgumu.

Tēviņu augļu mušu, kas audzētas kopā ar zirnekļiem, pagriezienu tendences mainīgums ( $MAD = 0,11$ ,  $n = 153$  mušas) bija ievērojami lielāks nekā kontrolgrupas mušām ( $MAD = 0,08$ ,  $n = 143$ ), kas tika audzētas bez plēsēju klātbūtnes (Permutācijas tests:  $P = 0,006$ ; 4. attēls). Mušu, kas audzētas ar zirnekļiem, barošana ar 5-HT ( $MAD = 0,12$ ,  $n = 116$ ) neizraisīja būtisku pagriezienu mainīguma palielināšanos ( $P = 0,34$ ), savukārt barošana ar  $\alpha MW$  ( $MAD = 0,10$ ,  $n = 140$ ) ievērojami samazināja pagriezienu tendences mainīgumu ( $P = 0,021$ ; 3. attēls). Kontrolgrupas mušām barošana ar 5-HTP ( $P = 0,33$ ) un  $\alpha MW$  ( $P = 0,12$ ) neizraisīja būtiskas pagriezienu mainīguma izmaiņas (4. attēls).



3. attēls. Shēmas pagriezienu pārbaudes (A) un izdzīvošanas eksperimentam (B)

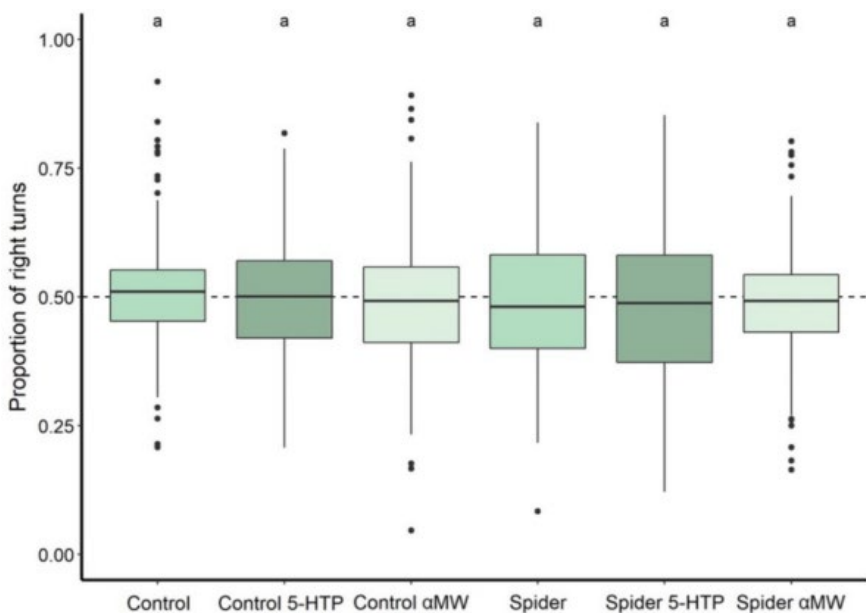


4. attēls. Pagriezienu tendences mainīgums augļu mušām, kas audzētas gan zirnekļu klātbūtnē, gan bez tiem un saņēmušas dažādas farmakoloģiskas vielas. Kļūdu joslas ir  $\pm$  SE, novērtētas, izmantojot bootstrapping metodi. Zvaigznītes norāda statistiski nozīmīgas atšķirības, kas noteiktas ar permutācijas testiem:

\* $0,05 > P > 0,01$ ; \*\* $0,01 > P > 0,001$ .

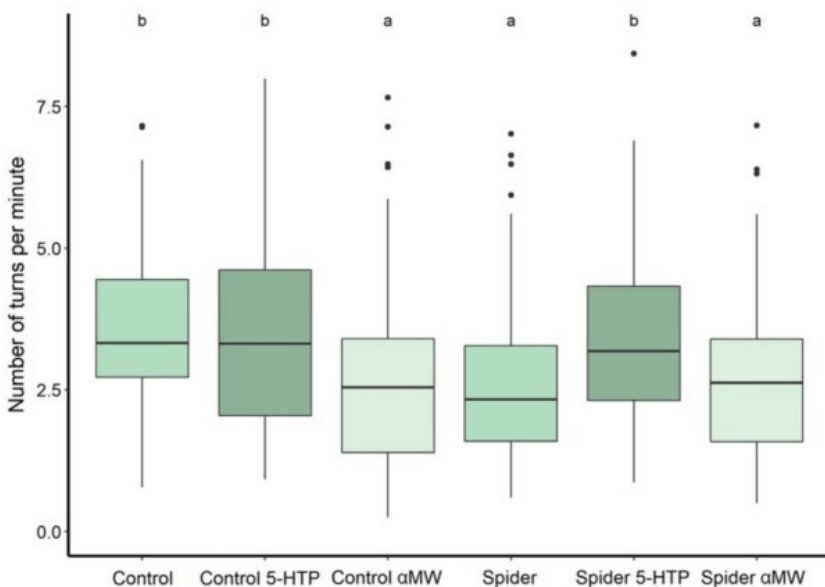
### 3.3 Priekšroka vienai ķermeņa pusei un pagriezienu skaits Y-labirintā (II)

Pagriezienu pa labi proporcija (pagriezienu tendence) starp dažādām mušu grupām būtiski neatšķirās (Kruskala Wollesa tests:  $\chi^2 = 6,41$ ,  $P = 0,268$ ; 5. attēls). Tāpat neviena no grupām neuzrādīja būtisku atšķirību no 0,5 attiecībā uz pagriezieniem pa labi (Vilkoksona testi: visi  $P > 0,05$ ; 5. attēls), t.i., katrā grupā bija līdzīgs pagriezienu skaits gan pa labi, gan pa kreisi.



5. attēls. Pagriezienu tendence augļu mušām, kas audzētas ar un bez zirnekļu klātbūtnes un saņēmušas dažādas farmakoloģiskās vielas attīstības laikā. Eksperimentālās grupas, kuras statistiski būtiski neatšķiras (Vilkoksona testi,  $P > 0,05$ ), ir norādītas ar vienādu burtu attēla augšpusē.

Mušas, kas audzētas kopā ar zirnekļiem, Y-labirintā veica ievērojami mazāk pagriezienu laika vienībā ( $2,6 \pm 1,3$  pagriezieni/min) salīdzinājumā ar kontrolgrupas mušām ( $3,4 \pm 1,5$  pagriezieni/min) (Manna-Vitnija tests:  $P = 0,0001$ ; 6. attēls). 5-HTP barošana mušām, kas audzētas ar zirnekļiem, ievērojami palielināja pagriezienu skaitu ( $3,4 \pm 1,4$  pagriezieni/min;  $P < 0,0001$ ), savukārt  $\alpha$ MW barošana būtisku efektu neradīja ( $2,7 \pm 1,3$  pagriezieni/min;  $P = 0,50$ ; 6. attēls). Kontrolgrupas mušām barošana ar  $\alpha$ MW ievērojami samazināja pagriezienu ātrumu ( $2,6 \pm 1,5$  pagriezieni/min;  $P = 0,0003$ ), bet barošana ar 5-HTP neizraisīja būtisku ietekmi ( $3,5 \pm 1,7$  pagriezieni/min;  $P = 0,94$ ; 6. attēls).

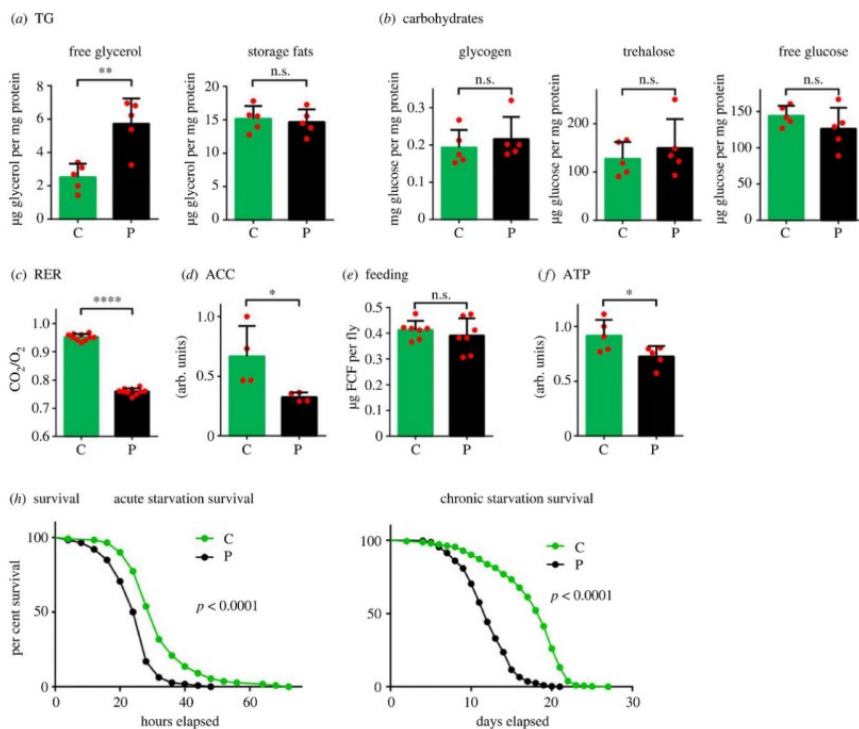


6. attēls. Pagriezienu biežums (pagriezieni minūtē) Y-veida labirintā mušām, kas audzētas ar un bez zirnekļu klātbūtnes un saņēmušas dažādas ķīmiskās vielas. Mušas, kas audzētas ar plēsēju klātbūtni, kāpuru stadijā bija pakļautas plēsēju ietekmei, savukārt kontrolgrupas mušas tika audzētas bez lēcējzirnekļiem. Biezās līnijas attēlo vidējo vērtību, lodziņi norāda uz Q1 un Q3 kvartilēm, bet “ūsas” apzīmē diapazonu starp augšējo un apakšējo kvartili, neiekļaujot izņēmuma vērtības. Melnie punkti attēlo novirzes jeb datu punktus, kas pārsniedz 1,5 reizes starpkvartīļu diapazonu no Q1 un Q3. Eksperimentālās grupas, kuras statistiski būtiski neatšķiras (Manna-Vitnija testi,  $P > 0,05$ ), ir attēlotas ar vienu un to pašu burtu attēla augšpusē.

### 3.4 Kataboliskā pāreja uz tauku oksidāciju plēsēja stresa ietekmē (III)

Gan ogļhidrāti, gan lipīdi kā galvenās bioķīmiskās enerģijas uzkrāšanas molekulas tika mērītas Oregon līnijās augļu mušām, kuras tika audzētas ar un bez zirnekļiem. Lai gan brīvā glikoze, tās disaharīds trehaloze un tās polimērā forma glikogēns ( $n = 8$ ) saglabājās bez būtiskām izmaiņām, neskatoties uz plēsēju stresa ietekmi, triglicerīdu daudzums samazinājās, bet brīvā glicerīda koncentrācija palielinājās salīdzinājumā ar kontroli ( $n = 10$ ; 7. attēls a, b). Šis rezultāts norāda uz paaugstinātu lipīdu izmantošanu, jo triglicerīdu lipolīze nodrošina brīvo taukskābju pieejamību katabolisma procesiem, vienlaikus

palielinot brīvā glicerīda koncentrāciju. Šāds specifisks tauku krājumu zudums bez izmaiņām ogļhidrātu koncentrācijā liecina par izmaiņām kataboliskajos procesos, nevis uz mušu badošanos.



7. attēls. Plēsonības stresa ietekme uz metabolismu, lokomotoro aktivitāti un izdzīvošanu augļu mušām, kas audzētas zirnekļu klātbūtnē (plēsēji) un bez zirnekļiem (kontrolē). (a) Brīvā glicerīda un uzkrāto tauku līmeņi. Kontroles mušu relatīvās, bet ne absolūtās vērtības ir zināmas un publicētas agrāk (Krams et al., 2020). TG – triglicerīdi. (b) Ogļhidrātu līmeņi: glikogēns, trehaloze un brīvā glikoze. (c) Elpošanas apmaiņas koeficients. (d) Acetil-KoA karboksilāzes (ACC) daudzums, normalizēts pret Ponceau S krāsvielā iekrāsotajām kopējām olbaltumvielām. (e) Pārtikas uzņemšana, izmantojot 1% zilo FCF krāsvielu. (f) ATF (ATP) koncentrācija. (g) Izdzīvošanas līknes mušām uz agara bāzes uztura (akūta bada gadījumā, logaritmiskais rangs tests  $P < 0,0001$ ) un uz 1% saharozes uztura (hroniska bada gadījumā, logaritmiskais rangs tests  $P < 0,0001$ ). Visos gadījumos: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ , n.s. – nebūtiski. C – kontrolē, P – plēsēju klātbūtnē audzētas mušas.

Zemais RER ( $n = 20$ ) 0,76 mušām, kas audzētas zirnekļu klātbūtnē, apstiprina šo interpretāciju (7. attēls c), norādot uz intensīvu taukskābju oksidāciju, lai veicinātu sistēmiskās ATF sintēzi.

### 3.5. Kopējā enerģijas līmeņa samazināšanās plēsēju stresa ietekmē (III)

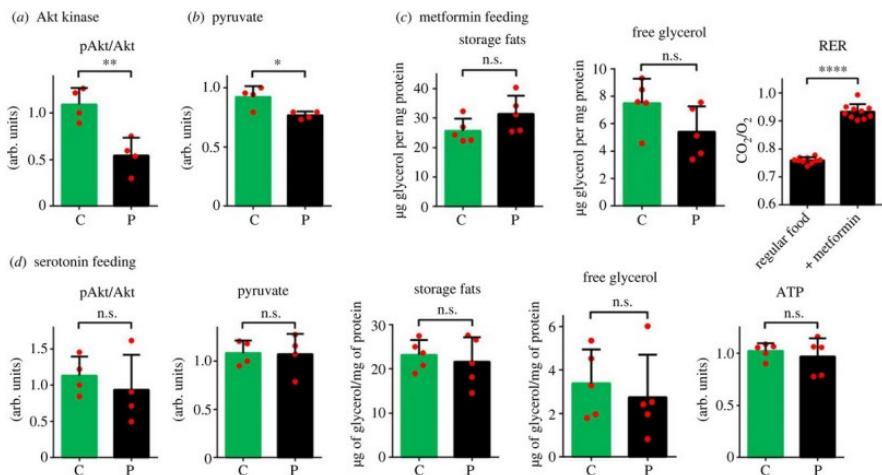
Lai gan katabolisms tiek pārorientēts uz taukskābju oksidāciju, ogļhidrāti var veicināt enerģijas radīšanu, izmantojot *de novo* lipīdu sintēzi. Tomēr šī procesa ātrumu ierobežojošā ACC, kas regulē lipīdu sintēzi, līmenis bija pazemināts mušām, kas piedzīvoja plēsēju izraisītu stresu ( $n = 8$ ; 7. attēls d). Paaugstināta barošanās intensitāte ( $n = 14$ ), kas *Drosophila* sugām parasti raksturīga kā reakcija uz resursu trūkumu, netika novērota (7. attēls e). Pilnīga atkarība tikai no viena kataboliskā enerģijas avota izraisīja ATF līmeņa 20% samazinājumu ( $n = 10$ ; 7. attēls f).

Samazināto ATF līmeni nevarēja kompensēt, palielinot pārtikas uzņemšanu vai veicinot lipīdu sintēzi, kas negatīvi ietekmēja vispārējo metabolismu. Tika novērots, ka mušas, kas audzētas zirnekļu klātbūtnē, uzrādīja zemāku aktivitāti staigāšanas/rāpšanās testos salīdzinājumā ar kontroles grupu ( $n = 24$  un  $16$ ; 9. attēls g). Tāpat šīs mušas bija mazāk izturīgas pret gan akūtu ( $n = 220$ ), gan hronisku ( $n = 274$  un  $275$ ) badu, izrādot īsāku izdzīvošanu apstākļos ar ierobežotiem pārtikas resursiem (7. h attēls).

### 3.6 Glikozes uzņemšanas kavēšana (III)

Akt – konservēta centrālā regulatora mehānisma, kas kontrolē glikozes uzņemšanu – aktivitāte ir atkarīga no treonīna fosforilācijas stāvokļa kināzes domēnā un serīna atlikuma hidrofofobajā motīvā (pozīcija 505 *Drosophila* Akt). Šī aktivitāte bija ievērojami samazināta mušām, kas audzētas zirnekļu klātbūtnē ( $n = 8$ ; 8. attēls a). Šis samazinājums norāda uz ierobežotu glikozes transportu, kas samazina glikolīzes pieejamību un pazemina tās gala produkta pīruvāta daudzumu ( $n = 4$ ; 8. attēls b).

Metformīna, pret diabēta līdzekļa, kas atvieglo glikozes uzņemšanu (Bahhir et al., 2019; Niccoli et al., 2016), pievienošana barībai atjaunoja mušu normālu ogļhidrātu un lipīdu izmantošanas līdzsvaru ( $n = 10$ ) un paaugstināja RER ( $n = 20$ ) līdz normālai vērtībai (8. attēls c).



8. attēls. Plēsēju stresa ietekme uz vielmaiņu, uzvedību un farmakoloģisko komplementāciju augļu mušām, kas audzētas zirnekļu klātbūtnē (plēsēji) un bez tiem (kontrolē). (a) Akt kināzes fosforilācija pie Ser505. (b) Piruvāta līmeņi. (c) Metformīna pievienošanas barībai ietekme uz uzkrātajiem taukiem, brīvo glicerīdu un elpošanas apmaiņas koeficientu mušām, kas audzētas plēsēju klātbūtnē. (d) Serotonīna pievienošanas barībai ietekme uz Akt fosforilāciju, piruvāta līmeni, uzkrātajiem taukiem, brīvo glicerīdu, ATF un RER mušām, kas audzētas plēsēju klātbūtnē. Visos gadījumos: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ , n.s. — nav nozīmīgs. C — kontrolē, P — plēsēju klātbūtnē audzētas mušas.

### 3.7 Serotonīns uzlabo vielmaiņas disfunkciju (III)

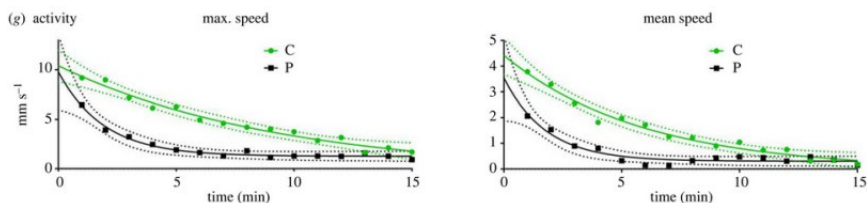
Reakcijas uz ārējiem kairinājumiem, ko izraisa dažādas stresa situācijas, bieži vien tiek realizētas pateicoties izmaiņām neurotransmiteru koncentrācijā. Serotonīna disfunkcija ir tieši saistīta ar neiroloģisko stresu, kas var izraisīt dažāda veida traucējumus. Piemēram, mušu līnija *w<sup>1118</sup>*, kam ir mutācija *white* gēnā un ievērojami pazemināts serotonīna līmenis salīdzinājumā ar sarkano acu līnijām (Borycz et al., 2008; Sitaraman et al., 2008), uzrādīja būtiski atšķirīgu vielmaiņu ( $n = 10$ ). Tas varētu norādīt, ka serotonīns kā starpnieks starp plēsēju stresu un uzvedību, ietekmē dažādus mušu vielmaiņas procesus.

Tāpēc rodas jautājums, vai paaugstināts serotonīna līmenis var mazināt plēsēju izraisītos vielmaiņas traucējumus. Mušas tika barotas ar paaugstinātām 5-HTP devām, un tika analizēta to ietekme uz Akt fosforilāciju ( $n = 8$ ), piruvātu

( $n = 8$ ), triglicerīdiem ( $n = 10$ ), brīvo glicerīdu ( $n = 10$ ), ATF ( $n = 10$ ) un RER ( $n = 20$ ) (8. attēls d). Visos gadījumos serotonīna prekursora pievienošana atjaunoja šos parametrus mušām, kas audzētas zirnekļu klātbūtnē, līdz kontroles līmenim, norādot, ka serotonīna sintēzes stimulēšana ir pietiekama, lai novērstu konstatētās vielmaiņas izmaiņas.

### 3.8. Plēsēju izraisīta stresa ietekme uz kustību aktivitāti (III, IV)

Tiek novērots straujš aktivitātes samazinājums mušās, kas audzētas ar zirnekļiem (attēls. 9).



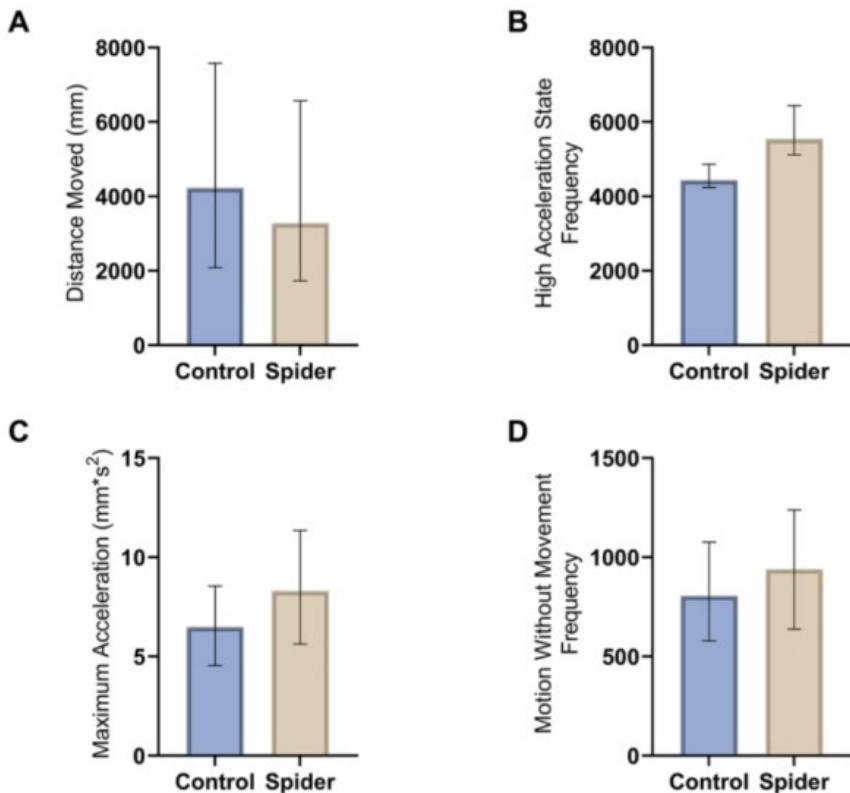
Attēls 9. Nelineāra regresija maksimālajam ātrumam un vidējam ātrumam, kas mērīts 15 minūšu laikā; testa  $P$ -vērtības abos gadījumos ir zemākas par 0,0001. Punkti attēlo vidējās vērtības no 16 (kontrolē) un 23 (plēsējs) eksperimentiem.

Neatkarīgu paraugu  $t$ -testu  $P$ -vērtības ir 0,00017 vidējam un 0,0047 maksimālajam ātrumam. Pārtrauktās līnijas attēlo 95% ticamības intervālus.

Tika konstatētas būtiskas atšķirības noietajā attālumā ( $\chi^2 = 13,00$ ,  $P = 0,003$ ): kontroles grupas mušas divu stundu laikā veica garākus attālumus ( $5039 \pm 3517$  mm; vidējā vērtība  $\pm$  standartnovirze) salīdzinājumā ar eksperimentālās grupas mušām ( $4403 \pm 3443$  mm) (10. attēls A).

Bija noteiktas augsta paātrinājumā stāvokļa sasniegšanas biežuma būtiskas atšķirības ( $\chi^2 = 53,376$ ,  $P < 0,001$ ), kā arī maksimālā paātrinājumā atšķirības starp grupām ( $\chi^2 = 119,82$ ,  $P < 0,001$ ). Kontroles grupas mušas augsta paātrinājuma stāvoklī nonāca retāk ( $4781 \pm 1474$  reizes; vidēji  $\pm$  SD) nekā augļu mušas, kas audzētas zirnekļu klātbūtnē ( $5746 \pm 1823$  reizes) (10. attēls B). Kontroles grupas mušas paātrinājuma laikā sasniedza zemāku ātrumu ( $7,807 \pm 5,665$  mm/s<sup>2</sup>; vidējā vērtība  $\pm$  standartnovirze) salīdzinājumā ar mušām, kas audzētas ar zirnekļiem ( $9,829 \pm 8,086$  mm/s<sup>2</sup>) (10. attēls C).

Kontroles grupā kustība bez pārvietošanās bija ievērojami retāk sastopama ( $\chi^2 = 19,183$ ,  $P < 0,001$ ) ( $828 \pm 476$  reizes; vidēji  $\pm$  SD) nekā grupā, kas tika audzēta ar zirnekļiem ( $1005 \pm 654$  reizes) (10. attēls D). Tas liecina, ka mušām, kas audzētas ar zirnekļiem, bija biežākas "mīnāšanās" kustības.



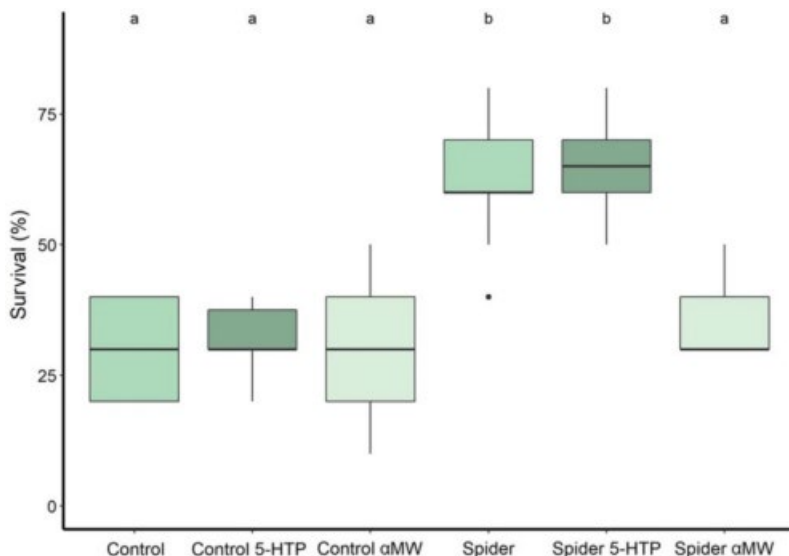
10. attēls. Vidējais attālums kontroles grupā un mušām, kas audzētas ar zirnekļiem divu stundu laikā; atšķirība ir nozīmīga ar  $P < 0.003$  (A). Atšķirība starp kontroles grupas mušām un kopā ar zirnekļiem augušajām mušām augstā paātrinājuma stāvokļa biežumā; atšķirība ir nozīmīga  $P < 0.001$  līmenī (B). Atšķirība starp kontroles grupu un ar zirnekļiem audzētām mušām maksimālā paātrinājuma vērtībās: atšķirība ir nozīmīga ar  $P < 0.001$  (C). Biežums, ar kādu novērota kustība bez pārvietošanās kontroles grupā un ar zirnekļiem audzēto mušu grupā: atšķirība ir nozīmīga ar  $P < 0.001$  (D). Kļūdu joslas ir  $\pm$  SD.

### 3.9 Mušu izdzīvošana plēsēju klātbūtnē (II, III, IV)

Pieaugušo mušu pakļaušana plēsējiem 12 stundu periodā ievērojami ietekmēja to izdzīvošanu. To noteica plēsēju klātbūtnē kāpuru attīstības laikā (divu faktoru ANOVA:  $F_{1,54} = 81,37$ ,  $P < 0,0001$ ), ķīmisko vielu lietošana ( $F_{2,54} = 14,76$ ,  $P < 0,0001$ ), kā arī abu faktoru mijiedarbība ( $F_{2,54} = 12,57$ ,  $P < 0,0001$ ).

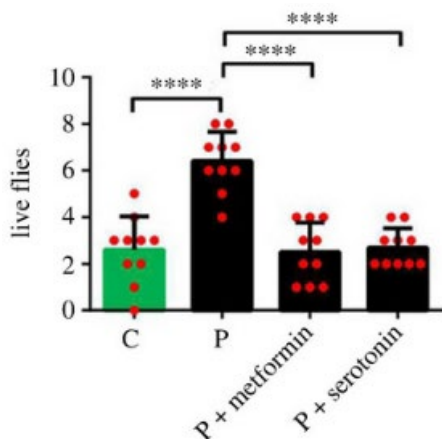
Ievērojami vairāk mušu izdzīvoja, ja tās tika audzētas plēsēju klātbūtnē (vidējā izdzīvošība:  $62\% \pm 11,4\%$  SD,  $n = 10$ ), salīdzinot ar kontroles grupu ( $30 \pm 9,4\%$ ,  $n = 10$ ) (Tukey HSD:  $P < 0,0001$ ; 11. attēls).

Zirnekļu klātbūtnē audzētu mušu barošana ar 5-HTP būtiski neietekmēja to izdzīvošanu ( $65 \pm 8,5\%$ ,  $n = 10$ ) ( $P = 0,985$ ; 11. attēls), savukārt  $\alpha$ MW barošana būtiski samazināja to izdzīvošanu ( $35 \pm 7,1\%$ ) ( $P < 0,0001$ ; 11. attēls). Kontroles grupas mušu izdzīvošanu būtiski neietekmēja ne barošana ar 5-HTP ( $32 \pm 6,3\%$ ,  $n = 10$ ;  $P = 0,998$ ; 11. attēls), ne  $\alpha$ MW ( $30 \pm 15\%$ ,  $n = 10$ ;  $P = 1,00$ ; 11. attēls).



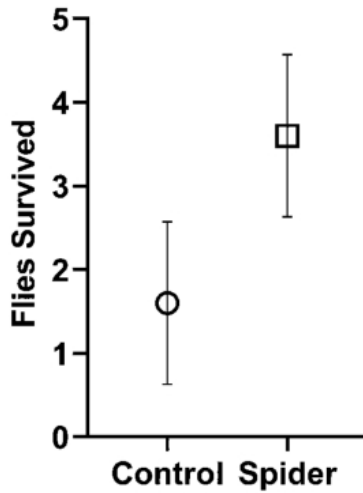
11. attēls. Pieaugušo augļu mušu izdzīvošanas procents 12 stundu ilgā lēcējzirnekļu ekspozīcijas laikā. Mušas, kas audzētas lēcējzirnekļu klātbūtnē, tika pakļautas plēsēju ietekmei kāpuru stadijā, savukārt kontroles grupas mušas tika audzētas bez zirnekļiem. Biezās līnijas norāda mediānu, lodziņi attēlo pirmo un trešo kvartili, un “ūsas” parāda augšējo un apakšējo kvartili, neiekļaujot ekstrēmas novirzes. Melnie punkti norāda uz ekstrēmām novirzēm – datu punktiem, kas atrodas vairāk nekā 1,5 reizes attālumā no interkvartila diapazona no pirmā un trešā kvartila. Eksperimentālās grupas, starp kurām nav statistiski nozīmīgu atšķirību (Tukey HSD,  $P > 0,05$ ), ir norādītas ar vienādiem burtiem attēla augšpusē.

Metabolisma izmaiņas un samazināta lokomotorā aktivitāte var ietekmēt mušu izdzīvošanu. Mušas tika izvietotas kopā ar zirnekļiem (katrā grupā 10 mušu tēviņi un 1 zirnekļis; kopā 10 eksperimentālās grupas), un to izdzīvošana tika novērota 12 stundu laikā. Ievērojami augstāka izdzīvošana tika novērota mušām, kas audzētas ar plēsējiem, salīdzinot ar kontroles mušām (12. attēls). Jāatzīmē, ka metformīna un serotonīna prekursora pievienošana barībai, kas normalizēja metabolisma rādītājus, samazināja plēsēju klātbūtnē audzēto mušu izdzīvošanu līdz kontroles grupas līmenim ( $n = 20$ ). Tas liecina, ka paaugstināta izdzīvošana, reaģējot uz plēsēju klātbūtni, notiek pateicoties metabolisma izmaiņām.



12. attēls. Plēsēju klātbūtnē audzēto kontroles mušu izdzīvošana pēc 12 stundu zirnekļu ekspozīcijas, ar vai bez 5-hidroksitriptofāna vai metformīna pievienošanas barībai. Visos gadījumos: \*\*\*\* $P < 0,0001$ . C — kontrole, P — plēsēju klātbūtnē audzētas mušas.

Pēc serotonīna un vielmaiņas izmaiņu datu apkopošanas tika ievākts liels datu apjoms par kustību raksturu un mušu izdzīvošanu. Tika konstatēts, ka mušas, kas audzētas kopā ar zirnekļiem, 12 stundu eksperimentā izdzīvoja ievērojami labāk ( $\chi^2 = 10,605$ ,  $P = 0,0011$ ) nekā kontroles grupas mušas, kuras kāpuru stadijā audzētas bez zirnekļiem (13. attēls). Vidēji kontroles grupā izdzīvoja  $1,6 \pm 0,97$  (vidējā vērtība  $\pm$  standartnovirze) no desmit mušām, bet grupā, kas audzēta ar zirnekļiem, izdzīvoja  $3,6 \pm 0,97$  (vidējā vērtība  $\pm$  standartnovirze) mušas.



13. attēls. Vidējais skaits, kas no 10 mušām izdzīvoja kontroles grupā un ar zirnekļiem audzēto mušu grupā pēc to pakļaušanas zirnekļu plēsonībai 12 stundu laikā. Atšķirība ir nozīmīga ar  $P = 0.0011$ ; Kļūdu joslas ir  $\pm$  standartnovirze.

## 4. DISKUSIJA

### 4.1 Ģenētisko faktoru un vides ietekme uz *D. melanogaster* fototaktisko mainīgumu (I)

Šajā pētījumā tika pārbaudīta augļu mušu kas dzīvo tropiskajā un boreālajā klimatā gaismas izvēles varbūtība un mainība pēc šīs uzvedības pazīmes. Lai gan visas mušas tika audzētas un testētas identiskos apstākļos, Kenijas augļu mušas nāca no reģioniem ar stabilu un paredzamu klimatu, savukārt Somijas augļu mušas pārstāvēja sugas izplatības ziemeļu robežu, kur klimats ir ļoti mainīgs. Rezultāti parādīja, ka Kenijas mušas kustējās uz gaismu vairāk (augstāka LCP) un individuāli konsekvētāk (zemāka VBE) nekā ziemeļos augušās mušas. Pretēji tam, mušas no ziemeļu platuma grādiem uzrādīja mazāku tieksmi uz gaismu un zemāku individuālo izveļu konsekvenci.

Likmju nodrošināšanas teorija paredz, ka augstāka fenotipiskā dažādība var būt adaptīva apstākļos ar mazāk paredzamu klimatu. Kain et al. (2015) izstrādāja datorizētu pētījumu metodi un modeli, kas norāda, ka šī hipotēze varētu būt īpaši piemērojama *Drosophila* gaismas izvēles uzvedībai. Šī promocijas darba ietvaros veiktā pētījuma rezultāti empīriski apstiprina Kain et al. (2015) modeli, izmantojot mušu līnijas, kas noķertas ģeogrāfiskās vietās ar atšķirīgu klimata mainības pakāpi (Akhund-Zade et al., 2020).

Agrāk veiktie pētījumi liecina, ka mušu laboratorijas līniju ģenētiskā mainība, visticamāk, nespēj izskaidrot fototaktisko reakciju mainīgumu (Kain et al., 2012). Turklāt VBE būtiski atšķīrās starp Austrumāfrikas un Ziemeļeiropas augļu mušām. Tas norāda uz ģenētiskiem faktoriem, kas spēj ietekmēt variāciju apjomu. Jāpiezīmē, ka ir konstatēts vairāku citu *Drosophila* uzvedības formu un reakciju mainīguma ģenētiskais pamats, tostarp tas ir zināms arī par lokomotoro uzvedību (Ayroles et al., 2015) un smaržas izvēles uzvedību (Honegger et al., 2020).

Attiecībā uz fototaksi ir konstatēts, ka gēnam *white* ir svarīga loma metabolisko prekursoru, piemēram, serotonīna, transportvielu regulācijā (Kain et al., 2012). Šajā pētījumā tika novērots ievērojams Kenijas mušu VBE samazinājums, kad tās tika barotas ar  $\alpha$ MW. Savukārt Somijas augļu mušu VBE būtiski samazinājās, barojot tās ar 5-HTP. Tādējādi manipulācijas, kas pazemināja serotonīna līmeni Kenijas mušās un paaugstināja to Somijas mušās, padarīja abu grupu VBE par statistiski līdzīgiem.

Jāatzīmē, ka Kenijas mušu barošana ar 5-HTP VBE būtiski nesamazināja, tāpat kā  $\alpha$ MW barošana būtiski nepalielināja Somijas mušu VBE. Šie rezultāti parāda, ka Kenijas mušām jau ir sasniegts maksimālais efekts (ceiling effect), padarot tās nejutīgas pret papildu serotonīna palielināšanos. Savukārt Somijas

mušu minimālais sākotnējais efekts var izskaidrot to nejutīgumu pret serotonīna inhibitoriem (Lam et al., 1996).

Tomēr pastāv iespēja, ka 5-HT ietekme uz gaismas izvēli un tās mainīguma var būt saistīta ar citiem - neatkarīgiem mehānismiem. Piemēram, neatkarīgie ģenētiskie efekti uz LCP un mainīgumu tika novēroti, deaktivējot gēnu *white* (Kain et al., 2012).

Tika atklāts, ka Somijas mušas uzrādīja augstu fototaksēs VBE, līdzīgi kā tas tika novērots laboratorijas *w<sup>1118</sup>* līnijā (Kain et al., 2012). Šīm mušām ir raksturīgas baltas acis (Green, 1996; Morgan, 1910), ko nosaka gēna *white* mutācija, kas ietekmē centrālo acu pigmentācijas signālkomponenti (Ferreiro et al., 2018). Gēns *white* kodē ATF saistošās kasetes transportieri *white* (Pepling & Mount, 1990), kas heterodimerizējas ar *brown* vai *scarlet* proteīniem, kurus kodē attiecīgi *brown* un *scarlet* gēni, lai transportētu guanīnu vai 5-HTP. Neironos šie transportieri veicina amīnu biosintēzi.

Pierādīts, ka *white* mutantiem ir ievērojami zemāki neirotransmiteru līmeņi, piemēram, serotonīna (samazināts līdz piecām reizēm), dopamīna un histamīna, īpaši glijā un smadzeņu neironos (Borycz et al., 2008; Sitaraman et al., 2008). Šie samazinātie neirotransmiteru līmeņi rada dažādas sekas, ietekmējot vairākus neiroloģiskos fenotipus, tostarp tēviņu miermīlīgo uzvedību (Anaka et al., 2008; Lee et al., 2008; Zhang & Odenwald, 1995), rezistenci pret anestēziju (Campbell & Nash, 2001), agresīvo uzvedību (Hoyer et al., 2008), telpisko atmiņu un smaržu iemācīšanos (Anaka et al., 2008; Diegelmann et al., 2006; Sitaraman et al., 2008), kustīguma atjaunošanās ilgumu pēc anoksijas (Xiao & Robertson, 2016), jutīgumu pret etanolu (Chan et al., 2014), jutīgumu pret noteiktiem taktiliem stimuliem (Titlow et al., 2014) un noslieci uz tīklenes deģenerāciju (Ferreiro et al., 2018).

Lai gan Somijas augļu mušām ir normālas sarkanas acis, to vidējā LCP (68%) un VBE (0,72) bija līdzīgas *white* mutantu vērtībām. Piemēram, *white* mutanti izvēlējās gaismu 61% gadījumu, un to VBE bija aptuveni 0,87. Šie rādītāji bija tuvāki Somijas mušu rādītājiem nekā standarta laboratorijas savvaļas tipa līnijai Canton-S (76% un 0,56) (Kain et al., 2012).

Iespējams, ka Somijas un *w<sup>1118</sup>* mušu uzvedības mērījumus ir ietekmējuši vairāki faktori vienlaicīgi. Tika atklāts, ka 5-HTP ievērojami ietekmēja Somijas mušu VBE, kamēr tas neietekmēja Kenijas mušu VBE. Līdzīgs rezultāts tika novērots arī *w<sup>1118</sup>* un Canton-S mušām (Kain et al., 2012). Šie novērojumi liecina, ka Āfrikas mušu smadzenēs ir augstāka serotonīna koncentrācija, iespējams, pateicoties to daudzveidīgākajiem barības avotiem, kas var saturēt vairāk metabolītu prekursoru nekā Somijas mušām. Triptofāns, kas ir serotonīna prekursors, ir neaizvietojamā aminoskābe, kuru dzīvnieki paši nespēj sintezēt un tāpēc to var iegūt tikai ar barību. Kamēr Āfrikas mušām visa gada garumā ir pieejami dažādi augļi, sēnes un augu sulas, Somijas augļu mušām ir daudz īsāka

vasaras sezona, kas ierobežo trūdošu augļu un sēņu pieejamību (Sardeshpande & Shackleton, 2019). Triptofāna deficīta procedūra ir plaši izmantota, lai pētītu smadzeņu serotonīna funkcijas cilvēkiem (Lam et al., 1996). Šī metode var ātri samazināt smadzeņu triptofāna līmeni cilvēkiem par vairāk nekā 80% dažu stundu laikā (Young et al., 1985), kas var tūlītēji ietekmēt depresijas pacientus (Neumeister et al., 1998; Smith et al., 1997). Šādas izmaiņas var izraisīt uzvedības novirzes, piemēram, samazinātu pārtikas uztņemšanu (Rantala et al., 2018, 2019).

Evolūcijas teorija paredz, ka relatīvā Kenijas klimata stabilitāte veicina ģenētiski determinētas un mazāk mainīgas fototaktiskās preferences, citiem vārdiem sakot, stratēģiju ar mazāk stohastisku likmju nodrošināšanu (Hopper, 1999). Šādā stratēģijā izveidotais vidējais fenotips vienmēr nedaudz atpaliek no vides izmaiņām, jo evolūcija dabiskās atlases ceļā nenotiek uzreiz. Prognozējamā vidē šīs atpalicības seku ietekme uz organismu individuālo ģenētisko pielāgotību (fitness) ir minimizēta. Pretstatā tam, Somijas mušas uzrādīja ievērojami mainīgākas fototaktiskās preferences, kas norāda uz adaptīvu likmju nodrošināšanu, kas saskan ar termiskās preferences uzvedības likmju nodrošināšanas modeļiem (Kain et al., 2015).

Interesanti, ka adaptācijas karstumizturībai var uzlabot arī aukstumizturību (Condon et al., 2014). Tas liecina, ka adaptēšanās ekstremāliem temperatūras apstākļiem ne tikai uzlabo spēju izturēt vidējās temperatūras novirzes, bet arī palielina toleranci pret krasām temperatūras svārstībām. Turklāt spējas izturēt ekstremālas temperatūras tiek uzlabotas populācijās, kas attīstās mainīgā vidē, salīdzinot ar populācijām, kuras dzīvo stabilos augstas temperatūras apstākļos (Condon et al., 2014; Tobler et al., 2015). Augstais Somijas mušu, kuras dabā varētu piedzīvot dažādas temperatūras izmaiņas, VBE var būt vērtējams kā adaptīva stratēģija dzīvei neprognozējamā vidē. Tas ļauj mušām atrast citus savas sugas indivīdus, uzlabo vairošanās spējas un sekmē olu dēšanu dažādos, arī nelabvēlīgos, apstākļos, nevis veicināt paļaušanos uz optimālu apstākļu gaidīšanu, kas var arī neiestāties kādā konkrētajā sezonā. Izmantojot likmju nodrošināšanas stratēģiju, populācijās nepārtraukti piedzimst indivīdi ar plašu preferenču diapazonu visa veida vides apstākļiem. Ja vasara ir vēsāka, izdzīvošanas priekšroku gūs zemākām temperatūrām adaptētie indivīdi, savukārt karstas un garas vasaras gadījumā priekšrocības būs siltumam adaptētām mušām (Bergland et al., 2014). Kawecki (2000) ir ierosinājis, ka ģenētiskās mainīguma fenotipiskā izpausme mainīgas atlases apstākļos var tikt apspiesta, tādējādi samazinot ģenētisko komponenti. Dinamiska serotonīna modulācija, kas mazina mainīgumu, var sniegt iespējamo fototaktiskā fenotipa kanalizācijas mehānismu. Lai pārbaudītu šādu ideju, varētu mērīt mušu, kuras dzimušas karstās un vēsās vasarās, pie sugas izplatības areālu ziemeļu robežām, smadzeņu 5-HT koncentrāciju un VBE. Mūsu rezultāti liecina, ka plastiskas reakcijas uz vides

atšķirībām, kas ir vēl viena svarīgā vides heterogenitātes pārvarēšanai stratēģija, nesniedz ticamu novēroto starp Āfrikas un Eiropas izcelsmes mušu atšķirību izskaidrojumu. Abas mušu populācijas tika audzētas identiskos laboratorijas apstākļos, un nav liecību, ka vides svārstības varētu būt rosinājušas ekoloģiskā un fizioloģiskā plastiskuma stratēģijas.

Lai gan Kain et al. (2012) pētījumā tika novērota būtiska 5-HTP ietekme uz mušu VBE, šī viela neizraisīja gaismas izvēles varbūtības izmaiņas. Savukārt mūsu pētījumā tika konstatēta nozīmīga 5-HTP un  $\alpha$ MW barošanas ietekme uz LCP, kas bija atkarīga no līnijas izcelsmes. Turklāt novērojām, ka LCP bija augstāka Kenijas mušām, kuras izrādīja apmēram 10% lielāku fotopozitivitāti salīdzinājumā ar Somijas mušām. Somijas mušu barošana ar 5-HTP neietekmēja LCP, savukārt barošana ar  $\alpha$ MW to ievērojami samazināja, kas ir pretēji tam, kas tika novērots attiecībā uz VBE šajā grupā. Kenijas mušu LCP, barojot tas ar 5-HTP ievērojami samazinājās, bet barošana ar  $\alpha$ MW to ievērojami palielināja. Tādējādi 5-HTP samazināja Kenijas mušu LCP, kamēr tas neietekmēja šo Somijas mušu rādītāju. Svarīgi atzīmēt, ka kontrolētos apstākļos Kenijas mušas biežāk izvēlējās gaismu nekā Somijas mušas. Tas var liecināt, ka Kenijas mušām, vismaz barojoties ar dabisku uzturu, ir augstāka 5-HT koncentrācija smadzenēs.

Iespējams, ka atšķirīgie serotonīna līmeņi nevar pilnībā izskaidrot šo līniju vidējo LCP, jo iepriekš ziņots, ka serotonīns vai tā prekursors samazina *Begula neiritina* fotopozitivitāti kāpuru stadijā (Pires & Woollacott, 1997). Ir iespējama arī ģenētiskā fona un serotonīna iedarbības mijiedarbība. Tomēr ir zināms, ka dopamīns pastiprina gaismas izvēli (Pires & Woollacott, 1997). *white* mutantiem raksturīga samazināta dopamīna koncentrācija smadzenēs (Borycz et al., 2008; Sitaraman et al., 2008), un, ja Somijas mušu neiromodulatorais stāvoklis ir līdzīgs *white* mutantu stāvoklim, tām varētu būt zemāki dopamīna līmeņi. Tas, savukārt, varētu izskaidrot zemāko LCP, savukārt zemāks serotonīna līmenis varētu izskaidrot augstāku VBE. Kain et al. (2012) konstatēja, ka dopamīnu modulējošas ķīmiskās vielas būtiski neietekmēja ne VBE, ne LCP dažādām augļu mušu līniju grupām, tostarp *white* mutantiem. Tomēr ir pierādīts, ka dopamīns ietekmē melatonīna sintēzi un izdalīšanos (Gonzalez et al., 2020), kas ir galvenais bioloģisko ritmu regulējošais faktors (Arendt & Skene, 2005). Somijas mušu smadzenēs melatonīna sintēze varētu būt traucēta, lai adaptētu to aktivitāti garajām vasaras dienām augstos platuma grādos. Tas norāda, ka boreālo augļu mušu dopamīnam, īpaši tā receptoru apakštīpiem un receptoru blīvumam, būtu jāpievērš īpaša uzmanība turpmākajos pētījumos.

Ir būtiski atzīmēt, ka 5-HT ir melatonīna prekursors (Richter et al., 2000), un tas arī tiek uzskatīts par vielu, kas ietekmē bezmugurkaulnieku fizioloģiskos ritmus, tiem adaptējoties gaismas-tumsas ciklam (Hardeland & Poeggeler, 2003). Kenijas un Somijas mušām, iespējams, ir atšķirīgi diennakts ritmi un miega modeļi. Tropu reģionos, kur dienas un nakts cikli ir relatīvi regulāri, Kenijas

mušām varētu būt konsekventāki miega un aktivitātes ritmi. Savukārt Somijas mušām, kas augstos platuma grādos piedzīvo nepārtrauktu dienas gaismu līdz pat diviem mēnešiem vasarā, šie ritmi var būt ievērojami traucēti. Šīs atšķirības var ietekmēt serotonīna neiromodulāciju, jo melatonīns, kura sintēze parasti tiek aktivizēta tumsā, ziemeļu vasarās var būt maz pieprasīts vai pat netikt metabolizēts. Tas varētu izraisīt paaugstinātu 5-HT līmeni nervu audos. Melatonīns, kā galvenais miega/modrības ciklu regulators, ir zināms arī ar savām spēcīgajām antioksidanta īpašībām un svarīgo lomu bezmugurkaulnieku imūnfunkciju uzturēšanā (Tan et al., 2010). Nakts laikā samazināta melatonīna sintēze ir kaitīga organismu antioksidantu sistēmām (Jones et al., 2015), kas var veicināt likmju nodrošināšanas stratēģijas invazīvām sugām augstos platuma grādos. Šāda stratēģija varētu būt īpaši svarīga Somijas mušām, kurās tiek pārvarētas nepārtrauktās dienasgaismas radītās fizioloģiskās sekas.

Mušas, kas seko likmju nodrošināšanas stratēģijai, var saskarties ar savam uzvedības repertuāram atbilstošiem apstākļiem tikai tad, ja tās izdzīvo ilgāku mūžu mainīgas vides apstākļos. Tādējādi iespējama mijiedarbība starp paaudžu/mūža ilgumu un vides svārstību laika mērogu. Modelēšana liecina, ka likmju nodrošināšanai piemīt adaptīva vērtība, ja tā tiek izmantota mainīgā vidē visā dzīves garumā (Krams et al., 2020). Melatonīns ir antioksidants un var pagarināt mušu mūžu (Teran et al., 2012). Tādējādi tam ir potenciāls ietekmēt evolūcijas uzvedības stratēģijas gan tieši caur neiromodulatoro stāvokli, gan netieši caur ietekmi uz mūža ilgumu. Šīs hipotēzes pilnīga pārbaude pieprasa precīzus augļu mušu 5-HT, melatonīna, dopamīna koncentrāciju un uzvedības mērījumus visā sezonā un to izplatības diapazona dienvienu-ziemeļu gradientā.

#### **4.2. Serotonīnērgiskā regulācija un izvairīšanās no plēsējiem stratēģijas regulācija (II)**

Plēsēju klātbūtne ir zināma kā faktors, kas ietekmē organismu morfoloģiju (Hossie et al., 2010; McCollum & Leimberger, 1997) un rada selektīvu spiedienu uz izvairīšanās spējām (Janssens & Stoks, 2018; Krams et al., 2016; O'Steen et al., 2002). Šajā pētījumā tika konstatēts, ka augļu mušām, kas audzētas plēsēju klātbūtnē, ir mazāk paredzama pagriezienu veikšanas uzvedība salīdzinājumā ar mušām, kas audzētas bez plēsējiem. Tika arī atklāts, ka mušas, kas audzētas plēsēju klātbūtnē, ievērojami labāk izdzīvoja zirnekļu plēsonības apstākļos nekā kontroles mušas. Šie rezultāti liecina, ka lielāka uzvedības mainīguma un zemāka pagriezienu paredzamība, kas novērota ar plēsējiem augušo mušu grupā, varētu būt adaptīva pazīme, kas uzlabo izvairīšanās no plēsēja spējas.

Farmakoloģiskie eksperimenti apstiprina, ka plēsēju klātbūtnes ietekme uz *D. melanogaster* pagriešanās uzvedības mainīgumu un izdzīvošanu tiek regulēta ar serotonīnu — neurotransmiteru (de Bivort et al., 2022). Tomēr šīs

serotonīnērgiskās ietekmes efekti ir novērojami tikai augļu mušām, kas audzētas plēsēju klātbūtnē.

Neparedzama un haotiska uzvedība, īpaši pagriezienos, dažiem kukaiņiem padara tos grūtāk notveramus (Bilecenoğlu, 2005; Eifler & Eifler, 2014; Yager et al., 1990). Tas ir demonstrēts gan eksperimentālajos (Jones et al., 2011), gan modelēšanas pētījumos (Richardson et al., 2018). Daži kukaiņi demonstrē ievērojamas atšķirības izvairīšanās uzvedībā pat tad, ja nav novērojama šīs pazīmes ģenētiska mainība (Schuett et al., 2011). Mūsu rezultāti liecina par saikni starp mazāku uzvedības paredzamību un augstāku izdzīvošanu plēsēju riska apstākļos, īpaši, ja plēsēji piekopj gaidīšanas stratēģiju, kā to dara, piemēram, lēcējzirnekļi.

Viens no izskaidrojumiem ir tāds, ka augšana plēsēju klātbūtnē nodrošina indivīdu ar vides signāliem, ko nevar nodrošināt īslaicīgs kontakts ar plēsējiem pēc attīstības perioda. Iespējams, ka šo signālu ietekmi regulē serotonīnērgiskā neiromodulācija attīstības laikā. Šī ideja saskan ar novērojumu, ka mušas, kas attīstības laikā tika barotas ar  $\alpha$ MW, bet bez plēsēju klātbūtnes, pieaugušā vecumā izrādīja līdzīgas izdzīvošanas sekmes zirnekļu klātbūtnē kā kontroles grupas mušas. Tas liecina, ka augļu mušu individuālā uzvedība nav pilnībā atkarīga tikai no serotonīnērgiskās sistēmas (Maloney, 2021).

Iepriekš veiktie pētījumi ir parādījuši, ka augļu mušas, kas audzētas identiskā laboratorijas vidē, demonstrē plašu dažādību savās fototaktiskajās izvēlēs. Šī mainīguma, kā norāda Kain et al. (2012) un Krams et al. (2021), ir cieši saistīta ar serotonīna regulāciju. Proti, 5-HT sintēzes inhibēšana veicina lielāku fototaktiskās uzvedības mainīgumu, savukārt šajā pētījumā tika novērots, ka serotonīna līmeņa samazināšanās arī mazina pagriezienu uzvedības paredzamību mušām, kas audzētas zirnekļu klātbūtnē.

Fototakses ģeogrāfiskās atšķirības starp augļu mušām korelē ar negatīvu saistību starp serotonīnu un fototakses izvēles mainīgumu. Mušām no ziemeļu reģioniem, kur pārtika ir nabadzīgāka ar serotonīna metaboliskajiem prekursoriem, bija zemāka VBE salīdzinājumā ar mušām no tropu reģioniem (Krams et al., 2021). Šī atklājuma pretrunīgais raksturs, salīdzinot ar iepriekšējiem pētījumiem, kuros serotonīns tika pētīts fototakses kontekstā, liecina, ka 5-HT ietekme uz dažādām uzvedībām var būt atšķirīga atkarībā no neironu tīkliem un uzvedības veida.

Pētījuma rezultāti atbalsta Pantoja et al. (2016) atklājumus par *Danio rerio* pretplēsēju lokomotorajās reakcijās mainīgumu. Šim zivīm tika novērota būtiska atšķirība akustisko izbīļa reakciju biežumā, kas saistīta ar serotonīnērgisko dorsālo *raphe* neironu aktivitāti. Paaugstināts serotonīna līmenis uzlaboja pretplēsēju uzvedības efektivitāti, novēršot pierašanu pie plēsēju stimuliem, kas būtiski uzlaboja indivīdu izdzīvošanu. Šie rezultāti uzsver serotonīnērgiskās signālu nozīmi centrālajā nervu sistēmā un tās lomu uzvedības attīstībā.

Šī promocijas darba ietvaros veiktā pētījuma rezultātiem ir nozīme arī evolucionārajā kontekstā, jo fenotipiskā mainība ir būtiska evolūcijas procesam dabiskās atlases ceļā. Pētījums parāda, ka indivīdi ar līdzīgiem genotipiem, kas audzēti vienādos apstākļos (izņemot plēsēju klātbūtni), var izrādīt ievērojamas atšķirības vienkāršajās uzvedības reakcijās, piemēram, izvēlē starp pagriezieniem pa kreisi un pa labi Y-labirintā. Šīs atšķirības varētu būt saistītas ar smadzeņu asimetriju un neironu aktivitāti, kas ietekmē uzvedības individuālo mainību (Buchanan et al., 2015). Tā kā šīs noslieces ir stabilas, bet atšķirīgas starp indivīdiem, tās tiek dēvētas par personalitāti (animal personality).

Rezultāti norāda, ka augļu mušas var izmantot vienkāršu mehānismu, lai dinamiskā veidā regulētu savu uzvedības individualitāti, kas nodrošina izdzīvošanu mainīgā vidē (Mollá-Albaladejo & Sánchez-Alcañiz, 2021). Tomēr precīzi mehānismi, kas izraisa uzvedības mainīgumu kā atbildi uz vides svārstību, vēl ir jānoskaidro. Uzvedības fenotipi veidojas dažādos bioloģiskās organizācijas līmeņos, ieskaitot plēsēju konstatēšanu, adaptīvu ģenētisko ekspresiju un pat tās stohastiskumu (Honegger & de Bivort, 2018; Li et al., 2017; Raj et al., 2010), radot individuālas un unikālas uzvedības reakcijas (Werkhoven et al., 2021).

Šajā pētījumā tika konstatēts, ka mušas, kas audzētas kopā ar zirnekļiem, demonstrēja samazinātu kustīgumu salīdzinājumā ar kontroles grupas mušām. Iepriekšējie pētījumi liecina, ka plēsēju stresa ietekme *Drosophila* kāpuru attīstības laikā traucē ogļhidrātu metabolismu, inhibējot Akt proteīnkināzi — centrālo glikozes uzņemšanas regulatoru (Krama et al., 2023). Šie metabolisma traucējumi, iespējams, izraisa diabētam līdzīga bioķīmiska un uzvedības fenotipa attīstību. Glikozes izmantošanas traucējumi liek augļu mušām pārorientēt metabolismu uz triglicerīdu patēriņu, kas samazina kustību aktivitāti un varētu būt tiešais iemesls paaugstinātai izdzīvošanai mušām, kas audzētas zirnekļu klātbūtnē.

Šo ideju atbalsta atklājums par to, ka ogļhidrātu metabolisms ir viena no molekulārajām funkcijām, kuru regulē gēni, un kuru ekspresijas mainība nosaka mušu lokomotorās aktivitātes individuālo mainību (Werkhoven et al., 2021). Tomēr mehānisms, kas izraisa mušu ar diabētam līdzīgo fenotipu pagriešanās uzvedības mainīgumu, vēl nav pilnībā izprasts.

Pretplēšēju uzvedība ir sarežģīts reakciju kopums, kurā iesaistīti vairāki neironu signālceļi papildus serotonīnam. Honegger et al. (2020) atklāja, ka gan 5-HT, gan dopamīns ietekmē mušu smaržas izvēles mainīgumu. Ir arī zināms, ka augļu mušas spēj uztvert plēsējus pēc to smaržām (Krams et al., 2021). Citi pētījumi liecina, ka tādi neiromodulatori kā tiramīns, oktopamīns, *npr-1* un *daf-7* arī var ietekmēt dzīvnieku pārvietošanās ātrumu (Omura et al., 2012; Stern et al., 2017). Šie atklājumi norāda, ka turpmākie pretplēšēju reakciju neironu regulācijās pētījumi būtu jāpaplašina, izpētot vairāku neurotransmitoru ietekmi

un to iespējamo mijiedarbību. Eksperimentālās manipulācijas, kas pēta vairāk nekā viena neurotransmitora ietekmi vienlaicīgi, varētu radīt būtisku progresu pētījumos, jo viens neurotransmitors var ietekmēt arī citu neurotransmitoru efektivitāti (Niederkofler et al., 2015; Niens et al., 2017). Papildus tam, reakcijas pret neurotransmitoriem var atšķirties atkarībā no organisma personalitātes (Krams et al., 2018). Šī neurotransmitors sarežģītā mijiedarbība un to specifiskā ietekme uz uzvedības paredzamību padara šo pētījumu jomu īpaši perspektīvu turpmākai izpētei.

### 4.3. Metabolisma un uzvedības adaptācijas plēsonības stresam (III)

Plēsēju ietekme uz upuriem neaprobežojas tikai ar upura nāves izraisīšanu; tā var izraisīt ilgstošas izdzīvojušo indivīdu baiļu reakcijas. Šīs reakcijas bieži izpaužas kā upuru morfoloģisko un fizioloģisko fenotipu izmaiņas attīstības laikā (Hawlena & Schmitz, 2010a, 2010b; Hossie et al., 2010; Krams et al., 2016; Lehmann et al., 2014). Lai gan šīs izmaiņas uzlabo izvairīšanās spējas un izdzīvošanu (Janssens & Stoks, 2014; Krams, 2002), tās var izraisīt ilgstošas negatīvas sekas, tostarp metaboliskus un uzvedības traucējumus (Siepielski et al., 2014; Zanette & Clinchy, 2020).

Pētījumiem par plēsēju izraisīto baiļu ietekmi ir nozīmīga loma pētot psiholoģiskā stresa ietekmi uz vielmaiņas traucējumiem, piemēram, 2. tipa diabētu, un tā saistību ar klīnisko depresiju (Zanette et al., 2019). Pierādīts, ka glikokortikoīdu koncentrācijas paaugstināšana un kateholamīnu izdalīšanās ir saistīta ar insulīna rezistences attīstību (Beaupere et al., 2021). Šajā pētījumā tika konstatēts, ka *Drosophila*, kas audzētas plēsēju klātbūtnē, attīstīja diabētam līdzīgu fenotipu. Tas izpaužas kā nespēja metabolizēt glikozi un metabolisma pārorientēšanās uz triglicerīdu patēriņu.

Šo fenotipu izraisa Akt kināzes aktivitātes samazināšanās, kam ir būtiska loma glikozes transporta regulācijā (piemēram, caur GLUT4 signālceļiem muskuļos) (Huang et al., 2018). Glikozes uzņemšanas uzlabošana, izmantojot metformīnu, atjaunoja sākotnējo metabolisko līdzsvaru mušām, kas tika audzētas plēsēju klātbūtnē.

Plēsēju klātbūtne būtiski maina vides kvalitāti, veicinot adaptīvu izdzīvošanas stratēģiju rašanos. Lai noteiktu/atpazītu plēsējus, piemēram, zirnekļus, *Drosophila* paļaujas gan uz vizuālām, gan ožas signāliem (Flor et al., 2017; Krams et al., 2016). Ir pierādīts, ka šī ožas sistēma ir tik attīstīta, ka mušas spēj dzīvot un reaģēt paaudzēm pilnīgā tumsā (Izutsu et al., 2016). Zirnekļu smaržas pašas par sevi var izraisīt metaboliskas un attīstības izmaiņas (Krams et al., 2016; Krams et al., 2021).

Interesanti, ka  $w^{118}$  mušu redzes spējas joprojām mums nav skaidras, lai gan tām ir pierādīta spēja izmantot vizuālos stimulus Y-labirinta eksperimentos (Buchanan et al., 2015).

Serotonīna sintēzes paaugstināšana antagonizē plēsēju stresa ietekmi uz metabolismu, norādot uz serotonīna centrālo lomu šādā biokīmiskajā regulācijā. Serotonīns regulē ne tikai miera stāvokļa uzvedību (Zhang & Odenwald, 1995), bet arī telpisko atmiņu (Diegelmann et al., 2006), fototaktisko un pagriešanās uzvedību (Krama et al., 2023), kā arī mijiedarbojas ar citiem neirotransmiteriem, piemēram, dopamīnu un oktopamīnu.

Pētījumi parāda, ka serotonīns ir cieši saistīts ar insulīnu sintezējošiem neironiem (Kaplan et al., 2008). Šīs divas neironu sistēmas savstarpēji komunicē, kontrolējot insulīna signālus. Cilvēkiem serotonīna koncentrācijas paaugstināšana uzlabo insulīna jutību un glikozes homeostāzi (Al-Zoairy et al., 2017). Tas liecina par līdzīgu serotonīna-insulīna regulācijas mehānismu arī *Drosophila*.

*Drosophila* nav tieša analoga HPA asij, kas cilvēkiem regulē glikokortikoidu izdalīšanos. Tomēr tās hormonālā sistēma ietver ekdizonu, kas darbojas kā stresa hormons, samazinot glikozes izmantošanu un veicinot lipīdu oksidāciju (Kovalenko et al., 2019). Šis mehānisms ir ļoti līdzīgs cilvēku glikokortikoidu reakcijām uz stresu.

Šī pētījuma rezultāti parāda, ka plēsēju klātbūtnes izraisītie metaboliskie traucējumi var būt adaptīvi, jo tie uzlabo izdzīvošanu, samazinot kustīgumu un taupot enerģiju. Tomēr ilgtermiņa hroniska stresa apstākļos šīs adaptīvās reakcijas izraisa negatīvas sekas, piemēram, samazinātu ATF sintēzi un bada rezistenci.

Lai pilnībā izprastu plēsēju stresa un metabolisko fenotipu attīstības saistību, ir nepieciešami turpmāki pētījumi, kas ietver neironu specifiskus mērījumus un neirotransmiteru kompleksās mijiedarbības analīzi.

#### **4.4. Uzvedības mainīgums un vielmaiņas traucējumi kā reakcija uz plēsonības stresu (IV)**

Šajā pētījumā tika iegūti aptuveni 70 miljoni datu punktu par *D. melanogaster* no divām grupām: mušām, kas kāpuru attīstības laikā nebija pakļautas zirnekļu klātbūtnei ( $n = 839$ ), un mušām, kuras tika audzētas plēsēju stresa apstākļos ( $n = 729$ ). Datu vākšanai tika izmantota augstas caurlaidspējas metode (Kain et al., 2012; Krama et al., 2023). Tika konstatēts, ka īslaicīgs stress palielina oksidatīvo stresu un veicina metaboliskā līdzsvara izmaiņas, pārorientējot enerģijas resursus no anaboliskiem procesiem uz glikogēna uzkrāšanu, tādējādi palielinot ogļhidrātu lomu (Trakimas et al., 2019). Tomēr

hronisks stress, piemēram, plēsēju radītais stress, var izraisīt metaboliskus traucējumus, kas turpinās arī pieaugušā vecumā.

Mušām, kas audzētas kopā ar zirnekļiem, tika novērots samazināts kopējais aktivitātes līmenis. Tas, iespējams, saistīts ar diabētam līdzīgu metabolisko traucējumu attīstību, kas samazina organisma spēju izmantot oglehidrātus. Rezultātā organisms sāk iegūt enerģiju no taukskābju oksidācijas (Krama et al., 2023). Tauku oksidācija, lai gan enerģētiski izdevīga, ir lēnāka salīdzinājumā ar oglehidrātu metabolismu, jo tai nepieciešama oksidatīvā fosforilācija (Brosnan, 1999). Šīs izmaiņas var izskaidrot mušu, kas audzētas ar zirnekļiem, raksturīgo mazāku noieto attālumu un lielāku sākotnējo paaugstinājumu, salīdzinot ar kontroles grupu. Tādējādi šīs mušas izrāda ātrāku enerģijas izsīkumu un mazāk efektīvu tās izmantošanu.

Šī promocijas darba ietvaros veikto pētījuma rezultāti atklāja kustību raksturā būtiskas atšķirības starp abām mušu grupām. Kontroles grupas mušas kustējās mēreni ātri, ar retākiem un zemas intensitātes paaugstinājumiem. Savukārt mušām, kas audzētas kopā ar zirnekļiem, bija raksturīgi bieži, īsi kustību paaugstinājumi, kā arī augstāka kustību intensitāte un "mīnāšanās" jeb ķermeņa kustības bez tā pārvietošanās telpā. Šāda uzvedība var maldināt plēsējus par mušu nākamajām darbībām, piemēram, lidojuma uzsākšanu, tādējādi mazinot to risku tikt notvertām (Card & Dickinson, 2008).

Zirnekļu klātbūtne izraisīja ievērojamas metaboliskas un fizioloģiskas izmaiņas mušu dzīves norisēs. Tika konstatēts, ka mušām, kas izaugušas kopā ar plēsēju, ir paaugstināts ķermeņa slāpekļa (N) saturs, mazāka muskuļu masa un samazināti tauku krājumi (Krams et al., 2016). Šīs izmaiņas, kopā ar paaugstinātu enerģijas avotu izsīkumu un haotiskām kustībām, iespējams, kalpo kā adaptīva stratēģija, kas uzlabo izdzīvošanu plēsēju klātbūtnē.

Šis pētījums parāda, ka ne tikai infekcijas slimības, bet arī hronisks stress var padarīt augļu mušas mazāk pievilcīgas, kā barības avotus, plēsējiem. Turpmākie pētījumi būtu jāveic, lai noteiktu, vai plēsēji aktīvi izvairās no metaboliskus traucējumus piedzīvojošām vai inficētām mušām, un vai šāda uzvedība korelē ar fizioloģiskām izmaiņām. Īpaša uzmanība jāpievērš saiknei starp hronisko stresu, uzvedības izmaiņām un metaboliskām slimībām.

Kopumā šis promocijas darbs atklāj, ka hronisks stress, piemēram, plēsēju radītais stress, var ietekmēt gan uzvedību, gan metabolismu, nodrošinot izdzīvošanai svārstīgas adaptīvas priekšrocības. Tomēr tas notiek par cenu, kas saistīta ar pavājinātu vispārējo fizioloģisko stāvokli (veselību) un enerģētisko efektivitāti.

## SECINĀJUMI

Tika pierādīts, ka plēsēju radītais risks būtiski ietekmē serotonīna signālceļus, kā rezultātā pieaugušu augļu mušu pagriezienu uzvedība kļūva mazāk paredzama. Šī uzvedības neparedzamība, kas tiek izteikta, kā vidējā absolūtā novirze no pagriešanās tendencēm pa labi/pa kreisi, liecina par dinamisku kukaiņu personalitātes īpašību regulāciju, reaģējot uz vides stresoriem, šajā gadījumā — plēsēju klātbūtni. Atklājumi norāda, ka plēsēju klātbūtne agrīnos attīstības posmos palielina augļu mušu izdzīvošanas iespējas, padarot to kustības mazāk prognozējamās, kas, savukārt, apgrūtina plēsēju uzbrukumu precizitāti un sekmīgumu.

Šajā promocijas darbā veikto pētījumu rezultāti liek daudz nopietnāk attiekties pret plēsēju radītā stresa fundamentālo ietekmi uz *D. melanogaster* metaboliskajiem procesiem. Attīstības radītais stress kopā ar plēsēju radīto stresu izraisīja diabētām līdzīgu fenotipu, ko raksturo traucēts ogļhidrātu metabolisms, sistēmiska Akt proteīnkināzes inhibīcija un enerģijas sintēzes pāreja no ogļhidrātu izmantošanas uz taukskābju izmantošanu enerģijas vajadzību apmierināšanai. Šī metaboliskā disregulācija organismam ir kaitīga, jo negatīvi ietekmē to enerģijas bilanci un lokomotoro aktivitāti. Tomēr vidē, kur ir plēsēji, šis bioķīmiskais fenotips nodrošina priekšrocības, kas uzlabo pretplēsēju stratēģiju realizēšanai nepieciešamo uzvedības reakciju adaptīvo raksturu (un, iespējams, uzlabo arī kognitīvās funkcijas), kas nepieciešamas plēsēju izvairīšanās stratēģiju realizēšanai.

Tika atklāts ka mušu barībai pievienotais metformīns un 5-HTP spēj novērst metaboliskos traucējumus, kā arī eliminēt visas ar serotonīnu saistītās pretplēsēju adaptācijas. Tas norāda uz ciešo saikni starp plēsēju izraisītajām metaboliskajām un uzvedības izmaiņām un serotonīna signālceļiem. Šo eksperimentu rezultāti norāda uz iespējām manipulēt ar metaboliskajiem un neurotransmiteru signālkaskādēm, lai ietekmētu uzvedības izpausmes un izdzīvošanas stratēģijas sugām, kas barošanās ķēdēs un trofiskajos tīklos ir plēsēju upuri.

Šī promocijas darba ietvaros veiktie pētījumi skaidri norāda, ka upuru reakcijas uz plēsēju radīto stresu var būt ļoti sarežģītas. Iegūtie rezultāti liecina, ka plēsēju radītā neletālā ietekme neietver tikai tūlītēju izvairīšanos no plēsēja, bet var radīt būtiskas bioķīmiskas un fizioloģiskas izmaiņas. Šīs izmaiņas ir adaptīvas plēsonības riska apstākļos. Tomēr mūsu veiktie atklājumi norāda uz sarežģīto līdzsvaru starp *D. melanogaster* izdzīvošanas stratēģijām un metabolisko veselību. Promocijas darba ietvaros veiktie pētījumi sniedz informāciju par evolūcijas procesu ietekmi uz upuru aizsardzības mehānismiem, un ar tiem saistītajiem fizioloģiskajiem un uzvedības kompromisiem, kas nodrošina adaptācijas dzīvei plēsēju klātbūtnē.

## PATEICĪBAS

Es esmu sirsnīgi pateicīgs mana promocijas darba vadītājam, profesoram Indriķim Kramam. Mans promocijas darbs un līdzšinējā zinātniskā darbība kopumā bija iespējama tikai pateicoties viņa neizsīkstošajam atbalstam un vadībai. Esmu arī ļoti pateicīgs vadošajai pētniecei Tatjanai Kramai par mana pētījuma laboratorijas darbu rūpīgu uzraudzību, motivāciju un apmācību.

Es izsaku pateicību mana promocijas darba publikāciju līdzautoram, profesoram Benjamin L. de Bivort, kura iepriekšējie pētījumi un izpratne bija izšķiroši manas disertācijas ideju attīstībā.

Milzīgs paldies Giedrius Trakimas par ilgstošu un pacietīgu palīdzību mana pētījuma datu matemātiskajā un statistiskajā apstrādē, Colton Bryce Adams par rūpīgu angļu valodas teksta rediģēšanu un Ronaldam Kramam par līdzdalību promocijas darba iesniegšanai nepieciešamo dokumentu sagatavošanā.

Es vēlos pateikties maniem kolēģiem un promocijas darba publikāciju līdzautoriem Priit Jõers, Jorge Contreras-Garduño, Markus J. Rantala, Anne Must, Enno Merivee, Ērikam Šļedevskim, Valdim Mizeram, Diana Bahhir, Vadimam Bartkevičam, Ivetai Pugajevai, Didzim Elfertam un Mārim Munkevicam par produktīvu sadarbību, kas ļāva man attīstīt daudzas prasmes, iemaņas un iegūt jaunas zināšanas.

Vislielākais paldies maniem vecākiem par viņu sniegtajiem padomiem, nepārtraukto enerģiju un atbalstu, kas palīdzēja man izstrādāt un pabeigt promocijas darbu. Esmu pateicīgs manai sievai Alīnai Popovai par sapratni, pacietību un motivāciju, kā arī manam sunim Bruschetta par morālo atbalstu.

Promocijas darba pētījumus finansiāli atbalstīja ESF projekts Nr. 8.2.2.0/20/I/003 un LZP projekts Nr. lzp-2024/1-0437.

Daugavpils University  
Institute of life sciences and technology  
Department of Biodiversity

**SERGEJS POPOVS**

**UNPREDICTABILITY AS AN ADAPTIVE BEHAVIORAL  
CHARACTERISTIC OF PREY: THE CASE OF FRUIT  
FLIES (*DROSOPHILA MELANOGASTER*)**

**NEPROGNOZĒJAMĪBA KĀ UPURA ADAPTĪVĀS  
UZVEDĪBAS PAZĪME: AUGĻU MUŠU (*DROSOPHILA  
MELANOGASTER*) PIEMĒRS**

**Doctoral Thesis**

for obtaining the doctoral degree (Ph. D.) in Natural sciences  
(Biology branch, Ecology sub-branch)

**Promocijas darbs**

zinātniskā doktora grāda (Ph. D.) Dabaszinātnēs iegūšanai  
(Bioloģijas nozarē, Ekoloģijas apakšnozarē)

**Supervisor:**

Dr. biol., Senior researcher, Prof. Indriķis Krams

**Scientific advisor:**

Dr. biol., Senior researcher Tatjana Krama

Daugavpils, 2025

**The thesis was performed:** in Latvia, at Daugavpils University, Institute of Life Sciences and Technology, Department of Biodiversity, Laboratory of Animal Ecology and Evolution in 2019 – 2025.

This thesis was supported by the European Social Fund project Nr. 8.2.2.0/20/I/003 and the Latvian Council of Science project Nr. lzp-2024/1-0437

**Type of work:** doctoral thesis (a set of publications) in Natural sciences, Biology branch, Ecology sub-branch.

**Supervisor:** Dr. biol., Prof. Indriķis Krams

**Scientific advisor:** Dr. biol., Senior researcher Tatjana Krama

**Darba recenzenti/Opponents:**

Dr. biol., Academy of Sciences member, Prof. Īzaks Rašals

Dr. biol., Principal investigator Juan A. Sánchez-Alcañiz

Dr. biol., Senior researcher Uldis Valainis

**The head of the Promotion Council:** Dr. biol., prof. Arvīds Barševskis

**Commencement:** Daugavpils Universitātes Bioloģijas zinātņu nozares promocijas padomes atklātā sēdē 2025. gada 28. aprīlī, plkst. 12:00.

The Doctoral Thesis and its summary are available at the library of Daugavpils University, Daugavpils, Parādes ielā 1, and Daugavpils University website: [www.du.lv](http://www.du.lv).

Comments are welcome. Send them to the secretary of the Promotion Council, Daugavpils, Parādes ielā 1, LV-5401; mob. +37126002593; e-mail: [jana.paidere@du.lv](mailto:jana.paidere@du.lv)

Secretary of the Promotion Council: Dr. biol. Jana Paidere, researcher at Daugavpils University

## LIST OF ORIGINAL PAPERS

This thesis is based on the following papers, which are referred to in the text by their Roman numerals. Original papers are reproduced with permissions from the publishers.

Šis promocijas darbs ir izstrādāts uz šādu tematiski vienotu publikāciju kopas pamata, kas tekstā tiek minētas ar romiešu cipariem. Publikāciju izmantošana promocijas darba tekstā ir saskaņota ar izdevniecībām.

- V. Krams, I. A., Krama, T., Krams, R., Trakimas, G., **Popovs, S.**, Jōers, P., Munkevics, M., Elferts, D., Rantala, M. J., Makṇa, J., & de Bivort, B. L. (2021). Serotonergic Modulation of Phototactic Variability Underpins a Bet-Hedging Strategy in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.659331>
- VI. Krama, T., Munkevics, M., Krams, R., Grigorjeva, T., Trakimas, G., Jōers, P., **Popovs, S.**, Zants, K., Elferts, D., Rantala, M. J., Sledevskis, E., Contreras-Garduño, J., de Bivort, B. L., & Krams, I. A. (2023). Development under predation risk increases serotonin-signaling, variability of turning behavior and survival in adult fruit flies *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2023.1189301>
- VII. Krama T., Bahhir D., Ots L., **Popovs S.**, Bartkevičs V., Pugajeva I., Krams R., Merivee E., Must A., Rantala M.J., Krams I., Jōers P. (2023). A diabetes-like biochemical and behavioral phenotype of *Drosophila* induced by predator stress. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 290(2002): 20230442. DOI: 10.1098/rspb.2023.0442.
- VIII. **Popovs, S.**, Munkevics, M., Krama, T., Krams, R., Sledevskis, E., Trakimas, G., Zants, K., Grigorjeva, T., Mizers, V., Kolbjonoks, V., Jōers, P., & Krams, I. (2024). Explaining the survival of the sickest: Altered walking patterns are linked with improved adult survival in *Drosophila melanogaster* grown with predators during larval development. *Behaviour*, 161(2), 133–148. <https://doi.org/10.1163/1568539X-bja10254>

### The author's contribution to the papers:

- I PUBLIKĀCIJA
  - apmēram 35 % no visa darba apjoma
- II PUBLIKĀCIJA
  - apmēram 30 % no visa darba apjoma
- III PUBLIKĀCIJA
  - apmēram 40 % no visa darba apjoma
- IV PUBLIKĀCIJA
  - apmēram 55 % no visa darba apjoma

## CONTENTS

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| LIST OF ORIGINAL PAPERS.....                                                                           | 53 |
| Approbation of research results at international scientific conferences:.....                          | 56 |
| 1. INTRODUCTION .....                                                                                  | 59 |
| 1.1. Mechanisms of phenotypic adaptation to fluctuating environments.....                              | 59 |
| 1.2. Bet-hedging.....                                                                                  | 59 |
| 1.3. Behavioral and metabolic consequences of stress.....                                              | 60 |
| 1.4. Serotonin drives predictability .....                                                             | 61 |
| 1.5. Aims and goals of the thesis .....                                                                | 62 |
| 2. MATERIALS AND METHODS.....                                                                          | 64 |
| 2.1. <i>Drosophila</i> husbandry and food formulations (I, II, III, IV).....                           | 64 |
| 2.2. Drug treatments (I).....                                                                          | 64 |
| 2.3. Neurotransmitter treatments (II) .....                                                            | 65 |
| 2.4. Feeding experiments (III).....                                                                    | 65 |
| 2.5. Survival under predation (II, III, IV) .....                                                      | 66 |
| 2.6. Starvation tolerance measurements (III) .....                                                     | 66 |
| 2.7. Phototaxis equipment (I).....                                                                     | 67 |
| 2.8. Turning behavior (II) .....                                                                       | 67 |
| 2.9. Behavioral assays (III) .....                                                                     | 68 |
| 2.10. Mobility parameters of fruit fly walks (IV) .....                                                | 68 |
| 2.11. Fruit fly motions without movements (IV) .....                                                   | 70 |
| 2.12. Western analyses (III) .....                                                                     | 70 |
| 2.13. Metabolite analyses (III) .....                                                                  | 71 |
| 2.14. Respiration exchange ratio measurements (III).....                                               | 72 |
| 2.15. Data analysis and statistical methods (I, II, III, IV) .....                                     | 73 |
| 3. RESULTS.....                                                                                        | 75 |
| 3.1 Light-Choice Probability (I).....                                                                  | 75 |
| 3.2 Variability Beyond Expectation (I, II) .....                                                       | 76 |
| 3.3 Handedness and the number of turns in the y-maze (II) .....                                        | 78 |
| 3.4 Predator stress induces a catabolic shift towards lipid oxidation (III) ...                        | 80 |
| 3.5 Predator stress reduces overall energy levels (III) .....                                          | 82 |
| 3.6 Glucose uptake is inhibited (III) .....                                                            | 82 |
| 3.7 Serotonin complements metabolic dysfunction (III).....                                             | 83 |
| 3.8 Effects of predator-induced stress on movement activity (III, IV).....                             | 84 |
| 3.9 Survival of flies under predation (II, III, IV) .....                                              | 85 |
| 4. DISCUSSION.....                                                                                     | 89 |
| 4.1 Genetic and environmental influences on phototactic variability in <i>D. melanogaster</i> (I)..... | 89 |
| 4.2. Serotonergic regulation of predator-evasion tactics (II).....                                     | 93 |
| 4.3. Metabolic and behavioral adaptations to predator stress (III).....                                | 96 |

|                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.4. Behavioral variability and metabolic disorders as responses to predator stress (IV) ..... | 100 |
| CONCLUSIONS .....                                                                              | 103 |
| ACKNOWLEDGEMENTS .....                                                                         | 104 |
| REFERENCES.....                                                                                | 105 |

### Approbation of research results at international scientific conferences:

1. Spanish Drosophila Meeting 2024, Sant Joan d'Alacant, Spain.  
Stenda referāts/poster “A diabetes-like biochemical and behavioral phenotype of *Drosophila* induced by predator stress”.  
Krams I., Krama T., **Popovs S.**, Krams R., Jõers P.
2. Latvijas Universitātes 82. Starptautiskā zinātniskā konference, Rīga, Latvija.  
Mutisks ziņojums/talk “Altered walking patterns connection with improved survival in fruit flies (*Drosophila melanogaster*) grown with predators during larval development”.  
Kolbjonoks V., **Popovs S.**, Munkevics M., Krama T., Krams R., Sledevskis E., Trakimas G., Zants K., Grigorjeva T., Mizers V., Joers P., Indriķis Krams.
3. Latvijas Universitātes 82. Starptautiskā zinātniskā konference, Rīga, Latvija.  
Mutisks ziņojums/talk “Link between serotonin concentration changes and the lateral movements of fruit flies (*Drosophila melanogaster* Meigen, 1830)”.  
Grigorjeva T., Kotova A., Maļutina V.V., Krama T., **Popovs S.**, Munkevics M., Zants K., Krams R., Joers P., Trakimas G., Krams I.
4. 27th European Drosophila Research Conference, Lyon, France.  
Stenda referāts/poster “Fear Me Not: Adaptive Metabolic and Behavioural Responses to Predator-Induced Stress in *Drosophila melanogaster*”.  
Munkevics M., Krama T., **Popovs S.**, Krams R., Zants K., Grigorjeva T., Krams I.
5. Daugavpils Universitātes 65. starptautiskā zinātniskā konference, Daugavpils, Latvija.  
Mutisks ziņojums/talk “Biochemical and behavioral phenotype of fruit flies (*Drosophila melanogaster* Meigen, 1830) induced by predator stress”.  
**Popovs S.**, Krama T., Bahhir D., Ots L., Bartkevičs M., Pugajeva I., Grigorjeva T., Munkevics M., Zants K., Krams R., Merivee E., Must A., Rantala M.J., Krams I., Joers P.

6. Daugavpils Universitātes 65. starptautiskā zinātniskā konference, Daugavpils, Latvija.  
Mutisks ziņojums/talk “Effects of predator presence and 5-HT signaling on behavioral lateralization and survival in *Drosophila melanogaster*”.  
Trakimas G., Krama T., Munkevics M., Krams R., Grigorjeva T., Joers P., **Popovs S.**, Zants K., Sledevskis E., de Bivort B.L., Krams I.
  
7. Daugavpils Universitātes 65. starptautiskā zinātniskā konference, Daugavpils, Latvija.  
Mutisks ziņojums/talk “What is personality?”.  
Krams I., **Popovs S.**, Krams R., Zants K., Munkevics M., Trakimas G., Grigorjeva T., Sledevskis E., Krama T.
  
8. Daugavpils Universitātes 65. starptautiskā zinātniskā konference, Daugavpils, Latvija.  
Mutisks ziņojums/talk “The effect of serotonin concentration changes on the lateral movements of fruit flies (*Drosophila melanogaster* Meigen, 1830)”.  
Grigorjeva T., Kotova A., Maļutina V.V., Krama T., **Popovs S.**, Munkevics M., Zants K., Krams R., Joers P., Krams I.
  
9. Latvijas Universitātes 81. Starptautiskā zinātniskā konference, Rīga, Latvija.  
Mutisks ziņojums/talk “Phototactic behavior of fruit flies (*Drosophila melanogaster* Meigen, 1830) study with the automated system”.  
Grigorjeva T., Maļutina V.V., Kotova A., Krama T., Munkevics M., **Popovs S.**, Krams R., Krams I.
  
10. 11th International Conference on Biodiversity Research, Daugavpils, Latvija.  
Mutisks ziņojums/talk “Threat of predation alters *Drosophila melanogaster* movement patterns”.  
**Popovs S.**, Munkevics M., Trakimas G., Krama T., Krams R., Grigorjeva T., Krams I.
  
11. 11th International Conference on Biodiversity Research, Daugavpils, Latvija.  
Mutisks ziņojums/talk “Use of automated system to study the effect of serotonin concentration changes on the behaviour of fruit flies (*Drosophila melanogaster* Meigen, 1830)”.  
**Popovs S.**, Munkevics M., Trakimas G., Krama T., Krams R., Grigorjeva T., Krams I.

- Grigorjeva T., Maļutina V.V., Kotova A., Krama T., Munkevics M., **Popovs S.**, Krams R., Krams I.
12. The evolution of personality in animals and humans, Erice, Italy.  
Mutisks ziņojums/talk “High-throughput devices to study serotonin-dependent phototactic personality, behavioral lateralization, and explorative activity in *Drosophila melanogaster*”.  
Krams I., Krama T., Krams R., **Popovs S.**
  13. The evolution of personality in animals and humans, Erice, Italy.  
Stenda referāts/poster “Serotonergic Modulation of the Variability in Phototactic Personality Underpins a Bet-Hedging Strategy in *Drosophila Melanogaster*”.  
**Popovs S.**, Krams I., Krama T.
  14. Daugavpils Universitātes 63. starptautiskā zinātniskā konference, Daugavpils, Latvija.  
Mutisks ziņojums/talk “Neurotransmitter Serotonin Acts as a Suppressor of Phototactic Choice Variability in *Drosophila Melanogaster*”.  
Krams R., **Popovs S.**, Krams I., Krama T., Munkevics M., Elferts D., Makna J.
  15. Latvijas Universitātes 79. Starptautiskā zinātniskā konference, Rīga, Latvija.  
Mutisks ziņojums/talk “Predator Stress Represses Systemic Glucose Use Through Serotonin-Dependent Effect”.  
Krams I., Krams R., **Popovs S.**, Munkevics M., Krama T., Joers P.
  16. Latvijas Universitātes 79. Starptautiskā zinātniskā konference, Rīga, Latvija.  
Mutisks ziņojums/talk “Spider Odors Induce Changes in Body Carbon and Nitrogen Concentrations in *Drosophila Melanogaster*”.  
Munkevics M., Krams R., **Popovs S.**, Krams I.

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. Mechanisms of phenotypic adaptation to fluctuating environments

Populations of organisms are constantly exposed to numerous variable biotic and abiotic factors. Organisms and their populations must respond to these ever-changing conditions by evolving various adaptations and survival strategies to process the information on environmental variability, react appropriately to increase fitness and avoid extinction. Three main mechanisms of phenotypic adaptation include adaptation through the continual natural selection on heritable variations (adaptive tracking), adaptive phenotypic plasticity, and bet-hedging. Charles Darwin suggested adaptive tracking as a survival mechanism more than a century ago (1859). Although this mechanism improves the viability of populations, it has some limitations regarding the individual level. Even though standing genetic variation of most traits can be successfully maintained by a balance between mutation and selection, acquiring novel traits is a relatively slow process when the rate of environmental change is high (Tufto, 2015).

Plasticity is another form of phenotypic adaptation. The phenotypic traits of organisms develop under the influence of genetic and environmental factors and their combinations. Ecological/physiological plasticity is considered a highly flexible mechanism. However, it also has some limitations in providing organisms with resistance to environmental and evolutionary factors. The main problem arises because plasticity is developed by the interaction between genes and the environment during development. In contrast, natural selection occurs in another environment sometime after development (Gavrilets & Scheiner, 1993). A third form of phenotypic adaptation is bet-hedging, which is a risk-spreading strategy to diversify phenotypes in a population randomly (Morawska et al., 2022). Although adaptive plasticity and bet-hedging are sometimes considered two competing survival and reproductive strategies under conditions of environmental heterogeneity (Draghi, 2023), the three mechanisms of phenotypic adaptation to fluctuating environments may co-occur.

## 1.2. Bet-hedging

The environment is rarely stable, requiring complex strategies for organisms to optimize chances of survival and reproductive success. When critical factors such as temperature, precipitation, food resources, and predation threat exhibit high levels of variability, critical processes such as reproduction and offspring development are at risk. This defines a bet-hedging approach: rather than investing all resources in a single strategy that may fail when conditions change, organisms spread their risks to improve the overall chance of

success over time (Chirgwin et al., 2015; Merilä & Hendry, 2014; Trakimas et al., 2019).

Bet-hedging is not limited to reproductive strategies; it can be applied to a variety of traits, including all kinds of behavior. For example, organisms can vary their behavior so that it appears unpredictable, thereby reducing the chances of negative impacts from unfavorable changes in the environment, such as temperature- or predation-induced stress. Thus, behavioral flexibility can be considered as an adaptive response to environmental uncertainty (Olofsson et al., 2009; Siepielski et al., 2017).

### **1.3. Behavioral and metabolic consequences of stress**

Predation is not reduced to the simple death of individual prey, but can induce long-lasting fear effects in large numbers of surviving individuals (Hossie et al., 2010; Lehmann et al., 2014). Fear stimulates fleeing and hiding behaviors, yet these changes in response indicate morphological and physiological changes occurring in the prey (Janssens & Stoks, 2014). Stress disorders following non-lethal encounters with predators have long-term and costly consequences (Zanette et al., 2019). Certainly, behavior and phenotype changes do follow metabolism, and we can relate here to studies of stress in humans. The underlying mechanisms of interaction are not clear, but it is known that chronic stress leads to the development of insulin resistance (Beaupere et al., 2021). For *Drosophila melanogaster*, this means switching the organism to other biochemical patterns, where a reduced ability to metabolize glucose (the main energy source for flies) forces a switch to increased fat consumption. Our studies have shown that this is due to a dramatic decrease in the activity of the central regulatory kinase Akt, an enzyme that plays an important role in glucose uptake (Huang et al., 2018).

The fact that glucose does not enter tissues capable of processing it may be an adaptation creating memories at the biochemical level and preparing for future stresses (Rooszendaal, 2002). However, chronic suppression of glucose utilization due to stress, switches systemic metabolism to fat usage (Tennessen et al., 2011). Loss of metabolic flexibility leads to decreased fitness due to reduced ATP production and poor resistance to nutritional deficiencies.

Metabolic disorders necessarily lead to changes in locomotor activity. Yet it is not only the intensity of movements to conserve energy that changes dramatically, but the whole pattern of walking and even standing in place. The measured movement has been replaced by sudden and short sprints, and the resting stops have changed their character. Unexpectedly, during rest periods, flies subjected to chronic predation stress expended a great amount of energy on senseless chaotic movements rather than preparing for the next dash. This reflects morbid changes in physiology characterized by a variety of coordinated

symptoms such as anxiety, chaotic grooming behavior, and inability to concentrate (Hart, 1988).

It is traditionally believed that predators prefer easy prey: young, inexperienced or sick individuals (Genovart et al., 2010). In contrast, our studies have shown that despite the counterintuitive sickness-resembling behavior of *Drosophila* with high levels of stress, their survival rate is much higher than in control groups. This may be because the randomness of prey movements gives predators many false signals for immediate future actions (Bilecenoglu, 2005; Card & Dickinson, 2008; Eifler & Eifler, 2014; Yager et al., 1990). It can also be hypothesized that some predators are selective in avoiding infected prey (Gutierrez et al., 2022; Hamilton & Zuk, 1982; G. A. Jones et al., 2005; Meyling & Pell, 2006).

#### **1.4. Serotonin drives predictability**

Bet-hedging might be a key strategy for adapting to environmental changes and predation threats, and we were able to establish that serotonin plays a particularly important role in this process. Observations have shown that serotonin regulates the predictability of light choices, a crucial behavior that allows flies to respond to unpredictable conditions. Evolutionary modeling suggests that this variability in behavior may not be random, but a deliberate survival strategy in which serotonin levels in the flies' brains adjust their ability to adapt (Kain et al., 2015).

This is extremely important in a variable climate, but potentially even more important when threatened by predation. Exposure to predators during critical developmental periods leads to changes in serotonergic signaling, which increases behavioral variability and potentially increases survival (Krama, et al., 2023; Maloney, 2021). This highlights how serotonin not only affects mood and general behavior, but is also critical for specific behavioral responses to avoid predators.

We hypothesize that serotonin plays a central role in the association between neurochemistry and metabolism. Serotonin has multiple biological functions in *Drosophila*: it regulates courtship behavior, affects spatial memory and olfactory learning, and influences phototactic and turning behavior (Anaka et al., 2008; Diegelmann et al., 2006; Kain et al., 2012; Zhang & Odenwald, 1995). It is also involved in several pathways that overlap with the roles of other neurotransmitters such as dopamine and octopamine (Kaplan et al., 2008). The roles of serotonin in neuronal networks are extremely diverse and can even be redundant, and its effects on metabolism have an unusual mechanism underlying them. Serotonergic neurons are closely adjacent to insulin-producing neurons, and these two systems exist in constant interaction (Al-Zoairy et al., 2017).

Increased serotonin levels have a favorable effect on metabolic balance, improving glucose homeostasis and increasing the amount of energy available. Also, through its effect on metabolism, serotonin can increase the chances of survival in the event of starvation.

Still, research on altered walking and survival patterns reveals an additional layer of adaptations that arise in response to predation. Reduced serotonin levels cause major changes in behavioral patterns. Decreased speed, extended stopping times, and unpredictability may reduce visibility to predators, improving chances of survival. Thus, serotonin serves as a regulator of a spectrum of adaptations from metabolic changes to behavioral strategies, highlighting its role as a critical mediator in adapting to changing environmental conditions and predation.

### 1.5. Aims and goals of the thesis

The main aim of the thesis is to investigate whether unpredictability can be considered an important adaptive strategy used by prey to avoid predation and what is the central mechanism controlling this characteristic.

*D. melanogaster* exhibits high inter-individual diversity in phototactic behavior. The first objective of this thesis was to investigate a possible link between choice unpredictability and serotonin (I) regulation. We took advantage of the fact that the fruit fly inhabits a wide variety of regions around the world and tested how populations living in different climates make light or dark phototactic choices. The basic assumption was that flies living in stable climates would exhibit high predictability of behavior and high levels of serotonin. Consistent with our expectations, serotonin inhibitors increased the variability of choices in flies reared in stable equatorial climates.

Variable climatic conditions can be a tremendous stressor for organisms, but in the natural environment they also face other stressors throughout their lives, the main one being predation. A second thesis objective was to test whether predictability of behavior changes in flies exposed to non-lethal predation stress early in life (II). We predicted that flies could exhibit high variability in the choice of movement direction and that this behavior could enhance survival when directly exposed to a predation threat. We also expected that these processes are controlled through serotonin signaling.

Chronic stress is known to affect the metabolism of animals. *Drosophila* serotonergic neurons are located extremely close to insulin-producing neurons, so the next thesis objective was to find out how strongly both stress and serotonin deficiency might affect the metabolism of fruit flies (III). We predicted that serotonin would prove to be a key element in the regulation of glucose metabolism, which would affect *Drosophila* fitness. We also hypothesized that

predation would reduce resistance to hunger conditions and available energy for utilization.

High levels of individuality, unpredictability in directional choices, and reduced energy availability are supposed to cause changes in behavioral patterns. The next goal of the thesis was to understand exactly how the movements of chronically stressed *Drosophila* change and why this has a positive effect on survival (IV). Based on data from previous experiments, we predicted a decrease in overall *Drosophila* activity. However, an unexpected finding was the data on resting behavior of flies - they expended considerable resources on meaningless chaotic movements. We hypothesized that in this way the prey gives the predator a large number of false signals about its future movements and thus becomes less predictable and conspicuous, which increases the chances of survival.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. *Drosophila* husbandry and food formulations (I, II, III, IV)

The study utilized wild strains Oregon-R-modENCODE (no. 25211) and *w<sup>1118</sup>* of *D. melanogaster*, sourced from the Bloomington Drosophila Stock Center, Indiana, USA. The flies were maintained in incubators set to  $23 \pm 1$  °C with a 12:12 h light-dark cycle to simulate natural conditions.

To facilitate breeding, 10 female and 5 male flies were placed together in vials measuring  $24.5 \times 95$  mm. These vials were filled with 18 ml of a specially prepared food mixture, allowing the flies to copulate and lay eggs for a 24-hour period.

The food for the *Drosophila* consisted of a mixture combining 500 ml water, 20 g dextrose, 15 g sucrose, 10 g brewer's yeast, 35 g cornmeal, and 4.5 g agar. To prevent mold growth, 12.5 ml of a 10% Tegosept (methyl-p-hydroxybenzoate) solution was added. For certain experimental groups, the food was supplemented with metformin or 5-hydroxytryptophan (5-HTP, a precursor of 5-HT synthesis) at concentrations of 20 mM and 5%, respectively, after the mixture cooled to below 65 °C.

Vials containing *Drosophila* eggs were positioned within plastic jars (10 cm height  $\times$  12 cm diameter). In experimental setups involving predation, each jar housed a pirate otter-spider (*Pirata piraticus*), allowing it to freely enter the vials and predate on the *Drosophila* larvae.

For biochemical analyses, adult flies were collected within 5-7 hours post-imaginal eclosion and subsequently stored at -80 °C. Flies intended for behavioral assays were utilized within 2-3 days following eclosion.

The rate of feeding was assessed by providing flies with food supplemented with Blue FCF dye. Spectrophotometric analysis of homogenates was used to quantify dye uptake, indicating the amount of food consumed. Flies were initially recovered from CO<sub>2</sub> exposure in standard food bottles before being transferred to food with or without dye supplementation. The absorbance of the supernatant from homogenized flies was measured at 650 nm, with values from flies on dye-free food serving for background subtraction.

### 2.2. Drug treatments (I)

We had three experimental groups per geographic location: flies (males and females) grown without any drugs, flies grown on food supplemented with 5-HTP and flies grown on food supplemented with  $\alpha$ -methyl-tryptophan ( $\alpha$ MW, a serotonin-synthesis inhibitor) (Dasari et al., 2007; Dierick & Greenspan, 2007; Hu et al., 2020; Majeed et al., 2016; Neckameyer, 2010; Ries et al., 2017). Drugs

were dissolved in Formula 4–24 instant *Drosophila* media. For the drug-feeding, F0 flies laid eggs in drug-containing media. Upon eclosion, adult F1 flies were assayed on days 2–3. The drug stock solutions were vortex-mixed and added to food powder. The final concentration of 5-HTP was 50 mM and the final concentration of  $\alpha$ MW was 20 mM (Huber, 2004; Kain et al., 2012).

### 2.3. Neurotransmitter treatments (II)

We had two main experimental groups of *D. melanogaster*: flies grown together with predators and flies grown with no predators; each of these two groups was further divided into three subgroups: flies raised on food supplemented with 5-HTP, flies grown on food supplemented with  $\alpha$ MW, and flies grown without any drugs (Dasari et al., 2007; Dierick & Greenspan, 2007; Hu et al., 2020; Krams et al., 2021; Majeed et al., 2016; Neckameyer, 1996; Ries et al., 2017). The drug stock solutions were vortex-mixed and added to food powder. 5-HTP and  $\alpha$ MW were dissolved in Cal Tech instant media (United States Biological, Salem, MA, USA). The final concentration of 5-HTP was 50 mM, and the final concentration of  $\alpha$ MW was 20 mM (Kain et al., 2012; Krams et al., 2021). The flies were 5–7 days old at the moment of behavioral experiments. Dierick and Greenspan (2007), by using HPLC, showed that 5-HTP feeding significantly increases the brain 5-HT within 3 days of treatment, while  $\alpha$ MW significantly decreases the amount of brain 5-HT during 4 days of treatment. Honegger et al (2020) confirmed similar effects ( $\sim 8\times$  reduction of 5-HT with  $\alpha$ MW treatment;  $\sim 20\times$  increase with 5-HTP) using ELISA assays.

### 2.4. Feeding experiments (III)

To measure the rate of feeding, food supplemented with blue dye (Blue FCF dye, Acros Organics A0373695, ThermoFisher Scientific) was fed to flies. The amount was quantified spectrophotometrically from homogenate. For each experiment, 140 flies from the control condition and 140 from the predator-stress condition were placed in two separate standard food bottles, and allowed to recover overnight from CO<sub>2</sub> exposure. On the next day, the flies were transferred without gas either to a new standard food or to food supplemented with 1% Blue FCF dye. After 1.5 h, 20 flies were collected and homogenized on ice by grinding in a mortar and pestle in 800  $\mu$ l phosphate-buffered saline (PBS). Debris was pelleted at 10 000 gmax for 10 min at 4 °C, and 400  $\mu$ l of each supernatant was transferred to 2 wells (200  $\mu$ l each) of 96-well plates. Absorbance was measured at 650 nm, and values from lysates of flies kept on food without Blue FCF were used for background subtraction.

## 2.5. Survival under predation (II, III, IV)

To investigate the impact of predation and pharmacological manipulation on the survival of *Drosophila*, we structured our experimental design around various conditions involving predator exposure and drug supplementation. Our study comprised six experimental groups, assessing the effects of two spider species under three different drug conditions: (1) fruit fly males grown without any spider presence and without any drug treatments, (2) male flies raised without spiders, with food supplemented with 5-HTP, (3) male flies also grown without spider exposure, on food supplemented with  $\alpha$ MW, (4) males raised in the presence of *P. apacheanus* spiders with no drug supplementation, (5) males grown with *P. apacheanus* spiders on 5-HTP supplemented food, and (6) males raised with *P. apacheanus* spiders with food supplemented with  $\alpha$ MW.

For the survival assays, we used ten Plexiglas jars for each experimental group, each jar measuring 10 cm in height and 12 cm in diameter. Each jar housed ten fruit flies, summing up to 480 fruit flies across 48 jars, maintained for 12 hours during daylight time. To simulate predation stress, a single young *P. apacheanus* spider, around 6–7 months old, was placed in each jar along with a vial containing fruit fly food. Spiders had access to water but were deprived of food for approximately 10 hours before the start of the survival tests, ensuring each spider was used only once to maintain consistency.

In parallel, to assess the adaptive value of a diabetes-like phenotype under predatory conditions, we established 20 groups (10 experimental and 10 control), each comprising 10 male *Drosophila*. These groups were placed in plastic containers measuring 20 cm in width, 10 cm in depth, and 10 cm in height. Similar to the previous setup, each container housed a single predator - either a pirate otter-spider or a wolf spider, referred to in our experiment - and a vial with *Drosophila* food made of cornmeal, dextrose, sucrose, agar, and yeast medium. A layer of filter paper lined the bottom of each container, and the tops were covered with mash. Spiders were subjected to a 12-hour food deprivation period before the trials and provided water before and during the tests to standardize hunger levels. Surviving flies were counted after the 12-hour period to evaluate the effectiveness of the predation pressure and the potential adaptive value of the flies' physiological responses to it.

## 2.6. Starvation tolerance measurements (III)

In the chronic starvation tolerance test, flies were kept on 1% agar in tubes containing 10 individuals. Survival was monitored every 3 h. Death was determined as the last activity time point from the final recorded activity for each fly. In the acute starvation tolerance test, flies were starved on deionized water-

soaked filter paper in tubes containing 10 individuals. The moisture content of the paper was controlled by injecting water with a syringe once a day.

## **2.7. Phototaxis equipment (I)**

We studied the variability of phototaxis behavior in F1 flies. The FlyVac apparatus allowed us to measure the startled phototaxis behavior of many individual fruit flies simultaneously (Kain et al., 2012). The operational details of FlyVac are detailed elsewhere (Kain et al., 2012). In brief, FlyVac is an instrument for the rapid quantification of phototaxis behavior. Up to 32 individual fruit flies were loaded into separate phototaxis modules, each consisting of a phototactic T-maze in which the fly could choose between a light [an illuminated light-emitting diode (LED)] and dark stimulus (a non-illuminated LED). Both branches of the T-maze are equipped with an LED but only one LED is illuminated, at random, in each trial.

To begin a phototaxis session, individual flies are aspirated from its culture vial into the vertical start tube of the T-maze. After insertion, a fly climbs upward through the vertical tube of the T-maze under negative geotaxis until it reaches the choice point of the T-maze. Upon making a choice by entering one of the corridors of the T-maze, the fly is detected by an optical interrupter. This trigger recording the direction of the choice done with respect to the direction of the illuminated stimulus LED and opens a vacuum to pull the fly back into the start tube. In each trial, one LED out of two is lit at random. After completing 40 trials, the phototaxis module is deactivated and the flies are simply contained until removal. In the event that a fly does not complete 40 trials within several hours, that fly is removed from the module and further analyses. Before the trials, we have checked whether the FlyVac apparatus itself was not affecting behavior. We have performed a long series of assays with two LEDs on and with two LEDs off. In both cases, the resulting distributions are statistically indistinguishable from the random binomial distribution.

## **2.8. Turning behavior (II)**

Since using variance as a phenotypic trait requires large sample sizes (Caballero et al., 2021), we used a high-throughput assay to monitor the behavior of individual flies placed into individual Y-mazes (Ayroles et al., 2015; Buchanan et al., 2015). We put flies into an array containing 95 individual Y-mazes consisting of three symmetrical arms (each 12 mm long) fabricated from laser-cut acrylic. Maze arrays were illuminated from below with a grid of 100 white LEDs (5500K, Knema) below acrylic diffusers. Maze arrays were imaged with 2MP digital cameras (Point Gray), and the X-Y positions of each fly's

centroid were automatically tracked and recorded with software custom written in LabView (National Instruments, USA) (Buchanan et al., 2015). We recorded the turning behavior of 3–6-day old flies, the standard age for measuring this behavior, for 2 h. Data from the small portion of individuals making fewer than 30 turns were discarded. Each fly was used only once.

To quantify turning predictability (the variability in turning bias across individuals), we computed the MAD, the median of the absolute deviation from each observation's median (Buchanan et al., 2015), a metric of variability that is robust to outliers. We estimated MAD for each experimental group.

## **2.9. Behavioral assays (III)**

We used sterile Petri dishes molded from clear polystyrene ( $60 \times 15$  mm; Flystuff, El Cajon, USA) as novel arenas to record individual flies' locomotor activity. Only one fly was aspirated into the arena for each test. The locomotor activity of six flies was recorded with the resolution of  $1920 \times 1080$  pixels at 5 frames per second simultaneously by a video-tracking system using the Logitech HD Pro Webcam C920 (Logitech Inc., Newark, CA, USA), fixed at a height of 25 cm above the arenas, and the software Debut Video Capture (NCH Software, Greenwood Village, CA, USA). To shorten the experiment duration, two identical video-tracking systems were prepared, which allowed tracking of 72 flies simultaneously. The video-tracking course was 15 min. We calculated the flies' average speed for each minute. The arenas were illuminated by reflected, diffused light from above by four MR 16 LED lamps (12 V, 6 W, 400 lm, 3000 K) located 0.9 m above the arenas. Illumination at the level of the arenas (3000 lux) was measured by a TES-1335 Digital Light Meter (TES Electrical Electronic Corporation, Taipei, Taiwan). All video recordings were made in the laboratory at between 21 and 22 °C, and 35–40% relative humidity. Distance moved (start speed  $> 0.20$  mm s<sup>-1</sup>; stop speed  $< 0.20$  mm s<sup>-1</sup>) with the temporal bin width of 1 min as the most important locomotor activity parameter was extracted offline from the recorded video files using EthoVision XT Version 11 software (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands). The distances moved were used to calculate the speed, representing the integral values of distances and time.

## **2.10. Mobility parameters of fruit fly walks (IV)**

A plate with Y-shaped mazes was made for this study (Buchanan et al., 2015; Krama, et al., 2023). Each plate consisted of two layers: the first layer was made of solid transparent plastic; the second layer, with 60 mazes carved into it, consisted of black matte plastic to reduce light reflections. Each maze consisted

of three sleeves equally spaced 120 degrees apart, each 3 mm wide and 12 mm long. Each arm ended in a circular turn with a diameter of 5 mm. Each maze was individually closed by a triangle of thin glass projecting above the plate surface. The glass was coated with Sigmacote (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to make it slippery and prevent the flies from turning upside down and walking on the ceiling. The height of each maze was 2 mm. In this way, all the flies had enough space to move freely but could not flip over and reduce their speed because of insufficient adhesion to the surface of the glass. The plate with mazes was illuminated from below through a thick matte plastic to create a contrasting surface for further recording of the movements of each fly. The recording was done in darkness to avoid the light reflections on the glass, which would have obstructed an accurate analysis of the movements. A Basler Ace camera with a 1/1.8" sensor (Basler, Ahrensburg, Germany) and Kowa F1.6/4.4-11 mm optics (Kowa Optimed Germany GmbH, Duesseldorf, Germany) was mounted above the plate. Custom settings were chosen to ensure the highest accuracy and lowest distortion.

Each fly was gently placed in one maze, using a short carbon dioxide anesthesia. All flies were given at least 25 min to adapt after awakening. This was followed by two hours of continuous recording of the walking behavior of fruit flies. Each fly only participated in one trial. The video files were subsequently uploaded to Noldus EthoVision XT v.15.0 (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) and analyzed using the following parameters: Distance Moved (mm), High Acceleration State frequency (see below), Maximum Acceleration ( $\text{mm/s}^{-2}$ ) and Motion Without Movement frequency. These are the most important parameters by which insect movement patterns can be characterized (Nilsson & Renshaw, 2004; Russig et al., 2003; Winberg et al., 1993). For each metric, data was obtained as a mean value per individual fly.

The Acceleration metrics were used to mark bursts of rapid movement. The High Acceleration State was observed when the average acceleration of the object exceeded the  $2.5 \text{ mm/s}^2$  threshold. The threshold value was adjusted by using the EthoVision XT Integrated Visualization tool. We used averaging interval of 2 to remove the effect of random changes in velocity between consecutive samples that would result in false transitions to High Acceleration State. The optimal state duration threshold was defined as 0.5 s and was found using the Integrated Visualization plot (i.e., we did not consider accelerations with a duration of less than half a second). It was used to filter out false readings from the body-point jitter that can be introduced by camera vibrations or minor body motions. The frequency of the High Acceleration state is presented as the median of all values for each group. Readings were recorded for the entire duration of the experiment.

Maximum Acceleration is presented as the median of all values for each group. Before calculating the acceleration, we ensured that the proportion of lost samples was less than 1%.

Distance Moved was determined within 2 h periods. We used a sample rate of 6 data points (according to Noldus). Higher values can lead to false readings and overestimation of the covered distance. On the other hand, small movements of the animal's central point may be missed due to lower values (Pham et al., 2009).

## **2.11. Fruit fly motions without movements (IV)**

Motion Without Movement ("Mobility" in the Noldus software) describes the degree to which an object's body moves without regard to the spatial displacement of the central point. This implies that measurements are taken only when there is no movement of the animal's central point in the horizontal plane. *Drosophila* flies often perform "stomping in place" type behaviors. To describe this motion, calculations do not require x and y coordinates but instead, use the change in the position of individual pixels. This is an important parameter to estimate the degree of an animal's motion regardless of its locomotion along the x and y axes. A classic example of this parameter is animal grooming: although the animal's limbs and body are busy, the animal remains in one place.

We estimated the frequency of Motions Without Movements ("Highly Mobile" according to Noldus) using a threshold of 50% change in the pixel area of the detected subject. We used the default Averaging Interval set to 1 data point, which means that the measures are not smoothed before determining values.

One limitation of Motion Without Movement is that it directly depends on the number of pixels that compose the object under examination and, consequently, on the camera resolution. *Drosophila* is a small object consisting of approx.  $100 \pm 20$  pixels, so we set an extremely high Immobility threshold of 50%. This means that the animal's motion was counted only if 50% of the pixels changed their position. In this way, we excluded the probability of recording false readings. To avoid false readings, we do not report the Immobility metric here.

## **2.12. Western analyses (III)**

Batches of 30 flies were homogenized with a pestle on ice in 300  $\mu$ l of western lysis buffer (PBS with 1.5% Triton X-100) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche Complete Mini no. 11836170001 and PhosSTOP no. 04906845001) following the manufacturer's protocols. Lysates were incubated on ice for 15 min and then centrifuged at 13 000gmax for 15 min at 4 °C to pellet debris. Supernatant protein concentrations were measured using

the Bradford assay (Thermo no. 1856209), and 70 µg aliquots were loaded onto precast Bio-Rad Criterion AnyKD gradient gels. Gels were run in ProSieve EX running buffer (Lonza). Proteins were transferred to Amersham Protran nitrocellulose membrane (no. 10600020) in ProSieve EX transfer buffer (Lonza) at 35 V for 50 min in a BioRad Criterion Transfer chamber. Membranes were incubated in 5% BSA in 1× TBS/0.05% Tween for 1 h for blocking, after which they were incubated overnight at 4 °C in the same buffer with primary antibodies. Antibodies and dilutions used were: Akt 1: 5000 (Cell Signaling no. 9272), phospho-Akt 1: 5000 (Cell Signaling no. 4054), ACC 1: 5000 (Cell Signaling no. 3676), HRP-conjugated anti-rabbit 1: 10 000 (PI-1000-1).

After washing membranes three times for 15 min with 1× TBS/0.05% Tween, they were incubated with anti-rabbit secondary antibody conjugated with horseradish for 1 h at ambient room temperature. After an additional three rounds of washing as before, results were visualized with the BioRad ChemiDoc XR detection system. For quantitation purposes, samples from control and predator-reared flies were run on the same gel with four individual biological replicates per group. When protein amount per lane was used for normalization, membranes were stained with Ponceau S solution (0.1% Ponceau S in 5% acetic acid), rinsed briefly with water, and documented using the BioRad ChemiDoc XR system. The signal was quantified, and the data were analyzed with ImageQuant software.

### **2.13. Metabolite analyses (III)**

For carbohydrate measurements, 10 flies were homogenized in 400 µl of PBS and incubated for 5 min at 70 °C. A total of 40 µl of lysate was transferred to four separate Eppendorf tubes with additions of 1 U of amyloglucosidase from *Aspergillus niger* (Sigma, total glucose measurement), 2× PBS (free glucose and background measurement) and 5 mU of porcine kidney trehalase (Sigma T8778, trehalose measurement). All reactions were incubated for 2 h at 37 °C, after which they were briefly centrifuged, and 30 µl of supernatant was transferred to 96-well microtiter plates. One hundred microliters of Glucose Assay Reagent (Sigma G3293) were added to all reactions except for one PBS-treated lysate mixed with 100 µl of PBS to measure the background signal. Reactions were incubated at 37 °C for 30 min, after which absorption was measured at 340 nm. Free glucose, glycogen and trehalose were calculated by subtracting relevant backgrounds from measured values. A glucose standard curve was generated using 1 to 20 µg of glucose (per well). The results were normalized against protein amount measured with Bradford assay (Thermo no. 1856209).

For triglyceride measurements, 10 flies were homogenized in 800 µl of PBS with 0.1% Tween 20 and incubated for 5 min at 70 °C. Twenty microliters of

each lysate were transferred to three Eppendorf tubes with additions of 20  $\mu$ l of Triglyceride Reagent (Sigma T2449, total glycerol measurement) and  $2 \times 20$   $\mu$ l of PBS (free glycerol and background measurement). All reactions were incubated for 30 min at 37 °C, then briefly centrifuged, and 30  $\mu$ l of supernatant was transferred to 96-well microtiter plates. One hundred microliters of Free Glycerol Reagent (Sigma F6428) were added to all reactions except for one PBS-treated lysate mixed with 100  $\mu$ l of PBS to measure the background. Reactions were incubated at 37 °C for 5 min, after which absorption was measured at 540 nm. Triglycerides were calculated by subtracting free glycerol from total glycerol measurement. A glycerol standard curve was calculated using 0.5 to 3  $\mu$ g of glycerol (per well). The results were normalized against protein amount measured with Bradford assay (Thermo no. 1856209).

ATP concentration was measured using the ATP Determination kit (ThermoFisher Scientific). Thirty flies were homogenized in ATP isolation buffer (6 M guanidine-HCl, 4 mM EDTA, 100 mM Tris/Cl pH 7.8) and snap-frozen in liquid nitrogen, followed by boiling for 5 min. Debris was pelleted by centrifugation at 10 000gmax for 10 min at 4 °C. Five microliters of a 12.5-fold diluted supernatant was added to 100  $\mu$ l of ATP Reaction Mix (Thermo Fisher; formulated according to the manufacturer's recommendations), and values were recorded using a Tecan luminometer with Greiner polypropylene plates (no. 655207). The results were normalized against protein amount measured with Bradford assay (Thermo no. 1856209).

Pyruvate was measured using BioVision kit no. K709 according to the modified protocol provided by the manufacturer. For pyruvate measurements, 20 flies were homogenized in 200  $\mu$ l Pyruvate Assay Buffer on ice and then centrifuged at 10 000gmax for 10 min at 4°C. Fifteen microliters of supernatant were mixed with 35  $\mu$ l of Pyruvate Assay Buffer in a well of the 96-well microtiter plate. Fifty microliters of reaction mix (formulated according to the manufacturer's guidelines) were added to each well containing supernatant and incubated for 30 min at room temperature, after which absorption was measured at 570 nm. Parallel background reactions were performed by mixing supernatant with background mix, formulated according to the manufacturer's guidelines. The results were normalized against protein amount measured with Bradford assay (Thermo no. 1856209).

## **2.14. Respiration exchange ratio measurements (III)**

Respiration exchange ratio (RER) was calculated as the ratio of CO<sub>2</sub> produced and O<sub>2</sub> used by flies. O<sub>2</sub> consumption in individual flies was measured by coulometric respirometry in a continuous O<sub>2</sub>-compensating system at constant temperature and humidity (23 °C and 55% relative humidity). Flies were placed

into measuring chambers, and measurements were begun when the flies stopped moving and the minimum value of gas exchange was reached. CO<sub>2</sub> levels were determined using a LI-700 differential CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O analyzer (LiCor, Lincoln, Nebraska, USA).

## **2.15. Data analysis and statistical methods (I, II, III, IV)**

We employed a Poisson generalized linear model (GLM) with a log link function, considering positive light-choice count as the dependent variable. This model incorporated geographic location (Finland, Kenya), treatment groups (control, 5-HTP,  $\alpha$ MW), and sex as predictors, with an interaction term for sex and treatment groups. Upon discovering that sex did not significantly influence the results, it was removed from the model, leading to a refined GLM that focused on the interaction between geographic location and treatment groups. The variability of phototactic choices was assessed using the variability beyond expectation (VBE) metric, a measure derived from the mean absolute deviation of data from their median, adjusted for expected sampling error, with standard errors for VBE calculated through bootstrap resampling of individual flies (5,000 replicates).

Further statistical analyses included permutation tests for comparing behavioral mean absolute deviations (MADs) across groups, with *P*-values determined by shuffling data tables and comparing randomized groups against original data. The impact of developmental conditions and drug supplementation on adult fly survival under predation was evaluated using two-way ANOVA, followed by Tukey's honest significance test for multiple comparisons, alongside the Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests to compare behavioral traits such as turn bias and locomotory speed.

All analyses were performed in the R environment (version 4.1.0), ensuring rigorous statistical evaluation and adjustment for multiple comparisons using the Benjamini–Hochberg procedure (Benjamini & Hochberg, 1995). Biological replicates ranged from four to ten, with individual data points indicated on diagrams, and statistical significance set at  $P < 0.05$ .

For locomotor activity and survival analyses, data were analyzed using both generalized linear models and non-linear regression models, fitting data to specific distributions based on the nature of the data collected, including gamma and quasi-Poisson distributions for traits such as maximum acceleration and high acceleration state frequency. Survival analysis under predation employed a binomial distribution model, with all models considering statistical significance at  $P < 0.05$ .

GraphPad Prism software was utilized for graphical representation and further statistical calculations, including two-tailed Student's *t*-tests for comparing control and predator-reared populations, and Mantel–Cox tests for survival analyses. The application of the Lowess track smoothing method facilitated the nuanced interpretation of motion data.

### 3. RESULTS

#### 3.1 Light-Choice Probability (I)

Female and male flies did not differ significantly in their LCP (fraction of choices toward the illuminated LED) either in Finland or Kenya (Poisson GLM with log link, Wald  $\text{Chisq}_1 = 0.66$ ,  $P > 0.4$ ) and, therefore, we pooled sexes in the further analyses of LCP. We found that geographic location was a significant predictor of light-choice probability (Poisson GLM with log link, Wald  $\text{Chisq}_1 = 290.8$ ,  $P < 0.0001$ ). Flies were photopositive both in Kenya and Finland, choosing the light 80% and 68% of the time (Table 1; Fig. 1), respectively. Kenyan flies were found to be significantly more photopositive than Finnish flies ( $P < 0.001$ ; Table 1; Fig. 1). While the main effect of treatment group on light-choice was not significant (Poisson GLM with log link, Wald  $\text{Chisq}_2 = 0.449$ ,  $P = 0.8$ ), however, there was significant interaction between geographic location and treatment group (Poisson GLM with log link, Wald  $\text{Chisq}_2 = 40.93$ ,  $P < 0.0001$ ). Feeding Kenyan flies,  $\alpha\text{MW}$  increased their LCP significantly while feeding 5-hydroxytryptophan, a serotonin precursor reduced LCP (Table 1; Fig. 1). In contrast, feeding Finnish flies  $\alpha\text{MW}$  reduced LCP, while 5-HTP increased their LCP. However, LCP of Finnish flies fed 5-HTP was still lower than the LCP of Kenyan flies (Table 1; Fig. 1).

Table 1.

Descriptive statistics of light-choice probability and variability beyond expectation;  $\pm$  SE were based on bootstrap resampling (5,000 replicates).

| Geographic location | Treatment         | <i>n</i> | Light choice probability (LCP) $\pm$ SE | Variability beyond expectation (VBE) $\pm$ SE |
|---------------------|-------------------|----------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Finland             | 5-HTP             | 286      | 0.695 $\pm$ 0.00665                     | 0.5278 $\pm$ 0.06943                          |
| Finland             | Control           | 255      | 0.6798 $\pm$ 0.00779                    | 0.7225 $\pm$ 0.0703                           |
| Finland             | $\alpha\text{MW}$ | 201      | 0.6454 $\pm$ 0.00977                    | 0.8394 $\pm$ 0.07307                          |
| Kenya               | 5-HTP             | 175      | 0.7673 $\pm$ 0.00745                    | 0.5458 $\pm$ 0.085                            |
| Kenya               | Control           | 256      | 0.7964 $\pm$ 0.00564                    | 0.3839 $\pm$ 0.07685                          |
| Kenya               | $\alpha\text{MW}$ | 197      | 0.8379 $\pm$ 0.00663                    | 0.6392 $\pm$ 0.07468                          |

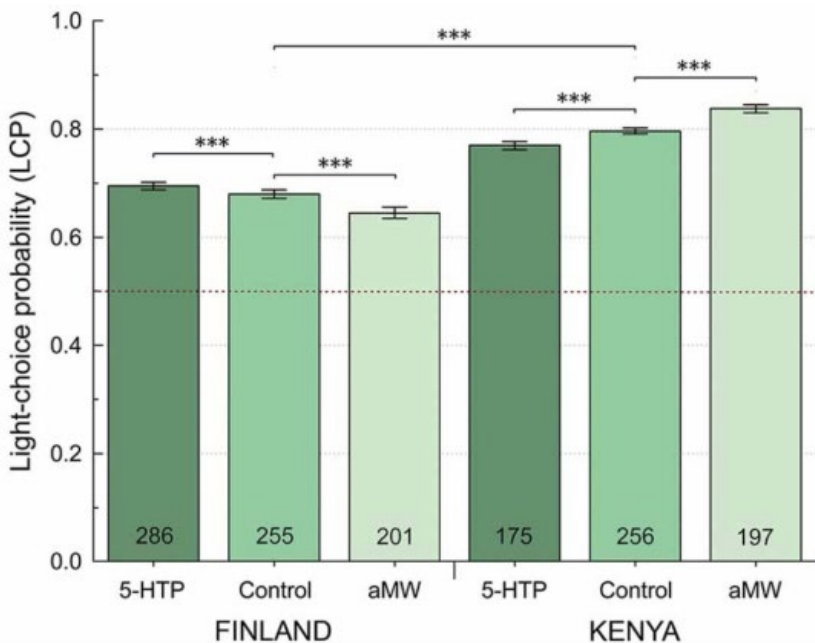


Figure 1. Light-choice probability by site and pharmacological treatment. Error bars are  $\pm 1$  SE, calculated by bootstrap resampling; \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3.2 Variability Beyond Expectation (I, II)

Female and male flies had similar among-individual phototactic variability, as measured by VBE, in both Finland and Kenya (all bootstrapped distributions,  $P > 0.05$ ) and sexes were pooled in the further analyses of VBE. Finnish fruit flies had significantly higher VBE than flies in Kenya ( $P < 0.001$ ; Table 1; Fig. 2). Feeding  $\alpha$ MW did not affect the VBE of Finnish flies, whereas adding 5-HTP to their food significantly suppressed VBE ( $P = 0.023$ ). In Kenyan flies, feeding  $\alpha$ MW significantly increased VBE, while 5-HTP did not affect their VBE (Table 1; Fig. 2). Importantly, feeding 5-HTP made VBE of Finnish flies similar to VBE of Kenyan flies (Table 1; Fig. 2).

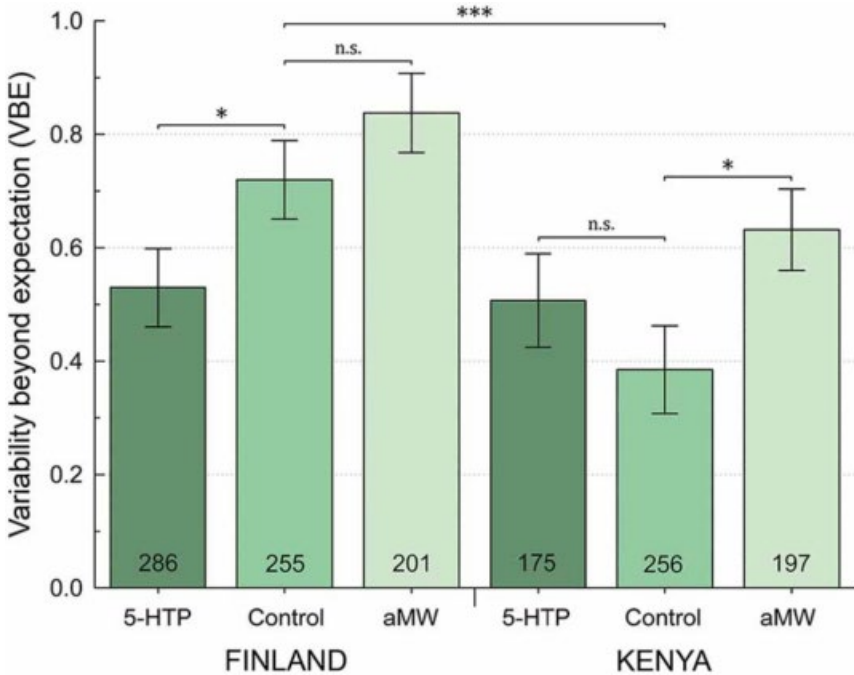


Figure 2. Behavioral variability beyond statistical expectation by site and pharmacological treatment. On a log2 scale, VBE = 0 indicates no excess variability, and VBE = 1 indicates twice as much variability as would be expected by chance alone. Error bars are  $\pm 1$  SE, calculated by bootstrap resampling; n.s.,  $P > 0.05$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  represent one-tailed significance.

Turn bias variability of male fruit flies grown with spiders (MAD = 0.11,  $n = 153$  flies) was significantly higher than that of control flies (MAD = 0.08,  $n = 143$ ) grown in a predator-free environment (Permutation test:  $P = 0.006$ ; Fig. 4). Feeding 5-HT to flies reared with spiders (MAD = 0.12,  $n = 116$ ) did not increase the turning variability ( $P = 0.34$ ) while feeding these flies  $\alpha$ MW (MAD = 0.10,  $n = 140$ ) significantly decreased turn bias variability ( $P = 0.021$ ; Fig. 3). Feeding 5-HTP ( $P = 0.33$ ) and  $\alpha$ MW ( $P = 0.12$ ) did not affect the variability of turning behavior of control fruit flies (Fig. 4).

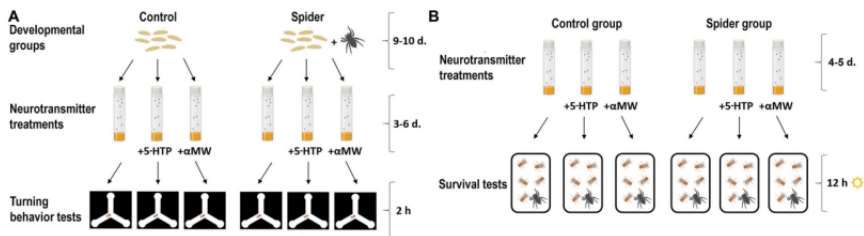


Figure 3. Schematic of the turning assay (A) and the survival experiment (B)

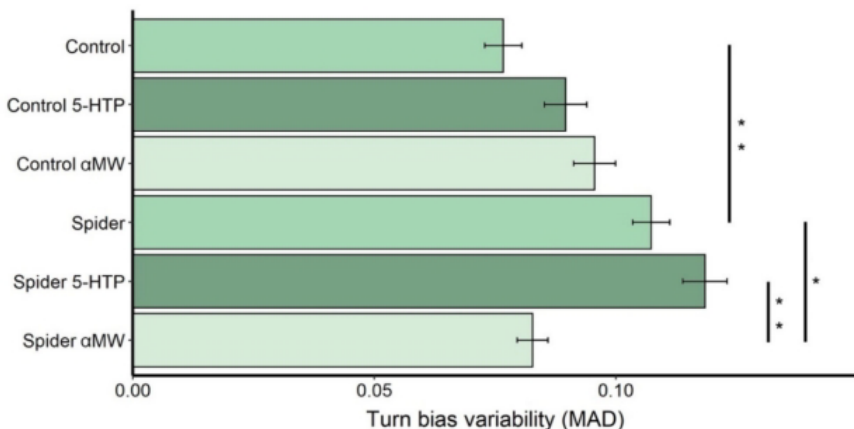


Figure 4. Turn bias variability (MAD) of fruit flies reared with and without spiders receiving different drug treatments. Error bars are  $\pm$  SE estimated by bootstrap resampling. Asterisks indicate significant differences according to permutation tests:  $*0.05 > P > 0.01$ ;  $**0.01 > P > 0.001$ .

### 3.3 Handedness and the number of turns in the y-maze (II)

The proportion of the right turns (turn bias) did not differ among the groups of flies (Kruskal–Wallis:  $\chi^2 = 6.41$ ,  $P = 0.268$ ; Fig. 5). Proportion of right turns by each group was also not significantly different from 0.5 (Wilcoxon tests: all  $P_s > 0.05$ ; Fig. 5), i.e., an equal number of right and left turns in each group.

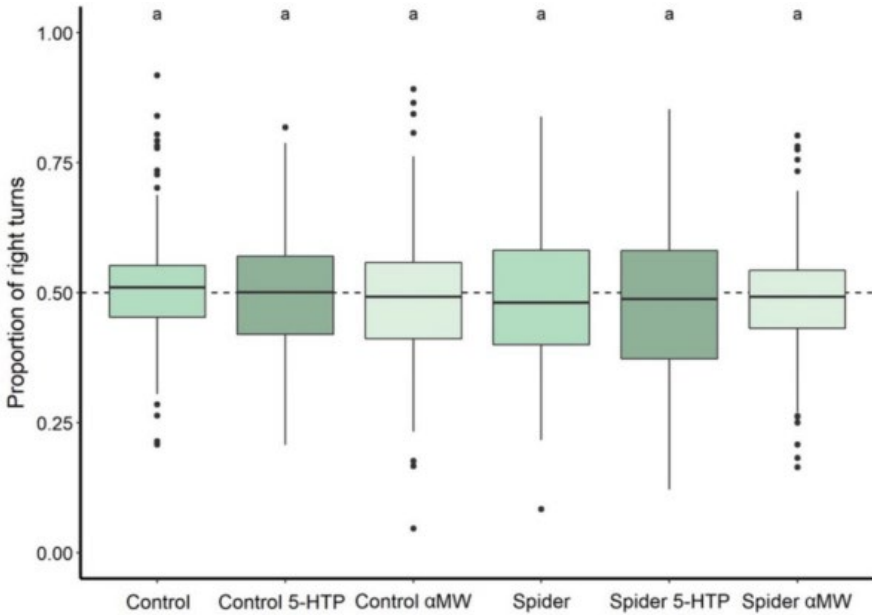


Figure 5. Turn bias of fruit flies reared with and without spiders and receiving different drug treatments during development. Experimental groups that are not statistically significantly different (Wilcoxon tests,  $P > 0.05$ ) are indicated by the same letter at the top of the figure.

Flies reared with spiders made significantly fewer turns per unit time ( $2.6 \pm \text{SD } 1.3$  turns/min) in the Y-maze compared to control flies ( $3.4 \pm 1.5$  turns/minute) (Mann–Whitney test:  $P = 0.0001$ ; Fig. 6). Feeding 5-HTP to flies reared with spiders significantly increased the turn rate ( $3.4 \pm 1.4$  turns/min) ( $P < 0.0001$ ), whereas feeding them  $\alpha\text{MW}$  had no significant effect ( $2.7 \pm 1.3$  turns/min) ( $P = 0.50$ ; Fig. 6). Feeding  $\alpha\text{MW}$  to control flies significantly decreased the turn rate ( $2.6 \pm 1.51$  turns/min) ( $P = 0.0003$ ), whereas feeding them 5-HTP had no significant effect ( $3.5 \pm 1.71$  turns/min) ( $P = 0.94$ ; Fig. 6).

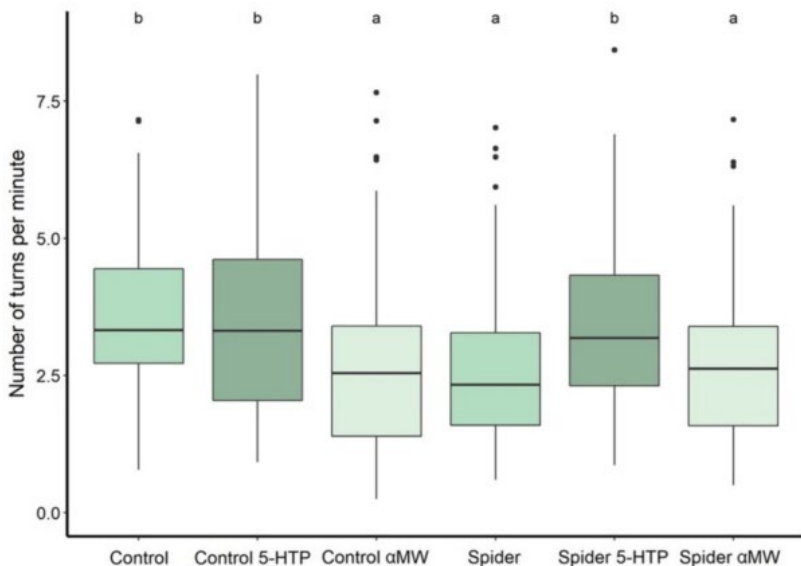


Figure 6. Turn rate (turns/minute) in the Y-maze of flies reared with and without spiders receiving different drug treatments. The flies reared with predators were previously exposed to predation during the larval stage, while in the control group, the flies were raised without jumping spiders. Thick lines indicate the median, boxes show the Q1 and Q3 quartiles, and whiskers represent the upper and lower quartile, excluding outliers. Black dots represent outliers (data points more than 1.5 times interquartile range away from Q1 and Q3). Experimental groups that are not statistically significantly different (Mann–Whitney tests,  $P > 0.05$ ) are indicated by the same letter at the top of the figure.

### 3.4 Predator stress induces a catabolic shift towards lipid oxidation (III)

Both carbohydrates and lipids, as key biochemical energy storage molecules, were measured in *Drosophila* Oregon strain flies reared with and without predatory spiders. While free glucose, its disaccharide trehalose, and polymeric form glycogen ( $n = 8$ ) remained stable regardless of predator stress, triglycerides decreased, and free glycerol increased compared with controls ( $n = 10$ , Fig. 7a, b). This indicates increased utilization of lipids since lipolysis of triglycerides would provide free fatty acids for catabolism and simultaneously increase free glycerol concentration. Such specific loss of fat stores without any change in carbohydrate concentrations strongly indicates a shift in catabolism

rather than inducing an overall starvation phenotype. Indeed, the RER ( $n = 20$ ) of 0.76 in spider-reared flies supported this interpretation (Fig. 7c), indicating a firm reliance on a fatty acid breakdown in fueling systemic ATP production.

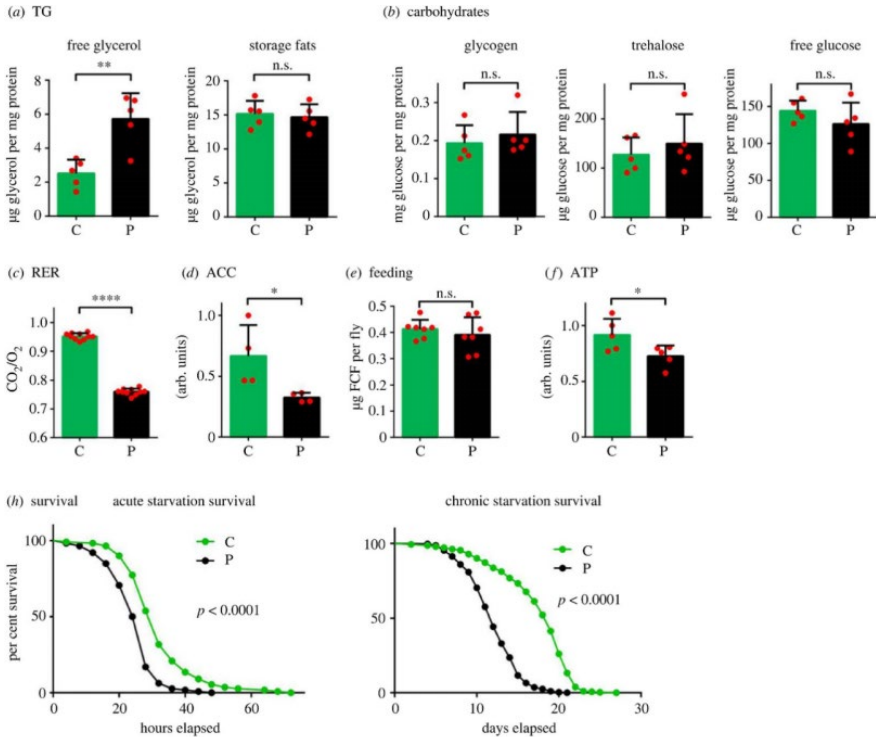


Figure 7. Effects of predator stress on the metabolism, locomotor activity, and survival in flies reared with spiders (predators) or without spiders (control). (a)

Levels of free glycerol and storage fats. Relative but not absolute values of control flies have been published before (Krams et al., 2020). TG, triglyceride.

(b) Levels of carbohydrates: glycogen, trehalose, and free glucose. (c) Respiration exchange ratio. (d) Amount of acetyl-CoA carboxylase (ACC) quantified against Ponceau S-stained total protein. (e) Uptake of food containing 1% Blue FCF dye. (f) ATP concentration. (h) Survival curves of flies kept on agar food (acute starvation, log-rank test  $P < 0.0001$ ) and on 1% sucrose food (chronic starvation, log-rank test  $P < 0.0001$ ). In all cases: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , n.s.—not significant. C—control, P—predator-reared.

### 3.5 Predator stress reduces overall energy levels (III)

Even if catabolism is re-oriented towards fatty acid oxidation, carbohydrates can contribute to this through de novo lipid synthesis. However, the levels of the rate-limiting ACC controlling this process were decreased in flies experiencing predator stress ( $n = 8$ , Fig. 7d). Increased feeding intensity ( $n = 14$ ), a typical response to resource scarcity in *Drosophila*, was not found (Fig. 7e). Complete reliance on only one type of catabolic fuel source caused a 20% decrease in steady-state ATP levels ( $n = 10$ , Fig. 7f). Not compensating for diminished ATP production by increasing food uptake or lipid synthesis must come at the cost of lower metabolism. Spider-reared flies were indeed observed to have lower speed than controls in walking/climbing assays ( $n = 24$  and 16, Fig. 9g). Similarly, these flies were less resistant to both acute ( $n = 220$ ) and chronic ( $n = 274$  and 275) starvation, exhibiting shorter survival in conditions of limited food resources (Fig. 7h).

### 3.6 Glucose uptake is inhibited (III)

The activity of Akt, a central regulator of the conserved glucose uptake mechanism, is dependent on the phosphorylation state of threonine at its kinase domain and serine residue in its hydrophobic motif (at position 505 in *Drosophila* Akt), which was found to be significantly decreased in spider-reared flies ( $n = 8$ , Fig. 8a). This indicates reduced glucose transport, depriving glycolysis of its substrate and decreasing its end-product pyruvate ( $n = 4$ , Fig. 8b). Administering metformin, an anti-diabetic drug that facilitates glucose uptake in both humans and flies (Bahhir et al., 2019; Niccoli et al., 2016), restored the normal balance in the flies' carbohydrate/lipid usage ( $n = 10$ ) and increased their RER ( $n = 20$ ) to normal value (Fig. 8c).

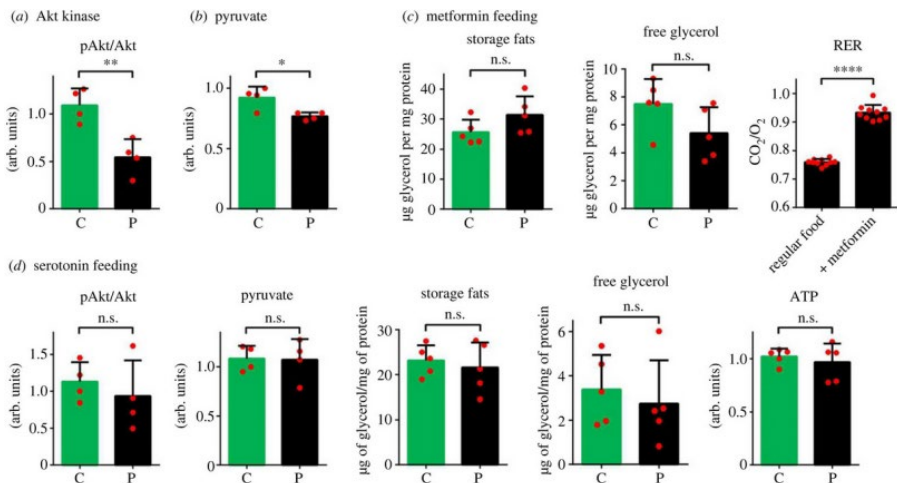


Figure 8. Effects of predator stress on metabolism/behavior and pharmacological complementation in flies reared with spiders (predators) or without (control) spiders. (a) Phosphorylation of Akt kinase at Ser505. (b)

Levels of pyruvate. (c) Effect of metformin feeding on storage fats, free glycerol, and predator-reared flies' respiration exchange ratio. (d) Effects of serotonin feeding on Akt phosphorylation, pyruvate, storage fats, free glycerol, ATP and predator-reared flies' RER. In all cases: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , n.s.—not significant. C—control, P—predator-reared.

### 3.7 Serotonin complements metabolic dysfunction (III)

The responses to external stimuli leading to different stress conditions are often mediated by changes in neurotransmitter levels. Serotonin dysregulation has been specifically associated with neurological stress that can cause several types of disorders in humans. In fact,  $w^{1118}$  strain flies with a mutation in the *white* gene and severely reduced serotonin levels compared with red-eyed strains (Borycz et al., 2008; Sitaraman et al., 2008) displayed a much stronger metabolic shift ( $n = 10$ ). This could mean that serotonin mediates the effects of predator stress downstream from other parts of fly metabolism. We therefore asked whether elevated serotonin can alleviate predator-induced metabolic impairment. We fed flies with elevated concentrations of the serotonin precursor and analyzed its effects on Akt phosphorylation ( $n = 8$ ), pyruvate ( $n = 8$ ), triglycerides ( $n = 10$ ), free glycerol ( $n = 10$ ), ATP ( $n = 10$ ) and RER ( $n = 20$ ) (Fig. 8d). In all cases, external administration of serotonin precursor restored these parameters in

spider-reared flies to control levels, suggesting that supporting serotonin synthesis is sufficient for countering these metabolic alterations.

### 3.8 Effects of predator-induced stress on movement activity (III, IV)

We observed a rapid decrease in the activity of flies reared with spiders (Fig. 9).

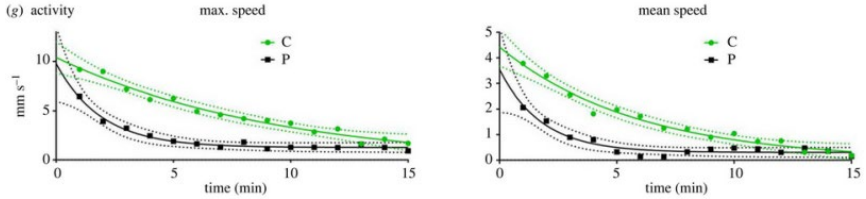


Figure 9. Nonlinear regression of maximum speed and mean speed measured across 15 min; test  $P$ -values for both cases are below 0.0001. Dots represent averages of 16 (control) and 23 (predator) experiments. The  $P$ -values of independent samples  $t$ -tests are 0.00017 for mean and 0.0047 for maximum speed. Dashed lines represent 95% confidence intervals.

We found significant ( $\chi^2=13.00$ ,  $P = 0.003$ ) differences in the distance travelled: the flies of the control group covered longer distances ( $5039 \pm 3517$  mm; mean  $\pm$  SD) within a 2-h period than the flies of the experimental group ( $4403 \pm 3443$  mm) (Fig. 10A).

There were significant differences in frequency of entering the High Acceleration State ( $\chi^2=53.376$ ,  $P < 0.001$ ), and in Maximum Acceleration ( $\chi^2=119.82$ ,  $P < 0.001$ ) between the groups. Flies of the control group entered the High Acceleration State less often ( $4781 \pm 1474$  times; mean  $\pm$  SD) than fruit flies raised with spiders ( $5746 \pm 1823$  times) (Fig. 10B). The flies of the control group exhibited lower speed during accelerations ( $7.807 \pm 5.665$   $\text{mm/s}^2$ ; mean  $\pm$  SD) than flies grown with spiders ( $9.829 \pm 8.086$   $\text{mm/s}^2$ ) (Fig. 10C).

The control group had Motion Without Movement significantly less often ( $\chi^2= 19.183$ ,  $P < 0.001$ ) ( $828 \pm 476$  times; mean  $\pm$  SD) than the group raised with spiders ( $1005 \pm 654$  times) (Fig. 10D). This shows that flies raised with spiders exhibited more “stomping in place” movements.

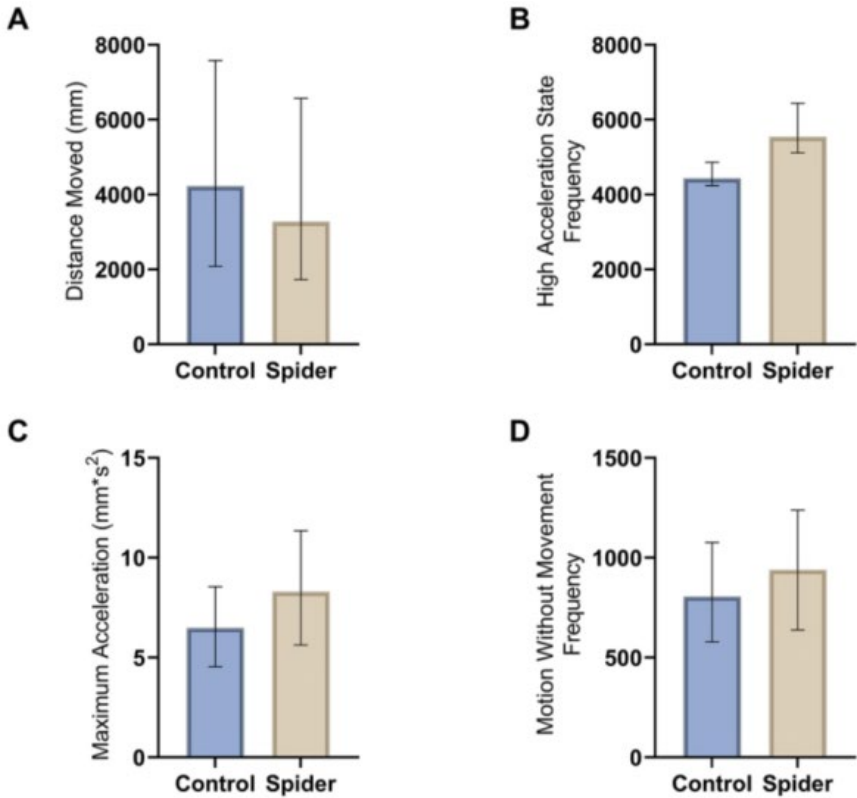


Figure 10. The median distance covered by the control group and flies grown with spiders within the 2-h period; the difference is significant at  $P < 0.003$  (A). Difference between control flies and flies grown with spiders in the occurrence of Frequency of High Acceleration State; the difference is significant at  $P < 0.001$  (B). Difference between control group and flies grown with spiders in the values of Maximum Acceleration; the difference is significant at  $P < 0.001$  (C). Frequency of Motion Without Movement in the control group and in flies grown with spiders; the difference is significant at  $P < 0.001$  (D). Error bars are  $\pm$  SD.

### 3.9 Survival of flies under predation (II, III, IV)

When exposing adult flies to predation for 12 h, their survival was significantly affected by predator presence during the larval development (two-

way ANOVA:  $F_{1,54} = 81.37$ ,  $P < 0.0001$ ), drug treatment ( $F_{2,54} = 14.76$ ,  $P < 0.0001$ ), and an interaction of both those factors ( $F_{2,54} = 12.57$ ,  $P < 0.0001$ ). Significantly more flies survived if they were reared under predator presence (mean survival:  $62\% \pm \text{SD } 11.4\%$ ,  $n = 10$ ) compared to the control group ( $30 \pm 9.4\%$ ,  $n = 10$ ) (Tukey HSD:  $P < 0.0001$ ; Fig. 11). Feeding flies reared with predators 5-HTP did not significantly affect their survival ( $65 \pm 8.5\%$ ,  $n = 10$ ) ( $P = 0.985$ ; Fig. 11), while feeding  $\alpha$ MW significantly decreased their survival ( $35 \pm 7.1\%$ ) ( $P < 0.0001$ ; Fig. 11). Feeding 5-HTP ( $32 \pm 6.3\%$ ,  $n = 10$ ) ( $P = 0.998$ ; Fig. 11) or  $\alpha$ MW ( $30 \pm 15\%$ ,  $n = 10$ ) ( $P = 1.00$ ; Fig. 11) did not significantly affect the survival of flies of the control group.

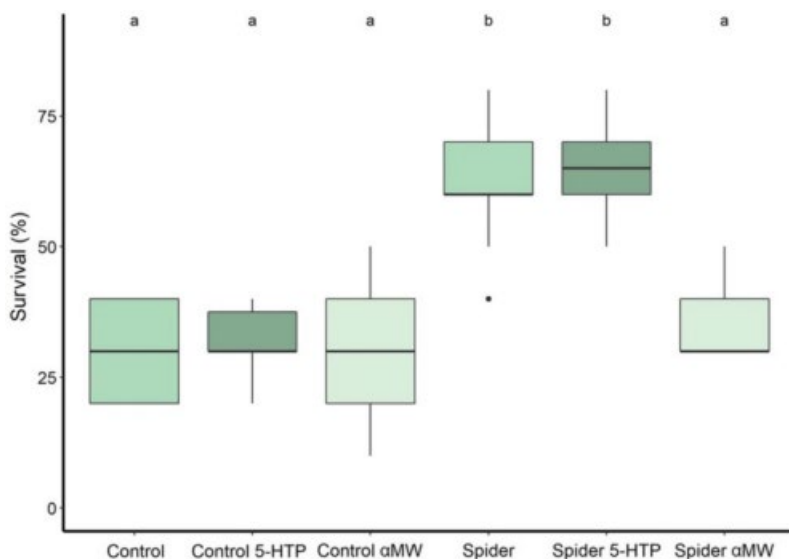


Figure 11. Survival percentage of adult fruit flies during a 12-h exposure to predation by jumping spiders. The flies reared with predators were exposed to predation during the larval stage; flies in the control group were raised without jumping spiders. Thick lines indicate the median, boxes show the Q1 and Q3 quartiles, and whiskers represent the upper and lower quartile, excluding outliers. Black dots represent outliers: data points more than 1.5 times interquartile range away from Q1 and Q3. Experimental groups that are not statistically significantly different (Tukey HSD,  $P > 0.05$ ) are indicated by the same letter at the top of the figure.

The changes in metabolism and decreased locomotor activity may also affect the survival of flies. We housed flies together with predatory spiders (10 male flies and 1 spider per group; 10 experimental groups in total) in a closed space and observed the survivability of flies over 12 h. There was an apparent increase in the survivability of predator-reared flies over control flies (Fig. 12). Remarkably, feeding metformin and a precursor of serotonin that reversed metabolic defects also decreased the survival of predator-reared flies to levels observed in the control group ( $n = 20$ ). This demonstrates that the increased survival of flies in response to predator presence comes at the cost of metabolic health.

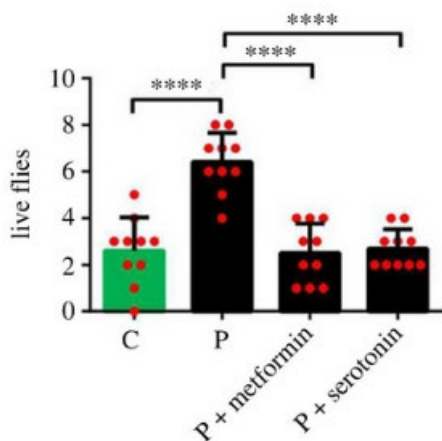


Figure 12. Survival of predator-reared and control flies with or without feeding 5-hydroxytryptophan or metformin after 12 h of incubation with spiders. In all cases: \*\*\*\* $P < 0.0001$ , C—control, P—predator-reared.

Lastly, following data on changes in serotonin-signaling and metabolism, we collected a vast amount of data on movement patterns and also tested the effects of these motions on fly survival.

We found that flies grown with spiders survived the 12 h experiment significantly better ( $\chi^2 = 10.605$ ,  $P = 0.0011$ ) than naïve individuals from the control group grown without spiders during their larval stage (Fig. 13). On average,  $1.6 \pm 0.97$  (mean  $\pm$  SD) out of ten flies survived in the control group and  $3.6 \pm 0.97$  (mean  $\pm$  SD) survived in the group grown with spiders.

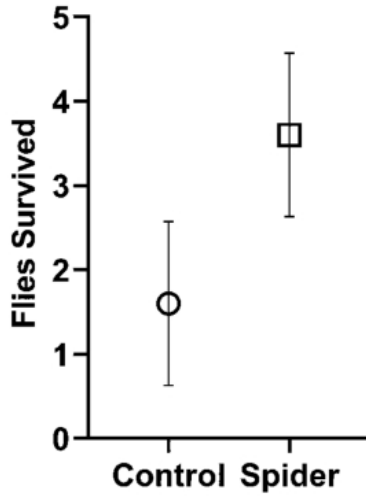


Figure 13. A mean number of ten control flies and ten flies grown with spiders surviving after a 12-h exposure to a spider. The difference is significant at  $P = 0.0011$ ; Error bars are  $\pm$  SD.

## 4. DISCUSSION

### 4.1 Genetic and environmental influences on phototactic variability in *D. melanogaster* (I)

In this study, we examined light-choice probability and the variation beyond expectation of the light choice probability in fruit flies from tropical and boreal climates. Although all flies were raised and tested in identical conditions, Kenyan fruit flies originated from areas with stable and predictable climate, while Finnish fruit flies originated in the northernmost limits of the species' distribution range, a zone characterized by an intensely fluctuating climate. We found that flies from the southern climate and were more strongly attracted to light (higher LCP), and more consistent across individuals (lower VBE) than flies from the northern climate. Conversely, flies from the higher latitude site were less attracted to light and less consistent across individuals. Bet-hedging theory predicts that higher phenotypic diversity may be adaptive under conditions of less predictable climate. Kain et al. (2015) developed a computational model suggesting that this hypothesis is plausible specifically with respect to *Drosophila* light-choice behavior. The results of this study provide empirical evidence in support of this model using fly strains caught at geographic sites with differential climatic variability (Akhund-Zade et al., 2020).

Previous work shows that genetic variation within lab strains likely cannot account for the variation of phototactic responses (Kain et al., 2012). In contrast, VBE varied significantly between flies collected in eastern Africa and northern Europe, suggesting that genetic factors underlie differences in the magnitudes of variation. A genetic basis for variability has been found in several other *Drosophila* behaviors including locomotor bias (Ayroles et al., 2015) and odor preference (Honegger et al., 2020). With respect to phototaxis, it was found that the gene *white* has an important role as an importer of metabolic precursors of serotonin (Kain et al., 2012). In this study, we significantly decreased VBE of Kenyan flies by feeding them  $\alpha$ MW. Feeding Finnish fruit flies 5-HTP, a serotonin biosynthesis precursor, significantly reduced their VBE. Thus, manipulations to reduce serotonin levels in Kenyan flies and increase them in Finnish flies made VBE of these groups statistically similar. Notably, feeding Kenyan flies 5-HTP did not significantly reduce the VBE of these flies. Likewise, feeding Finnish flies  $\alpha$ MW did not increase their VBE. These results suggest that a possible ceiling effect in Kenyan flies renders them insensitive to additional serotonin. Conversely a floor effect in Finnish flies may explain their insensitivity to serotonin inhibitors (Lam et al., 1996). However, we cannot exclude the possibility that the 5-HT-related effects on light choice and the variability of choices are also due to independent mechanisms. For example,

independent genetic effects on the mean and variability of light choice were observed when the *white* gene was muted (Kain et al., 2012).

We found that Finnish flies exhibited high VBE for phototaxis, similarly to what was observed in a laboratory strain, *D. melanogaster* *w<sup>1118</sup>* (Kain et al., 2012). These flies have white eyes (Green, 1996; Morgan, 1910) due to a mutation in the gene *white*, which is a central part of the eye-pigmentation pathway (Ferreiro et al., 2018). This gene encodes *white*, an ATP binding cassette transporter (Pepling & Mount, 1990), that heterodimerizes with either Brown or Scarlet proteins, encoded by *brown* and *scarlet* genes to transport guanine or 5-HTP, respectively. In neurons, these transporters contribute to the biosynthesis of amines. It has been shown that *white* mutants have significantly reduced levels of the neurotransmitters serotonin (up to five times lower), dopamine, and histamine (Borycz et al., 2008; Sitaraman et al., 2008), especially in glia and neurons of the brain (Borycz et al., 2008). These diminished concentrations of the neurotransmitters in *white* mutants (Borycz et al., 2008; Sitaraman et al., 2008) have multiple consequences on a variety of neurological phenotypes affecting male courtship behavior (Anaka et al., 2008; Lee et al., 2008; Zhang & Odenwald, 1995), anesthesia resistance (Campbell & Nash, 2001), aggressive behavior (Hoyer et al., 2008), spatial learning and olfactory learning (Anaka et al., 2008; Diegelmann et al., 2006; Sitaraman et al., 2008), duration of periods of locomotion recovery following anoxia (Xiao & Robertson, 2016), sensitivity to ethanol (Chan et al., 2014), sensitivity to certain tactile stimuli (Titlow et al., 2014) and propensity to retinal degeneration (Ferreiro et al., 2018). Although Finnish fruit flies have normal red eyes, they displayed average light preference (68%) and VBE (0.72) similar to the values seen in *white* mutants. For example, *w<sup>1118</sup>* mutants chose light 61% of the time and their VBE is ~0.87, values which are closer to those in Finnish flies than, for example, flies of the standard lab wild type strain Canton-S (76% and 0.56, respectively; Kain et al., 2012).

Common factors may be responsible for the behavioral metrics of Finnish and *w<sup>1118</sup>* flies. We found that 5-HTP significantly affected VBE of Finnish flies, while it had no effect on VBE of Kenyan flies. The same pattern was observed in *w<sup>1118</sup>* and Canton-S flies, respectively (Kain et al., 2012). This suggests that the brains of African flies contain a higher concentration of serotonin, perhaps because their food sources are more diverse and may contain more metabolite precursors than Finnish flies. Tryptophan, a serotonin precursor, is an essential amino acid because animals cannot synthesize it but instead must obtain it through their diet. While African flies often enjoy the availability of different fruits, mushrooms, sap fluxes year-round, Finnish fruit flies have much shorter summer season in general, with reduced availability of rotting and decaying fruits and mushrooms in particular (Sardeshpande & Shackleton, 2019). The depletion of tryptophan from the diet has been used to assess brain serotonergic function

in humans (Lam et al., 1996). This procedure is capable of rapidly lowering brain tryptophan levels in human patients by over 80% within just a few hours (Young et al., 1985), which may have immediate effects on depression patients (Neumeister et al., 1998; Smith et al., 1997) such as deviations from normal behavior and lowered food intake (Rantala et al., 2018, 2019).

Theory predicts that the relative stability of the local climate in Kenya should favor heritable and lower variability phototactic preferences, i.e., a strategy with less stochastic bet-hedging (Hopper, 1999). In such strategies, the current mean phenotype always lags environmental fluctuations, because evolution by natural selection is not instantaneous. In predictable environments, the penalty for this lag is minimized. By contrast, Finnish flies showed significantly more variable phototactic preferences, suggestive of an adaptive bet-hedging and consistent with previous modeling of bet-hedging in thermal preference behavior (Kain et al., 2015). Interestingly, adaptations for heat resistance have the potential to improve cold resistance (Condon et al., 2014). This shows that adaptations to extreme temperatures improve not only the ability to withstand a particular deviation from mean temperatures, but also the magnitude of temperature variation. Moreover, the ability to tolerate extreme temperatures is improved in populations that evolve in fluctuating environments relative to when populations are exposed to a stable increase of high temperatures (Condon et al., 2014; Tobler et al., 2015). The high VBE of Finnish flies, which in the wild may result in a variety of thermal experiences, may serve as parallel adaptation to life in relatively unpredictable thermal and visual environments, leading flies to find conspecifics, breed and oviposit in a variety of conditions, rather than wait for specific optimal conditions that might not arrive in a particular season.

In a population utilizing a bet-hedging strategy, individuals exhibiting a wide variety of preferences are born continuously across a season. If the summer is cooler, spring-adapted individuals will survive, while summer-adapted flies will survive if the summer is hot and long (Bergland et al., 2014). Kawecki (2000) has suggested that the phenotypic expression of genetic variation can be suppressed, and heritability reduced under fluctuating selection. Dynamic modulation of variability-suppressing serotonin is a potential mechanism to tune the canalization of the phototactic phenotype. To test this possibility, one could measure VBE and 5-HT concentration in the brains of flies, born during hot and cool summers near the northernmost areas of their distribution ranges. Our results suggest that plastic responses to environmental differences, which is another major strategy for dealing with environmental heterogeneity, is not a likely explanation for the observed differences between African and European flies. The flies of both populations were grown under identical conditions and we are

not aware of any environmental fluctuations to which a plasticity strategy could respond.

While Kain et al. (2012) observed significant effects of 5-HTP on the VBE of flies, this treatment did not show any influence on light-choice probability in their study. However, we found significant effects of feeding 5-HTP and  $\alpha$ MW on LCP, which depended on the origin of the strain. In addition, we observed effects on LCP of line origin, with Kenyan flies ~10% more photopositive. In Finnish flies, feeding 5-HTP did not affect LCP, while feeding  $\alpha$ MW significantly reduced it, which was the opposite of what we observed in the case of VBE in these flies. Feeding 5-HTP significantly lowered LCP and feeding  $\alpha$ MW significantly raised LCP in Kenyan flies. Thus, 5-HTP decreased the light choice probability in Kenyan flies and did not affect it in Finnish flies. Importantly, Kenyan flies on control media chose the light more often than Finnish flies on control media. Kenyan flies are likely to have a higher concentration of 5-HT in the brains, at least when fed natural diets.

It is possible that differential levels of serotonin do not explain the mean LCP of these strains, since serotonin or its precursor 5-HTP have been previously reported to decrease photopositivity in larval bryozoans (Pires & Woollacott, 1997). There may also be genetic background by serotonin-exposure effects. However, dopamine was previously reported to increase light choice (Pires & Woollacott, 1997). *White* mutants have reduced concentrations of dopamine in the brain (Borycz et al., 2008; Sitaraman et al., 2008) and if the neuromodulatory state of Finnish flies mirrors that of *white* mutants, they may also have lower dopamine levels. This in turn might explain their lower LCP, while lower serotonin could explain their higher VBE. Kain et al. (2012) did not find any effect of dopamine drugs on VBE or LCP of different strains of fruit flies including *white* mutants. However, it has been shown that dopamine affects the production and release of melatonin (Gonzalez et al., 2020), a key driver of biological rhythm (Arendt & Skene, 2005). Melatonin production might be disrupted in the brains of Finnish flies to ensure activity during long summer days at high latitudes indicating that dopamine of boreal fruit flies, especially the receptor subtypes and the density of receptors deserve a special attention in future research.

Importantly, 5-HT is a precursor of melatonin (Richter et al., 2000), and 5-HT is also regarded as a substance affecting physiological rhythms according to the light–dark cycle in invertebrates (Hardeland & Poeggeler, 2003). Kenyan and Finnish flies likely have different diurnal rhythms and sleep patterns: While there is a relatively regular day/night cycle in the tropical zone, Finnish flies enjoy never-ending daylight for up to two months at high latitudes. This may affect their serotonergic neural regulation because melatonin may be in low demand and not metabolized much during the northern summer, perhaps allowing the

accumulation of elevated 5-HT in neural tissues in summer. Besides a leading role of melatonin in the determination of sleep/wake cycles, it is also a potent antioxidant with a proposed role in immune function in invertebrates (Tan et al., 2010). The suppression of nocturnal production of melatonin has detrimental effects on antioxidant systems of organisms (Jones et al., 2015) which may facilitate the bet-hedging strategy of invasive species at high latitudes.

Flies that follow a bet-hedging strategy might only attain environmental conditions well-matched to their behavioral biases if they live through long periods of poorly matched conditions. Thus, there is likely an interplay between generation/lifespan length and the timescale of environmental fluctuations. Indeed, modeling suggests that bet-hedging is an adaptive response to environmental fluctuations at specific timescales roughly corresponding to the lifespan (Krams et al., 2020). Melatonin is an antioxidant, and may lengthen the lifespan of flies (Teran et al., 2012). Thus, it has the potential to affect evolutionary behavioral strategies both directly through the neuromodulatory state, but also indirectly through an effect on lifespan. These hypotheses call for precise measurements of 5-HT, melatonin, dopamine and behavior in fruit flies across the season and the south-north gradient of their distribution range.

#### **4.2. Serotonergic regulation of predator-evasion tactics (II)**

The presence of predators is known to alter prey morphology (Hossie et al., 2010; McCollum & Leimberger, 1997) and exert selective pressure on prey escape ability (Janssens & Stoks, 2018; Krams et al., 2016; O'Steen et al., 2002). In this study, we found that the turning choices of fruit flies grown with predators are less predictable than those of flies grown in a predator-free environment. We also show that flies raised with predators survived under predation by spiders significantly better than flies grown without predators. Our results suggest that the higher variability/lower predictability of turning behavior of flies grown with predators may make them better at evading predation. We also show with pharmacological experiments that the effects of predator-rearing on turning variability and survival of *D. melanogaster* are regulated by the neurotransmitter serotonin, which also regulates the variability of turning behavior (de Bivort et al., 2022). However, these serotonin-associated effects applied only for fruit flies grown with spiders.

Unpredictable and erratic turning behavior in some animals makes them more challenging to attack (Bilecenoglu, 2005; Eifler & Eifler, 2014; Yager et al., 1990), as is seen in both experimental (Jones et al., 2011) and modeling (Richardson et al., 2018) studies. Individual insects can exhibit substantial differences in escape behaviors, even in the absence of genetic variation (Schuett et al., 2011). Our results suggest a link between less predictable turning behavior

and better survival under predation risk by jumping spiders that are sit-and-wait predators. One explanation is that growing up with predators provides prey with signals that are not generated by transient contact with predators' post-development. Perhaps the effect of these signals is mediated by serotonergic neuromodulation during prey development. This idea is consistent with the observation that flies fed  $\alpha$ MW during development, but without predators present, showed similar adult survival in the presence of spiders as control flies, suggesting that fruit fly individuality is not solely driven by 5-HT (Maloney, 2021).

Some previous work has shown that fruit flies reared in identical lab environments show broad diversity in their phototactic choices, variability which is under the control of 5-HT (Kain et al., 2012; Krams et al., 2021). Notably, inhibiting 5-HT synthesis was associated with higher phototactic variability — here we observed that inhibiting 5-HT reduced the excess turn bias variability seen in flies reared with spiders. Geographic variation of fruit fly phototaxis was consistent with a negative relationship between 5-HT and variability of phototactic choices. Flies from northern climates grow on food relatively deficient in the metabolic precursors of serotonin and had lower predictability of phototactic choices (Krams et al., 2021). Thus, the association between 5-HT and behavioral predictability went in opposite directions in the present study and previous work examining phototaxis. These contradictory results suggest that the control of 5-HT over different behaviors may lead to different results, probably because different serotonin-responsive neuronal circuits are involved in different behaviors. To better understand the developmental, epigenetic and neurophysiological changes caused by direct predation and non-lethal predator presence, more study of behavior-specific neurobiological effects is required.

Our results support the results by Pantoja et al. (2016) examining variability in zebrafish (*Danio rerio*) antipredator locomotor behaviors. They found that zebrafish individuals show significant variation in acoustic startle responses. These responses are linked with the neurosecretion of dorsal raphe neurons (Pantoja et al., 2016). It was shown that zebrafish individuals show a higher fraction of serotonergic dorsal raphe nucleus neurons active during predator attacks. Pantoja et al. (2016) also showed that heightened 5-HT prevented habituation to predator stimuli, which improves the efficiency of antipredator behavior and survival of the prey. Together, these results suggest the importance of serotonergic signaling in the CNS and its ontogenetic development in establishing a distribution of antipredator behaviors across individuals.

The results of this study may have evolutionary implications. It is known that without phenotypic variation, there would be no evolution by natural selection. However, we show that individuals with similar genotypes raised in similar environments, except for the presence/absence of spiders, may

significantly differ in their simple behavioral reactions, (such as left vs. right decision in the absence of an asymmetric stimulus in the Y-maze). This suggests that asymmetries within the brain predispose the animal to go one way rather than the other and that neural activity influences the variation between animals (Buchanan et al., 2015). As these predispositions are relatively stable within individuals with considerable among-individual differences in behaviors (Buchanan et al., 2015; Reale et al., 2010; Roche et al., 2016; Trakimas et al., 2019), behavioral reactions of this kind are coined animal personality. Our results show that fruit flies may use a simple mechanism to dynamically regulate their behavioral individuality with individual variation in wiring and behavior as a general feature of neural circuits to facilitate individual adaptations and survive in changing environments (Mollá-Albaladejo & Sánchez-Alcañiz, 2021). However, explaining the proximate origins of changes in behavioral variability as a response to environmental challenges is not easy. Behavioral phenotypes emerge from many different levels of biological organization, including sensing of predators in the environment, adaptive gene expression, and even stochasticity in gene expression (Honegger & de Bivort, 2018; Li et al., 2017; Raj et al., 2010) to develop biases in idiosyncratic behavioral responses (Werkhoven et al., 2021) without changes in average left-right turning preferences.

This study found that flies reared with spiders were less mobile than control flies. Our recent study shows that predator stress during larval development of *Drosophila* impairs carbohydrate metabolism by systemic inhibition of Akt protein kinase, which is a central regulator of glucose uptake (Krama et al., 2023). This metabolic disorder is a likely cause of developing a diabetes-like biochemical and behavioral phenotype. An inability to metabolize glucose shifts the metabolism of fruit flies to triglyceride consumption, which decreases walking activity and might be a direct reason for the enhanced survival of fruit flies grown with spiders. Consistent with this idea, carbohydrate metabolism was found as one of the molecular functions most enriched in genes whose expression variation predicts variation in locomotor activity among individual isogenic flies (Werkhoven et al., 2021). However, the mechanism causing the higher variability of the turning behavior in flies with a diabetes-like phenotype remains unknown.

Antipredator behavior consists of a complex set of behavioral and physiological reactions and therefore likely involves neural pathways other than 5-HT. Honegger et al. (2020) found that both 5-HT and dopamine affect olfactory preference variability in fruit flies, and it is known that fruit flies can detect predators by their odors (Krams et al., 2021). Omura et al. (2012) and Stern et al. (2017) showed that the roaming speed of animals might depend on such neurotransmitters as tyramine, octopamine, npr-1, and daf-7, in addition to 5-HT. This suggests that future research on the neural regulation of antipredator responses in fruit flies should examine the effects of several neurotransmitters

and their possible interactions. Experimental manipulations targeting more than one neuromodulator may be essential, as one neuromodulator can alter the efficacy of other neuromodulators (Niederkofler et al., 2015; Niens et al., 2017). Finally, animals may respond to neuromodulators differentially based on their personalities (Krams et al., 2018). The complex interactions of neuromodulators and their behavior-specific effects on predictability will make this a rich and challenging area of research.

### **4.3. Metabolic and behavioral adaptations to predator stress (III)**

The effects predators have on prey are not limited to the death of prey individuals, but can induce a lasting condition of fear in the prey that survive in the presence of predators. As a result, prey often respond to predators in their environment by altering their morphological and physiological phenotypes during development (Hawlana & Schmitz, 2010a, 2010b; Hossie et al., 2010; I. Krams et al., 2016; Lehmann et al., 2014). Although these changes facilitate survival by improving escape abilities (Janssens & Stoks, 2014; I. Krams, 2002), predators may have enduring costly effects on prey individuals (Siepielski et al., 2014; Zanette & Clinchy, 2020). For example, predator-induced fear is one of the most common stressors employed in animal model studies of post-traumatic stress disorder (Zanette et al., 2019). This research has gained scientific interest because of the relevance of psychological stress in causing clinical depression and other metabolic disorders, such as type 2 diabetes, in humans. Although the underlying mechanism has remained unclear, increased serum glucocorticoid concentrations and catecholamine release are commonly associated with the development of insulin resistance (Beaupere et al., 2021). Our results align with these findings by showing that *Drosophila* reared with predators develop a diabetes-like biochemical phenotype characterized by an inability to metabolize glucose, forcing a shift to triglyceride consumption. This is caused by a decreased activity of Akt kinase, a central regulatory kinase that has a major role in controlling glucose uptake. This protein facilitates a highly conserved glucose transport mechanism (e.g., via GLUT4-dependent pathway in muscles), and defects in this pathway are therefore closely associated with the development of diabetes (Huang et al., 2018). Improving glucose transport using metformin, which has similar effects in flies to those in humans (Bahhir et al., 2019), restored the original metabolic balance in flies grown with predators.

Predator presence eventually changes the quality of the environment and affects the survival strategies of prey. While *Drosophila* flies rely on visual and olfactory cues for detecting predators such as spiders and mantises, it is currently unclear to what extent flies use separate sensory systems in different environmental conditions (Flor et al., 2017; I. Krams et al., 2016). However, they

do have a highly developed olfactory system that allows them to live for generations in complete darkness (Izutsu et al., 2016). This sensory system is sufficient by itself to detect the presence of spiders, and even exposure to spider odors can elicit metabolic and developmental changes (Krams et al., 2016; Krams et al., 2021). Regarding  $w^{1118}$  flies, it is also unclear whether they can use vision to detect predators, as they may have poor visual acuity (Kalmus, 1943). However,  $w^{1118}$  flies easily chose walking corridors when tested in the Y-maze experiments (Buchanan et al., 2015), suggesting  $w^{1118}$  flies actively rely on vision while exploring their environment.

Although a number of studies have described how chronic stress can have enduring effects on metabolism and behavior (Chen et al., 2014; Wu et al., 2019; Zanette et al., 2019), the connection between neural chemistry and metabolism has remained unclear. Our finding that supporting serotonin synthesis antagonizes the described metabolic effects suggests a central role for serotonin in such biochemical communication. Serotonin has multiple biological functions: regulating courtship behavior (Zhang & Odenwald, 1995), affecting spatial memory (Diegelmann et al., 2006) and olfactory learning (Anaka et al., 2008), influencing phototactic behavior (Kain et al., 2012; Krams et al., 2021), and affecting turning behavior (Krama, et al., 2023). Furthermore, it participates in several pathways that overlap with the roles of other neurotransmitters, such as dopamine and octopamine (norepinephrine homologue in *Drosophila*). Owing to the variety of serotonin's roles in neural circuits, which are at least partially redundant, its effect on metabolism can be caused by a number of different mechanisms. One plausible explanation could be related to the observed interconnection between serotonergic and insulin-producing nervous systems. In *Drosophila*, serotonergic neurons are closely apposed with insulin-producing neurons, and these two neuronal systems communicate (Kaplan et al., 2008). They control insulin signaling and, if defective, serotonin and insulin accumulate together, with suppressed peripheral insulin sensitivity. In humans, elevating serotonin has beneficial effects on metabolic balance, improving insulin sensitivity and glucose homeostasis (Al-Zoairy et al., 2017). This effect is relayed through serotonylation of the small GTPase Rab4, which elicits beneficial effects on glucose uptake, thus representing a convergence point between serotonin and insulin signaling. Since serotonin is decreased in human psychological disorders resembling the effects of predator stress, it is tempting to speculate a linear relationship between the metabolic reprogramming described here and serotonin levels. Tentative support for this hypothesis comes from a quantitatively stronger metabolic shift in the serotonin-depleted  $w^{1118}$  strain. However, serotonergic upregulation caused by the exogenous administration of serotonin might also elicit the observed reversion of metabolic changes.

Systemic effects on catabolism in predator-stressed flies resembled the effect of glucocorticoids in humans, a group of hormones released in response to stress conditions through activation of the HPA axis. These hormones antagonize the function of insulin by inhibiting the uptake of glucose in muscles and adipose tissue. They also downregulate glycolysis, inducing lipolysis and hepatic gluconeogenesis (Kuo et al., 2015). This mobilizes and reroutes energy reserves for specific tasks, e.g. increasing blood glucose levels to prepare the organism for a ‘flight-or-fight’ response.

*Drosophila* has no apparent neuroanatomical homologue of the mammalian HPA axis nor the same glucocorticoid hormones as humans. However, it has a central steroid hormone ecdysone, converted into 20-hydroxyecdysone (20HE) in hemolymph after its release. Best known for its role in inducing larval moults and metamorphosis (Yamanaka et al., 2013), it also regulates metabolism by suppressing glucose use. Binding with its receptor (EcR) induces this protein's translocation to the nucleus, where it represses the transcription of genes central to glucose utilization (Kovalenko et al., 2019). This is antagonistic to the function of an oestrogen-like receptor (ERR) recently described as a receptor for glucocorticoids in *Drosophila*, suggesting an interplay with other steroid hormones in this organism (Bartolo et al., 2020; Tennessen et al., 2011). The effects of 20HE are very similar to the deletion of ERR, which blocks the use of carbohydrates as a fuel source, leading to a shift towards lipid oxidation and depleting triglyceride reserves (Tennessen et al., 2011). Furthermore, 20HE acts as a stress hormone in flies, upregulated in response to adverse environmental conditions and stressful social interactions (Ishimoto et al., 2009).

Intriguingly, we found that predator stress enhances the survival of spider-reared flies in the adult stage when kept together with the spiders. This effect correlated precisely with metabolic reprogramming since the administration of metformin and serotonin precursor reverted the survival advantage to control levels. This indicates that this metabolic reprogramming is adaptive and provides a clear survival benefit at the expense of reduced metabolic fitness. One explanation for this finding is associated with the speed of movement and overall locomotor activity of the flies. Another possibility is linked to the glucocorticoid stress effect on memory. Stress-induced glucocorticoid release enhances memory consolidation and long-term memory in humans (Roozendaal, 2002). The effect is the same in flies, with ecdysone having a clear beneficial impact on long-term memory formation (Ishimoto et al., 2009, 2013). It is believed that these effects of glucocorticoids are linked to the conservation of glucose for neural tissue function, which is a primary carbon source. This adaptation fuels increased neural activity, especially learning and memory (Wirth, 2015). Brains are metabolically costly organs, as is the process of creating new memories (e.g., via increased synaptic connections) (Burns et al., 2010). In fact, elevated

carbohydrate uptake in humans and animals, including *Drosophila*, has an apparent memory-enhancing effect, especially for long-term memory (Greenwood & Winocur, 2001; Placais et al., 2017; Smith et al., 2011; Totani et al., 2020; Winocur & Gagnon, 1998).

In the aggregate, the results of this study allow us to propose a model explaining how chronic psychological stress, such as predator stress, induces metabolic disorders. Shunting glucose away from catabolically active tissues like muscle to be consumed by neurons is likely an adaptation to create memories and prepare for similar stressful conditions in the future. However, when stress persists and leads to chronic activation of the HPA axis and sustained glucocorticoid release, it will impair normal glucose metabolism and permanently shift systemic catabolism towards lipid oxidation, preventing the use of carbohydrates. Such loss of metabolic flexibility, especially in animals that use carbohydrates as the main form of energy source, will inflict fitness costs, leading to decreased ATP production and downstream effects on resistance to nutritional scarcity and locomotor activity. Therefore, this chronic activation of a mechanism that provides short-term benefits will cause decreased fitness if stress persists. This is supported by the observation that chronic activation of ecdysone signaling, although beneficial for an immediate response, can cause negative long-term effects (Ishimoto & Kitamoto, 2011).

The results of this study suggest that although the diabetes-like phenotype induced by predator presence reduces general health, it might be beneficial for survival. The insulin-producing system in *Drosophila* and other invertebrates differs to some extent from that of vertebrates, including humans. *Drosophila* flies have eight insulin-like peptides (Wu & Brown, 2006), which likely have different and partially overlapping roles in metabolism regulation (Gronke et al., 2010). This shows that insects may have numerous ligands for one receptor, while mammals have receptors with somewhat redundant functions but a restricted number of ligands. Also, while the effect of extra 5-HTP in increasing serotonin is straightforward, it might affect concentrations of another neurotransmitter. Tryptophan is a precursor of bipterin (Joh, 2000), a cofactor associated with serotonin and dopamine synthesis. While the metabolic shift in serotonin-depleted  $w^{1118}$  flies compared with the Oregon strain provides tentative support for decreased serotonin concentration in response to predator stress, neuron-specific measurements are required to fully understand the mechanism underlying this hypothetically adaptive metabolic shift.

Finally, metabolic disorders are often associated with the impairment and loss of dopaminergic function (Bell et al., 2020). Predator-induced stress affects the levels of brain dopamine, which are decreased in rats exposed to predator stress (Dremencov et al., 2019; Kondashevskaya et al., 2022). Since the  $w^{1118}$  strain has reduced dopaminergic activity, the interconnected serotonin and

dopamine pathways should be studied simultaneously in predator-induced stress. These numerous aspects must be considered to fully understand the role of stress in the development of metabolic phenotypes and similarities/dissimilarities of stress perception in humans and *Drosophila* (Graham & Pick, 2017).

#### **4.4. Behavioral variability and metabolic disorders as responses to predator stress (IV)**

In this study, nearly 70 million data points were collected for *D. melanogaster* not exposed to spider presence during their larval development ( $n = 839$ ) and those flies ( $n = 729$ ) subjected to predation stress during their larval stage using a high-throughput data sampling method (Kain et al., 2012; Krama et al., 2023). Short-term stress promotes oxidative stress and changes the metabolic balance away from anabolism and high-molecular-mass compound production, resulting in increased glycogen generation and hence a more significant requirement for carbohydrate intake (Trakimas et al., 2019). However, chronic psychological stress differs from short-term acute stress because prolonged stress, such as predator stress, may induce metabolic disorders (Krama et al., 2023). As a result, the stress of encountering a predator early in life may alter an adult organism's phenotypic appearance, behavior, and metabolism. Our results support earlier findings that walking activity is reduced in flies grown with spiders; a possible explanation for this is because diabetes-like metabolic disorder prevents fruit flies from using carbohydrates and shifts catabolism toward fat utilization (Krama et al., 2023). Therefore, oxidation of lipids is expected to contribute proportionally more to major metabolic functions, including walking and flight movements in fruit flies grown with spiders than in control flies. Although fats are the most energy-rich macronutrient, fatty acids are a slower energy source than carbohydrates, requiring oxidative phosphorylation to generate ATP (Brosnan, 1999). We show that fruit flies raised with spiders walk less while their initial movement acceleration is higher than in the control group, suggesting a more rapid exhaustion in flies grown with spiders.

In this study, we also confirmed that flies grown with spiders survived better in adulthood under direct exposure to predation risk than those from the control group grown without any previous contact with predators. The flies affected by predation risk were observed to move in frequent and short dashes. Importantly, their initial speed (acceleration) was substantially higher than that of flies of the control group. We found that fruit flies from the control group moved at a more measured pace characterized by rare and low-intensity accelerations. Thus, the two groups of fruit flies radically differed in their movement pattern. Interestingly, during their rest stops, fruit flies reared with spiders moved their bodies (stomped in place) more often, which was found

using the Motion Without Movement parameter. Thus, fast accelerations, less distance walked, and distinctive “stomping in place during rest” behavior may make fruit flies grown with spiders sooner to leave dangerous areas and become less attractive to spiders while resting between two subsequent walks.

The swift and sporadic stomping in place is a kind of unexpected behavior of fruit flies grown with spiders. Instead of efficiently accumulating energy for the next series of walks, these flies spend their rest while quickly moving/shaking their bodies without spatial displacement. Despite being potentially more conspicuous to predators because of this activity, flies grown with spiders survived better than control flies when exposed to predators as adults. One explanation for this is that by turning in place and making small movements while staying in the same spot, these flies give predators false signals of their immediate future activities, such as flight initiation behavior (Card & Dickinson, 2008).

Another explanation for the improved survival of flies reared with spiders is that the exposure of fruit flies to predators may cause metabolic disorders, and active motions without spatial displacement may reflect conditions of altered physiology, such as sickness behavior characterized by a variety of coordinated symptoms such as anxiety, chaotic grooming behavior, and failure to concentrate (Hart, 1988). It has been traditionally considered that predators are supposed to select substandard prey such as young, inexperienced, or sick individuals (Genovart et al., 2010). However, it has also been shown that some predators can non-randomly avoid infected prey (Hamilton & Zuk, 1982; Jones et al., 2005; Meyling & Pell, 2006). Although this strategy of predation has received much less attention in the literature (Gutierrez et al., 2022), our results show one more mechanism for the improved survival of sick animals expressing less predictable and more erratic walking responses than fruit flies without a diabetes-like biochemical phenotype (Krama et al., 2023). Previous research showed that fruit flies with a diabetes-like biochemical phenotype rely only on fat as a catabolic fuel source, causing lower body fat content (Krams et al., 2016) and a 20% decrease in ATP levels (Krama et al., 2023). Also, fruit flies grown with spiders are known to have higher body nitrogen (N) content, suggesting increased muscle mass in these flies (Krams et al., 2016). Thus, higher body N and muscle mass, lower fat reserves, faster accelerations and faster exhaustion, more “stomping in place” behaviors, and lowered availability of ATP may explain more erratic and less predictable walking locomotion and better survival of fruit flies grown with spiders. Future research should test whether spiders actively avoid fruit flies with metabolic disorders and flies with infectious diseases and whether the behavior of infected flies resembles that of fruit flies experiencing metabolic diseases.

This study shows that some conditions other than infectious diseases can make fruit flies unpreferred prey as individuals grown under sustained stress of

predation survived better than control individuals when exposed to spider predation. Encountering stress during development and adulthood may lead to metabolic disorders, such as PTSD (Zanette et al., 2019) and diabetes-like phenotypes (Krama et al., 2023), often affecting the nervous and endocrine systems. Although the link between psychological conditions and dysfunctional glucose catabolism has been established (Hackett & Steptoe, 2017), our understanding of the signaling pathways connecting environmental stress, behavior, and biochemistry is rudimentary, and little is known about the impact of environmental stress on systemic metabolism. Based on the interconnections between physiology and behavior, we would predict higher senescence rates of walking behavior in flies grown with spiders. Eventually, even young fruit flies demonstrate a shift toward inefficient energy consumption at short sprints and an incapacity to cover long distances without accessible energy sources. Overall, a link between sickness behavior and improved survival under predation risk looks tempting; however, future research on the sickness behavior of fruit flies and other animals is needed because the underlying biochemical and behavioral mechanisms seem complex. Further studies on metabolism and movement of larvae, as well as the effects of senescence and their influence on behavior are also essential to develop a comprehensive interpretation of the observations.

## CONCLUSIONS

Predation risk was shown to significantly impact the serotonin signaling pathway, leading to increased variability in turning behavior among adult fruit flies. This increased behavioral unpredictability, as measured by the Median Absolute Deviation of turning biases, suggests a dynamic regulation of animal personality traits in response to environmental stressors, in this case, predation. The findings demonstrate that exposure to predators during developmental stages enhances the survival chances of fruit flies by making their movement patterns less predictable to predators, thereby complicating predator attack strategies.

Moreover, the studies highlighted a profound impact of predation stress on the metabolic processes within *Drosophila melanogaster*. Exposure to predators induced a diabetes-like phenotype characterized by impaired carbohydrate metabolism, systemic inhibition of Akt protein kinase, and a shift towards the utilization of fatty acids over carbohydrates. This metabolic dysregulation, while detrimental to the organism's energy balance and locomotor activity under normal conditions, conferred an advantage in predator-rich environments by possibly enhancing cognitive functions and behavioral responses crucial for evading predators.

Interestingly, the administration of metformin and 5-hydroxytryptophan was found to reverse the metabolic impairments and the survival advantage under predation, suggesting that the predator-induced metabolic and behavioral changes are closely linked to serotonin signaling pathways. These interventions highlight the potential for manipulating metabolic and neurotransmitter pathways to influence behavioral outcomes and survival strategies in prey species.

The research underscores the complexity of prey responses to predation stress, revealing that the non-lethal effects of predator exposure extend beyond immediate behavioral adaptations to encompass significant biochemical and physiological alterations. These changes, while adaptive in the context of predation, underscore the intricate balance between survival strategies and metabolic health in *D. melanogaster*. The findings suggest insights into the evolutionary pressures shaping prey defenses and the potential trade-offs involved in adapting to predation risk.

## ACKNOWLEDGEMENTS

I express my deep gratitude to my scientific supervisor professor Indriķis A. Krams. My work in science in general and this dissertation in particular became possible only through his tireless support and mentoring. I am also especially grateful to Tatjana Krama for careful laboratory work supervision, motivation and training.

I extend my gratitude to our co-author professor Benjamin L. de Bivort. His research and insights were key to this thesis' ideas development.

Special thanks to Giedrius Trakimas for his long and patient guidance in statistics, Colton Adams for meticulous English language proofing, and Ronalds Krams for his careful help with administrative tasks.

I would also like to thank my colleagues and co-authors Priit Jõers, Jorge Contreras-Garduño, Markus J. Rantala, Anne Must, Enno Merivee and Maris Munkevics, whose productive collaboration has allowed me to develop many skills and acquire new knowledge.

I express my gratitude to Eriks Sledevskis, Valdis Mizers, Diana Bahhir, Vadims Bartkevičs, Iveta Pugajeva and Didzis Elferts for prompt and exceptional cooperation.

My most important thanks go to my parents for their advice, constant energy and commitment, which allowed me to make it all the way to my doctoral thesis. I am grateful to my wife Alina Popova for her understanding, patience and motivation, as well as to my dog Bruschetta for providing psychological support.

The thesis was supported by European Social Fund project Nr. 8.2.2.0/20/I/003 and the Latvian Council of Science project Nr. lzp-2024/1-0437.

## REFERENCES

1. Akhund-Zade, J., Yoon, D., Bangerter, A., Polizos, N., Campbell, M., Soloshenko, A., Zhang, T., Wice, E., Albright, A., Narayanan, A., Schmidt, P., Saltz, J., Ayroles, J., Klein, M., Bergland, A., & Bivort, B. de. (2020). *Wild flies hedge their thermal preference bets in response to seasonal fluctuations* (p. 2020.09.16.300731). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.09.16.300731>
2. Al-Zoairy, R., Pedrini, M. T., Khan, M. I., Engl, J., Tschoner, A., Ebenbichler, C., Gstraunthaler, G., Salzmann, K., Bakry, R., & Niederwanger, A. (2017). Serotonin improves glucose metabolism by Serotonylation of the small GTPase Rab4 in L6 skeletal muscle cells. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13098-016-0201-1>
3. Anaka, M., Macdonald, C. D., Barkova, E., Simon, K., Rostom, R., Godoy, R. A., Haigh, A. J., Meinertzhagen, I. A., & Lloyd, V. (2008). The *white* Gene of *Drosophila melanogaster* Encodes a Protein with a Role in Courtship Behavior. *Journal of Neurogenetics*, 22(4), 243–276. <https://doi.org/10.1080/01677060802309629>
4. Arendt, J., & Skene, D. J. (2005). Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Medicine Reviews*, 9(1), 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2004.05.002>
5. Ayroles, J. F., Buchanan, S. M., O’Leary, C., Skutt-Kakaria, K., Grenier, J. K., Clark, A. G., Hartl, D. L., & de Bivort, B. L. (2015). Behavioral idiosyncrasy reveals genetic control of phenotypic variability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(21), 6706–6711. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503830112>
6. Bahhir, D., Yalgin, C., Ots, L., Järvinen, S., George, J., Naudí, A., Krama, T., Krams, I., Tamm, M., Andjelković, A., Dufour, E., Cózar, J. M. G. de, Gerards, M., Parhiala, M., Pamplona, R., Jacobs, H. T., & Jöders, P. (2019). Manipulating mtDNA in vivo reprograms metabolism via novel response mechanisms. *PLOS Genetics*, 15(10), e1008410. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008410>
7. Bartolo, G., Gonzalez, L. O., Alameh, S., Valencia, C. A., & Martchenko Shilman, M. (2020). Identification of glucocorticoid receptor in *Drosophila melanogaster*. *BMC Microbiology*, 20(1), 161. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01848-x>
8. Beaupere, C., Liboz, A., Fève, B., Blondeau, B., & Guillemain, G. (2021). Molecular Mechanisms of Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms22020623>

9. Bell, S. M., Burgess, T., Lee, J., Blackburn, D. J., Allen, S. P., & Mortiboys, H. (2020). Peripheral Glycolysis in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/ijms21238924>
10. Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
11. Bergland, A. O., Behrman, E. L., O'Brien, K. R., Schmidt, P. S., & Petrov, D. A. (2014). Genomic Evidence of Rapid and Stable Adaptive Oscillations over Seasonal Time Scales in *Drosophila*. *PLOS Genetics*, 10(11), e1004775. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004775>
12. Bilecenoğlu, M. (2005). Observations on the burrowing behaviour of the Dwarf Blaasop, *Torquigener flavimaculosus* (Osteichthyes: Tetraodontidae) along the coast of Fethiye, Turkey. *Zoology in the Middle East*, 35(1), 29–34. <https://doi.org/10.1080/09397140.2005.10638100>
13. Borycz, J., Borycz, J. A., Kubów, A., Lloyd, V., & Meinertzhagen, I. A. (2008). *Drosophila* ABC transporter mutants *white*, *brown* and *scarlet* have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain. *Journal of Experimental Biology*, 211(21), 3454–3466. <https://doi.org/10.1242/jeb.021162>
14. Brosnan, J. T. (1999). Comments on metabolic needs for glucose and the role of gluconeogenesis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(1), s107–s111. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600748>
15. Buchanan, S. M., Kain, J. S., & de Bivort, B. L. (2015). Neuronal control of locomotor handedness in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(21), 6700–6705. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500804112>
16. Burns, J. G., Foucaud, J., & Mery, F. (2010). Costs of memory: Lessons from ‘mini’ brains. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1707), 923–929. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2488>
17. Caballero, A., Villanueva, B., & Druet, T. (2021). On the estimation of inbreeding depression using different measures of inbreeding from molecular markers. *Evolutionary Applications*, 14(2), 416–428. <https://doi.org/10.1111/eva.13126>
18. Campbell, J. L., & Nash, H. A. (2001). Volatile general anesthetics reveal a neurobiological role for the *white* and *brown* genes of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurobiology*, 49(4), 339–349. <https://doi.org/10.1002/neu.10009>

19. Card, G., & Dickinson, M. (2008). Performance trade-offs in the flight initiation of *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology*, 211(3), 341–353. <https://doi.org/10.1242/jeb.012682>
20. Chan, R. F., Lewellyn, L., DeLoyht, J. M., Sennett, K., Coffman, S., Hewitt, M., Bettinger, J. C., Warrick, J. M., & Grotewiel, M. (2014). Contrasting Influences of *Drosophila white/mini-white* on Ethanol Sensitivity in Two Different Behavioral Assays. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(6), 1582–1593. <https://doi.org/10.1111/acer.12421>
21. Chen, L., Shen, B., Liu, D., & Li, S. (2014). The Effects of Early-Life Predator Stress on Anxiety- and Depression-Like Behaviors of Adult Rats. *Neural Plasticity*, 2014, e163908. <https://doi.org/10.1155/2014/163908>
22. Chirgwin, E., Monro, K., Sgro, C. M., & Marshall, D. J. (2015). Revealing hidden evolutionary capacity to cope with global change. *Global Change Biology*, 21(9), 3356–3366. <https://doi.org/10.1111/gcb.12929>
23. Condon, C., Cooper, B. S., Yeaman, S., & Angilletta, M. J., Jr. (2014). Temporal variation favors the evolution of generalists in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 68(3), 720–728. <https://doi.org/10.1111/evo.12296>
24. Darwin, C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection*. Appleton.
25. Dasari, S., Viele, K., Turner, A. C., & Cooper, R. L. (2007). Influence of PCPA and MDMA (ecstasy) on physiology, development and behavior in *Drosophila melanogaster*. *European Journal of Neuroscience*, 26(2), 424–438. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05655.x>
26. de Bivort, B., Buchanan, S., Skutt-Kakaria, K., Gajda, E., Ayroles, J., O’Leary, C., Reimers, P., Akhund-Zade, J., Senft, R., Maloney, R., Ho, S., Werkhoven, Z., & Smith, M. A.-Y. (2022). Precise Quantification of Behavioral Individuality From 80 Million Decisions Across 183,000 Flies. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.836626>
27. Diegelmann, S., Zars, M., & Zars, T. (2006). Genetic dissociation of acquisition and memory strength in the heat-box spatial learning paradigm in *Drosophila*. *Learning & Memory*, 13(1), 72–83. <https://doi.org/10.1101/lm.45506>
28. Dierick, H. A., & Greenspan, R. J. (2007). Serotonin and neuropeptide F have opposite modulatory effects on fly aggression. *Nature Genetics*, 39(5), 678–682. <https://doi.org/10.1038/ng2029>
29. Draghi, J. A. (2023). Bet-hedging via dispersal aids the evolution of plastic responses to unreliable cues. *Journal of Evolutionary Biology*, 36(6), 893–905. <https://doi.org/10.1111/jeb.14182>

30. Dremencov, E., Lapshin, M., Komelkova, M., Alliluev, A., Tseilikman, O., Karpenko, M., Pestereva, N., Manukhina, E., Downey, H. F., & Tseilikman, V. (2019). Chronic predator scent stress alters serotonin and dopamine levels in the rat thalamus and hypothalamus, respectively. *General Physiology and Biophysics*, 38(02), 187–190. [https://doi.org/10.4149/gpb\\_2019003](https://doi.org/10.4149/gpb_2019003)
31. Eifler, D., & Eifler, M. (2014). Escape tactics in the lizard *Meroleles cuneirostris*. *Amphibia-Reptilia*, 35(4), 383–389. <https://doi.org/10.1163/15685381-00002963>
32. Ferreira, M. J., Pérez, C., Marchesano, M., Ruiz, S., Caputi, A., Aguilera, P., Barrio, R., & Cantera, R. (2018). *Drosophila melanogaster* White Mutant *w<sup>1118</sup>* Undergo Retinal Degeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00732>
33. Flor, M. de la, Chen, L., Manson-Bishop, C., Chu, T.-C., Zamora, K., Robbins, D., Gunaratne, G., & Roman, G. (2017). *Drosophila* increase exploration after visually detecting predators. *PLOS ONE*, 12(7), e0180749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180749>
34. Gavrillets, S., & Scheiner, S. M. (1993). The genetics of phenotypic plasticity. V. Evolution of reaction norm shape. *Journal of Evolutionary Biology*, 6(1), 31–48. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1993.6010031.x>
35. Genovart, M., Negre, N., Tavecchia, G., Bistuer, A., Parnal, L., & Oro, D. (2010). The Young, the Weak and the Sick: Evidence of Natural Selection by Predation. *PLOS ONE*, 5(3), e9774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009774>
36. Gonzalez, V. G., Moreta, A. H., Triana, A. M., Sierra, L. R., García, I. C., & Méndez, N. I. (2020). Prolapsed cervical myoma during pregnancy. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 252, 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.06.039>
37. Graham, P., & Pick, L. (2017). Chapter Thirteen—*Drosophila* as a Model for Diabetes and Diseases of Insulin Resistance. In L. Pick (Ed.), *Fly Models of Human Diseases* (Vol. 121, pp. 397–419). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.07.011>
38. Green, M. M. (1996). The “Genesis of the White-Eyed Mutant” in *Drosophila melanogaster*: A Reappraisal. *Genetics*, 142(2), 329–331. <https://doi.org/10.1093/genetics/142.2.329>
39. Greenwood, C. E., & Winocur, G. (2001). Glucose Treatment Reduces Memory Deficits in Young Adult Rats Fed High-Fat Diets. *Neurobiology of Learning and Memory*, 75(2), 179–189. <https://doi.org/10.1006/nlme.2000.3964>
40. Gronke, S., Clarke, D.-F., Broughton, S., Andrews, T. D., & Partridge, L. (2010). Molecular Evolution and Functional Characterization of

- Drosophila* Insulin-Like Peptides. *PLOS Genetics*, 6(2), e1000857. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000857>
41. Gutierrez, S. O., Minchella, D. J., & Bernal, X. E. (2022). Survival of the sickest: Selective predation differentially modulates ecological and evolutionary disease dynamics. *Oikos*, 2022(9), e09126. <https://doi.org/10.1111/oik.09126>
  42. Hackett, R. A., & Steptoe, A. (2017). Type 2 diabetes mellitus and psychological stress—A modifiable risk factor. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(9), 547–560. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.64>
  43. Hamilton, W. D., & Zuk, M. (1982). Heritable True Fitness and Bright Birds: A Role for Parasites? *Science*, 218(4570), 384–387. <https://doi.org/10.1126/science.7123238>
  44. Hardeland, R., & Poeggeler, B. (2003). Non-vertebrate melatonin. *Journal of Pineal Research*, 34(4), 233–241. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2003.00040.x>
  45. Hart, B. L. (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 12(2), 123–137. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(88\)80004-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(88)80004-6)
  46. Hawlena, D., & Schmitz, O. J. (2010a). Herbivore physiological response to predation risk and implications for ecosystem nutrient dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(35), 15503–15507. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009300107>
  47. Hawlena, D., & Schmitz, O. J. (2010b). Physiological Stress as a Fundamental Mechanism Linking Predation to Ecosystem Functioning. *The American Naturalist*, 176(5), 537–556. <https://doi.org/10.1086/656495>
  48. Honegger, K., & De Bivort, B. (2018). Stochasticity, individuality and behavior. *Current Biology*, 28(1), R8–R12. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.058>
  49. Honegger, K. S., Smith, M. A.-Y., Churgin, M. A., Turner, G. C., & de Bivort, B. L. (2020). Idiosyncratic neural coding and neuromodulation of olfactory individuality in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(38), 23292–23297. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901623116>
  50. Hopper, K. R. (1999). RISK-SPREADING AND BET-HEDGING IN INSECT POPULATION BIOLOGY1. *Annual Review of Entomology*, 44(Volume 44, 1999), 535–560. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.535>
  51. Hossie, T. J., Ferland-Raymond, B., Burness, G., & Murray, D. L. (2010). Morphological and behavioural responses of frog tadpoles to perceived predation risk: A possible role for corticosterone mediation? *Écoscience*. <https://doi.org/10.2980/17-1-3312>

52. Hu, S. W., Yang, Y. T., Sun, Y., Zhan, Y. P., & Zhu, Y. (2020). Serotonin Signals Overcome Loser Mentality in *Drosophila*. *iScience*, 23(11). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101651>
53. Huang, X., Liu, G., Guo, J., & Su, Z. (2018). The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *International Journal of Biological Sciences*, 14(11), 1483–1496. <https://doi.org/10.7150/ijbs.27173>
54. Huber, P. J. (2004). *Robust Statistics*. John Wiley & Sons.
55. Ishimoto, H., & Kitamoto, T. (2011). Beyond molting-roles of the steroid molting hormone ecdysone in regulation of memory and sleep in adult *Drosophila*. *Fly*, 5(3), 215–220. <https://doi.org/10.4161/fly.5.3.15477>
56. Ishimoto, H., Sakai, T., & Kitamoto, T. (2009). Ecdysone signaling regulates the formation of long-term courtship memory in adult *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(15), 6381–6386. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810213106>
57. Ishimoto, H., Wang, Z., Rao, Y., Wu, C.-F., & Kitamoto, T. (2013). A Novel Role for Ecdysone in *Drosophila* Conditioned Behavior: Linking GPCR-Mediated Non-canonical Steroid Action to cAMP Signaling in the Adult Brain. *PLOS Genetics*, 9(10), e1003843. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003843>
58. Izutsu, M., Toyoda, A., Fujiyama, A., Agata, K., & Fuse, N. (2016). Dynamics of Dark-Fly Genome Under Environmental Selections. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 6(2), 365–376. <https://doi.org/10.1534/g3.115.023549>
59. Janssens, L., & Stoks, R. (2014). Chronic Predation Risk Reduces Escape Speed by Increasing Oxidative Damage: A Deadly Cost of an Adaptive Antipredator Response. *PLOS ONE*, 9(6), e101273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101273>
60. Janssens, L., & Stoks, R. (2018). Rapid larval development under time stress reduces adult life span through increasing oxidative damage. *Functional Ecology*, 32(4), 1036–1045. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13068>
61. Joh, T. H. (2000). Tryptophan Hydroxylase: Molecular Biology and Regulation. In H. G. Baumgarten & M. Göthert (Eds.), *Serotonergic Neurons and 5-HT Receptors in the CNS* (pp. 117–129). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-60921-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60921-3_4)
62. Jones, G. A., Sieving, K. E., Avery, M. L., & Meagher, R. L. (2005). Parasitized and non-parasitized prey selectivity by an insectivorous bird. *Crop Protection*, 24(2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.07.002>

63. Jones, K. A., Jackson, A. L., & Ruxton, G. D. (2011). Prey jitters; protean behaviour in grouped prey. *Behavioral Ecology*, 22(4), 831–836. <https://doi.org/10.1093/beheco/arr062>
64. Jones, T. M., Durrant, J., Michaelides, E. B., & Green, M. P. (2015). Melatonin: A possible link between the presence of artificial light at night and reductions in biological fitness. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1667), 20140122. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0122>
65. Kain, J. S., Stokes, C., & de Bivort, B. L. (2012). Phototactic personality in fruit flies and its suppression by serotonin and *white*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(48), 19834–19839. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211988109>
66. Kain, J. S., Zhang, S., Akhund-Zade, J., Samuel, A. D. T., Klein, M., & de Bivort, B. L. (2015). Variability in thermal and phototactic preferences in *Drosophila* may reflect an adaptive bet-hedging strategy. *Evolution*, 69(12), 3171–3185. <https://doi.org/10.1111/evo.12813>
67. Kalmus, H. (1943). The optomotor responses of some eye mutants of *Drosophila*. *Journal of Genetics*, 45(2), 206–213. <https://doi.org/10.1007/BF02982936>
68. Kaplan, D. D., Zimmermann, G., Suyama, K., Meyer, T., & Scott, M. P. (2008). A nucleostemin family GTPase, NS3, acts in serotonergic neurons to regulate insulin signaling and control body size. *Genes & Development*, 22(14), 1877–1893. <https://doi.org/10.1101/gad.1670508>
69. Kawecki, T. J. (2000). The Evolution of Genetic Canalization Under Fluctuating Selection. *Evolution*, 54(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00001.x>
70. Kondashevskaya, M. V., Downey, H. F., Tseilikman, V. E., Alexandrin, V. V., Artem'yeva, K. A., Aleksankina, V. V., Tseilikman, O. B., Pashkov, A. A., Goryacheva, A. V., Ivleva, I. S., Karpenko, M. N., Shatilov, V. A., & Manukhina, E. B. (2022). Cerebral Blood Flow in Predator Stress-Resilient and -Susceptible Rats and Mechanisms of Resilience. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/ijms232314729>
71. Kovalenko, E. V., Mazina, M. Y., Krasnov, A. N., & Vorobyeva, N. E. (2019). The *Drosophila* nuclear receptors EcR and ERR jointly regulate the expression of genes involved in carbohydrate metabolism. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 112, 103184. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103184>
72. Krama, T., Bahhir, D., Ots, L., Popovs, S., Bartkevičs, V., Pugajeva, I., Krams, R., Merivee, E., Must, A., Rantala, M. J., Krams, I., & Jõers, P. (2023). A diabetes-like biochemical and behavioural phenotype of

- Drosophila* induced by predator stress. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 290(2002), 20230442. <https://doi.org/10.1098/rspb.2023.0442>
73. Krama, T., Munkevics, M., Krams, R., Grigorjeva, T., Trakimas, G., Jöers, P., Popovs, S., Zants, K., Elferts, D., Rantala, M. J., Sledevskis, E., Contreras-Garduño, J., de Bivort, B. L., & Krams, I. A. (2023). Development under predation risk increases serotonin-signaling, variability of turning behavior and survival in adult fruit flies *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2023.1189301>
  74. Krams, I. (2002). Mass-dependent take-off ability in wintering great tits (*Parus major*): Comparison of top-ranked adult males and subordinate juvenile females. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51(4), 345–349. <https://doi.org/10.1007/s00265-002-0452-8>
  75. Krams, I. A., Krama, T., Krams, R., Trakimas, G., Popovs, S., Jöers, P., Munkevics, M., Elferts, D., Rantala, M. J., Makna, J., & de Bivort, B. L. (2021). Serotonergic Modulation of Phototactic Variability Underpins a Bet-Hedging Strategy in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.659331>
  76. Krams, I. A., Krams, R., Jöers, P., Munkevics, M., Trakimas, G., Luoto, S., Eichler, S., Butler, D. M., Merivee, E., Must, A., Rantala, M. J., Contreras-Garduño, J., & Krama, T. (2020). Developmental speed affects ecological stoichiometry and adult fat reserves in *Drosophila melanogaster*. *Animal Biology*, 71(1), 1–20. <https://doi.org/10.1163/15707563-bja10043>
  77. Krams, I., Inwood, S. E., Trakimas, G., Krams, R., Burghardt, G. M., Butler, D. M., Luoto, S., & Krama, T. (2016). Short-term exposure to predation affects body elemental composition, climbing speed and survival ability in *Drosophila melanogaster*. *PeerJ*, 4, e2314. <https://doi.org/10.7717/peerj.2314>
  78. Krams, I., Trakimas, G., Kecko, S., Elferts, D., Krams, R., Luoto, S., Rantala, M. J., Mänd, M., Kuusik, A., Kekäläinen, J., Jöers, P., Kortet, R., & Krama, T. (2018). Linking organismal growth, coping styles, stress reactivity, and metabolism via responses against a selective serotonin reuptake inhibitor in an insect. *Scientific Reports*, 8(1), 8599. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26722-9>
  79. Krams, R., Krama, T., Munkevics, M., Eichler, S., Butler, D. M., Dobkeviča, L., Jöers, P., Contreras-Garduño, J., Daukste, J., & Krams, I. A. (2021). Spider odors induce stoichiometric changes in fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Current Zoology*, 67(1), 127–129. <https://doi.org/10.1093/cz/zoaa070>

80. Kuo, T., McQueen, A., Chen, T.-C., & Wang, J.-C. (2015). Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. In J.-C. Wang & C. Harris (Eds.), *Glucocorticoid Signaling: From Molecules to Mice to Man* (pp. 99–126). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_5)
81. Lam, R. W., Zis, A. P., Grewal, A., Delgado, P. L., Charney, D. S., & Krystal, J. H. (1996). Effects of Rapid Tryptophan Depletion in Patients With Seasonal Affective Disorder in Remission After Light Therapy. *Archives of General Psychiatry*, 53(1), 41–44. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1996.01830010043007>
82. Lee, Y., Paik, D., Bang, S., Kang, J., Chun, B., Lee, S., Bae, E., Chung, J., & Kim, J. (2008). Loss of spastic paraplegia gene *atlastin* induces age-dependent death of dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Neurobiology of Aging*, 29(1), 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.09.004>
83. Lehmann, K. D. S., Goldman, B. W., Dworkin, I., Bryson, D. M., & Wagner, A. P. (2014). From Cues to Signals: Evolution of Interspecific Communication via Aposematism and Mimicry in a Predator-Prey System. *PLOS ONE*, 9(3), e91783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091783>
84. Li, H., Horns, F., Wu, B., Xie, Q., Li, J., Li, T., Luginbuhl, D. J., Quake, S. R., & Luo, L. (2017). Classifying *Drosophila* Olfactory Projection Neuron Subtypes by Single-Cell RNA Sequencing. *Cell*, 171(5), 1206–1220.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.019>
85. Majeed, Z. R., Abdeljaber, E., Soveland, R., Cornwell, K., Bankemper, A., Koch, F., & Cooper, R. L. (2016). Modulatory Action by the Serotonergic System: Behavior and Neurophysiology in *Drosophila melanogaster*. *Neural Plasticity*, 2016, e7291438. <https://doi.org/10.1155/2016/7291438>
86. Maloney, R. T. (2021). Neuromodulation and Individuality. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.777873>
87. McCollum, S. A., & Leimberger, J. D. (1997). Predator-induced morphological changes in an amphibian: Predation by dragonflies affects tadpole shape and color. *Oecologia*, 109(4), 615–621. <https://doi.org/10.1007/s004420050124>
88. Merilä, J., & Hendry, A. P. (2014). Climate change, adaptation, and phenotypic plasticity: The problem and the evidence. *Evolutionary Applications*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/eva.12137>
89. Meyling, N. V., & Pell, J. K. (2006). Detection and avoidance of an entomopathogenic fungus by a generalist insect predator. *Ecological Entomology*, 31(2), 162–171. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2006.00781.x>
90. Mollá-Albaladejo, R., & Sánchez-Alcañiz, J. A. (2021). Behavior Individuality: A Focus on *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.719038>

91. Morawska, L. P., Hernandez-Valdes, J. A., & Kuipers, O. P. (2022). Diversity of bet-hedging strategies in microbial communities-Recent cases and insights. *WIREs Mechanisms of Disease*, 14(2), e1544. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1544>
92. Morgan, T. H. (1910). Sex Limited Inheritance in *Drosophila*. *Science*, 32(812), 120–122. <https://doi.org/10.1126/science.32.812.120>
93. Neckameyer, W. S. (1996). Multiple Roles for Dopamine in *Drosophila* Development. *Developmental Biology*, 176(2), 209–219. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0128>
94. Neckameyer, W. S. (2010). A Trophic Role for Serotonin in the Development of a Simple Feeding Circuit. *Developmental Neuroscience*, 32(3), 217–237. <https://doi.org/10.1159/000304888>
95. Neumeister, A., Praschak-Rieder, N., Hesselmann, B., Vitouch, O., Rauh, M., Barocka, A., & Kasper, S. (1998). Effects of tryptophan depletion in fully remitted patients with seasonal affective disorder during summer. *Psychological Medicine*, 28(2), 257–264. <https://doi.org/10.1017/S0033291797006375>
96. Niccoli, T., Cabecinha, M., Tillmann, A., Kerr, F., Wong, C. T., Cardenes, D., Vincent, A. J., Bettedi, L., Li, L., Grönke, S., Dols, J., & Partridge, L. (2016). Increased Glucose Transport into Neurons Rescues A $\beta$  Toxicity in *Drosophila*. *Current Biology*, 26(17), 2291–2300. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.017>
97. Niederkofler, V., Asher, T. E., & Dymecki, S. M. (2015). Functional Interplay between Dopaminergic and Serotonergic Neuronal Systems during Development and Adulthood. *ACS Chemical Neuroscience*, 6(7), 1055–1070. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00021>
98. Niens, J., Reh, F., Çoban, B., Cichewicz, K., Eckardt, J., Liu, Y.-T., Hirsh, J., & Riemensperger, T. D. (2017). Dopamine Modulates Serotonin Innervation in the *Drosophila* Brain. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00076>
99. Nilsson, G. E., & Renshaw, G. M. C. (2004). Hypoxic survival strategies in two fishes: Extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *Journal of Experimental Biology*, 207(18), 3131–3139. <https://doi.org/10.1242/jeb.00979>
100. Olofsson, H., Ripa, J., & Jonzén, N. (2009). Bet-hedging as an evolutionary game: The trade-off between egg size and number. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1669), 2963–2969. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0500>
101. Omura, D. T., Clark, D. A., Samuel, A. D. T., & Horvitz, H. R. (2012). Dopamine Signaling Is Essential for Precise Rates of Locomotion by C.

- elegans. *PLOS ONE*, 7(6), e38649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038649>
102. O'Steen, S., Cullum, A. J., & Bennett, A. F. (2002). Rapid Evolution of Escape Ability in Trinidadian Guppies (*Poecilia Reticulata*). *Evolution*, 56(4), 776–784. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb01388.x>
  103. Pantoja, C., Hoagland, A., Carroll, E. C., Karalis, V., Conner, A., & Isacoff, E. Y. (2016). Neuromodulatory Regulation of Behavioral Individuality in Zebrafish. *Neuron*, 91(3), 587–601. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.016>
  104. Pepling, M., & Mount, S. M. (1990). Sequence of a cDNA from the *Drosophila melanogaster white* gene. *Nucleic Acids Research*, 18(6), 1633. <https://doi.org/10.1093/nar/18.6.1633>
  105. Pham, J., Cabrera, S. M., Sanchis-Segura, C., & Wood, M. A. (2009). Automated scoring of fear-related behavior using EthoVision software. *Journal of Neuroscience Methods*, 178(2), 323–326. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.12.021>
  106. Pires, A., & Woollacott, R. M. (1997). Serotonin and Dopamine Have Opposite Effects on Phototaxis in Larvae of the Bryozoan *Bugula neritina*. *The Biological Bulletin*, 192(3), 399–409. <https://doi.org/10.2307/1542749>
  107. Placais, P.-Y., de Tredern, É., Scheunemann, L., Trannoy, S., Goguel, V., Han, K.-A., Isabel, G., & Preat, T. (2017). Upregulated energy metabolism in the *Drosophila* mushroom body is the trigger for long-term memory. *Nature Communications*, 8(1), 15510. <https://doi.org/10.1038/ncomms15510>
  108. Raj, A., Rifkin, S. A., Andersen, E., & van Oudenaarden, A. (2010). Variability in gene expression underlies incomplete penetrance. *Nature*, 463(7283), 913–918. <https://doi.org/10.1038/nature08781>
  109. Rantala, M. J., Luoto, S., Krama, T., & Krams, I. (2019). Eating Disorders: An Evolutionary Psychoneuroimmunological Approach. *Frontiers in Psychology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.02200>
  110. Rantala, M. J., Luoto, S., Krams, I., & Karlsson, H. (2018). Depression subtyping based on evolutionary psychiatry: Proximate mechanisms and ultimate functions. *Brain, Behavior, and Immunity*, 69, 603–617. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.012>
  111. Reale, D., Dingemanse, N. J., Kazem, A. J. N., & Wright, J. (2010). Evolutionary and ecological approaches to the study of personality. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1560), 3937–3946. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0222>
  112. Richardson, G., Dickinson, P., Burman, O. H. P., & Pike, T. W. (2018). Unpredictable movement as an anti-predator strategy. *Proceedings of the*

- Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1885), 20181112. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1112>
113. Richter, K., Peschke, E., & Peschke, D. (2000). A neuroendocrine releasing effect of melatonin in the brain of an insect, *Periplaneta americana* (L.). *Journal of Pineal Research*, 28(3), 129–135. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2001.280301.x>
  114. Ries, A.-S., Hermanns, T., Poeck, B., & Strauss, R. (2017). Serotonin modulates a depression-like state in *Drosophila* responsive to lithium treatment. *Nature Communications*, 8(1), 15738. <https://doi.org/10.1038/ncomms15738>
  115. Roche, D. G., Careau, V., & Binning, S. A. (2016). Demystifying animal ‘personality’ (or not): Why individual variation matters to experimental biologists. *Journal of Experimental Biology*, 219(24), 3832–3843. <https://doi.org/10.1242/jeb.146712>
  116. Roozendaal, B. (2002). Stress and Memory: Opposing Effects of Glucocorticoids on Memory Consolidation and Memory Retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3), 578–595. <https://doi.org/10.1006/nlme.2002.4080>
  117. Russig, H., Pezze, M.-A., Nanz-Bahr, N. I., Pryce, C. R., Feldon, J., & Murphy, C. A. (2003). Amphetamine withdrawal does not produce a depressive-like state in rats as measured by three behavioral tests. *Behavioural Pharmacology*, 14(1), 1.
  118. Sardeshpande, M., & Shackleton, C. (2019). Wild Edible Fruits: A Systematic Review of an Under-Researched Multifunctional NTFP (Non-Timber Forest Product). *Forests*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/f10060467>
  119. Schuett, W., Dall, S. R. X., Baeumer, J., Kloesener, M. H., Nakagawa, S., Beinlich, F., & Eggers, T. (2011). Personality variation in a clonal insect: The pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Developmental Psychobiology*, 53(6), 631–640. <https://doi.org/10.1002/dev.20538>
  120. Siepielski, A. M., Morrissey, M. B., Buoro, M., Carlson, S. M., Caruso, C. M., Clegg, S. M., Coulson, T., DiBattista, J., Gotanda, K. M., Francis, C. D., Hereford, J., Kingsolver, J. G., Augustine, K. E., Kruuk, L. E. B., Martin, R. A., Sheldon, B. C., Sletvold, N., Svensson, E. I., Wade, M. J., & MacColl, A. D. C. (2017). Precipitation drives global variation in natural selection. *Science*, 355(6328), 959–962. <https://doi.org/10.1126/science.aag2773>
  121. Siepielski, A. M., Wang, J., & Prince, G. (2014). Nonconsumptive predator-driven mortality causes natural selection on prey. *Evolution*, 68(3), 696–704. <https://doi.org/10.1111/evo.12294>

122. Sitaraman, D., Zars, M., LaFerriere, H., Chen, Y.-C., Sable-Smith, A., Kitamoto, T., Rottinghaus, G. E., & Zars, T. (2008). Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14), 5579–5584. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710168105>
123. Smith, K. A., Fairburn, C. G., & Cowen, P. J. (1997). Relapse of depression after rapid depletion of tryptophan. *The Lancet*, 349(9056), 915–919. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)07044-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)07044-4)
124. Smith, M. A., Riby, L. M., Eekelen, J. A. M. van, & Foster, J. K. (2011). Glucose enhancement of human memory: A comprehensive research review of the glucose memory facilitation effect. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(3), 770–783. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.09.008>
125. Stern, S., Kirst, C., & Bargmann, C. I. (2017). Neuromodulatory Control of Long-Term Behavioral Patterns and Individuality across Development. *Cell*, 171(7), 1649–1662.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.041>
126. Tan, D.-X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Korkmaz, A., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Fuentes-Broto, L., & Reiter, R. J. (2010). The changing biological roles of melatonin during evolution: From an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biological Reviews*, 85(3), 607–623. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00118.x>
127. Tennessen, J. M., Baker, K. D., Lam, G., Evans, J., & Thummel, C. S. (2011). The *Drosophila* Estrogen-Related Receptor Directs a Metabolic Switch that Supports Developmental Growth. *Cell Metabolism*, 13(2), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.005>
128. Teran, R., Bonilla, E., Medina-Leendertz, S., Mora, M., Villalobos, V., Paz, M., & Arcaya, J. L. (2012). The life span of *Drosophila melanogaster* is affected by melatonin and thioctic acid. *Investigacion Clinica*, 53(3), 250–261.
129. Titlow, J. S., Rice, J., Majeed, Z. R., Holsopple, E., Biecker, S., & Cooper, R. L. (2014). Anatomical and genotype-specific mechanosensory responses in *Drosophila melanogaster* larvae. *Neuroscience Research*, 83, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.04.003>
130. Tobler, R., Hermisson, J., & Schlötterer, C. (2015). Parallel trait adaptation across opposing thermal environments in experimental *Drosophila melanogaster* populations. *Evolution*, 69(7), 1745–1759. <https://doi.org/10.1111/evo.12705>
131. Totani, Y., Nakai, J., Dyakonova, V. E., Lukowiak, K., Sakakibara, M., & Ito, E. (2020). Induction of LTM following an Insulin Injection. *eNeuro*, 7(2). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0088-20.2020>

132. Trakimas, G., Krams, R., Krama, T., Kortet, R., Haque, S., Luoto, S., Eichler Inwood, S., Butler, D. M., Jöers, P., Hawlena, D., Rantala, M. J., Elferts, D., Contreras-Garduño, J., & Krams, I. (2019). Ecological Stoichiometry: A Link Between Developmental Speed and Physiological Stress in an Omnivorous Insect. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00042>
133. Tufto, J. (2015). Genetic evolution, plasticity, and bet-hedging as adaptive responses to temporally autocorrelated fluctuating selection: A quantitative genetic model. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 69(8), 2034–2049. <https://doi.org/10.1111/evo.12716>
134. Werkhoven, Z., Bravin, A., Skutt-Kakaria, K., Reimers, P., Pallares, L. F., Ayroles, J., & de Bivort, B. L. (2021). The structure of behavioral variation within a genotype. *eLife*, 10, e64988. <https://doi.org/10.7554/eLife.64988>
135. Winberg, S., Nilsson, G. E., Spruijt, B. M., & Höglund, U. (1993). Spontaneous Locomotor Activity in Arctic Charr Measured by a Computerized Imaging Technique: Role of Brain Serotonergic Activity. *Journal of Experimental Biology*, 179(1), 213–232. <https://doi.org/10.1242/jeb.179.1.213>
136. Winocur, G., & Gagnon, S. (1998). Glucose Treatment Attenuates Spatial Learning and Memory Deficits of Aged Rats on Tests of Hippocampal Function. *Neurobiology of Aging*, 19(3), 233–241. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(98\)00057-8](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(98)00057-8)
137. Wirth, M. M. (2015). Hormones, Stress, and Cognition: The Effects of Glucocorticoids and Oxytocin on Memory. *Adaptive Human Behavior and Physiology*, 1(2), 177–201. <https://doi.org/10.1007/s40750-014-0010-4>
138. Wu, Q., & Brown, M. R. (2006). SIGNALING AND FUNCTION OF INSULIN-LIKE PEPTIDES IN INSECTS. *Annual Review of Entomology*, 51(Volume 51, 2006), 1–24. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151011>
139. Wu, Y.-P., Gao, H.-Y., Ouyang, S.-H., Kurihara, H., He, R.-R., & Li, Y.-F. (2019). Predator stress-induced depression is associated with inhibition of hippocampal neurogenesis in adult male mice. *Neural Regeneration Research*, 14(2), 298. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.244792>
140. Xiao, C., & Robertson, R. M. (2016). Timing of Locomotor Recovery from Anoxia Modulated by the *white* Gene in *Drosophila*. *Genetics*, 203(2), 787–797. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.185066>
141. Yager, D. D., May, M. L., & Fenton, M. B. (1990). Ultrasound-triggered, flight-gated evasive maneuvers in the praying mantis *Parasphendale agrionina* I. Free flight. *Journal of Experimental Biology*, 152(1), 17–39. <https://doi.org/10.1242/jeb.152.1.17>

142. Yamanaka, N., Rewitz, K. F., & O'Connor, M. B. (2013). Ecdysone Control of Developmental Transitions: Lessons from *Drosophila* Research. *Annual Review of Entomology*, 58(Volume 58, 2013), 497–516. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153608>
143. Young, S. N., Smith, S. E., Pihl, R. O., & Ervin, F. R. (1985). Tryptophan depletion causes a rapid lowering of mood in normal males. *Psychopharmacology*, 87(2), 173–177. <https://doi.org/10.1007/BF00431803>
144. Zanette, L. Y., & Clinchy, M. (2020). Ecology and Neurobiology of Fear in Free-Living Wildlife. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 51 (Volume 51, 2020), 297–318. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-011720-124613>
145. Zanette, L. Y., Hobbs, E. C., Witterick, L. E., MacDougall-Shackleton, S. A., & Clinchy, M. (2019). Predator-induced fear causes PTSD-like changes in the brains and behaviour of wild animals. *Scientific Reports*, 9(1), 11474. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47684-6>
146. Zhang, S. D., & Odenwald, W. F. (1995). Misexpression of the *white* (w) gene triggers male-male courtship in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12), 5525–5529. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5525>

Sergejs Popovs. Neprognozējamība kā upura adaptīvās uzvedības pazīme: augļu mušu (*Drosophila melanogaster*) piemērs. *Promocijas darba kopsavilkums* = Unpredictability as an adaptive behavioral characteristic of prey: the case of fruit flies (*Drosophila melanogaster*). *Summary of the Thesis for Obtaining the Doctoral Degree*. Daugavpils: Daugavpils Universitātes Akadēmiskais apgāds “Saule”, 2025. 120 lpp.

• • • • •

Izdevējdarbības reģistr. apliecība Nr. 2-0197.  
Iespiests DU Akadēmiskajā apgādā „Saule” –  
Vienības iela 13, Daugavpils, LV–5401, Latvija