

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Aleš LIPIČNIK

**VPLIV TEMPERATURNE AKLIMATIZACIJE NA
MIROVNO AKTIVNOST TRIHOBOTRIJEV PRI
STENICI VRSTE *Pyrrhocoris apterus***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Aleš LIPICNIK

**VPLIV TEMPERATURNE AKLIMATIZACIJE NA MIROVNO
AKTIVNOST TRIHOBOTRIJEV PRI STENICI VRSTE**

Pyrrhocoris apterus

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ACCLIMATIZATION ON
THE RESTING ACTIVITY OF TRICHOBOTHRIA IN THE BUG**

Pyrrhocoris apterus

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno na Katedri za fiziologijo živali. Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Senat Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenoval prof. dr. Kazimirja Drašlarja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Gregor Zupančič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzent: doc. dr. Peter Stušek
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentor: prof. dr. Kazimir Drašlar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Datum zagovora: 28.8.2009 ob 12.00 uri.

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Aleš Lipičnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK 591.18:595.75(043.2)=163.6
- KG trihobotrij/mirovna aktivnost/trend/diapavza/adaptacija
- AV LIPIČNIK, Aleš
- SA DRAŠLAR, Kazimir
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2009
- IN VPLIV TEMPERATURNE AKLIMATIZACIJE NA MIROVNO AKTIVNOST
TRIHOBOTRIJEV PRI STENICI VRSTE *Pyrrhocoris apterus*
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP IX, 49 str., 5 pregl., 22 sl., 45vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Stenice vrste *Pyrrhocoris apterus* prezimijo v stadiju imaga. V raziskavi smo ugotavljali vpliv temperature na mirovno aktivnost trihobotrijev tipa T_1 , T_2 in T_3 , na 5. abdominalnem segmentu pri osebkih iste generacije. Trihobotrija tipov T_1 in T_2 sta bila redno spontano aktivna pri vseh preparatih, medtem ko je bila spontana aktivnost trihobotrija T_3 prisotna le pri nekaterih osebkih. Spremljali smo temperaturo odvisnost mirovne aktivnosti v območju med 5 °C in 35 °C. Pri T_1 je skozi celo leto temperaturna odvisnost pozitivna v celotnem temperaturnem območju. Pri T_2 je odvisnost pozitivna v poletnih mesecih, v hladnih pa frekvenca spontane mirovne aktivnosti doseže vrh pri temperaturi med 20 °C in 25 °C in nato z višanjem temperature upade. Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti tipa T_3 je preko celega leta podobna kot pri trihobotrijih tipa T_2 v hladnih mesecih. Pri hladno adaptiranih osebkih se temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev peti dan po prenosu v laboratorij popolnoma prilagodi na nove, toplejše temperaturne razmere. Tipa T_1 in T_2 dosežeta trend značilen za živali aklimirane na toplo. Drugače pa je pri toplo aklimatiziranih živalih, kjer se trend ne spremeni niti sedemnajsti dan po prenosu v hladne pogoje. Sezonska adaptacija na hladno nima večjih vplivov na temperaturno odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1 . Veliko večji vpliv smo ugotovili pri trihobotrijih tipa T_2 in T_3 .

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC 591.18:595.75(043.2)=163.6

CX trichobothrium/resting activity/trend/diapause/adaptation

AU LIPIČNIK, Aleš

AA DRAŠLAR, Kazimir

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2009

TI THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ACCLIMATIZATION ON THE
RESTING ACTIVITY OF TRICHOBOTHRIA IN THE BUG *Pyrrhocoris apterus*

DT Graduation thesis (University studies)

NO IX, 49 pp., 5 tab., 22 fig., 45ref.

LA en

AL sl/en

AB Firebugs of the species *Pyrrhocoris apterus* spend the winter as imagos. In our research we ascertained the influence of temperature on the resting activity of trichobothria types T₁, T₂ and T₃, located on the 5th abdominal segment, in individuals of the same generation. The trichobothria of types T₁ and T₂ were regularly spontaneous active in all preparations measured while the spontaneous activity of trichobothrium T₃ was present only in some animals. We monitored the temperature dependence of the resting activity in the temperature range between 5 °C and 35 °C. In T₁ the temperature dependence was positive throughout the entire temperature range. In T₂ the dependence was positive in warm summer months, while in cold months the frequency of spontaneous resting activity reached a peak at temperature between 20 °C and 25 °C and then decreased with rising temperature. The temperature dependence of type T₃ was similar over the whole year to T₂ in cold months. In cold-adapted animals the temperature dependence of the resting activity of trichobothria fully adjusted to the new warmer conditions on the 5th day after transmission to the laboratory. The types T₁ and T₂ reach a dependence characteristic of warm-adapted animals. On the contrary, in warm-adapted the trend does not change not even on the 17th day after the transfer to cold conditions. Seasonal adaptation on cold has no major influence on the temperature dependence of resting activity of trichobothria of type T₁. We ascertained a much bigger influence in trichobothria of types T₂ and T₃.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE IN DELOVNE HIPOTEZE	10
2 MATERIAL IN METODE	11
2.1 POSKUSNE ŽIVALI.....	11
2.2 METODE DELA	11
2.2.1 Načrtovanje poskusa	11
2.2.2 Priprava preparata	13
2.2.3 Registracija živčnega signala	14
2.2.4 Uravnavanje temperature preparata	15
2.2.5 Obdelava podatkov	16
3 REZULTATI.....	18
3.1 Letna dinamika mirovne aktivnosti trihobotrijev T_1 , T_2 in T_3^*	18
3.1.1 Letna dinamika mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1	18
3.1.2 Letna dinamika mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_2	19
3.1.3 Letna dinamika mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_3	20
3.2 Aklimatizacijske in aklimacijske lastnosti trihobotrijev.....	21
3.2.1 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T_1 , termin meritev: januar.....	21
3.2.2 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T_2 , termin meritev: januar	25
3.2.3 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T_1 , termin meritev: februar.....	27
3.2.4 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T_2 , termin meritev: februar	29
3.2.5 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T_1 in T_2 , termin meritev: januar	31
3.2.6 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T_1 , termin meritev: maj.....	33
3.2.7 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T_2 , termin meritev: maj	36
3.2.8 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T_3	39
4 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	40

5	POVZETEK	43
6	VIRI.....	45
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Januarja izmerjena temperatura in vlažnost na dan poskusov (I).....	21
Preglednica 2:	Februarja izmerjena temperatura in vlažnost na dan poskusov.	27
Preglednica 3:	Januarja izmerjena temperatura in vlažnost na dan poskusov (II).....	31
Preglednica 4:	Maja izmerjena temperatura in vlažnost na dan poskusov.	33
Preglednica 5:	Izmerjena frekvenca impulzov mirovne aktivnosti trihobotrija tipa T ₃ za posamezen preparat v januarju, februarju in maju.....	39

KAZALO SLIK

Slika 1:	Shema razvoja senzile.....	4
Slika 2:	Shema zgradbe žuželčje senzile.....	5
Slika 3:	Razporeditev trihobotrijev na zadku stenice <i>P. Apterus</i>	7
Slika 4:	Laski trihobotrijev tipa T_1 , T_2 in T_3	7
Slika 5:	A: Lega in razpored trihobotrijev na petem segmentu. B: Primer registrirane mirovne aktivnosti trihobotrijev petega segmenta.....	9
Slika 6:	Temperatura v Ljubljani.	13
Slika 7:	Shema postavitve poskusa.	15
Slika 8:	Peltier-jev element je vpet med dva bakrena bloka.	16
Slika 9:	Letna dinamika temperaturne odvisnosti mirovne aktivnosti trihobotrija T_1 . .	18
Slika 10:	Letna dinamika temperaturne odvisnosti mirovne aktivnosti trihobotrija T_2 ..	19
Slika 11:	Letna dinamika temperaturne odvisnosti mirovne aktivnosti trihobotrija T_3 .	20
Slika 12:	Primer zapisa mirovne aktivnosti trihobotrija $T_1/5$	22
Slika 13:	Niz intervalnih histogramov.	22
Slika 14:	Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1 v mesecu januarju.	24
Slika 15:	Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_2 v mesecu januarju.	26
Slika 16:	Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1 v mesecu februarju.....	29
Slika 17:	Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_2 v mesecu februarju.....	31
Slika 18:	Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1 in T_2 v januarju, na dan 30.1.2008.....	32
Slika 19:	Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1 v mesecu maju.....	34
Slika 20:	Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1 v mesecu maju.....	35
Slika 21:	Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_2 v mesecu maju.....	37

Slika 22: Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T ₂ v mesecu maju.....	38
---	----

1 UVOD

Značilnost v življenjskem ciklu stenice *Pyrrhocoris apterus* je preživljanje zime v stanju imaga. Razvoj, od jajčeca do imaga, traja od šest do osem tednov. Prva letna generacija se pojavi v maju in juliju, od julija do oktobra sledi razvoj druge generacije. Živali preživijo poletje, ko temperature dosežejo 30 °C in več. Zimo, ko temperatura v njihovem okolju pade pod ledišče, živali preživijo v zemlji pod steljo odpadlega listja. V sončnih dneh živali, kljub nizkim temperaturam zraka, priplezajo na debela dreves. Za kratek čas se lahko temperatura njihovega telesa povzpne tudi do 28 °C (Škorjanc et al, 2007).

Za preživetje ekstremno nizkih temperaturnih pogojev uporabljajo žuželke dve strategiji: Zmrzovanje poskušajo preprečiti s podhladitvijo telesnih tekočin ali pa razvijejo večjo toleranco na nizke temperature (Zachariassen, 1985). Pri tolerantnih vrstah, ki preživijo nastajanje zunajceličnih ledenih kristalov, pa sladkorji in polioli pomagajo blažiti osmotski stres med zmrzovanjem z regulacijo vode in s podaljševanjem celične dehidracije (Koštal et al, 2001).

Stenica *P. apterus* ni odporna na nizke temperature (Hodkova in Hodek, 1997). Hladno aklimatizirani osebki v diapavzi akumulirajo polioli kot so ribitol, sorbitol, manitol in arabinitol (Koštal et al., 2001). Nizka temperatura vpliva na zmanjšano delovanje encimov glikolize in kopičenje poliolor (Hayakawa, 1985; Storey & Storey, 1991). Akumulacija poliolor se prične, ko se temperature spustijo pod 5 °C. Pri osebkih, ki prezimujejo se sladkorji in polioli kopičijo v manjših količinah (do 1% sveže teže ali 100 mM v hemolimfi). Akumulacija le teh se zvišuje z nižanjem temperatur v okolju (Koštal in Šimek, 2000). Koncentraciji ribitola in sorbitola naraščata z nižanjem temperature pod 5 °C v vseh organih in maščobnem tkivu, medtem ko v hemolimfi dosežeta najvišjo koncentracijo pri 0 °C. Podobno se akumulirata tudi arabinitol in manitol, vendar v manjših koncentracijah (Koštal et al., 2001).

Pomembno vlogo pri adaptaciji poikilotermnih organizmov na sezonske spremembe temperature okolja imajo tudi spremembe fosfolipidov v celični membrani (Hazel, 1997). Spremembe temperature okolja vplivajo na sestavo celičnih membran, ki so občutljive za

poškodbe nastale zaradi nizkih temperatur (Hodkova et al., 2002). Vzdrževanje fluidnosti membrane pri različnih temperaturah imenujemo homeoviskozna adaptacija (Sinensky, 1974). Na fluidnost vpliva razmerje maščobnih kislin (Hazel, 1989). Najpogostejši in prisotni pri vseh temperaturah sta dve nenasičeni maščobni kislini, linoleična (18:2n-6) in oleinska (18:1n-9), in dve nasičeni, palmitinska (16:0) in stearinska (18:0), (Stanley-Samuelson et al., 1988). Druge maščobne kisline so prisotne v manjših količinah (<1%). Sestava lipidov v membranah torakalnih mišic *P. apterus* se sezonsko spreminja. Pri aklimaciji na hladno se poveča delež 16 C in zmanjša delež 18 C verig. Delež palmitinske kisline (16 C atomov) se iz 11 %, pri temperaturi 11 °C, povzpne na 18 % pri -10 °C. Skupni delež linoleične, oleinske in stearinske kisline pa se iz 87 % pri 25 °C, zmanjša na 80 % pri -10 °C. Z nižanjem temperature se zviša delež maščobnih kislin z 16 C atomi, kar sovпада z nižanjem deleža maščobnih kislin s 18 C atomi (Hodkova et al., 1999).

Spreminja se tudi delež lipidov s fosfatidiletanolaminsko glavo (PE) in delež lipidov s fosfatidilholinsko glavo (PC). Maščobne kisline povečujejo temperaturno območje v katerem so membrane fluidne (Ohtsu et al., 1998). Delež PE lipidov z nižanjem temperature narašča, medtem ko se delež PC lipidov zmanjšuje (Hodkova et al., 1999). Ti procesi povečujejo odpornost membran tako na mrazu kot v vročini.

Življenjski cikel stenice *P. apterus* sestavljajo tri obdobja. Obdobje reprodukcije, obdobje diapavze in obdobje mirovanja (LTQ – Low temperature quiescence) (Koštal in Šimek, 2000). Obdobje reproduktivne aktivnosti nastopi v aprilu. Reproductivna aktivnost osebkov je regulirana z dolžino fotoperiode (Koštal et al., 2001). Osebkki izleženi do konca reproduktivnega obdobja, dosežejo stanje imaga pred nastopom diapavze, kar jim omogoča uspešno prezimovanje. V tem obdobju sestavljajo populacijo odrasli osebki dveh generacij, manjši delež jajčec druge generacije in ličinke v vseh razvojnih stadijih. Reproductivna aktivnost se zaključi do sredine meseca julija (Koštal in Šimek, 2000).

Diapavza nastopi ob koncu poletja ali v začetku jeseni (Hodkova et al., 1999). V diapavzi se dihanje upočasni do 50 % (Slama, 1964). Zmanjšana je motorična aktivnost, aktivnost prehranjevanja in pitja tekočin. Poveča pa se aktivnost nekaterih prebavnih encimov (Socha et al., 1997). Zaradi nizkih temperatur se v hemolimfi pojavijo heksamerni proteini

(Socha in Šula, 1992; Šula et al., 1995). Obdobje se zaključi v začetku januarja. Začetek diapavze sproži fotoperioda, ko dan postane krajši od noči. Poleg fotoperiode na začetek vplivata tudi padec temperature okolja in gostota populacije (Hodek, 1968). V času diapavze pripravijo kemične spremembe organizem na prezimovaje še pred nastopom nizkih temperatur (Koštal in Šimek, 2000). Z nastopom diapavze preneha tudi reproduktivna zmogljivost, saj osebki iz jajčec izleženih tik pred nastopom nizkih temperatur ne bi dosegli zadovoljivega razvojnega stadija za preživetje.

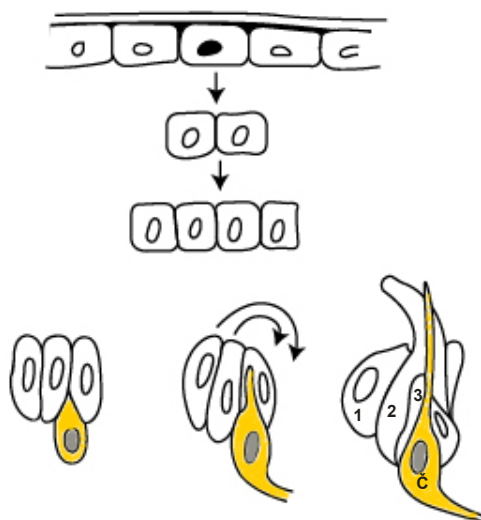
Obdobje mirovanja traja od konca diapavze do nastopa reproduktivne aktivnosti v začetku aprila (Koštal in Šimek, 2000). Mirovanje sproži nizka temperatura okolja. Znižana je aktivnost encimov in nivo metabolizma.

Zaznava dražljajev je ena ključnih sposobnosti živih organizmov. Pojavlja se na vseh organizacijskih nivojih od najpreprostejših enoceličarjev do kompleksno zgrajenih organizmov in omogoča preživetje.

Delovanje vzdražnih celic je odvisno od dogodkov na membrani. Ker pa je stanje membrane odvisno od vrste parametrov, od katerih je temperatura pomembna, se pojavi vprašanje kako žival vključi te spremembe v prepoznavanje dražljajev. Zato se zdijo trihobotriji stenice *P. apterus* primeren študijski model, s pomočjo katerega bi doprinesli k boljšemu razumevanju temperaturnih učinkov na delovanje vzdražnih sistemov pri poikilotermnih organizmih.

Pri členonožcih je telo prekrito s kutikulo, ki je ovira pri prenosu in zaznavi zunanjih dražljajev. Z diferenciacijo kutikule so se razvile specializirane strukture, senzile, ki jim omogočajo premostitve pri zaznavi dražljajev.

Senzila je čutilni organ členonožcev, čeprav je običajno zgrajena samo iz ene receptorske celice in treh celic spremljevalk (Keil, 1997a, 1997b).

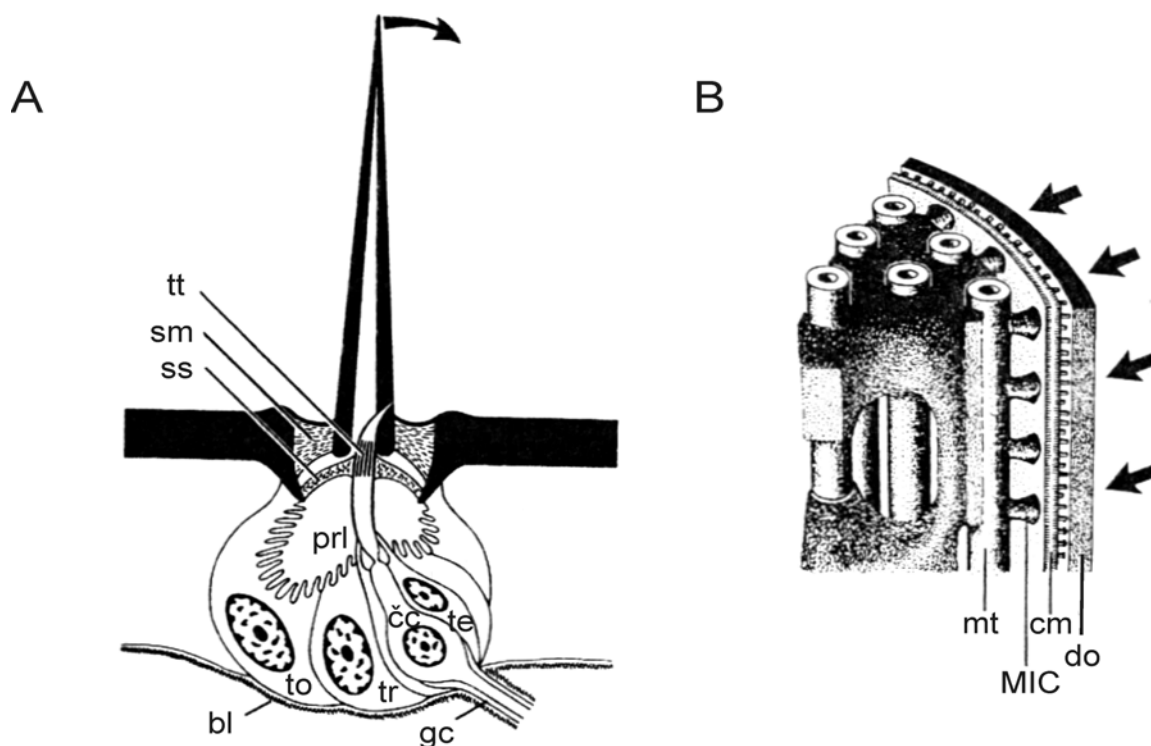


Slika 1: Shema razvoja senzile. Matična celica v epidermu se po dveh delitvah razdeli v štiri celice. Ena izmed njih postane čutilna celica (Č). Ostale tri se z indukcijo čutilne celice diferencirajo v tormogeno (1), trihogeno (2) in tekogeno celico (3). (Prirejeno po Keil, 1997)

Opisani so štirje osnovni tipi: skolopodij, kampaniformna senzila, ščetina in filiformna senzila. Filiformna senzila vključuje tenak, gibljivo vpet hitinski lasek. Odklon laska je tudi ustrezni dražljaj za to senzilo. Filiformne senzile so prisotne pri nekaterih metuljih (Tautz, 1978), na zadku in antenah stenic (Drašlar 1973, Gaffal 1976) in na cerkih ščurkov (Gnatzy, 1976). Zaradi oblike jamice okoli laska, ki spominja na čašo se pri stenicah uporablja tudi izraz trihobotrij (Tullgren, 1918).

Čutilni del senzile je bipolarni receptorski nevron. Apikalni del dendrita je izoblikovan kot modificirana cilija, ki izrašča proti bazi hitinskega laska in se nanj pripenja. Na bazalnem delu iz čutilne celice izrašča akson, ki se po abdominalnem živcu projecira proti centralnemu živčevju (Keil, 1997). Fibrilarno telo deli dendrit na notranji in zunanji segment (Smith, 1969). Notranji segment je nadaljevanje čutilne celice, ki vsebuje celične organele in apikalno par centriolov. Zunanji segment dendrita, je odebeljen in obdan z ovojnico. Membrana dendrita je z zunajceličnimi filamenti pritrjena na dendritsko ovojnico (Keil, 1997). Na apikalnem delu dendrita je tubularno telo (Thurm, 1974). Dendrit je na višini tubularnega telesa preko dendritske ovojnice pripet na bazo laska. Konica dendrita

sega v levitveni kanal laska, ki med nastajanjem novega laska omogoča stik med dendritom in starim hitinskim laskom (Tautz, 1977).



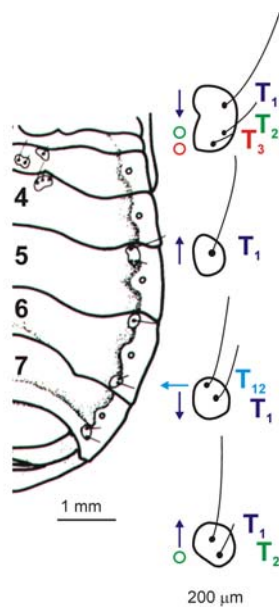
Slika 2: Shema zgradbe žuželčje senzile. **A:** Čutilno celico (čc) ovijajo tekogena (te), trihogena (tr) in tormogena celica (to). Akson ovija glia celica (gc). Na spodnji strani obdaja senzilo bazalna lamina (bl). Zunanji segment dendrita obdaja zunanji prostor receptorske limfe (prl). Konica dendrita vsebuje tubularno telo (tt). Dendrit je pritrjen na bazo laska, podpira pa ga vsadiščni pretin ali "socket septum" (ss). Lasek v vsadišče pripenja sklepna membrana (sm). Če se zunanji del laska premakne v desno (ukrivljena puščica), se baza premakne v levo in vzdraži konico dendrita. **B:** Tridimenzionalen pogled na tubularno telo. Mikrotubuli (mt) so vklopljeni v elektronsko gosto snov. Nanje je s strukturami, ki jih je Thurm (Thurm et al., 1983) poimenoval "membrane-integrated cones" (MIC), pritrjena celična membrana (cm). Preko tankih vlaken pa je membrana pritrjena tudi na dendritsko ovojnico (do), ki na zunanji strani obdaja zunanji segment dendrita (prirejeno iz Keil in Steinbrecht, 1984).

Čutilno celico ovijajo tekogena, trihogena in tormogena celica. Tekogena celica ovija telo čutilne celice in obdaja notranji segment dendrita. V področju fibrilarnega telesa tvori notranji prostor receptorske limfe. Tekom razvoja senzile, tekogena celica tvori dendritsko ovojnico. Okoli tekogene se ovija trihogena celica, ki med diferenciacijo senzile v njej

nastaja eksoskeletni material potreben za izgradnjo hitinskega laska in vsadiščnega pretina. Trihogena celica ima pomembno vlogo pri regulaciji sestave »receptorske limfe«. Tormogena celica obdaja trihogeno. Gradi večji del stene zunanjega prostora receptorske limfe in uravnava sestavo. Tako kot trihogena celica tudi ta uravnava sestavo receptorske limfe. Med razvojem senzile tvori sklepno membrano in bazalni del laska (Keil, 1997). Tormogena celica je od epidermalnih celic ločena z tremi pasovi medceličnih stikov. Apikalno leži adhezijski pas (zonula adherens), ki spada med sidriščne povezave. Pod njim leži pas septalnih stikov (septate junction). Bazalni pas pa tvorijo presledkovni stiki (gap junctions) (Thurm et al., 1980). Med tormogeno celico in kutikulo je tesen stik. Le ta ločuje receptorsko limfo od ostalega subtikularnega prostora in omogoča senzili električno izoliranost.

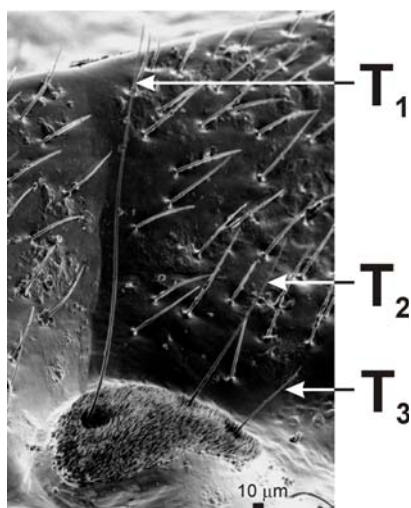
Po sedanji predstavi mehanska deformacija senzornega odstavka čutilne celice, neposredno aktivira mehansko regulirane ionske kanalčke in povzroči spremembo njihove prevodnosti. Kanalčki so kationsko selektivni in razmeroma dobro prevodni; tok K^+ in/ali Na^+ v celico povzroči depolarizacijo. Po oceni se v membranah čutilnih celic nahaja od 100 do 1000 kanalčkov. Pri nastanku in ojačitvi receptorskega potenciala sodeluje receptorska limfa. V njej značilno prevladuje visoka koncentracija K^+ , ki zagotavlja dodaten vir napetosti za ionske tokove. Koncentracija K^+ v receptorski limfi je od 100 do 150 mM in Na^+ približno 10 mM. Takšne koncentracije kationov ustvarijo transepiteliarno napetost med hemolimfo in receptorsko limfo. Tok ionov spremeni polariteto membranskega potenciala ter povzroči nastanek receptorskega potenciala (Škorjanc, 2008).

Pri stenici *P. apterus* delimo trihobotrije oziroma filiformne senzile po zgradbi in funkcionalnih lastnostih na tri različne tipe (T_1 , T_2 in T_3) (Drašlar, 1973; Škorjanc, 2002; Drašlar in Škorjanc, 2003; Škorjanc et al., 2009). Nameščeni so na ventralni strani abdomna, mediano na tretjem in četrtem segmentu. Na petem, šestem in sedmem segmentu pa lateralno ob robu segmenta. Skupno je na abdomnu 28 senzil. Nameščene so posamično ali pa se združujejo v skupine po dve ali tri (Drašlar, 1980). Število in razporeditev trihobotrijev je pri stenicah stalna, tipična in vrstno specifična (Shaefer, 1975).



Slika 3: Razporeditev trihobotrijev na zadku stenice *P. Apterus* (prirejeno iz Škorjanc, 2008).

Na robu 5. segmenta se na vsaki strani zadka nahaja skupina treh trihobotrijev, ki pripadajo tipom T₁, T₂ in T₃ (Drašlar, 1980).



Slika 4: Laski trihobotrijev tipa T₁, T₂ in T₃ (povzeto iz Škorjanc, 2008).

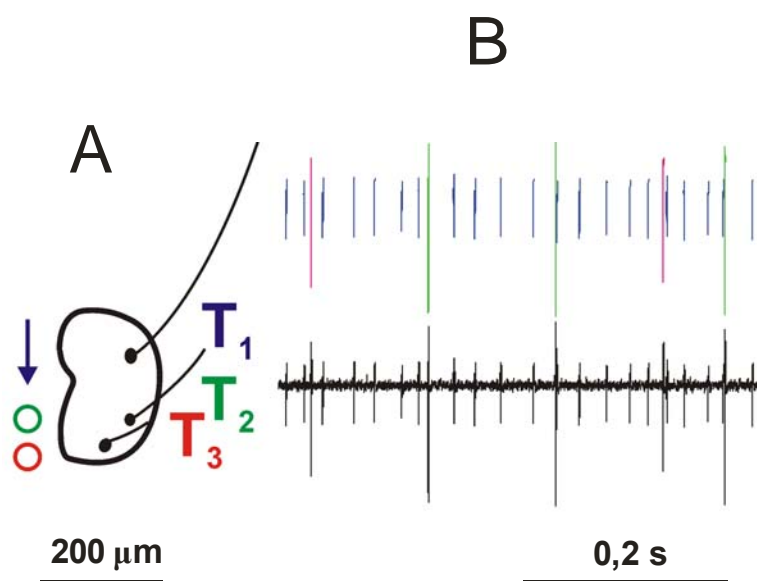
Različni tipi trihobotrijev se med sabo razlikujejo po dolžini laska in funkcionalnih lastnostih. (Drašlar, 1980).

Spontano nastajanje živčnih impulzov je posebnost različnih tipov receptorskih celic (Škorjanc et al., 2009). Praviloma receptorske celice postanejo aktivne ob prisotnosti dražljaja, vendar lahko pri mnogih senzilah kljub odsotnosti zunanjih dražljajev registriramo živčne impulze. Spontana mirovna aktivnost povečuje občutljivost receptorja, nastavlja ničelni nivo in omogoča kodiranje smeri dražljaja (Škorjanc, 2008). Predpostavko, da spontano aktivnost povzročajo neznatni zračni tokovi, eksperimenti z imobilizacijo in odstranitvijo laske ne potrdijo, saj po poškodbi ne pride do večjih sprememb v spontani aktivnosti (Drašlar 1973; Buno et al., 1981; Dagan in Volman, 1982; Hamon in Guillet, 1994; Landolfa in Miller, 1995). Obstaja več hipotez nastajanja spontane aktivnosti. Ko je lasek v ravnovesni legi bi lahko bil vir, upognjenost dendrita v eksitacijsko smer (Buno et al., 1981). Lahko je posledica aktivnosti ritmovnika (Škorjanc, 2002) ali pa gre za nihanje transdukcijskih kanalčkov med zaprtim in odprtim stanjem kljub odsotnosti dražljaja (Thurm, 2001).

Pri stenici *Pyrrhocoris apterus* sta redno spontano aktivna trihobotrija tipa T_1 in T_2 medtem ko so spontano aktivni trihobotriji tipa T_3 le pri približno 10 % preparatov.

Povprečna frekvenca spontane aktivnosti pri tipu T_1 znaša 57 imp/s, pri T_2 3.3 imp/s in pri T_3 je 0.5 imp/s.

Predpostavlja se, da se mirovna aktivnost pri senzilah T_2 in T_3 generira v distalnem delu čutilne celice, medtem ko pri tipu T_1 poleg izvora v distalnem delu čutilne celice obstaja dodaten generator mirovne aktivnosti. To dokazuje, da je pri tipu T_1 drugačno generiranje spontane aktivnosti kot pri T_2 in T_3 (Škorjanc et al., 2009).



Slika 5: A: Lega in razpored trihobotrijev na petem segmentu. B: Primer registrirane mirovne aktivnosti trihobotrijev petega segmenta. Puščica prikazuje ekscitacijsko smer tipa T₁. Tip T₂ in T₃ nista smerno občutljiva (prikazano s krožcem). Podatki za posamezen tip trihobotrija so barvno kodirani (prirejeno iz Škorjanc, 2008).

1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen našega raziskovalnega dela je bil ugotoviti vpliv temperature na mirovno aktivnost trihobotrijev pri živalih adaptiranih na hladne zimske razmere in pri živali adaptiranih na poletne razmere po prenosu na nove ambientalne pogoje.

Predpostavljamo, da se različni tipi trihobotrijev različno prilagajajo in odzivajo na temperaturno aklimatizacijo.

Z dobljenimi rezultati bi prispevali delež k boljšemu razumevanju spontane mirovne aktivnosti v živčnih celicah in senzoričnih receptorjih.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 POSKUSNE ŽIVALI

Poskuse smo izvajali na stenicah vrste *Pyrrhocoris apterus* (L.). Živali za poskuse smo nabirali v lipovem drevoredu pri gradu Bogenšperk pri Litiji. Pri meritvah mirovne aktivnosti trihobotrijev smo uporabljali izključno samce, ker se je izkazalo, da so iz neznanih razlogov živčni signali pri preparatih samcev bolj stabilni in manj šumni.

Do meritve smo živali gojili v steklenih kozarcih. Na dno posode smo položili filter papir in posodico z vodo. V posodo smo namestili tudi pokončne trakove filter papirja za vpijanje izločkov. Za hrano smo uporabljali lipovo seme.

Živali v aklimatizacijskem poskusu smo nastanili v škatli, delno zakopani v tla zunaj laboratorija na senčni strani stavbe Biološkega središča. Škatla je varovala živali pred padavinami in drugimi živalmi. Odprtine pod pokrovom so zagotavljale stalen pretok zraka, vlažnost in svetlobo. Za meritve temperature in vlage v škatli smo uporabili zunanji brezžični senzor vremenske postaje BAR 628 HG (Oregon Scientific, ZDA).

2.2 METODE DELA

2.2.1 Načrtovanje poskusa

V prvem sklopu poskusa smo izvedli meritve letne dinamike spontane mirovne aktivnosti trihobotrijev. Meritve smo opravili med novembrom leta 2006 in oktobrom leta 2007. Dobljeni rezultati so nam služili kot izhodišče in kontrola v drugem sklopu poskusa.

Protokol I. Letna dinamika (iz okolja na mizo) (Ugotavljanje stanja).

V protokolu 1. meritve, smo živali adaptirane na okoljske pogoje namestili na termostatiran nosilec za preparat in takoj začeli z meritvijo temperaturne odvisnosti mirovne aktivnosti.

V drugem sklopu poskusa smo opravili meritve vpliva temperature na mirovno aktivnost trihobotrijev pri različno adaptiranih živalih. Poskus je bil sestavljen iz treh serij meritev. Vse meritve so bile opravljene na isti populaciji (izlov, oktober 2007). Prvo serijo meritev smo opravili januarja in drugo serijo februarja. Živali so bile od oktobra 2007 izpostavljene okoljskim temperaturam. Obravnavali smo jih kot adaptirane na hladne pogoje.

Protokol II. Iz hladnega na toplo (aklimacija na toplo).

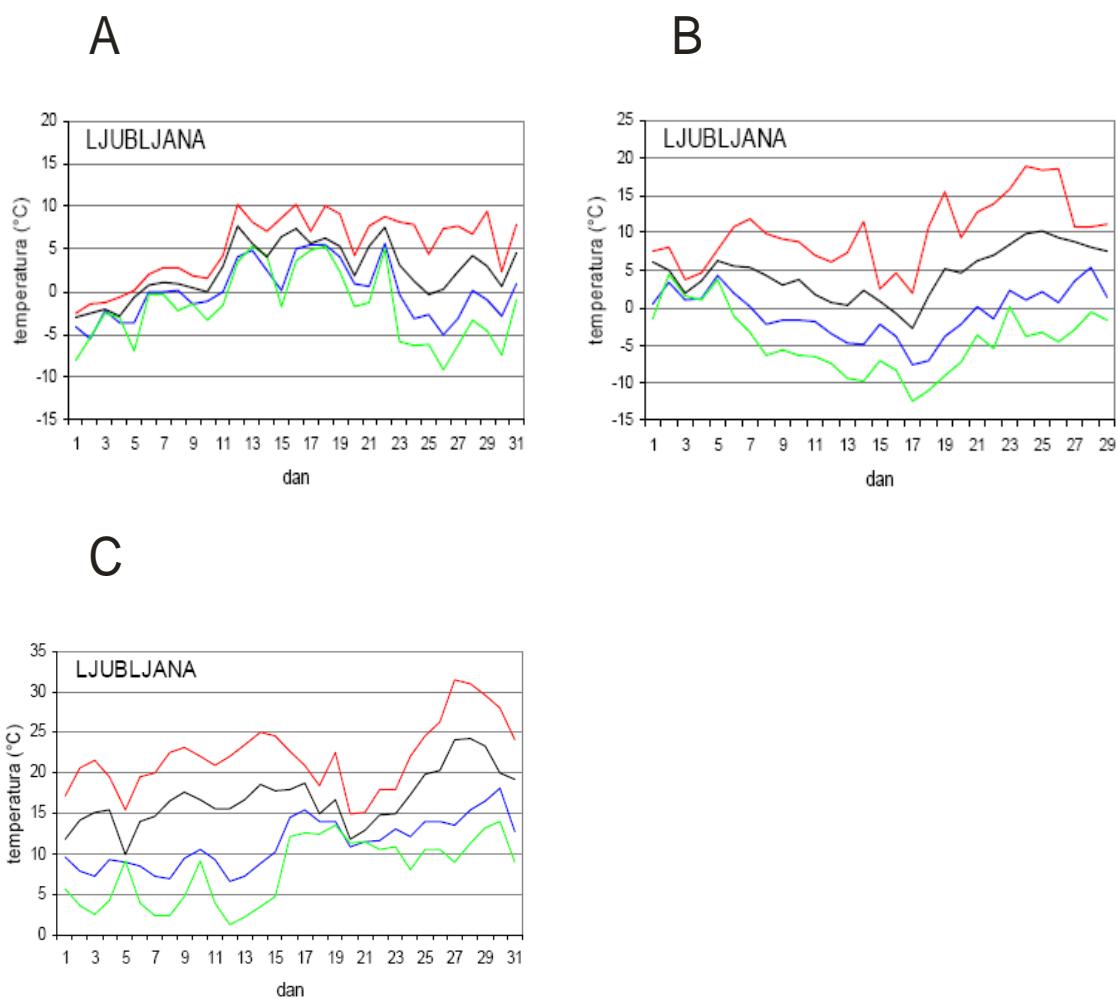
Živali, adaptirane na hladno, smo prenesli v laboratorijske pogoje. Temperatura v laboratoriju je bila med 20 in 23 °C. Meritve temperaturne odvisnosti smo opravili isti dan po prenosu, drugi dan in peti dan po prenosu na laboratorijske pogoje.

Meritve temperaturne odvisnosti mirovne aktivnosti v februarju smo dopolnili z dvema dodatnima merilnima terminoma. Tako je prva meritev potekala isti dan po prenosu v laboratorij, preostale meritve pa drugi, tretji, četrti in peti dan po prenosu v laboratorijske pogoje.

Protokol III. Iz toplega na hladno (aklimacija na hladno).

V januarju smo poskus dopolnili, s prenosom živali nazaj v zunanje okolje. Meritve temperaturne odvisnosti smo opravili deveti dan po prenosu.

V maju 2008, smo opravili drugi del poskusa. Meritve so bile opravljene na živalih iz iste generacije. V maju so bile živali že adaptirane na toplo. Aklimirali smo jih na hladno v hladilniku, pri temperaturi 8 °C s svetlobnim režimom 12:12. Meritve smo opravili isti dan po prenosu v hladilnik, drugi dan, tretji, četrti, peti, osmi, deseti in sedemnajsti dan po prenosu.



Slika 6: Temperatura v Ljubljani. A: Januar 2008 (Cegnar 2008a). B: Februar 2008 (Cegnar 2008b). C: Maj 2008 (Cegnar 2008c). Najvišja (rdeča črta), povprečna (črna črta) in najnižja (modra) temperatura zraka ter temperatura zraka 5 cm nad tlemi (zeleni).

Povprečne temperature v Ljubljani. Januar - 2.5 °C (Cegnar, 2008), februar - 4.6 °C (Cegnar, 2008), maj - 16.8 °C (Cegnar, 2008c).

2.2.2 Priprava preparata

Poskusno žival smo s hrbtno stranjo pritrdili na bakren nosilec. Preparat smo prilepili z cianoakrilatnim sekundnim lepilom (Loctite Super Attack, gel). S tem smo se izognili pregrevanju preparata pri sicer običajnem pritrdjevanju preparata z mešanico čebeljega voska in kolofonije.

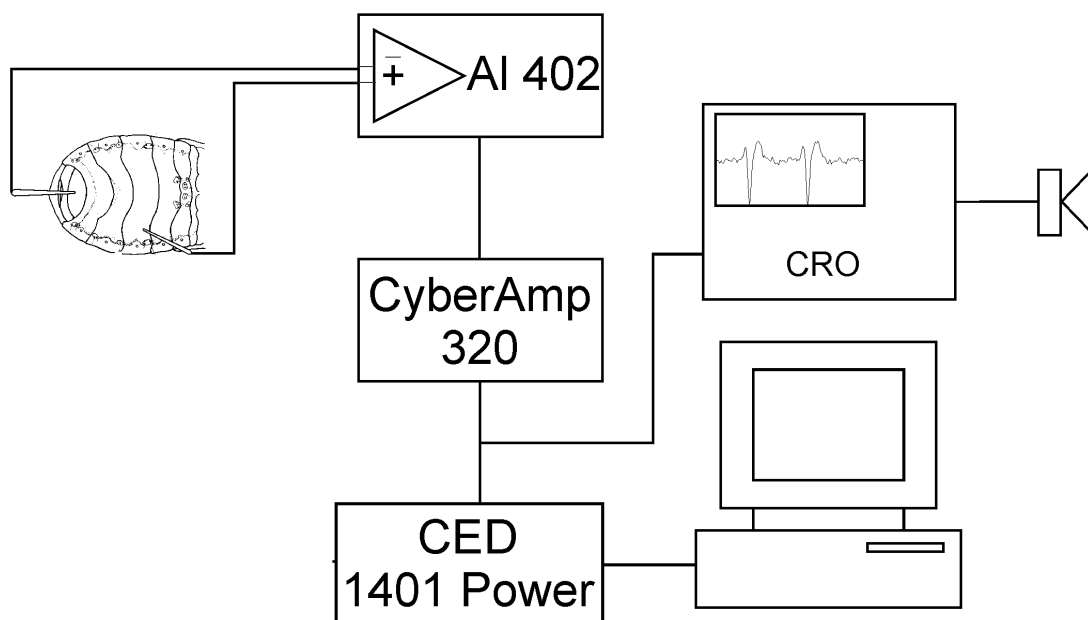
Meritve smo opravljali na izoliranem abdomnu. Pri preparaciji smo živali odstranili noge in oprsje, rano pa smo prekrili z silikonskim lepilom Kwik Sil (WPI Sarasota ZDA). Izkazalo se je, da je preživetje tako pripravljenelega preparata več kot 24 ur, vendar pa smo vse meritve izvedli že nekaj ur po preparaciji.

2.2.3 Registracija živčnega signala

Preparat smo namestili v Faradayevo kletko, nameščeno na kovinski antivibracijski mizi. Motnje zaradi zračnih tokov smo zmanjšali z rebrato izolacijsko peno.

Vse meritve smo opravili na skupini trihobotrijev 5. segmenta zadka. Skupina vključuje vse tri tipe trihobotrijev (T_1 , T_2 in T_3). Razdalje med posameznimi senzilami so cca 100 μm . Zato upravičeno predpostavljamo, da so potekale meritve za vse senzile pod istimi pogoji. Živčne impulze smo registrirali zunajcelično z volframovimi mikroelektrodami. Elektrode smo izdelali z elektrolitskim koničenjem. Debelina žice indiferentne elektrode je bila 500 μm . Z uporabo iste kovine smo preprečili nastanek medelektrodnega potenciala. Referenčno elektrodo smo vstavili v zadek vzdolž glavne telesne osi. Registracijsko elektrodo prikoničeno iz 125 μm debele žice smo zabodli v empirično določeno področje na abdomnu (Drašlar 1980). Z isto registracijsko elektrodo smo zajeli aktivnost vseh treh trihobotrijev. Velikost tako registriranih signalov je bila med 100 in 500 μV .

Signal smo zajeli in ojačali na prvi stopnji z predojačevalnikom AI402 (Molecular devices, ZDA). Za končno ojačanje, filtracijo in prilagoditev za AD pretvorbo smo uporabili sistem CyberAmp 320 (Molecular devices, ZDA). Frekvenčno okno smo nastavljali med 100 in 3000 Hz. Obdelan signal smo vodili v analogno-digitalni pretvornik 1401 plus ali 1401 power (CED, Cambridge, VB) in ga shranili na trdi disk osebnega računalnika (Dell computers).



Slika 7: Shema postavitve poskusa.

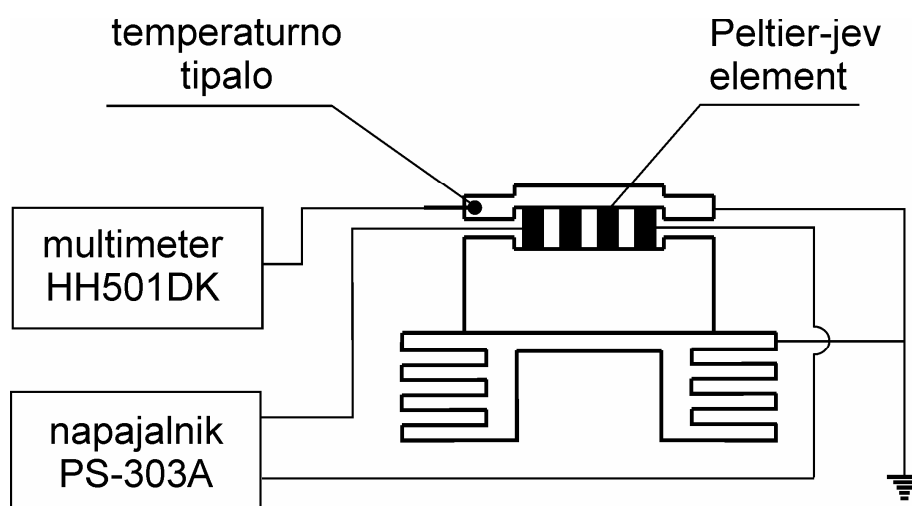
Za zajem, zapis, diferenciacijo signalov posamezne senzile in osnovno procesiranje signala smo uporabili program Spike2 v.6.02 (CED, Cambridge, VB), za statistično obdelavo podatkov in izdelavo diagramov pa program Matlab r.2007b (TheMathWorks, Natick MA, ZDA).

V rezultatih podajamo samo podatke meritev pri vseh po protokolu predvidenih temperaturah, pri katerih po zaključku meritve frekvenca pri 20 °C ni odstopala od frekvence izmerjene na začetku meritve pri 20 °C.

2.2.4 Uravnavanje temperature preparata

V skladu s protokolom meritve smo preparat segrevali in ohlajali po vnaprej določeni temperaturni lestvici: 5 , 10 , 15 , 20 , 25 , 30 in 35 °C. Nosilec za preparat je bil nameščen na Peltier-jevem elementu (RO3.3-3.9, Conrad, Nemčija). Temperaturo Peltier-jevega elementa smo nastavljali s konstantnim tokom. S tem smo se izognili motnjam, ki nastajajo

pri običajnih regulatorjih ob vklopu in izklopu električnega toka. Temperaturo nosilca preparata smo med meritvijo nadzorovali s termočlenom (tip K, HH501DK, Omega, ZDA) vstavljenim v izvrtino v nosilcu preparata. Temperaturno stabilnost nosilca smo zagotovili s primerno toplotno kapaciteto in odvajanjem toplote preko hladilnih reber.



Slika 8: Peltier-jev element je vpet med dva bakrena bloka. V zgornjem, ki je tudi nosilec preparata, je nameščeno temperaturno tipalo. Na spodnjega je nameščeno hladilno telo.

Meritve smo začeli izvajati 5 min po ustalitvi temperature nosilca preparata.

2.2.5 Obdelava podatkov

Za osnovno analizo signala smo uporabili program Spike2 v.6.02, ki v zveznem zapisu aktivnosti trihobotrijev prepozna posamezne signale in jih zapiše v obliki niza diskretnih dogodkov. Prednost takšnega preparata je, da lahko s selektivno stimulacijo ugotovimo, kateri signal pripada določenemu trihobotriju. Iz zapisa sumaričnega signala smo s programom ločili signale posameznih tipov trihobotrijev. Te signale smo zapisali kot niz diskretnih dogodkov jih posneli kot ločene kanale in podatke shranili. Frekvenca mirovne aktivnosti v diagramih je podana kot srednja vrednost, izračunana kot količnik med številom živčnih impulzov in trajanjem meritve.

Pri protokolu I in II je zajem signala trajal 60 s za vsako temperaturno stopnjo v celotnem temperaturnem območju. V protokolu III je zajem signala trajal 120 s z začetne temperature 10 °C.

Za obdelavo podatkov in izdelavo diagramov smo uporabili programe Spike2 (CED), Matlab r.2007b (TheMathWorks, Natick MA, ZDA) in Corel Draw graphics suite (Corel corporation).

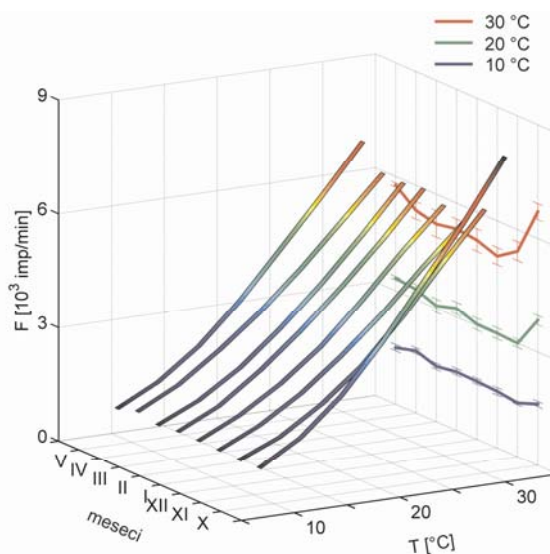
3 REZULTATI

3.1 LETNA DINAMIKA MIROVNE AKTIVNOSTI TRIHOBOTRIJEV T_1 , T_2 IN T_3 *

3.1.1 Letna dinamika mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1

Meritve spontane mirovne aktivnosti trihobotrijev T_1 , T_2 in T_3 na petem segmentu smo izvajali od meseca oktobra do meseca maja v osmih zaporednih ciklih (označeni z rimskimi številkami) pri osmih temperaturnih nivojih v razponu od 5 °C do 35 °C.

Slika 9 prikazuje potek letne dinamike temperaturne odvisnosti spontane mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1 . Pri nizkih temperaturah so nihanja v frekvenci mirovne aktivnosti med posameznimi letnimi obdobji neznatna.



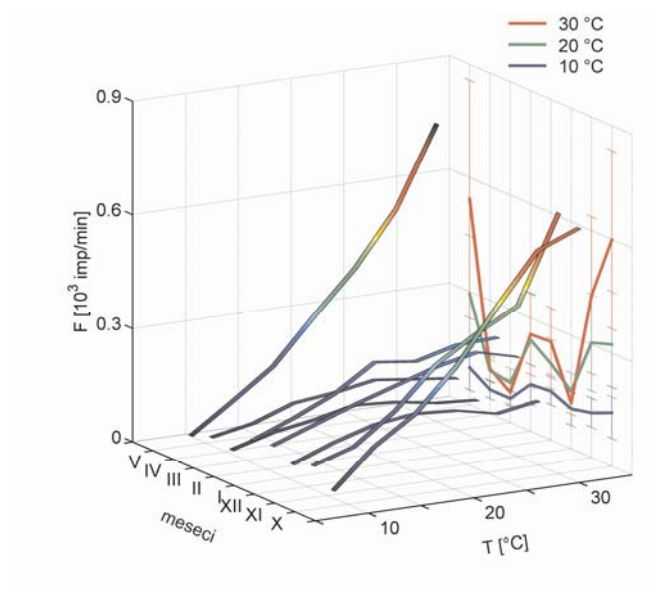
Slika 9: Letna dinamika temperaturne odvisnosti mirovne aktivnosti trihobotrija T_1 . Prikazane so povprečne frekvence impulzov. Projekcija na pokončno ravnino diagrama predstavlja povprečno vrednost frekvence živčnih impulzov \pm SN za posamezen mesec pri 10 °C, 20 °C in 30 °C (Škorjanc, 2008).

* Slike (9, 10 in 11) so povzete iz doktorske disertacije Aleša Škorjanca (Škorjanc, 2008). Avtor slik priznava moje soavtorstvo pri meritvah letne dinamike mirovne aktivnosti in se strinja z objavo diagramov v diplomski nalogi.

Nasprotno pa se kažejo večja odstopanja v frekvenci mirovne aktivnosti pri višjih temperaturah. Najvišje vrednosti smo izmerili v oktobru in maju. V vmesnem obdobju pa je opazen očitni upad frekvence živčnih signalov v novembru in decembru, nato se frekvenca ustali na nižjem nivoju, v aprilu pa začneja frekvenca spontane aktivnosti ponovno naraščati.

3.1.2 Letna dinamika mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_2

Za razliko od T_1 so nihanja pri tipu T_2 (sl. 10) večja že pri nižjih temperaturah. Z višanjem temperature se pokažejo večja odstopanja v frekvenci mirovne aktivnosti med posameznimi meseci. V oktobru in maju narašča frekvenca proporcionalno z rastočo temperaturo v celotnem območju, podobno kot pri T_1 . Novembra so že opazna odstopanja, ki nakazujejo trend, ki se izkaže v naslednjih hladnih mesecih.



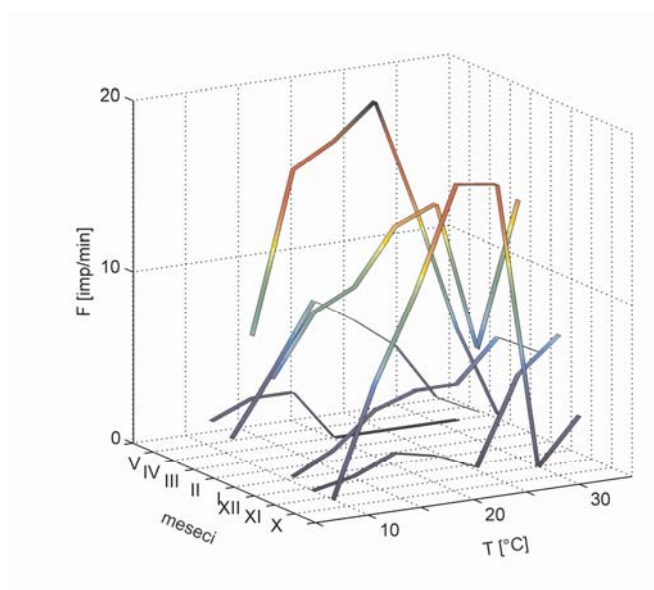
Slika 10: Letna dinamika temperaturne odvisnosti mirovne aktivnosti trihobotrija T_2 . Prikazane so povprečne frekvence impulzov. Projekcija na pokončno ravnino diagrama predstavlja povprečno vrednost frekvence živčnih impulzov \pm SN za posamezen mesec pri 10 °C, 20 °C in 30 °C (Škorjanc, 2008).

V tem obdobju je temperaturna odvisnost nižja, kar se kaže v zmanjšani strmini poteka krivulje. Poleg tega je opazna značilnost, da krivulja doseže vrh med 20 °C in 25 °C in nato frekvenca živčnih signalov z višanjem temperature upade. Iz diagrama je razvidno, da je v

toplejših mesecih trend letne dinamike temperaturne odvisnosti spontane mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_2 podoben kot pri tipu T_1 . Drugačen trend pa je značilen za hladnejše mesece, kjer v meritvah opazimo značilen prelom v frekvenci mirovne aktivnosti.

3.1.3 Letna dinamika mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_3

Pri trihobotrijih tipa T_3 smo registrirali spontano mirovno aktivnost samo pri manjšem številu preparatov. V temperaturni odvisnosti mirovne aktivnosti trihobotrija tipa T_3 (sl. 11) opazimo izrazito večje stresanje pri nizkih temperaturah. Frekvenca v vseh obdobjih leta narašča s temperaturo, doseže vrh pri temperaturah med $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in nato upade. Podoben trend opazimo v temperaturni odvisnosti spontane mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_2 v hladnem delu leta.



Slika 11: Letna dinamika temperaturne odvisnosti mirovne aktivnosti trihobotrija T_3 . Prikazane so povprečne frekvence impulzov. Projekcija na pokončno ravnino diagrama predstavlja povprečno vrednost frekvence živčnih impulzov \pm SN za posamezen mesec pri $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Škorjanc, 2008).

Pri poteku letne dinamike temperaturne odvisnosti mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1 , T_2 in T_3 , petega abdominalnega segmenta, smo opazili, da prihaja v hladnejšem in toplejšem letnem obdobju do različnega odziva mirovne aktivnosti na spremembo temperature med posameznimi tipi trihobotrijev.

Iz diagramov je očitno razvidno, da je trend temperaturne odvisnosti meritev pri tipu T₁ skozi celo leto praktično enak z manjšim odstopanjem v frekvenci pri višjih temperaturah. Pri tipu T₂ so meritve v toplih mesecih podobne meritvam T₁. V hladnejših mesecih pa smo registrirali značilen vrh in prelom pri srednjih temperaturah (20-25 °C), in nato upadanje frekvence mirovne aktivnosti kar pa ne sovпада s trendom meritev tipa T₁.

Iz meritev vpliva aklimatizacije na mirovno aktivnost trihobotrijev tipa T₃ opazimo določeno podobnost s trendi tipa T₂ v hladnih mesecih, medtem ko ni opaziti nobenih podobnosti z načinom delovanja tipa T₁.

Z nadaljnjim poskusom smo želeli ugotoviti ali oziroma kako se spremeni odziv receptorja, izražen kot sprememba mirovne aktivnosti, po prenosu živali adaptiranih na hladne zimske razmere v laboratorijsko okolje z ambientalno temperaturo.

3.2 AKLIMATIZACIJSKE IN AKLIMACIJSKE LASTNOSTI TRIHOBOTRIJEV

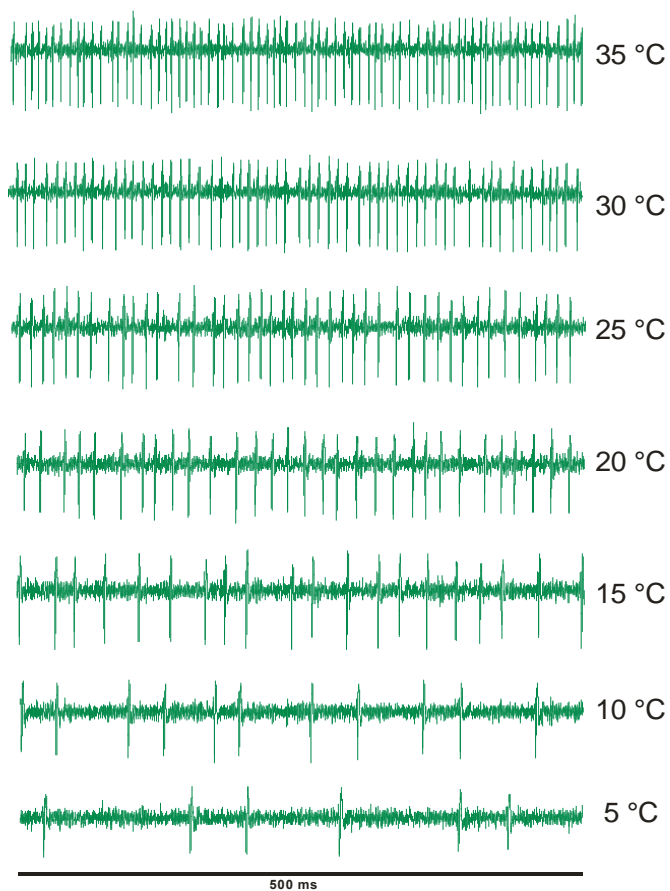
V drugem sklopu poskusa smo v treh serijah meritev želeli ugotoviti vpliv aklimacije na spremembo mirovne aktivnosti pri različnih tipih trihobotrijev na 5. abdominalnem segmentu stenice *P. apterus*.

3.2.1 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T₁, termin meritev: januar (hladno → toplo)

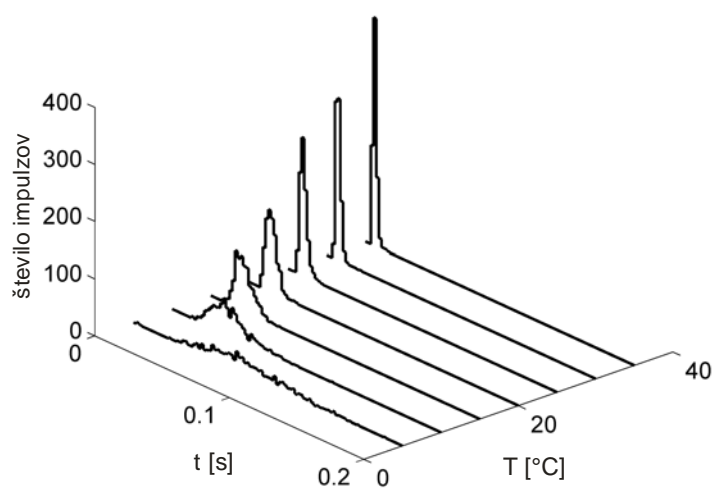
Meritve temperaturnega odziva mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_{1/5} smo opravili 17., 18. in 21. januarja 2008.

Preglednica 1: Januarja izmerjena temperatura in vlažnost na dan poskusov (I).

Januar	zunanje okolje		laboratorij	
	temperatura [°C]	vlažnost [%]	temperatura [°C]	vlažnost [%]
1., 17.1.	2	94	23,3	33
2., 18.1.	2,1	96	22,3	29
5., 21.1.	1,7	94	22,2	27



Slika 12: Primer zapisa mirovne aktivnosti trihobotrija $T_1/5$ (preparat 1/ dan3, februar 08)

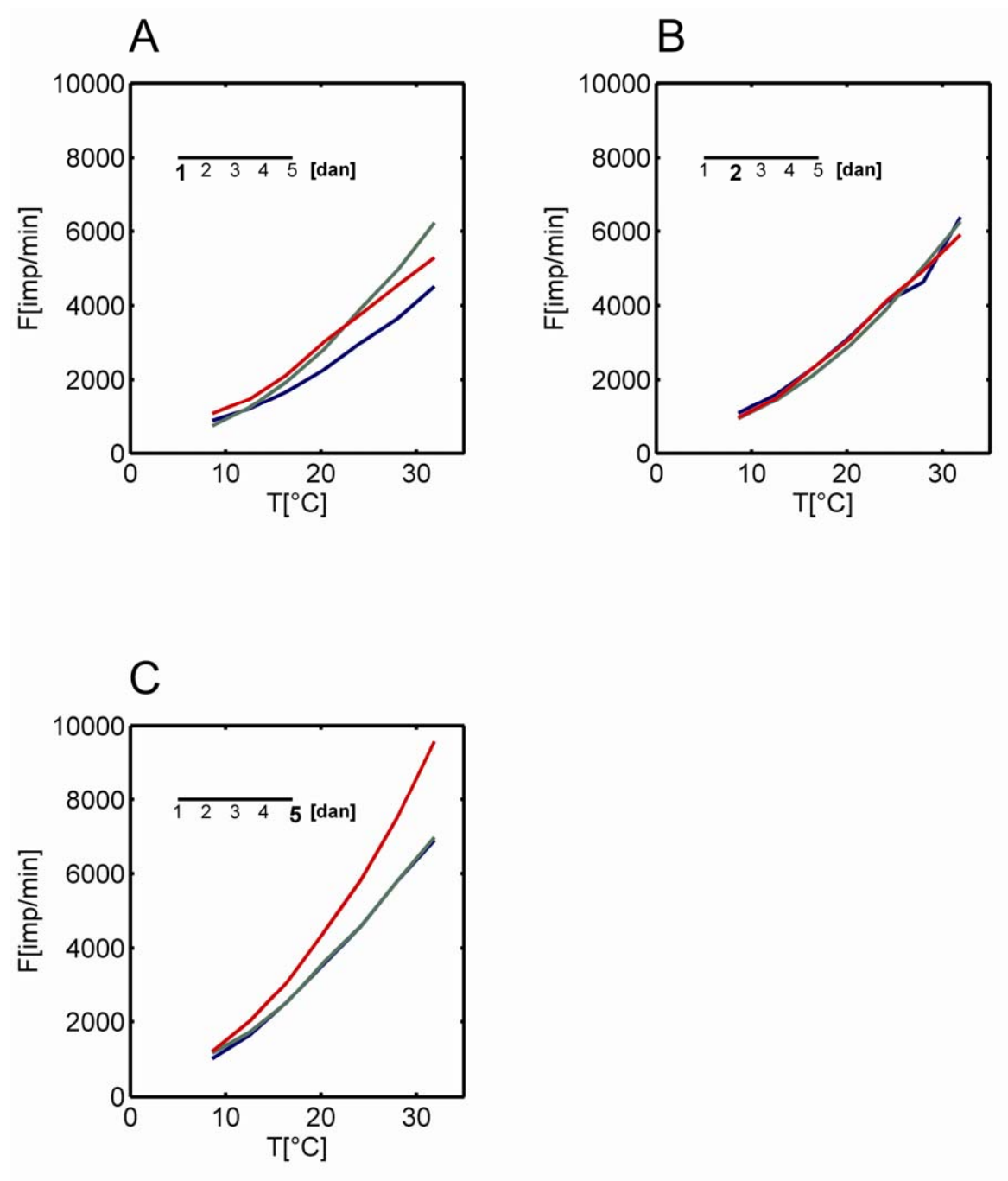


Slika 13: Niz intervalnih histogramov (IH) kaže porazdelitev časovnih intervalov med živčnimi impulzi trihobotrija tipa T_1 pri različnih temperaturah. Vsak posamezen IH vključuje 720 impulzov.

Na sliki 14 je prikazana temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T₁ v januarju. Zaradi časa trajanja posamezne meritve je število meritev, ki smo jih lahko opravili v posameznem dnevu omejeno.

Frekvenca impulzov mirovne aktivnosti pri vseh meritvah enakomerno narašča v celotnem temperaturnem območju. Pri nižji temperaturi (5 °C) so vrednosti pri vseh meritvah podobne, pri višjih temperaturah pa se kažejo očitna odstopanja.

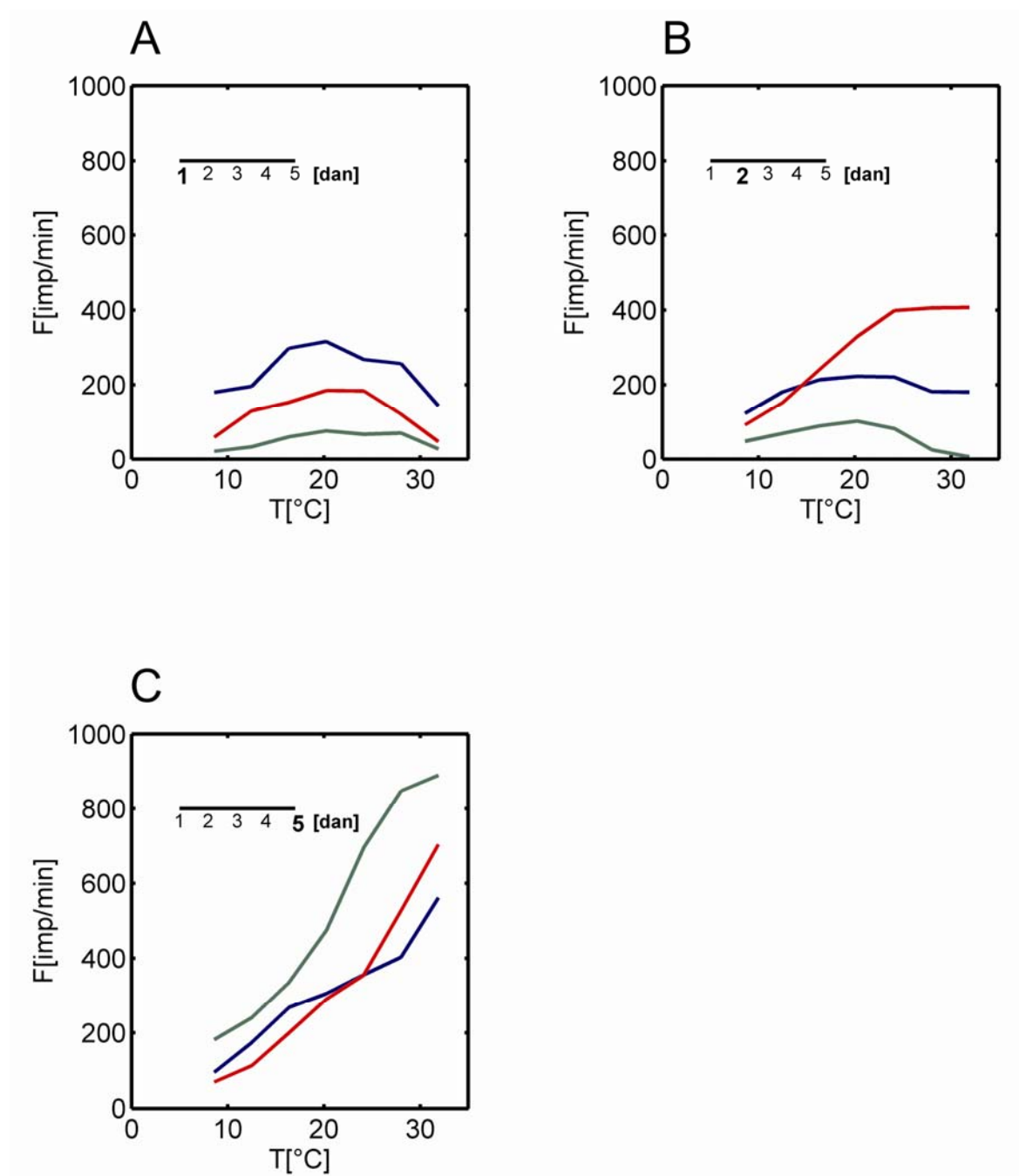
Prvi dan po prenosu na laboratorijsko okolje imajo frekvence impulzov pri najvišji temperaturi zelo podobne vrednosti kot jih opazimo pri meritvah letne dinamike mirovne aktivnosti tipa T₁ v hladnih mesecih. Drugi dan dosežejo frekvence impulzov pri visokih temperaturah višje vrednosti kot prvi dan. Pri meritvah v petem dnevu se frekvenca impulzov pri višjih temperaturah povečuje in doseže vrednosti v toplejših mesecih. Rezultati nekaterih meritev kažejo odstopanja od tega trenda, kar ocenjujemo kot lastnost posameznega preparata.



Slika 14: Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1 v mesecu januarju. A) Temperaturna odvisnost v 1. dnevu. B) Temperaturna odvisnost v 2. dnevu. C) Temperaturna odvisnost v 5. dnevu. Vsaka posamezna linija predstavlja posamezen preparat.

3.2.2 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T₂, termin meritev: januar (hladno → toplo)

Pri trihobotrijih tipa T₂ (sl. 15) so razlike v mirovni aktivnosti glede na mirovno aktivnost tipa T₁. Že pri najnižji temperaturi opazimo, da si vrednosti med sabo niso tako podobne kot je to opaziti pri trihobotrijih tipa T₁ (sl. 14). V prvem dnevu (sl. 15A) so si rezultati meritev med sabo podobni, le da je razpon med posameznimi preparati večji. Frekvenca impulzov mirovne aktivnosti narašča do temperature 20 °C kjer vrednosti dosežejo vrh. Z nadaljnjim višanjem temperature je frekvenca impulzov upadla. V drugem dnevu meritev (sl. 15B) so pri 5 °C vrednosti podobne kot v prvem dnevu. Opazili smo, da dve meritvi od treh dosežeta maksimalno frekvenco impulzov mirovne aktivnosti pri 20 °C, ki podobno kot pri prvem dnevu nato z višanjem temperature upade. Pri eni meritvi pa frekvenca impulzov narašča v celotnem temperaturnem območju, kjer se kaže izrazit dvig frekvenca impulzov do temperature 25 °C, nato pa frekvenca narašča le minimalno do najvišje temperature. V petem dnevu (sl. 15C) smo opazili, da frekvenca impulzov mirovne aktivnosti narašča v celotnem temperaturnem območju. Vrednosti meritve pri najvišji temperaturi so podobne kot pri meritvah letne dinamike mirovne aktivnosti, trihobotrijev T₂, v toplejših mesecih.



Slika 15: Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_2 v mesecu januarju. A) Temperaturna odvisnost v 1. dnevu. B) Temperaturna odvisnost v 2. dnevu. C) Temperaturna odvisnost v 5. dnevu. Vsaka posamezna linija predstavlja posamezen preparat.

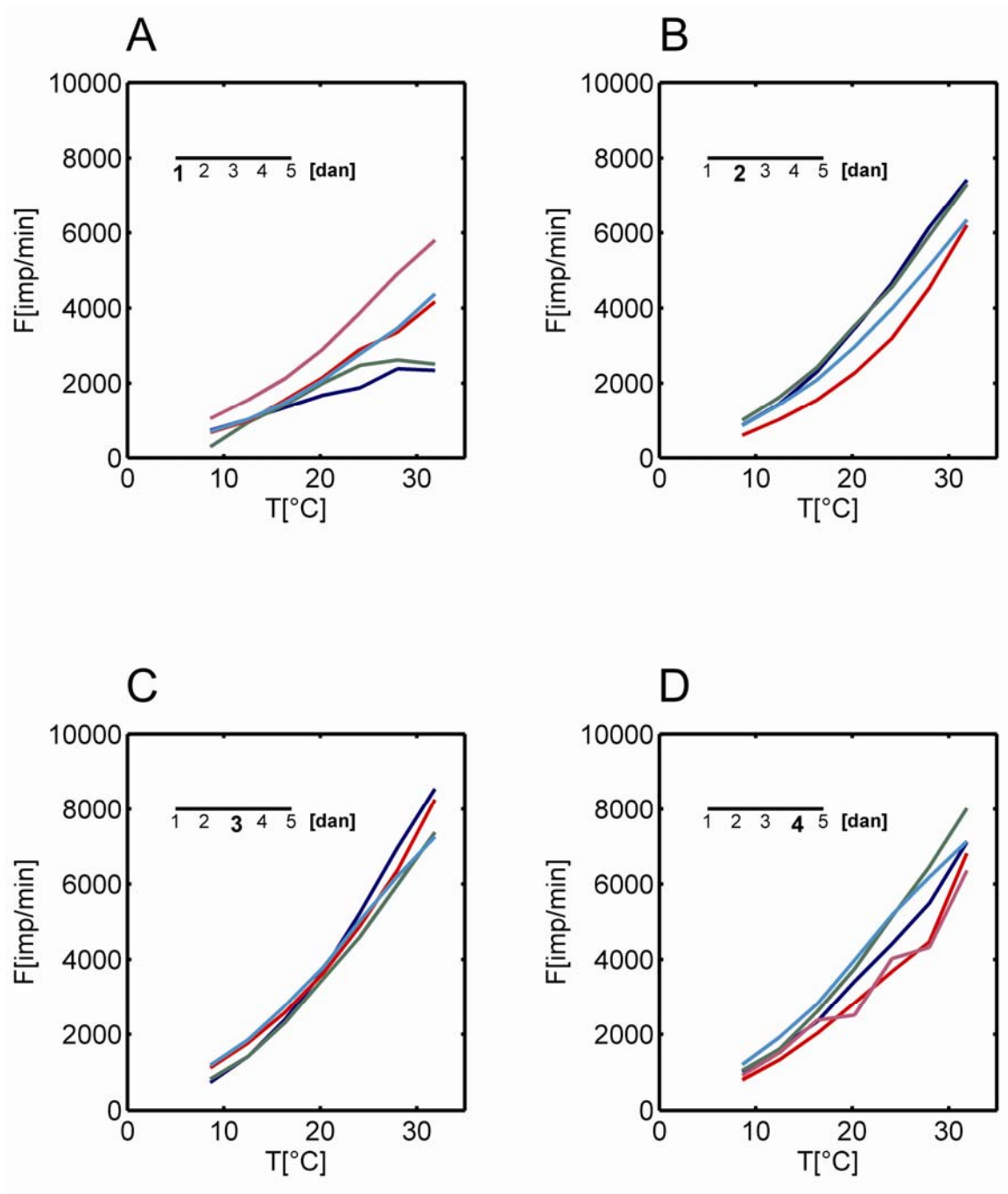
3.2.3 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T₁, termin meritev: februar (hladno → toplo)

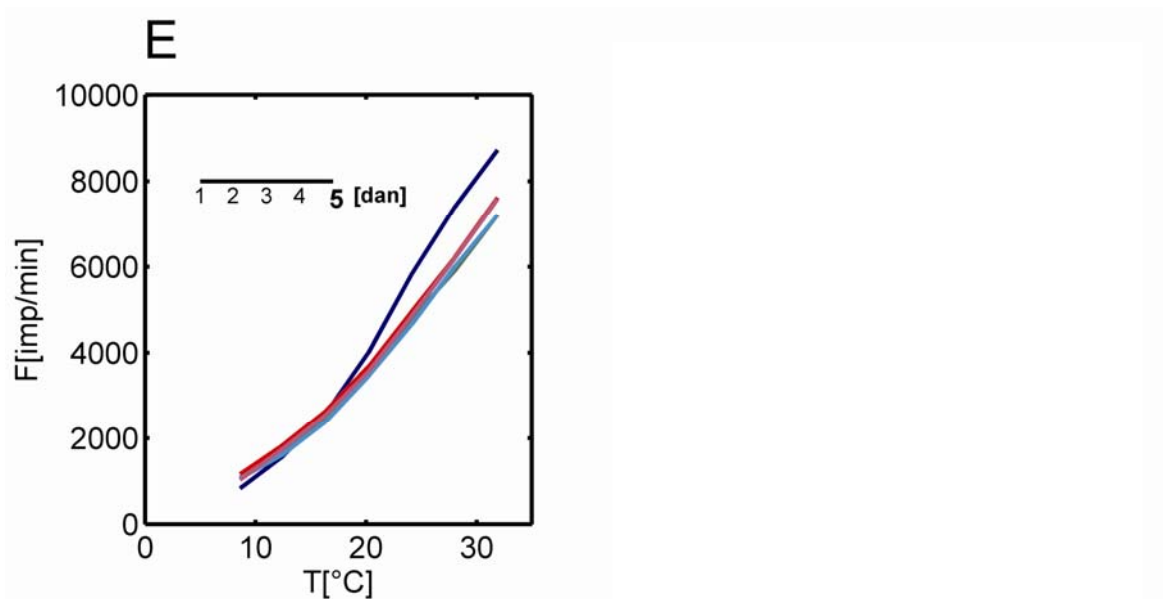
Preglednica 2: Februarja izmerjena temperatura in vlažnost na dan poskusov.

Februar	zunanje okolje		laboratorij	
Dan	temperatura [°C]	vlažnost [%]	temperatura [°C]	vlažnost [%]
1., 11.2.	0,4	95	23	22
2., 12.2.	1,8	88	22,6	21
3., 13.2.	0,2	89	24,2	21
4., 14.2.	-0,7	85	22,4	18
5., 15.2.	1,2	92	22,2	20

Protokol meritev v februarju smo dopolnili z vključitvijo dveh nadaljnjih dni meritev.

Mirovna aktivnost trihobotrijev tipa T₁ (sl. 16) pokaže v februarju podobne lastnosti kot v mesecu januarju (sl. 14). Frekvenca impulzov pri vseh meritvah z višanjem temperature narašča v celotnem temperaturnem območju. V vseh meritvah so si frekvence impulzov pri začetni temperaturi podobne. Nasprotno pa se kažejo odstopanja pri višjih temperaturah. V prvem dnevu pri treh meritvah opazimo trend, da so frekvence impulzov mirovne aktivnosti pri visokih temperaturah podobne kot v januarju prvi dan. Frekvenca impulzov z dvigom temperature narašča bolj položno kot je to opaziti pri ostalih dneh. Odstopata dve meritvi pri katerih frekvenca impulzov doseže optimum pri temperaturi 30 °C in nato nekoliko upade. Drugi dan opazimo, da so frekvence impulzov pri visokih temperaturah višje kot prvi dan. V tretjem dnevu so vrednosti frekvenc pri 35 °C zelo podobne vrednostim izmerjenim pri letni dinamiki mirovne aktivnosti trihobotrija T₁ v toplejših mesecih (maj). Četrty dan opazimo manjši upad pri najvišji temperaturi, medtem ko se vrednosti frekvence impulzov mirovne aktivnosti peti dan ponovno dvignejo. Četrty dan odstopa meritev, pri kateri opazimo neznačilen potek dvigovanja frekvence s temperaturo.



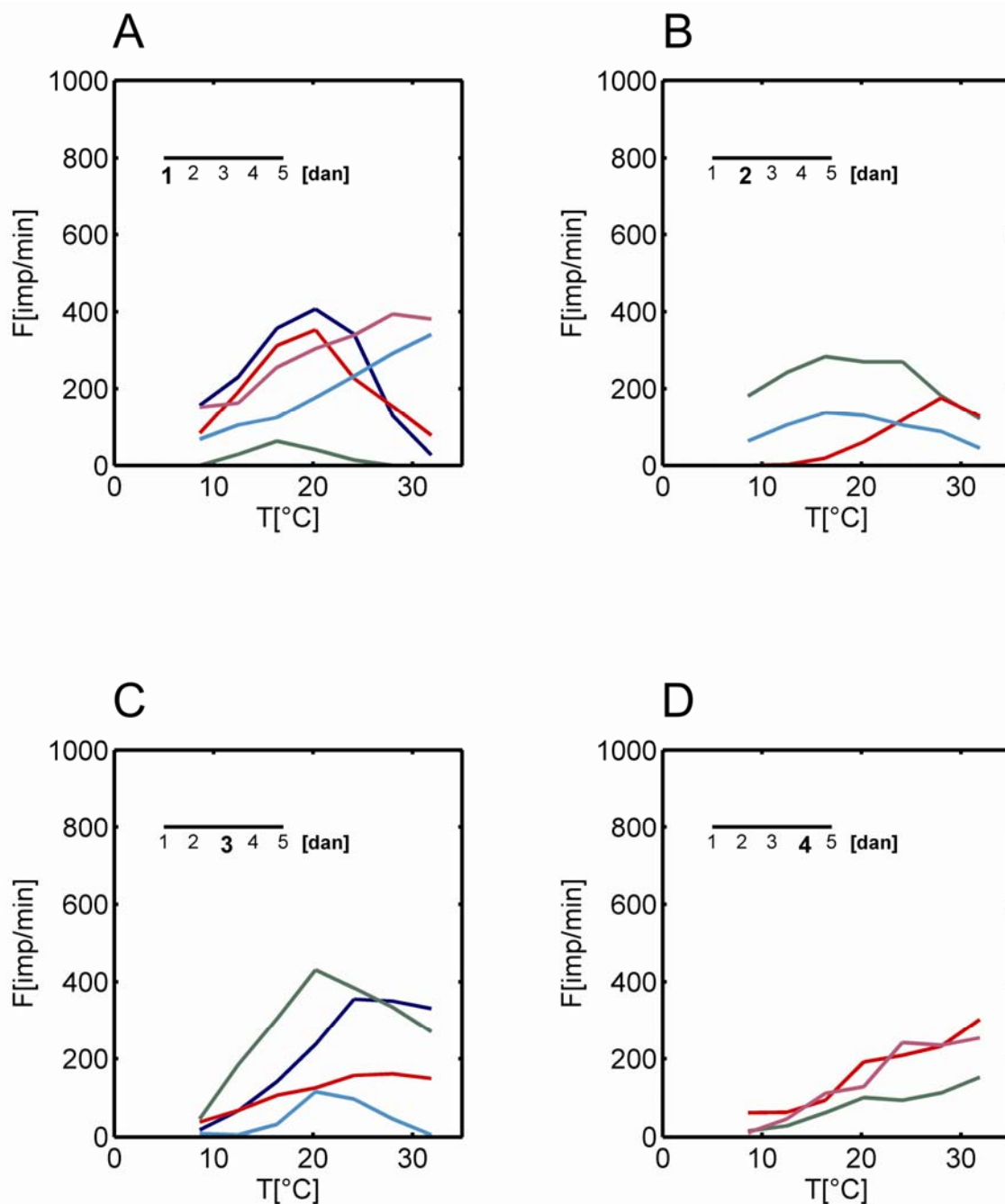


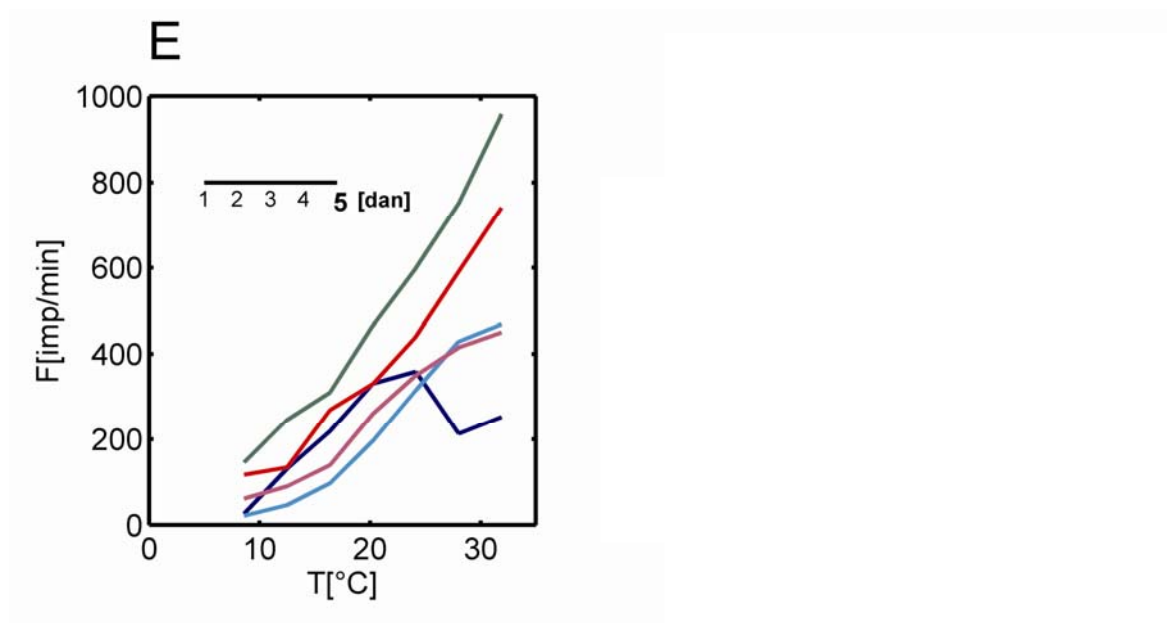
Slika 16: Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1 v mesecu februarju. A) Temperaturna odvisnost v 1. dnevu. B) Temperaturna odvisnost v 2. dnevu. C) Temperaturna odvisnost v 3. dnevu. D) Temperaturna odvisnost v 4. dnevu. E) Temperaturna odvisnost v 5. dnevu. Vsaka posamezna linija predstavlja posamezen preparat.

3.2.4 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T_2 , termin meritev: februar (hladno → toplo)

Podatki meritev pri tipu T_2 (sl. 17) prvi dan v 80 % dosežejo vrh v frekvenci impulzov v temperaturnem območju med 15 °C in 30 °C, nato po doseženem vrhu z višanjem temperature mirovna aktivnost upade. Pri eni meritvi frekvenca narašča v celotnem temperaturnem območju. Izstopa pa tudi meritev, pri kateri se spontana mirovna aktivnost pojavi šele pri 10 °C in preneha po temperaturi višji od 25 °C. Tudi v drugem (sl. 17B) in tretjem (sl. 17C) dnevu vse meritve dosežejo vrh pri temperaturah od 15 °C do 30 °C. Po doseženem vrhu sledi upad frekvence podobno kot v prvem dnevu. V drugem dnevu ponovno izstopa meritev katere mirovna aktivnost se pojavi pri 10 °C. Zelo nizke in podobne vrednosti v frekvenci impulzov pri temperaturi 5 °C opazimo tretji in četrti dan, kar pa ne opazimo v prvem, drugem in petem dnevu, ko so frekvence višje in v širšem frekvenčnem razponu. Pri meritvah opravljenih četrti dan (sl. 17D) opazimo rast frekvence v celotnem temperaturnem območju kar sovpada s podatki izmerjenimi peti dan v januarju. V dveh primerih pride do manjšega upada frekvence pri določeni temperaturi vendar že v

naslednjem povišanju temperature frekvenca ponovno naraste. Tudi peti dan (sl. 17E) štiri meritve kažejo rast frekvenca impulzov v celotnem temperaturnem območju. Trend meritev je podoben kot v petem dnevu januarja (sl. 15C).





Slika 17: Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_2 v mesecu februarju. A) Temperaturna odvisnost v 1. dnevu. B) Temperaturna odvisnost v 2. dnevu. C) Temperaturna odvisnost v 3. dnevu. D) Temperaturna odvisnost v 4. dnevu. E) Temperaturna odvisnost v 5. dnevu. Vsaka posamezna linija predstavlja posamezen preparat.

Izstopa meritev pri kateri frekvenca narašča do temperature $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (podobno kot četrti dan), nato ji sledi upad in ponovni dvig.

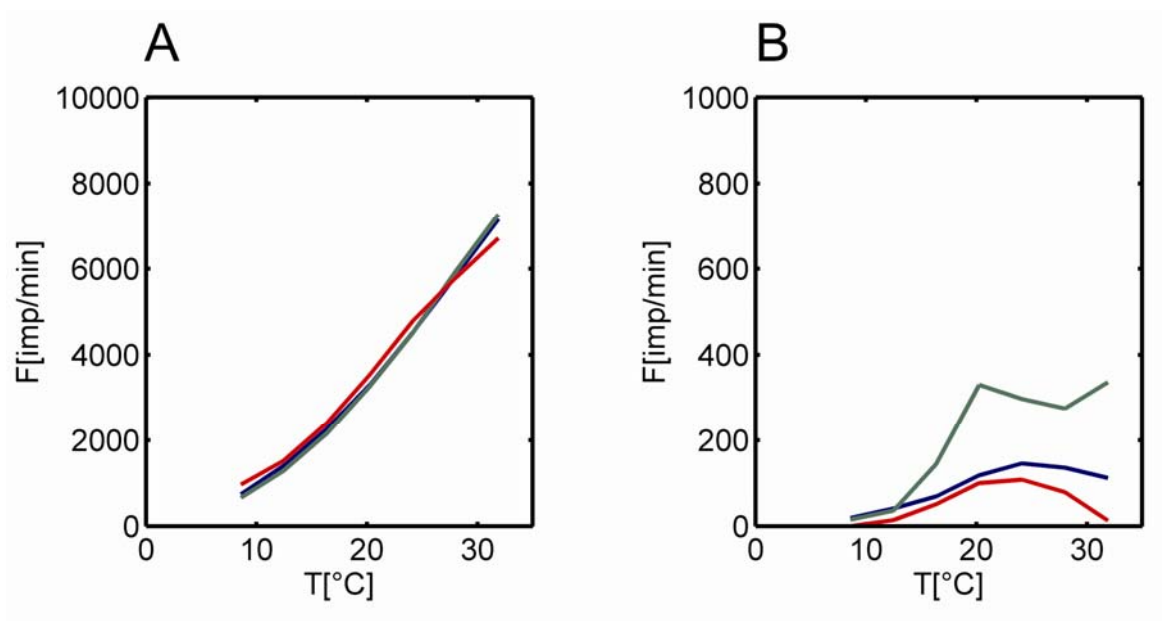
3.2.5 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T_1 in T_2 , termin meritev: januar (toplo \rightarrow hladno)

V nadaljevanju nas je zanimalo, kako se odziva mirovna aktivnost posameznih tipov trihobotrijev, če hladno aklimatizirane živali po krajši aklimaciji na toplo ponovno aklimatiziramo na hladno.

Po pet dnevni aklimaciji na laboratorijsko okolje v januarju smo živali ponovno prenesli na hladno. Učinek smo preverili deveti dan.

Preglednica 3: Januarja izmerjena temperatura in vlažnost na dan poskusov (II).

Januar	zunanje okolje		laboratorij	
Dan	temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	vlažnost [%]	temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	vlažnost [%]
30.1.2008	1,1	97	23,2	23



Slika 18: Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1 in T_2 v januarju, na dan 30.1.2008. A) Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev T_1 . B) Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev T_2 . Vsaka posamezna linija predstavlja posamezen preparat.

Pri trihobotrijih tipa T_1 (sl. 18A) frekvenca narašča v celotnem temperaturnem območju. Opazimo, da so meritve zelo podobne. Frekvence pri višjih temperaturah dosegajo vrednosti podobne tistim v petem dnevu meritev opravljenih meseca januarja (slika 14C). Opazimo, da se mirovna aktivnost po aklimaciji na laboratorijsko okolje kljub izpostavitvi nizkim temperaturam bistveno ne spremeni.

Spremenjeno mirovno aktivnost pa opazimo pri delovanju trihobotrijev tipa T_2 (sl. 18B). Frekvence so si pri temperaturi 5 °C zelo podobne. V dveh meritvah frekvenca impulzov doseže maksimum pri 25 °C in nato upade. Trend sovпада z meritvami opravljenimi prvi in drugi dan v mesecu januarju in prvi, drugi in tretji dan v februarju. Izstopa ena meritev kjer pride do upada frekvence vendar se pri višji temperaturi ponovno dvigne.

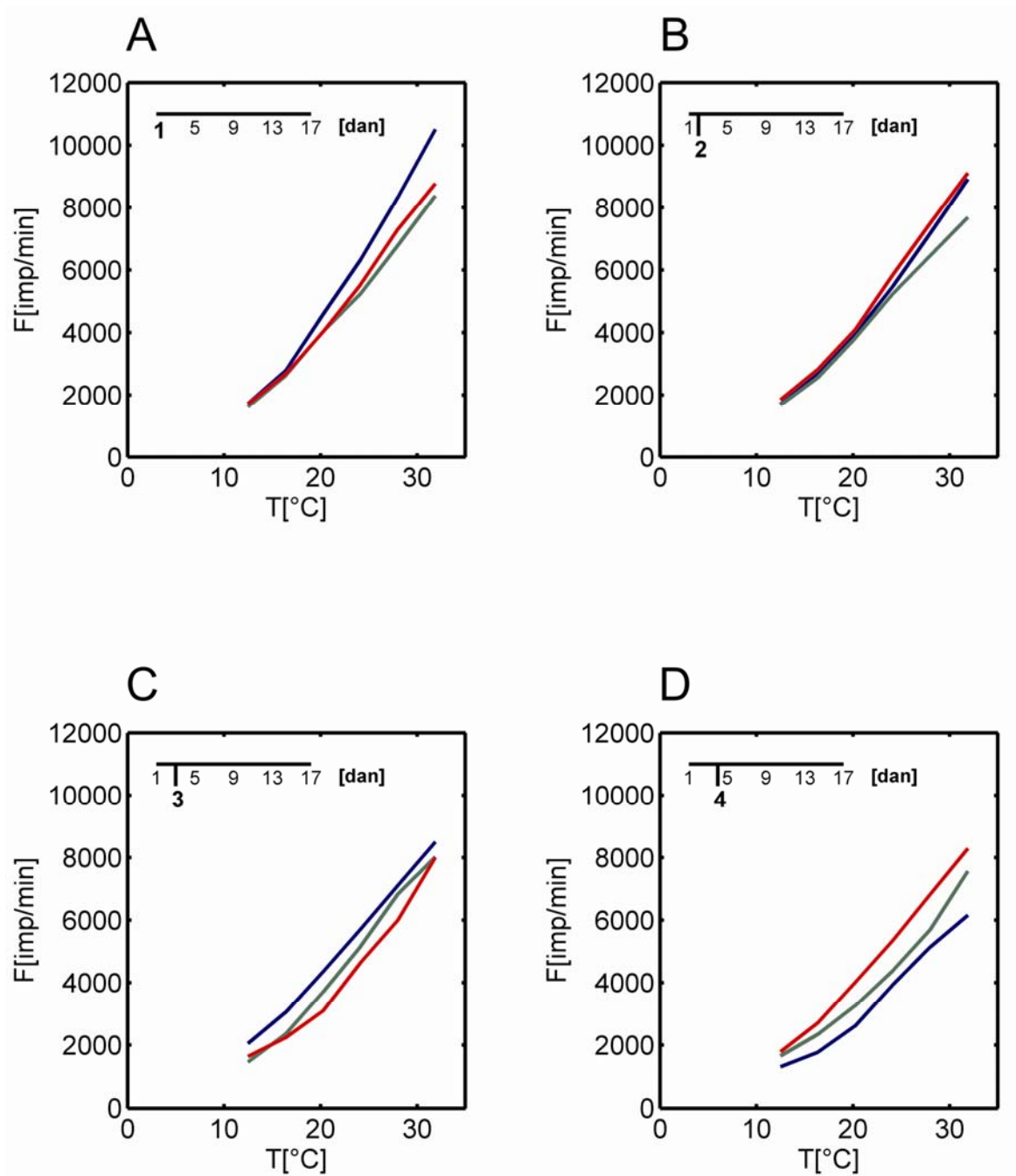
3.2.6 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T₁, termin meritev: maj

(toplo → hladno)

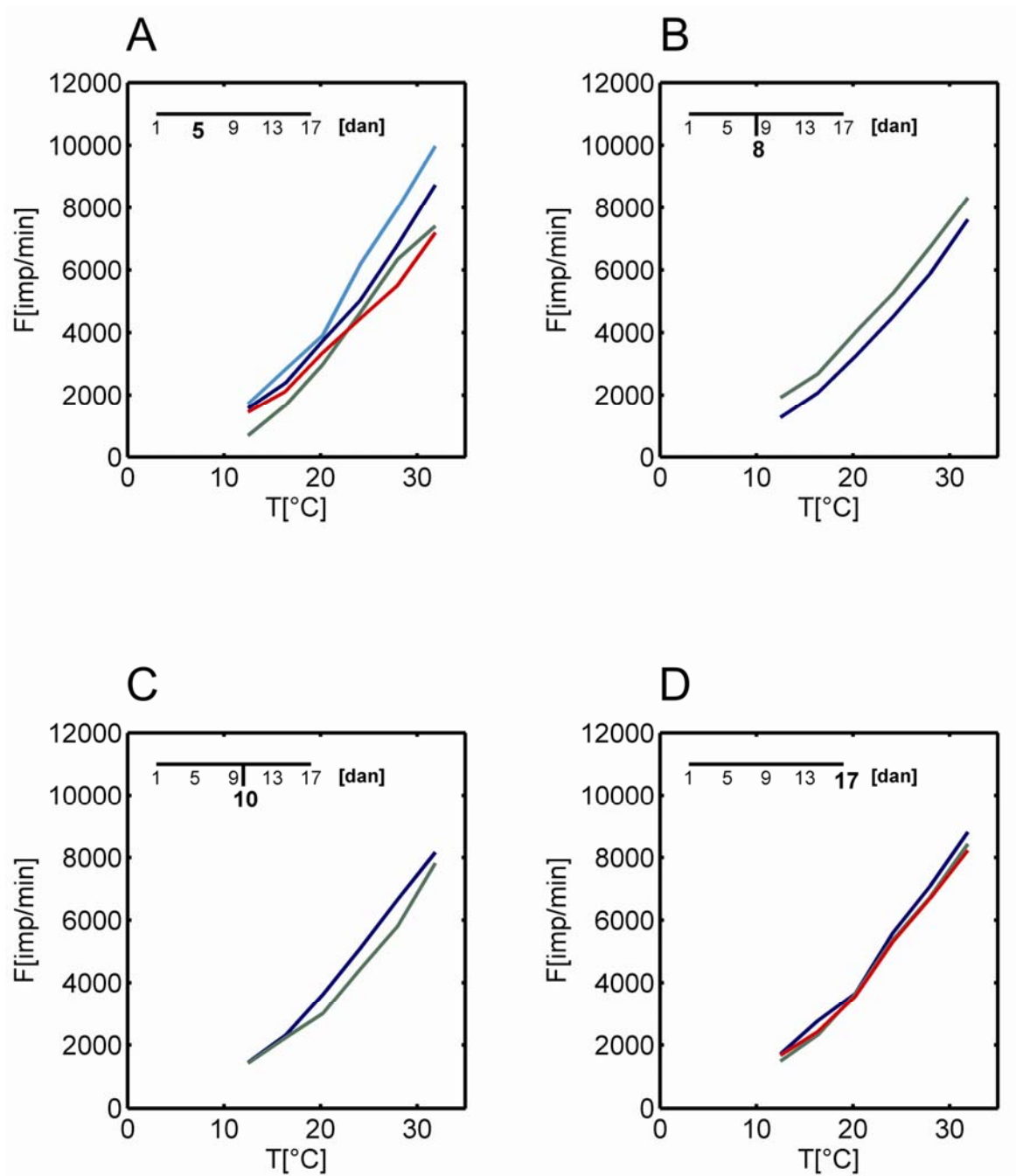
Preglednica 4: Maja izmerjena temperatura in vlažnost na dan poskusov.

Maj	laboratorij		hladilnik	
Dan	temperatura [°C]	vlažnost [%]	temperatura [°C]	vlažnost [%]
1., 19.5.	21,4	48	8,1	63
2., 20.5.	21,6	53	8	58
3., 21.5.	21,6	52	8,3	60
4., 22.5.	21,5	52	8,2	58
5., 23.5.	21,8	52	8,4	62
8., 26.5.	22,7	54	7,9	50
10., 28.5.	23,1	56	8,4	56
17., 4.6.	22,4	61	8,9	56

Meritve frekvence mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T₁ (sl. 19, sl. 20) so si med dnevi podobne. Frekvenca impulzov pri vseh narašča v celotnem temperaturnem območju. Pri nizkih temperaturah opazimo, da so si frekvence med meritvami podobne. Nasprotno se kažejo večja odstopanja v frekvenci mirovne aktivnosti pri višjih temperaturah. Prvi dan izstopa meritev katere frekvenca pri najvišji temperaturi doseže preko 10000 imp/min in četrti dan kjer ena meritev od treh doseže nekoliko nižjo frekvenco pri 35 °C. Pri vseh meritvah opazimo trend, ki ga zasledimo tudi pri letni dinamiki spontane mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T₁ v toplejših mesecih.



Slika 19: Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1 v mesecu maju. A) Temperaturna odvisnost v 1. dnevu. B) Temperaturna odvisnost v 2. dnevu. C) Temperaturna odvisnost v 3. dnevu. D) Temperaturna odvisnost v 4. dnevu. Vsaka posamezna linija predstavlja posamezen preparat.

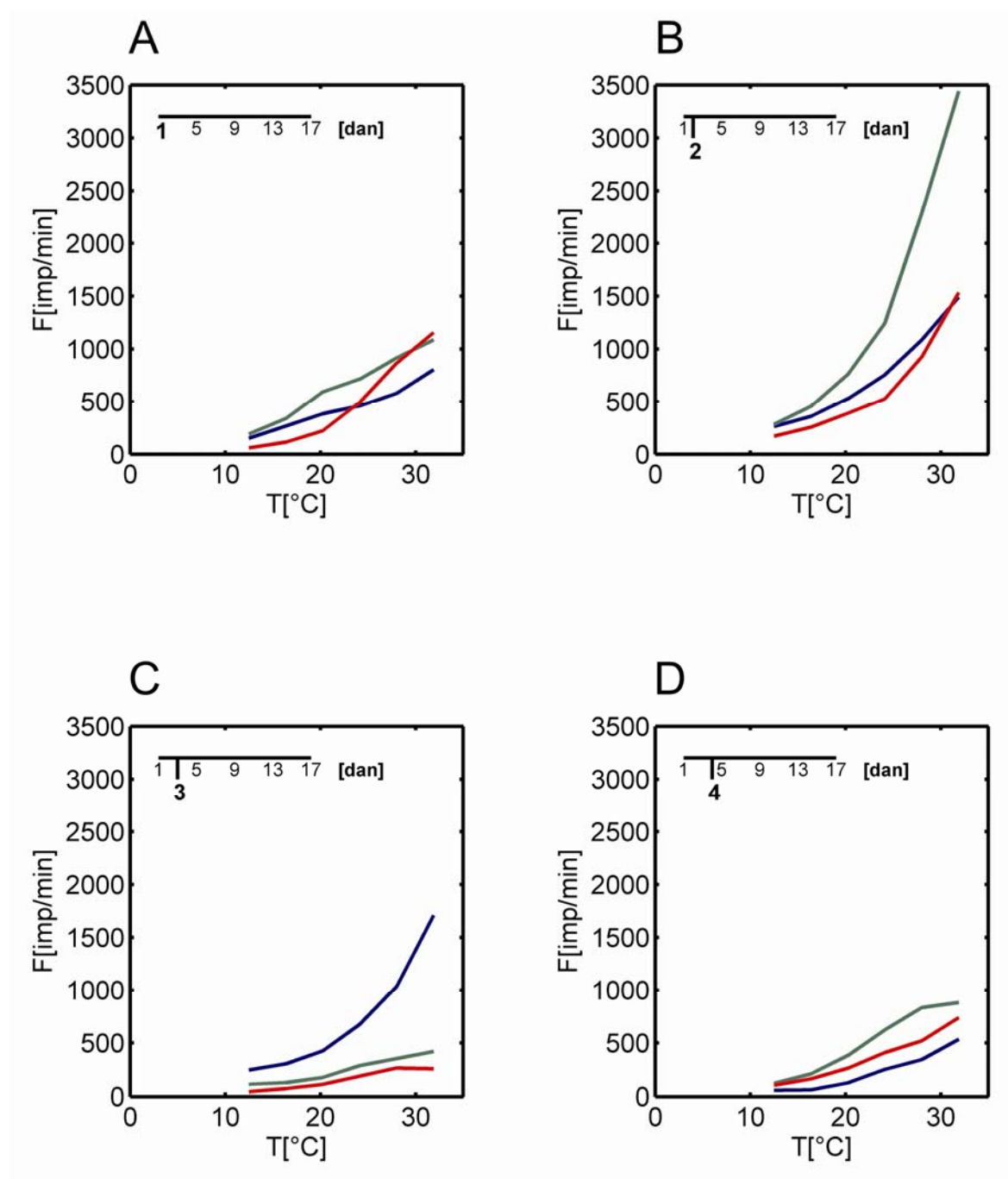


Slika 20: Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_1 v mesecu maju. A) Temperaturna odvisnost v 5. dnevu. B) Temperaturna odvisnost v 8. dnevu. C) Temperaturna odvisnost v 10. dnevu. D) Temperaturna odvisnost v 17. dnevu. Vsaka posamezna linija predstavlja posamezen preparat.

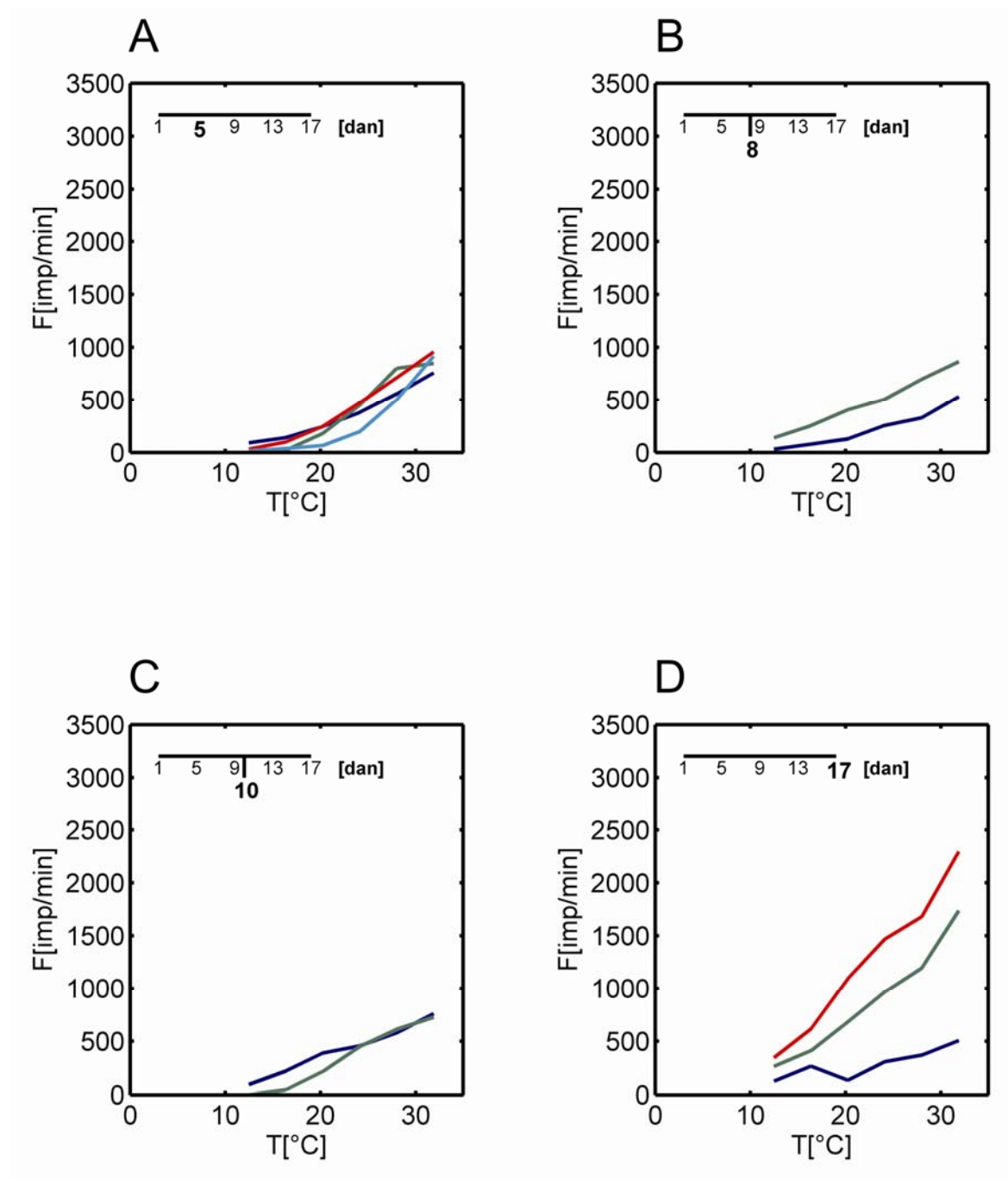
3.2.7 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T₂, termin meritev: maj

(toplo → hladno)

Frekvenca mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T₂ (sl. 21, sl. 22) pri vseh meritvah narašča v celotnem temperaturnem območju podobno kot pri tipu T₁. Opazili smo, da so si frekvenca pri nižjih temperaturah podobne, medtem ko pri višjih temperaturah opazimo večja odstopanja v frekvenci mirovne aktivnosti. Izstopa meritev v drugem dnevu, ko frekvenca pri 35 °C doseže skoraj 3500 imp/min in meritev v tretjem dnevu kjer je pri isti temperaturi frekvenca preko 1500 imp/min. V tretjem dnevu (sl. 21C) prav tako izstopa meritev kjer frekvenca minimalno upade pri najvišji temperaturi. V sedemnajstem dnevu (sl. 22D) po prenosu se v eni meritvi pri 15 °C frekvenca odkloni in upada do temperature 20 °C, po kateri prične ponovno naraščati. Opazimo, da so si frekvenca pri temperaturi 35 °C zelo različne in zajemajo širok frekvenčni interval. Ostali dve meritvi pa pri najvišji temperaturi tudi dosežeta vrednosti preko 1500 imp/min.



Slika 21: Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T_2 v mesecu maju. A) Temperaturna odvisnost v 1. dnevu. B) Temperaturna odvisnost v 2. dnevu. C) Temperaturna odvisnost v 3. dnevu. D) Temperaturna odvisnost v 4. dnevu. Vsaka posamezna linija predstavlja posamezen preparat.



Slika 22: Temperaturna odvisnost mirovne aktivnosti trihobotrijev tipa T₂ v mesecu maju. A) Temperaturna odvisnost v 5. dnevu. B) Temperaturna odvisnost v 8. dnevu. C) Temperaturna odvisnost v 10. dnevu. D) Temperaturna odvisnost v 17. dnevu. Vsaka posamezna linija predstavlja posamezen preparat.

3.2.8 Temperaturna aklimacija trihobotrijev tipa T₃

Preglednica 5: Izmerjena frekvenca impulzov mirovne aktivnosti trihobotrija tipa T₃ za posamezen preparat v januarju, februarju in maju.

Mesec	Dan	meritev	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
Januar	1., 17.1.	1	0	12	17	10	0	0	0
Januar	2., 18.1.	1	5	4	8	0	0	0	0
Januar	5., 21.1.	1	2	17	35	57	67	69	0
Februar	1., 11.2.	1	0	0	0	0	19	8	2
Februar	1., 11.2.	2	8	20	41	50	61	47	16
Februar	2., 12.2.	1	0	5	7	7	2	0	0
Februar	3., 13.2.	1	0	11	23	18	17	0	0
Februar	5., 15.2.	1	0	6	18	24	16	6	0
Februar	5., 15.2.	2	6	6	17	25	16	8	5
Februar	5., 15.2.	3	4	10	14	32	57	46	35
Maj	2., 20.5.	1	/	0	37	43	94	84	353
Maj	8., 26.5.	1	/	0	0	5	17	43	65

V maju je bila začetna temperatura 10 °C. Posnetki so dolgi 120 s, zato so vrednosti enkrat večje od vrednosti v januarju in februarju, ko so posnetki dolgi 60 s. Frekvence so podane z enoto [imp/min].

Mirovno aktivnost trihobotrijev tipa T₃ smo registrirali le pri 12 meritvah od vseh opravljenih. Zaradi pojavljanja aktivnosti pri tako nizkem številu osebkov ni moč izpeljati primerjave podatkov za posamezna časovna obdobja. Pri večini opazimo, da frekvenca doseže vrh pri določeni temperaturi, nato pa z višanjem temperature aktivnost upade ali popolnoma preneha, kar je podobno trendu meritev tipa T₂ opravljenih v hladnih mesecih.

4 RAZPRAVA IN SKLEPI

V raziskovalnem delu smo želeli ugotoviti ali se pri aklimatiziranih živalih v naravnem okolju po prenosu v laboratorij na nove ambientalne pogoje spremeni odziv delovanja mirovne aktivnosti pri različnih tipih trihobotrijev.

Rezultati smiselno potrjujejo in dopolnjujejo rezultate dosedanjih eksperimentov in meritev funkcionalnih lastnosti in adaptacijskih mehanizmov pri stenici *Pyrrhocoris apterus*. Z meritvami spontane mirovne aktivnosti trihobotrijev preko leta smo s pridobljenimi rezultati potrdili, da se različni tipi trihobotrijev petega abdominalnega segmenta različno odzivajo na spremembo temperature v okolju. Očitno je, da temperaturna nihanja preko leta bistveno ne vplivajo na spontano mirovno aktivnost trihobotrijev tipa T₁. Frekvenca živčnih impulzov pri višjih temperaturah v hladnih mesecih resda nekoliko upade in se deloma razlikuje od poletnih mesecev, vendar trend v osnovi ostane nespremenjen. Večje spremembe se pojavijo pri tipu T₂. V celotnem temperaturnem območju je v poletnih mesecih naraščanje frekvence spontane mirovne aktivnosti podobno kot pri T₁. Meritve opravljene v hladnih mesecih pa so pokazale popolnoma drugačen odziv, ki ne sovпада z lastnostmi tipa T₁. Frekvenca spontane mirovne aktivnosti pri T₂ v tem primeru doseže vrh pri temperaturi med 20 °C in 25 °C, in nato z višanjem temperature upade. To dodatno potrjuje, da gre pri tipu T₁ za drugačen odziv na spremembo temperature kot pri tipu T₂.

Tudi pri tipu T₃ se pojavlja spontana mirovna aktivnost, vendar ne pri vseh preparatih. Trend, ki se pojavlja pri T₃ preko celega leta je podoben trendu meritev trihobotrijev tipa T₂, opravljenih v hladnih mesecih, kar dokazuje, da gre tudi pri T₂ in T₃ za drugačen odziv na spremembo temperature.

Kljub sobivanju senzil v istem receptorskem polju, se na videz podobne enote po funkcionalnih lastnostih različno odzivajo na spremembo termičnih pogojev. Že predhodni rezultati so pokazali, da so trihobotriji tipa T₁ drugačni od tipa T₂ in T₃, kar dodatno potrjujejo odzivi na termično adaptacijo.

Glavni induktor diapavze je kratek dan. Na potek diapavze vplivajo tudi nizke temperature. Rezultati meritve, pri katerih smo živali, aklimatizirane na hladno, v času diapavze prenesli v laboratorij na nove, tople temperaturne pogoje, sovpadajo z učinki diapavze. Peti dan po prenosu na nove ambientalne pogoje se pokaže vpliv aklimacije. Rezultati pri T_1 , prvi dan po prenosu, sovpadajo z rezultati v hladnem delu leta. Frekvenca impulzov narašča v celotnem temperaturnem območju in je pri najvišjih temperaturah nekoliko nižja, kar je značilno za meritve opravljene v hladnih mesecih, vendar trend ostaja nespremenjen. Peti dan pa krivulja sovpada z rezultati v poletnih mesecih letne dinamike spontane mirovne aktivnosti. Pri tipu T_1 torej ni vidnega večjega odstopanja v endogeni aktivnosti trihobotrijev.

Pri T_2 pa je prvi dan še viden očiten prelom v poteku frekvence mirovne aktivnosti. Peti dan pa je kljub nespremenjenemu dnevno-nočnemu režimu prišlo do aklimacije, ki se kaže kot naraščanje frekvence spontane mirovne aktivnosti v celotnem temperaturnem območju, tudi značilno za poletne mesece. Z rezultati smo potrdili, da lahko potek mirovne aktivnosti trihobotrijev hladno adaptirane živali pod termičnim vplivom preide na delovanje značilno za poletne razmere.

Pri živalih aklimiranih na toplo v januarju, je razvidno, da ob devet dnevni izpostavitvi na hladno, pri tipu T_2 pride do podobnega odziva v frekvenci mirovne aktivnosti, kot je to značilno za hladne mesece. Pri T_1 trend ostane podoben trendu po aklimaciji na toplo.

V maju, na toplo aklimatiziranim živalim se mirovna aktivnost po prenosu na hladno tudi sedemnajsti dan bistveno ne spremeni. Trend ostane značilen za meritve v poletnih mesecih in ne pride do aklimacije na hladne pogoje.

Rezultati, ki smo jih zbrali v okviru diplomske naloge odpirajo tudi vprašanje kako se odziva trihobotrij $T_{12}/6$. Zato bi bilo vredno v nadaljnjih poskusih začeti z meritvami adaptacijskih sprememb na trihobotriju tipa $T_{12}/6$. Trihobotrij se nahaja na 6. abdominalnem segmentu. Po funkcionalnih lastnostih pripada tipu T_1 , po stopnji mirovne aktivnosti pa med tip T_1 in T_2 . Smiselno bi bilo po istem protokolu opraviti meritve in rezultate primerjati.

Predvidevati moramo, da so živali iz iste generacije odvzete za meritve v januarju in februarju bile v maju starejše in drugačnem fiziološkem stanju. V januarju so bile živali še mlade, v obdobju diapavze, medtem ko so majske živali starejše in v začetku reproduktivnega obdobja. Sklepamo, da bi bilo pri meritvah adaptacijskih mehanizmov potrebno uporabiti živali, ki so v podobnem fiziološkem stanju. S tem bi lahko izključili morebitne dvome, ki pod vprašaj postavljajo interpretacijo rezultatov zaradi različnega fiziološkega stanja živali. Z gojenjem v laboratoriju bi lahko spremljali fiziološko stanje živali. S tem bi lahko opravili več meritev po določenem protokolu, kar bi doprineslo večjo verodostojnost rezultatov in možnost uporabe raznih statističnih orodij.

S predpostavko, da se z nastopom nizkih temperatur spremeni sestava membrane, ki vpliva na mirovno aktivnost trihobotrijev, bi bilo smiselno živali gojiti v laboratorijskem okolju z natančno določenim dnevno-nočnim ritmom. V tem primeru naj ne bi prišlo do kontrolirane indukcije diapavze in aktivacije mehanizmov, ki omogočajo preživetje neugodnih nizkih temperatur.

5 POVZETEK

Stenice *P. apterus* v naravi najdemo preko celega leta. Hladno zimsko obdobje preživljajo v stanju imaga. v sončnih dneh, živali kljub nizkim temperaturam zraka priplezajo na debla dreves. Pri tem se temperatura njihovega telesa za kratek čas dvigne tudi do 28 °C.

Na robu 5. segmenta se na vsaki strani zadka nahaja skupina treh trihobotrijev, ki pripadajo tipom T₁, T₂ in T₃. Spontano nastajanje živčnih impulzov je posebnost različnih tipov receptorskih celic. Spontana mirovna aktivnost povečuje občutljivost receptorja, nastavlja ničelni nivo in omogoča kodiranje smeri dražljaja. Redno spontano aktivna sta trihobotrija tipa T₁ in T₂, medtem ko spontano aktivnost trihobotrija tipa T₃ registriramo pri približno 10 % preparatov.

V naši raziskavi smo preučevali temperaturno odvisnost spontane mirovne aktivnosti različnih tipov trihobotrijev 5. abdominalnega segmenta pri stenici *P. apterus*. V prvem sklopu poskusa smo izvedli meritve letne dinamike spontane mirovne aktivnosti trihobotrijev. Živali so bile čez leto aklimatizirane v naravnim podobnem okolju, na senčni strani s stalnim pretokom zraka, vlažnostjo in svetlobo. Meritve smo opravili med novembrom leta 2006 in oktobrom leta 2007. Z volframovimi elektrodami smo registrirali zunajcelične akcijske potenciale in jih z diferenciacijo ločili po posameznih tipih.

Z analizo smo izdelali diagrame, ki kažejo, da je vpliv temperature na spontano mirovno aktivnost trihobotrijev tipa T₁, preko leta manjši kot na tip T₂. V toplih mesecih je trend tipa T₂ podoben kot pri T₁, medtem ko pride v hladnih mesecih do značilnega preloma krivulje in upada frekvence spontane mirovne aktivnosti pri tipu T₂. Tudi pri tipu T₃ se pojavlja spontana mirovna aktivnost, vendar ne pri vseh preparatih. Trend, ki se pojavlja pri T₃ preko celega leta je podoben trendu meritev trihobotrijev tipa T₂, opravljenih v hladnih mesecih. Rezultati potrjujejo, da se preko leta različni tipi trihobotrijev različno odzivajo na temperaturne spremembe.

V drugem sklopu poskusa smo opravili meritve vpliva temperature na mirovno aktivnost trihobotrijev pri različno adaptiranih živalih. Poskus je bil sestavljen iz treh serij meritev

opravljenih na isti populaciji. Pri dveh serijah smo hladno adaptirane živali prenesli v laboratorijske pogoje. Rezultati so pokazali, da v petem dnevu pride do aklimacije na ambientalne pogoje, ki se kaže v podobnem trendu mirovne aktivnosti kot je značilen za poletne mesece. V tretji seriji meritev pa so bile živali aklimatizirane na toplo in po prenosu na hladno tudi sedemnajsti dan ni prišlo do opaznih sprememb v poteku mirovne aktivnosti trihobotrijev.

6 VIRI

- Buno W, Monti-Bloch L, Mateos A, and Handler P. 1981. Dynamic properties of cockroach "threadlike" hair sensilla. *J Neurobiol*, 12 No. 2: 123-141
- Cegnar T. 2008. Naše okolje. Bilten Agencije RS za okolje, januar 2008, XV, 1
- Cegnar T. 2008. Naše okolje. Bilten Agencije RS za okolje, februar 2008, XV, 2
- Cegnar T. 2008. Naše okolje. Bilten Agencije RS za okolje, maj 2008, XV, 5
- Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F. 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.*, 242: 1-10
- Dagan D, Volman S. 1982. Sensory basis for directional wind detection in first instar cockroaches, *Periplaneta Americana*. *J Comp Physiol*, 147: 471-478
- Drašlar K. 1973. Functional properties of trichobothria in the bug *Pyrrhocoris apterus* (L.). *J Comp Physiol*, 84: 175-184
- Drašlar K. 1980. Physiology of trichobothria in the bug *Pyrrhocoris apterus* (L.). Academia Scientiarum et Artium Slovenica, Dissertationes XXII/5
- Drašlar K., Škorjanc A. 2003. Functional properties of trichobotria in the bug *Pyrrhocoris apterus*. V: Elsner N. (ur.), Zimmermann H. (ur.). *The neurosciences from basic research to therapy*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003, str. 359
- Gaffal K. P. 1976. The stimulus transmitting apparatus in the trichobotria of the bugs *Pyrrhocoris apterus* L. and *Dysdercus intermedius* (Dist.) and its influence on the dynamic of excitation in the sensilla. *Experientia*, 32:166-168

- Gillespie P. G., Walker R. G. 2001. Molecular basis of mechanosensory transduction
Nature, 413:194-202
- Gnatzy W. 1976. The ultrastructure of the thread-hairs on the cerci of the cockroach
Periplaneta americana L.: The intermoult phase. *J. Ultrastruct. Res.*, 54: 124-134
- Hamon A., Guillet J. C. 1994. Some electrical properties of the cercal anemoreceptors of
the cockroach, *Periplaneta americana*. *Comp Biochem Physiol*, 107A: 357-368
- Hayakawa Y. 1985. Activation mechanism of insect fat body phosphorylase by cold. *Insect
Biochemistry*, 15: 123-128
- Hazel J.R., 1997. Thermal adaptation in biological membranes: beyond homeoviscous
adaptation. *Adv. Molec. Cell Biol. (Thermobiology)*, 19: 57-101
- Hodek I. 1968. Diapause in females of *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera). *Acta
Entomol. Bohemoslov.*, 65: 422-435
- Hodkova M., Berkova P., Zahradničkova H. 2002. Photoperiodic regulation of the
phospholipid molecular species composition in thoracic muscles and fat body of
Pyrrhocoris apterus (Heteroptera) via an endocrine gland, corpus allatum. *J Insect
Physiol*, 48: 1009-1019
- Hodkova M., Hodek I. 1997. Temperature regulation of supercooling and gut nucleation in
relation to diapause of *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Cryobiology*, 34: 70-79
- Hodkova M., Šimek P., Zahradničkova H., Novakova O. 1999. Seasonal changes in the
phospholipid composition in thoracic muscles of a heteropteran, *Pyrrhocoris apterus*.
Insect Biochem Mol Biol, 29: 367-376
- Keil T. A. 1997a. Comparative morphogenesis of sensilla: A review, *Int. J. Insect Morphol.
& Embryol.*, 26(3/4): 151-160

- Keil T. A. 1997b. Functional morphology of insect mechanoreceptors, *Microscopy Research and Technique*, 39: 506-531
- Koštal V., Šimek P. 2000. Overwintering strategy in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera): the relations between life-cycle, chill tolerance and physiological adjustments. *Journal of Insect Physiology*, 46: 1321-1329
- Koštal V., Šlachta M., Šimek P. 2001. Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Insecta). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 130: 365-374
- Landolfi MA, Miller JP. 1995. Stimulus-response properties of cricket cercal filiform receptors. *J Comp Physiol, A* 177: 749-757
- Ohtsu T., Kimura M.T., Katagiri C. 1998. How *Drosophila* species acquire cold tolerance. Qualitative changes of phospholipids. *Eur. J. Biochem.*, 252: 608-611
- Shaefer W.C. 1975. Heteropteran Trichobotria (Hemiptera: Heteroptera). *J. Insect Morphol-Embriol.*, 4, 3: 193-264
- Sinensky M. 1974. Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 522-525
- Slama K. 1964. Hormonal control of respiratory metabolism during growth, reproduction, and diapause in female adults of *Pyrrhocoris apterus* L. (Hemiptera). *Journal of Insect Physiology*, 10: 283-303
- Smith D. S. 1969. The fine structure of haltere sensilla in the blowfly, *Calliphora erythrocephala* (Meig.), with scanning electron microscopic observations on the haltere surface. *Tissue Cell*, 1: 443-484

- Socha R., Šula J., Zemek r. 1997. Feeding, drinking and digestive enzyme activities in long-and short day females of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *Physiological Entomology*, 22: 161-169
- Socha R., Šula J. 1992. Voltinism and seasonal changes in haemolymph protein pattern of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) in relation to diapause. *Physiological Entomology*, 17: 370-376
- Stanley-Samuelson D.W., Jurenka R.A., Cripps C., Blomquist G.J., De Renobales M. 1988. Fatty acids in insects: Composition, metabolism, and biological significance. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 9: 1-13
- Storey K.B., Storey J.M. 1991. Biochemistry of cryoprotectants. In: Lee, R.E.Jr., Denlinger, D.L. (Eds), *Insects at Low Temperature*. Chapman and Hall, New York and London, pp. 64-93
- Škorjanc A. 2002. Določitev funkcionalnih lastnosti trihobotrijev na petem členu zadka pri stenici *Pyrrhocoris apterus*. Diplomaska naloga. Ljubljana, 2002
- Škorjanc A. 2008. Potek vzburjenja in adaptacije filiformnih senzil pri stenici *Pyrrhocoris apterus* (Insecta: Heteroptera). Doktorska disertacija. Ljubljana 2008
- Škorjanc A., Batagelj S., Drašlar K. 2007. Thermal acclimatization does not affect the resting activity of type T1 trichobotrium in the firebug (*Pyrrhocoris apterus*; Heteroptera). *Acta biologica slovenica*, 50, 2: 85-92
- Škorjanc A., Zupančič G., Drašlar K. 2009. Multiple mechanisms generate the resting activity of filiform sensilla in the firebug (*Pyrrhocoris apterus* L.; Heteroptera). *J. Comp. Physiol. A.*, DOI 10.1007/s00359-009-0440-9

- Šula J., Kodrik D., Socha R. 1995. Hexameric haemolymph protein related to adult diapause in the red firebug, *Pyrrhocoris apterus*; (L.) (Heteroptera). *Journal of Insect Physiology*, 41: 793-800
- Tautz J. 1977. Reception of medium vibration by thoracic hairs of caterpillars of *Barathra brassicae* L. (Lepidoptera, Noctuidae). I. Mechanical properties of the receptor hairs. *J Comp Physiol*, 118(A): 13-31
- Tautz J. 1978. Reception of medium vibration by thoracic hairs of caterpillars of *Barathra brassicae* L. (Lepidoptera, Noctuidae). II. Response characteristic of the sensory cell. *J Comp Physiol*, 125(A): 67-77
- Thurm U. 1974. Basics of the Generation of Receptor Potentials in Epidermal Mechanoreceptors of Insects. V: Schwartzkopff J (ed) *Mechanoreception*. Abh Rhein-Westf Akad Wiss, 53: 355-385
- Thurm U. 2001. *Mechanosensorik*. V: Dudel J (ed.), Menzel R (ed.), Schmidt RF. (ed.): *Neurowissenschaften: Vom Molekül zur Kognition*. Springer-Verlag, pp. 331-338
- Thurm U., Küppers J. 1980. Epithelial physiology of insect sensilla. V: *Insect Biology in the Future*. M. Locke and D. S. Smith, eds. Academic Press, New York, pp. 735-758
- Tullgren A. 1918. Zur Morphologie und Systematik der Hemipteren I. *Entomologisk Tidskrift*, 39: 113-133
- Zachariassen K.E. 1985. Physiology of Cold Tolerance in Insects. *The American Physiological Society*, 65, 4: 799-832

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Kazimirju Drašlarju, ki me je z izkušnjami in nasveti pripravil k bolj fiziološkem razmišljanju in si vzel čas potreben za nastajanje diplome.

Posebej se zahvaljujem dr. Alešu Škorjancu, za več čas, ki si ga je vzel, da mi je od prvega trenutka pomagal pri izvajanju poskusa in izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se doc. dr. Petru Stušku, ki mi je nemalokrat z izvirnimi idejami in obiski v laboratoriju dvignil energijo na višji energijski nivo.

Zahvalil bi se tudi doc.dr Gregorju Zupančiču in asist. dr. Gregorju Belušiču, za nasvete in za odpravljanje marsikaterih, zame nerešljivih, tehničnih vprašanj.

Zahvalil bi se Suzani Logar za marsikatero debato in vzpodbudo.

Naj se zahvalim mojim staršem, ki so mi omogočili študij in mi vedno stali ob strani.

Zahvaljujem se Andreji za vso podporo, brez katere verjamem, da bi bil študij še kakšno leto daljši.

Hvala tudi vam, prijatelji, sošolci, da ste mi stali ob strani in mi pomagali pri marsikaterih odločitvah.

Hvala!