

Uticaj kofeina na komponente adaptivne vrednosti vrste *Drosophila melanogaster*

Linije jedinki Drosophila melanogaster dobijene gajenjem kroz tri generacije na standardnom supstratu bez kofeina i supstratima sa koncentracijama kofeina od 100 µg/mL i 1000 µg/mL prebačene su na svaki od ova tri supstrata čime je dobijeno devet eksperimentalnih grupa. Ispitivane su tri komponente adaptivne vrednosti – brzina razvića, preživljavanje i dužina krila. Analizom podataka utvrđeno je da se kod kontrolne linije (jedinke gajene na supstratu bez kofeina) i linije dobijene gajenjem na nižoj koncentraciji kofeina brzina razvića značajno usporava a procenat preživljavanja smanjuje na supstratu sa višom koncentracijom kofeina u poređenju sa standardnim i supstratom sa nižom koncentracijom kofeina. Sličan obrazac se primećuje i kod dužine krila, osim kod mužjaka kontrolne linije. Kod linije dobijene gajenjem jedinki na supstratu sa višom koncentracijom kofeina usporavanje brzine razvića, kao i pad preživljavanja i veličine krila na višoj koncentraciji kofeina nisu značajne u poređenju sa vrednostima na standardnom supstratu i supstratu sa nižom koncentracijom kofeina. Takođe, kod ove linije za jedinke gajene na višoj koncentraciji kofeina dobijeno je da su procenat preživljavanja, veličina krila, kao i brzina razvića značajno veći u odnosu na preostale dve linije. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju hipotezu da prisustvo kofeina u supstratu u koncentraciji od 1000 µg/mL u toku tri generacije dovodi do genetičke adaptacije, dok je koncentracija od 100 µg/mL dovoljna da izazove akutni fiziološki odgovor.

Uvod

Kofein je stimulativna droga koja u ljudski organizam dospeva konzumiranjem kafe, čaja, lekova, energetskih pića i hrane. Dokumentovan je uticaj kofeina na nervni, gastrointestinalni, urinarni, kardiovaskularni i respiratorni sistem, ali pošto se ne zadržava u organizmu ubrzo nakon resorpcije u krv prestaje da deluje (Leonard *et al.* 1987). Najpoznatiji efekat kofeina na nervni sistem ljudi je omogućavanje bolje koncentracije i održavanje budnosti, ali u zavisnosti od individua može izazvati poremećaj spavanja, nervozu i sl. (Nehlig i Daval 1992). Nakon unošenja kofeina u

Vanja Drljević (1993),
Mali Zvornik, Nikole
Tesle 42, učenica 3.
razreda gimnazije u
Srednjoj školi Mali
Zvornik

MENTOR:
Bojan Kenig,
istraživač-saradnik,
Institut za biološka
istraživanja „Siniša
Stanković“, Beograd

organizam u dužem vremenskom periodu stvara se zavisnost i tolerancija, tj. samo veće doze od uobičajeno unošenih imaju efekta (Leonard *et al.* 1987). Rezultati pojedinih istraživanja ukazuju na to da kofein može izazvati sterilnost adulata, kao i smrt embriona pacova (Campos Bicudo i Itoyama 1992). Kod ljudi kofein izaziva pothranjenost novorođenčeta (Martin i Bracken 1987). Utvrđeno je da kofein utiče na sintezu DNK i povećava broj hromozomskih aberacija (Campos Bicudo i Itoyama 1992). Takođe, on povećava broj crossing over-a kod vrste *Drosophila melanogaster* (Yefremova i Filippova 1974). Ukoliko se larve *D. melanogaster* hrane kofeinom, često dolazi do gubitka hromozoma, dok tretiranje adulata kofeinom ne dovodi do značajnijih promena na hromozomima (Clark i Clark 1968).

Mera preživljavanja i reprodukcije jedinki u opulacionoj biologiji naziva se adaptivna vrednost (eng. fitness). Komponente adaptivne vrednosti se odnose direktno na preživljavanje i reproduktivni uspeh jedinki, a njihovom procenom može se utvrditi da li određeni faktor sredine predstavlja stres za populaciju i u kojoj meri (Tucić i Tucić 2000). U komponente adaptivne vrednosti spadaju brzina razvića, fekunditet, preživljavanje, dužina životnog veka i dr.

Pokazano je da kofein utiče na smanjenje broja jaja kod komarca *Aedes aegypti* (Laranja *et al.* 2006). Produktivnost *Drosophila prosaltans* smanjuje se sa povećanjem koncentracije kofeina, ali se nakon deset generacija produktivnost uspešno obnavlja, izuzev kod jedinki gajenih na veoma visokim koncentracijama (2500 µg/mL) (Itoyama *et al.* 1998). Takođe, utvrđeno je da različite koncentracije kofeina smanjuju dužinu životnog veka *Drosophila melanogaster* srazmerno sa povećanjem koncentracije (Nikitin *et al.* 2008).

S obzirom na to da postoje podaci da gajenje jedinki *D. melanogaster* u uslovima prisustva kofeina dovodi do promena u komponentama adaptivne vrednosti, u ovom radu se pristupilo analizi brzine razvića i preživljavanja kod grupa jedinki *D. melanogaster* gajenih na različitim koncentracijama kofeina tokom tri generacije. Cilj istraživanja bio je utvrđivanje postojanja eventualnih adaptacija na prisustvo kofeina u supstratu, kao i postojanja razlika u komponentama adaptivne vrednosti između tretiranih i netretiranih grupa kada se one nađu u uslovima akutne zagađenosti supstrata kofeinom.

Materijal i metode

Ishodna populacija je predstavljena wild type jedinkama vrste *D. melanogaster*, gajenim tokom pet godina u optimalnim laboratorijskim uslovima za tu vrstu (temperatura 24°C, vlažnost vazduha 60%) na standardnom *Drosophila* supstratu u Odeljenju za ekogenotoksikologiju u

Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu. Ova masovna populacija može se smatrati potpuno adaptiranom na takve uslove (Sgro i Partridge 2001). Eksperimentalne linije su formirane tako što je po 15 parova wild type jedinki *D. melanogaster* iste starosti postavljeno u po 8 teglica sa 50 mL standardnog supstrata sa tri različite koncentracije kofeina, na kojima su gajene tokom tri generacije u optimalnim laboratorijskim uslovima.

Prva linija formirana je tako što su jedinke postavljene na standardni *Drosophila* supstrat bez kofeina u 8 teglica sa po 50 mL supstrata, označenih kao kontrolna linija (K). Druga eksperimentalna linija (označena sa C1) je formirana na isti način kao i kontrolna, osim što je u supstrat na koji su postavljene jedinke dodat kofein u koncentraciji od 100 µg/mL (ppm). Treća eksperimentalna linija (C2) je formirana gajenjem jedinki tokom tri generacije na supstratu koji je imao 10 puta veću koncentraciju u odnosu na prethodni, tj. 1000 µg/mL (ppm) kofeina. Nakon izleganja jedinki, mužjaci i ženke F1 generacije izmešani su po principu slučajnosti i ostavljeni da se ukrštaju. Posle toga su izmešane jedinke postavljene na novih 8 teglica u okviru svake eksperimentalne grupe, čime je formirana F2 generacija. Ovaj postupak je ponavljan sukcesivno u tri generacije. Na ovaj način su eksperimentalne grupe održavane u tzv „masovnim” populacijama, na različitim supstratima.

Jedinke vrste *D. melanogaster* imaju potpuno razviće tako da ciklus razvića čine stadijumi: jaje, larva, lutka i adult. Tokom eksperimenta je praćen broj jedinki koje su uspele da se razviju do stadijuma adulta i brzina razvića od jaja do adulta. Analiza komponenti adaptivne vrednosti vršena je nakon treće generacije u okviru svake eksperimentalne linije (K, C1 i C2) ponaosob. Komponente adaptivne vrednosti su procenjivane na slučajnom uzorku od po 20 jedinki. U okviru svake eksperimentalne linije je omogućeno slobodno ukrštanje nevinih ženki i mužjaka iste starosti, tako što je u svim teglicama izvršeno izbacivanje svih adultnih jedinki po početku izleganja. Nakon četiri dana po 30 ženki i 60 mužjaka iz svih teglica, za svaku liniju posebno, postavljano je na po 10 petri šolja sa standardnim supstratom. Posle 12 časova sakupljana su jaja koje su ženke položile.

Formirane su eksperimentalne grupe na sledeći način: po 20 jaja iz svake linije postavljano je na 20 flakona sa sva tri različita supstrata. Na ovaj način formirano je devet eksperimentalnih grupa – tri linije na tri supstrata. Ukupan broj postavljenih jaja po eksperimentalnoj grupi je iznosio 400. Potomstvo dobijeno iz tih flakona korišćeno je za proveru tri komponente adaptivne vrednosti: preživljavanja, brzine razvića i veličine krila.

Preživljavanje jaje-adult predstavlja odnos broja izleženih jedinki tokom perioda izleganja, koji kod *D. melanogaster* traje oko nedelju dana, i ukupnog broja postavljenih jaja. Prilikom analize ove osobine izvršena je arkussinus transformacija ($p' = \arcsin \sqrt{p}$) nizova podataka, jer su originalni nizovi podataka predstavljeni procentualnim vrednostima i kao takvi se ne mogu koristiti u parametarskim testovima.

Brzina razvića je potkomponenta adaptivne vrednosti koja predstavlja vreme trajanja ciklusa razvića, od trenutka polaganja jaja do izleganja adulta. Po početku izleganja, broj izleženih adulata je utvrđivan na svakih 24 h u svakom flakonu. Smatralo se da je izleganje završeno u jednom flakonu kada se nijedan adult ne pojavi tokom perioda od 72 h. Za ovu osobinu nije korišćena transformacija podataka.

Statistička analiza podataka dobijenih preko provere komponenti adaptivne vrednosti je bazirana na srednjim vrednostima replika, tj. na osnovu izleženih jedinki u po 20 flakona po eksperimentalnoj grupi. Za testiranje normalne distribucije nizova podataka u okviru grupa korišćen je neparametarski test Jarque-Bera. Za proveru homogenosti varijansi pre analize varijanse korišćeni su Bartletov test i Levenov test. Za poređenje razlika između grupa korišćena je dvofaktorska analiza varijanse, sa fiksnim faktorima *Linija* i *Tretman*, kao i post hoc Tukey test u slučaju značajnih rezultata dvofaktorske analize varijanse. U nekoliko slučajeva pretpostavke neophodne za korišćenje analize varijanse su bile narušene, tj. varijanse koje su planirane za poređenje su pokazale značajno odstupanje od homogenosti. Tada je korišćena posebna varijanta analize varijanse, tzv. Welch ANOVA, koja nije osetljiva na heterogenost varijansi. Međutim, s obzirom da su se rezultati Welch ANOVA-e potpuno podudarali sa rezultatima post hoc Tukey testa dvofaktorske ANOVA-e, kao i zbog toga što je poznato da su analize varijanse prilično robusne kada su u pitanju devijacije od normalnosti raspodele i homogenosti varijanse sve dok su veličine uzoraka velike i jednake (Zar 1999), korišćenje samo dvofaktorske analize varijanse je opravdano. Kompletna statistička analiza podataka je sprovedena korišćenjem programa Statistica for Windows 5.0 (StatSoft Inc., USA) i MS Excel 2003.

Dužina krila ženki i mužjaka merena je na uzorku od po 30 ženki i mužjaka iz svake eksperimentalne grupe, osim grupe jedinki linije C2 gajenih na standardnom supstratu (C2K), koja je izgubljena u eksperimentalnoj proceduri. Oba krila su uklonjena sa svake jedinke i zalepljena na mikroskopske pločice. Podaci korišćeni za analizu odnose se samo na levo krilo. Dužina krila dobijena je merenjem distance od preseka treće longitudinalne vene sa anteriornom poprečnom venom do vrha krila na mestu gde se treća vena završava. Fotografisanje i merenje dužine krila izvršeno je korišćenjem binokularnog mikroskopa sa Leica/Cannon sistemom

analize slika. Poređenje dobijenih vrednosti između eksperimentalnih grupa je vršeno jednofaktorskom analizom varijanse, za ženke i mužjake posebno.

Rezultati i diskusija

Preživljavanje

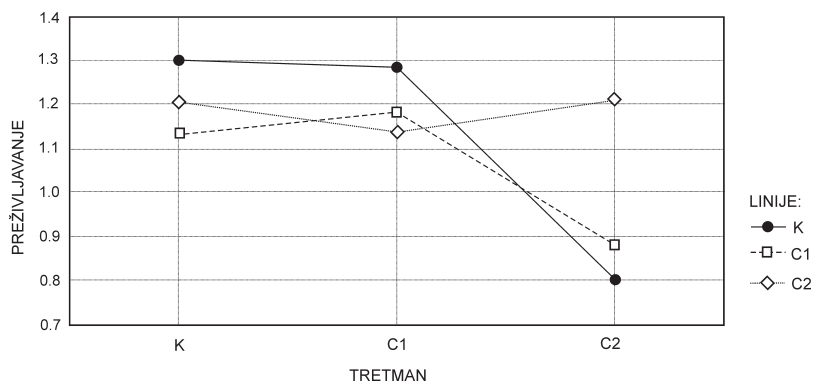
Za ispitivanje uticaja koncentracije kofeina na procenat preživelih jedinki (od stupnja jaja do adulta) korišćena je dvofaktorska analiza varijanse sa osnovnim faktorima linija i tretman kao izvorom varijabilnosti. Utvrđeno je da oba ova faktora imaju statistički značajan uticaj na variranje vrednosti preživljavanja kod različitih grupa jedinki formiranih u eksperimentu (faktor linija: $p < 0.01$; faktor tretman: $p < 0.001$), ali i da postoji statistički visoko značajna interakcija ova dva faktora ($p < 0.001$) (tabela 1).

Tabela 1. Rezultati dvofaktorske ANOVA-e za osobinu preživljavanje

	df efekat	MS efekat	df greška	MS greška	F	p
LINIJA	2	0.21	171	0.04	5.108	0.007
TRETMAN	2	1.17	171	0.04	27.757	0.000
LIN. × TRETM.	4	0.49	171	0.04	11.693	0.000

Jedinke kontrolne linije su imale skoro identične vrednosti preživljavanja na standardnom supstratu (90.0%) i supstratu sa nižom koncentracijom kofeina (89.8%). Nepostojanje značajnih razlika između jedinki gajenih na ova dva supstrata potvrđeno je i post hoc Tukey testom. Međutim, kada se posmatraju vrednosti preživljavanja jedinki ove linije na supstratu koji sadrži višu koncentraciju kofeina, uočava se drastična redukcija te vrednosti (52%), kada se uporedi sa prethodne dve, što je potvrđeno i post hoc Tukey testom ($p < 0.001$, u oba poređenja) (slika 1).

Jedinke koje su u eksperimentu gajene tokom tri generacije na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina najvišu vrednost preživljavanja pokazuju na tom istom supstratu (82%). U odnosu na ovu grupu ne uočava se velika razlika u preživljavanju kada se posmatraju jedinke te linije gajene na „čistom” supstratu, bez kofeina (80%). Jedinke ove linije pokazale su pad vrednosti preživljavanja (59%) na supstratu sa višom koncentracijom kofeina, što je sličan trend uočen i kod kontrolne linije. I ovde je post hoc testom potvrđen statistički značajan pad vrednosti preživljavanja između grupe jedinki linije C1 koje su gajene na supstratu sa višom koncentracijom kofeina, sa onima koje su gajene na kontrolnom



Slika 1.
Preživljavanje jedinki u zavisnosti od linije kojoj pripadaju i supstrata

Figure 1.
Survival depending on line and medium

supstratu ($p < 0.01$) i sa onima koje su gajene na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina ($p < 0.001$) (slika 1).

Kofein smanjuje procenat preživljavanja jedinki i kontrolne linije (K) i linije gajene na nižoj koncentraciji kofeina (C1). Obema linijama sa povećanjem koncentracije kofeina u supstratu opada procenat preživelih jedinki. Ukoliko se porede vrednosti prilikom gajenja na kontrolnom i supstratu sa nižom koncentracijom kofeina razlike nisu značajne, dok pri gajenju jedinki ove dve linije na supstratu sa višom koncentracijom kofeina uočava se značajna redukcija u preživljavanju. Ovo govori u prilog zaključku da mala koncentracija kofeina ne dovodi do genetičke adaptacije, ali može da izazove akutni fiziološki odgovor. Ako se upoređi preživljavanje linije K i linije C1 na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina uočava se da su veće vrednosti preživljavanja K linije, što je suprotno pretpostavci da će ukoliko dođe do genetičke adaptacije najveću vrednost preživljavanja na ovom supstratu imati linija C1.

Linija koja je formirana gajenjem jedinki *D. melanogaster* na supstratu sa višom koncentracijom kofeina pokazuje različite vrednosti preživljavanja dobijene gajenjem na supstratima sa različitom koncentracijom kofeina, kada se upoređi sa kontrolnom linijom i linijom formiranom gajenjem jedinki iste vrste na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina. Prvo što se uočava je da ova linija ne pokazuje velike razlike u preživljavanju između različitih supstrata (tretmana), kao i da je najveća prosečna vrednost ove osobine kod ove linije registrovana na supstratu sa višom koncentracijom kofeina, supstratu na kome je ona i gajena tokom tri generacije (86.5%). Nešto nižu vrednost preživljavanja jedinke ove linije su imale kada su gajene na kontrolnom, standardnom supstratu bez kofeina (83.5%), a najnižu vrednost kada su gajene na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina (75.2%) (slika 1). Dvofaktorska analiza varijanse i post hoc Tukey test nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika između grupa jedinki ove linije gajenih na tri supstrata sa različitom koncentracijom kofeina.

Gajenje jedinki *D. melanogaster* tokom tri generacije na supstratu sa višom koncentracijom kofeina najverovatnije je dovelo do genetičke adaptacije, s obzirom da ne postoje značajne razlike u preživljavanju između različitih supstrata, tj. ne dolazi do redukcije preživljavanja na supstratu sa višom koncentracijom kofeina. Ipak, ne treba isključiti ni mogućnost fiziološke/biohemijske adaptacije, kao i postojanja materinskog efekta, jer pre provere razlika u otpornosti na prisustvo kofeina u supstratu nije izvršena aklimatizacija, tj. jedinke sve tri linije nisu gajene na istom, standardnom supstratu.

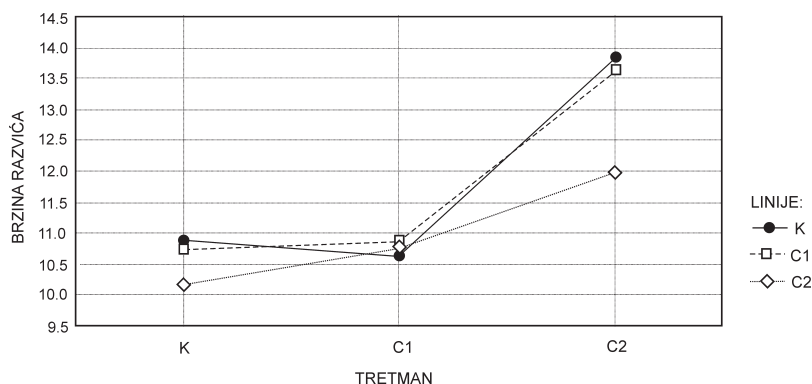
Kada se posmatra preživljavanje jedinki različitih linija na istim supstratima, vidi se da na kontrolnom supstratu najveću vrednost preživljavanja imaju jedinke kontrolne linije, što je i očekivano. Ipak, ne postoje statistički značajne razlike između jedinki bilo koje linije kada su one gajene na standardnom, kontrolnom supstratu. Sličan slučaj je i kod jedinki različitih linija gajenih na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina, gde takođe jedinke kontrolne linije imaju najveću vrednost preživljavanja ali ni u ovom slučaju ne postoje značajne razlike između različitih linija. Kada se posmatraju vrednosti preživljavanja jedinki tri linije, uporedo, na supstratu sa višom koncentracijom kofeina, statistički značajne razlike se uočavaju između linije gajene na supstratu sa višom koncentracijom kofeina i ostale dve linije, kontrolne ($p < 0.001$) i linije gajene na nižoj koncentraciji kofeina ($p < 0.001$). To je i očekivan rezultat s obzirom na to da je C2 linija pokazala najveće vrednosti preživljavanja na supstratu na kome je i gajena tokom tri generacije.

Brzina razvića

Korišćenjem dvofaktorske analize varijanse, sa glavnim faktorima linija i tretman, utvrđeno je da oba faktora imaju statistički visoko značajan uticaj na varijabilnost brzine razvića kod različitih grupa jedinki formiranih u eksperimentu (faktori: linija $p < 0.01$; tretman $p < 0.001$), ali i da postoji statistički visoko značajna interakcija ova dva faktora ($p < 0.001$) (tabela 2).

Tabela 2. Rezultati dvofaktorske ANOVA-e za osobinu brzina razvića

	df efekat	MS efekat	df greška	MS greška	F	p
LINIJA	2	12.6	171	0.23	55.97	0.000
TRETMAN	2	123	171	0.23	545.26	0.000
LIN. × TRETM.	4	5.6	171	0.23	25.03	0.000



Slika 2.
Brzina razvića jedinki (izražena u danima) u zavisnosti od linije kojoj pripadaju i supstrata

Figure 2.
Development rate (shown in days) depending on line and medium

Kada su jedinke kontrolne linije gajene na standardnom supstratu, u proseku je bilo potrebno 10.9 dana za kompletiranje razvića od jaja do adultnog stupnja. Kada su jedinke te linije gajene na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina nije došlo do velike promene u prosečnoj brzini razvića (10.6 dana), što je potvrđeno i post hoc testom. Do značajnog usporavanja razvića dolazi gajenjem jedinki kontrolne linije na supstratu sa višom koncentracijom kofeina, kada je prosečno vreme potrebno za razviće iznosilo 13.8 dana (slika 2). Post hoc test je pokazao da postoji statistički visoko značajna razlika između vrednosti brzine razvića kod grupe jedinki kontrolne linije koje su gajene na supstratu sa visokom koncentracijom kofeina u odnosu na one koje su gajene na standardnom supstratu i na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina ($p < 0.001$ u oba poređenja).

Uticaj povišene koncentracije kofeina u supstratu (efekat tretman) se ogleda u usporavanju razvića kod jedinki kontrolne linije.

Jedinke koje su u eksperimentu gajene tokom tri generacije na *Drosophila* supstratu sa nižom koncentracijom kofeina pokazuju skoro identičan trend promene brzine razvića u zavisnosti od koncentracije kofeina u supstratu kao i jedinke kontrolne linije. Jedinke ove linije na standardnom supstratu i supstratu sa nižom koncentracijom kofeina imaju približno jednake vrednosti brzine razvića (10.7 i 10.9 dana). Kao i kod kontrolne linije, gajenjem jedinki linije C1 na supstratu sa višom koncentracijom kofeina dolazi do značajnog usporavanja razvića, pa na tom supstratu prosečno vreme potrebno za kompletiranje razvića od jaja do adulta iznosi 13.7 dana (slika 2). I ovde je post hoc testom potvrđeno da je usporavanje razvića kod jedinki C1 linije gajenih na supstratu sa višom koncentracijom kofeina i druge dve grupe statistički visoko značajno (post hoc Tukey test: $p < 0.001$ u oba poređenja).

Na osnovu ovih činjenica može se zaključiti da gajenje jedinki na nižoj koncentraciji kofeina tokom tri generacije ne dovodi do genetičke adaptacije.

Linija koja je formirana gajenjem jedinki *D. melanogaster* na supstratu sa višom koncentracijom kofeina (linija C2) pokazuje različite promene brzine razvića u zavisnosti od koncentracije kofeina u supstratu, kada se upoređi sa kontrolnom linijom i linijom formiranom gajenjem jedinki na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina. Promene brzine razvića kod ove linije su postepene, sa rastom koncentracije kofeina u supstratu. Najbrže razviće jedinke ove linije imaju na standardnom supstratu, gde je prosečna vrednost te osobine 10.2 dana. Na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina dolazi do usporavanja razvića, i prosečna vrednost te osobine je na ovom supstratu 10.8 dana. Do još većeg usporavanja razvića dolazi gajenjem jedinki linije C2 na supstratu sa višom koncentracijom kofeina, gde je jedinkama u proseku bilo potrebno 12.0 dana za kompletiranje razvića (slika 2). Post hoc Tukey test je pokazao da statistički značajne razlike u brzini razvića postoje između sva tri supstrata.

Gajenje jedinki tokom tri generacije na supstratu sa višom koncentracijom kofeina najverovatnije je dovelo do genetičke adaptacije, s obzirom da ne dolazi do usporavanja razvića sa povećanjem koncentracije kofeina u supstratu u onoj meri u kojoj je to izraženo kod kontrolne linije i linije C1.

Kada se posmatra brzina razvića jedinki različitih linija na istim supstratima, vidi se da na standardnom supstratu najbrže razviće imaju linije gajene na supstratu sa višom koncentracijom kofeina (linija C2). Kod druge dve linije razviće je nešto sporije, s tim što se ne uočavaju razlike u brzini razvića između jedinki kontrolne linije i linije C1 na kontrolnom supstratu. Rezultati post hoc testa pokazuju da između kontrolne linije i linije gajene na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina ne postoje statistički značajne razlike u brzini razvića, dok između linije C2 i kontrolne linije postoje ($p < 0.001$), kao i između linije C2 i linije C1 ($p < 0.01$).

Kod jedinki gajenih na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina brzina razvića je skoro potpuno jednaka.

Kada se posmatraju vrednosti preživljavanja jedinki na supstratu sa višom koncentracijom kofeina uočava se da jedinke linije C2 imaju najbrže razviće u odnosu na jedinke kontrolne linije i linije C1. Statistički značajne razlike u brzini razvića su registrovane između linije gajene na supstratu sa višom koncentracijom kofeina i kontrolne ($p < 0.001$), kao i linije gajene na nižoj koncentraciji kofeina ($p < 0.001$).

Postojanje značajnih razlika u brzini razvića između linije C2, u poređenju sa linijama C1 i K jasan je pokazatelj da je kofein tokom samo tri generacije uspeo da dovede do genetičke adaptacije. Kofein kod *D. melanogaster* usporava brzinu razvića, ali je brzina razvića jedinki C2 linije na supstratu sa višom koncentracijom kofeina veća u poređenju sa druge dve linije.

Dužina krila

Ženke

Kod kontrolne linije smanjuje se veličina krila u zavisnosti od koncentracije kofeina u supstratu (slika 3), s tim što značajna razlika postoji samo između ženki gajenih na standardnom supstratu, koje imaju najveću vrednost dužine krila, i onih na supstratu sa većom koncentracijom kofeina, koje imaju najmanja krila (jednofaktorska ANOVA: $p < 0.05$). Kod linije dobijene gajenjem tokom tri generacije na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina uočava se da postoji drastično velika razlika u veličini krila onih ženki koje su gajene na supstratu sa višom koncentracijom kofeina, koje imaju najmanja krila, kada se uporede sa ženkama gajenim na nižoj i na višoj koncentraciji kofeina (jednofaktorska ANOVA: $p < 0.001$ u oba poređenja). Ovde treba napomenuti da najveća krila imaju ženke koje su gajene na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina, tj. na onoj koncentraciji na kojoj su jedinke te linije gajene tokom tri generacije. Kod linije gajene na višoj koncentraciji kofeina ne postoje značajne razlike u veličini krila između dve grupe gajene na različitim koncentracijama kofeina u supstratu.

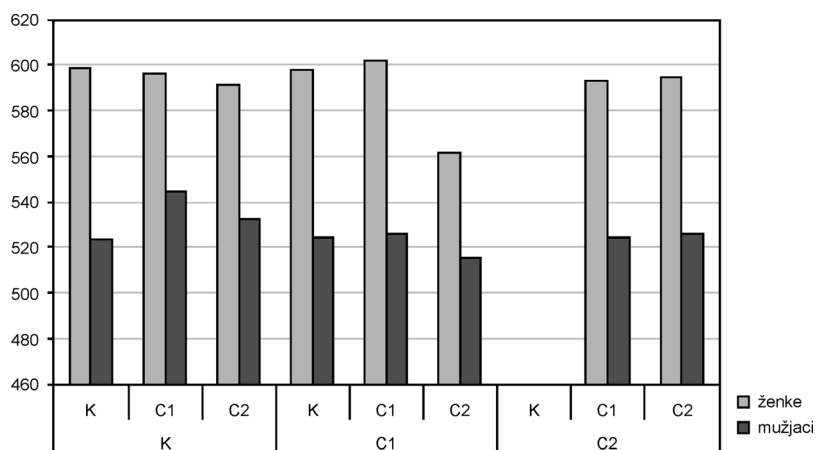
Poređenjem veličine krila ženki kontrolne linije i linije C1 (slika 3), kada su gajene na kontrolnom supstratu nije utvrđeno postojanje značajnih razlika, kao ni kada su ženke te dve linije gajene na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina. Međutim, poređenjem veličine krila ženki te dve linije, kada su one gajene na supstratu sa višom koncentracijom kofeina, uočava se da one iz linije C1 imaju značajno manja krila (jednofaktorska ANOVA: $p < 0.001$). Poređenjem veličine krila ženki linija C1 i C2 na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina dobijeno je da je manja vrednost te osobine kod linije C2 značajna (jednofaktorska ANOVA: $p < 0.05$). Na supstratu sa višom koncentracijom kofeina je potpuno suprotno, značajno manja krila imaju ženke C1 linije (jednofaktorska ANOVA: $p < 0.001$).

Kod ženki, u okviru kontrolne linije se primećuje da je povećana koncentracija kofeina u supstratu povezana sa kraćim krilima tj. manjim telom. U grupi ženki gajenih na nižoj koncentraciji kofeina, najveću vrednost dužine krila imaju one koje su gajene na istom tom supstratu, što je još jedan pokazatelj da je veće telo u korelaciji sa višom adaptivnom vrednošću.

Kada su jedinke kontrolne linije i linije C2 gajene na supstratu sa nižom i višom koncentracijom kofeina, nisu uočene značajne razlike u veličini krila (slika 3).

Mužjaci

Kod kontrolne linije primećeno je povećanje veličine krila kod mužjaka gajenih na nižoj i višoj koncentraciji kofeina u odnosu na standardni supstrat, pri čemu mužjaci koji su gajeni na nižoj koncentraciji kofeina imaju najveća krila (slika 3). Značajna razlika u veličini krila primećena je između grupe gajene na standardnom supstratu kada je ona poređena sa grupama gajenim na supstratima sa nižom i višom koncentracijom kofeina (jednofaktorska ANOVA: $p < 0.001$ u oba poređenja). Kod linije dobijene gajenjem jedinki na nižoj koncentraciji kofeina kroz tri generacije, primećene su razlike u veličini krila mužjaka gajenih na supstratu sa višom koncentracijom kofeina (čija su krila najmanja) u odnosu na mužjake gajene na nižoj koncentraciji kofeina i standardnom supstratu (jednofaktorska ANOVA: $p < 0.05$ u oba slučaja). Najveća krila u okviru ove linije imaju mužjaci gajeni na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina. Kod linije gajene na višoj koncentraciji kofeina ne postoje značajne razlike u veličini krila, u zavisnosti od količine kofeina u supstratu.



Slika 3.

Dužina krila muških i ženskih jedinki u zavisnosti od linije kojoj pripadaju i supstrata sa različitim koncentracijama kofeina

Figure 3.

Wing length in males (dark gray) and females (light gray) depending on line and medium with different concentrations of caffeine

Poređenjem veličine krila mužjaka kontrolne linije i linije C1 gajenih na kontrolnom supstratu, nije primećena značajna razlika. Međutim, poređenjem mužjaka ove dve linije kada su oni odgajeni na supstratu sa nižom i višom koncentracijom kofeina, primećuje se da veća krila u oba slučaja imaju mužjaci kontrolne linije (jednofaktorska ANOVA: $p < 0.01$ u oba poređenja).

Kada su mužjaci linija C1 i C2 gajeni na višoj koncentraciji kofeina, uočava se da značajno manja krila imaju oni koji potiču iz linije C1 (jednofaktorska ANOVA: $p < 0.01$). Kada su mužjaci kontrolne linije i linije C2 kompletirali razviće na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina, pri-

mećeno je da veličina krila značajno veća kod kontrolne grupe (jednofaktorska ANOVA: $p < 0.01$).

Kod mužjaka se ne može primetiti pravilna zavisnost dužine krila i koncentracije kofeina u supstratu, posebno ne u kontrolnoj liniji, gde mužjaci koji su gajeni na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina imaju najveća krila, što nije očekivan rezultat. Jedinke linije koja je gajena na nižoj koncentraciji kofeina kao i kod ženki imaju najveća krila na supstratu sa nižom koncentracijom kofeina (slika 3).

Jedinke linije C2 ni kod ženki ni kod mužjaka ne pokazuju značajne razlike u dužini krila u zavisnosti od koncentracije kofeina u supstratu.

Zaključak

Efekat više koncentracije kofeina (1000 $\mu\text{g/mL}$) na jedinke odgajene na čistom supstratu i supstratu sa nižom koncentracijom kofeina (100 $\mu\text{g/mL}$) ogleda se u značajnoj redukciji preživljavanja i usporavanju brzine razvića. Dalje, ova koncentracija kofeina statistički značajno utiče na smanjenje dužine krila kod ženki obe grupe, kao i kod mužjaka odgajenih na podlozi sa nižom koncentracijom.

Kada je u pitanju efekat više koncentracije kofeina na jedinke koje su odgajane na podlozi sa istom koncentracijom kofeina, dobijeno je da ona nije izazvala smanjenje procenta preživljavanja. Dalje, brzina razvića ovih jedinki je usporena, ali ne tako značajno kao kod jedinki odgajanih sa podlogama bez ili sa malom koncentracijom kofeina. Veličina krila nije smanjena.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da prisustvo kofeina u koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ tokom tri generacije nije bilo dovoljno da izazove genetičku adaptaciju kod jedinki *D. melanogaster*, ali da je bila dovoljna da izazove akutni fiziološki odgovor. Gajenje jedinki kroz tri generacije na višoj koncentraciji kofeina od 1000 $\mu\text{g/mL}$ dovelo je do povećane otpornosti na tu supstancu u čijoj osnovi najverovatnije leži genetička adaptacija.

Literatura

- Campos Bicudo H. E. M. D., Itoyama M. M. 1992. Effects of caffeine on fecundity, egg laying capacity and longevity in *D. prosaltans*. *Brasil J. Genetics*, **15** (2): 303.
- Clark, A. M., Clark, E. G. 1968. The genetic effects of caffeine in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res*, **6** (2): 227.
- Itoyama M. M., Campos Bicudo H. E. M. D., Manzato A. J. 1998. The development of resistance to caffeine in *Drosophila prosaltans*: productivity and longevity after ten generations of treatment. *Cytobios*, **96** (382): 81.

- Laranja A., Manzato A. J., Campos Bicudo H. E. M. D. 2006. Caffeine effect on mortality and oviposition in successive generations of *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública*, **40** (6): 1112.
- Leonard T. K., Watson R. R., Mohs M. E. 1987. The effects of caffeine on various body systems. *J Am Diet Assoc*, **8**: 1048.
- Martin T. R., Bracken M. B. 1987. The association between low birth weight and caffeine consumption during pregnancy. *American Journal of Epidemiology*, **126** (5): 813.
- Nehlig A., Daval J. 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*, **17** (2):139.
- Nehlig A., Debry G. 1994. Potential teratogenic and neurodevelopmental consequences of coffee and caffeine exposure: A review on human and animal data. *Neurotoxicol Teratol*, **16** (6): 531.
- Nikitin A., Navitskas S., Nicole Gordon A. 2008. Effect of varying doses of caffeine on life span of *Drosophila melanogaster*. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, **63**: 149.
- Sgro M. C., Partridge L. 2001. Laboratory adaptation of life history in *Drosophila*. *Am Nat*, **158** (6): 657.
- Tucić N., Tucić B. 2000. *Prirodna selekcija i adaptacije*. Beograd: NNK International.
- Yefremova G. I. Filippova L. M. 1974. Effect of caffeine on crossing-over in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **23** (3): 347.
- Zar J. H. 1999. *Bio-statistical Analysis*. Upper Saddle River: Prentice Hall
- Živanov-Čurils J., Tomin J., Bojanić V., Bojanić Z., Najman S., Katić K., Mrčarića E., Đindić B. 2004. Effect of chronic phenol intoxication on fertility and life span of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Oncol*, **12**: 17.

Vanja Drljević

Effect of Caffeine on Adaptive Value Components of *Drosophila melanogaster*

Laboratory lines of *Drosophila melanogaster* population that had been cultivated in standard nourishing medium and mediums with caffeine concentrations of 100 µg/mL and 1000 µg/mL were transported to all three mentioned types of medium after three generations. We investigated three components of adaptive value: developmental time, survival and wing length. Our results showed that the medium with a higher concentration of caffeine caused significantly longer developmental time, smaller percent of survivals, and shorter wing length in the control line and the line which was cultivated in the medium with a lower concentration of

caffeine, when compared to the control and the medium with a lower caffeine concentration. Changes of wing length were the same, except the control male line. The line that was cultivated in the medium with a higher caffeine concentration did not show significant differences in these values in different mediums. Also, the percent of survivals and wing length values were significantly higher, and the developmental time in the medium with a higher caffeine concentration was shorter in this line when compared to the other two lines. The results of this investigation confirmed the hypothesis that the presence of caffeine in a concentration of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in a nourishing medium through three generations causes the genetic adaptation of *Drosophila melanogaster*. A concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ causes an acute physiological response.

