

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Vera ZGONIK

**UGOTAVLJANJE PROŽILCEV POZIVNEGA IN
PARITVENEGA NAPEVA SAMICE STENICE
NEZARA VIRIDULA L. (Heteroptera Pentatomidae)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Vera ZGONIK

**UGOTAVLJANJE PROŽILCEV POZIVNEGA IN
PARITVENEGA NAPEVA SAMICE STENICE
NEZARA VIRIDULA L. (Heteroptera Pentatomidae)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**TRIGGERS OF FEMALE CALLING AND COURTSHIP
SONGS IN GREEN STINK BUG *NEZARA VIRIDULA* L.
(Heteroptera Pentatomidae)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu senata Biotehniške fakultete in sklepa komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 24.2.2014 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu bioznanosti, znanstveno področje biologija. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Andrej Čokl. Naloga je bila v celoti opravljena na Oddelku za Entomologijo Nacionalnega Inštituta za Biologijo.

KOMISIJA ZA OCENO IN ZAGOVOR:

Predsednik: doc. dr. Peter STUŠEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo

Član: prof. dr. Andrej ČOKL

Nacionalni Inštitut za Biologijo, Oddelek za entomologijo

Član: prof. dr. Dušan DEVETAK

Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za Biologijo

Datum zagovora: 11.3.2014

Doktorsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Vera Zgonik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 595.7:577.19(043.3)=163.6
- KG kemična komunikacija / vibracijska komunikacija / spolna komunikacija / ščitaste stenice / zelena smrdljivka / *Nezara viridula* / feromon / prožilec / spontano petje
- AV ZGONIK, Vera, univ. dipl. biolog
- SA ČOKL, Andrej (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Doktorski študij Bioznanosti, področje biologija
- LI 2014
- IN UGOTAVLJANJE PROŽILCEV POZIVNEGA IN PARITVENEGA NAPEVA SAMICE STENICE *NEZARA VIRIDULA* L. (Heteroptera Pentatomidae)
- TD doktorska disertacija
- OP IX, 70 str., 4 pregl., 22 sl., 126 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Zelena smrdljivka *Nezara viridula* (L.) (Pentatomidae, Heteroptera) se sporazumeva s signali različnih modalitet. Na daljše razdalje samčevi feromoni privlačijo partnerje na isto rastlino, na kateri najprej vibracijski signali omogočijo srečanje samca in samice, nato pa v neposredni bližini igrajo pomembno vlogo tudi vidni, kemični in taktilni signali. Namen raziskave je bil ugotoviti, signali katere modalitete sprožijo začetek sporazumevanja z vibracijskimi signali in ovrednotiti spontano petje. Tako samci kot samice pojejo sami na rastlini brez dodanih zunanjih signalov, vendar samice veliko redkeje od samcev. Kadar sta na rastlini oba, začne v poskusnih pogojih večkrat vibracijsko komunikacijo samec. Samice začnejo oddajati vibracijske napeve zelo redko spontano, večinoma pa z njimi odgovorijo na prisotnost feromonov samca. Oddajanje pozivnega napeva samice kot odgovor na kemične signale je daljše in z bolj pravilno ritmiko ponavljanja posameznih signalov kot v primeru spontanega začetka petja. Samci oddajajo vibracijske signale bodisi spontano bodisi jih sprožijo vidni in/ali vibracijski signali. Samci in samice oddajajo vibracijske signale pogosteje na svetlobi kot v temi, vendar pa razlika ni statistično značilna.

KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)

DN Dd

DC UDK 595.7:577.19(043.3)=163.6

CX vibrational communication / chemical communication / pheromone / mating behaviour / vibrations / *Nezara viridula* / spontaneous singing / green stink bug / Pentatomidae / Heteroptera / trigger

AU ZGONIK, Vera

AA ČOKL, Andrej (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate study of Biosciences, Field: Biology

PY 2014

TI TRIGGERS OF THE FEMALE CALLING AND COURTSHIP SONGS OF GREEN STINK BUG *NEZARA VIRIDULA* L. (Heteroptera Pentatomidae)

DT Doctoral dissertation

NO IX, 70 p., 4 tab., 22 fig., 126 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Signals of different modalities are involved in the behavior of green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Pentatomidae, Heteroptera). Long range attraction is mediated by male pheromones, resulting in aggregation of bugs on the same plant where vibratory signals, vision and various chemical signals become important. The purpose of this research was to determine signals of which modality trigger green stink bugs to produce vibrations and to evaluate the rate of spontaneous singing. Both males in females sing spontaneously but males do so much more often. In experiments when both were on the same plant, males started vibratory communication more often than females. Females produce vibratory signals spontaneously at a lesser degree and mainly triggered by the male pheromones. Female calling song lasts longer and is produced in a steady rhythm when triggered by the male pheromone but rarely so in spontaneous singing. Males produce vibratory signals either spontaneously or triggered by visual and/or vibrational stimuli. Males in females sing more often in the daylight than in the dark but the difference is not significant.

KAZALO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
1 UVOD	1
1.1 OPIS PROBLEMA IN NAMEN RAZISKAVE	1
1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	2
1.3 PRISPEVEK DISERTACIJE K RAZVOJU ZNANOSTI	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 POSKUSNA ŽIVAL - ZELENA SMRDLJIVKA (<i>NEZARA VIRIDULA</i> L.)	3
2.2 KOMUNIKACIJA	6
2.2.1 Vibracijska komunikacija žuželk	6
2.2.2 Vibracijska komunikacija pri stenicah	7
2.2.3 Prenos vibracij po rastlini	9
2.2.4 Vibracijska komunikacija pri zeleni smrdljivki	9
2.3 KEMIČNA KOMUNIKACIJA PRI ZELENI SMRDLJIVKI	11
2.4 OSTALA ČUTILA	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 POSKUSNE ŽIVALI	14
3.2 RASTLINE	14
3.3 REGISTRIRANJE IN ANALIZA SIGNALOV	15
3.4 POSKUSI S PAROM	16
3.5 POSKUSI S POSAMEZNIH OSEBKOM	16
3.5.1 Poskusi s predvajanjem vibracij	17
3.5.2 Poskusi z modelom	19
3.5.3 Poskusi s kemičnimi signali	20
3.6 KONTROLE IN SPONTANO PETJE	22
3.7 STATISTIČNE METODE	22
4 REZULTATI	23
4.1 SPONTANO PETJE	23
4.2 ZAČETNO PETJE PRI PARIH SMRDLJIVK	24
4.2.1 Čas prvega napeva v paru	31
4.3 ODGOVORI POSAMEZNIH OSEBKOV NA RAZLIČNE MODALITETE SIGNALOV	32
4.3.1 Kontrole	32
4.3.2 Vibracijski držaljšaji	35
4.3.3 Vidni signali	35
4.3.4 Kemični signali	35

4.4 ČAS IN VRSTA NAPEVA SAMCEV IN SAMIC V POSKUSIH S POSAMEZNO ŽUŽELKO	38
4.4.1 Napevi samcev	38
4.4.2 Čas prvega napeva pri samcih v različnih poskusih (sam na rastlini).....	40
4.4.3 Napevi samic v različnih poskush	41
4.4.4 Čas prvega napeva v različnih poskusih pri samicah, samih na rastlini	43
4.4.5 Samičin ritem oddajanja signalov pozivnega napeva v kontrolah (spontano petje) in sprožen s kemičnim signalom:	44
5 RAZPRAVA	45
5.1 SPONTANO PETJE	45
5.2 RAZLIKA MED POSKUSI NA SVETLOBI IN V TEMI	46
5.3 VIBRACIJE	47
5.4 PRIMERJAVA Z DRUGIMI PENTATOMIDAMI PRIMERJAVA Z DRUGIMI STENICAMI DRUŽINE PENTATOMIDAE	47
5.5 VIDNI SIGNAL.....	48
5.6 KEMIČNI SIGNALI.....	48
5.7 POVEZAVA RAZLIČNIH MODALITET.....	50
5.8 OSTALA ČUTILA - TIP	52
5.9 ČAS NAPEVA.....	52
5.10 IDEJE ZA NADALJNE RAZISKAVE.....	53
6 SKLEPI	55
7 POVZETEK (SUMMARY)	56
7.1 POVZETEK.....	56
7.2 SUMMARY.....	58
8 VIRI	61
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primerjava poskusov in kontrol ter različnih poskusov med seboj pri samicah s pomočjo chi-kvadrat testa	33
Preglednica 2: Primerjava poskusov in kontrol ter različnih poskusov med seboj pri samcih s pomočjo chi-kvadrat testa	34
Preglednica 3: Samčevi napevi v različnih poskusih	39
Preglednica 4: Primerjava pogostosti pojavljanja samičinega nepulziranega (FCS1) in pulziranega (FCS2) pozivnega napeva v različnih poskusih, kjer sta se pojavljala:	42

KAZALO SLIK

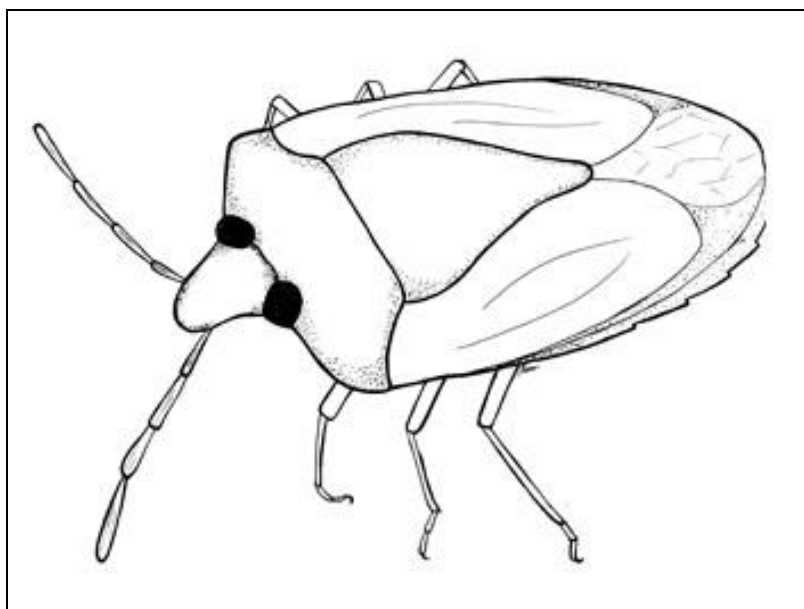
Slika 1: Zelena smrdljivka (<i>Nezara viridula</i> L.)	1
Slika 2: Slika napevov (po Čokl, 2008).	10
Slika 3: Oblike samčevega feromona zelene smrdljivke (iz Brezot, 1994)	12
Slika 4: Struktura in dimenzije fižolovih sadik (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	15
Slika 5: Struktura in dimenzije fižolovih sadik (<i>Phaseolus vulgaris</i>), uporabljenih v poskusih s predvajanjem vibracij ter postavitve laserskega vibrometra in vibracijskega spodbujevalca ..	17
Slika 6: Oscilogram stimulacijskega programa.....	18
Slika 7: Struktura in dimenzije fižolovih sadik (<i>Phaseolus vulgaris</i>), uporabljenih v poskusih z modelom ter postavitve modela (živa ali mrtva stenica)	19
Slika 8: Struktura in dimenzije fižolovih sadik (<i>Phaseolus vulgaris</i>), uporabljenih v poskusih s kemičnim signalom ter postavitve kletke z osebkom, ki je bil vir signala.....	21
Slika 9: Spontano petje samcev in samic zelene smrdljivke na svetlobi (5 in 13 minutni poskusi) in v temi (13 minutni poskus).....	24
Slika 10: Pari v 13 minut trajajočih poskusih.....	25
Slika 11: Prvi napev v poskusu s pari - 13 minutni poskus.....	26
Slika 12: Prvi napev v poskusu s pari - 25 minutni poskus.....	27
Slika 13: Napevi samcev in samic v poskusu s pari v odvisnosti od starosti samice.....	28
Slika 14: Napevi samcev in samic v poskusu s pari v odvisnosti od starosti samca.....	29
Slika 15: Graf napevov v odvisnosti od starosti samca in samice.....	30
Slika 16: Prvi napevi pri parih zelenih smrdljivk v odvisnosti od časa.....	31
Slika 17: Odgovori samcev in samic na signale različnih modalitet in na kontole.....	36
Slika 18: Napevi samcev v različnih poskusih in kontrolah	38
Slika 19: Časi samčevih prvih napevov (združeni rezultati različnih poskusov s posameznim samcem)	40

Slika 20: Napevi samic v različnih poskusih in kontrolah	41
Slika 21: Časi samičinih prvih napevov (združeni rezultati različnih poskusov s posamezno samico)	43
Slika 22: Grafični prikaz chi kvadrat testa in razlike v ritmičnosti petja pri poskusu s kemičnimi signali (samcem v kletki) (levo) in kontroli na svetlobi (desno).....	44

1 UVOD

1.1 OPIS PROBLEMA in NAMEN RAZISKAVE

Zelena smrdljivka (*Nezara viridula* (Linneus 1758)) spada med ekonomsko najpomembnejše škodljive vrste žuželk na svetu, na katerem je razširjena od 45° južne do 45° severne zemljepisne širine (Schaffer in Panizzi, 2000). Zanja je značilna izrazito pestra prehrana, zato povzroča škodo na zelo različnih pridelkih. To je eden pomembnih razlogov, da je zbranih precej podatkov o biologiji te vrste - kot na primer značilnosti njenega areala, prehrane, vrstnega reda gostiteljev, življenjski cikel, njeni parazitoidi (Schaffer in Panizzi, 2000) itd. Dobro je poznano tudi vedenje v času parjenja z načinom sporazumevanja tako s kemičnimi kot z vibracijskimi signali. Ne glede na to pa ostaja odprto vprašanje o prožilcih vibracijskega sporazumevanja, povezavi signalov različnih modalitet in njihove vloge v različnih fazah sporazumevanja.



Slika 1: Zelena smrdljivka (*Nezara viridula*), ilustracija: Vera Zgonik

Figure 1: Green stink bug (*Nezara viridula*), illustration by Vera Zgonik

Namen raziskave je ugotoviti, signali katerih modalitet sprožajo petje pozivnega napeva in napeva dvorjenja pri samici in samcu zelene smrdljivke (*Nezara viridula* (L.)). S poskusi brez dodanih zunanjih signalov želimo ovrednotiti prisotnost spontanega petja pri samcih in samicah tako na svetlobi kot v temi. S poskusi s pari pa bi radi ugotovili, ali se kateri od napevov večkrat pojavlja kot prvi - kot začetni napev v duetu in kdo od obeh spolov običajno začne z vibracijsko komunikacijo.

1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da bodo pri samcu sprožili pozivni oz. napev dvorjenja signali druge modalitete kot pri samici. Pričakujemo, da bodo samice stenic *Nezara viridula* začele peti po draženju s kemičnimi signali (feromoni) samcev iste vrste. Predvidevamo, da bomo petje samcev izzvali z vidnim ali vibracijskim draženjem. Pričakujemo razlike med samci in samicami v prisotnosti spontanega petja. Prav tako postavljamo hipotezo, da obstajajo razlike v intenziteti vibracijskega komuniciranja podnevi in ponoči (ob svetlobi in v temi).

1.3 PRISPEVEK DISERTACIJE K RAZVOJU ZNANOSTI

Osnovni namen doktorske naloge je ugotoviti, signali katerih modalitet sprožijo vibracijsko komunikacijo pri zeleni smrdljivki *Nezara viridula*.

Vibracijska komunikacija pri zeleni smrdljivki je dobro raziskana: analizirali so vrstne, geografske in spolne značilnosti posameznih napevov. Raziskan je pomen posameznih napevov ter njihova vloga pri orientaciji proti viru vibracij. Poleg tega sta pri tej vrsti raziskani struktura in funkcija vibroreceptorjev ter njihove povezave v centralnem živčnem sistemu. Rezultati raziskav v okviru disertacije nadgrajujejo poznavanje komunikacijskih procesov z odgovori na mnoga znanstveno pomembna vprašanja kot na primer: (a.) kaj sproži vibracijsko komunikacijo pri samcu in kaj pri samici, (b.) kdaj se pozivni napev spremeni v napev dvorjenja, (c.) zakaj samica ne poje zmeraj napeva dvorjenja, (d.) kako samec zazna samico in/ali drugega samca na rastlini in tudi (e.) v kolikšni meri zelene smrdljivke pojejo spontano. Te raziskave prinašajo tudi pomembno razumevanje povezovanja različnih čutil in signalov v kompleksnem okolju pri paritvenem vedenju. S povezovanjem z znanimi dejstvi in drugimi raziskavami bi lahko dobili vpogled v celotno paritveno vedenje pri zeleni smrdljivki.

Rezultati temeljnih raziskav te disertacije dajejo tudi osnovo za različne uporabne študije v okviru razvoja metod biološke kontrole škodljivih vrst žuželk.

2 PREGLED OBJAV

2.1 POSKUSNA ŽIVAL - ZELENA SMRDLJIVKA (*Nezara viridula* (L.))

Zelena smrdljivka (*Nezara viridula* [Linnaeus, 1758]) (Slika 1) je kozmopolitska, izrazito polifagna vrsta iz poddružine ščitastih stenic Pentatominae (Schaefer in Panizzi, 2000). Zelena smrdljivka (*Nezara viridula*) izvira iz področja Etiopije in se je od tam razširila po celem svetu (Hokkanen, 1986; Kavari in sod., 2006) ter še vedno osvaja nova področja (Kiritani, 2011). Njen sedanji areal se razprostira čez Severno, Srednjo in Južno Ameriko, Evropo, Azijo in Afriko - najdemo jo na vseh celinah razen Antarktike. Živi v tropskem, subtropskem in zmernem pasu do 45 stopinj severne in južne zemljepisne širine (Todd, 1989; Schaefer in Panizzi, 2000). Vrsta je visoko invazivna, saj se je v preteklosti razširila po celem svetu in še zmeraj osvaja nove areale, pri čemer ima vpliv tudi globalno segrevanje (Kiritani, 2011). V Sloveniji živi na Primorskem: od obale do Kraškega roba in na območju Nove Gorice (Gogala in Gogala, 1989; Gogala, 2008).

Gostiteljske rastline te izrazito polifagne vrste spadajo med več kot 30 različnih družin tako eno kot dvokaličnic kot so na primer: soja, bombaž, fižol, paradižnik, bučke, detelja, pesa, repa, radič, koruza, tobak in križnice, na primer gorčica (Todd, 1989; Panizzi, 1997). Zelena smrdljivka ima precejšnjo preferenco do stročnic, zato je pomemben škodljivec na kulturnih pridelkih povsod, kjer se pojavlja v večjem številu (Schaefer in Panizzi, 2000). Najrajši ima mlade sadeže in stroke (Molina in Trumper, 2012), ki jih popolnoma izsesa ter tako uniči pridelek. Divje rastline igrajo ključno vlogo pri vzdrževanju populacij v vmesnih obdobjih, ko ni na voljo kulturnih rastlin in zato je v uporabi divjih rastlin še precej možnosti za zatiranje tega škodljivca (Panizzi, 1997). Ponekod, na primer v Braziliji, je razdelitev po različnih gostiteljih povezana s fazo v razvoju (Todd, 1989; Panizzi, 1997). Nimfe so našli na soji in različnih divjih gostiteljih, kjer je njih preživetje in razvoj praviloma nižje oz. počasnejše. Odrasli osebki pa se jeseni umaknejo na divje gostitelje, kjer se hranijo in na nekaterih rastlinah tudi pariyo. V tropskem delu Brazilije (država Parana) pozno jeseni in zgodaj pozimi zaključijo peto generacijo na radiču in gorčici. Pozimi se v tropih preselijo na žito, kjer se prehranjujejo, vendar se na njem ne pariyo. Spomladi se preselijo na *Leonorus sibiricus*, kjer se zaključi šesta generacija (Panizzi, 1997).

Zelena smrdljivka je hemimetabolna žuželka s petimi stadiji nimf (Todd in Herzog, 1980; Todd, 1989). V tropskih in subtropskih predelih se razmnožuje celo leto, v zmernem pasu pa mrzli del leta (zimo) odrasli osebki preživijo v zimskem spanju (dormanci), zariti v rastlinski opad, pod lubjem, med kamenjem ali v zgradbah (človeška prebivališča, hlevi, ipd...). Osebki, pripravljani na zimsko spanje, spremenijo barvo iz zelene v rjavo (kriptično) in se v tem obdobju ne pariyo (Michieli in Žener, 1968; Harris in sod., 1984). Mastna hrana, rjava barva in stopnja varnosti (mesto dormance) pozitivno vplivajo na preživetje osebkov čez zimo (Panizzi in Hirose, 1995). Najbolj omejujoč dejavnik preživetja in razširjanja zelene smrdljivke je zimska umrljivost, zato tudi ne naseljujejo področij nad 45 vzporednikom geografske širine, ker so tam pozimi temperature prenizke.

Na leto ima smrdljivka lahko do šest generacij: v tropskih predelih običajno štiri do pet, v zmernem pasu pa samo dve do štiri (Todd, 1989; Kiritani, 2006). V zmernem pasu prilezejo spomladi žuželke na plano iz zimskega spanja in se po prilagoditvenem času

(najmanj pet dni pri samcih do največ 21 dni pri samicah) pariyo (Brennan in sod., 1977). Samice lahko v tem času preletijo tudi 1000 m na dan, medtem ko iščejo hrano in mesta za odlaganje jajc (Todd, 1989). Po parjenju samica na spodnjo stran lista izleže skupek jajčec, ki jih prilepi v značilno heksagonalno obliko. Ko odloži jajca, spet odleti drugam - na ta način se stenice hitro razširjajo (Todd, 1989).

Jajca so krem do blede rumene barve in običajno v skupkih (jajčnih masah), ki jih sestavlja zelo različno število jajc (30-130, povprečno okoli 60+/- 24 (Todd, 1989) oz. 80 jajc v eni jajčni masi (Panizzi in sod., 2004). Jajca so zlepljena med seboj in na podlago - običajno na spodnjo stran lista, v laboratoriju pa so samice prilepile jajca tudi na umetne površine. Izleganje lahko traja od pet dni poleti do 2-3 tedne pozno jeseni in zgodaj spomladi. Izleganje je sinhrono (vse nimfe v jajčni masi se izležejo približno istočasno).

Prva generacija nimf, ki se izvali iz jajc, se ne hrani in ostaja na jajčni masi. Te nimfe se združujejo s tipanjem in ne zaradi vida ali agregacijskega feromona, ker tega začno proizvajati šele dva dni po levitvi. Po prvi levitvi se razširijo po listu in se začno hraniti. Agregacija v začetnih treh fazah jih varuje pred mravljami (zaradi kemičnih snovi - smradne tekočine, ki jo izločajo zelene smrdljivke - tudi nimfe), zato se zmanjša umrljivost nimf v skupkih. Agregacijski feromon n-tridekan v majhnih koncentracijah sproži agregacijo nimf, v večjih koncentracijah pa njihovo disperzijo. V tretjem stadiju se nimfe začno razhajati, vendar še vedno ostajajo v skupkih. V četrti fazi pa se razširijo po večjem območju. Nimfe se večinoma hranijo z enako hrano kot odrasli osebk: najrajši imajo mlade poganjke, mlade razvijajoče se sadeže in semena. (Todd, 1989)

Razvoj od jajca do odrasle žuželke traja 35-37 dni poleti v zmernih klimatih, je pa zelo odvisen od temperature in lahko traja od 23 dni pri 30°C do 58 dni pri 20°C (Todd, 1989). Nimfe zadnjega stadija naredijo enako škode kot odrasle živali, saj potrebujejo veliko hrane (energije) za svojo aktivnost. Zato nimfe večinoma nimajo posebnih prehranskih diet, kot so običajne pri odraslih živalih. Po zadnji levitvi odrasle stenice vedno odletijo na druge rastline, kjer izležejo jajca (Todd, 1989).

Nezara viridula je zelo podvržena parjenju v sorodstvu (inbreeding-u), zato je potrebno laboratorijsko populacijo osvežiti vsaj enkrat letno, idealno pa bi bilo vsake štiri do šest tednov. V naravi poteka paritveno vedenje v dveh fazah. V agregacijski fazi se samci in samice zberejo na isti raslini s pomočjo samčevih feromonov (Borges in sod., 1987). Samčev feromon α -bisabolen epoksid naj bi po eni teoriji imel agregacijsko funkcijo in privlačil poleg samic še druge samce in nimfe petega stadija (Todd, 1989), vendar druge študije tega niso potrdile (Brézot in sod., 1994a), je pa dokazano, da ga zaznava tudi parazitoid *Trichopoda pennipes* - samčev feromon je kairomon za parazitoida (Colazza, 1999; Colazza, 2004). Vloga ostalih komponent feromonske zmesi: (E)-nerolidol in n-nonadekana še ni razjasnjena (Aldrich 1987).

Zelene smrdljivke, kot že ime nakazuje, izločajo smradno tekočino, kadar se počutijo ogrožene. Začnejo jo proizvajati že nekaj dni stare nimfe. Sestavlja jo vsaj 19 različnih snovi, največ je (E)-2-heksanala. To spojino najdemo v obrambni tekočini pri vsaj trinajstih drugih vrstah stenic družine Pentatomidae. Smradna tekočina nastaja v obeh metatorakalnih žlezah ter v tretji in četrti dorzalno abdominalni žlezi. Je prvi poznani eksokrini produkt, ki je hkrati feromon, alomon, kairomon in repelent (Todd, 1989). V

ekskretu samcev so našli poleg zgoraj navedene še dodekan, tridekan, (E)-2-heksanal, (E)-2 heksanil acetat, (E)-decanal in nerolidol (Aldrich in sod., 1978; Baker in sod., 1987; Lockwood in Story, 1987; Aldrich in sod., 1989; Brezot in sod., 1994; Borges, 1995). Nekatere od njih, kot na primer (E)-2-heksanal, heksanal, 1-heksanol in n-tridekan, so našli tudi v ekskretu samic, pri čemer je n-tridekana celo trikrat več kot pri samcih (Aldrich, 1978). Kljub temu pa te spojine nimajo enakega učinka kot feromoni. Samčevi feromoni imajo agregacijsko funkcijo na daljše razdalje (Borges 1987) in sprožijo vibracijsko komunikacijo (oddajanje pozivnega napeva) pri samici (Zgonik in Čokl, 2014).

Na rastlini se v pozivni fazi samec približa samici s pomočjo vibracijskih signalov, ki jih le-ta oddaja (Ota in Čokl, 1991). V duetu s samico poje samec najprej pozivni napev (MCS) in nato napev dvorjenja (MCrS), katerega dolžino signalov običajno prilagodi intervalu med dvema signaloma pozivnega napeva samice (Čokl in Virant-Doberlet, 2003). Ko se zeleni smrdljivki dovolj približata, sledi faza dvorjenja, ki se konča ali s kopulacijo ali s samičino zavrtnitvijo. Tej lahko sledi naslednji poskus samca, ki se spet začne z oddajanjem napeva dvorjenja. V fazi dvorjenja samica pogosto poje napev dvorjenja (Čokl in sod., 2000). Za fazo dvorjenja je značilno specifično gibanje samca - paritveni ritual, ko se samec najprej z antenami dotika samice po glavi, nato po hrbtu. Tudi samica antenira samca, kar pri njem sproži tresenje telesa. Slednje je Kon (1988) opisal tudi pri sorodni vrsti *Nezara antennata*, kasneje pa so opazili enako vedenje tudi pri zeleni smrdljivki (Čokl, 2006). Anteniranju sledi samčevo suvanje z glavo pod samičin trebuh in obrat, pri čemer ostajata ves čas v telesnem stiku (Borges, 1987). Samec zdaj suva samico z zadkom, dokler ta ne dvigne svojega zadka, čemur sledi kopulacija. Samec in samica sta v kopuli najprej z zadkom dvignjena od tal v obliki črke A, ko pa vzpostavita povezavo z genitalijami, spet spustita zadka (Čokl, 2006). Sama kopulacija lahko traja tudi več dni (McLain 1980).

Zelena smrdljivka je ekonomsko pomemben škodljivec na poljih bombaža, soje in raznih vrst zelenjave (Todd, 1989; Panizzi, 1997; Schaefer in Panizzi, 2000). Uporabo pesticidov učinkovito dopolnjujejo ali zamenjujejo različne metode biološke kontrole na primer s parazitoidi in/ali predatorji (Borges in sod. 2011, Knight in Gurr, 2007). Poznanih je 57 vrst parazitoidov (Jones, 1988), večina je naključnih: imajo različne gostitelje in niso specializirani na zeleno smrdljivko. Najuspešnejši je parazitoid na jajcih - kožekrilec *Trissolocus basalis*, ki spada v družino Scelionidae. Zelena smrdljivka je njegova glavna gostiteljica. Zelo malo parazitoidov parazitira na mlajših stadijih nimf. Pomembna pa sta še dva parazita, ki zajedata četrti in peti stadij nimf in odrasle živali: muhi tahinidi *Trichopoda pennipes* in *Trichopoda pilipes*. Skupaj poznamo trinajst vrst tahinidov, ki parazitirajo na odraslih smrdljivkah (drugih vrst, ki bi parazitirale na odraslih živalih, še niso odkrili) (Todd, 1989).

Iz šestih redov in devetnajstih družin je poznanih več nespecializiranih predatorjev zelene smrdljivke, med njimi je 18 vrst žuželk in šest vrst pajkov. Večina predatorjev pleni jajca, najpomembnejša je mravlja *Solenopsis invicta*, ki je tudi mlade nimfe, običajno med rastjo soje (na vegetativnih delih soje) (Schaefer in Panizzi, 2000). Jajca na reproduktivnih delih soje plenijo tudi nekatere kobilice (Todd, 1989).

2.2 KOMUNIKACIJA

Komunikacija, v ožjem pomenu besede, je izmenjava informacij med oddajnikom in sprejemnikom s pomočjo signalov različnih modalitet, ki se prenašajo preko podlage, zraka ali vode (Bradbury in Vehrencamp, 1998; Cocroft in Rodrigez, 2005). Medij in medsebojna oddaljenost določata uporabo in karakteristike te ali one modalitete ter sam način oddajanja in sprejemanja signalov. Na primerni razdalji pa lahko istočasno uporabljajo tudi signale različnih modalitet.

Komunikacija igra osrednjo vlogo v živalskih družbah in je zelo pomembna pri paritvenem vedenju. Njeno razumevanje nam pomaga pojasnjevati splošne evolucijske principe in procese naravne selekcije, olajša taksonomsko klasifikacijo (skupaj z morfološkimi znaki) in ponuja rešitve praktičnim problemom s škodljivci ipd.

2.2.1 Vibracijska komunikacija žuželk

Vibracijska komunikacija je zaradi tehničnih omejitev slabše raziskana, čeprav so vibracije splošno razširjene v okolju. Številne živali se med seboj sporazumevajo s signali, ki se prevajajo kot vibracije podlage. Vibracije, ki so posledica določene aktivnosti, lahko služijo plenilcem kot informacija o plenu (Laumann, 2007; Virant-Doberlet in sod., 2011), parazitoidi jo izkoriščajo za iskanje gostitelja (Casas in sod., 1998, Laumann in sod, 2007), služi pa lahko tudi za sporazumevanje znotraj vrste (Cocroft, 2001; Virant-Doberlet in Čokl, 2004; Cocroft in Rodriguez, 2005).

Že pred 300 leti so opisali oglašanje pri stenicah iz poddružine Geocorisae (Ray, 1710). Konec 20 stoletja pa so podrobneje začeli raziskovati različne skupine stenic kot so Reduviide, Pentatomidae, Acanthosomatidae, Cydnidae, Lygaeidae, Geocorisae (Gogala, 1989, 2006). Med registracijo zvokov so dejansko registrirali vibracije kot zvok. Ko je tehnika napredovala, pa so začeli meriti same vibracije na rastlini s pomočjo laserske vibrometrije (Michelsen, 1982).

Komunikacija z mehanskimi signali je med žuželkami najpogostejša oblika komunikacije, delimo pa jo glede na medij, po katerem signali potujejo: po zraku (bližnji in oddaljeni zvok), po trdni podlagi (vibracijska komunikacija), po vodni površini in po vodi (podvodni zvok) (Greenfield, 2002). Vibracija prek trdne podlage je med njimi najpogostejša, tako po številu vrst in družin kot tudi po filogenetski razporeditvi (Cocroft in Rodrigez, 2005). Večina dokazov kaže, da je vibracijska komunikacija pri žuželkah evolucijsko izvirnejša od zvočne (Stumpner in von Helversen, 2001; Greenfield, 2002).

Žuželke lahko proizvajajo vibracije na različne načine: s trkanjem, stridulacijo, tremulacijo in vibriranjem celotnega telesa ali njegovega dela (Ewing, 1989; Virant-Doberlet in Čokl, 2004; Hill, 2008), nekatere žuželke pa uporabljajo kombinacijo dveh načinov, na primer trkanje in vibriranje telesa ali dela telesa skupaj. Tremulacijo najdemo pri žuželkah, ki nimajo specializiranih struktur in je vsaj pri jamskih kobilicah izvorna oblika proizvodnje vibracij (Stritih, 2009). Za razliko od tremulacije, za katero so značilni ozkopasovni signali katerih frekvence so običajno pod 200 Hz, so signali pri trkanju in stridulaciji širokopasovni, kjer je večina energije sproščena pri višjih frekvencah (nad 500 Hz).

Vibracije za sporazumevanje uporabljajo samotarske in socialne živali. Med sesalci so znani na primer bizoni, sloni in gole podgane (*Heterocephalus glaber*) (Hill, 2008). Med žuželkami se z vibracijskimi signali sporazumevajo termiti (Rosengaus in sod., 1999), škržatki, ki živijo v skupinah, čeprav niso eusocialni (Cocroft, 2001; Cocroft in Rodriguez, 2005), vrbnice (Stewart in sod., 1995), termiti (Kirchner in sod., 1994), mravlje (Roces in Hölldobler, 1995), čebele (Kirchner in sod., 1988), tenčičarice (Henry, 1980) in mnoge druge žuželke (Čokl in Virant-Doberlet, 2003; Virant-Doberlet in Čokl, 2004). Poleg žuželk je vibracijska komunikacija znana tudi pri pajkovcih (Barth, 1986), škorpionih (Brownell in Farley, 1979) in rakih (Aicher in Tautz, 1990). Vibracijska komunikacija omogoča določanje položaja plena (Virant-Doberlet in sod., 2011), gostitelja (pri parazitoidnih žuželkah) (Laumann, 2007) ali partnerja kot na primer pri zeleni smrdljivki (Ota in Čokl, 1991; Čokl in sod. 1999, Žunič in sod. 2011) in še nekaterih drugih vrstah stenic (Virant-Doberlet in Čokl, 2004). Skupaj z drugimi čuti omogoča razpoznavanje vrste, spola in navsezadnje kopulacijo.

Pri členonožcih je raznolikost proizvajanja zvočnih in vibracijskih signalov veliko večja kot pri vretenčarjih, saj zaradi trdega eksoskeleta skoraj vsak premik telesa lahko producira zvok (Ewing, 1989). Popolna klasifikacija različnih načinov proizvajanja mehanskih signalov ne obstaja, v širšem pa jih združujemo v štiri kategorije: stridulacija, bobnanje, vibriranje telesa ali delov telesa (npr. membrane, kril ali izrastkov), klik mehanizmi in hitri izpust zraka (i.e. potiskanje zraka skozi majhno odprtino) (Ewing, 1989; Bradbury in Vehrencamp, 1998). Razen slednjega lahko vsi ostali proizvajajo tudi vibracije, ki se prenašajo po podlagi (Ewing, 1989). Žuželke včasih proizvajajo mehanske signale s pomočjo specializiranih struktur (Virant-Doberlet in Čokl, 2004). Slednje, na primer stridulacijski aparat in timbal, so običajno udeležene pri produkciji zvočnih signalov, včasih pa so vključene tudi v bimodalno komunikacijo, kjer so vibracije "stranski produkt" zvočne komunikacije. Vseeno tudi v tem primeru igrajo vibracije pomembno vlogo pri lokalizaciji partnerja (Latimer in Schatral, 1983).

Za majhne žuželke je vibracijska komunikacija primernejša od zvočne tudi zato, ker lahko učinkovito oddajajo le zvoke z valovno dolžino manjšo od tretjine dolžine telesa, torej visokih frekvenc (Marten in Marler, 1977; Markl, 1983; Michelsen in Larsen, 1983; Riede, 1997), ki se hitreje zadušijo v rastlinju kot signali nizkih frekvenc (Michelsen in sod., 1982; Čokl in sod., 2005). Vibracije nizkih frekvenc se učinkovito prenašajo po rastlini (Cocroft in Rodriguez, 2005) tudi na daljše razdalje (do 2 metra), ker so pogosto uglašene z resonančnimi lastnostmi rastline (Čokl, 2005; Polajnar in sod., 2012; 2013).

2.2.2 Vibracijska komunikacija pri stenicah

Glede na druge skupine živali je vibracijska komunikacija pri stenicah poddružine Pentatominae relativno dobro raziskana: registrirali, analizirali in opisali so vrstno in spolno specifične pozivne napeve in napeve dvorjenja pri več vrstah (Pavlovčič in Čokl, 2001; Blassioli-Moraes in sod. 2005; Čokl in sod., 2007, Čokl, 2008, 2011; Kavčič in sod., 2013). Vsi komunikacijski vibracijski signali imajo dominantno frekvenco okoli 100 Hz in višje harmonične tone praviloma pod 500 Hz (Čokl in Virant-Doberlet, 2003; Gogala, 2006). Razlike med napevi različnih vrst in spolov so izražene v časovnem vzorcu in amplitudni modulaciji. Pozivna napeva samca in samice služita iskanju partnerjev, napeva dvorjenja pa prepoznavanju vrste in pripravi na kopulacijo. Za rivalno vedenje dveh

samcev je značilen rivalni napev, pri samicah pa so opisali tudi zavrtnitveni napev (Čokl in sod., 2000b).

Različne skupine stenic oddajajo vibracijske signale s stridulacijo (Gogala, 2006), nihanjem zadka (Čokl in Virant-Doberlet, 2003), tremulacijo in trkanjem po podlagi (Žunič in sod., 2011). Večinoma uporabljajo podlago kot medij za prenos signalov, zvočna komponenta pa ima nizko intenziteto in in predstavlja aposemantični signal v medvrstni komunikaciji (Gogala, 2006). Zelena smrdljivka oddaja vibracijske signale tako, da trese zadek, nihanje pa se preko nog prenaša na podlago. Pentatominae imajo specializirano strukturo, ki jo tvorita prvi in drugi abdominalni tergiti. Skupaj zraščena tergita predstavljata ogrodje, na katero se vežejo nasprotno vpete mišice, udeležene pri produkciji vibracij: timbalne (tergalne longitudinalne), lateralni kompresor ter par mišic pred timbalom (Kuštar, 1989). Vse navedene mišice delujejo sinhrono. Krčenje mišic in faza oddanih vibracij sta v enakem razmerju (Amon, 1990). Na grebenu tergalne plošče timbala se nahaja še dorzoventralna mišica depresor timbali, ki verjetno tudi sodeluje pri produkciji vibracij (Kuštar, 1989).

Vibracijske receptorje stenic je prvi opisal Debaisieux leta 1938 pri vrsti *Pyrrhocoris apterus*, njihovo funkcijo pa kasneje Devetak pri rodu *Sehirus* (Devetak, 1978) in Čokl (1983) pri vrsti *Nezara viridula*. Subgenualni receptorji tega rodu so uglašeni med 50 in 2000 Hz, femoralni pa na frekvence nižje od 200 Hz. Oboji so približno enako občutljivi (Devetak, 1978).

Vibracijska komunikacija pri stenicah ni omejena samo na rastline ali drugo trdno podlago. Vodne stenice zaznavajo vibracije preko zračnih mehurčkov, s katerimi dihajo (Theiß, 1982).

Najbolj raziskana je zaznava vibracij pri zeleni smrdljivki (*Nezara viridula*): strukturo receptorjev so opisali Michel in sod. (1983), funkcijo pa Čokl (1983). V vseh nogah so subgenualni organi, sklepni hordotonalni organi in na nogah posamezne kampaniformne senzile. Vedenjski poskusi so pokazali, da najverjetneje tudi antenalni organi prispevajo k zaznavanju vibracij (Ota in Čokl, 1991; Jeram in Čokl, 1996). Stenice imajo v vseh šestih nogah subgenualni organ in sklepne hordotonalne organe: femoralni, tibialni distalni in tarzopretarzalni hordotonalni organ (Michel in sod., 1983; Čokl, 2006).

Subgenualni organ se nahaja na sprednjem delu tibije, sestavljata ga 2 skolopidija, ki imata vsak po eno čutilno celico. Ti celici se na eni strani priraščata na steno – epitel tibije, drugi konec pa je distalno pritrjen na membrano krvnega kanala (Michel in sod., 1983). Aksona obeh celic sta del senzoričnega (čutilnega) živca in se pridružita aksonu femoralnega hordotonalnega organa (Zorović in sod., 2008). Z registracijo odgovorov receptorskih celic na vibracijske signale je bilo dokazano, da so celice uglašene na frekvenčno območje njihovih komunikacijskih vibracijskih signalov (Čokl, 1983).

Hordotonalni organi se nahajajo v femurju, tibiji in tarsu, blizu sklepov (Michel in sod., 1983). Razlikujejo se po številu skolopidijev in čutilnih celic v njih. Femoralni hordotonani organ sestavlja 12 skolopidijev, ki so razporejeni v dve skupini: proksimalno z osmimi in distalno s štirimi skolopidiji. Vsi imajo po dve receptorski celici. Tibialni hordotonalni organ ima 2 skolopidija (ena z eno in drugega z dvema receptorskima celicama).

Tarzalni hordotonalni organ pa sestavljata dva skoloparija, eden z dvema in drugi s tremi skolopidiji. V prednjem skolopariju ima en skolopidij eno, drugi pa dve receptorski celici, v zadnjem pa vsak po eno. Hordotonalni organi v sklepih in kampaniformne senzile zaznavajo vibracije nizkih frekvenc (Čokl, 1983). Njihove projekcije v centralnem gangliju so ugotavljali s sočasnim barvanjem in intracelularnim odvajanjem (Zorovič, 2005).

Antenalni organ: vedenjski poskusi so pokazali, da najverjetneje tudi receptorji na ali v antenah zaznavajo vibracije (Ota in Čokl, 1991). Antenalne kampaniformne senzile in Johnstonov organ so opisali Jeram in Pabst (1996) in Jeram in Čokl (1996). Tudi morfologija antenalnih organov kaže na olafaktorno in mehanoreceptorsko funkcijo (Rani in Madhavendra, 1995).

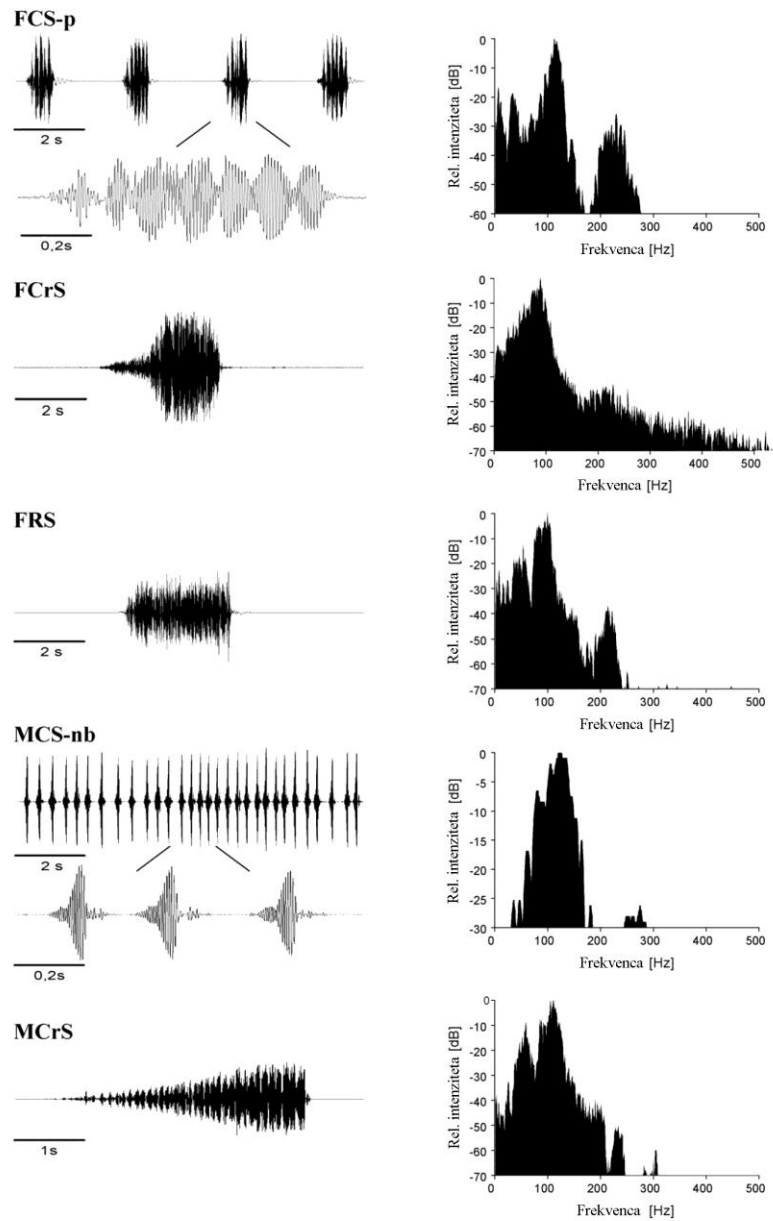
2.2.3 Prenos vibracij po rastlini

Glede na hitrost prevajanja vibracij in njihovo frekvenco so dokazali, da uporabljajo žuželke za komunikacijo po podlagi upogibne valove za katere je značilno, da podlaga niha v ravnini vzbujanja in se širi prečno nanjo ter da je hitrost prevajanja signalov po rastlinah obratno sorazmerna s frekvenco (Michelsen in sod. 1982; Barth, 1986).

Dušenje (atenuacija) ni linearno ampak je odvisno od frekvence signala (Čokl in sod., 2004, 2005). Zeleni deli rastlin delujejo kot nizkopasovni filter, ki prepušča nizke frekvence in duši frekvence nad 500 Hz (Čokl, 2008). Lokalni minimumi in maksimumi amplitude signala so posledica stoječega valovanja, ki nastane zaradi odbojev vibracij na mejah dveh faz (Michelsen in Larsen 1983; Barth, 1986). Amplituda signala na anti-vozu je lahko višja od amplitude vhodnega signala (Čokl in sod., 2007). Dušenje je najmanjše stebelu in listnih žilah in večje na ploskvah (laminah listov) (Magal in sod., 2000; Čokl in sod., 2004). Dušenje je največje na prehodih iz listne lamine na žilo, iz peclja na list ipd. (Čokl in sod., 2004; 2007).

2.2.4 Vibracijska komunikacija pri zeleni smrdljivki

Vibracijska komunikacija je pomemben del paritvenega vedenja zelene smrdljivke (Čokl in Virant-Doberlet, 2003; Virant-Doberlet in Čokl, 2004). Samec in samica proizvajata pozivni napev in napev dvorjenja, samec tudi rivalni napev in samica zavrtnitveni napev (Slika 2) (Čokl, 2008). Med oddajanjem pozivnega napeva ostaja samica na istem mestu, samec pa jo išče po rastlini in v duetu oddaja napev dvorjenja. Ko se samec približa samici, se pogosto samica premakne k samcu. Temu lahko sledi še samičin napev dvorjenja tik pred samo paritvijo (Čokl in sod., 2000b). Pri samcu včasih pozivni napev preide v napev dvorjenja znotraj iste sekvence, močno motiviran samec pa lahko odgovori na samičin pozivni napev takoj z napevom dvorjenja. Pri samici so Čokl in sodelavci (2000b) opisali dve obliki pozivnega napeva: FCS1 (imenovan tudi FCS-np), je pogostejši in se običajno pojavlja v duetu, sestavlja pa ga en daljši pulz za razliko od FCS2 (imenovan tudi FCS-p), ki je sestavljena iz vlaka kratkih pulzov in se redkeje pojavlja. Dominantna frekvenca vseh opisanih napevov je med 90 in 120 Hz. Napeve lahko ločimo med seboj po njihovem splošnem amplitudnem in časovnem vzorcu ter po časovnih parametrih kot so dolžina in ponavljalna frekvenca pulza ali pulznega vlaka, ter po frekvenčnih karakteristikah od katerih so najpomembnejše: dominantna frekvenca, višji harmonični toni in frekvenčna modulacija (Čokl in sod., 2000a,b; Čokl, 2008).



Slika 2: Slika napevov zelene smrdljivke (po Čokl, 2008): Slika prikazuje oscilogramе (na levi) in frekvenčne spektre različnih napevov (na desni) samca in samice zelene smrdljivke (*Nezara viridula*). Napevi so bili posneti na membrani zvočnika. FCS-p= pulziran samičin napev (= FCS2), FCrS = samičin napev dvorjenja, FRS = samičin zavrnitveni napev, MCS-nb = ozkopasovni tip samčevega pozivnega napeva, MCrS = samčev napev dvorjenja

Figure 2: Songs of the green stink bug (adapted from Čokl, 2008): the figure shows oscilograms (on the left) and spectral properties (on the right) of different songs of male and female green stink bug (*Nezara viridula*). Songs were recorded on a loudspeaker membrane. FCS-p = pulsed female calling song (= FCS2), FCrS = femal courtship song, FRS = female repelling song, MCS-nb = narrowband male calling song, MCrS = male courtship song

Raziskane so tudi razlike med vibracijskimi napevi posameznih geografsko ločenih populacij stenic: vibracijski napevi različnih geografsko ločenih populacij se značilno razlikujejo v časovnih parametrih, vendar se osebkii različnih ločenih populacij kljub temu med seboj pariyo (Čokl in sod. 2000b), znotraj vrste niso našli kriптиčnih vrst (Kavar in sod., 2006). Iskanje in določanje položaja samice na rastlini omogočajo samcu signali njenega pozivnega napeva. To so dokazali tako vedenjsko Ota in Čokl, 1991; Čokl in sod., 1999; Miklas in sod., 2003b) kot nevrobiološko (Zorović in sod., 2008).

2.3 KEMIČNA KOMUNIKACIJA PRI ZELENIM SMRDLJIVKI

Na daljše razdalje je za majhne živali, kot so žuželke, najučinkovitejša kemična komunikacija, saj je energetska najmanj potratna: metulji na primer lahko zaznajo zelo majhne količine feromona (Raina in sod., 1984). Problem pri kemični komunikaciji je le natančna lokalizacija partnerja, saj so kemični signali odvisni od zunanjih dejavnikov (veter, pretok zraka v gostem rastlinju,...) in niso usmerjeni, zato za končni del iskanja, ko je treba cilj natančno določiti, živali običajno uporabljajo še druge načine sporazumevanja kot so vibracije, vid, itd.

Kemična komunikacija je bolj raziskana pri socialnih žuželkah, npr. čebelah (Robinson 1996; Slessor 2005) in tudi pri nekaterih metuljih (Tumlinson, 1982), vendar pa jo uporabljajo tudi druge solitarne živali. Zelene smrdljivke se zbirajo v skupine na rastlini s pomočjo agregacijskega feromona, poleg tega pa igra kemična komunikacija pri tej vrsti pomembno vlogo tudi pri samem parjenju (Brennan in sod., 1977; Harris in Todd, 1980; Borges in sod., 1987; Aldrich, 1988, 1995; Todd, 1989; Brezot in sod., 1993; Aldrich in sod., 1997, 2006).

Feromoni so snovi, ki jih živali uporabljajo za komunikacijo. Beseda feromon izhaja iz grških besed "pherin" - prenesti in "hormon" - prebuditi. Skovala sta jo Karlson in Luscher (1959) in pomeni snov, ki jo izloča osebek ter zazna drugi osebek iste vrste, pri katerem sproži določeno specifično reakcijo, na primer značilno vedenje ali razvojni proces. Feromone največ uporabljamo za spremljanje velikosti populacij (monitoring populacij), motenje parjenja in za masovne ulove škodljivcev. Taka uporaba feromonov zmanjša stroške kmetovalcem in pozitivno vpliva na okolje, saj se s tem zmanjša uporaba pesticidov. Slednje vpliva tudi na kakovost izdelka in posredno na potrošnika (Zarbin in sod., 2007).

Iz prejšnjih študij (Čokl in Bogataj, 1982) sklepamo, da potrebujejo samice stenic kemične signale, da začnejo peti in s tem klicati partnerja. Samice, ki so jim odstranili antene niso klicale partnerjev in niso kopulirale. Stenice imajo na antenah kemoreceptorje, s katerimi zaznavajo kemične signale v okolju (Brezot in sod., 1996). Samci zelene smrdljivke oddajajo feromone, pri samcih jih ni nihče našel (Aldrich, 1995).

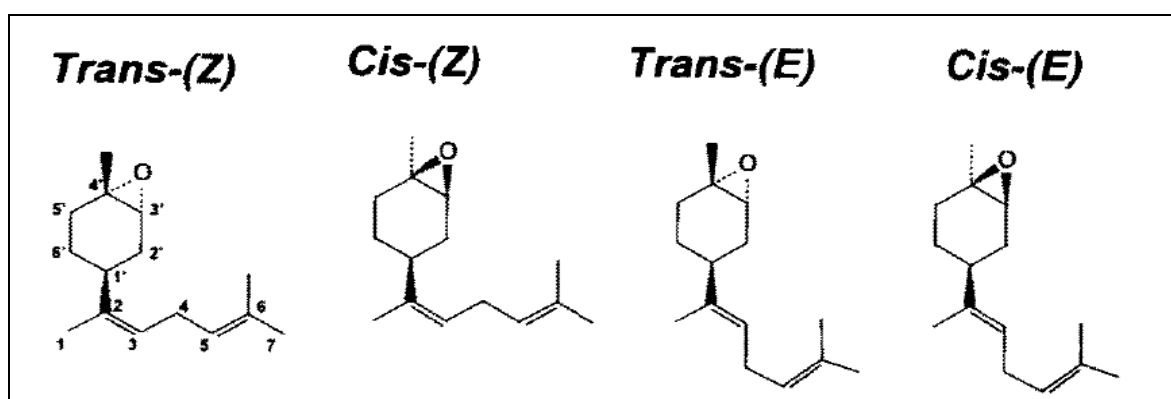
Vendar pa ostaja odprto vprašanje bimodalne komunikacije, to je povezav ter sinergije sporazumevanja z vibracijskimi in kemičnimi signali v začetnih fazah paritvenega vedenja pri stenici vrste *Nezara viridula*.

Miklas in sodelavci (2003a) so ugotovili, da petje samice zelene smrdljivke zviša oddajanje feromona pri samcu. Samčev feromon ima agregacijsko funkcijo in dokazano vpliva na vedenje samice (Harris in Todd, 1980; Brézot in sod., 1994; Tillman in sod., 2010). Učinek feromona na samce in celo nimfe zadnjega stadija sta opisala Harris in Todd (1980), vendar kasnejše študije slednjega niso potrdile - dokazano pa je, da samčev feromon privlači odrasle samice - tako v laboratoriju (Brézot in sod., 1994) kot v poskusih v naravi (Tillman, in sod., 2010). Študije so si enotne glede vpliva feromona α -bisabolen epoksid na tahinide: samčev feromon privlači parazitoidne muhe tahinide, ki parazitirajo na zeleni smrdljivki (Harris in Todd, 1980; Tillman in sod., 2010).

Glavni sestavini samčevega feromona zelene smrdljivke sta *cis* in *trans* izomeri (Z)- α -bisabolen epoksid-a (Slika 3), pomožne snovi, ki so jih našli v samčevem ekskretu pa še dodekan in nerolidol (Borges, 1995) oz. n-nonadekan in nerolidol (Aldrich, 1995).

Interindividualne variacije v količini in čistosti feromona sta opisala Johansson in Jones (2007). Kljub temu, da obstaja med osebki precejšnja variabilnost v razmerju *cis* in *trans* izomere (Brézot in sod., 1994; Ryan in sod., 1995; Miklas in sod., 2000), se vseeno razlikujejo tudi povprečja populacij iz različnih koncev sveta (Brezot in sod., 1994) - v različnih delih sveta sta *cis* in *trans* izomeri različno močno zastopani v feromonski zmesi. V Franciji je razmerje med *trans* in *cis* izomero 1,4:1, v ZDA 3:1, na Japonskem pa sta v enakem razmerju 1:1, Brazilska populacija ima samo *trans* izomero (Aldrich in sod., 1987, 1993).

Zanimivo je, da je pri sorodni vrsti *Acrosternum hilare* razmerje med *cis* in *trans* izomerama obrnjeno v korist *cis* izomere.



Slika 3: Oblike samčevega feromona zelene smrdljivke (iz Brezot, 1994): Trans-(Z) = *trans*-(Z)-bisabolen epoksid, Cis-(Z) = *cis*-(Z)-bisabolen epoksid, Trans-(E) = *trans*-(E)-bisabolen epoksid, Cis-(Z) = *cis*-(Z)-bisabolen epoksid

Figure 3: Forms of the male pheromone in the green stink bug (from Brezot, 1994): Trans-(Z) = *trans*-(Z)-bisabolene epoxide, Cis-(Z) = *cis*-(Z)-bisabolene epoxide, Trans-(E) = *trans*-(E)-bisabolene epoxide, Cis-(Z) = *cis*-(Z)-bisabolene epoxide

Več skupin raziskovalcev je sintetiziralo feromone samca zelene smrdljivke na različne načine (Baker in sod., 1987; Tomioka in Mori, 1992; Baptistella in Aleixo, 1994; Brézot in sod., 1994).

2.4 OSTALA ČUTILA

Stenice so dnevne živali in imajo dve sestavljeni očesi in dva ocelija (Salini, 2011). Vid zelenih smrdljivk ni dobro raziskan, vendar pa lahko domnevamo, da igra vsaj na krajših razdaljah pomembno vlogo pri razpoznavanju partnerja. Prav tako je za parjenje pomemben dotik, saj imajo zelene smrdljivke poseben ritual paritvenega vedenja, s katerim samec stimulira samico za kopulacijo. Najprej se je dotika z antenami na sprednjem delu toraksa in po glavi, nato se premakne ob stran in z glavo suva pod njen zadek, nakar zleze tik za njo in še bolj intenzivno suva z glavo njen zadek kvišku, dokler ga ona ne dvigne. Takrat se samec obrne, pri tem pa še vedno suva s svojim zadkom gor-dol. Večinoma se tudi pri obračanju ves čas dotika samice. Sledi kopulacija, ki se začne v značilni obliki črke A, ko imata oba partnerja dvignjena zadka (Čokl, 2006). Za sam začetek proizvodnje vibracijskih napevov pa dotik ni potreben, saj začne eden od para običajno peti že ko sta več kot 20 cm narazen in se s pomočjo vibracijskih signalov najdeta. Pozivni napev ima funkcijo določitve položaja partnerja (Ota in Čokl, 1991), zato seveda dotik ne more biti potreben pogoj za petje tega napeva.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POSKUSNE ŽIVALI

V vseh poskusih smo uporabljali zeleno smrdljivko *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) iz laboratorijsko gojene populacije. Divje stenice smo nabrali pozno poleti in jeseni (od avgusta do oktobra) na severni (slovenski) obali Jadranskega morja, v Tržaškem zalivu, v bližini Kopra. Stenice smo v laboratoriju takoj ločili po spolu in jih dali v temo pri temperaturi 8°C v 30 x 40 x 25 cm velike terarije (steklene škatle z žičnatim pokrovom, napolnjene z bršljanom in embalažnimi kartoni za zatočišča), na prezimovanje za 1-4 mesece. Po diapavzi so živele živali pri 16/8 urnem dnevno-nočnem ritmu svetlobe, vlagi 30-60 % RH (relativne vlažnosti) in temperaturi 22-25°C. Hranili smo jih s svežim fižolom (*Phaseolus vulgaris* L.), poganjki pritličnega fižola, svežimi arašidi (*Arachis hypogaea*) in sončnimi semeni (*Helianthus annuus*). Laboratorijsko populacijo smo ohranjali pri istih pogojih v steklenih in plastičnih terarijih z žičnatim pokrovom, velikih (38 x 25 x 25 cm).

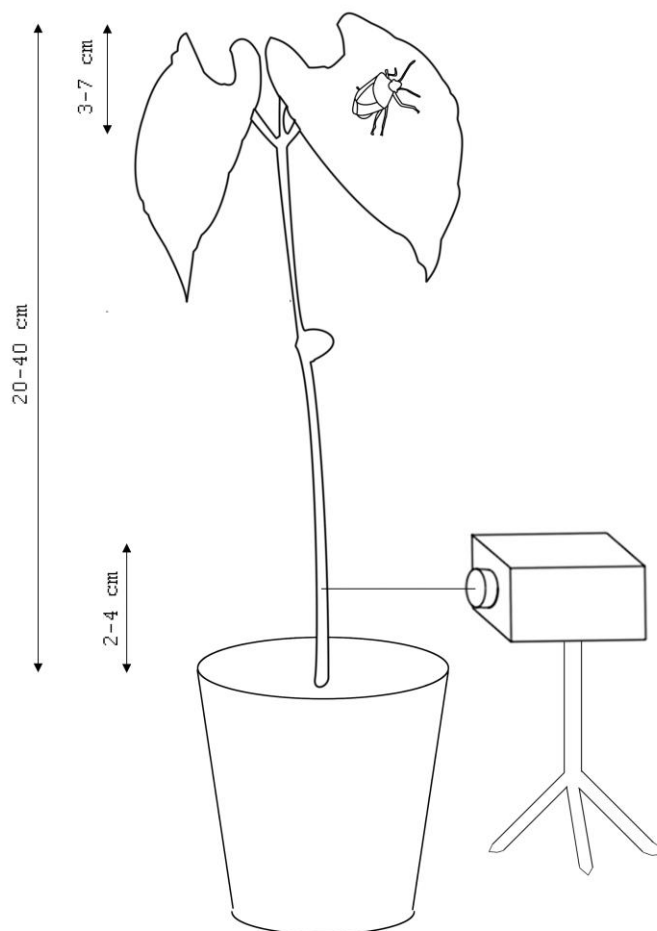
V poskusih so sodelovale naivne živali prve in druge laboratorijsko vzgojene generacije, ki smo jih ločili po spolu prvi dan po zadnji levitvi in divje živali po prezimovanju v laboratoriju. Uporabljali smo samce vsaj 10-14 dni in samice vsaj 14-20 dni po zadnji levitvi, da bi zagotovili njihovo spolno zrelost (Brennan in sod., 1977).

Poskusne živali so bile ločene, vsaka v svojem pollitrskem plastičnem lončku (14 cm visokem, z 10 cm premerom na vrhu in 6 cm premerom na dnu), hranjene z enako hrano in v istih pogojih kot laboratorijska populacija.

3.2 RASTLINE

Vse poskuse sem izvajala na svežih sadikah fižola (*Phaseolus vulgaris* L., var. etna), gojenih pri 22°C, 30-60 % RH in 16/8 dnevno-nočnem ritmu. Rastline so bile posamično posajene v plastične lončke z vermikulitom. Poskuse sem izvajala na 20-40 cm visokih sadikah fižola z dvema večjima listoma (5 do 8 cm široka in približno enake dolžine), vsak na eni strani na 2 cm dolgem peclju. Na sredini med listoma je bil 3-7 cm visok vršiček z dvema manjšima listoma, ki sta bila včasih še v brstu, včasih pa že razvita in dolga do 3 cm (Slika 4).

Rastline so bile ločene od stenic, da bi preprečili kakršenkoli stik med zeleno smrdljivko in poskusnimi sadikami pred poskusom. Za vsak test sem uporabila novo rastlino, individualno posajeno v lonček.



Slika 4: Struktura in dimenzije fižolovih sadik (*Phaseolus vulgaris*), uporabljenih v poskusih ter postavitev laserskega vibrometra

Figure 4: Structure and dimensions of a bean plant (*Phaseolus vulgaris*) used in experiments and position of a laser vibrometer

3.3 REGISTRIRANJE IN ANALIZA SIGNALOV

Vse poskuse sem izvajala v laboratorijih Oddelka za entomologijo na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani, med 9:00 in 17:00 uro (2 do 10 ur po začetku foto faze). Vibracije sem registrirala 13 minut s pomočjo laserskega vibrometra (krmilnik 2200-L, senzorična glava OFV-353, Polytec GmbH, Waldbronn, Nemčija) na dnu stebila (2-4 cm nad zemljo) rastline, ki je bila v kovinski kletki, obdani s peno, in položeni na železno ploščo na gumijastih nogicah, da zmanjšamo šum – pena ublaži vibracije nizkih frekvenc, železna plošča pa visokih. Za boljši odsev sem na steblo rastline prilepila 2 mm² velik košček odbojne folije na mesto, kamor sem usmerila laserski žarek. Posnete vibracije so shranjene v računalniku, digitalizirane s pomočjo zvočne kartice Sound Blaster Audigy 4

(Creative Labs Inc., Singapur) in programa Cool Edit Pro 2 (Syntrillium Software, Phoenix, AZ, ZDA) s hitrostjo 44000 Hz, enokanalno (mono channel) in pri 16 bitni resoluciji. Digitalizirane shranjene signale sem analizirala s pomočjo programa Sound Forge, verzija 6.0 (Sonic Foundry, Inc. Madison, Ca, ZDA). Poskuse s posameznimi osebki sem izvajala pri dnevni svetlobi in pri rdeči luči, ki je zelene smrdljivke ne vidijo. Vedenje stenic na rastlini sem opazovala in razčlenjevala na posnetkih digitalne kamere (GR-DV4000E, JVC, ZDA).

Komunikacijski signali so opisani kot pulzi, definirani kot enotni homogeni sklopi vibracij določenega trajanja (Broughton, 1963). Izraz vlak pulzov uporabljamo, kadar so pulzi razporejeni v ponovljive in časovno značilne skupine.

Načrtovali smo tri tipe poskusov. (a.) Pri testiranju parov smo opazovali samca in samico istočasno na rastlini. (b.) Za oceno prisotnosti spontanega petja smo opazovali posamezno žival samo na rastlini, brez vključevanja dodatnih zunanjih signalov. (c.) Da bi ugotovili kdaj začnejo peti, torej kateri signali sprožijo pozivni ali napev dvorjenja pri samcih in samicah smo posamezne stenice dražili z različnimi signali.

3.4 POSKUSI S PAROM

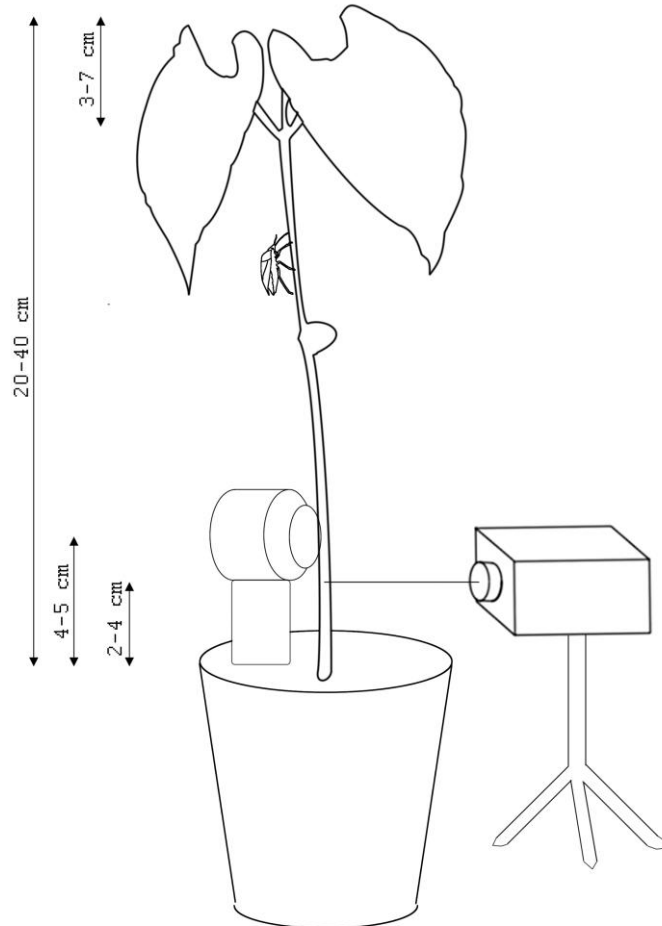
V teh poskusih sem registrirala vibracije na rastlini, ko je bil na njej par stenic in hkrati opazovala in s kamero snemala vedenje, da bi ugotovila morebitne povezave med določeno vrsto napeva in vedenjem stenic. Vsako žival sem testirala samo enkrat na dan. Vsi pari so unikatni. V poskusu sem najprej osebek (v nekateri poskusih najprej samca, v drugih najprej samico) položila (oz. mu/ji dovolila, da spleza) sam/a na steblo fižolove sadike. Stenice so običajno splezale na vrh stebela in se umirile na enem od listov. Po 5 minutni kontroli sem dodala zeleno smrdljivko nasprotnega spola na steblo. Nato sem opazovala in snemala vedenje z digitalno kamero JVC GR-DV4000 skupaj z registracijo vibracijskih signalov. Poskus sem končala po 25 minutah oz. tik pred poskusom kopulacije, če je do tega prišlo prej, z namenom, da ohranim spolno nedolžnost testiranih osebkov. Iz podatkov tega poskusa sem analizirala vedenje in čas, do kdaj se večina žuželk začne oglašati. Večinoma so začele peti (če so) v dvanajstih minutah, zato sem temu prilagodila naslednje poskuse.

V drugem poskusu s pari sem izpustila 5 minutno kontrolo na začetku in položila samca in samico hkrati (t.j. v roku ene minute) na nasprotna lista. Poskus sem končala po 13-ih minutah oz. ko je katera od stenic začela peti. Trajanje tega poskusa (13 minut) je enako kot pri poskusih s posameznim osebkom in različnimi signali.

3.5 POSKUSI S POSAMEZNYM OSEBKOM

Posameznemu osebkemu sem dovolila, da je splezal na steblo rastline in po 1-2 minutah, ko se je umiril, sem ga dražila s signali različnih modalitet. V kontrolah nisem dodajala dražljajev in te so služile za ovrednotenje pogostosti spontanega petja.

3.5.1 Poskusi s predvajanjem vibracij



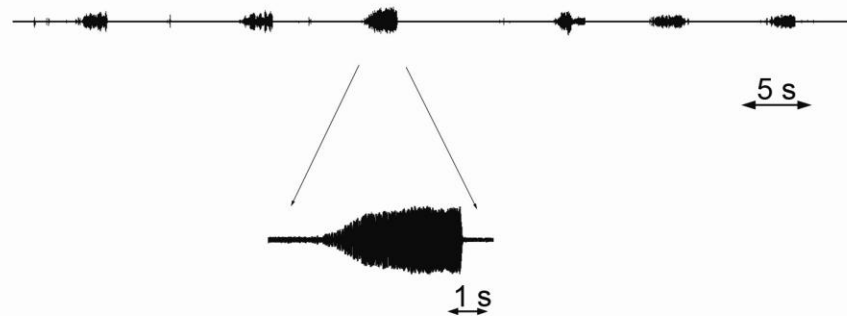
Slika 5: Struktura in dimenzije fižolovih sadik (*Phaseolus vulgaris*), uporabljenih v poskusih s predvajanjem vibracij ter postavitev laserskega vibrometra in vibracijskega spodbujevalca

Figure 5: Structure and dimensions of a bean plant (*Phaseolus vulgaris*) used in playback experiments and position of a laser vibrometer and a vibrational exciter

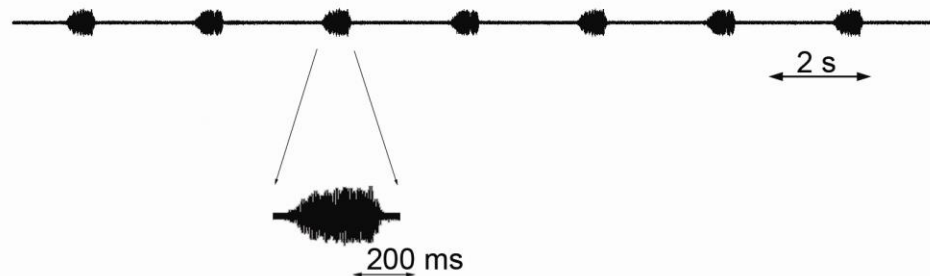
Te poskuse sem izvajala na rastlini, ki sem jo tresla pri dnu stebila z vibracijskim spodbujevalcem (tip 4810, Brüel & Kjaer, Naerum, Danska). Stimulacijski program sem predvajala 13 minut (Slika 5).

Stimulacijski program za samce je bil sestavljen iz naravnega samičinega pozivnega napeva (FCS), za samice pa iz naravnega samčevega pozivnega napeva (MCS) (Slika 6). Napeve, ki smo jih uporabili za stimulacijo, smo prej registrirali z laserskim vibrometrom kot vibracije membrane nizkofrekvenčnega zvočnika (Conrad Electronic, Germany, impedance 8 Ohm, 4.5 mm diameter, 50–2,000 Hz), na katerem so pele stenice.

Stimulacijski program MCrS



Stimulacijski program FCS



Slika 6: Oscilogram stimulacijskega programa: del stimulacijskega programa za samice, ki smo jih dražili s samčevim napevom dvorjenja (MCrS) ter tipični samčev pozivni napev (zgoraj) in del stimulacijskega programa za samce, ki smo jih dražili s samičinim pozivnim napevom (FCS) ter tipični samičin pozivni napev (spodaj)

Figure 6: A section of the male courtship song (MCrS) sequence with a typical male courtship song pulse train (above) and a section of the female calling song (FCS) sequence with a typical female calling song pulse (below) shown in an oscillogram

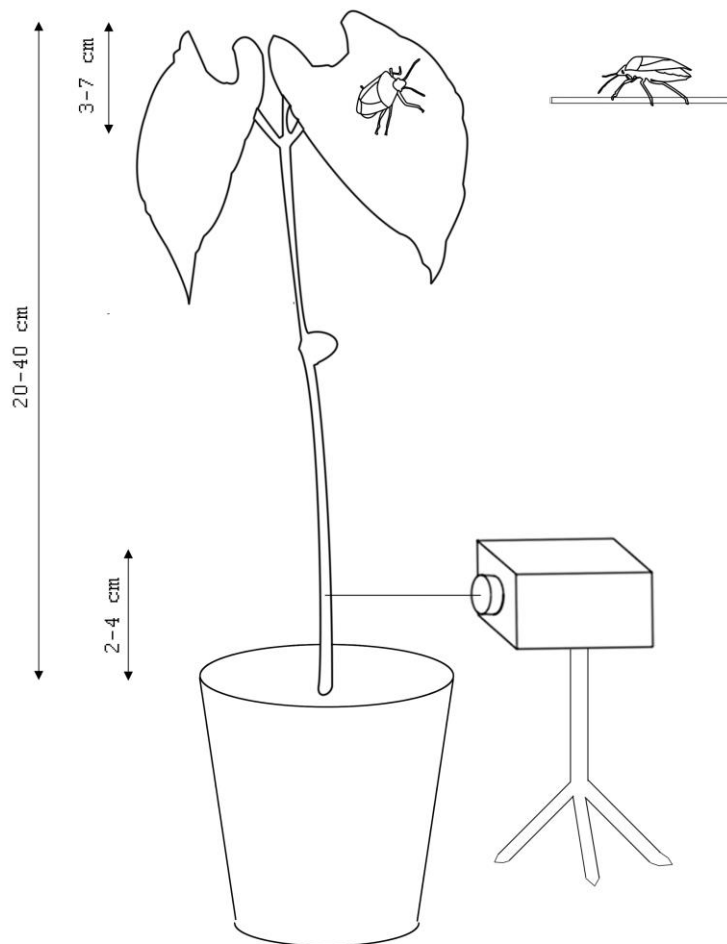
Signale sem shranila v računalnik s pomočjo zvočne kartice (glej zgoraj) s programom Cool Edit Pro (glej zgoraj) pri hitrosti vzorčenja 44.100 Hz. Stimulacijske sekvence so sestavljene iz napevov petih različnih samcev in samic iz slovenske populacije, prav tako s pomočjo programa Cool Edit Pro. Vlak pulzov FCS stimulacijskega programa je trajal povprečno 538.1 ± 25.6 ms, povprečna dominantna frekvenca je bila 119.8 ± 1.5 Hz in povprečni ponavljalni čas (čas med začetkom dveh zaporednih signalov) 2559 ± 384 ms. Povprečja smo izračunali na podlagi meritev 62 signalov FCS stimulacijske sekvence.

Dominantna frekvenca MCrS stimulacijske sekvence je bila povprečno 127.7 ± 7.2 Hz, čas trajanja vlaka pulzov 2109 ± 415 ms in ponavljalni čas 9548 ± 2325 ms. Analizirala sem 64 pulzov MCrS sekvence. Na sliki sta tipična FCS in MCrS signala in koščka obeh stimulacijskih sekvenc (Slika 6).

Stimulacijske signale, ki jih je produciral vibracijski spodbujevalec, sem registrirala sočasno z vibracijami, s katerimi so žuželke odgovarjale.

3.5.2 Poskusi z modelom

Za model smo uporabili žive in mrtve osebke iste vrste. Mrtvo stenico sem oprala z etanolom, da sem odstranila njen vonj, jo zalepila na palčko in pokazala testiranemu osebku z zračne razdalje 2-4 cm (Slika 7). Ob testiranju z živimi osebki sem samici, ki je služila kot vidni signal, dovolila, da je splezala na paličico in jo pokazala testiranemu osebku z zračne razdalje 2-4 cm. V nobenem primeru se žuželke niso mogle dotakniti modela in niso bile v kontaktu z njim preko rastline. Morebitne vibracije v odgovor na vidni signal sem registrirala 13 minut.



Slika 7: Struktura in dimenzije fižolovih sadik (*Phaseolus vulgaris*), uporabljenih v poskusih z modelom ter postavitev modela (živa ali mrtva stenica)

Figure 7: Structure and dimensions of a bean plant (*Phaseolus vulgaris*) used in experiments with a model and position of a model (a live or dead green stink bug)

3.5.3 Poskusi s kemičnimi signali

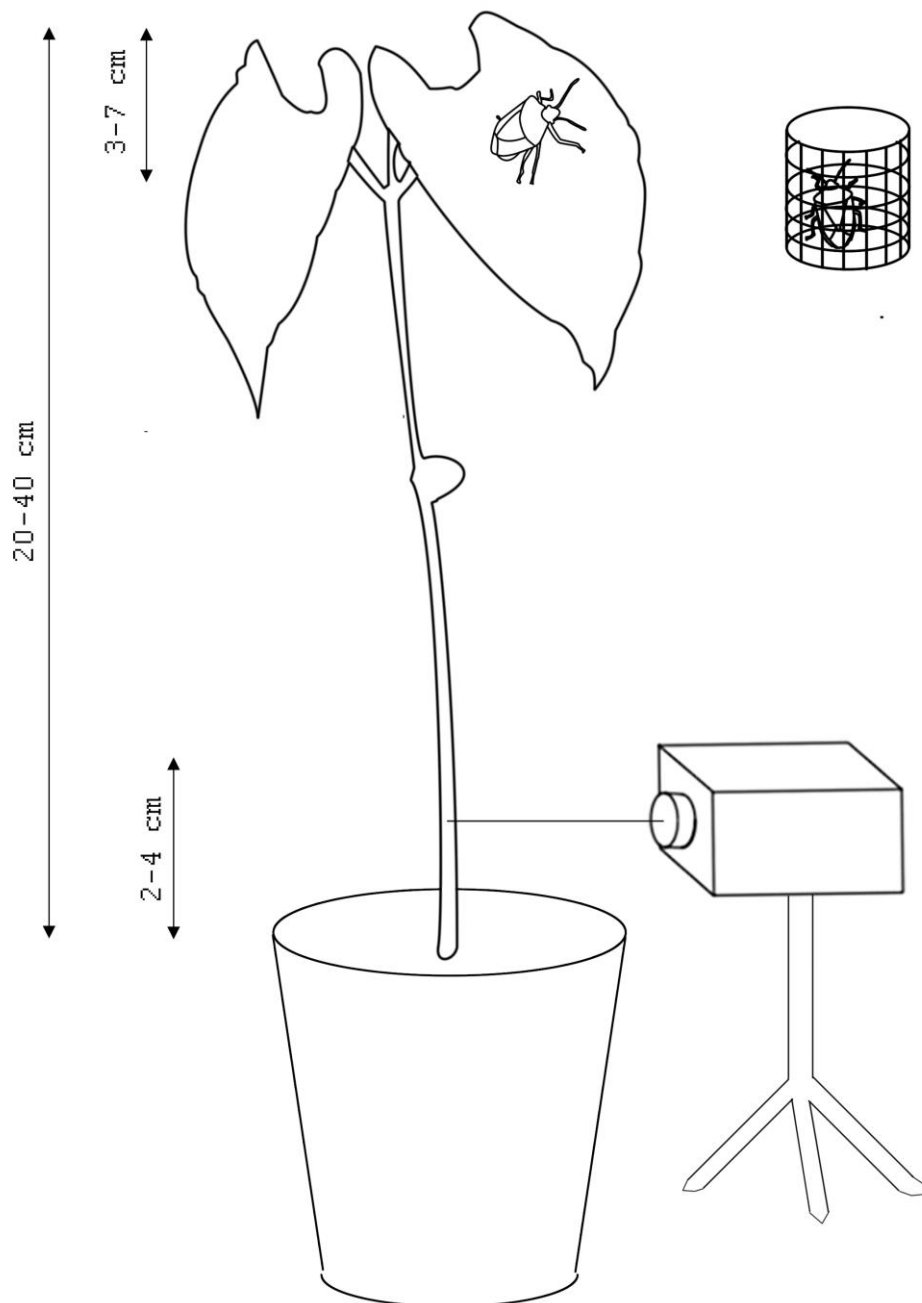
Poskuse v »temi«, sem izvajala pri rdeči luči ($\lambda > 610$ nm, $\lambda_{50} = 650$ nm). Osebek sem položila na sadiko fižola kot pri ostalih poskusih in ga pustila tam 1-2 minuti, da se je umiril, nato sem ga dražila s filter papirjem ali živo stenico v majhni kletki iz žičnate mreže, ki je bila oddaljena 2-4 cm od testiranega osebk in se ni dotikala rastline ali testiranega osebk (Slika 8). Poskus se je končal 13 minut po tem, ko sem dodala signal.

Poskusi z naravnimi feromoni

Naravne feromone sem testiranemu osebk predstavila na dva načina: s pomočjo živega samca in z vonjavami, ujetimi na filter papir.

Samec v kletki:

Samcu, ki je bil vir feromonov (ali samici) sem dovolila, da je splezal v majhno žičnato kletko (4 cm visok cilinder s premerom 2,5 cm), jo zaprla in postavila 2-4 cm od testirane živali. Kletka je onemogočala kontakt in prenašanje vibracij med testiranim osebkom in tistim, ki je bil vir feromonov. Hkrati pa je omogočala prost prenos feromonov. V primerjavi z drugimi metodami, na primer lepljenjem osebk na paličico, je metoda s kletko manj invazivna za osebek, ki je bil v kletki, kar zmanjša možnosti drugačnega sproščanja feromonov oz. smradne tekočine zaradi same metode dela. V kletki sem uporabila različne osebk, da bi kar najbolj zmanjšala vpliv individualne variabilnosti v sestavi, produkciji in izločanju feromonov (Slika 8).



Slika 8: Struktura in dimenzije fižolovih sadik (*Phaseoulus vulgaris*), uporabljenih v poskusih s kemičnimi signali ter postavitev kletke z osebkom, ki je bil vir signalov

Figure 8: Structure and dimensions of a bean plant (*Phaseoulus vulgaris*) used in experiments with chemical stimuli and position of the cage with the bug that was the source of chemical stimuli

Filter papir z vonjem samca:

Živali na sadiki sem dražila s filter papirjem, na katerem sem prej pustila 4-5 samcev za 24 ur, da se je navzel njihovega vonja. Filter papir sem postavila 2-4 cm zračne razdalje od testirane žuželke. Poskus sem ponovila z več različnimi filter papirji, z vonjavami različnih samcev: vsak dan sem dala 4-5 samcev iz laboratorijske kolonije na košček filter papirja v veliko petrijevko za 24 ur in naslednji dan sem ta filter papir uporabila v poskusu. Naslednji dan sem za pridobivanje vonjave uporabila druge samce. Za kontrolo sem uporabila svež filter papir.

Poskusi s sintetiziranim feromonom:

Uporabljala sem α -bisabolen epoksid, raztopljen v n-heksanu v razmerju *trans* in *cis* izomer (3:1), (1.4:1) in (1:1) in v dozah od 0.031 do 0.04 $\mu\text{g/ml}$, kar predstavlja 8-9 % dnevno sproščene doze odraslega samca (Aldrich in sod., 1989). Da bi se izognila kontaminaciji aparata, nisem uporabila aeracijske metode, ampak sem kapnila 100 μL zmesi feromonov (ali čistega heksana v kontrolnih poskusih) na 3x4 cm velik košček filter papirja, s katerim sem dražila zeleno smrdljivko na rastlini na isti način kot s filter papirjem z vonjem samcev (glej zgoraj). Isti filter papir sem uporabljala cel dan, rastlino in žuželko pa sem seveda zamenjala za vsak poskus. Zato sem izbrala n-heksan, ker je manj hlapen od drugih možnih topil. Kontrole sem izvajala s filter papirjem s 100 μL topila n-heksana.

3.6 KONTROLE IN SPONTANO PETJE

Za kontrolo sem uporabila poskuse s posameznim osebkom brez dodanih zunanjih signalov pri dnevni svetlobi in v temi (13 minut, kot poskus s signalom) - kontrole na svetlobi sem izvajala 13 minut in 5 minut. Iz teh kontrol sem izračunala stopnjo spontanega petja za samce in samice pri svetlobi in v temi. Poleg te kontrole sem za posamezne poskuse naredila še posebne kontrole: kontrolo s prazno kletko za teste s kemičnim signalom, kjer sem v poskusu za signal uporabila živega samca ali samico v kletki. Ta kontrola je trajala 13 minut. Za kontrolo kemičnega signala na filter papirju sem uporabila svež filter papir brez vonjav, istih dimenzij in filter papir s čistim topilom (n-heksan) v enaki količini kot v poskusu. Tudi ti dve kontroli sta trajali enako dolgo kot poskus - 13 minut.

3.7 STATISTIČNE METODE

Statistična analiza in grafi so konstruirani v računalniškem programu R (A Language in Environment for Statistical Computing, <http://cran.r-project.org/>). Test chi kvadrat (chi sq) sem uporabila za primerjavo poskusov in kontrol. Primerjala sem tudi različne kontrole med seboj in nekaj poskusov med seboj. Bonferroni popravek je bil uporabljen, kjer je bilo to potrebno. Za testiranje razlike med strukturnima deležema samcev in samic, ki so prvi začeli duet v poskusih s parom stenic, smo izbrali test strukturnih deležev - test enojne binominalne verjetnosti (test of single binomial probability). Da bi preverila možno korelacijo med starostjo osebka in napevom, ki ga poje, sem uporabila linearno regresijo.

4 REZULTATI

Da bi ugotovili vlogo različnih modalitet signalov pri sprožanju vibracijske komunikacije pri zeleni smrdljivki sem izvedla tri različne tipe poskusov. V prvem tipu poskusov sem testirala petje samcev in samic brez kakršnihkoli dodanih zunanjih signalov. V drugem sem registrirala in analizirala petje para, da bi ugotovila, kateri spol pogosteje začne z vibracijsko komunikacijo in s katerim napevom. V tretjem, zadnjem, testu pa sem izvedla serijo poskusov, kjer sem dražila posameznega samca ali samico z vibracijskimi, vidnimi ali kemičnimi signali, da bi določila njihovo vlogo pri proženju pozivnega napeva in napeva dvorjenja. Rezultati so prikazani v preglednici 1 za samice in preglednici 2 za samce, primerjava poskusov med spoloma pa v grafu na sliki 17.

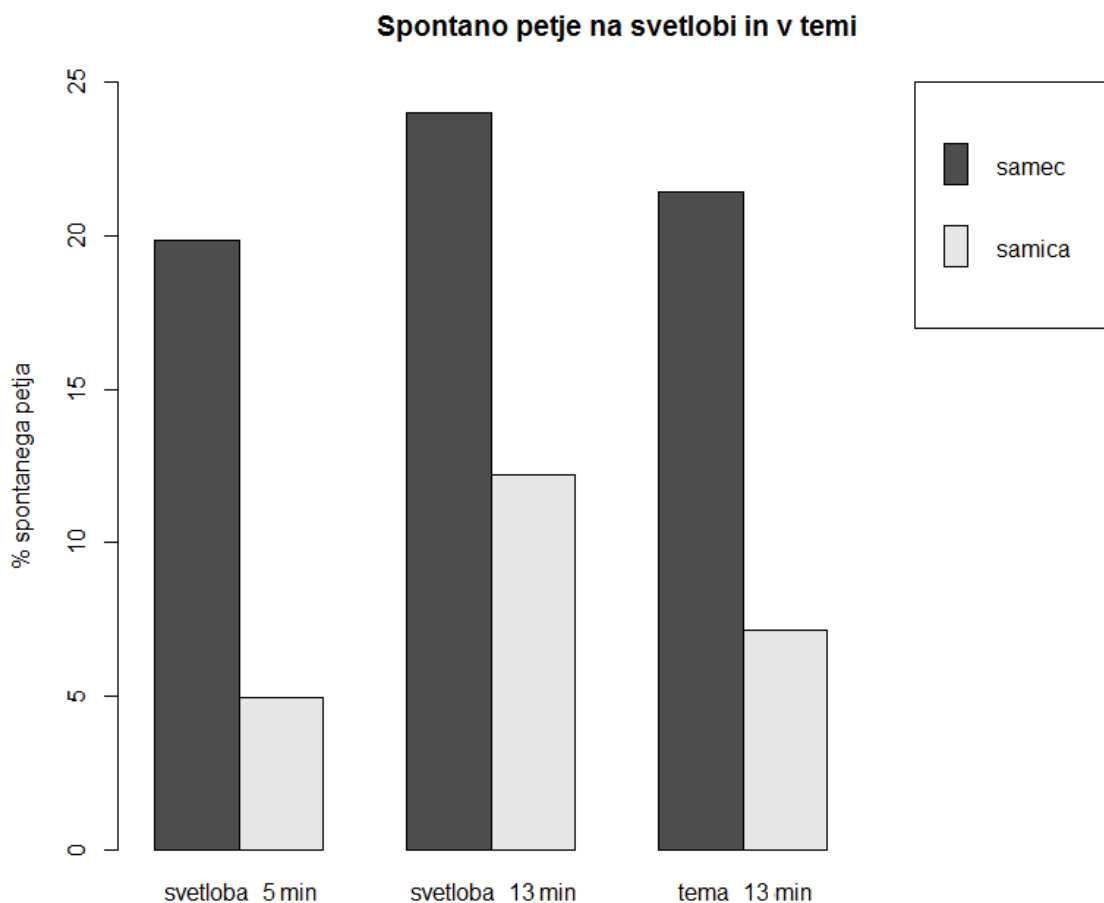
4.1 SPONTANO PETJE

Da bi določili stopnjo spontanega petja, sem položila samega samca ali samico na rastlino in 13 minut registrirala morebitne vibracijske signale. Poskus sem ponovila na svetlobi in v temi (Slika 9). Brez dodanih zunanjih signalov so samice začele peti pozivni napev v 12,2 % na svetlobi (N=41) in v 7,1 % v temi (N=14). Chi-kvadrat test ni pokazal razlik (P=0.98), (Preglednica 1). Brez zunanjih signalov je samo enkrat ena samica pela napev dvorjenja in sicer v temi (glej diskusijo).

Samci so večkrat peli spontano. V 13 minutnih poskusih so samci začeli spontano peti v 24 % (N=25) na svetlobi in v 21,4 % (N=14) v temi (chisq-test, P=0.83). Na svetlobi sta dva samca pela MCS, eden prehodni napev iz MCS v MCrS in trije MCrS. V temi je en samec spontano pel MCS in dva MCrS.

V 5 minutnih kontrolah pred testom s pari na rastlini (glej material in metode) je spontano pelo 19,8 % samcev (N= 126). V enakih pogojih je pelo 5 % samic (N=121) (Slika 9).

Razlika v pogostosti spontanega petja med spoloma je bila statistično različna v 5 minutnih poskusih z večjim numerusom (chisq test, p=0.0008), v 13 minutnih pa ne (chisq test, p=0.3640).

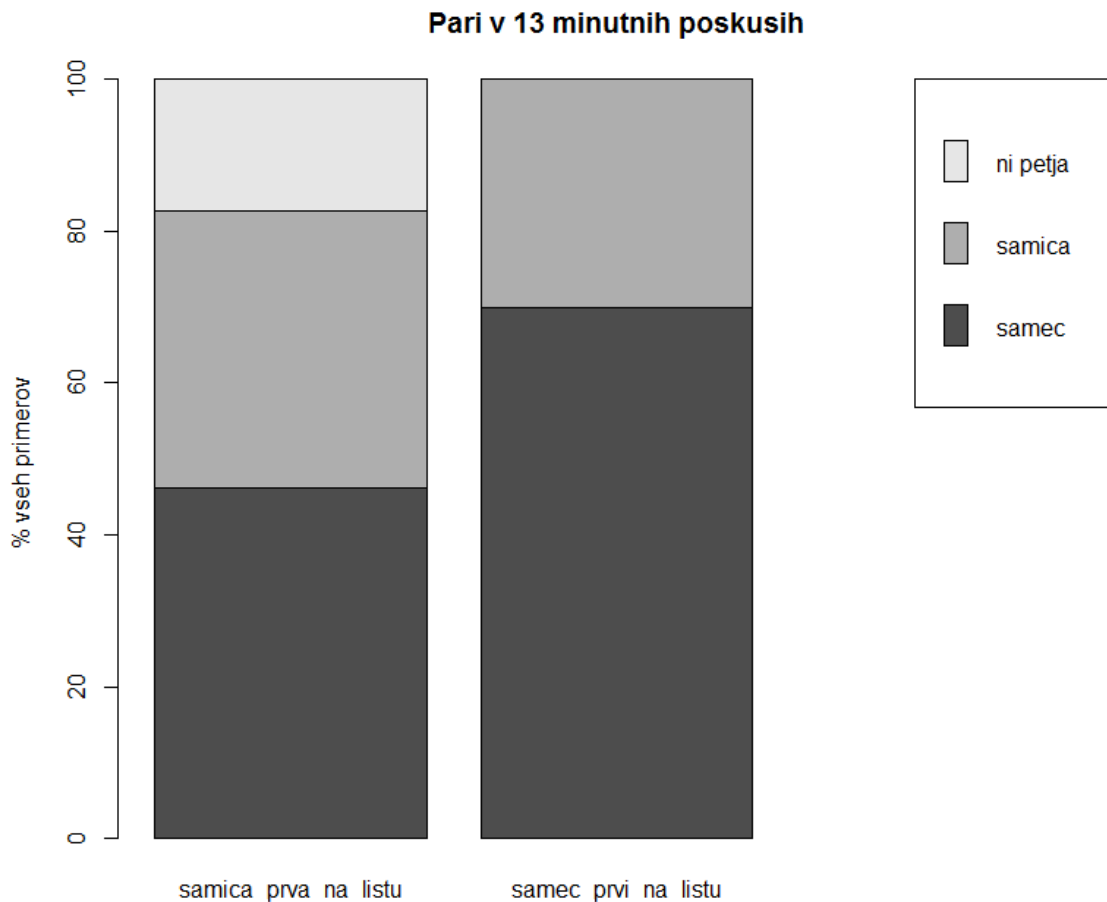


Slika 9: Spontano petje samcev in samic zelene smrdljivke na svetlobi (5 in 13 minutni poskus) in v temi (13 minutni poskus)

Figure 9: Spontaneous singing (in %) of males and females of the green stink bug in daylight (5 in 13 minutes experiments) and in the darkness (13 minutes experiment); "svetloba" = light, "tema" = dark, "samec" = male, "samica" = female

4.2 ZAČETNO PETJE PRI PARIH SMRDLJIVK

Poskuse s pari na rastlini sem delala, da bi ugotovila, kateri spol pogosteje začne z vibracijsko komunikacijo in ali se kateri napev (pozivni ali napev dvorjenja) pogosteje pojavlja v tem obdobju. Kadar sem najprej postavila samico na rastlino za 5 minut, preden sem dodala samca, je samec prvi začel oddajati vibracijske signale pogosteje kot samica: od 52 parov je samec začel z vibracijsko komunikacijo v 46,2 %, samica v 36,5 % in v 17,3 % ni pel nihče (Slika 10). Od 43 parov, ki so si izmenjali vibracijske signale, so torej samci pričeli v 55,8 % in samice v 44,2 %. Razlike med spoloma niso bile statistično signifikantne (test binominalne verjetnosti, $T=1,2$).

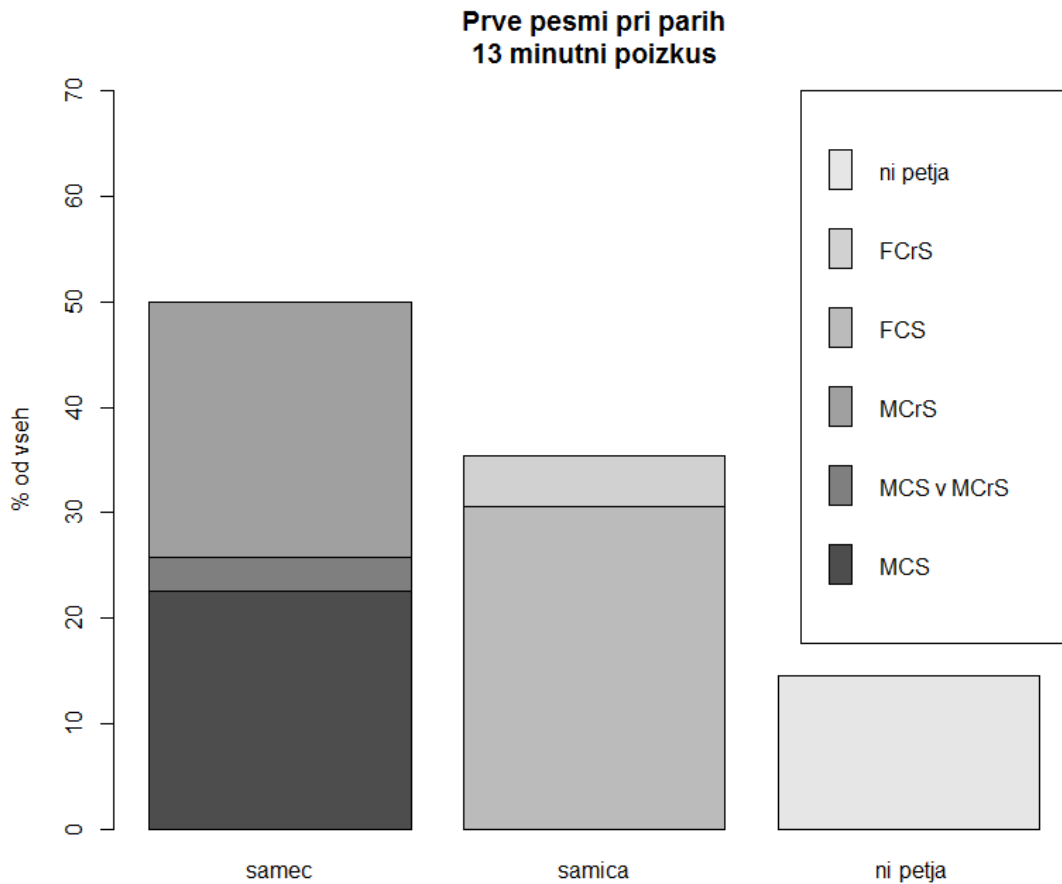


Slika 10: Pari v 13 minut trajajočih poskusih: graf prikazuje, kateri spol prične z vibracijsko komunikacijo pri parih v 13 minut trajajočih poskusih. V prvem stolpcu so rezultati poskusa, kjer je bila najprej na listu samica, v drugem pa je bil najprej na listu samec.

Figure 10: Pairs in 13 minute experiments: the graph shows which sex starts vibrational communication in pairs in 13 minute experiments: in the first barplot female was placed first on the plant ("samica prva na listu") and in the second male was first on the plant ("samec prvi na listu"). The y axis represent % of all cases, "samec"= male, "samica"= female and "ni petja" = no singing.

Kadar sem najprej položila na rastlino samca za 5 minut pred poskusom s parom, je samec začel z vibracijsko komunikacijo v 70 % in samica v 30 % primerov (N=10, vsi pari so peli) (test binominalne verjetnosti T=1.26) (Slika 10).

Rezultati obeh testov se statistično niso razlikovali (chisq test: p=0.6428), zato sem ju združila za nadaljnjo analizo začetne pesmi. Združene rezultate prikazuje slika 11.

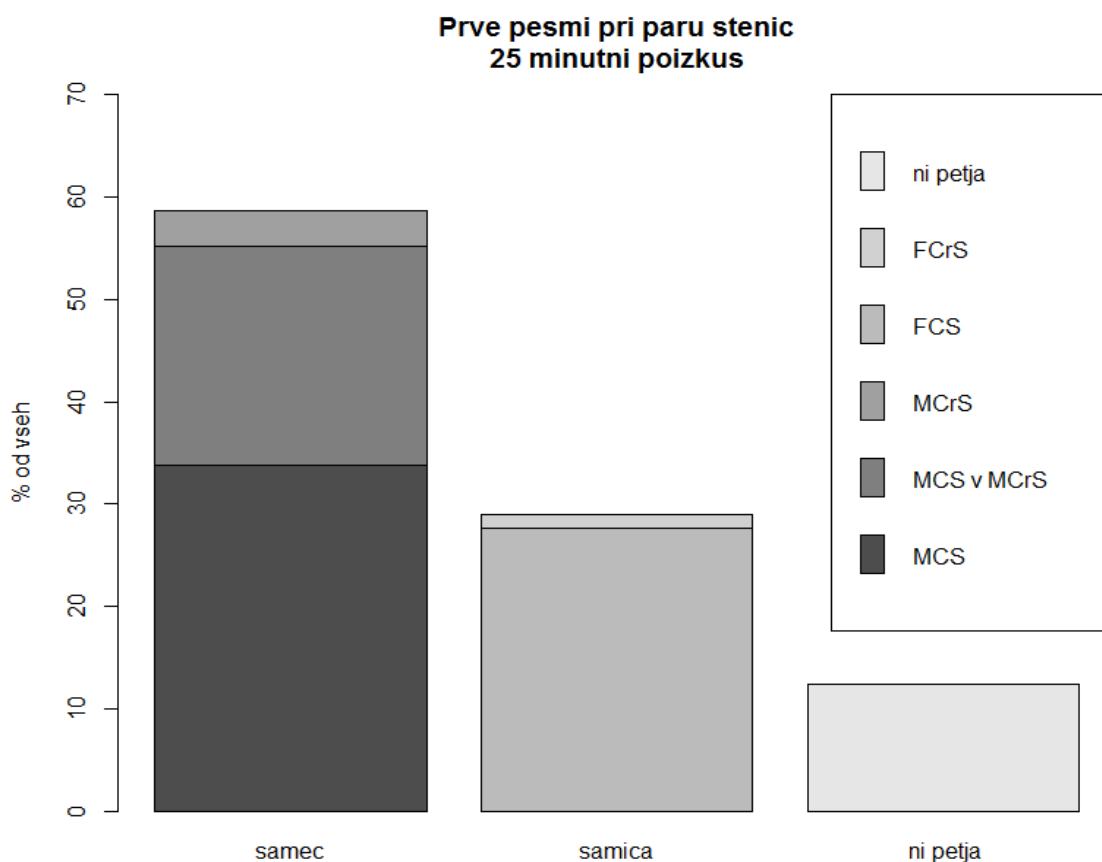


Slika 11: Prvi napev v poskusu s pari - 13 minutni poskus: stolpci prikazujejo, v kakšnem deležu je začel prvi peti samec (levi stolpec), v kakšnem samica (srednji stolpec), zadnji stolpec pa predstavlja pare, kjer ni pela nobena žival. Stolpci so razdeljeni še na posamezne pesmi: samci so peli pozivni (MCS) in napev dvorjenja (MCrS), pa tudi prehodni napev iz pozivnega v napev dvorjenja (MCSv MCrS). Samice so pele pozivni napev (FCS) in napev dvorjenja (FCrS).

Figure 11: The first song that occurred in 13 minute experiments with pairs is plotted: bar plot represents ratios of different sexes: male (left), female (in the middle) and in the right bar no bug was singing. Bars are segmented horizontally to represent different songs: the male calling song (MCS), the male courtship song (MCrS) and a transition from the male calling to the male courtship song (MCS v MCrS). Females sang the female calling song (FCS) or the female courtship song (FCrS). The y axis represent % of all cases, "samec"= male, "samica"= female and "ni petja" = no singing.

Samice najprej pojejo pozivni napev (FCS) v 86,4 %. Samičin napev dvorjenja (FCrS) se je pojavil v 13,6 % in sicer vedno po fizičnem (taktilnem) kontaktu s samcem (N=22). Samci so pričenjali vibracijsko komunikacijo s pozivnim napevom (MCS), napevom dvorjenja (MCrS) in s prehodnim napevom iz MCS v MCrS, ki ga sestavljajo vedno hitreje ponavljajoči se MCS pulzi, ki se nazadnje zlijejo v MCrS v sklopu istega vlaka pulzov. Samčeva prva pesem je bila MCS v 45,2 %, MCrS v 48.4 % in prehodna iz MCS v MCrS v 6,5 % (N=31).

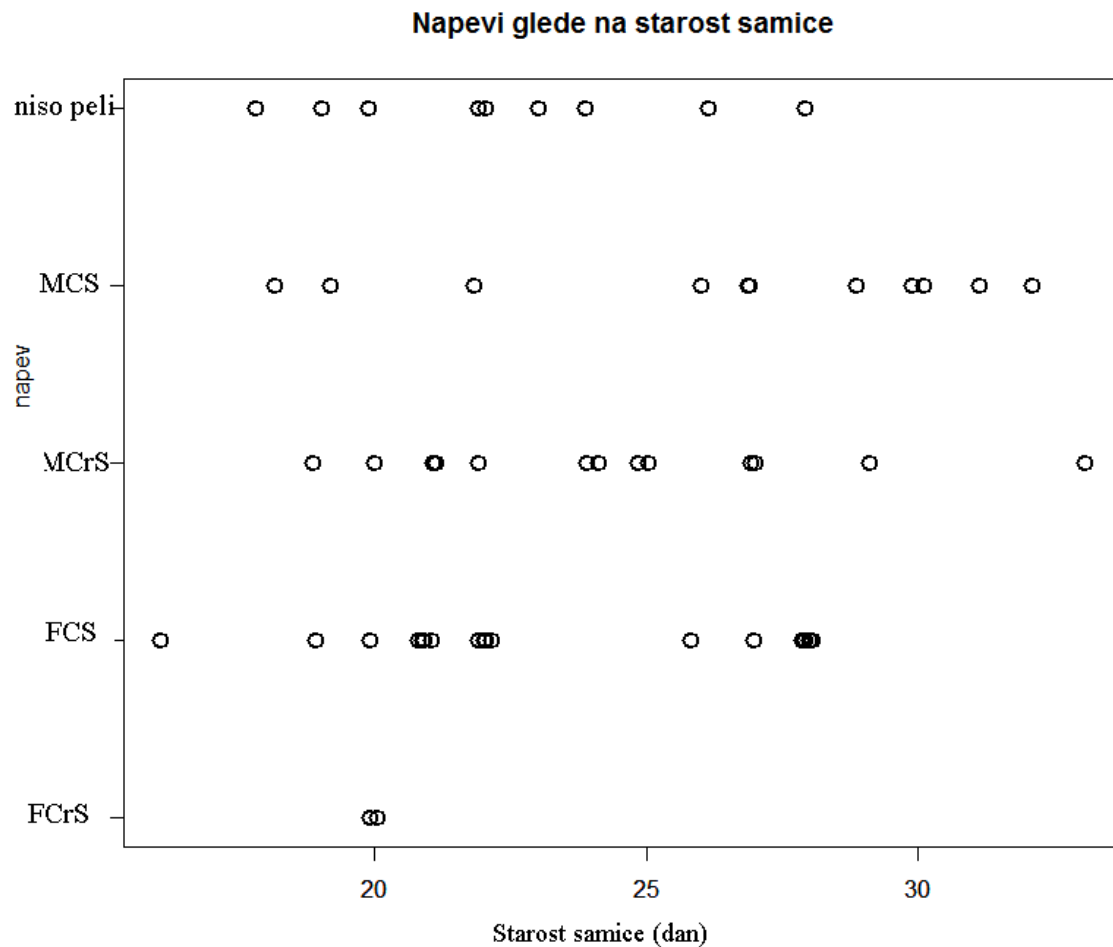
V 25 minut trajajočih poskusih (N=145) so razlike med spoloma še bolj izražene: samci so začeli vibracijsko komunikacijo v 58,6 %, samice v 29,0 % in v 12,4 % ni pel nihče. Izmed 127 parov, ki so si izmenjali vibracijske signale, so samci začeli z vibracijsko komunikacijo v 66,9 % primerov, samice pa v 33,1 %. Tukaj je razlika statistično signifikantna (test binominalne verjetnosti, $T=3,8$). Samice so pele FCS v 95,2 %, kadar so začele vibracijsko komunikacijo (N=42) (Slika 12). Samci so kot prvi napev peli MCS v 57,7 % in MCrS v 36,5%, kadar so začeli vibracijsko komunikacijo (N=85). Prehodna pesem iz MCS v MCrS znotraj ene sekvence pa se je pojavila v 4,8 % primerov, ko je samec začel prvi peti (Slika 11).



Slika 12: Prvi napev v poskusu s pari - 25 minutni poskus: na sliki je prikazano razmerje med spoloma: kolikokrat je začel prvi peti samec (stolpec na levi) in kolikokrat samica (stolpec na sredini), zadnji stolpec predstavlja pare, kjer ni pela nobena od stenic v poskusu. Samec je lahko pel pozivni (MCS), napev dvorjenja (MCrS) ali prehodni napev iz pozivnega v napev dvorjenja v sklopu enega vlaka pulzov (MCS v MCrS). Samice so pele pozivni napev (FCS), dve pa napev dvorjenja (FCrS). Numerus vseh parov je bil 145, pelo je 127 parov.

Figure 12: First song in 25 min experiments with pairs of bugs: different shares of singing in the two sexes are presented: the male on the left, the female in the middle and the right bar represents couples where no singing occurred. Males sang the male calling song (MCS), the male courtship song (MCrS) or a transition from one to the other (MCS v MCrS). Females emitted the female calling song (FCS) and only two of them sang the courtship song (FCrS). N=145, 127 pairs shared vibrational signals. The y axis represent % of all cases, "samec" = male, "samica" = female and "ni petja" = no singing.

V poskusih s pari sem tudi preverila, ali obstaja kakšna povezava med starostjo smrdljivke in napevom, ki ga poje. Preverila sem vpliv starosti samca in starosti samice na napev samca. Samo dve samici sta peli napev dvorjenja, zato za samice statistika ne bi bila zanesljiva. Obe samici, ki sta peli napev dvorjenja, sta bili stari 20 dni in sta peli samcema, starima 22 dni. Ostale samice so pele pozivni napev in so bile stare od 16 do 28 dni. Samci so peli samicam, starim od 18 do 33 dni (18 do 32 dni za MCS in 19 do 33 za MCrS) (Slika 13).

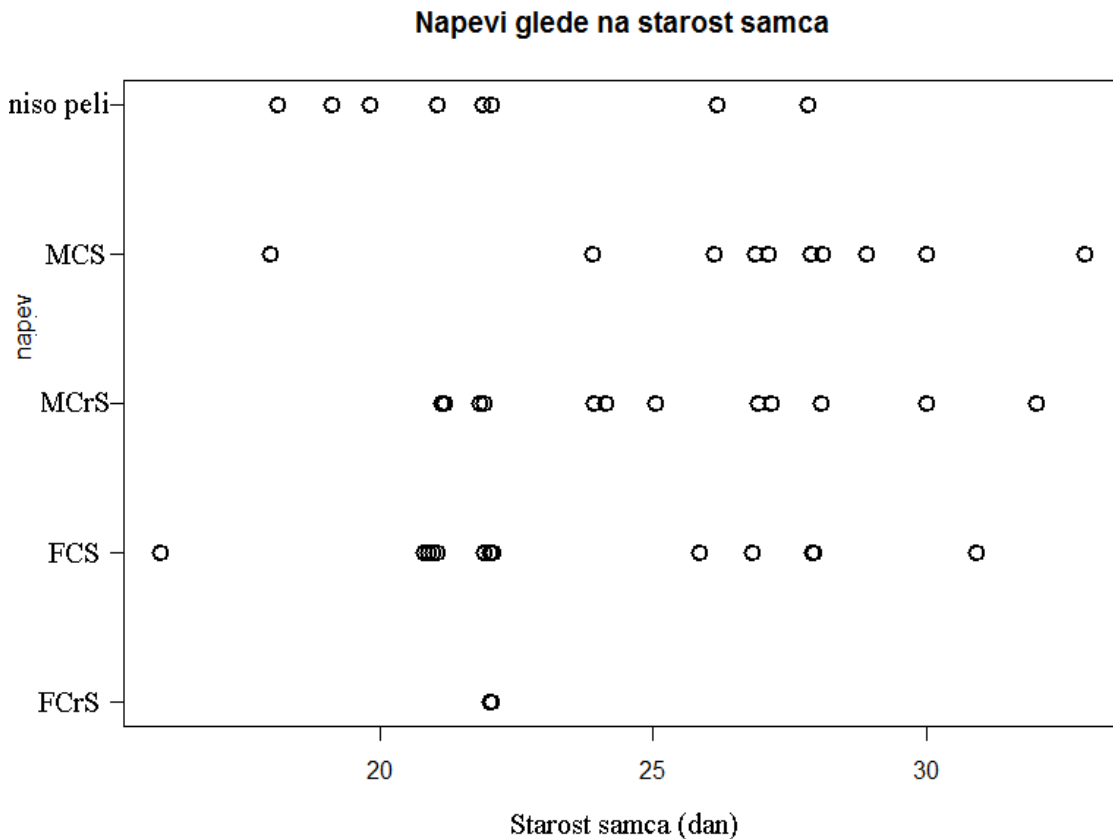


Slika 13: Napevi samcev in samic v poskusu s pari v odvisnosti od starosti samice: samčev pozivni napev (MCS), samčev napev dvorjenja (MCrS), samičin pozivni napev (FCS), samičin napev dvorjenja (FCrS)

Figure 13: Male and female songs in experiments with pairs in correlation to female age: male calling song (MCS), male courtship song (MCrS), female calling song (FCS), female courtship song (FCrS)

Opazimo lahko, da starejše samice običajno ne začnejo prve peti (Slika 13), jih pa ne moti starost samca: samice, ki prve producirajo vibracijske signale, pojejo tako mlajšim kot starejšim samcem (Slika 14). Še bolj zanimivo pa je dejstvo, da pari, kjer ni nihče pel,

nikoli niso bili starejši od 29 dni - kljub temu, da imamo veliko podatkov tudi za starejše pare. Pari starejši od 29 dni so vedno peli, večinoma so prvi začeli peti samci.

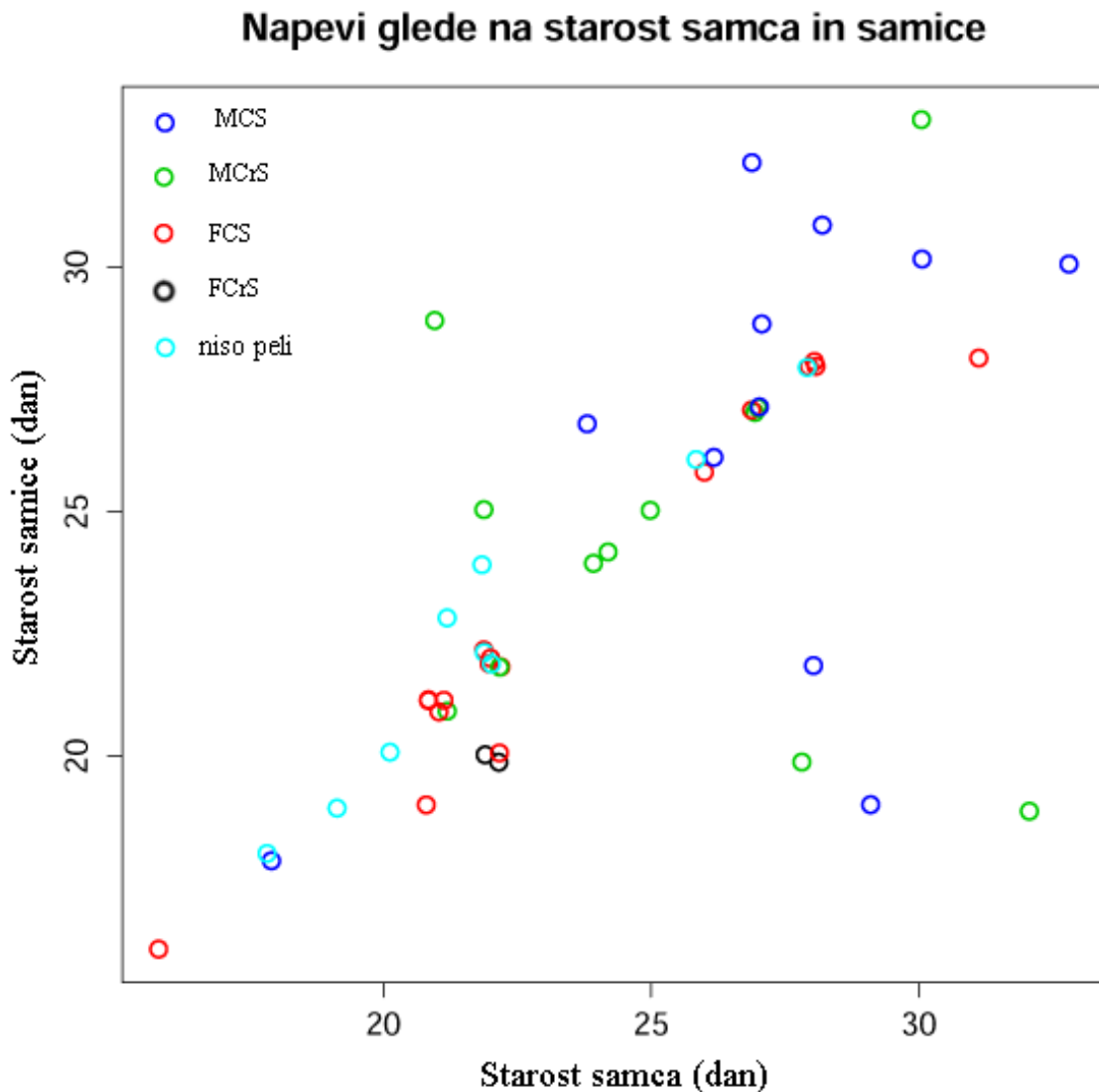


Slika 14: Napevi samcev in samic v poskusu s pari v odvisnosti od starosti samca: samčev pozivni napev (MCS), samčev napev dvorjenja (MCrS), samičin pozivni napev (FCS), samičin napev dvorjenja (FCrS)

Figure 14: Male and female songs in experiments with pairs in correlation to male age: male calling song (MCS), male courthship song (MCrS), female calling song (FCS), female courthship song (FCrS)

Našla nisem nobene povezave med starostjo samca in napevom, ki ga poje (Slika 14), niti med starostjo samice in napevom, ki ga poje samec (Slika 13). Logistična regresija med starostjo samca oz. samice in napevom samca je neznačilna. Vseeno pa kaže na to, da starejšim samicam samci večkrat pojejo pozivni napev (Slika 13).

Če pogledamo združene podatke (Slika 15), ugotovimo, da je pri starejših parih (stara samica in star samec) prevladoval pozivni samčev napev, samice takrat praviloma niso pele. Pri mlajših parih se je večkrat zgodilo, da ni pel nihče. Samice praviloma vedno pojejo pozivni napev, vendar starejše samice običajno ne začnejo dueta, starost samca - partnerja pa pri tem ne igra vloge - samice pojejo tako mlajšim kot starejšim samcem.

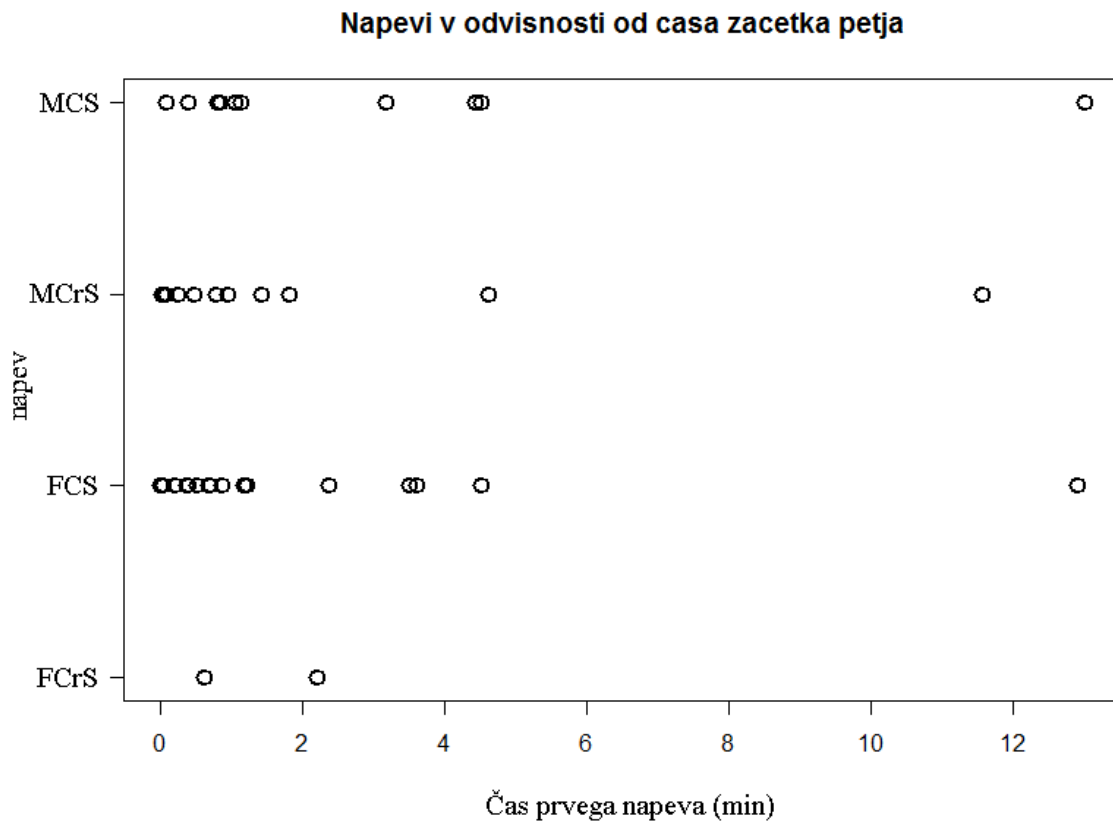


Slika 15: Graf napevov v odvisnosti od starosti samca in samice: samčev pozivni napev (MCS), samčev napev dvorjenja (MCrS), samičin pozivni napev (FCS), samičin napev dvorjenja (FCrS), "niso peli" predstavlja pare, kjer ni nobena žival pela

Figure 15: Songs that occurred in tests with pairs in correlation to female and male age: male calling song (MCS), male courthship song (MCrS), female calling song (FCS), female courthip song (FCrS), "niso peli" = no singing occurred in these pairs, "starost samca" = age of male, "starost samice" = age of female, "dan" = day

Obe samici, ki sta peli napev dvorjenja, sta bili stari 20 dni in sta peli 22 dni starim samcem, vendar so enako stare samice pele tudi pozivni napev, približno enako starim samcem. Model logistične regresije se ne prilega podatkom.

4.2.1 Čas prvega napeva v paru



Slika 16: Prvi napevi pri parih zelenih smrdljivk v odvisnosti od časa: samčev pozivni napev (MCS), samčev napev dvorjenja (MCrS), samičin pozivni napev (FCS), samičin napev dvorjenja (FCrS)

Figure 16: The first songs that occurred in pairs of green stink bugs in correlation to time: male calling song (MCS), male courthip song (MCrS), female calling song (FCS), female courthip song (FCrS)

Če pogledamo, kdaj začnejo peti zelene smrdljivke v paru (samec in samica hkrati na rastlini), ugotovimo, da se to v veliki večini zgodi že v prvih petih minutah (Slika 16). To je pomemben podatek za načrtovanje prihodnjih poskusov, saj znatno zmanjša čas brez dodatnih informacij, poleg tega lahko raziskovalec naredi več poskusov na dan (ne da bi zato izgubil dosti podatkov).

4.3 ODGOVORI POSAMEZNIH OSEBKOV NA RAZLIČNE MODALITETE SIGNALOV

4.3.1 Kontrole

Kontrole za vsak test sem primerjala med seboj in nisem našla nobenih signifikantnih razlik med katerikoli parom kontrol (Preglednica 1 in 2).

Kontrola s prazno kletko je pokazala, da sama kletka in morebitne vonjave, ki bi se je držale, ne vpliva/jo na testirani osebek, enako svež filter papir ne vpliva na oddajanje vibracij zelenih smrdljivk. Kontrola s topilom heksanom je bila višja od ostalih kontrol, vendar ne statistično značilno različna.

Prav tako ni značilno različna majhna razlika med kontrolami, izvedenimi na svetlobi in v temi - velja tako za samce kot za samice. Ta razlika obstaja na splošno tudi med poskusi, izvedenimi na svetlobi in v temi, vendar ni nikoli statistično značilno različna (Preglednica 1 in 2).

Preglednica 1: Primerjava poskusov in kontrol ter različnih poskusov med seboj pri samicah s pomočjo chi-kvadrat (χ^2) testa: N = numerus, "df" = stopinje prostosti, NS = ni statistično značilne razlike

Table 1: Comparison between tests and controls and between different tests with chi-sq test in females: N = Numerous, "df" = degrees of freedom, "NS" = not statistically significantly different

poskus /kontrola	N	kontrola / 2. poskus	N	χ^2 test	df	P	stat. znač. razlika
stimulacija - MCrS	11	kontrola - svetloba	41	0.0602	1	0.8062	NS
živa samica	10	kontrola - svetloba	41	0.0171	1	0.8960	NS
model - mrtev samec	17	kontrola - svetloba	41	0.0600	1	0.8065	NS
samec v kletki - svetloba	17	samec v kletki - tema	29	0.4234	1	0.5153	NS
samec v kletki - tema	29	kontrola - prazna kletka	10	18.162	1	0.00002	****
samec v kletki - tema	29	kontrola - tema	14	19.184	1	0.00001	****
fp s samčevim vonjem	21	kontrola - svež fp	20	12.330	1	0.0005	***
feromon 4 μ g BAE (3:1)	14	kontrola - svež fp	20	5.0891	1	0.0241	*
feromon 3,1 μ g BAE (1,4:1)	22	kontrola - svež fp	20	11.466	1	0.0007	***
feromon 3,3 μ g BAE (1:1)	17	kontrola - svež fp	20	8.4158	1	0.0037	**
feromon 4 μ g BAE (3:1)	14	kontrola - heksan	14	0.6550	1	0.4183	NS
feromon 3,1 μ g BAE (1,4:1)	22	kontrola - heksan	14	3.5080	1	0.0610	NS
feromon 3,3 μ g BAE (1:1)	17	kontrola - heksan	14	2.0225	1	0.1550	NS
kontrola - svetloba	41	kontrola - tema	14	0.0007	1	0.9784	NS
kontrola - prazna kletka	10	kontrola - tema	14	0.0298	1	0.8629	NS
kontrola - svež fp	20	kontrola - tema	14	0.2296	1	0.6318	NS
kontrola - heksan	14	kontrola - svež fp	20	0.8510	1	0.3563	NS

Preglednica 2: Primerjava poskusov in kontrol ter različnih poskusov med seboj pri samcih s pomočjo chi-kvadrat (χ^2) testa: N = numerus, "df" = stopinje prostosti, "NS" = ni statistično značilne razlike

Table 2: Comparison between tests and controls and between different tests with chi-sq test in males

poskus	N	kontrola / 2. poskus	N	χ^2 test	df	p	stat. znač. razlika
stimulacija - FCS	29	kontrola - svetloba	25	12.4616	1	0.0004	***
živa samica - svetloba	13	kontrola - svetloba	25	7.7757	1	0.0053	**
živa samica - svetloba	13	živa samica - tema	14	8.3244	1	0.0039	**
model	30	kontrola - svetloba	25	0.0374	1	0.8466	NS
model - mrtev m	17	kontrola - svetloba	25	0.2001	1	0.6546	NS
model - mrtev samec	17	model - mrtva samica	13	0.1034	1	0.7500	NS
model - mrtva samica	13	kontrola - svetloba	25	0.1147	1	0.7349	NS
živ samec na svetlobi	11	kontrola - svetloba	25	0.0023	1	0.9614	NS
samec v kletki - svetloba	12	kontrola - svetloba	25	0.4770	1	0.4898	NS
samec v kletki - svetloba	12	samec v kletki - tema	21	0.1031	1	0.7481	NS
samec v kletki - tema	21	kontrola - prazna kletka	10	0.1794	1	0.6719	NS
fp s samčevim vonjem	12	kontrola - svež fp	6	1.0045	1	0.3162	NS
feromon 4 μ g BAE (3:1)	12	kontrola - svež fp	6	/	1	/	NS
feromon 3,1 μ g BAE (1,4:1)	11	kontrola - svež fp	6	0.1006	1	0.7511	NS
feromon 4 μ g BAE (3:1)	12	kontrola - tema	14	1.1865	1	0.2760	NS
feromon 3,1 μ g BAE (1,4:1)	11	kontrola - tema	14	0.0817	1	0.7750	NS
kontrola - svetloba	25	kontrola - tema	14	0.0455	1	0.8311	NS
kontrola - prazna kletka	10	kontrola - tema	14	0.1805	1	0.6710	NS
kontrola - svež fp	6	kontrola - tema	14	0.2988	1	0.5846	NS

4.3.2 Vibracijski držaljaji

Vibracijski signali so imeli izrazito različen vpliv na samce in samice (Slika 17). Samo 9,1 % samic (N=11) je odgovarjalo na napev dvorjenja samca (MCrS), kar ni statistično različno (χ^2 test, P=0.8062), (Preglednica 1) od kontrol na svetlobi oz. spontanega petja (12,2 %, N=22). Samci pa so odgovarjali na samičin pozivni napev (FCS) v 75,9 % primerov, z zelo značilno razliko (χ^2 test, P=0.0004), (Preglednica 2) v primerjavi s kontrolo (24,0 %, N=40). Samci (N=29), ki sem jih stimulirala s konspecifično FCS, so v 28,6 % primerov odgovarjali s pozivnim napevom (MCS), v 64,2 % že takoj z napevom dvorjenja in v 7,1 % primerov se je napev spremenil iz pozivnega v napev dvorjenja znotraj ene sekvence. Samice so na stimulacijo z MCrS vedno odgovarjale samo s FCS. Za samce je bil vibracijski signal najzanesljivejši prožilec od vseh testiranih modalitet.

4.3.3 Vidni signali

Da bi preverila vpliv vidnega signala, sem testiranemu osebkku pokazala model (mrtvo ali živo zeleno smrdljivko) (Slika 17, Preglednici 1, 2). Vidni signal je sprožil večji odziv vibracijske komunikacije pri samcih kot pri samicah. Mrtva stenica (truplo) je sprožila zelo nizek vibracijski odziv s FCS pri samicah (5,9 %, N=15), še nižje kot kontrola. Samci so se odzvali z vibracijami v 30,0 % (N=30). Večinoma so se odzvali z MCrS (66,7 %), prehodno pesmijo iz MCS v MCrS v 22,2 %, v 11,1 % primerov pa sem registrirala MCS.

Med odzivi na model samčevega in samičinega trupla nisem našla nobene statistično značilne razlike (chisq test, p=0.75), (Preglednica.2).

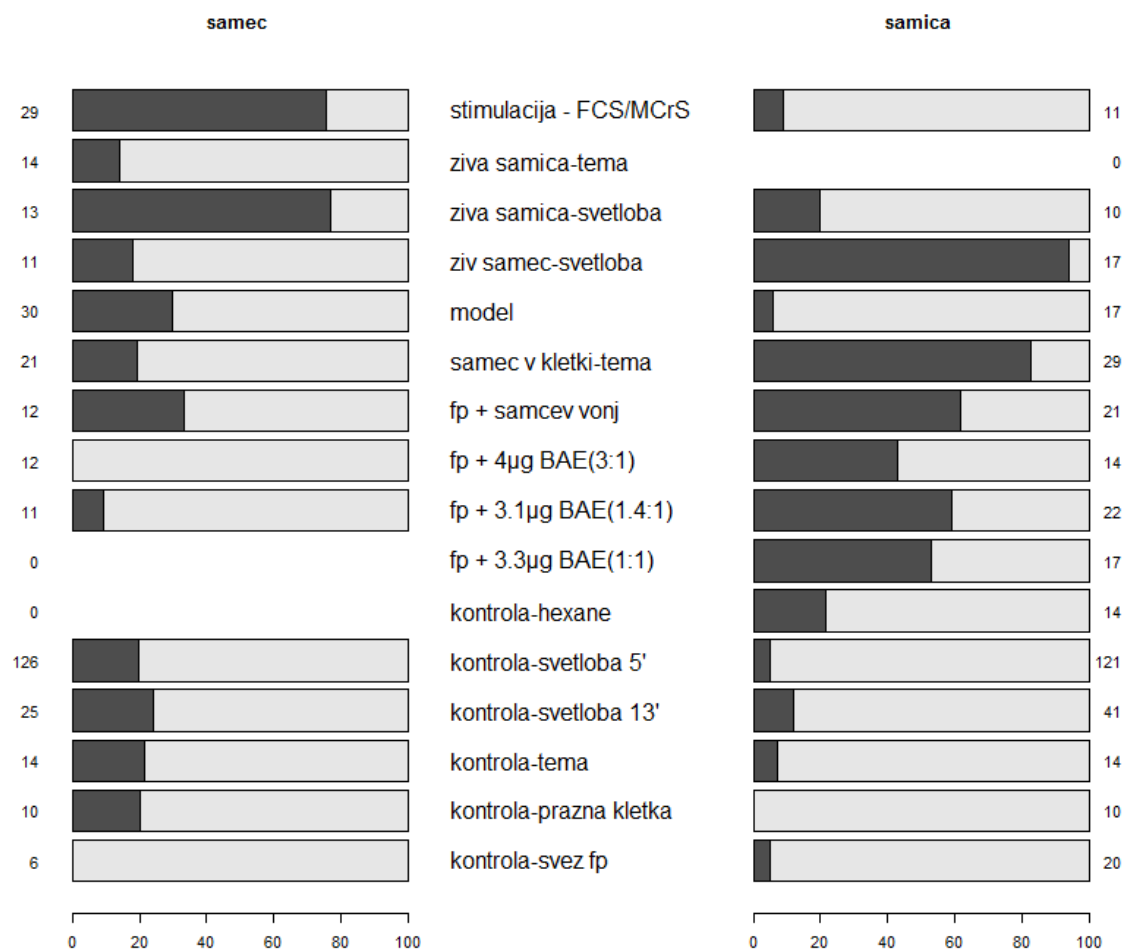
Samčev odgovor na model (30,0 %, N=30) je bil sicer nekoliko višji kot na kontrolo (24,0 %, N=25), vendar razlika ni bila statistično značilna (chisq test, p=0.8466), (Preglednica 2).

Ko pa sem samcu pokazala živo samico pri dnevni svetlobi, pa so samci začeli peti v zelo visokem deležu (76,9 %, N=13) in tudi statistično različno od kontrole (chisq test, p=0.0053), (Preglednica 2). Na samico v temi pa so se redko odzvali (14,3 %, N=14), celo redkeje kot v kontroli, razlika ni statistično značilna. Razlika med odgovori na živo samico v temi in na svetlobi pa je zelo značilna (chisq test, p=0.00391) (Preglednica 2).

Samice so se odzivale na živo samico v 20 % od desetih primerov (chi kvadrat test, p= 0.896) (Preglednica 1), kar je višje od kontrole, vendar ne značilno različno.

4.3.4 Kemični signali

Da bi preverila vpliv kemičnih signalov, sem v različnih poskusih uporabila naravne kemične signale in tudi sintetizirane feromone v različnih koncentracijah in razmerjih *cis* in *trans* oblike. Rezultati so prikazani v preglednicah 1 in 2 in združeni za primerjavo z ostalimi modalitetami signalov na sliki 17.



Slika 17: Odgovori samcev in samic na signale različnih modalitet in na kontole, predstavljeni v odstotkih: ob straneh so numerusi, na sredini pa navedeni testi

Figure 17: Responses of males and females to signals of different modalities and to different controls in percentages: to the sides are numeri for each test and names of tests are given in the middle

Samec v kletki: ob odsotnosti ostalih signalov (glej Materijal in metode) so samice začele peti pozivni napev (FCS) v 82,8 % (N=29), kadar sem jim približala kletko z živim samcem. Razlika s kontrolo (prazna kletka, na katero ni odgovorila nobena samica) je statistično značilna (chisq test, $p=0.00002$), (Preglednica 1). Prav tako je statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo v temi, kjer je pelo 7,9 % samic (N=14) (chisq test, $p=0.00001$), (Preglednica 1). Poleg tega pa ni statistično značilne razlike med odgovorom samic na samca v kletki v temi in pri dnevni svetlobi (chisq test, $p=0.5153$), (Preglednica 1).

Ko sem samca v kletki približala testiranemu samcu na rastlini pri enakih pogojih (pri rdeči luči), je sprožil vibracijsko komunikacijo v 19,1 % (N=12), v rangi kontrolnih vrednosti (spontane petje) v temi (21,4 %, N=14) in kontrol s prazno kletko, kjer je pelo 20 % od desetih testiranih samcev, ki sem jim približala prazno kletko.

Ko sem testiranemu osebku približala samico v kletki pod rdečo lučjo, so samci odgovarjali samo v 14,3 % (N=14) (slika 17). V obeh testih so odgovarjali samo z MCrS. Tudi v ostalih poskusih, izvedenih "v temi" (t.j. pri rdeči luči), so samci večinoma peli napev dvorjenja: v kontrolah s prazno kletko sem posnela samo MCrS, v kontrolah v temi brez zunanjih dodanih signalov pa so peli dvakrat MCRS in enkrat MCS.

Filter papir z vonjem samca: samice so se odzvale na filter papir, ki se je predhodno navzel vonja samcev, s proženjem vibracijskih signalov v 61,9 % (N=21), kar je statistično značilno različno od kontrole s svežim filter papirjem brez vonja, kjer je pelo 5 % od 20 testiranih samic. Odziv na filter papir z vonjem samcev je bil tudi statistično značilno različen od kontrole na svetlobi (12,2 %, N=41), (Preglednica 1). Samice pojejo v veliki večini pozivni napev FCS (v 92,3 %), napev dvorjenja se je pojavil samo enkrat.

Samci so se na filter papir z vonjem samca odzvali v 33,3 % (N=12) in vedno s pozivnim napevom MCS. Odziv je višji kot na kontrole s svežim filter papirjem (noben od šestih samcev ni spontano pel v tej kontroli), prav tako je višji, vendar ne statistično različen od kontrole na svetlobi (spontano petje na svetlobi) (24,0 %, N=25) (Preglednica 1).

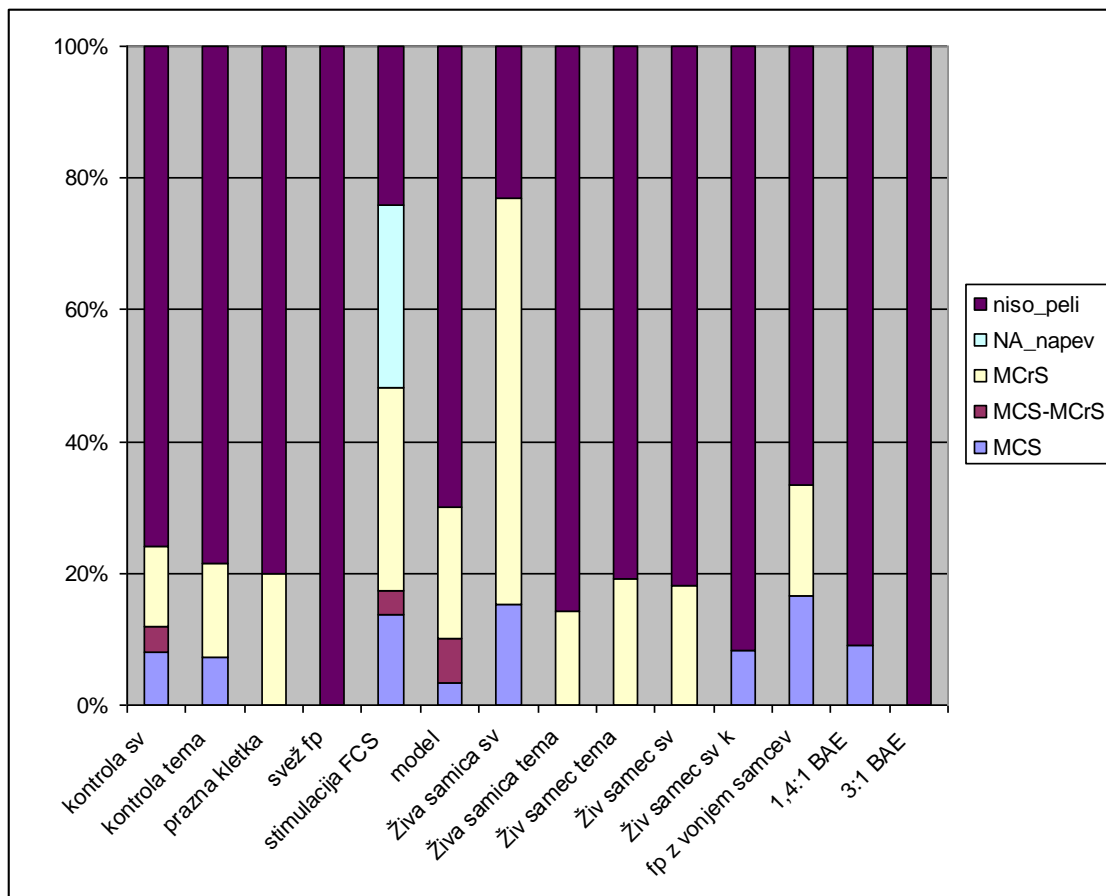
Sintetični feromoni: samice so odgovarjale na signal sintetičnega feromona v različnih *cis* in *trans* razmerjih: na 0,04 µg/ml koncentracijo α -bisabolene epoksida (BAE) z razmerjem *trans*: *cis* izomer 3:1 je odgovarjalo 42,9 % samic (N=14). Vse so pele pozivni napev. Višji odziv je sprožila 0,031 µg/ml koncentracija 1,4:1 = *trans*: *cis* BAE (59,1 % vseh primerov; N=22). V tem primeru so samice pele tako pozivni napev (76,9 %) kot tudi napev dvorjenja. Ko sem uporabila 0,033 µg/ml 1:1 *trans*: *cis* BAE, je pelo 52,9 % samic (N=17), 88,9 % napevov pa je bilo pozivnih (FCS).

Stopnja odgovarjanja je bila v vseh testih statistično značilno različna od kontrol s svežim filter papirjem (Preglednica 1), kontrola s heksanom pa ni bila značilno različna. Kontrole s topilom (heksan) so sicer sprožile nekoliko večji odziv (21,4 %, N=14) kot kontrola s svežim filter papirjem (5,0 %, N=20), vendar razlika ni statistično značilna.

Samce sem testirala z 0,04 µg/ml koncentracijo 3:1 (*trans*: *cis*) α -bisabolene epoksida, na katerega ni odgovarjal nobeden od dvanajstih testiranih samcev. Ko sem uporabila 0,031 µg/ml koncentracijo 1,4 *trans*: *cis* BAE, je en samec od dvanajstih (t.j. 9,1 %) pel pozivni napev (MCS).

4.4 ČAS IN VRSTA NAPEVA SAMCEV IN SAMIC V POSKUSIH S POSAMEZNO ŽUŽELKO

4.4.1 Napevi samcev



Slika 18: Napevi samcev v različnih poskusih in kontrolah: samčev pozivni napev (MCS), samčev napev dvorjenja (MCrS), prehodni napev iz pozivnega v napev dvorjenja v sklopu enega vlaka pulzov (MCS v MCrS), samičin pozivni napev (FCS), samičin napev dvorjenja (FCrS), ni podatka za ta napev (NA_napev), "niso peli" predstavlja osebk, ki niso odgovarjali na signal/kontrolo, "sv" = svetloba, "fp" = filter papir, "k" = kletka, "BAE" = *Z-α*-bisabolen epoksid v navedenem razmerju *trans* in *cis* izomere

Figure 18: Male calling and courtship songs in different tests and controls: male calling song (MCS), male courtship song (MCrS), a transition from one to the other (MCS v MCrS), female calling song (FCS), female courtship song (FCrS), no data for this test (NA_napev), "niso peli" = no singing occurred in these tests, "sv" = daylight, "fp" = filter paper, "k" = cage, "BAE" = *Z-α*-bisabolen epoxid in the given ratio of *trans* and *cis* isomere

Samci, ko so sami na rastlini, zelo redko pojejo pozivni napev, tako v kontrolah kot v poskusih s posameznimi signali (Slika 18 in Preglednica 3) - v vseh poskusih in kontrolah je pelo pozivni napev le 14 samcev od 66-ih, ki so peli v 220 poskusih. Sploh se MCS redko oz. skoraj nikoli ne pojavlja v temi oz. pri rdeči luči (od vseh poskusov v temi se je pojavil le enkrat v kontroli v temi) (Preglednica 3 in Slika 18). Samci kot prvi napev večkrat pojejo napev dvorjenja (69 %, N=58) kot pozivnega.

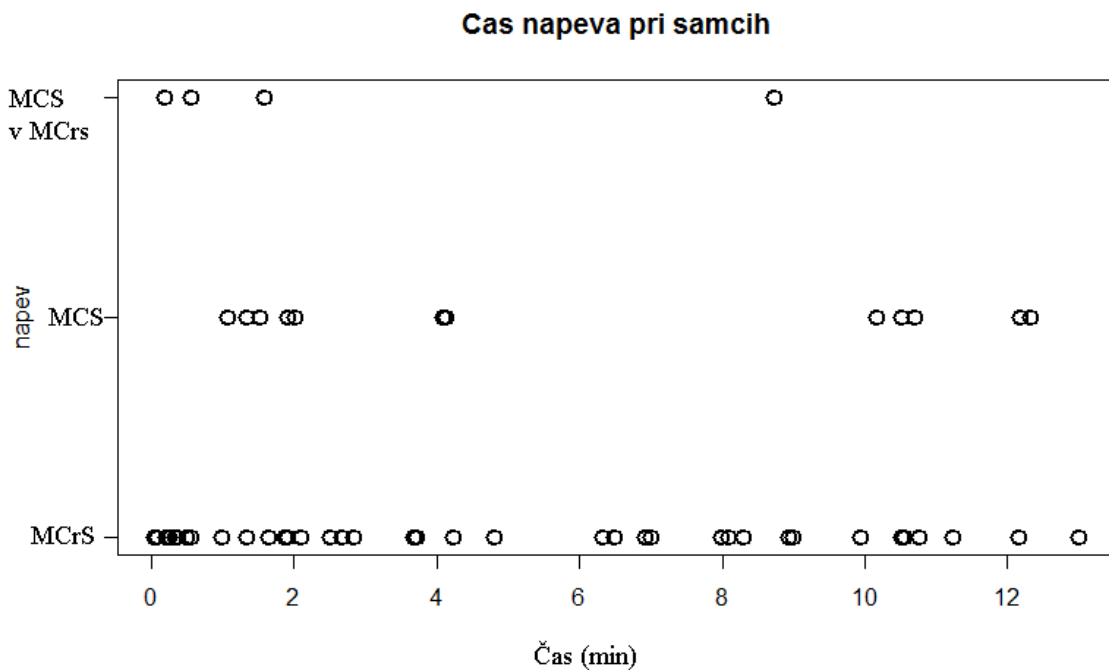
Preglednica 3: Samčevi napevi v različnih poskusih: samčev pozivni napev (MCS), samčev napev dvorjenja (MCrS), prehodni napev iz pozivnega v napev dvorjenja v sklopu enega vlaka pulzov (MCS v MCrS), samičin pozivni napev (FCS), "neznani napev" = ni podatka za ta poskus, "BAE" = Z- α -bisabolen epoksid v navedenem razmerju *trans* in *cis* izomere

Table 3: Male songs in different tests: male calling song (MCS), male courthship song (MCrS), a transition from one to the other (MCS v MCrS), "niso peli" = males did not sing, "neznani napev" = no data for this experiment, "BAE" = Z- α -bisabolen epoksid in the given ratio of *trans* and *cis* isomere

	MCS	MCS-MCrS	MCrS	niso_peli	Neznani napev
Kontrola svetloba	2	1	3	19	
Kontrola tema	1	0	2	11	
Prazna kletka	0	0	2	8	
Svež filter papir	0	0	0	6	
Stimulacija s FCS	4	1	9	7	8
Model	1	2	6	21	
Živa samica - svetloba	2	0	8	3	
Živa samica - tema	0	0	2	12	
Živ samec - tema	0	0	4	17	
Živ samec - svetloba	0	0	2	9	
Živ samec - svetloba kletka	1	0	0	11	
Filter papir z vonjem samcev	2	0	2	8	
1,4:1 = <i>trans</i> : <i>cis</i> BAE	1	0	0	10	
1:1 = <i>trans</i> : <i>cis</i> BAE	0	0	0	12	
skupaj	14	4	40	154	8

4.4.2 Čas prvega napeva pri samcih v različnih poskusih (sam na rastlini)

Samci so peli pozivni napev (MCS) štirinajstkrat, od tega so v polovici primerov (sedemkrat) peli v prvih štirih minutah, ostala polovica pa po deseti minuti poskusa oz. kontrole, vmes samci niso nikoli peli MCS. Napev dvorjenja se je pojavljal ves čas (Slika 19).

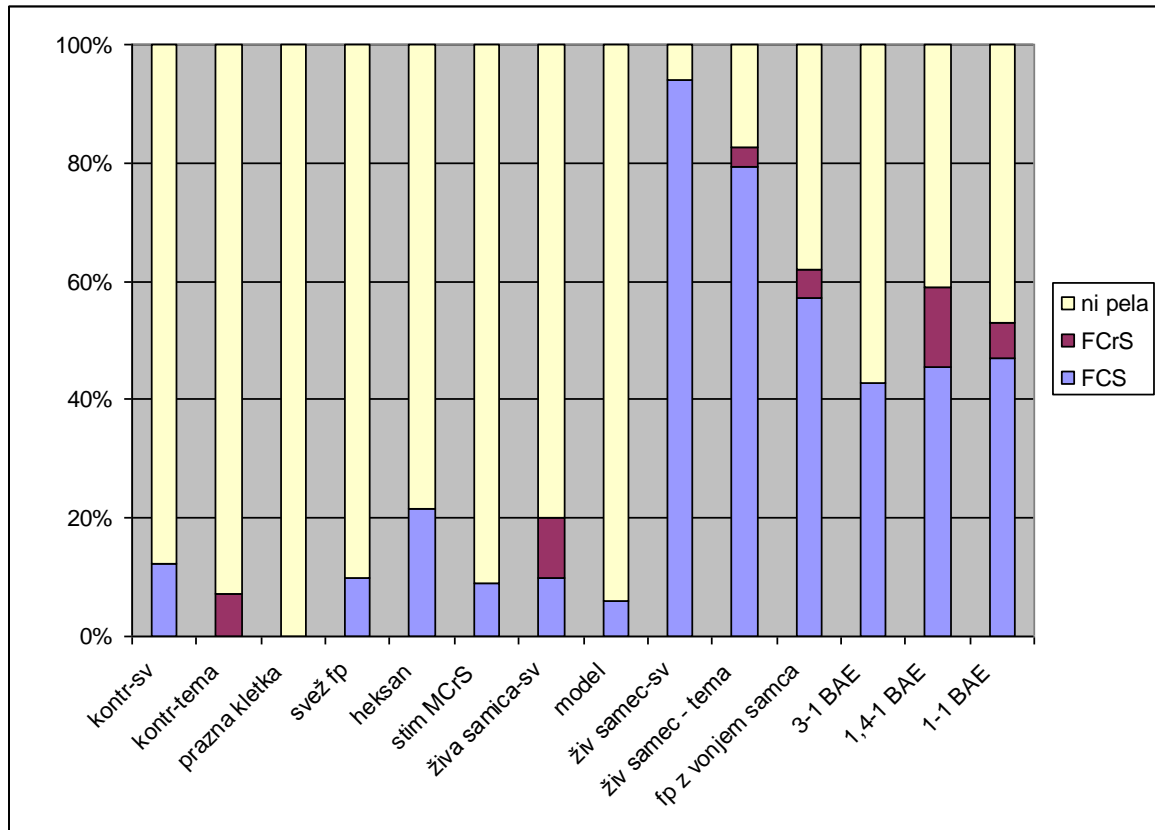


Slika 19: Časi samčevih prvih napevov (združeni rezultati različnih poskusov s posameznim samcem): samčev pozivni napev (MCS), samčev napev dvorjenja (MCrS), prehodni napev iz pozivnega v napev dvorjenja znotraj enega vlaka pulzov (MCS v MCrS)

Figure 19: The time of male first songs (combined results of different experiments with single male): male calling song (MCS), male courthship song (MCrS), a transition from one to the other (MCS v MCrS)

4.4.3 Napevi samic v različnih poskush

Samice so v veliki večini pele pozivni napev (FCS), napev dvorjenja (FCrS) se pojavi samo pri draženju s kemičnem signalom in enkrat v poskusu z živo samico ter enkrat v kontroli v temi (glej diskusijo) (Slika 20).



Slika 20: Napevi samic v različnih poskush in kontrolah: samičin pozivni napev (FCS), samičin napev dvorjenja (FCrS), "ni pela" predstavlja osebke, ki niso odgovarjali na signal/kontrolo, "sv" = svetloba, "fp" = filter papir, "k" = kletka, "BAE" = *Z*- α -bisabolen epoksid v navedenem razmerju *trans* in *cis* izomere

Figure 20: Female calling in courthship songs in different tests in controls: male calling song (MCS), male courthship song (MCrS), female calling song (FCS), female courthship song (FCrS), "niso peli" = no singing occurred in these tests, "sv" = daylight, "fp" = filter paper, "k" = cage "BAE" = *Z*- α -bisabolen epoxid in the given ratio of *trans* and *cis* isomere

V svojih poskusih sem med prvimi napevi našla tudi 24 primerov pulziranega pozivnega napeva FCS2, ki so ga pele različne samice. Enkrat se je zgodilo tudi, da je samica prešla iz enega (FCS2) v drugega (FCS1), druga samica pa je iz pulziranega napeva prešla v napev dvorjenja. Samice, ki sem jih ponovno testirala v enakem poskusu, v katerem so prvič pele FCS2, drugič v 75 % primerov niso pele, ena samica pa je spet pela FCS2. Ko sem isti test ponovila še enkrat, so v tretjem poskusu vse samice pele FCS1 (N=4).

V vseh ostalih poskusih, ki jih ni v preglednici št. 4, so samice pele samo FCS1. Vidimo, da se je pulziran (nasekan) samičin napev FCS2 pojavljal samo v poskusih z različnimi kemičnimi signali, samo enkrat pa tudi v kontroli s svežim filter papirjem (Preglednica 4).

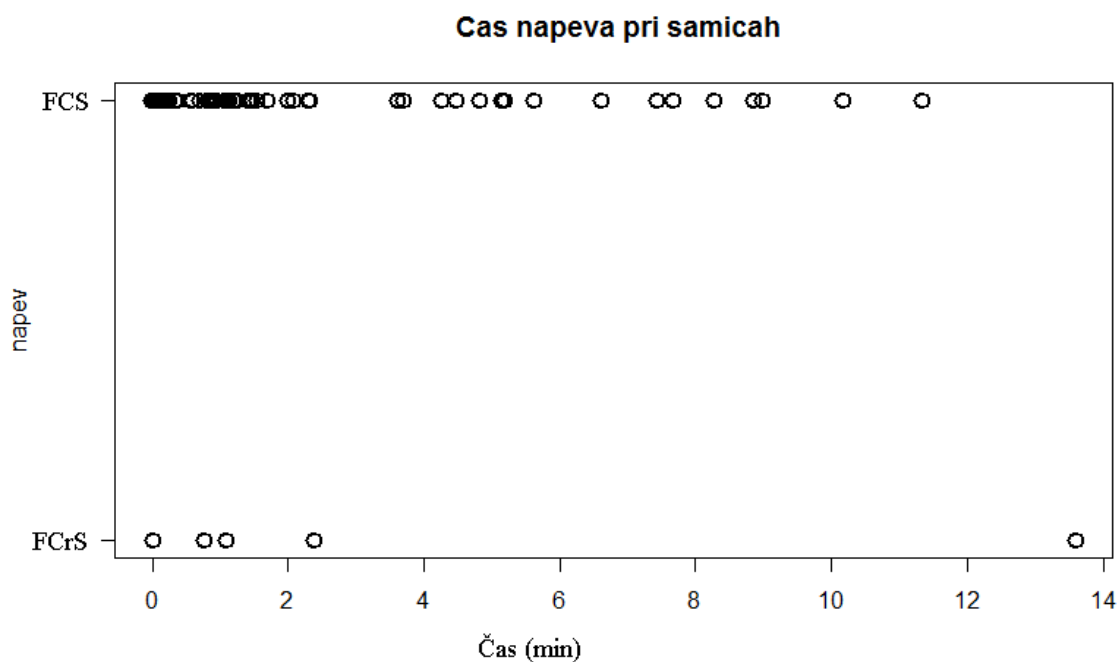
Preglednica 4: Primerjava pogostosti pojavljanja samičinega nepulziranega (FCS1) in pulziranega (FCS2) pozivnega napeva v različnih poskusih, kjer sta se pojavljala; "fp" = filter papir, "BAE" = Z- α -bisabolen epoksid v navedenem razmerju *trans* in *cis* izomere

Table 4: Comparison of non-pulsed (FCS1) in pulsed (FCS2) female calling song in different experiments where both occurred; "fp" = filter paper, "BAE" = Z- α -bisabolen epoxide in the given ratio of *trans* and *cis* isomere

poskus	pele FCS1	pele FCS2	petje	% FCS2
svež fp	1	1	2	50
živ samec na svetlobi	21	4	25	16
živ samec v temi	19	4	23	17.4
Filter papir z vonjem samca	8	4	12	33.3
3:1 BAE	4	2	6	33.3
1,4:1 BAE	7	3	10	30
1:1 BAE	2	6	8	75

4.4.4 Čas prvega napeva v različnih poskusih pri samicah, samih na rastlini

Samice, ki so v poskusih pele, so v veliki večini začele že v prvih šestih minutah - le osem samic (od 96 samic, ki so pele, v skupno 257 poskusih) je v vseh poskusih skupaj začelo peti šele po šesti minuti, večinoma pri poskusih z umetnimi feromoni (Slika 21).



Slika 21: Časi samičinih napevov v različnih poskusih (združeni); samičin pozivni napev (FCS), samičin napev dvorjenja (FCrS)

Figure 21: Results from different experiments with single female combined: time of the first female song, female calling song (FCS), female courthip song (FCrS), "napev" = song, "čas" = time

Samice so pele napev dvorjenja večinoma v prvih 2,5 minutah, le ena samica ga je pela kasneje. Samičin pozivni napev se pojavlja ves čas, vendar veliko bolj pogosto v prvih minutah (Slika 21).

4.4.5 Samičin ritem oddajanja signalov pozivnega napeva v kontrolah (spontano petje) in sprožen s kemičnim signalom:

Medtem ko so samice oddajale spontano le manjše število FCS signalov (večinoma le en ali dva signala), so tiste, ki so pele kot odgovor na feromone samca, pele v značilnem stalnem ritmu signalov ves čas poskusa. Chi-kvadrat test sicer ni pokazal statistično značilnih razlik (chi-kvadrat= 2,4575 pri 1 stopinji prostosti in $p= 0,117$), vendar je bil vzorec za kontrolo majhen, saj samice zelo redko sploh pojejo spontano, zato je kljub velikemu vzorcu kontrol malo podatkov, kjer so samice res pele (sedemkrat, od tega samo enkrat ritmično) (Slika 22). Enako velja za ostale kontrole, na sliki je prikazana primerjava poskusa s kemičnimi signali (samec v kletki) in kontrole na svetlobi.



Slika 22: Grafični prikaz chi kvadrat testa in razlike v ritmičnosti petja pri poskusu s kemičnimi signali (samcem v kletki) (levo) in kontroli na svetlobi (desno)

Figure 22: Graphic of chi sq. test for comparisson of rythem in chemical stimuli (male in cage = "samec v kletki") experiment (on the left) in control = "kontrola" (on the right), "Ni ritma" = no rithm, "Ritem" = rithm

5 RAZPRAVA

Rezultati dokazujejo, da v okviru vrste petje samice zelene smrdljivke sprožijo večinoma kemični signali samca, petje samca pa vibracijski in vidni signali samice. Samice se običajno odzovejo s petjem pozivnega napeva (FCS), samci pa s pozivnim (MCS) in/ali napevom dvorjenja (MCRS).

V paru na rastlini večinoma začnejo prvi peti samci, saj je bila statistično značilna razlika med spoloma v dalj trajajočem poskusu z večjim številom testiranih parov. Samičin prvi napev je bil večinoma pozivni napev, napev dvorjenja so oddajale samo po predhodnem telesnem stiku s samcem. Samci so kot prvi napev oddajali oba napeva in tudi prehodni napev, kjer se signali pozivnega napeva zlijejo v napev dvorjenja. Oba samčeva napeva (pozivni in napev dvorjenja) sta se pojavljala kot prvi napev v poskusih s pari. Prvi samčev napev je bil v krajših (13 minutnih) poskusih s pari pogosteje napev dvorjenja, vendar ne značilno različno od pojavljanja pozivnega napeva. V daljših (25 minutnih) poskusih s pari je bil nekoliko pogostejši pozivni napev, vendar ne značilno različno, razlika je še manjša kot v krajšem poskusu. Samci torej kot prvi napev uporabljajo oba napeva, samice pa večinoma pozivnega. V poskusih s posameznim osebkom, so samci pogosteje peli napev dvorjenja, razlika je značilna za združene rezultate vseh poskusov.

5.1 SPONTANO PETJE

Samice in samci so peli spontano v odsotnosti partnerja v različnih kontrolah in brez očitnega zunanje sprožilca, tako na svetlobi kot v temi. Vendar pa je bila pogostost spontanega petja značilno nižja od pogostosti petja, sproženega z vidnim in vibracijskim dražljajem za samce in kemičnim za samice.

Samci pogosteje pojejo spontano kot samice, tako na svetlobi kot v temi. Spontano oddajanje vibracijskih signalov pri samicah je običajno sestavljalo le nekaj signalov, ki se večinoma niso razvili v dalj časa trajajočo sekvenco, značilno za kemično sprožene signale. Ker so bili poskusi izvedeni na svežih rastlinah, kamor stenica še ni stopila, so kemični signali, ki jih oddajajo samci stenice *Nezara viridula*, izključeni kot možni sprožilci spontanega petja. Vendar pa so na rastlini lahko prisotne substance rastlinskega izvora, ki prav tako lahko vplivajo na vedenje žuželk (Reddy in Guerrero, 2004). Ne moremo izključiti možnosti, da imajo lahko tudi rastlinske kemične substance vlogo pri vzbujanju oddajanja vibracijskih signalov, opisanih kot spontano petje. Pri zelenih smrdljivkah vloga rastlinskih kemičnih substanc na vibracijsko komunikacijo še ni bila preučena, znano pa je, da snovi, ki jih izločajo rastline, vplivajo na ovipozicijo – odlaganje jajčec (Panizzi in sod., 2004).

Spontano petje je bilo doslej spregledano oz. podcenjeno, predvsem pri samcih, vendar naši poskusi kažejo, da se pojavlja na dnevni svetlobi pri samcih vsaj dvakrat pogosteje kot pri samicah. Večje število osebkov, ki sem jih testirala v pet minutnih kontrolah, daje večjo težo tem rezultatom, kjer se je pokazala statistično značilna razlika med spoloma. Neznačilnost razlike med spontanim petjem samcev in samic v 13 minutnih poskusih lahko verjetno pripišemo majhni velikosti vzorca, ne pa dolžini poskusa, saj so večinoma osebki začeli peti (spontano ali ne), že v prvih petih minutah. Na podlagi teh rezultatov lahko

zaključimo, da so v naših poskusnih pogojih samci pogosteje oddajali vibracijske signale v odsotnosti očitnih zunanjih dražljajev kot samice.

Ta rezultat je lahko posledica selekcijskega pritiska, ki nastane, kadar je oddajanje signala tvegano za oddajnika. To tezo podpira tudi evolucijska teorija, po kateri samec več tvega za pridobitev partnerice kot samica (Kotiaho, 2001; Johansson in Jones, 2007). Podoben mehanizem je opazen pri kemični komunikaciji zelenih smrdljivk, saj so feromone zaenkrat našli samo pri samcu. Samice po dosedanjih raziskavah ne proizvajajo feromonov, kar dokazano zniža verjetnost, da jih najde parazitoid, saj le-tega feromon privlači (Colazza in sod., 1999). Oddajanje vibracij pa je tvegano za oddajnika, ker vibracije zaznavajo tudi plenilci, na primer predatorske stenice (Žunič, 2008). Kot izločanje feromona poveča tveganje za zaparazitiranost, proizvajanje vibracij poveča tveganje, da stenico odkrijejo paraziti ali plenilci, ki zaznavajo vibracije. Prisluskovanje plenilcev je bilo potrjeno pri pajkih (Virant-Doberlet in sod., 2011), prisluskovanje parazitoidov pa pri stenici *Euschistus heros* (Laumann, 2007; 2011). Da znižajo tveganje samice redkeje pojejo spontano in se odzivajo s stalnim ritmom samo takrat, ko to sprožijo kemični signali (samčevi feromoni), medtem ko samci pojejo spontano pogosteje, njihovo petje pa sprožita vibracijski in vidni signal.

Spontano petje je lahko eden ključnih dejavnikov za začetek vibracijske komunikacije, vendar so pri naših poskusnih pogojih samice redkeje oddajale vlake vibracijskih pulzov v urejenem ritmu, značilnem za pozivni napev, ki ga sproži odziv na kemične signale. Čeprav razlika ni bila statistično značilna, je to najverjetneje posledica majhnosti vzorca (N=7 za kontrole, kjer so samice spontano pele). Iz kontrol, kjer so samice pele, imamo malo podatkov, ker se v njih običajno ne oglašajo. Šest od sedmih samic, ki so spontano pele na svetlobi, ni redno oddajalo signalov, kar daje slutiti, da je statistična neznačilnost posledica majhnosti vzorca saj se je podobno dogajalo tudi pri ostalih kontrolah.

Kontrole se med seboj niso statistično razlikovale in so bile vedno znotraj območja spontanega petja, ne glede na to, kako so bile izvedene (s prazno kletko, s praznim filter papirjem, s topilom heksan, na svetlobi ali v temi oz. pri rdeči luči).

5.2 RAZLIKA MED POSKUSI NA SVETLOBI IN V TEMI

Tako samci kot samice so pogosteje peli na svetlobi kot v temi, vendar razlika ni bila statistično značilna. Četudi bi to pripisali manjšemu vzorcu in bi v resnici obstajala razlika med spontano aktivnostjo na svetlobi in v temi, nas taka razlika ne bi preveč presenetila, saj je *Nezara viridula* dnevna žival. Čeprav njena podaljšana kopulacija (McLain, 1980) lahko traja več dni, je iskanje partnerja bolj intenzivno podnevi kot ponoči.

V pričujočih poskusih se je izkazalo, da samci pogosto začnejo vibracijsko komunikacijo v paru. Na naravi, kjer so stenice pogosto v skupinah in je koncentracija samčevih feromonov v zraku lahko visoka, je lahko drugače. Razen vidnega signala nisem našla nobenega dokaza, da bi kateri zunanji signal sprožil samce, da začnejo peti prvi. Prvi napev ni odgovor na vibracijske napeve, saj začne komunikacijo, prav tako pa ni odgovor na kemijske signale samice, saj pri njih ni najden noben feromon (Aldrich in sod., 1987, 1993; Millar, 2005), poleg tega samci niso odgovarjali na samico v temi.

Drugi vibracijski signali, ki jih povzroča npr. hoja in trkanje po rastlini ter vibracije, ki jih povzročajo abiotski dejavniki kot npr. dež ali veter, bi tudi lahko imeli svojo vlogo pri sprožanju vibracijskih napevov. Vendar pa zaenkrat ni nobenih podatkov o vlogi vrstno nespecifičnih signalov pri sprožanju vibracijske komunikacije pri zelenih smrdljivkah. Seveda bi bilo za trdne zaključke oz. izključitev le-teh potrebno vse te signale še preizkusiti.

Proti pričakovanjem začne velik delež samcev vibracijsko komunikacijo z oddajanjem napeva dvorjenja, ki je v krajših poskusih s pari celo pogostejši od pozivnega napeva. Samci oddajajo oba napeva tako v poskusih s pari kot v poskusih s samim samcem na rastlini. Vseeno pa obstajajo nekatere razlike v okoliščinah, kdaj oz. v kakšnih primerih se posamezen napev pojavlja. Pozivni napev pojejo samci veliko pogosteje na svetlobi kot v temi. V temi se je to zgodilo samo v enem primeru od 35 ponovitev. Tudi v poskusu s pari sem opazila, da samci pojejo pozivni napev, kadar sta se žuželki približali druga drugi, zato bi lahko bil ta odziv povezan z vidnim signalom. Napev dvorjenja je po drugi strani običajno odgovor na samičino petje ter je tudi najpogostejša samčeva pesem v duetu s samico, ki poje pozivni napev.

5.3 VIBRACIJE

Duet samca in samice zelene smrdljivke običajno sestavljata samčev napev dvorjenja in samičin pozivni napev, zato sem uporabila ta dva napeva za draženje s konspicivnim signalom v "play-back" stimulaciji. Poleg tega se samičin napev dvorjenja običajno pojavi šele po fizičnem stiku med osebkoma, zato ni vpletena v samo iskanje, ko se prvi vibracijski signal pojavi. Zaenkrat še niso odkrili nobenega odziva samice na samčevo pozivno pesem (Čokl in Bogataj, 1982; Čokl, 2006), zato smo za stimulacijo samic uporabili napev dvorjenja samcev (MCRS). Oddajanje vibracij pri samcih nedvomno sproži vibracijski signal (samičin pozivni napev). Samice pa odgovarjajo na vibracijsko stimulacijo z napevom dvorjenja v rangu kontrole.

5.4 PRIMERJAVA Z DRUGIMI STENICAMI DRUŽINE PENTATOMIDAE

Vprašnji vloge samčevega pozivnega napeva in primerjava med vrstami sta v okviru družine Pentatomidae na splošno še odprti, saj na tem področju ni poenotene klasifikacije napevov niti okoliščin, v katerih so bili signali registrirani. Zaenkrat še ni bilo opaziti nobenega neposrednega odziva samice na samčev pozivni napev. Nekateri pozivni napev (MCS) razlagajo kot vmesno, prehodno fazo pred samčevim napevom dvorjenja, ki je običajni odgovor na samičino petje. Napev dvorjenja samca (MCRS) ima običajno bolj zapleteno zgradbo in vrstno specifične časovne, amplitudne in frekvenčne vzorce, kar kaže na pomembno vlogo pri prepoznavanju vrste potencialnega partnerja. Samčev pozivni napev se tudi pojavlja kot prehodna pesem med napevom dvorjenja in rivalnim napevom.

V večini primerov, kadar na rastlini začne vibracijsko komunikacijo samica, oddaja pozivni napev (FCS). Ta poveča samčevo aktivnost: bolj zavzeto išče samico na rastlini (Virant-Doberlet in Čokl 2004, Čokl 2008), omogoča vibracijsko usmerjanje (Čokl in sod., 1999), sproža samčev vibracijski odgovor (Virant-Doberlet in Čokl, 2004) in poveča samčevo oddajanje feromonov (Miklas in sod., 2003a). Pozivni napev samice je običajno prvi napev samice in omogoča samcem, da jo najdejo. Časovni parametri pozivnega

napeva so zelo stabilni, ne glede na to, kje na rastlini samica poje – na listu, na stebelu, na žili, na vrhu (Čokl in Bogataj, 1982). Zaradi podobnih časovnih in frekvenčnih značilnosti nosi prva samičina pesem (pozivni napev) pri večini vrst pentatomid manj informacije o vrstni identiteti (Čokl in Bogataj, 1982; Čokl in Virant-Doberlet, 2003). Prepoznavanje vrste se večinoma dogaja na nivoju napeva dvorjenja, v bližini, kjer postanejo pomembne še druge modalitete.

5.5 VIDNI SIGNAL

Zelene smrdljivke so majhne živali zelene barve, ki se dobro zlivajo z okoljem (mimikrija) in čeprav o vidu ni dosti znanega, so vseeno dnevne živali, ki uporabljajo tudi optične signale (imajo dve sestavljeni očesi in dva ocelija), zato ne moremo izključiti pomembnosti vloge vida na krajše razdalje. Zelena barva se v zmernih klimatih tekom cikla jeseni spremeni v rjavo, vendar se rjava obarvane smrdljivke običajno ne pari več, saj se pripravljajo na spanje. Rjava barva je značilna za živali v reproduktivni diapavzi, zato sem uporabila zelene modele, saj je bolj verjetno, da sprožijo odziv. Telo smrdljivke se v etanolu včasih nekoliko razbarva, zato so bili nekateri modeli bolj rjavi in drugi bolj zeleni, vendar med njimi ni bilo nobenih statističnih razlik.

Poskusnim živalim smo pokazali različne vidne signale, da bi ugotovili morebitno vlogo spola oz. velikosti (uporabili smo mrtvega samca in samico), uporabili smo modele različne obarvanosti in na različnih razdaljah. Ugotovili nismo nobene razlike v stopnji vibracijskega odgovaranja na vidni signal med samčevim in samičinim telesom in različnimi barvnimi odtenki modelov. Razdalja od modela do testiranega osebka in gibanje modela pa sta igrala ključno vlogo pri sprožanju vibracijskega odziva samcev. Samci so značilno bolj odgovarjali na vidni signal, medtem ko je bil odgovor samic v rangu kontrole (slika 17, preglednici 1 in 2).

V poskusih v temi se na živo samico v kletki niso odzvali ne samci ne samice, kar potrjuje odsotnost samičinih feromonov ali drugih kemičnih signalov (Harris in Todd, 1980; Aldrich in sod., 1987, 1989, 1993; Miklas in sod., 2000; Millar, 2005).

Samci so statistično značilno pogosteje peli, kadar sem za model uporabila živo samico v primerjavi z mrtvo, prav tako je statistično značilna razlika med modelom žive samice in živega samca. To je najverjetneje posledica gibanja samice v bližini samca, ko zaradi prisotnosti samčevega feromona hitro vrtijo svoje tipalke, da bi prestregle kar največ kemičnih signalov. Druga razlaga bi bila, da feromon, ki ga oddaja samec-model zavira odziv testiranega samca na vidni signal, saj testirani samec v tem primeru ve, da vidi samca, ne samice. Vendar je ta možnost manj verjetna, saj samci reagirajo tudi na samčev feromon v večji meri kot na kontrolo – čeprav ne statistično različno.

5.6 KEMIČNI SIGNALI

Žičnato kletko smo uporabili zato, ker omogoča samcu/samici, ki je uporabljen/a kot vir signalov, prosto gibanje in zato manj vpliva na njeno vedenje, povezano s stresom - izločanje smradne tekočine, ki smo se mu želeli izogniti, saj v njej nastopa veliko število (vsaj 19, po nekaterih virih pa celo 27) različnih kemičnih snovi, mi pa smo želeli ugotoviti vpliv samčevega feromona. Kletka je preprečila fizični kontakt in prenos vibracij, saj je

bila pritrjena na samostojno stoječo palico, poleg tega sem lahko z njo določala natančno razdaljo med testiranim osebkom na rastlini in osebkom v kletki.

Samčevi feromoni pri vrsti *N. viridula* privlačijo samice in po študiji Harris in Todd (1980) tudi samce ter ličinke petega larvalnega stadija. Slednje v kasnejših raziskavah ni bilo potrjeno (Brezot in sod., 1993). Zelene smrdljivke izločajo veliko različnih snovi, večinoma v smradni tekočini, ki jo izločata oba spola (Borges in Aldrich, 1992, Aldrich in sod., 1989; Brezot in sod., 1993; Aldrich, 1995; McBrien in Millar, 1999). Proizvajajo jo dorzalne, abdominalne in metatorakalne smradne žleze (Aldrich, 1988). Feromone pa izločajo samci iz uniceularnih žlez na abdomnu, ki so razpršene med normalnimi integumentalnimi celicami abdomna. Samice po podatkih iz literature najverjetneje ne izločajo feromonov, ki bi sprožali paritveno vedenje na kratke razdalje. To hipotezo smo preverili s poskusom s samico v kletki v temi, na katero se niso odzivali ne samci ne samice. Odzive na samčeve feromone smo preverjali z naravnimi in sintetičnimi feromoni zelene smrdljivke in ustreznimi kontrolami. Izraz feromoni uporabljam zato, ker sem v poskusih s sintetičnimi feromoni uporabljala zmes *cis* in *trans* izomere alfa bisabolen epoksida, ki sta tehnično gledano že dve različni snovi (pogosto imajo izomere različne učinke), poleg tega pa so v samčevem eksretu v manjši meri zastopane tudi E-nerolidol in n-nonadekan. Njuna vloga še ni razjasnjena, vendar so vedenjski odzivi na zmes, kjer so prisotne tudi manjšinske spojine, večji kot na zmes samo α -BAE. Enako se je pokazalo v naših poskusih, kjer je bil odgovor na naravni kemični signal precej višji od odgovora na sintetični feromon.

Odgovori samic na testirane kemične signale (feromone samcev vrste *Nezara viridula*) so se vedno statistično razlikovali od kontrol. Samice so odgovarjale na vse testirane kemične signale v večji meri kot samci (slika 17), pa tudi antenirale so pogosteje. Ritem oddanih FCS signalov je bil običajno ustaljen in oddajanje pesmi je trajalo dlje časa v primerjavi s spontanim petjem, kjer se je običajno pojavil samo en ali dva vlaka pozivnega napeva.

Ko sem samcu pri rdeči luči približala samico v kletki, so samci peli v zelo malo primerih (še manj kot v kontroli), medtem ko v obrnjeni situaciji, ko sem samici približala samca v kletki v temi (pri rdeči luči), so samice odgovarjale v zelo visokem odstotku in značilno bolj pogosto kot v kontroli. Da bi zmanjšali individualno variacijo v oddajanju feromonov sem uporabila več samcev v kletki (vsak dan drugega). Vseeno je značilno več samic odgovarjalo na vsakega od njih, iz česar lahko sklepamo, da feromon samca zelene smrdljivke sproži samičino petje vibracijskega pozivnega napeva (rezultati med odgovori samic na različne samce se niso statistično razlikovali). Samice so se močno odzivale na samca v kletki pri dnevni svetlobi, vendar tudi na samca v kletki v temi - razlika ni statistično značilno različna, zato lahko sklepamo, da je feromon glavni sprožilec petja samice zelene smrdljivke. Poleg tega nisem opazila nikakršnega odgovora na vidni signal pri samicah, vsi so bili v rangi kontrole. Zato je sinergija med vidnim in kemičnim signalom manj verjetna, čeprav je manj samic odgovarjalo na filter papir s samčevim vonjem in na sintetični feromon kot na prisotnost živega samca v kletki. Verjetno je kakšna komponenta naravnega feromona bolj hlapna, pa tudi količina samčevega feromona pri živem samcu je lahko višja od količine feromona na filter papirju, zbranem čez noč. Vsi kemični signali so sprožili pri samici večji odziv (več samic je odgovarjalo, večkrat so ponovile napev in antenirale so pogosteje) kot pri kontroli na dnevni svetlobi in kontroli s filter papirjem.

5.7 POVEZAVA RAZLIČNIH MODALITET

Majhna razlika med odgovorom samice na samca pri dnevni svetlobi in v temi, ki pa ni statistično značilno različna, je lahko posledica pomanjkanja vidnega signala, torej splošna razlika med poskusi na svetlobi in v temi. Seveda pa je lahko tudi rezultat različnih količin feromona. Vibracijski signali samic povečajo samčevo sproščanje feromona (Miklas in sod., 2003a) in samčevo petje (Miklas in sod., 2001). Isti princip bi lahko aplicirali na vidni signal, za katerega smo tudi pokazali, da sproži samčev vibracijski odgovor (enako kot samičino petje). Torej bi lahko samec v kletki na svetlobi sproščal več feromonov, ker vidi samico – v nasprotju s samcem v kletki v temi, ki samice ne vidi – podobno kot pri samčevemu odgovoru na pozivni napev samic, ki sproži oboje: vibracijski odgovor in večje sproščanje feromonov. Poleg tega je lahko samčevo sproščanje feromonov višje na svetlobi že samo po sebi umevno. Za to hipotezo ni dokazov. Tak poskus bi lahko zasnovali z vetrovno komoro, ki jo prepričavamo z zrakom in na drugi strani zbiramo vonjave, podobno kot v svojih raziskavah Brezot s sodelavci (1993 in 1994) in Miklas s sodelavci (2000 in 2003a).

Ker v poskusih z modeli niso samice nikoli odgovarjale na vidni signal, predvidevamo, da je majhna razlika v pogostosti samičinega petja (statistično sicer neznačilna) med kontrolo na svetlobi in v temi, bolj verjetno posledica fiziološkega stanja in ne pomanjkanja vidnega signala.

Odgovori samic na vse kemične signale so bili značilno višji kot na kontrole, vendar je trend očiten in pada od najbolj prave naravne zmesi (živi samec – najvišji odgovor) do najbolj poenostavljenega sprožilca (sintetični feromoni – najnižji odgovor) (glej sliki 17 in 20). Samice so se najbolj odzivale na samca v kletki pri dnevni svetlobi in šele nato na samca v kletki v temi, malo manjši odgovor je sprožil samčev vonj na filter papirju in najmanjšega umetna zmes feromonov, kjer je spet najvišji odgovor pričakovano sprožila zmes v razmerju izomer, ki je prisotno v francoski populaciji, ki je med testiranimi najbližja naši populaciji, torej sklepamo, da je tudi razmerje izomer najbolj podobno razmerju naše populacije. Vsi kemični signali so bili statistično značilno različni od vseh kontrol razen od kontrole s heksanom. Heksan je organsko topilo in lahko sproži odziv kemoreceptorjev. Pokazano je bilo, da sproži sorodna spojina, strukturno podobna heksanu, nevrolški odziv pri koblicah (Stritih, 2009). E-2-heksanal je alarmna snov pri zeleni smrdljivki (*Nezara viridula*) (Lockwood, 1987), v smradni tekočini pri obeh spolih pa najdemo tudi heksan-1-ol. Vendar ti dve spojini nista ciklični, zato nimata enakega učinka. Vseeno pa med kontrolo s heksanom in kontrolo na svetlobi ni bilo nobene razlike, to je vmesna stopnja.

Samice, ki niso začele peti, ko sem jih izpostavila samčevemu feromonu, so pogosto zletele na kletko oz. filter papir (kar je bilo pač uporabljeno v poskusu). To, da samica prileti v bližino vira feromonov, je daljnosežno paritveno vedenje; sproži ga feromon, ki deluje kot atraktant, (Borges in sod., 1987; 2011). V mojih poskusih je bila količina feromonov postavljena na prag delovanja za odziv z vibracijsko komunikacijo (FCS), zato se nekatere samice niso odzvale s petjem pozivnega napeva, ampak z letenjem v bližino vira, kar je agregacijski učinek feromonov, ki deluje na daljše razdalje. Razlogi so lahko individualni: nekatere samice niso zavohale dovolj feromona za sprožitev vibracijskega napeva, svojo vlogo pa lahko igra tudi samo fiziološko stanje samice – ali je bolj

pripravljena na parjenje (torej ima manjši signal večji učinek) ali ne. Večina samic je tudi antenirala, kadar so bile izpostavljene kemičnemu signalu.

Glede na rezultatov preliminarnih poskusov s sintetičnim feromonom z različnimi koncentracijami feromona smo izbrali 8-9 % od doze, ki jo samec izloči v enem dnevu (Aldrich in sod., 1989). Ker samci ne izločajo feromonov enakomerno, ves čas v isti količini, ampak v običajno v kratkih sunkih, so lahko koncentracije samčevih feromonov v naravi v gostem grmovju precej višje od vrednosti, pričakovanih iz podatkov aeracijskih poskusov (McBrien in Millar, 1999, 2003).

Samice na kemični signal večinoma odgovarjajo s pozivnim napevom v značilnem stalnem ritmu ponavljanja posameznih signalov - v nasprotju s spontanim petjem. Razlika sicer ni značilna zaradi zelo majhnega števila samic ki so spontano pele, ker samice redko pojejo v kontrolah (N=41, pelo jih je le sedem, od tega ena ritmično), vendar je trend opazen: kemični signali so izzvali daljši odgovor. Samice so kot po pričakovanju odgovarjale na signale s pozivnim napevom, enako pri spontanem petju. Napev dvorjenja se je v poskusih s parom pojavil samo, kadar sta bila samec in samica že v bližini in sta se večinoma predhodno že dotaknila. V poskusih s posamezno žuželko pa so samice pele napev dvorjenja samo nekajkrat kot odgovor na kemični signal, spontano in na druge signale pa nikoli, razen v eni kontroli s filter papirjem in enkrat v kontroli v temi. V slednjem primeru je to morda posledica tega, da je na lonček te stenice zletela predhodno testirana smrdljivka in je potem v lončku smrdelo po smradni tekočini, tako da kemični signali niso bili izključeni.

Samice pojejo dva različna pozivna napeva, ki so jih opisali Čokl, Virant-Doberlet in Stritih (2000b): FCS1 je zvezna (nepulzirana), frekvenčno ozkopasovna, predstavlja jo en daljši zvezen signal, FCS2 pa pulzirana, širokopasovna, ki jo sestavlja več skupaj zlitih kratkih signalov. Samice, ki so pele FCS2, so uporabljale enkrat FCS1, drugič FCS2 (štiri samice, ki so pele FCS2, sem dala večkrat v isti poskus, v tretji ponovitvi so pele FCS1). Ena je prešla iz FCS2 v FCS1, kar se sklada z dosedanjimi ugotovitvami, da lahko ena žival poje oba napeva in ju včasih celo menjava znotraj ene same sekvence. Pulzirani tip pozivnega napeva FCS2 torej ni značilen za posamezne osebkke, kot na primer albino morf, ampak lahko ena žival poje tak ali drugačen napev. V mojih poskusih je ena samica iz nasekanega napeva prešla v napev dvorjenja. Druga zanimiva ugotovitev je, da se je ta tip napeva pojavljal skoraj samo v poskusih s kemičnim signalom. Vendar pa je to zelo verjetno samo posledica različnih numerusov, saj so samice veliko pele na kemične signale in zelo male v kontrolah. Bi bilo pa zanimivo preizkusit, ali so kemični signali povezani s petjem tega tipa napeva.

Testirala sem sintetične feromone v različnih razmerjih med *cis* in *trans* izomerama. Kljub velikim interindividualnim razlikam v sestavi feromona (Ryan in sod., 1995) se razlika med feromoni različnih populacij odraža v različnem razmerju med *cis* in *trans* izomerama (Z)- α -bisabolen epoksida (BAE) (Aldrich, 1995). V svojih poskusih sem uporabila naslednja razmerja: razmerje 3:1, značilno za populacijo iz ZDA, razmerje 1,4:1, najdeno pri francoski populaciji in razmerje 1:1 iz japonske populacije (Aldrich, 1995). Po pričakovanjih so se samice zelene smrdljivke najbolj odzvale na razmerje 1,4:1, značilno za francosko populacijo, ki je geografsko najbližje testirani (slovenski) populaciji (glej rezultate, slika 17).

Za samice je na splošno veljalo, da začnejo vibracijsko komunikacijo, ko pridejo na rastlino, kjer so samci (Čokl, 2008), vendar so v teh poskusih samci pogosteje začeli peti prvi v duetu. Razlika med spoloma je značilna za daljše poskuse, kar pa je verjetno posledica manjšega vzorca v krajšem poskusu.

Razlog, da so bile samice pogosto opisane kot začetnice dueta, bi lahko bilo dejstvo, da v tistih poskusih običajno niso uporabljali sveže rastline/podlage za vsak test za vsako žival. Poleg feromonov v zraku sprošča samec tudi kontaktne kemične substance, ki se primejo na površino rastlin, membrano zvočnika,...) in katere samica zazna s svojimi antenami, s katerimi tiplje po steblo/listih med hojo in iskanjem samca (Colazza in sod., 1999). Kar so prej opisovali kot spontano petje, bi lahko bilo delno odgovor na kontaktni feromon (ali drug kontaktni kemični produkt) ali njegove ostanke na rastlinah ali zvočnikih, uporabljenih v teh poskusih. Kontaktni kemični signali imajo lahko pomemben vpliv na vedenje, celo v zelo nizkih koncentracijah (Colazza in sod., 1999; Siljiner in sod., 2008). To se je pokazalo tudi v naših poskusih, kjer so samice začele peti hitreje, če je bil samec na isti rastlini (čeprav ni pel) kot če smo ga približali v kletki.

5.8 OSTALA ČUTILA - TIP

Tip igra pomembno vlogo ko sta samica in samec blizu drug drugega. To je še posebej opaziti pri samicah, ki v kopulacijo privolijo ob specifičnem paritvenem ritualu, v katerem samec buta samico z glavo in kasneje z zadkom pod toraks. Samica s tipom tudi izraža svojo privolitev ali zavrnitev dvorjenja samca: če samca sprejme, se ga dotika oz. se mu pusti dotikati, če pa ga zavrne, se umakne ali ga vrže z lista. V kopulacijo privoli z dvigom zadka.

5.9 ČAS ODDAJANJA NAPEVA IN VPLIV STAROSTI

V veliki večini so začele stenice v poskusih s pari in v poskusih s posamezno živaljo peti v prvih petih minutah, predvsem to velja za samice. Tiste, ki so začele peti kasneje, so bile večinoma dražene z umetnimi (sintetičnimi) feromoni, ki niso tako značilen signal kot pravi, naravni feromon, zato so samice verjetno potrebovale dalj časa, da so spoznale signal, na katerega se spleča odzvati. Samice, ki so pele napev dvorjenja, pa so vedno pele v prvih dveh minutah in pol.

Samci so prav tako večinoma peli že v prvih petih minutah, vendar so bolj pogosto kot samice peli tudi kasneje. Zanimivo je, da so pozivni napev peli samci v prvih štirih minutah ali pa po deseti minuti, nikoli pa med peto in deseto minuto. Lahko je to zgolj naključje, kar bodo pokazale morebitne kasnejše raziskave z daljšimi poskusi. Ni izključeno, da bi se razlike pokazale pri zelo velikem vzorcu, saj se trend nekoliko nakazuje. Starejši samci so večkrat peli pozivni napev, posebno v kombinaciji s starejšo samico (glej sliko 15), vendar razlike niso značilne.

Zanimivo je, da starost samca ne igra vloge: pojejo tako mlajši kot starejši samci. Tudi samice pojejo tako mlajšim kot starejšim samcem. Samičina starost pa vpliva na njeno pripravljenost peti: starejše samice redko pojejo. Samci pa vseeno pojejo tudi starejšim samicam, vendar bolj pogosto pozivni napev kot sicer (na splošno je pogostejši napev dvorjenja). Starejše samice torej ne začenjajo dueta, koliko je star samec pa ni pomembno

za samo petje, vpliva pa na izbor napeva: starejši samci večkrat pojejo pozivni napev, sploh starejšim samicam. Še ena zanimiva ugotovitev je, da so pari, kjer ne pride do izmenjave vibracijske komunikacije, v glavnem mlajši. Pari, starejši od 29 dni, so vedno peli, večinoma je peti začel samec.

Ti rezultati imajo to praktično vrednost za izvedbo nadaljnjih poskusov, ker ne izgubimo veliko podatkov, če poskuse omejimo le na 6 minut, saj se večina petja (v poskusih s pari in s posameznimi žuželkami) zgodi že prej. Tako lahko naredimo več poskusov v istem času in povečamo njih število, zato je statistika zanesljivejša.

5.10 IDEJE ZA NADALJNE RAZISKAVE

Vsaka raziskava odpre več vprašanj kot ponuja odgovorov in ta ni izjema: zanimivo bi bilo raziskati še druge vibracijske signale in njihov morebitni vpliv predvsem na samce: na primer stimulacija z vsemi še netestiranimi napevi: s samičinim in samčevim napevom dvorjenja (in MCrS), samce in samice bi lahko testirali s samčevim pozivnim napevom (MCS) in rivalnim napevom, stimulacija z vibracijami, ki jih oddajajo stenice pri hoji - tukaj sicer ne pričakujemo odgovora, saj je hoja zelo vrstno nespecifična.

Vidni signal bi lahko analizirali: uporabili bi model - mrtvo žuželko, ki bi jo ves čas gibali sem in tja. Da bi ugotovili, ali kroženje s tipalkami znatno pripomore k vidnemu signalu, ki sproži petje samca, bi samce dražili z živo samico brez tipalk (ki smo jih predhodno odrezali).

Testi z dvema samcema in eno samico v različnih okoliščinah bi lahko pokazali sprožilce rivalnega napeva. Vedenje bi analizirali tako, da bi namesto enega samca uporabili na primer stimulacijo napeva.

Samice bi lahko testirali še z drugimi razmerji *cis* in *trans* izomer *Z- α* -bisabolen epoksida in test razširili na različne populacije, lahko bi preskusili tudi posamezni izomeri (zanimiva bi bila predvsem čista *trans* izomera, ki jo najdemo v brazilski populaciji) in druge sestavine samčevega feromona (n-nondekan, noralidol...). Uporabili bi lahko različne koncentracije in ovrednotili, katero vedenje (anteniranje, let v bližino vira feromonov, vibracijski odgovor) sproži posamezna koncentracija. Metodo bi lahko nadgradili še z aeracijsko metodo - preprihavanjem in združili rezultate s testi dveh možnosti ("two choice experiments"). Samice bi dražili tudi s smradno tekočino samca in samice. Vemo namreč, da vsebuje smradna tekočina samcev tudi nezanemarljivo količino samčevega feromona.

Rezultate te študije bi lahko uporabili tudi pri načrtovanju poskusov in boljši evalvaciji rezultatov teh poskusov z zeleno smrdljivko. Pri načrtovanju poskusov bi lahko uporabili dva ključna signala (vibracije - stimulacijo s FCS za samce in kemične signale (samčeve feromone) za samice) za preverjanje spolne zrelosti dan pred začetkom poskusov, da bi v poskus vedno vključili le spolno zrele osebe in ne dobili lažno negativnih rezultatov zaradi nedoraslosti poskusnih živali. Hitrost razvoja je namreč odvisna od laboratorijskih pogojev, predvsem temperature, zato je lahko določanje spolne zrelosti težavno. Vplivu dneva bi se lahko precej izognili s kontrolo pripravljenosti živali na izmenjavo vibracijskih signalov: po končanem poskusu bi naredili še poskus s preverjenim ključnim signalom (ie pozivni napev samic za samce oz. samčevi feromoni za samice) in s tem izključili vse

lažno negativne teste. Samčeve feromone je najlažje dobiti od živega samca, ki ga približamo testirani samici, za tako kontrolo ne bi potrebovali sintetičnih feromonov, saj niti niso tako zanesljivi kot naravni.

Uporabni rezultat teh raziskav bi lahko bila tudi past, ki bi združevala vibracijske in kemične signale, saj bi bila verjetno bolj učinkovita od feromonskih, ker samice dostikrat pridejo v bližino vira feromonov, potem pa čakajo, da se jim približa samec (Ota in Čokl, 1991). Če pa on poje, je večja verjetnost, da mu pride ona nasproti.

6 SKLEPI

V pričujoči raziskavi smo odgovorili na več odprtih vprašanj, ki so pomembna za razumevanje vedenja zelenih smrdljivk. Zaključimo lahko, da testirani kemični in vibracijski signali igrajo ključno vlogo med pozivanjem in dvorjenjem. Spontano pojeta obe spola, vendar pa je spontano petje bolj pogosto pri samcih kot pri samicah. Rezultati vedenjskih poskusov s pari v polnaravnem okolju (na rastlini) so pokazali, da večkrat začne z vibracijsko komunikacijo samec.

Oddajanje pozivnega napeva pri samicah sprožijo kemični signali, oddajanje napeva dvorjenja pa taktilni signali. Oddajanje pozivnega in napeva dvorjenja pri samcih sprožita vidni in vibracijski (samičin pozivni napev) signal. Pri samcih se v vseh poskusih pojavljata oba napeva in ni bistvenih razlik v pogostosti oz. razmerju pojavljanja pozivnega in napeva dvorjenja glede na različne modalitete signala, se pa kažejo razlike v času in okoliščinah (tema). Pogosteje se pojavlja napev dvorjenja, vendar je v poskusu s pari razlika med pojavljanjem pozivnega in napeva dvorjenja majhna in neznačilna, v združenih poskusih s posameznim samcem pa večja in značilna.

Potrdila sem hipotezo, da sprožijo vibracijsko komunikacijo pri samicah zelene smrdljivke kemični signali, pri samcih pa vibracijski in vidni signali. Potrdila sem hipotezo, da oba spola pojeta spontano in da obstajajo razlike v pogostosti spontanega petja med spoloma. Ovrгла sem hipotezo, da obstaja značilna razlika med pogostostjo oddajanja vibracijskih napevov na svetlobi in v temi.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Zelena smrdljivka (*Nezara viridula* (L.)) iz družine Pentatomidae, podred Heteroptera je globalno razširjena žuželka z izrazito pestro prehrano, ki vključuje tako eno kot dvokaličnice. Je škodljivec na veliko pomembnih kulturnih rastlinah, kot so na primer soja, koruza, bombaž, tobak, paradižnik, bučke, itd. Nima veliko naravnih sovražnikov in jo zatirajo večinoma z insekticidi. Zaradi ekonomske pomembnosti je njena biologija dobro raziskana: opisan je njen življenjski cikel, prehranske navade, tudi sezonsko menjavanje gostiteljev v Južni Ameriki, izolirali in sintetizirali so samčeve feromone in ugotovili razlike v razmerju med izomerama pri geografsko ločenih populacijah. Dobro raziskano je njeno paritveno vedenje, v sklopu katerega so registrirali in analizirali vibracijske napeve obeh spolov pri različnih geografsko ločenih populacijah in jih primerjali. Neodgovorjeno pa je ostalo vprašanje, kateri signal sproži vibracijsko komunikacijo in kako se različne modalitete signalov povezujejo v kompleksnem paritvenem vedenju. Tudi spontano petje ostaja neznanka.

Namen te raziskave je bil ugotoviti, kaj sproži oddajanje komunikacijskih vibracijskih signalov tako pri samcih kot samicah in ovrednotiti pogostost spontanega petja pri samcih in samicah.

V ta namen smo zasnovali tri različne poskuse: prvi je bil poskus s pari, kjer smo ugotavljali, kdaj in kdo oz. kateri spol (samec ali samica) začne z vibracijsko komunikacijo, kadar sta oba na rastlini. V drugem poskusu smo dali na rastlino samo samca ali samico in ugotavljali pogostost spontanega petja. V tretjem poskusu pa smo dražili posamezen osebek s signali različnih modalitet: z vibracijskim, vidnim in kemičnim signalom (naravnim in sintetičnim).

Vse poskuse smo izvajali na čistih, za vsak poskus in za vsako žival svežih rastlinah, da bi preprečili prenos kemičnih snovi iz enega v drug poskus. Tudi pred poskusom rastline niso imele stika s smrdljivkami. Pri vseh poskusih smo dovolili poskusnemu osebku, da je zlezal na paličico/čopič in ga položili na steblo/list fižolove sadike (*Phaseolus vulgaris* L.), na kateri smo registrirali vibracije z laserskim vibrometrom. Pri poskusu s pari smo osebka dali na rastlino enega za drugim in njuno vedenje še posneli s kamero. V poskusih z vidnim signalom smo testirani osebki dražili z mrtvo ali živo stenico (samcem ali samico) na palčki. Ostale poskuse s posameznimi signali smo izvajali na svetlobi in tudi v temi (pri rdeči luči), da izključimo vidni signal. Stimulacijski program za samice je bil sestavljen iz samčevih napevov dvorjenja, za samce pa iz samičnih pozivnih napevov, saj se ta dva običajno pojavljata v duetu. Rastline smo tresli s pomočjo vibracijskega spodbujevalnika. Kemične signale smo preizkušali s pomočjo kletke, v kateri je bil samec (in za kontrolo samica) ali s filter papirjem, na katerem so bile ujete vonjave: naravni ali sintetični feromon. Le-tega smo raztopili v določeni koncentraciji v topilu n-heksanu. Testirali smo različna razmerja med *cis* in *trans* izomerama samčevega feromona.

V poskusu s pari smo ugotovili, da v naših poskusnih pogojih samec pogosteje začne z vibracijsko komunikacijo kot samica, razlika je bila statistično značilna v poskusu z večjim številom testiranih parov. Na rastlini, kjer so stenice običajno v skupinah in je v zraku

veliko samčevih feromonov in je tudi na sami rastlini prisotnih veliko kontaktnih snovi, živalskega in rastlinskega izvora, pa je lahko slika drugačna. Starejši samci kot začetni napev nekoliko pogosteje pojejo pozivni napev, sploh starejšim samicam, ki običajno ne začnejo z vibracijsko komunikacijo. Povezava med starostjo samca in samice ni statistično značilno povezana z napevom, ki ga oddajata. Prvi napev začnejo zelene smrdljivke oddajati v naših eksperimentalnih pogojih običajno v prvih petih minutah.

Tudi spontano so v naših poskusnih pogojih peli samci vsaj dvakrat pogosteje kot samice, pri čemer je bila razlika še večja in statistično značilna pri daljšem poskusu z večjim številom osebkom (tu so samci spontano peli skoraj štirikrat pogosteje od samic). Primerjava med spontanem petjem na svetlobi in v temi pokaže, da majhna razlika med poskusoma ni statistično različna: samci in samice so v vseh poskusih, ne samo v kontrolah, peli manj v temi, vendar razlika ni nikjer statistično značilno različna. Poskusi s posameznim osebkom brez dodanih zunanjih signalov, iz katerih smo ovrednotili nivo spontanega petja za samce in samice, so služili tudi kot kontrola za poskuse s posameznim signalom (skupaj z ostalimi kontrolami).

V poskusih s signali različnih modalitet smo ugotovili, da samce in samice sprožijo signali različnih modalitet: samci odgovarjajo na vibracijski signal (samičino pozivno pesem) in na vidni signal (živa samica na palčki), samice pa na kemične signale (samčeve feromone). Samci so se bolj odzivali tudi na mrtvi model, vendar razlika ni bila statistično različna od kontrole, enako velja za samčev feromon. Samice se na vidni in vibracijski signal niso odzivale oz. so se v območju kontrole, zelo značilno različen odgovor pa je bil na kemične signale. Največji odziv je bil po pričakovanju na naravni samčev feromon živega samca. Ker med poskusom na svetlobi in v temi ni bilo statistično značilne razlike, sklepamo, da je res kemična snov tista, ki sproži samičin odziv. Opazen je trend upadanja od najbolj naravnega signala (samec v kletki) do najbolj umetnega (sintetični feromoni): samice se najbolj odzivajo na naravni signal in najmanj na sintetičnega, tudi na slednjega pa značilno višje od kontrole.

Samice veliko pogosteje pojejo pozivni napev kot napev dvorjenja. Ta se pojavi le ob draženju s samčevimi feromoni. Prav tako se je pulzirani samičin pozivni napev FCS2 pojavil le v poskusih s kemičnimi signali (in enkrat v kontroli s praznim filter papirjem). Samice, ki so pele spontano v kontrolah, so oddale le nekaj signalov pozivnega napeva (FCS). Samice vzdražene s kemičnim signalom pa so pele v ritmičnem zaporedju signalov, značilnem za opisani pozivni napev z enakomerno dolgimi intervali in so pele dalj časa. Samci uporabljajo oba napeva, vendar napev dvorjenja pogosteje. Kaže se tudi razlika med poskusi na svetlobi in v temi - pozivni napev se v temi skoraj ne pojavlja in izgleda povezan z vidnim signalom, napev dvorjenja pa je bil registriran v vseh pogojih. Pri samcih se pojavlja tudi prehod iz pozivnega v napev dvorjenja v sklopu istega signala, ko se pulzi hitro ponavljajoči se pozivnega napeva zlijejo v napev dvorjenja.

Tudi v poskusih s posameznim osebkom je bil čas prvega napeva običajno v prvih petih minutah, kar je koristno pri načrtovanju poskusov v bodoče. Rezultate te raziskave bi lahko uporabili tudi za določanje spolne zrelosti osebkom in za spremljanje dnevne fiziološke pripravljenosti samcev in samic na izmenjavo vibracijskih signalov.

Zaključimo lahko, da oddajanje vibracij pri samicah sprožijo kemični signali (samčevi feromoni) in oddajanje vibracij pri samcih sproži vibracijski signal (samičina pozivna pesem) in vidni signal (najverjetneje je ključno premikanje žive stenice). Spontano petje je pogostejše pri samcih kot pri samicah, samci tudi pogosteje začnejo duet v paru.

7.2 SUMMARY

Green stink bug (*Nezara viridula* (L.)), family Pentatomidae, suborder Heteroptera is a worldwide pest with very diverse nutrition that includes mono in dicots. It affects a lot of economically important cultural plants such as soy, corn, cotton, tobacco, tomatoes, zucchini, etc. It has little natural enemies so it is mostly treated with insecticides. Due to its size and economic importance its biology is well researched: its lifecycle, diet, also seasonal changing of hosts in South America have been described. Man has isolated and synthesized male pheromones and determined the difference between ratios of the two isomers of male pheromone blend in different populations across the world. Courtship behaviour has been extensively researched. Vibrational songs have been registered and analysed and compared in both sexes and in different geographically separated populations. Unanswered remains the question of which modality triggers vibrational communication in males and females and how signals of different modalities connect in the complex nezara's courtship behaviour. The spontaneous singing also remains unanalyzed.

The purpose of this research was to determine why does male and female start to produce vibrational signals - which modalities trigger vibrational communication and to evaluate the rate of spontaneous singing in males and females.

To answer this questions three different test were designed: the first is an experiment with pairs of bugs where it was suggested when and which sex (male or female) starts vibrational communication when both are on a plant. In the second test a single male or female was on a plant to evaluate the rate of spontaneous singing. In the third test a single tested specimen (male or female) was stimulated with signals of different modalities: with vibrational, visual and chemical (natural or synthetic) stimuli.

All experiments were conducted on clean fresh plant seedlings that were changed for every animal to exclude the transmission of chemicals form one experiment to another. Plants (*Phaseolus vulgaris* L.) also had no contact with green stink bugs before the experiment. In all experiments the tested specimen was allowed to climb on a stick/paintbrush and put to the seedling's stalk/leaf of a plant. Vibrations were measured with laser vibrometer. In experiment with pairs male and female were put to the plant one after another and than recorded with camera and laser vibrometer. . In vibrational stimuli experiments two stimulation programs were used: male courtship song for females and female calling song for males as this songs usually consist a duet. Vibrations were transmitted to plants by using vibrational exciter. In visual stimuli experiments a live female or dead male or female on a stick was used. All other experiments were conducted in daylight as well as in the dark (at red light) to exclude visual stimuli. Chemical signals were tested with the use of the cage with a male (or a female in controls) or with a filter paper with male odours or synthetic pheromones dissolved in n-hexane. Different ratios of *cis* and *trans* isomers were tested.

In tests with pairs in our experimental conditions males were starting vibrational communication more often than females - the difference was statistically significant in the test with larger numerous. This might be different in nature where stink bugs are usually found in groups and there is a lot of male pheromones in the air as well as on the plant (contact chemicals and plant's chemicals). Older males in our tests were using male calling song a little more often than courtship song - especially when in combination with older females which usually do not start the vibrational communication (younger females do). But the relationship between age and type of song is not statistically significant - not for males nor for females. The first vibrational song usually occurs in the first 5 minutes.

Spontaneous singing in our experimental conditions was at least twice as common in males than in females - the difference was statistically significant in the test with the larger numerous. Comparison between spontaneous singing in daylight and in the dark shows a little difference that is not statistically different: males and females in all experiments and controls were singing more in daylight than in the dark but the difference was never statistically significant. Experiments with no added external stimulus that were used to evaluate the rate of spontaneous singing were also used as a control for experiments with different stimuli (together with other controls).

In experiments with stimuli of different modalities it was shown that different modalities trigger males and females: males are triggered by vibrational stimulus (female calling song) and visual stimuli (live female on a stick) while females respond to chemical stimuli (male pheromones). Males responded to dead model and male pheromone to a greater extent than in controls but the difference was not significant. Females did not respond to vibrational and visual stimuli (all in the range of control) but their response to chemical stimuli was much higher and statistically significantly different. As expected the largest response was to natural male pheromones from live male. There was no statistically significant difference between this experiment conducted in daylight and in the dark so we conclude that chemical stimuli are the one triggering female behaviour. A trend in diminished response from the most natural stimulus (male in the cage) to the most artificial (synthetic pheromone) is noted: females react the most to the natural stimulus and the least to the synthetic but the response to the latter is still statistically higher than the control.

Females sing female calling song much more often than courtship song. The latter only occurred in tests with male pheromones. Pulsed female calling song (FCS2) also occurred only in experiments with chemical stimuli and once in control with empty filter paper. Females that sang in controls usually emitted just a few pulses of female calling song (FCS) rather than singing in the characteristic rhythm described for FCS. Females triggered by chemical signal were singing in the rhythm characteristic for described female calling song with constant interval and they also sang longer. Males use both songs though courtship song is prevalent. In pairs the difference between the occurrence of male calling song (MCS) and male courtship song (MCrS) is not significant but in combined results with single male on a plant the difference is significant. A trend occurs when each song is used: male calling song is usually used in daylight and seems to be connected to the visual stimulus while male courtship song was registered in daylight and in the dark. A transitional song from male calling to courtship song also occurs: male calling songs get fused into male courtship song within one signal sequence.

In the experiments with a single specimen the time of the first song was usually in the first 5 minutes what could be used in planning future experiments. Results from this experiments could be used in determining sexual maturity of green stink bugs and also to monitor daily physiological state of male and females - are they ready to exchange vibrational stimuli on that particular day or not.

We can conclude that emitting of vibrational signals in females is triggered by chemical signals (male pheromones) and producing vibrational signals in males is triggered by vibrational stimulus (female calling song) and visual stimuli (probably connected with the movement of a live female). Spontaneous singing is more often found in males and they also usually start the duet in our experimental conditions.

VIRI

- Aicher B., Tautz J. 1990. Vibrational communication in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 166, 3: 345–353
- Aldrich J.R. 1988. Chemical ecology of the Heteroptera. *Annual Review of Entomology*, 33, 1: 211–238
- Aldrich J.R. 1995. Chemical communication in the true bugs and parasitoid exploitation. V: *Chemical Ecology of Insects 2*. Card R.T., Bell W. J. (eds.). New York, Springer: 318–363
- Aldrich J.R., Blum M.S., Lloyd H.A., Fales H.M. 1978. Pentatomid natural products. *Journal of Chemical Ecology*, 4, 2: 161–172
- Aldrich J.R., Khrimian A., Zhang A., Shearer P.W. 2006. Bug pheromones (Hemiptera, Heteroptera) and tachinid fly host-finding. *Denisia*, 19: 1051–1031
- Aldrich J.R., Oliver J.E., Lusby W.R., Kochansky J.P., Lockwood J.A. 1987. Pheromone strains of the Cosmopolitan pest, *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of Experimental Zoology*, 244, 1: 171–175
- Aldrich J., Lusby W., Marron B., Nicolaou K., Hoffmann M., Wilson L. 1989. Pheromone blends of green stink bugs and possible parasitoid selection. *Naturwissenschaften*, 76, 4: 173–175
- Aldrich J.R., Numata H., Borges M., Bin F., Waite G.K., Lusby W.R. 1993. Artifacts and pheromone blends from *Nezara* spp. and other stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Zeitschrift für Naturforschung, Section C, Biosciences*, 48, 1-2: 73–79
- Aldrich J.R., Leal W.S., Nishida R., Khrimian A.P., Lee C.J., Sakuratani Y. 1997. Semiochemistry of aposematic seed bugs. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 84, 2: 127–135
- Amon T. 1990. Electrical brain stimulation elicits singing in the bug *Nezara viridula*. *Naturwissenschaften*, 77, 6: 291–292
- Baker R., Borges M., Cooke N.G., Herbert R.H. 1987. Identification and synthesis of (Z)-(1S,3R,4S)(-)-2-(3,4-epoxy-4-methylcyclohexyl)-6-methylhepta-2,5-diene, the sex pheromone of the southern green stinkbug, *Nezara viridula* (L.). *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 6: 414–416
- Baptistella L.H.B., Aleixo A.M. 1994. Stereocontrolled synthesis of the sex pheromone of *Nezara viridula* (L.). *Liebigs Annalen der Chemie*, 8: 785–789

- Barth F.G. 1986. Vibrationssinn und vibratorische Umwelt von Spinnen. *Naturwissenschaften*, 73, 9: 519–530
- Blassioli-Moraes M.C.B., Laumann R.A., Čokl A., Borges M. 2005. Vibratory signals of four Neotropical stink bug species. *Physiological Entomology*, 30, 2: 175–188
- Borges M. 1995. Attractant compounds of the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, 24, 2: 215–225
- Borges M., Aldrich J. 1992. Instar-specific defensive secretions of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 48, 9: 893–896
- Borges M., Jepson P., Howse P. 1987. Long-range mate location and close-range courtship behaviour of the green stink bug, *Nezara viridula* and its mediation by sex pheromones. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 44, 3: 205–212
- Borges M., Schmidt F.G.V., Sujii E.R., Medeiros M.A., Mori K., Zarbin P.H.G., Ferreira J.T.B. 1998. Field responses of stink bugs to the natural and synthetic pheromone of the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Physiological Entomology*, 23, 3: 202–207
- Borges M., Moraes M.C.B., Laumann R.A., Pareja M., Silva C.C., Michereff M.F.F., Paula D.P. 2011. Chemical Ecology Studies in Soybean Crop in Brazil and Their Application to Pest Management. V: Soybean-Biochemistry, Chemistry and Physiology. Ng T.B. (ed.). Rijeka, InTech Publishing: 31-66
- Bradbury J.W., Vehrencamp S.L. 1998. Principles of animal communication. Sunderland, Sinauer Associates: 882 str.
- Brennan B.M., Chang F., Mitchell W.C. 1977. Physiological Effects on Sex Pheromone Communication in the Southern Green Stink Bug, *Nezara viridula*. *Environmental Entomology*, 6, 1: 169–173
- Brézot P., Malose C., Renou M. 1993. Etude de L'attractivite; de La Pheromone Des Males Chez *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera : Pentatomidae). *Paris Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Series 3, Sciences de la Vie*, 316, 7: 671–675
- Brézot P., Tauban D., Renou M. 1996. Sense organs on the antennal flagellum of the green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae): Sensillum types and numerical growth during the post-embryonic development. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 25, 4: 427–444
- Brézot P., Malosse C., Mori K., Renou M. 1994. Bisabolene epoxides in sex pheromone *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae): Role of *cis* isomer and relation to specificity of pheromone. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 12: 3133–3147
- Broughton W.B. 1963. Method in bio-acoustic terminology V: Acoustic behaviour of animals. Busnel R.G. (ed.). Amsterdam, Elsevier: 3–24

- Brownell P., Farley R.D. 1979. Prey-localizing behaviour of the nocturnal desert scorpion, *Paruroctonus mesaensis*: Orientation to substrate vibrations. *Animal Behaviour*, 27: 185–193
- Casas J., Bacher S., Tautz J., Meyhöfer R., Pierre D. 1998. Leaf vibrations and air movements in a leafminer–parasitoid system. *Biological control*, 11, 2: 147–153
- Cocroft R.B. 2001. Vibrational communication and the ecology of group-living, herbivorous insects. *American Zoologist*, 41, 5: 1215–1221
- Cocroft R.B., Rodrigez R.L. 2005. The Behavioral Ecology of Insect Vibrational Communication. *BioScience*, 55, 4: 323–334
- Colazza S. 2004. Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. *Journal of Experimental Biology*, 207, 1: 47–53
- Colazza S., Salerno G., Wajnberg E. 1999. Volatile and Contact Chemicals Released by *Nezara viridula* (Heteroptera:Pentatomidae) Have a Kairomonal Effect on the Egg Parasitoid *Trissolcus basalus* (Hymenoptera: Scelionidae). *Biological Control*, 16, 3: 310–317
- Čokl A. 1983. Functional properties of vibroreceptors in the legs of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera, Pentatomidae). *Journal of Comparative Physiology*, 150, 2: 261–269
- Čokl A. 2006. Stink bug communication through plants during mating. *Razprave IV. razreda, SAZU*, 200: 7–35
- Čokl A. 2008. Stink bug interaction with host plants during communication. *Journal of Insect Physiology*, 54, 7: 1113–1124
- Čokl A., Bogataj E. 1982. Factors affecting vibrational communication in *Nezara viridula* L. (Heteroptera, Pentatomidae), *Biološki vestnik*, 30, 1: 1–20
- Čokl A., Virant-Doberlet M. 2003. Communication With Substrate-Borne Signals In Small Plant-Dwelling Insects. *Annual Review of Entomology*, 48, 1: 29–50
- Čokl A., Virant-Doberlet M., McDowell A. 1999. Vibrational directionality in the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.), is mediated by female song. *Animal Behaviour*, 58, 6: 1277–1283
- Čokl A., Virant-Doberlet M., Stritih N. 2000a. Temporal and spectral properties of the songs of the southern green stink bug *Nezara viridula* (L.) from Slovenia. *Pflügers Archiv*, 439, 1: 168–170
- Čokl A., Virant-Doberlet M., Stritih N. 2000b. The structure and function of songs emitted by southern green stink bugs from Brazil, Florida, Italy and Slovenia. *Physiological Entomology*, 25, 2: 196–205

- Čokl A., Zorović M., Millar J.G. 2007. Vibrational communication along plants by the stink bugs *Nezara viridula* and *Murgantia histrionica*. *Behavioural Processes*, 75, 1: 40–54
- Čokl A., Žunič A., Virant-Doberlet M. 2011. Predatory bug *Picromerus bidens* communicates at different frequency levels. *Central European Journal of Biology*, 6, 3: 431–439
- Čokl A., Zorović M., Žunič A., Virant-Doberlet M. 2005. Tuning of host plants with vibratory songs of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of Experimental Biology*, 208, 8: 1481–1488
- Čokl A., Prešern J., Virant-Doberlet M., Bagwell G.J., Millar J.G. 2004. Vibratory signals of the harlequin bug and their transmission through plants. *Physiological Entomology*, 29, 4: 372–380
- Devetak D., Gogala M., Čokl A. 1978. Prispevek k fiziologiji vibroreceptorjev stenic iz družine Cydnidae (Heteroptera). *Biološki vestnik*, 26, 2: 131–139
- Ewing A.W. 1989. *Arthropod Bioacoustics: Neurobiology and Behaviour*. Edinburgh, Edinburgh University Press: 260 str.
- Field L.H., Matheson T. 1998. Chordotonal organs of insects. *Advances in Insect Physiology*, 27: 1–56
- French A.S. 1988. Transduction mechanisms of mechanosensilla. *Annual Review of Entomology*, 33, 1: 39–58
- Gogala M. 2006. Vibratory Signals Produced by Heteroptera-Pentatomorpha and Cimicomorpha. V: *Insect sounds and communication: physiology, behaviour, ecology and evolution*. Claridge M.F., Drosopolous S. (eds.) Boca Raton: 275–296
- Gogala A., Gogala M. 1989. Stenice Slovenije II. (Insecta: Heteroptera). *Biološki vestnik*, 37, 1: 11–44
- Greenfield D., Lonsdale D. 2002. Mortality and growth of juvenile hard clams *Mercenaria mercenaria* during brown tide. *Marine Biology*, 141, 6: 1045–1050
- Harris V.E., Todd J.W. 1980. Male-mediated aggregation of male, female and 5th-instar southern green stink bugs and concomitant attraction of a tachinid parasite, *Trichopoda pennipes*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 27, 2: 117–126
- Harris V.E., Todd J.W., Mullinix B.G. 1984. Color change as an indicator of adult diapause in the southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Journal of Agricultural Entomology*, 1: 82–91

- Henry C.S. 1980. The importance of low-frequency, substrate-borne sounds in lacewing communication (Neuroptera: Chrysopidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 73, 6: 617–621
- Hill P.S. 2008. *Vibrational Communication in Animals*. Harvard, Harvard University Press: 261 str.
- Hokkanen H. 1986. Polymorphism, parasites, and the native area of *Nezara viridula* (Hemiptera, Pentatomidae). *Annales Entomologici Fennici*, 52: 28–31
- Jeram S., Čokl A. 1996. Mechanoreceptors in insects: Johnston's organ in *Nezara viridula* (L.)(Pentatomidae, Heteroptera). *Pflügers Archiv*, 431, 6: 281–282
- Jeram S., Pabst M.A. 1996. Johnston's organ and central organ in *Nezara viridula* (L.)(Heteroptera, Pentatomidae). *Tissue and Cell*, 28, 2: 227–235
- Johansson B.G., Jones T.M. 2007. The role of chemical communication in mate choice. *Biological Reviews*, 82, 2: 265–289
- Jones W.A. 1988. World review of the parasitoids of the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 81, 2: 262–273
- Karlson P., Lüscher M. 1959. Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183, 4653: 55–56
- Kavar T., Pavlovčič P., Sušnik S., Meglič V., Virant-Doberlet M. 2006. Genetic differentiation of geographically separated populations of the southern green stink bug *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Bulletin of Entomological Research*, 96, 2: 117–128
- Kavčič A., Čokl A., Laumann R.A., Blassioli-Moraes M.C., Borges M. 2013. Tremulatory and Abdomen Vibration Signals Enable Communication through Air in the Stink Bug *Euschistus heros*. *PLoS ONE*, 8, 2: e56503
- Kirchner W.H., Lindauer M., Michelsen A. 1988. Honeybee dance communication. *Naturwissenschaften*, 75, 12: 629–630
- Kirchner W.H., Broecker I., Tautz J. 1994. Vibrational alarm communication in the damp-wood termite *Zootermopsis nevadensis*. *Physiological entomology*, 19, 3: 187–190
- Kiritani K. 2006. Predicting impacts of global warming on population dynamics and distribution of arthropods in Japan. *Population Ecology*, 48, 1: 5–12
- Kiritani K. 2011. Impacts of global warming on *Nezara viridula* and its native congeneric species. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14, 2: 221–226

- Knight K.M.M., Gurr G.M. 2007. Review of *Nezara viridula* (L.) management strategies and potential for IPM in field crops with emphasis on Australia. *Crop Protection*, 26, 1: 1–10
- Kon M., Oe A., Numata H., Hidaka T. 1988. Comparison of the mating behaviour between two sympatric species, *Nezara antennata* and *N. viridula* (Heteroptera: Pentatomidae), with special reference to sound emission. *Journal of Ethology*, 6, 2: 91–98
- Kotiaho J.S. 2001. Costs of sexual traits: a mismatch between theoretical considerations and empirical evidence. *Biological Reviews*, 76, 3: 365–376
- Kuštor V. 1989. Aktivnost mišic pri vibracijskem organu stenice *Nezara viridula* (L.). Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 68 str.
- Latimer W., Schatral A. 1983. The acoustic behaviour of the bushcricket *Tettigonia cantans* I. Behavioural responses to sound and vibration. *Behavioural Processes*, 8, 2: 113–124
- Laumann R.A., Moraes M.C.B., Čokl A., Borges M. 2007. Eavesdropping on sexual vibratory signals of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) by the egg parasitoid *Telenomus podisi*. *Animal Behaviour*, 73, 4: 637–649
- Laumann R.A., Čokl A., Lopes A.P., Ferreira J.B., Moraes M.C., Borges M. 2011. Silent singers are not safe: selective response of a parasitoid to substrate-borne vibratory signals of stink bugs. *Animal Behaviour*, 82, 5: 1175–1183
- Lockwood J.A., Story R.N. 1987. Defensive secretion of the southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) as an alarm pheromone. *Annals of the Entomological Society of America*, 80, 5: 686–691
- Magal C., Schöller M., Tautz J., Casas J. 2000. The role of leaf structure in vibration propagation. *Journal of the Acoustical Society of America* 108, 5: 2412–2418
- Markl H. 1983. *Vibrational Communication. V: Neuroethology and Behavioral Physiology*. Huber F., Markl H. (eds.). Berlin, Springer Berlin Heidelberg: 332–353
- Marten K., Marler P. 1977. Sound transmission and its significance for animal vocalization. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2, 3: 271–290
- McBrien H.L., Millar J.G. 1999. *Phytophagous bugs. V: Pheromones of non-lepidopteran insects associated with agricultural plants*. Hardie J., Minks A.K. (eds.). Wallingford, CABI Publishing: 277–304
- McBrien H.L., Millar J.G. 2003. Substrate-borne vibrational signals of the Conspere stink bug (Hemiptera: Pentatomidae). *The Canadian Entomologist*, 135, 4: 555–567

- McLain D.K. 1980. Female choice and the adaptive significance of prolonged copulation in *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Psyche*, 87, 3-4: 325–336
- Michel K., Amon T., Čokl A. 1983. The morphology of the leg scolopidial organs in *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera, Pentatomidae). *Revue canadienne de biologie expérimentale*, 42, 2: 139–150
- Michelsen A., Larsen O. 1983. Strategies for Acoustic Communication in Complex Environments. V: *Neuroethology and Behavioral Physiology*. Huber F., Markl H. (eds.). Berlin, Springer Berlin Heidelberg: 321–331
- Michelsen A., Fink F., Gogala M., Traue D. 1982. Plants as transmission channels for insect vibrational songs. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 11, 4: 269–281
- Michieli Š., Žener B. 1968. Der Sauerstoffverbrauch verschiedener Farbstadien bei der Wanze *Nezara viridula* (L.). *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 58, 2: 223–224
- Miklas N., Lasnier T., Renou M. 2003a. Male Bugs Modulate Pheromone Emission in Response to Vibratory Signals from Conspecifics. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 3: 561–574
- Miklas N., Čokl A., Renou M., Virant-Doberlet M. 2003b. Variability of vibratory signals and mate choice selectivity in the southern green stink bug. *Behavioural Processes*, 61, 3: 131–142
- Miklas N., Renou M., Malosse I., Malosse C. 2000. Repeatability of pheromone blend composition in individual males of the southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 11: 2473–2485
- Miklas N., Stritih N., Čokl A., Virant-Doberlet M., Renou M. 2001. The Influence of Substrate on Male Responsiveness to the Female Calling Song in *Nezara viridula*. *Journal of Insect Behavior*, 14, 3: 313–332
- Millar J. 2005. Pheromones of True Bugs. V: *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II Topics in Current Chemistry*. Schulz S. (ed.). Berlin, Springer Berlin Heidelberg: 37–84
- Molina G.A.R., Trumper E.V. 2012. Selection of Soybean Pods by the Stink Bugs, *Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii*, *Journal of Insect Science*, 12, 104: 1–16
- Ota D., Čokl A. 1991. Mate location in the southern green stink bug, *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae), mediated through substrate-borne signals on ivy. *Journal of Insect Behavior*, 4, 4: 441–447
- Panizzi A.R. 1997. Wild hosts of pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops. *Annual Review of Entomology*, 42, 1: 99–122

- Panizzi A.R., Hirose E. 1995. Seasonal body weight, lipid content, and impact of starvation and water stress on adult survivorship and longevity of *Nezara viridula* and *Euschistus heros*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 76, 3: 247–253
- Panizzi A.R., Berhow M., Bartelt R.J. 2004. Artificial substrate bioassay for testing oviposition of southern green stink bug conditioned by soybean plant chemical extracts. *Environmental Entomology*, 33, 5: 1217–1222
- Pavlovčič P., Čokl A. 2001. Songs of *Holcostethus strictus* (Fabricius): a different repertoire among landbugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Behavioural Processes*, 53, 1–2: 65–73
- Polajnar J. 2013. Vpliv izbranih dejavnikov okolja na vibracijsko komunikacijo stenice zelene smrdljivke (*Nezara viridula* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 87 str.
- Polajnar J., Svenšek D., Čokl A. 2012. Resonance in herbaceous plant stems as a factor in vibrational communication of pentatomid bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of The Royal Society Interface*, 9, 73: 1898–1907
- Raina A.K., Klun J.A. 1984. Brain factor control of sex pheromone production in the female corn earworm moth. *Science*, 225, 4661: 531–533
- Rani P.U., Madhavendra S.S. 1995. Morphology and distribution of antennal sense organs and diversity of mouthpart structures in *Odontopus nigricornis* (Stall) and *Nezara viridula* (Hemiptera). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 24, 2: 119–132
- Ray J. 1710. *Historia Insectorum*. London, Churchill: 424 str.
- Reddy G.V., Guerrero A. 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends in Plant Science*, 9, 5: 253–261
- Riede K. 1997. Bioacoustic diversity and resource partitioning in tropical calling communities. V: *Tropical biodiversity and systematics. Proceedings of the International Symposium on Biodiversity and Systematics in Tropical Ecosystems*, Bonn, 1994. Urlich H. (ed.). Bonn: Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig: 275–280
- Robinson G.E. 1996. Chemical communication in honeybees. *Science*, 271, 5257: 1824–1825
- Roces F., Hölldobler B. 1995. Vibrational communication between hitchhikers and foragers in leaf-cutting ants (*Atta cephalotes*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 37, 5: 297–302
- Rosengaus R.B., Jordan C., Lefebvre M.L., Traniello J.F.A. 1999. Pathogen alarm behavior in a termite: a new form of communication in social insects. *Naturwissenschaften*, 86, 11: 544–548

- Ryan M.A., Moore C.J., Walter G.H. 1995. Individual variation in pheromone composition in *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae): how valid is the basis for designating "pheromone strains"? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 111, 2: 189–193
- Salini S. 2011. Polymorphism in southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). *Current Biotica*, 4, 4: 482–485
- Schaefer C.W., Panizzi A.R. 2000. Economic importance of Heteroptera: a general view. V: *Heteroptera of Economic Importance*. Schaefer C.W., Panizzi A.R. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 3–10
- Siljander E., Gries R., Khaskin G., Gries G. 2008. Identification of the Airborne Aggregation Pheromone of the Common Bed Bug, *Cimex lectularius*. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 6: 708–718
- Slessor K., Winston M., Conte Y. 2005. Pheromone Communication in the Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 31, 11: 2731–2745
- Stewart K.W., Abbott J.C., Kirchner R.F., Moulton S.R. 1995. New descriptions of North American Euholognathan stonefly drumming (Plecoptera) and first Nemouridae ancestral call discovered in *Soyedina carolinensis* (Plecoptera: Nemouridae). *Annals of the Entomological Society of America*, 88, 2: 234–239
- Stritih N. 2009. Anatomy and physiology of a set of low-frequency vibratory interneurons in a nonhearing ensiferan (*Troglophilus neglectus*, Rhabdiphoridae). *Journal of Comparative Neurology*, 516, 6: 519–532
- Stumpner A., von Helversen D. 2001. Evolution and function of auditory systems in insects. *Naturwissenschaften*, 88, 4: 159–170
- Theiß J. 1982. Generation and radiation of sound by stridulating water insects as exemplified by the corixids. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 10, 3: 225–235
- Tillman P.G., Aldrich J.R., Khrimian A., Cottrell T.E. 2010. Pheromone attraction and cross-attraction of *Nezara*, *Acrosternum*, and *Euschistus* spp. stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) in the field. *Environmental entomology*, 39, 2: 610–617
- Todd J.W. 1989. Ecology and Behavior of *Nezara Viridula*. *Annual Review of Entomology*, 34, 1: 273–292
- Todd J.W., Herzog D.C. 1980. Sampling phytophagous Pentatomidae on soybean. V: *Sampling methods in soybean entomology*. Kogan M., Herzog D.C. (eds.). New York, Springer-Verlag: 438–478
- Tomioka H., Mori K. 1992. Simple synthesis of a diastereomeric mixture of 2-(3', 4'-epoxy-4'-methylcyclohexyl)-6-methyl-2, 5-heptadiene, the pheromone of the green stink bug. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56, 6: 1001

- Tumlinson J.H., Heath R.R., Teal P.E.A. 1982. Analysis of chemical communication systems of Lepidoptera. V: ACS Symposium, Insect Pheromone Technology: Chemistry and Applications. Washington DC, 1982. Leonhardt B.A., Beroza M. (eds.). Journal of the American Chemical Society: 1–25
- Virant-Doberlet M., Čokl A. 2004. Vibrational communication in insects. Neotropical Entomology, 33, 2: 121–134
- Virant-Doberlet M., King R.A., Polajnar J., Symondsen W.O.C. 2011. Molecular diagnostics reveal spiders that exploit prey vibrational signals used in sexual communication. Molecular Ecology, 20, 10: 2204–2216
- Zarbin P.H., Villar J., Corrêa A.G. 2007. Insect pheromone synthesis in Brazil: an overview. Journal-Brazilian Chemical Society, 18, 6: 1100-1124
- Zgonik V., Čokl A. 2014. The role of signals of different modalities in initiating vibratory communication in *Nezara viridula*. Central European Journal of Biology, 9, 2: 200–211
- Zorović M., Prešern J., Čokl A. 2008. Morphology and physiology of vibratory interneurons in the thoracic ganglia of the southern green stinkbug *Nezara viridula* (L.). The Journal of Comparative Neurology, 508, 2: 365–381
- Žunič A., Čokl A., Doberlet M.V., Millar J.G. 2008. Communication with signals produced by abdominal vibration, tremulation, and percussion in *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). Annals of the Entomological Society of America, 101, 6: 1169–1178
- Žunič A., Virant-Doberlet M., Čokl A. 2011. Species Recognition During Substrate-Borne Communication in *Nezara viridula* (L.) (Pentatomidae: Heteroptera). Journal of Insect Behavior, 24, 6: 468–487

ZAHVALA

Najprej hvala mentorju, prof. dr. Andreju Čoklu za vso potrpežljivost in hitrost pri popravljanju moje disertacije in za vso svobodo, ki mi jo je nudil pri snovanju in izvedbi poskusov, delu, kjer sem najbolj uživala. Hvala, da ste me izbrali za mlado raziskovalko, bilo je zanimivo delo.

Hvala članoma komisije: prof. dr. Dušanu Devetaku in doc. dr. Petru Stušku za vse razumevanje in ekspresni pregled in popravke moje naloge ter hitro oceno doktorata. Res hvala za vso podporo v času, ko se je mudilo z dokončanjem tega dela. Hvala tudi Vesni Ješe Janžeič iz referata za podiplomske študente, da mi je pomgala pri prehodu na bolonjski program in razlagi vseh birokratskih postopkov za dokončanje tega dela.

Najlepša hvala prof. dr. Andreju Blejcu za pomoč ne samo pri statistiki, ampak tudi za vse strokovne debate. Kadar nisem vedela, kako naprej, je vse steklo po tem, ko sva predebatirala številke in možnosti. Hvala za realni pogled in za to, da ste si vedno vzeli čas!

Hvala sodelavkam in sodelavcem v skupini za Entomologijo za vso prijaznost in podporo: od reševanja tehničnih težav (hvala, Jernej, za ugotavljanje, kateri kabel ne dela;) in hvala Petri za razumevanje, kadar so se poskusi zavlekli) do psihične podpore (hvala, Maja D. in Alenka, za poslušanje mojega jamranja) in seveda za vse strokovne debate (hvala Nataša, Maja Z. in vsi ostali: Andreja, Anka, Danilo, Janez, Maarten, Meta, Petra in Špela).

Zahvaljujem se tudi Nacionalnemu Inštitutu za Biologijo, da sem lahko tukaj delala in Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za financiranje projekta. Hvala prof. dr. Jocelyn G. Millarju za sintetični feromon.

Hvala staršema, da sta imela rada naravo in mi pustila vedno proste roke pri izbiri in načinu učenja in kasneje študija. Hvala očetu za tiste besede: "Mlada si, tudi če se narobe odločiš - pravico imaš naredit napako!" So mi še večkrat kasneje pomagale, da sem se bolj sproščeno odločala. Hvala varuški in varuhu, da sta me vlačila vsak dan na Grad in mi predstavila naravo, da sem jo vzljubila že kot otrok. Hvala prijateljem, da so me spodbujali na moji poti in verjeli vame. Hvala Bajagi, Rolling Stonesom, Beethoven-u, Chopinu in mnogim drugim za to, da so me držali pokonci: budno in skoncentrirano, ko je bilo to najbolj oz. nujno potrebno.

Žeki, hvala! Čeprav je 3/2 tebe zadevo nekoliko otežilo in precej zavleklo, pa je 1/1 tebe to več kot samo kompenzirala. Hvala za vse vroče čokolade, termoforje, svakojake pijače s tavrinom (hvala tudi izumiteljema tavrina:), pocket coffeeje, za vsakič, ko si jih peljal v vrtec in prišel ponje in delal minus, ki si ga pokrival druge dni z nenormalnim delavnikom, hvala za vse bolniške, ko nobenemu ni bilo enostavno ostati doma, kosila in držanje malih kolikor se je dalo proč, ko sem pisala in seveda za vse debate, za pomoč pri pisanju virov:), občasno iskanje tiskarskih škratov, predvsem pa za vso spodbudo in da si mi stal ob strani tudi kadar sem bila najbolj nemogoča in najbolj na dnu. Hvala za vse in ti vrnem čez kako leto ali dve;).