# UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Janez PREŠERN

Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste Nezara viridula (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) proti viru vibracijskega signala

DOKTORSKO DELO

LJUBLJANA, 2007

# UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Janez PREŠERN

Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste Nezara viridula (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) proti viru vibracijskega signala

DOKTORSKO DELO

# Neurobiological fundamentals of orientation of the stink bug *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) towards the source of vibration signal

PhD THESIS

LJUBLJANA, 2007

*Obstaja sedem čustev: veselje, jeza, hrepenenje, ljubezen, strah, žalost in sovraštvo. Če se človek ne prepusti nobenemu od teh, je potrpežljiv.* 

Tokugava Ijejasu, 1543-1616

Doktorska naloga je bila opravljena na Oddelku za entomologijo Nacionalnega inštituta za biologijo. Pregledovanje preparatov z apotomom smo opravili na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete UL.

Komisija za podiplomski študij Biotehniške fakultete je za mentorja doktorske naloge imenovala prof. dr. Andreja Čokla.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Kazimir Drašlar

Mentor: prof. dr. Andrej Čokl

Član: prof. dr. Dušan Devetak

Datum zagovora: 19.12.2007

Delo je plod lastnega raziskovalnega dela.

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.

Janez Prešern, univ. dipl. biol.

#### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

#### ŠD Dd

- DK 591.18:591.51:595.75(043.3)=863
- KG Nezara viridula/Heteroptera/žuželke/nevrofiziologija/internevroni/orientacija/ vibracijska komunikacija/časovni zamik
- AV PREŠERN, Janez
- SA ČOKL, Andrej mentor
- KZ SI 1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2007
- IN Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) proti viru vibracijskega signala
- TD doktorsko delo
- OP XXIII, 166 str., 1 tab.,171 sl., 1pril., 209 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- Čut za vibracije podlage pri žuželkah ima več funkcij. Med njimi so zelo pomembne zaznavanje AI predatorja, plena in spolnega partnerja. Komunikacija preko podlage je v odnosu do zvočne komunikacije pri žuželkah evolucijsko izvorna, vendar je v primerjavi s slednjo precej slabše raziskana. Zlasti pomanjkljivo je raziskano področje določanje lokacije partnerja oz. orientacije proti viru vibracijskih dražljajev. Vrsta stenice zelena smrdljivka Nezara viridula je primeren objekt za raziskavo tega problema, ker je dobro znana njena biologija, razširjenost in vedenje, poznane pa so tudi lastnosti nekaterih nevronov v živčnem sistemu. Mirujoča samica oddaja pozivni napev, samec pa ji odgovarja in jo išče na rastlini. Na križišču - razvejitvi stebla – se običajno ustavi in primerja signale na vejah tega križišča. Za določanje smeri izvora vibracije bi lahko zelena smrdljivka uporabila tako razliko v amplitudi signala na različnih vejah ali časovni zamik v prihodu signala na različne dele križišča. Ugotovljeno je bilo, da je amplituda vibracijskega signala nezanesljiv podatek, saj je bilo izmerjeno, da je v dobri tretjini višja na strani, ki je nasprotna viru. Nasprotno se je pokazalo, da bi bil časovni zamik uporabnejši parameter, saj so bili pri fižolu pri prehodu čez razvejišče izmerjeni 2-4ms zamiki med eno in drugo vejo razvejitve. Z znotrajcelično registracijo aktivnosti v centralnem in protorakalnem ganliju smo preučevali odzive internevronov na različno velike časovne zamike med prihodom dražljajev iste amplitude na različne noge (vhode). Pokazali smo, da živčni sistem zelene smrdljivke lahko zazna zamik velikosti 0,5 ms, kar bi zadostovalo za zgoraj omenjeno časovno razliko. Sposobnost zaznave take velikostne razlike smo pokazali tako pri primerjanju vhodov iz istega para nog kot tudi pri primerjanju vhodov s sprednje in kontralateralnih zadnjih nog. Ob večanju časovnih razlik razvrščanje odzivov posamezne celice ni bilo tako natančno, napake pri razvrščanju so bile v nekaterih primerih velikostnega razreda treh milisekund. Glavni mehanizem določanja smeri je kontralateralna inhibicija. Ta je bila v primeru dominance kontralateralnega ekscitacijskega vhoda sicer prekrita z ekscitacijio, vendar je bil njen prispevek dovolj močan, da so se odzivi pri razvrščanju ločili. V večini primerov je bila inhibicija dominantna; njeno delovanje se je pokazalo kot povečanje latence prvega akcijskega potenciala. V nekaterih primerih pa smo zaznali inhibitorno delovanje le pri frekvenčnem testiranju, ko je bile latence odzivov večje in relativna jakost odzivov manjša pri istočasnem obojestranskem draženju. Opisali smo tudi dva tipa spuščajočih se, spontano aktivnih, internevronov, katerih soma je v tritocerebrumu, razvejitve pa unilateralno v nevropilah vseh treh nog. Po obliki in delovanju pa domnevamo, da gre za internevrone povratne zanke.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd

- DC 591.18:591.51:595.75(043.3)=863
- CX Nezara viridula/Heteroptera/insects/nevrofiziologija/interneurons/orientation/ vibrational communication/time delay
- AU PREŠERN, Janez
- AA ČOKL, Andrej supervisor
- PP SI 1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
- PY 2007
- TI Neurobiological fundamentals of orientation of the stink bug *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) towards the source of vibration signal
- DT PhD thesis
- NO XXIII, 166 p., 171 fig., 1 ann., 209 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- Vibrational sense of insects has multiple roles, the most important being detection of predators, prey AB and sexual partners. Although substrate communication appears to be evolutionary older and more widespread than acoustic communication, it has received much less attention. Shieldbug Nezara *viridula* is a suitable object for tackling the problem of orientation towards the vibrational source and localisation of a partner, since its biology, ecology and behaviour are well investigated, and the properties of some of the neurons in its central nervous system have already been described. While a female N. viridula remains still on a plant during calling, a male responds to its song and searches for her. At a node, a male usually stops to compare the signal inputs between the branches. Amplitude difference and time delay could both be used as directional cues in such a situation. Amplitude difference has already been shown as unreliable, time delay, however, seems more informative as crossing of a node of a bean plant causes a 2-4 ms time delay in signal arriving to the two branches. By recording intracellularly from the central and the prothoracic ganglion we studied interneuronal responses to time differences in the signal arrival time to the inputs (the legs). We showed that the central nervous system of *N. viridula* can detect a time difference as small as 0.5 ms. This was demonstrated both when the legs of the same pair were stimulated and when we stimulated the contralateral front and hind legs. Responses to increasing time differences were correctly sorted by the leading side but in clustering, errors were up to 3 ms. The main mechanism of directional orientation is contralateral inhibition. In the case of a stronger excitatory input, the inhibition was masked by excitation, however, its influence on spike timing was large enough for correct clustering of the responses. Inhibitory input was most often dominant and influenced the latency of the first spike of the response. In a couple of cases we noticed inhibitory influence when performing frequency sensitivity tests: the relative strength of the response was lower and the latency was longer when both sides were stimulated simultaneously compared to the situation of one-sided stimulation. We have also described two descending and spontaneously active neurons with somata in tritocerebrum. Both branch unilaterally in neuropils of each of the three legs of one side. Considering their morphology and functional properties, we suppose they could be part of a feedback loop.

#### **KAZALO VSEBINE**

Ključna dokumentacijska inforacija	IV	
Key words documentation		
Kazalo vsehine		
Kazalo slik		
	VII VVII	
Kazalo tabel	XXII	
Slovarček	XXIII	
1 UVOD	1	
1.1 ŠIRJENJE VIBRACIJSKIH SIGNALOV PO RASTLINAH	3	
1.2 ORIENTACIJA PROTI VIRU VIBRACIJSKEGA DRAŽLJAJA PRI ČLENONO	ŽCIH4	
1.2.1 Pajkovci	4	
1.2.2 Žuželke	5	
1.3 VIBRACIJSKA KOMUNIKACIJA STENICE VRSTE NEZARA VIRIDULA	6	
1.4 MORFOLOŠKE IN FUNKCIONALNE ZNAČILNOSTI VIBRORECEPTORJEV	V 8	
1.5 CENTRALNI ŽIVČNI SISTEM VRSTE STENICE NEZARA VIRIDULA	11	
1.5.1 Funkcionalne in morfološke značilnosti vibracijskih internevronov	pri vrsti	
<i>Nezara viridula</i> in nekaterih drugih žuželkah	11	
1.6 NAMEN RAZISKAVE	13	
2 MATERIALI IN METODE		
2.1 POSKUSNE ZIVALI IN PREPARACIJA	14	
2.2 ZNOTRAJCELICNO ODVAJANJE POTENCIALOV INTERNEVRONOV IN		
IONTOFOREZA		
2.3 EKSPERIMENTALNI PROTOKOL		
2.4 ANALIZA ODZIVOV ZIVCNIH CELIC		
2.5 REKONSTRUKCIJA OBLIKE ZIVCNIH CELIC		
2.6 POIMENOVANJE ZIVCNIH CELIC		
3 REZULIATI		
3.1 TIPI INTERNEVRONOV S KOMBINIKANIMI INHIBITORNIM/EKSCITATO	KNIM 22	
3 1 1 Draženje prvega para nog (situacija levo - desno)	22	
PTG-TB-1a	22	
C1	27	
3.1.2 Draženie leve druge in tretie ter prve desne noge (situacija zadaj - spre	edai) 28	
C2		
3.2 TIPI INTERNEVRONOV, PRI KATERIH SE OB POVEČEVANJU ČASOVNEO	GA	
ZAMIKA SKOKOVITO ZVIŠA LATENCA PRVEGA AKCIJSKEGA POTENCI	ALA31	
3.2.1 Draženje prvega para nog (situacija levo - desno)		
PTG-TC-1		
PTG-TI-1		
PTG-TI-2	41	
PTG-DC-2	46	
3.2.2 Draženje druge in tretje leve ter prve desne noge (situacija zadaj - spre	edaj) 51	
PTG-TC-2	51	

	3.2.3 Draženje zadnjega para nog (situacija zadaj levo - zadaj desno)	
	2.2 TIDI INTERNEVRONOV KATERIH LATENCE ODCOVOROV ZVEZNO SU	
	5.5. TIPI INTERNEV KUNUV, KATERIH LATENCE UDUUVUKUV ZVEZNU SL. VEČANILI ČASOVNE DAZLIVE V ZAČETVU DDAŽENIJA	EDIJO 60
	VECANJU CASUVINE KAZLIKE V ZACETKU DRAZENJA	00 60
	DTC TP 1b	, 00 60
	DTC 9.9	
	PTG I C 1	
	3 3 2 Dražanja druga in tratja lava tar nrva desna noga (situacija zadaj - snr	
	PTG_DC_3	uaj) / /
	CG-AC-2b	
	C3	
	C1	
	3 3 3 Dražanja zadnjaga nara nog (situacija lavo zadaj - dosno zadaj)	92
	5.5.5 Drazenje zadnjega para nog (situacija ievo zadaj - desno zadaj)	
	$CG \land C \land$	100
	CG-AC-7	105
	3 4 CELICE S SOMO V MOŽGANSKIH GANGLIJIH	100
	3.4.1 Dražanja prvoga para pog (situacija lava dosna)	109
	TC DL 10	100
	3 1 2 Drožanje druge in tratje leve ter prve desne noge (situacije zadaj spre	109 dai)111
	TC DI 1b	111
	2.5 DDUGE CELICE	111
	3.5.1 Droženje prvega para pog (situacija lavo despo)	110
	DTG DC 1	116
	2.6 OPDEL AVA ODZIVOV CELICE Z METODO DO VAN DOSSUM U	110
	DTG TP 10	119
		120
	$\Gamma I O - D C - 2$	121
	DTC TD 1h	123
	F IO-1D-10	124
		123
	2 7 DDECLEDNICA	120
4	5.7 FREULEDNICA	120
4		120
	4.1 U CELICAH.	130
	4.1.1 Tipi internevronov, ki odgovarjajo na draženje z innibicijo in ekscitaci 4.1.2 Tipi internevronov, pri katorih organakoložili skolvovito povoženje later	jo 130
	4.1.2 Tipi internevronov, pri katerin smo zabelezili skokovito povečanje later	ice prveg
	A 1.2 The istance between the test of the second se	132
	4.1.3 11p1 internevronov, katerin latence odgovorov zvezno sledijo vecanj	u casovn
	raziike v zacetku urazenja	133 1 <i>25</i>
	4.1.4 1 ipi internevronov s somo v mozganskin ganglijih	135
	4.1.5 Internevron tipa PIG-DU-1	135
	4.2 PKAU KUDIKANJA CASUVNIH ZAMIKUV	130
	4.3 POMEN SPREMEMBE LATENCE PRVEGA AKCIJSKEGA POTENCIALA (F)	SL) 137
	4.4 KOMENTAR K REZULTATOM METODE PO VAN ROSSUM-U	138

<ul> <li>4.5 MOŽNI MEHANIZMI DOLOČANJA SMERI VIRA DRAŽLJAJA</li> <li>4.6 ČASOVNA VARIABILNOST ODZIVOV</li> <li>4.7 SKLEPI</li> </ul>	
5 IZVLEČEK (SUMMARY)	
5.1 IZVLEČEK	
5.2 SUMMARY	
6 SLOVSTVO	
7 ZAHVALE	
PRILOGA 1	

# KAZALO SLIK

ločeno od ostalih. Bližnja sorodnost odzivov L0.0 in D0.0 v nekaterih ...... 19

- Slika 15. Oblika in lega celice PTG-TB-1a. Vhodne in izhodne regije zaradi nepopolne obarvanosti niso bile določljive. Iz enakih razlogov je nepoznan tudi popoln potek askona...... 23
- Slika 17. Latence inhibicij (levo) in latence ekscitacij (desno) pri celici PTG-TB-1a......24
- Slika 18. Rastrski prikaz odgovorov celice PTG-TB-1a med testiranjem frekvnenčne občutljivosti na hkratno draženje prvega para nog (*zgoraj*), na draženje prve ipsilateralne - leve - noge (*sredina*) in na draženje prve kontralateralne - desne - noge (*spodaj*)......25
- Slika 19. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TB-1a na draženje z večanjem časovnega zamika začetka draženja med eno in drugo nogo. Nad x osjo so odzivi celice ob zaostajanju začetka draženja desne (kontralateralne noge), pod x osjo so odzivi celice ob zaos 26
- Slika 20. Dendrograma razvrščanja odzivov celice PTG-TB-1a na draženje z zamiki s 150 Hz dražljaji po sorodnosti. Za *levi* prikaz je bila uporabljena FSL in intervali med prvimi 11 akcijskimi potenciali. Za *desni* prikaz smo uporabili intervale med prvimi en ........26
- Slika 21. Odzivi internevrona C1 pri testiranju frekvenčne občutljivosti na draženje obeh prednjih nog hkrati (*zgoraj*), leve noge (*sredina*) in desne noge (*spodaj*)......27
- Slika 23. Rastrski prikaz odzivov celice C2 ob draženju z zamaknjenim začetkom stimulacije. Nad absciso so prikazani odzivi ob zamikanju začetka draženja prednje desne noge, pod absciso pa odzivi ob zamikanju začetka draženja druge in tretje leve noge. Upo .... 30
- Slika 24. Dendrograma sorodnosti odzivov celice C2 ob draženju z zamaknjenim začetkom stimulacije. *Levi* prikaz smo izdelali z uporabo FSL in intervalov med prvimi 15 AP-ji. *Desni* prikaz smo izdelali na podlagi intervalov med prvimi 15 AP-ji.Uporabili smo d 30
- Slika 26. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TC-1 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju obeh nog prvega para (*zgoraj*), na draženje ipsilateralne - prednje leve - noge (*sredina*) in na draženje kontralateralne - prednje desne - noge (*sp* ..... 33
- Slika 27. Prikaz spontane aktivnosti celice PTG-TC-1 kot kumulativne frekvence ob hkratnem draženju prvega para nog (*zgoraj*), ob draženju prednje leve ipsilateralne noge (*sredina*)

- Slika 30. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TC-1 na draženje z večanjem časovnega zamika začetka draženja med eno in drugo nogo. Nad x osjo so odzivi celice ob zaostajanju začetka draženja desne (kontralateralne noge), pod x osjo so odzivi celice ob zaost35

- Slika 33. Razvrstitev odzivov celice PTG-TC-1 na draženje z zamiki s 100 Hz po sorodnosti. Za razvrščanje smo uporabili intervale med prvimi štirimi APji izpustili smo FSL.... 36
- Slika 34. Oblika in lega celice PTG-TI-1. Celica ima en vzpenjajoč in en spuščajoč akson, ki sta se nepopolno napolnila z barvilom. Soma je v desnem protorakalnem hemigangliju. . 37
- Slika 35. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TI-1 med meritvami frekvenčne občutljivosti: ob hkratnem draženju obeh prvih nog (*zgoraj*), ob draženju kontralateralne (leve) noge (*sredina*) in ob draženju somi ipsilateralne (desne) noge (*spodaj*). Na zgornjem p. 38

- Slika 38. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TI-1 ob draženju obeh nog s 150 Hz s povečevanjem časovnega zamika med začetkom draženja ene in druge prednje noge. Nad absciso so prikazani odgovori na stimulacijo z zamikom začetka draženja desne (ipsilateral... 39

- Slika 46. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TI-2 na draženje obeh nog s povečevanjem časovne razlike med začetkom draženja ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob zamikanju začetka draženja desne noge, pod absciso so odzivi .....44

- Slika 54. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-DC-2 na draženja leve in desne prednje noge s 40

Hz dražljaji ob povečevanju zamika med začetkom stimulacije z eno in drugo pobudno glavo. Nad absciso so odzivi celice ob povečevanju zamika pred začetkom draženj49

- Slika 57. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-DC-2 na draženja leve in desne prednje noge s 750 Hz dražljaji ob povečevanju zamika med začetkom stimulacije z eno in drugo pobudno glavo. Nad absciso so odzivi celice ob povečevanju zamika pred začetkom dražen 50

- Slika 62. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TC-2 na draženja prve desne in zadnjih levih nog ob povečevanju zamika med začetkom stimulacije z eno in drugo pobudno glavo. Nad absciso so odzivi celice ob povečevanju zamika pred začetkom draženja prednje des54

- Slika 67. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-2a ob draženju z večanjem časovnega zamika med začetkom stimulacije z eno in drugo pobudno glavo. Opazno je skoraj 20 ms povečanje

latence prvega AP pri odzivih na draženje z zamiki na desni strani, od 0.5 ms ...... 58

- Slika 76. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TB-1b na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateraln..... 64
- Slika 77. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-TB-1b na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Za *levi* prikaz smo uporabili FSL, za *desnega* pa FSL in intervale med prvimi petimi akc. 65
- Slika 78. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-TB-1b na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Uporabili smo latenco prvega akcijskega potenciala in intervale med prvimi petimi akci 65

- Slika 80. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TB-1b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateral...... 66
- Slika 81. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-TB-1b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Za *levi* prikaz je bila uporabljena FSL. L0.0 in D0.5 so urejeni kot podobni. Na *desne.....* 66
- Slika 82. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-TB-1b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Za prikaz so bili uporabljeni intervali med prvimi štirimi AP. Odzivi L0.0 in D0.0 so . 67

- Slika 90. Prikaz kumulativnih frekvenc odzivov celice PTG-LC-1 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju obeh prednjih nog (*zgoraj*), ob draženju prednje leve ipsilateralne noge (*sredina*) in ob draženju prednje desne kontralateralne ....... 73
- Slika 91. Prikaz latenc odzivov celice PTG-LC-1 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju obeh prednjih nog (LinD) in ob draženju kontralateralne desne noge (D).74

- Slika 93. Prikaz latenc odzivov celice PTG-LC-1 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju obeh prednjih nog (LinD) in ob draženju kontralateralne - desne noge (D). Prikazane so latence za prve tri akcijske potenciale v odzivu. Latence d. 74
- Slika 94. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-LC-1 na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateralne... 75

- Slika 97. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-LC-1 na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Pri razvrščanju smo uporabili intervale med prvimi štirimi akcijskimi potenciali (brez 76
- Slika 98. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-LC-1 na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Uporabili smo FSL in intervale med prvimi štirimi AP-ji. Na *levi* sliki so odzivi s pove 76

- Slika 103. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-DC-3 na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateral...... 80

- Slika 106. Oblika in lega celice CG-AC-2b. Soma leži v desni polovici centralnega ganglija med drugim in tretjim nožnim živcem. 82

- Slika 110. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-2b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije prednje desne (ipsil ...... 84
- Slika 112. Dendrogram sorodnosti odzivov celice CG-AC-2b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije prednje desne (ipsilateralne) in zadnjih dveh levih (kontralateralnih) nog v korakih po 0.5 ms. Za sliko je bila uporabljena ...... 85

- Slika 117. Dendrogram sorodnosti odzivov celice C3 na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije zadnjih dveh levih nog in prednje desne noge v korakih

- Slika 118. Dendrogram sorodnosti odzivov celice C3 na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije zadnjih dveh levih nog in prednje desne noge v korakih po 0.5 ms. Uporabljenih so bili intervali med prvimi osmimi akcijskimi poten...... 89
- Slika 119. Rastrski prikaz odzivov celice C3 na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije prednje desne noge, pod ab......90
- Slika 120. Dendrogram sorodnosti odzivov celice C3 na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije z eno in drugo pobudno glavo v korakih po 0.5 ms. Za *levo* sliko je bila uporabljena FSL, za *desno* sliko so bili FSL in intervali m..........90
- Slika 122. Prikaz latenc odzivov (*levo*) in relativne jakosti odzivov (*desno*) odzivov celice C4 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju zadnjih dveh levih nog in prednje desne noge (LinD), ob draženju zadnjih dveh levih nog (L) in ob dra ....... 92
- Slika 124. Rastrski prikaz odzivov celice C4 na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije prednje desne noge, pod ab......94
- Slika 126. Oblika in lega celice CG-AC-5. Soma celice je v desni polovici centralnega ganglija, nekoliko anteriorno glede na mesto izstopa živca zadnje desne noge. Razvejitve v protorakalnem gangliju so omejene na kontralateralno stran, medtem ko ima celic 96
- Slika 127. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-5 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju obeh nog zadnjega para (*zgoraj*), ob draženju leve kontralateralne noge (*sredina*) in ob draženju desne ipsilateralne noge (*spodaj*). Zanimiv ...... 96

- Slika 130. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-5 na 200 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (ipsilateralne)......97
- Slika 131. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-5 na 250 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (ipsilateralne)......98

- Slika 137. Prikaz relativne jakosti odgovorov celice CG-AC-6 ob draženju obeh zadnjih nog hkrati (zgoraj) in ob draženju zadnje leve noge kontralateralne noge (spodaj). Meritev frekvenčne občutljivosti nevronaob draženju zgolj ipsilateralne zadnje noge...... 102
- Slika 138. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-6 na 200 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateraln... 102
- Slika 140. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-6 na 500 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateraln... 103
- Slika 142. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-6 na 750 Hz draženje s povečevanjem časovne

razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateraln... 103

- Slika 148. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-7 na draženje s povečevanjem zamika med začetkom stimulacije leve in desne zadnje noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so prikazani odzivi celice ob zakasnjevanju začetka stimulacije desne (ipsilateralne) no108

- Slika 155. Prikaz latenc odzivov celice TC-DI-1b ob hkratnem draženju zadnjih levih ipsilateralnih - nog ter prednje desne - kontralateralne - noge (LinD), ob draženju zadnjih dveh levih

- ipsilateralnih - nog (L) in ob draženju prednje desne - kontrala...... 114

- Slika 156. Rastrski prikaz odzivov celice TC-DI-1b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije levih zadnjih nog in prednje desne noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacij.. 114
- Slika 157. Dendrogram sorodnosti odzivov celice TC-DI-1b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije zadnjih dveh levih nog in prednje desne noge v korakih po 0.5 ms. Uporabljenih je bilo petnajst intervalov, med katerimi je .... 115
- Slika 158. Dendrogram sorodnosti odzivov celice TC-DI-1b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije zadnjih dveh levih nog in prednje desne noge v korakih po 0.5 ms. Na *levi* sliki so odzivi ob povečevanju zamika pred stimula. 115
- Slika 159. Oblika in lega celice PTG-DC-1. Soma je v levi polovici protorakalnega ganglija, vse razvejitve so v desnih polovicah protorakalnega ter centralnega ganglija in ne .... 117
- Slika 160. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-DC-1 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju prednjega para nog (*zgoraj*), ob draženju ipsilateralne (*leve*) prednje noge (*sredina*) in ob draženju kontralateralne (desne) prednje noge (*spoda*j)...... 117

- Slika 163. Primer Van Rossumove matrike. Vsako posamezno polje predstavlja mediano vrednost primerjav vsake od desetih ponovitev poskusa z x osi z vsako od desetih ponovitev poskusa z y osi. Razpon barvne skale je 12 odtenkov od temno rdeče (maksimalna rel 119
- Slika 165. Prikaz sorodnosti odzivov celice PTG-DC-2 na draženje z zamiki (40 Hz dražljaji) po obdelavi posnetkov z metodo po Van Rossumu. Na zgornjem prikazu je bila uporabljena časovna konstanta 0.05 ms, na *spodnjem desnem* 0.025 ms, na *spodnjem levem* 0.0121
- Slika 166. Prikaz sorodnosti odzivov celice PTG-DC-2 na draženje z zamiki /750 Hz dražljaji) po obdelavi posnetkov z metodo po Van Rossumu. Na *zgornjem* prikazu je bila uporabljena časovna konstanta 0.05 ms, na *spodnjem desnem* 0.025 ms, na *spodnjem levem* 0.122

#### KAZALO TABEL

# SLOVARČEK

AP	akcijski potencial			
FSL	latenca prvega akcijskega potenciala ("first spike latency")			
PTG	protorakalni ganglij			
CG	centralni ganglij			
SEG	podžrelni ganglij			
ТС	tritocerebrum			
LinD	testiranje frekvenčne občutljivosti celice, obe pobudni glavi delujeta hkrati			
L	testiranje frekvenčne občutljivosti celice, deluje le leva pobudna glava			
D	testiranje frekvenčne občutljivosti celice, deluje le desna pobudna glava			
Dx.x	draženje z zamiki, vodeča leva pobudna glava, začetek stimulacije z desno			
pobudno glavo zaostaja za x.x milisekund				
Lx.x	draženje z zamiki, vodeča desna pobudna glava, začetek stimulacije z levo			
pobudno glavo zaostaja za x.x milisekund				
n	število ponovitev meritev pri enakih pogojih			

#### 1 UVOD

Intra- in interspecifična komunikacija je pomembna za obstoj osebka in vrste. Komunikacija preko podlage (vibracijska komunikacija) je znana pri mnogih skupinah živalskega sistema: dvoživkah, plazilcih, sesalcih, vrečarjih in členonožcih (pregled v: Hill, 2001; Greenfield, 2002).

Prevladuje mnenje, da je pri žuželkah vibracijska komunikacija v odnosu do zvočne komunikacije evolucijsko izvorna (Meier in Reichert, 1990; Yack in Fullard, 1990; Lakes-Harlan s sod., 1999; Stumpner in von Helversen, 2001; Greenfield, 2002; Stritih, 2006). Komunikacija preko podlage ni omejena z velikostjo živali – žival ne glede na velikost lahko učinkovito oddaja vse frekvence v nasprotju s situacijo pri komunikaciji z vibracijami zraka (zvok). Tu lahko majhne žuželke učinkovito oddajajo le zvočne signale visokih frekvenc, katerih valovna dolžina je manjša od 1/3 velikosti telesa (Michelsen s sod., 1982; Markl, 1983), ti pa se v primerjavi z nizkofrekvenčnimi signali precej hitreje absorbirajo v vegetaciji (Marten in Marler, 1977; Michelsen in Larsen, 1983; Riede, 1997).

Najbolje je uporaba vibracijskih signalov raziskana pri členonožcih. Škorpijoni vrste *Paruroctonus mesaensis* vibracije podlage uporabljajo kot informacijo o smeri plena (Brownell in Farley, 1979; Brownell, 1984; Brownell in Hemmen, 2001). Pajki rodov *Cupiennius* in *Habronattus* vibracije podlage uporabljajo pri lovu in komunikaciji s spolnim partnerjem (Rovner in Barth, 1981; Klarner in Barth, 1982; Bleckmann in Barth, 1984; Schuch in Barth, 1985; Schuch in Barth, 1990; Barth, 1993; Dierkes in Barth, 1995; Elias s sod., 2003), raki vrste *Uca pugilator* (Aicher in Tautz, 1990) pa pri komunikaciji z nasprotnim spolom.

Nekatere žuželke, npr. larve volkcev, s pomočjo vibracij zaznavajo in najdejo plen (Devetak, 1985; Mencinger, 1998; Mencinger-Vračko in Devetak, 2007), druge izkoriščajo vibracije za iskanje gostitelja (Meyhofer in Casas, 1999; Stölting s sod., 2002; Laumann s sod., 2007), spet tretje kot opozorilo pred približujočim se predatorjem oz. parazitoidom (Meyhöfer s sod., 1997; Djemai s sod., 2001). Žuželke uporabljajo vibracijske signale tudi pri komuniciranju znotraj vrste zlasti za razpoznavanje partnerja in določanje njegovega položaja v prostoru (Rupprecht, 1974; Gogala, 1984; Claridge, 1985; Hoy s sod., 1988; Loher in Dambach, 1989; Ota in Čokl, 1991; Birch in Keenlyside, 1991; Ivanov, 1993; Henry, 1994; Wilcox, 1995; Stewart, 1997; Hirschberger, 2001; Čokl in Virant-Doberlet, 2003a; Virant-Doberlet in Čokl, 2004; Cocroft in Rodríguez, 2005; Čokl, 2006). Vibracije so pomembne tudi pri socialni komunikaciji (Kirchner s sod., 1994; Nieh, 1998; Michelsen,

1999; Cocroft, 2001; Lewis s sod., 2002) in komunikacijo s potomci (Savoyard s sod., 1998; Cocroft, 1999). Greenfield (2002) ter Cocroft in Rodríguez (2005) ocenjujejo, da je vibracijska komunikacija pri žuželkah prevladujoča, slednja avtorja pa tudi trdita, da skoraj tri četrtine vseh poznanih vrst pri svoji komunikaciji uporablja podlago kot medij za prenos signalov. Poleg vrst, ki za komunikacijo uporabljajo izključno vibracije so poznane tudi nekateri taksoni, ki komunicirajo z zračnim zvokom (Gryllidae, Tettigoniidae, Cicadidae), ki so sposobne izrabiti tudi vibracijsko komponento njihove akustične komunikacije (Kalmring s sod., 1997; Stölting in Stumpner, 1998; Hill in Shadley, 2001; Rössler s sod., 2006). Pri vrsti kobilice Locusta migratoria je Čokl s sod. (Čokl s sod., 1977) opisal bimodalne internevrone, ki poleg informacije o akustičnem signalu prenašajo tudi informacije o vibracijah podlage. Ne glede na to pa je vibracijska komunikacija slabo raziskana. Še prav posebej malo pa je znanega o orientaciji s pomočjo vibracijskih signalov (Virant-Doberlet s sod., 2006). Večina podatkov o procesiranju vibracijskih signalov v centralnem živčnem sistemu izvira iz raziskav pri žuželkah, ki komunicirajo z zvokom in za katere orientacija proti viru vibracij ni bila dokazana (kratkoroge kobilice; Čokl s sod., 1985) ali je relativno šibka (muren; Virant-Doberlet, 1989) ali pri katerih način komunikacije ni poznan (jamska kobilica; Stritih, 2006). Zorović (2005) je v centralnem gangliju zelene smrdljivke vrste Nezara viridula identificirala serijo nevronov višjega reda, ki so se v centralnem gangliju odzivali na vibracije podlage. Njihove funkcije v vibracijski orientaciji pa ni opisala. V istem delu je analizirala tudi vibracijske signale zelene smrdljivke na križiščih, kjer pride do orientacije in ugotavljala spremembe signala, ki bi lahko služili kot smerna informacija.



Slika 1. Nezara viridula na listu fižola.

Zelena smrdljivka *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) je primeren objekt za preučevanje vibracijske komunikacije in orientacije proti viru vibracij (slika 1). Njena biologija je dobro opisana (Michieli in Žener, 1968; Walker in Jones, 1985; Jones, 1985; Hokkanen, 1986; Panizzi in Slansky, 1991; Panizzi s sod., 1995; Panizzi, 1997; Panizzi s sod., 2000; Panizzi, 2002) in njena razširjenost po svetu in v Sloveniji je poznana (Todd, 1989; Gogala in Gogala, 1989). Dobro je obdelan vedenjski nivo vibracijske komunikacije (Čokl s sod., 1999; Čokl s sod., 2000; Miklas s sod., 2001; 2003a; 2003b; Virant-Doberlet in Čokl, 2004; Hrabar s sod., 2004), poznane pa so tudi strukturne (Michel s sod., 1983) in funkcionalne značilnosti receptorjev (Čokl, 1983) in nekaterih internevronov centralnega ganglija (Čokl in Amon, 1980; Zorović, 2005).

#### 1.1 ŠIRJENJE VIBRACIJSKIH SIGNALOV PO RASTLINAH



Slika 2. Upogibno disperzno valovanje (Barth 1985).

Zelene rastline so primeren medij za prenos vibracijskih dražljajev. Žuželka, ki oddaja vibracijske signale na rastlini, vzbuja v njej različne tipe valovanja kot so longitudinalno, transverzalno, torzijsko, Rayleighevo in upogibno (Cremer in Heckl, 1973; Michelsen s sod., 1982; Markl, 1983; Gogala, 1985; Barth, 2002). Po mnenju Michelsena s sod.(1982) žuželke za komunikacijo uporabljajo disperzno upogibno valovanje (slika 2), katerega najpomembnejša lastnost je frekvenčno odvisna hitrost širjenja valovanja, hitrosti pa so relativno nizke. Novejša raziskava pokazala, da v območjih nad 5 kHz pri dovolj velikem premeru stebla (>2.1 mm; bistveno je razmerje med premerom in valovno dolžino,  $r/\lambda > 0.03$ ) valovanje postane ne-disperzno (Casas s sod., 2007). Hitrost prenosa vibracij je odvisna od mehanskih lastnosti rastline, posledično tudi od njenega fiziološkega stanja. Na bobu merjeno 200 Hz valovanje se je širilo s hitrostjo 36 m/s, 2000 Hz pa kar s 120 m/s; na bananinih listih se 100 Hz in 500 Hz valovanji širita z hitrostima, nižjima od 50 m/s, na agavi pa so za 200 Hz sinusno valovanje namerili 26 m/s na bazi lista, 80 m/s v sredini in 87 m/s na apikalnem delu lista (Michelsen s sod., 1982; Barth, 1993; Barth, 1998). McNett s sodelavci (2006) je opozoril na nujnost upoštevanja dvodimenzionalne narave prevajanja vibracijskega signala po steblu rastlin, saj se valovanje lahko v različnih dimenzijah obnaša različno. Čokl s sod. (2004) je preučeval vpliv struktur rastlinskega tkiva na prenos signala in ugotovil, da se signal preko listnih žil prenaša z manjšimi izgubami kot preko lamine. Hkrati je ugotovil, da listne žile delujejo kot bariere pri prenosu signala med laminana na obeh straneh žile in tako ustvarjajo intenzitetni gradient, katerega bi predvidevanju avtorjev žuželka lahko izrabila kot smerno informacijo. Čokl, Zorović in Millar (2007) so obravnavali dušenje signala dveh vrst pentatomid iz listov v stebla in ugotovili atenuacijo do 20 dB; hkrati pa je dušenje v steblu rastline nelinearno. Stojno valovanje so avtorji zabeležili v steblih zelenih rastlin, ne pa v olesenelih rastlinah, hkrati pa so ugotovili, da lahko maksimalna amplituda signala v nekaterih točkah presežo amplitudo vhodnega signala.

### 1.2 ORIENTACIJA PROTI VIRU VIBRACIJSKEGA DRAŽLJAJA PRI ČLENONOŽCIH

Pri žuželkah se čutila za vibracije nahajajo v vseh treh parih nog (Debaisieux, 1937; Michel s sod., 1983; Shaw, 1994; Devetak, 1998; Čokl in Virant-Doberlet, 2003b). Pri določanju smeri vira akustičnega oz. vibracijskega dražljaja lahko žival uporablja tri različne parametre: razliko amplitud med posameznimi vhodi (nogami), razliko v času prihoda na različne vhode in razliko v fazi valovanja med različnimi vhodi. Osnovni pogoji za nastanek nadpražnih amplitudnih in časovnih razlik med posameznimi nogami, da jih živčni sistem lahko zazna, so: 1) relativno močno dušenje signala med prevajanjem po podlagi, 2) nizka hitrost prevajanja in 3) dovolj velik razpon nog. Dolgo časa je prevladovalo mnenje, da na trdni podlagi (rastline, zemlja, pesek) majhne žuželke ne morejo določiti smeri izvora vibracij, saj naj bi bile amplitudne razlike in zamiki med posameznimi vhodi premajhni (pregled v: Cocroft s sod., 2000). Najkrajši časovni zamik, ki še sproži orientacijo, so opisali pri škorpijonih in znaša 0,2 ms (Brownell in Farley, 1979), vendar je za žuželke z razponom nog manjšim od 1cm izračunan časovni zamik manjši od 0,1 ms (Virant-Doberlet s sod., 2006). Vedenjske raziskave so pokazale, da se tudi majhne žuželke (razdalja med nogami manj kot 1 cm) lahko orientirajo proti izvoru vibracij (pregled v: Virant-Doberlet s sod., 2006; Laumann s sod., 2007), vendar mehanizem zaznavanja smeri vibracijskega signala pri majhnih žuželkah in drugih majhnih členonožcih še ni bil pojasnjen.

#### 1.2.1 Pajkovci

Vedenjske raziskave so pokazale, da se pajek vrste *Cupiennius salei* obrne v smer iz katere je prejel močnejši ali prvi vibracijski dražljaj (Hergenröder in Barth, 1983). Najkrajši časovni zamik, ki je še povzročil usmerjen odgovor je bil 2 ms in najnižja amplitudna razlika 10 dB (Barth, 1993). Modelna živčna mreža možnih interakcij med vhodi iz osmih nog predpostavlja ipsilateralno in kontralateralno inhibicijo v smeri od sprednjih nog proti zadnjim. Tudi za škorpijona vrste *Paruroctonus mesaensis* so z vedenjskimi

poskusi pokazali, da se je sposoben orientirati na podlagi amplitudnih in časovnih zamikov (Brownell in Farley, 1979). Za škorpijone so dokazali, da je glavni parameter za orientacijo časovni zamik, saj se orientirajo v smer iz katere so prejeli prvi in ne močnejši vibracijski signal. Najmanjši izmerjeni časovni zamik, na katerega se je škorpijon odzval, je bil 0,2 ms. Brownell in Farley (1979) sta predpostavila preprosto živčno mrežo, ki integrira vhode iz osmih nog, Stürzl in sod. (2000) so to mrežo tudi matematično podprli. Omrežje sestavlja osem komandnih internevronov (eden za vsako nogo), ki prejemajo ekscitacijski vhod iz vibracijskih receptorjev v posamezni nogi in inhibicijski vhod iz receptorjev v treh nasproti ležečih nogah. Glavni mehanizem pri procesiranju smeri vira dražljaja pri škorpijonih in pajkih naj bi tako bila kontralateralna inhibicija (Brownell in Farley, 1979; Hergenröder in Barth, 1983).

#### 1.2.2 Žuželke

Hrbtoplovka Notonecta undulata se orientira proti izvoru vibracij na podlagi časovnega zamika med prihodom signala na prostorsko ločene receptorje (Wiese, 1972; Wiese, 1974). Na podlagi vedenjskih poskusov je Murphey (1973) predlagal nevronsko mrežo, ki predpostavlja inhibitorne interakcije med vsemi senzoričnimi vhodi. Podlaga za zaznavanje smeri izvora vibracij pri vodnem drsalcu Gerris remigis je zelo verjetno časovni zamik (Murphey, 1971). Iz raziskav na murnu vrste Gryllus campestris lahko strnemo temeljne zakonitosti centralne integracije vibracijskih vhodov na podlagi naslednjih dognanj: a) večina vzpenjajočih se vibracijskih internevronov sprejema ekscitatorne vhode iz subgenualnih organov vseh šestih nog (Dambach, 1972; Kühne s sod., 1984; Kühne s sod., 1985; Virant-Doberlet, 1989); b) vhodi enega (navadno drugega) para nog so dominantni (Kühne s sod., 1984; Kühne s sod., 1985; Virant-Doberlet, 1989); c) v odgovoru nekaterih internevronov so opazni vplivi kontralateralne inhibicije (Dambach, 1972; Kühne s sod., 1984; Kühne s sod., 1985; Virant-Doberlet, 1989); d) vzorec odzivov nekaterih internevronov je v veliki meri odvisen od časovnega zaporedja stimulacije nog (Virant-Doberlet, 1989). Čeprav pri murnih niso zabeležili aktivnosti internevronov, ki bi povezovali vhode iz različnih nog z vzpenjajočimi se internevroni, pa taka intersegmentalna integracijska mreža zagotovo obstaja. Centralne projekcije subgenualnih receptorjev so omejene na ipsilateralno polovico ustreznega ganglija (Eibl in Huber, 1979). Dendritske regije opisanih vzpenjajočih se internevronov so bile večinoma omejene na en torakalni ganglij, poleg tega pa se vhodi iz različnih nog med seboj razlikujejo v latenci odgovorov (Virant-Doberlet, 1989). Pri kratkorogi kobilici Locusta migratoria se odziv internevronov spreminja v odvisnosti od zaporedja draženja različnih parov nog, kar kaže odvisnost vzorcev proženja akcijskih potencialov od smeri dražljaja (Čokl s sod., 1985). Ta odvisnost se je pri nekaterih internevronih še dodatno povečala ob hkratni



*Slika 3. Shema paritvenega vedenja pri vrsti* Nezara viridula. *Prirejeno po Virant-Doberlet* 2004.

simulaciji dušenja signalov (nižja intenziteta 'kasnejših' signalov). Kot pri murnu so tudi pri kratkorogi kobilici opazili vplive kontralateralne inhibicije; zabeležili pa so tudi aktivnost internevronov, omejenih na torakalne ganglije, ki so se selektivno odzivali na draženje enega samega para nog (Čokl s sod., 1985). Domnevajo, da ti internevroni povezujejo senzorične vhode posameznih nog z vzpenjajočimi internevroni.

#### 1.3 VIBRACIJSKA KOMUNIKACIJA STENICE VRSTE NEZARA VIRIDULA



Slika 4. Oscilogram (zgoraj) in spektrogram (spodaj) pozivnega napeva samice N. viridula. Povzeto in prilagojeno po Zorović 2005.



Slika 5. Prenos signalov samičinega pozivnega napeva preko razvejitve rastline. »K« in »I« označujeta točki hkratnega merjenja z laserskim vibrometrom. »I« označuje ipsilateralno stran - stran, na kateri poje žival, »K« označuje kontralateralno stran (zgoraj levo). Intenziteta vibracijskih signalov samičinega pozivnega napeva v točkah »K« in »I« (zgoraj desno). Časovna razlika med točkama »K« in »I« pri prenosu samičinega pozivnega napeva (sredina) in pri prenosu umetnega signala preko magnetka na listni bazi (spodaj). Prirejeno po Zorović 2005.

Intraspecifična komunikacija pri zeleni smrdljivki poteka po več kanalih – feromonski komunikaciji na večje razdalje sledi vibracijska komunikacija na rastlini, pri čemer vibracijski signali samice modulirajo emisijo feromona (Miklas s sod., 2003b). Feromone izločajo le samci in z njimi privabljajo samice, hkrati pa sprožijo oddajanje pozivnega napeva samice. Samičin pozivni napev vzdržuje in modulira samčevo izločanje feromonov (Miklas s sod., 2003b) in petje pozivnega napeva samca, hkrati pa samčev pozivni napev vzdržuje pozivno

petje samice (Čokl in Bogataj, 1982). Samice so med komunikacijo večinoma stacionarne, medtem ko se samci usmerjeno gibljejo proti njim (Ota in Čokl, 1991; Čokl s sod., 1999) (slika 3). Na križiščih med glavnim in stranskimi stebli oz. peclji se samci ustavijo, razporedijo noge na peclje oz. stranske veje okoli križišča in počakajo na naslednji vibracijski signal, nato pa nadaljujejo z iskanjem. Ko sta samec in samica v neposredni bližini, se v komunikacijo vključita še vid in tip (Borges s sod., 1987; Kon s sod., 1988). Poleg pozivnega napeva samca in samice (slika 4) je poznanih še nekaj drugih napevov samca s funkcijami dvorjenja in rivalstva z drugim(i) samcem(-i) ter zavrnitveni napev samice (Čokl et al., 2000; Čokl in Virant-Doberlet, 2003, Virant-Doberlet & Čokl 2004). Pri vseh vrstah napevov je dominantni frekvenčni vrh med 90 in 120 Hz, prisotni pa so še višje frekvenčni harmonični vrhovi in subdominantni vrhovi, občasno tudi rahla frekvenčna modulacija (Čokl in Virant-Doberlet, 2003).

Izhajajoč iz del Ote in Čokla (1991) in Čokla s sod. (1999) je Zorovićeva (2005) opravila meritve z dvema laserskima vibrometroma v razvejiščih rastlin na razdaljah, ki so enake razdaljam položenih nog. Rezultati so pokazali, da amplitudne razlike niso zanesljiv in ponovljiv parameter za orientacijo (slika 5). Amplitude signalov na kontralateralnem peclju so bile v več kot eni tretjini meritev višje kot na ipsilateralni strani, amplituda signala pa pri prenosu po rastlini ne upada monotono z razdaljo, temveč niha (Stritih s sod., 2000; Zorović, 2005; Čokl s sod., 2007). V istem delu je Zorovićeva (2005) pri prenosu signalov po rastlini preko razvejišč ugotovila časovne zamike 2-5 ms med kontra- in ipsilateralnim delom razvejitve. To pa je verjetno dovolj velika razlika, da jo živčni sistem lahko zazna, kot so npr. pokazali pri vrsti kratkoroge kobilice *Locusta migratoria* (Čokl s sod., 1985) in škorpijonu vrste *P. mesaensis* (Brownell in Farley, 1979).

#### 1.4 MORFOLOŠKE IN FUNKCIONALNE ZNAČILNOSTI VIBRORECEPTORJEV

Amon (1981) in Michel s sod. (1983) so opisali morfologijo skolopidialnih organov v nogah vrste *N. viridula*. Njihova zgradba je enaka v vseh nogah in pri obeh spolih in je zelo podobna morfologiji pri stenici vrste *Pyrrhocoris apterus* (Debaisieux, 1937; Michel s sod., 1983). Zaznavanje vibracij lahko potencialno opravljajo štirje organi v vsaki nogi: femoralni hordotonalni organ (FCO), subgenualni organ (SO), tibialni distalni hordotonalni organ (TDCO) in tarzo-pretarzalni hordotonalni organ (TPCO) (slika 6). Vse čutilne celice v teh strukturah so primarne (Amon, 1981). Subgenualni organ vrste *N. viridula* vsebuje v nasprotju z 20-40 skolopidiji pri ščurkih in ravnokrilcih (Schnorbus, 1971; Lakes in Schikorski, 1990) ali 400 pri osah iz družine Orussidae (Vilhelmsen s sod., 2001) le dva skolopidija, ki imata vsak po eno čutilno celico (Amon, 1981; Michel s sod., 1983). Vsak

od skolopidijev ima kapno celico, ki tvori ligament, pritrjujoč se ob steno tibije. Ligament je pripet dovolj ohlapno, da omogoča nihanje v hemolimfi, hkrati pa sta ligamenta različno dolga (Michel s sod., 1983). Podobno vlogo kot ligamenti v SO zelene smrdljivke, ima velum v SO tenčičarice *Chrysoperla carnea*, ki ga sicer sestavljajo trije skolopidiji (Devetak in Pabst, 1994). Ostali trije receptorski organi v nogah zelene smrdljivke so zgrajeni iz več skolopidijev s po eno ali dvema čutilnima celicama. FCO je tako sestavljen iz dvanajstih skolopidijev, od katerih ima vsak po dve čutilni celici. Pritrdišče FCO-ja je kutikularna apodema femurja. TDCO sestavljata dva skolopidija, eden z eno in drugi z dvema čutilnima celicama. TPCO je sestavljen iz dveh enot (skoloparijev), proksimalnega tvorita dva skolopidija, distalnega pa trije (Michel s sod., 1983). Čokl (1983; 1985) za vse noge zelene smrdljivke navaja tudi kampaniformne senzile na trohanterju in femurju, ki bi lahko zaznavale nizkofrekvenčne vibracije. Te so pri zeleni smrdljivki razporejene po vsej površini noge,



Slika 6. Shema hordotonalnih organov v nogah stenice vrste N. viridula. Shematske risbe femoralnega hordotonalnega organa (FCO) (**a**), subgenualnega organa (SO) (**b**), tibialno-distalnega hordotonalnega organa (TDCO) (**c**) in tarzo-pretarzalnega hordotonalnega organa (TPCO) (**d**). ap - apodema: atž - anteriorni tibialni živec; dfž - dorzalni femoralni živec; f - femur; kh - kanal hemolimfe; kr - krempeljci; ku - kutikula; lig - ligament; lut - ligament m. unguitractor; mk - mišični kanal; mlt - musculus levator tibiae; ptž - posteriorni tibialni živec; pu - pulvilus; se - septum; sk - skolopidij; sm - sklepna membrana; t - tibija; ta - tarzus; tr traheja; ut - pritrdišče m. unguitractor; žfc - živec femoralnega hordotonalnega organa. Merilca predstavljajo 200 µm (**a**, **b**) in 100 µm (**c**, **d**). Povzeto po Zorović 2005, modificirano po Michel in sod. 1983.

večinoma po femurju in tibiji (Zorović, 2005; Čokl s sod., 2005), med tem ko pri drugih taksonih poročajo o njihovi organiziranosti v receptivna polja ob sklepih (Grosch s sod., 1985; Keil, 1998; Devetak s sod., 2004). Na vibracije podlage je občutljiv tudi Johnstonov organ v antenah (Jeram in Pabst, 1996; Jeram in Čokl, 1996). Receptorske celice, občutljive na vibracije, so raziskane pri vrstah žuželk, ki primarno komunicirajo z zračnim zvokom, kar je smiselno tudi s stališča, da je komunikacija z vibracijami podlage evolucijsko starejša kot komunikacija z zračnim valovanjem (Meier in Reichert, 1990; Yack in Fullard, 1990; Lakes-Harlan s sod., 1999; Stumpner in von Helversen, 2001; Greenfield, 2002; Stritih, 2006).

Z elektrofiziološkimi metodami je Čokl (1983) pri zeleni smrdljivki določil tri funkcionalne tipe vibracijskih čutilnih celic – nizkofrekvenčne receptorske celice (LFR), srednjefrekvenčno receptorsko celico (MFR) in visokofrekvenčno receptorsko celico (HFR). V skladu z rezultati raziskav Devetaka in sod. (1978) na cidnidah je možno, da sta celici skolopidijev subgenualnega organa tipa MFR in HFR. Kapni celici skolopidijev tvorita ploščat filament, ki bi lahko določal frekvenčno značilen odgovor obeh čutilnih celic. Celice tipa LFR naj bi izvirale iz hordotonalnih organov in kampaniformnih senzil; Čokl (1983) jih je razdelil na tri podtipe, ki se med seboj ločijo po fazi valovanja podlage, na katero odgovarjajo. Frekvenčno področje, v katerem odgovarjajo celice tipa LFR, sega vsaj od 0,03 do 0,4 kHz, vendar spodnja meja ni bila izmerjena (Čokl, 1983). V istem delu avtor navaja tudi frekvenčne



Slika 7. Fotografija izprepariranega centralnega živčnega sistema stenice Nezara viridula. OŽ - optični živec; OL - optični lobus; PCL - protorcerebralni lobus; SEG - podžrelni ganglij; PTG - protorakalni ganglij; CG - centralni ganglij; NŽ1-3 - nožni živci prvega, drugega in tretjega para nog; ABŽ - abdominalni živci; GŽ - genitalni živec. Povzeto po Zorović 2005.

občutljivosti za celico tipa MFR (0,03 kHz – 1,0 kHz) in HFR (0,1 kHz – 5,0 kHz). LFR celice se odzivajo fazno-vezano do frekvence 150 Hz (Čokl, 1983; Zorović, 2005). Centralne projekcije LFR in MFR celic pokrivajo prostorsko ločena področja v senzorični nevropili v centralnem gangliju (Zorović, 2005). Razpored je podoben prostorskemu razporedu projekcij celic pri ravnokrilcih (Oldfield s sod., 1986; Römer s sod., 1988), kljub temu, da so bila pri stenici *N. viridula* obarvana vlakna iz več kot enega receptorskega sistema.

#### 1.5 CENTRALNI ŽIVČNI SISTEM VRSTE STENICE NEZARA VIRIDULA

Sestavljen je iz možganskega dela, ki leži v glavini kapsuli nad stomodeumom in trebušnjače v torakalnem in abdominalnem delu telesa (Chapman, 1998). Pri skupini Heteroptera in še nekaterih drugih skupinah žuželk je prišlo do zlivanja segmentalnih ganglijev. Tako drugi in tretji torakalni ganglij skupaj s serijo abdominalnih tvorita t.i. centralni ganglij (slika 7), podobno kot sta pri stenici *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygeidae) opisala Rutschky in Stryjak (1955). Trebušnjača se zaključi v torakalnih segmentih.

## 1.5.1 Funkcionalne in morfološke značilnosti vibracijskih internevronov pri vrsti *Nezara viridula* in nekaterih drugih žuželkah

Za živčni sistem žuželk velja, da so v njegovem sklopu identificirali nevrone, ki so s svojo značilno strukturo in delovanjem prisotni v vsakem osebku iste vrste (Comer in Robertson, 2001). Vsaka oblika nevrona naj bi se pojavljala v zrcalno simetričnem paru na obeh straneh živčnega sistema (Wohlers in Huber, 1982; Burrows, 1996), razen neparnih nevronov, kot so recimo DUM celice ravnokrilcev (in njim podobne spodaj omenjene celice zelene smrdljivke).

Pri stenici *N. viridula* so Čokl in Amon (1980) ter Zorović (2005) opisali strukturne in funkcionalne značilnosti devetih skupin vibracijskih internevronov v protorakalnem in centralnem gangliju. Celice dveh skupin so izrazito asimetrične, imajo vzpenjajoč akson, kontralateralno ležeč glede na telo celice. Ti internevroni imajo vhod v regiji, ki leži ipsilateralno glede na telo, izhodne regije pa so v področju kontralateralnih senzoričnih nevropil. Internevroni druge skupine so po obliki podobni slušnemu vzpenjajočemu internevronu TH3-AC5 pri kratkorogi kobilici *Omocestus viridulis* (Hedwig in Elsner, 1985). Drugi dve skupini imata zrcalno simetrično zgradbo vhodnih in izhodnih regij v centralnem gangliju, soma leži lateralno od medialne ravnine, vzpenjajoč akson pa kontralateralno od some. Ena od teh dveh skupin ima v centralnem gangliju vhodne, druga pa izhodne regije. Peta

skupina vzpenjajočih nevronov je po morfologiji podobna bimodalnemu »G1« internevronu kratkoroge kobilice Locusta migratoria (Kalmring, 1975). Šesta skupina internevronov v centralnem gangliju so lokalni internevroni; vsi trije primerki iz dela Zorovićeve (2005) imajo vhodne regije na eni in izhodne na drugi strani sredinske ravnine. Dva nevrona tega tipa sta se na draženje odzivali z inhibicijo, eden pa z ekscitacijo. Pri dolgorogih kobilicah in murnih so poznani podobni internevroni (omega nevron), ki se odzivajo na akustični dražljaj in povečujejo lateralni kontrast intenzitete zvoka (npr. Horseman in Huber, 1994a; 1994b). Podobno funkcijo bi lahko imeli tudi lokalni internevroni pri zeleni smrdljivki. Zorović (2005) je opisala tudi skupino simetričnih internevronov, ki imajo izhodne regije v nevropilah vseh treh parov nog in so omejeni na torakalne ganglije. Celice te skupine so podobne DUM celicam ravnokrilcev, ki imajo nevromodulatorno funkcijo in kažejo imunoreaktivnost na GABA (Burrows, 1996) ali oktopamin (Grolleau in Lapied, 2000). Identificirani vibracijski internevroni zelene smrdljivke se odzivajo na dražljaje v frekvenčnem območju med 50 Hz in 2000 Hz, hkrati pa Zorović (2005) in Čokl (1983) dopuščata možnost, da so receptorji sposobni zaznati tudi frekvence nižje od 50 Hz. Zorovićeva (2005) je funkcionalno razdelila internevrone v dve skupini: celice prve imajo največjo občutljivost pri 50 Hz, celice v drugi pa okoli 200 Hz. Avtorica v istem delu meni, da nevroni prve skupine prejemajo vhode iz LFR receptorskih celic, nevroni druge skupine pa iz MFR receptorskih celic. Vibracijske internevrone so opisali tudi pri čebelah in jih označili za širokofrekvenčne (Kilpinen in Michelsen, 1994), vendar je bila večina raziskav na področju vibracijskih internevronov opravljena pri ravnokrilcih, katerih osnovna komunikacija poteka z zvokom. Pri dolgorogih kobilicah so opisali dva tipa internevronov, ki se odzivata na vibracije. Prvi je monomodalni vibracijski, drugi pa je bimodalni vibracijsko-slušni (Kühne, 1982; Kalmring, 1983; Kalmring s sod., 1997). Pri slednjem hkratni vibracijski vhod izboljšuje frekvenčno-amplitudno kodiranje konspecifičnega napeva (Kühne, 1982; Kalmring s sod., 1983). Monomodalni vibracijski internevroni imajo največjo občutljivost na frekvence pod 1 kHz (Silver s sod., 1980; Kalmring s sod., 1997; Nebeling, 2000). Tudi pri kratkorogi kobilici vrste Locusta *migratoria* so našli tri tipe internevronov, ki se odzivajo na vibracijske dražljaje (Čokl s sod., 1977; Čokl s sod., 1985), eden od njih je že zgoraj omenjeni »G1« (Kalmring, 1975).
### 1.6 NAMEN RAZISKAVE

Osrednji namen doktorskega dela je raziskati možni mehanizem orientacije proti viru vibracijskega dražljaja pri stenici vrste *Nezara viridula*. Doktorska naloga ima naslednje cilje:

1. morfološka in funkcionalna karakterizacija internevronov, ki prevajajo informacije o vibracijah podlage, v protorakalnem in centralnem gangliju stenice *Nezara viridula*;

2. ugotoviti, kako ti internevroni procesirajo časovne zamike v prihodu dražljaja na različne vhode, v velikostnem razredu tistih, izmerjenih pri prevajanju signala po rastlini;

3. ugotoviti mehanizem, s katerim ti internevroni opravljajo funkcijo analize smeri izvora vibracij.

# **2 MATERIALI IN METODE**

### 2.1 POSKUSNE ŽIVALI IN PREPARACIJA

Za poskuse smo uporabili odrasle osebke obeh spolov iz laboratorijske populacije, ki je vsako leto obnovljena z osebki z Obale. Laboratorijska populacija je bila vzdrževana v 16:8 urnem dnevno/nočnem ciklu pri temperaturah med 22 in 26°C, 70-80% relativni vlagi. Živali so bile hranjene z rastlinami fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) in boba (*Vicia faba* L.), arašidi (*Arachis hypogaea* L.) in semeni sončnic (*Helianthus anuus* L.).

Poskusno žival smo pritrdili z ventralno stranjo na kovinski nosilcev v obliki črke U z mešanico voska in kolofonije. Noge so bile proste. Odstranili smo ji ščitek in protorakalni tergit. Protorakalni in centralni ganglij smo izpostavili z odstranitvijo letalnih mišic in črevesa. Na oba ganglija smo dali majhen kristal kolagenaze (Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, Nemčija), kar je omogočilo lažjo penetracijo mikropipete. Preparat smo ves čas dela vlažili s fiziološko raztopino (Priloga 1).

# 2.2 ZNOTRAJCELIČNO ODVAJANJE POTENCIALOV INTERNEVRONOV IN IONTOFOREZA

Poskusi so bili izvedeni na protitresni mizi v Faradayevi kletki. Nosilec s stenico, referenčno elektrodo in podporno žličko za ganglij smo vpeli vsakega v svoj mikromanipulator (Narishige M-152, Tokio, Japonska). S horizontalnim vlečnikom (Sutter Instruments Micropipette Puller P-87, Novato, ZDA) smo iz steklenih kapilar (Sutter Instruments BF-120-69-15, Novato, ZDA) naredili mikropipete. Za meritve smo uporabili tiste z upornostjo med 50 in 120 MΩ. Kot snemalna elektroda je služila klorirana srebrna žička v nosilcu (Science Products GmbH., EH-2FS W:0.010" A:1.2mm, Nemčija) oz. Ag/AgCl pelet (WPI MEH1SF12). Kot referenčno elektrodo smo uporabili klorirano srebrno žico, ki smo jo vstavili v abdomen živali. Signal smo ojačali 50x (WPI Cyto 773, Sarasota, ZDA) in ga posneli v računalnik skupaj z dražljaji z AD pretvornikom (CED 1401plus, Cambridge, VB) (slika 8). Konice mikropipet smo napolnili z 5% raztopino Lucifer Yellow (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija) v 0.5 M LiCl ali pa z 10 mM raztopino barvila Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Oregon, ZDA) v 200 mM KCl). V prvem primeru smo elektrodo dopolnili z 0.5 M LiCl, v drugem pa z 200 mM KCl). S tako pripravljenimi mikroelektrodami smo v protorakalnem in centralnem ganglija registrirali spremembe membranskega potenciala nevronov, ki so se odzivali na draženje. Kriterij za uspešen znotrajcelični odvod je bila



Slika 8. Shema postavitve poskusa.

odzivnost celice na hiper- ali depolarizacijo (Römer in Marquart, 1984). Noge smo tresli z dvema pobudnima glavama (Bruel & Kjær, model 4180, Nærum, Danska). Draženje je bilo računalniško vodeno s programom Cool Edit Pro 2.0 podjetja Syntrillium, ZDA.

#### 2.3 EKSPERIMENTALNI PROTOKOL

V prvem sklopu poskusov smo dražili prvo levo nogo z eno in prvo desno nogo živali z drugo pobudno glavo. V drugem sklopu poskusov pa smo pobudni glavi postavili tako, da smo po enakem protokolu dražili z eno pobudno glavo eno nogo sprednjega para, z drugo pobudno glavo pa kontralateralni nogi zadnjih dveh parov. V tretjem sklopu poskusov smo dražili z eno pobudno glavo zadno levo nogo in z drugo pobudno glavo zadnjo desno nogo. Tako smo simulirali situaciji »levo – desno«, ko žival primerja časovno zamaknjena vhoda z leve in desne strani ter situacijo »spredaj – zadaj«, ko je žival soočena s časovno zamaknjenima vhodoma spredaj – zadaj (slika 9).

Uporabili smo 100 ms dražljaje, sestavljene iz sinusnih valov z začetno in končno 10 ms fazo naraščajoče oz. padajoče amplitude. Uporabljene frekvence dražljajev so bile 40, 70, 100, 150, 200, 250, 500 in 750 Hz. Pri vseh frekvencah je bila amplituda hitrost signala med naraščajočim in padajočim delom  $5 \times 10^{-4}$  m/s. V primeru uporabe drugačne amplitude hitrosti signala smo to posebej označili. Obe pobudni glavi smo umerili. Presledek med ponovitvami dražljaja je bil 500 ms, presledek med ponovitvami vlaka dražljajev pa 1 sekundo.



Slika 9. Izbrane kombinacije nog pri stimulaciji. Draženje prve leve z levo pobudno glavno in prve desne z desno pobudno glavo (levo); draženje zadnjih dveh levih nog z levo pobudno glavo in prednje desne z desno pobudno glavo (sredina); draženje zadnje leve noge z levo in zadne desne noge z desno pobudno glavo.



Slika 10. Prvi del eksperimentalnega protokola. Testiranje frekvenčne občutljivosti. Vsak pravokotnik predstavlja 100 ms sinusno valovanje z zgoraj označeno frekvenco. Testiranje odziva s hkratnim draženjem izbranih nog z obema pobudnima glavama - LinD - (**zgoraj**); testiranje celice z levo pobudno glavo - L - (**sredina**); testiranje celice z desno pobudno glavo - D - (**spodaj**).



Slika 11. Drugi del eksperimentalnega protokola - Testiranje občutljivosti na časovne zamike v začetku stimulacije s posamezno pobudno glavo. Vsak pravokotnik predstavlja 100 ms sinusno valovanje z izbrano frekvenco. Testiranje odziva s povečevanjem zaostanka desne pobudne glave - oznaka stimulusa Dx.x (zgoraj); testiranje odziva s povečevanjem zaostanka leve pobudne glave - oznaka stimulusa Lx.x (spodaj). Številke poleg oznake L ali D pomenijo časovno razliko med eno in drugo pobudno glavo v milisekundah.

Protokol draženja je bil sestavljen iz dveh delov. V prvem delu smo ugotavljali frekvenčno občutljivost internevrona. Testiranje le-te je bilo sestavljeno iz: 1. hkratnega draženja z levo in desno pobudno glavo z vsemi zgoraj naštetimi frekvencami (oznaka: LinD), 2. draženja z levo pobudno glavo z vsemi frekvencami (oznaka: L), 3. draženja z desno pobudno glavo z vsemi frekvencami (oznaka: D) (slika 10). V drugem delu smo ugotavljali občutljivost nevrona na različno velike časovne intervale med začetkom draženja z eno in z drugo pobudno glavo (različno velike zamike). Pri tem smo uporabili frekvenco, na katero se je celica najmočneje odzivala. Zamik med stimulacijo z eno in drugo pobudno glavo smo večali s korakom 0.5 ms od 0 ms do 5 ms. Test smo ponovili z zamenjanima vlogama: vodilna je bila druga pobudna glava, draženje s prvo pa je bilo časovno zamaknjeno (oznaki sta Dx.x v primeru, ko je bil zamaknjen začetek stimulacije z desno pobudno glavo in Lx.x v primeru, ko je bil zamaknjen začetek stimulacije z levo pobudno glavo; x.x označuje časovni zamik med začetkom stimulacije ene in druge pobudne glave v milisekundah; slika 11). Za vsako vrednost eksperimentalnih parametrov (frekvence, zamik) smo opravili vsaj deset meritev. Če je bila celica stabilna smo protokol draženja ponovili tudi z manjšimi amplitudami hitrosti signala ( $1x10^{-4}$  m/s,  $1 x10^{-3}$  m/s). Po opravljenih meritvah smo celice označili z barvilom (Lucifer Yellow/Alexa Fluor 568). Vnos barvila smo opravili iontoforetično, z uporabo konstantnega pulza negativnega toka 3-4 nA in trajanjem približno 300 s.

# 2.4 ANALIZA ODZIVOV ŽIVČNIH CELIC

V statistične namene smo uporabljali R (odprtokodni program) in Kyplot 5 (Kyence labs., Japonska).

Odzive internevronov smo narisali kot rastrski prikaz (slika 12) in/ali kot prikaz kumulativne frekvence proženja akcijskih potencialov (slika 13), kot navaja Blejec (2005). Na rastrskem prikazu sivo polje označuje trajanje dražljaja, vsaka proga pa vsebuje odzive na ponovitve istega dražljaja. Na rastrskem prikazu odzivov na draženje z zamiki y-os prikaza označuje začetek stimulacije vodeče noge, črtice ob ordinati pa začetek stimulacije kontralateralne noge. V primeru nevronov, ki so prožili tudi od draženja neodvisne akcijske potenciale (kar smo poimenovali spontana aktivnost), smo v časovnem oknu 0.3 s pred naslednjim dražljajem določili frekvenco spontane aktivnosti iz medianega števila akcijskih potencialov v časovnem oknu.

Pri testiranju frekvenčne občutljivosti celice smo beležili:

1) latenco odziva (čas od začetka dražljaja do vrha prvega AP v odzivu). V primeru spontane aktivnosti smo si pomagali z rastrskim prikazom/prikazom kumulativne frekvence, s katerim smo določili časovno okno v katerem je dražljaj deloval in tako preprečili veliko



Slika 12. Primer rastrskega prikaza odzivov celice. Vsak siv pas označuje ponovitve meritev pod enakimi pogoji. Točke v isti vrsti znotraj enega pasu predstavljajo akcijske potenciale zabeležene v eni ponovitvi. Dolžina sivega pasu prikazuje trajanje draženja vodilne noge. Nad časovno osjo so odzivi na draženje z zamikanjem desne, pod časovno osjo pa odzivi na draženje z zamiki leve noge.



Slika 13. Primer prikaza kumulativnih frekvenc akcijskih potencialov za primer spontano aktivnih celic. Sive proge označujejo trajanje stimulusa, frekvenca dražljaja je označena na vrhu proge. Vsaka točka predstavlja akcijski potencial.

sipanje izmerkov. Latenco smo v tem oknu določili na opisan način. V primerih, ko se je (spontano aktivni) internevron odzival z inhibicijo, smo določili latenco odgovora kot čas od začetka dražljaja do zadnjega AP pred inhibicijo. Za trajanje inhibicije smo vzeli razliko med časom pojava prvega AP po inhibiciji in zadnjega AP pred inhibicijo. V delu navajamo mediane vrednosti izmerkov.

2) relativno jakost odgovora internevrona, ki ga predstavlja število AP celice v časovnem oknu 0.2 s po začetku dražljaja. V delu navajamo mediane vrednosti izmerkov.

Pri testiranju občutljivosti internevronov na zamike v začetku stimulacije smo narisali odzive na rastrski prikaz. Za ugotavljanje kodiranja zamika začetka stimulacije smo:

1) uporabili metodo razvrščanja odzivov po sorodnosti na podlagi standardizirane evklidske razdalje in metode skupinskega povprečja in izrisali dendrogram (slika 14). Uporabljene spremenljivke so bili mediani časovni intervali med AP-ji v odzivih internevrona na več ponovitev (10) istega dražljaja in mediani časovni interval med začetkom dražljaja in prvim akcijskim potencialom. Dendrogram smo izrisali na enega ali več naslednjih načinov: pri prvem, smo kot spremenljivko uporabili le mediano latenco prvega akcijskega potenciala (FSL), pri drugem, smo kot spremenljivke uporabili FSL in mediane intervale med izbranim številom akcijskih potencialov, pri tretjem pa smo naredili kot pri drugem s to razliko, da pri izrisu nismo upoštevali FSL. Število intervalov, ki smo jih uporabili, smo določili iz števila akcijskih potencialov, ki jih je nevron proizvedel med frekvenčnimi testi z izbrano frekvenco. V nekaterih primerih pa smo število intervalov določili na podlagi izrisov dendrogramov iz različnega števila intervalov. Različne načine izrisa smo uporabili, da bi ugotovili težo prispevka latence prvega akcijskega potenciala k smerni informaciji.

Slika 14. Primer dendrograma odzivov, razvrščenih po sorodnosti. V tem primeru se odzivi skoraj idealno ločijo na Lx.x in Dx.x, odzivi na draženje D0.0 in L0.0 pa so razvrščeni skupaj in ločeno od ostalih. Bližnja sorodnost odzivov L0.0 in D0.0 v nekaterih primerih kaže na stabilnost celice med meritvijo, ker gre enaka dražljaja.



uporabili metodo – »Van Rossum spike train metrics« (van Rossum, 2001a; Victor, 2005). Metoda vzame akcijske potenciale kot dogodke v času in vsakemu pripiše funkcijo, po obliki podobno ekscitatornemu akcijskemu potencialu.

enačba 1: 
$$f(t) = \sum_{i}^{M} H(t-t_i) e^{-(t-t_i)/t_c}$$

Dva vlaka akcijskih potencialov se po konvoluciji z zgoraj napisano formulo odštejeta drug od drugega.

enačba 2: 
$$D^2(f, g)_{t_c} = 1/t_c \int_0^\infty [f(t) - g(t)]^2 dt$$

Tako dobljene mere podobnosti se uredijo v t.i. »heatmap«, katerega barve kažejo sorodnost odzivov. Časovna konstanta EPSP funkcije je določena s poskusom.

Prednost uporabe metode po van Rossumu je ravno v uporabi EPSP funkcije, ki simulira dogajanje na postsinaptični membrani (Victor, 2005). Časovno konstanto EPSP funkcije smo določili arbitrarno.

#### 2.5 REKONSTRUKCIJA OBLIKE ŽIVČNIH CELIC

Centralni živčni sistem živali smo izolirali in fiksirali v 4% raztopini formalina v fosfatnem pufru (pH = 7.2; 1-2 uri), dehidrirali v alkoholni vrsti (50%, 70%, 90%, 96%, abs. etanol 2x; vsaka stopnja po 10 min) in zbistrili z metilsalicilatom. Preparat smo pregledali pod fluorescentnim mikroskopom Leica DRMB (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemčija) in ga fotografirali. V drugi stopnji smo preparat pregledali tudi s fluorescentnim mikroskopom Zeiss AxioImager, opremljenim z Apotomom (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Nemčija). Tu smo iz optičnih rezin naredili izostreno tlorisno projekcijo, ki smo jo izrisali s programom Adobe Illustrator CS (Adobe Systems Inc., San Jose, ZDA) oz. Reconstruct 1.0.8.5 (avtor John Diala, Buffalo University, ZDA).

#### 2.6 POIMENOVANJE ŽIVČNIH CELIC

Pri poimenovanju vibracijskih internevronov smo uporabili dopolnjen način (Zorović, 2005) poimenovanja slušnih internevronov ravnokrilcev (Hedwig in Elsner, 1985; Hedwig, 1986). Oznaka nevrona je štiridelna, sestavljena iz: 1. lege some, 2. poteka aksona, 3. lege aksona glede na somo in 4. zaporedne številke opisanega tipa celice.

Ad 1.:

PC	protocerebrum
DC	deutocerebrum
ТС	tritocerebrum
PTG	protorakalni ganglij
CG	centralni ganglij

#### Ad 2.:

A (ascending)	vzpenjajoči
D (descending)	spuščajoči
L (local)	lokalni
T (transversal)	vzpenjajoči in spuščajoči

#### Ad 3.:

I (ipsilateral)	ipsilateralno, v isti lateralni polovici ganglija
C (contralateral)	kontralateralno, v nasprotni lateralni polovici ganglija
B (bilateral)	bilateralno, aksona sta dva in sicer v ipsi- in kontralateralni
polovici ganglija	

#### Ad 4.:

zaporedna številka opisanega tipa celice. Pri tipih celic, ki so po obliki podobni tistim, opisanih s strani Zorovićeve (2005), smo številčenje nadaljevali. Pri celicah, enakih po obliki in ki so imele drugačen tip odziva, smo dodali v ime še črko (a, b...npr.: PTG-TB-1b).

Pri večini celic lahko terminalne odrastke razdelimo na gladke in take s terminalnimi odebelitvami. Te na končnih razvejitvah internevronov označujejo regije z večinsko izhodno funkcijo, medtem ko gladke veje kažejo pri nevronih na vhodne regije (Römer in Marquart, 1984; Peters s sod., 1986). Pri nekaterih celicah v CZŠ zelene smrdljivke terminalne zadebelitve niso opazne s svetlobno mikroskopijo, kar onemogoča optično identifikacijo vhodne/izhodne regije podobno, kot so poročali že pri kobilici (Wilson in Phillips, 1982; Watson in Burrows, 1983).

# 3 REZULTATI

Opravili smo 194 poskusov v 118 živalih obeh spolov (13 samic, 9 samcev). Iz dobljenih rezultatov smo izbrali in identificrali 22 internevronov. Kriteriji za izbor so billi kvaliteta posnetka (signal/šum), stabilnost celice med posnetkom in stopnja, do katere je bil eksperimentalni protokol opravljen. Internevrone smo razvrstili glede na njihov odziv na vibracije; pri tisti, katere smo uspešno markirali, smo opisali tudi strukturo obliko. Hitri pregled je na voljo v Tabeli 1.

# 3.1 TIPI INTERNEVRONOV S KOMBINIRANIMI INHIBITORNIM/ EKSCITATORNIM ODZIVI

To so tipi internevronov, ki na draženje enega vhoda odgovarjajo z ekscitacijo, na draženje drugega vhoda pa z inhibicijo. Skupaj smo identificirali tri take celice, dve ob draženju prvega para nog ter eno ob draženju 2. in 3. noge na levi strani in prve noge na desni. Le pri prvi celici smo opisali njeno obliko.

### 3.1.1 Draženje prvega para nog (situacija levo - desno)

#### PTG-TB-1a

Soma leži skoraj mediano glede na vzdolžno os, v ventralni skorji levega posteriornega dela protorakalnega ganglija. Primarno vlakno, izraščajoče iz some se vzpne in še v isti polovici ganglija razdeli na vzpenjajoči akson, ki nadaljuje ipsilateralno in anteriorno proti podžrelnemu gangliju, kjer se zaključi z medianim pletežem. Druga veja prečka mediano ravnino in se obrne v posteriorno smer - spuščajoči akson, ki teče kontralateralno glede na somo in se kmalu po prehodu v centralni ganglij izgubi. V protorakalnem gangliju ima v sredinski ravnini dva pleteža, enega na ipsi- in drugega na kontralateralni strani – v približno sredinski globini (slika 15). Barvilo ni popolnoma napolnilo celice, zato je njena identifikacija nepopolna.

S celico smo vzpostavili kontakt v protorakalnem gangliju. Celica je bila ves čas meritev spontano aktivna; večino časa je bila ponavljalna frekvenca akcijskih potencialov med 43 in 48 na sekundo. Ob draženju nog na strani some (ipsilateralno) se je odzivala z ekscitacijo; ob draženju na kontralateralni strani pa z inhibicijo. Ekscitaciji v prvem primeru je sledila inhibicija pri dražljajih frekvenc od 200 do 750 Hz; v drugem primeru pa inhibicija v celoti

nadomestila ekscitacijo. Ob hkratnem draženju obeh prednjih nog, so bili odzivi ekscitacijski, post-ekscitacijska inhibicija je bila opazna pri dražljajih frekvenc 200, 250, 500 in 750 Hz (sliki 16 in 18). Pri draženju leve in obeh nog hkrati so bile latence odgovorov celice kratke: pri 40 Hz dražljaju je bila latenca 8.5 (n = 10; Q1 = 8.3 ms, Q3 = 9.4 ms) oz. 8.6 ms (n = 18; Q1 = 7.9 ms, Q3 = 9 ms). Zaradi tega sklepamo, da gre za internevron prvega reda. Inhibicija ob draženju noge na kontralateralni strani je nastopila najhitreje pri 500 Hz dražljaju, in sicer po 21 ms (n=13; Q1 = 14 ms, Q3 = 36 ms; slika 17). Z ozirom na več kot enkrat daljšo latenco inhibitornega odziva menimo, da je inhibitorni vhod drugega ali višjega reda. Testiranje z zamiki smo opravili z 150 Hz dražljaji. Izrisali smo rastrski prikaz (slika 19) in razvrstili odzive po sorodnosti. Za prvi izris dendrogram smo uporabili FSL in intervale med prvimi enajstimi akcijskimi potenciali. Za drugi izris smo uporabili le deset intervalov med prvimi enajstimi AP-ji. Razvrščanje odzivov po sorodnosti je pokazalo ločevanje na odzive Lx.x in Dx.x, hkrati pa je odzive na stimulusa L0.0 in D0.0 razvrstilo skupaj (slika 20). Izjeme so odzivi na D0.5 in L2.0. Menimo, da je v odzivu celice kodirana časovna razlika, posledično pa smerna informacija, glede na razvrščanje pa smo mnenja, da natančnost v tem primeru ni manjša od 2.0 ms.



*Slika 15. Oblika in lega celice PTG-TB-1a. Vhodne in izhodne regije zaradi nepopolne obarvanosti niso bile določljive. Iz enakih razlogov je nepoznan tudi popoln potek askona.* 



Prešern J. Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste *Nezara viridula...* proti viru vibracijskega signala. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani. BF, Odd. za biologijo, 2007

Slika 16. Odzivi celice tipa PTG-TB-1a ob hkratnem draženju prvega para nog (zgoraj), ob draženju prednje leve - ipsilateralne - noge (sredina) in ob draženju kontralateralne noge (spodaj).



Slika 17. Latence inhibicij (levo) in latence ekscitacij (desno) pri celici PTG-TB-1a.



Slika 18. Rastrski prikaz odgovorov celice PTG-TB-1a med testiranjem frekvnenčne občutljivosti na hkratno draženje prvega para nog (**zgoraj**), na draženje prve ipsilateralne - leve - noge (**sredina**) in na draženje prve kontralateralne - desne - noge (**spodaj**). Inhibicija pri draženju kontralateralne noge nastopi prej, kot pri hkratnem draženju obeh nog prvega para oz. pri draženju ipsilateralne noge, vendar več kot 10 ms kasneje kot ekscitacija (glej puščice)



Slika 19. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TB-1a na draženje z večanjem časovnega zamika začetka draženja med eno in drugo nogo. Nad x osjo so odzivi celice ob zaostajanju začetka draženja desne (kontralateralne noge), pod x osjo so odzivi celice ob zaostajanju začetka draženja leve (ipsilateralne noge). Uporabili smo dražljaje frekvence 150 Hz.



Slika 20. Dendrograma razvrščanja odzivov celice PTG-TB-1a na draženje z zamiki s 150 Hz dražljaji po sorodnosti. Za **levi** prikaz je bila uporabljena FSL in intervali med prvimi 11 akcijskimi potenciali. Za **desni** prikaz smo uporabili intervale med prvimi enajstimi AP-ji. Na obeh prikazih je opazno združevanje odzivov na L0.0 in D0.0 ter dobro ločitev ostalih odzivov na Dx.x in Lx.x. Natančnost ločevanja bi v obeh primerih ocenili na 2.0 ms.

#### C1

Internevrona nismo uspeli označiti. V času poskusa je bila celica spontano aktivna s ponavljalno frekvenco akcijskih potencialov med 23 in 34 Hz (n = 10). Celica se je na hkratno draženje obeh nog (LinD) odzivala z inhibicijo, ki je nastopila po 15-20 ms (v tem primeru odčitano z rastrskega prikaza), ne glede na frekvenco dražljaja (slika 21). Najmočnejšo inhibicijo smo zabeležili pri draženju s 750 Hz. Slika je skoraj identična na rastru odzivov na draženje leve noge (L) z edino razliko, da je inhibicija najmočnejša ob draženju s 500 in 750 Hz. Draženje nasprotne noge (D) izzove dodatne akcijske potenciale pri 150, 200, 250 in 500 Hz dražljajih. Testiranja z zamiki zaradi nestabilnosti celice nismo opravili.



*Slika 21. Odzivi internevrona C1 pri testiranju frekvenčne občutljivosti na draženje obeh prednjih nog hkrati (zgoraj), leve noge (sredina) in desne noge (spodaj).* 

#### 3.1.2 Draženje leve druge in tretje ter prve desne noge (situacija zadaj - spredaj)

#### C2

Internevrona nismo uspeli označiti, njegova oblika in lega sta nepoznani. Celica je bila v času poskusa spontano aktivna s ponavljalno frekvenco med 33 in 43 Hz (n = 11). Odgovore celice smo registrirali v protorakalnem gangliju. Testirali smo frekvečno odvisnost odgovorov celice. Ob draženju LinD je celica odgovarja z ekscitacijo do vključno 150 Hz dražljajev; pri 100 Hz dražljajih se je v odgovoru pojavila inhibicija, ki se je z višjo frekvenco draženja daljšala. Draženje zadnjih levih nog je povečalo frekvenco proženja akcijskih potencialov ob draženju s frekvencami do 500 Hz. Ob draženju prve desne noge se je v odgovorih na draženja do vključno 200 Hz najprej pojavila kratka ekscitacija, pri vseh frekvencah pa je po približno 20 ms nastopila inhibicija, ki je pri odgovorih na draženja do 150 Hz trajala približno 15 ms, nato pa se enkrat do dvakrat povečala (slika 22).

Celico smo testirali z zamiki začetka draženja pri frekvenci 150 Hz. Na rastrskem prikazu odgovorov (slika 23) na draženja serije Dx.x je viden začetni akcijski potencial, sledi inhibicija in nato nekoliko širši pas akcijskih potencialov z višjo frekvenco. FSL sledijo zamikanju začetka draženja levih nog, podobno velja za širši pas akcijskih potencialov, ki sledi inhibiciji. Odzivi na L0.0 so podobno strukturirani kot D0.0, ostali odzivi pa se precej ločijo – pas vodečega akcijskega potenciala na prikazu ni tako jasno izražen kot pri odzivih na serijo Dx.x, enako pa mu sledi pas inhibicije in pa širši pas akcijskih potencialov. L0.0 in D0.0 sta se po pričakovanju razvrstila skupaj. Ostali odzivi so pomešani tako po smeri (L-D) kot po velikosti zamika (slika 24). Zaradi neenakomerne in nihajoče spontane aktivnosti menimo, da v odgovorih tega nevrona (v naših eksperimentalnih pogojih) smerna informacija ni kodirana.



Slika 22. Odzivi nevrona C2 med testiranjem frekvenčne občutljivosti na hkratno draženje leve 2. in 3. noge z eno ter prve desne z drugo pobudno glavo (zgoraj), na draženje 2. in 3. leve noge (sredina) in na draženje prve desne noge (spodaj). Rdeče puščice označujejo inhibicijo na rastru odzivov ob draženju prednje desne in zadnjih dveh levih nog hkrati in ob draženju desne prednje noge. Na srednji sliki rdeča puščica prikazuje povečan ekscitatorni odgovor ob draženju leve srednje in zadnje noge.



Slika 23. Rastrski prikaz odzivov celice C2 ob draženju z zamaknjenim začetkom stimulacije. Nad absciso so prikazani odzivi ob zamikanju začetka draženja prednje desne noge, pod absciso pa odzivi ob zamikanju začetka draženja druge in tretje leve noge. Uporabili smo dražljaje frekvence 150 Hz.



Slika 24. Dendrograma sorodnosti odzivov celice C2 ob draženju z zamaknjenim začetkom stimulacije. Levi prikaz smo izdelali z uporabo FSL in intervalov med prvimi 15 AP-ji. Desni prikaz smo izdelali na podlagi intervalov med prvimi 15 AP-ji.Uporabili smo dražljaje frekvence 150 Hz.

# 3.2 TIPI INTERNEVRONOV, PRI KATERIH SE OB POVEČEVANJU ČASOVNEGA ZAMIKA SKOKOVITO ZVIŠA LATENCA PRVEGA AKCIJSKEGA POTENCIALA

V tem sklopu predstavljamo 6 tipov internevronov, ki pri povečevanju zamika začetka draženja izbranih dveh vhodov izkazujejo skokovito podaljšanje latence prvega akcijskega potenciala (FSL). Besedno zvezo "skokovito podaljšanje FSL" uporabljamo za fenomen podaljšanja FSL nad vrednost povečanja časovnega zamika. Pri vseh opisanih tipih internevronov je ta skok daljši od 5.0 ms, torej daljši od največjega zamika.

# 3.2.1 Draženje prvega para nog (situacija levo - desno)

# PTG-TC-1

Soma celice leži ventralno v mediani ravnini posteriornega dela protorakalnega ganglija. Primarno vlakno izrašča iz some v lateralno smer, se obrne in prečka sredinsko ravnino na kontralateralno stran, kjer se razdeli v en vzpenjajoči in v en spuščajoči se akson. Iz prečnega vlakna izraščata v anteriorni smeri še dve večji veji, vsaka v svoji polovici ganglija, ki sta lokasto oblikovani in se lokalno zaključita. Iz obeh vej izraščajo številne drobne veje, katerih končiči so v večji meri gladkega tipa (možne vhodne regije). Iz vzpenjajočega se



Slika 25. Oblika in lega celice PTG-TC-1. Soma leži v levi polovici protorakalnega ganglija. Celica ima en kontralateralni spuščajoči akson. Kontralateralni vzpenjajoči akson se je slabo napolnil z barvilom, njegov popoln potek je nepoznan.

aksona se v višini izrasta živca prve desne noge odcepljajo manjše vejice z zadebljenimi končiči. Podobno tudi iz spuščajočega se aksona v centralnem gangliju izraščajo številne drobne veje, katerih končiči so zadebeljeni (izhodne regije). Spuščajoči se akson se konča v centralnem gangliju, posteriorno od odcepa živca zadnje desne noge. Vzpenjajoči se akson od konektivov podžrelnega ganglija naprej ni viden (Slika 25).

Meritve smo registrirali z mikropipeto, vstavljeno v protorakalnem gangliju. Med testiranjem frekvenčne občutljivosti je bila celica spontano aktivna s frekvenco AP med 10 in 20 Hz (slika 27). Spontana aktivnost je med meritvami prvega in drugega dela protokola popolnoma izginila. Ob hkratnem draženju obeh prednjih nog (LinD) se je celica odzivala na vse uporabljene frekvence dražljajev; latence so bile med 11 ms pri 250 Hz dražljaju (n = 12; Q1 = 9 ms, Q3 = 14 ms) in 18 ms pri 40 Hz dražljaju (n = 12; Q1 = 14 ms, Q3 = 20 ms). Na draženje leve- ipsilateralne - noge se je celica odzivala predvsem na dražljaje frekvenc 40, 70 in 250 Hz. Odziv na dražljaje ostalih frekvenc je bil šibak, na frekvenci 500 in 750 Hz pa se nismo zebeležili odziva. Na draženje kontralateralne - desne - noge se je nevron odzival podobno kot na draženje LinD – na vse uporabljene frekvence, latence so se gibale med 12 ms (n=12; Q1 = 8 ms, Q3 = 14 ms) pri 200 Hz in 16 ms (n=12; Q1 = 9 ms, Q3 = 19 ms) pri 70 Hz (sliki 28 in 29).

Teste občutljivosti na časovne zamike smo opravili s 100 Hz dražljaji. Na rastrskem prikazu (slika 30) je opazno, da je bil odgovor celice sestavljen iz dveh AP-jev, katerima so sledili drugi, po času prihoda neurejeni AP-ji. Tak tip odgovora bi morda lahko označili kot fazično - toničen. V primerjavi z odgovori na draženje s serijo Lx.x so bili odzivi na serijo dražljajev Dx.x od odziva D1.0 naprej pravilneje razporejeni; variacija latenc prvih dveh akcijskih potencialov je bila manjša. Ugotovitev potrjuje tudi razvrstitev odzivov po sorodnosti. Dendrogam, narisan z upoštevanjem FSL je pravilno ločil Lx.x in D0.5 - D5.0, nadaljnja ločitev po velikosti zamikov ni bila tako pravilna. Kot najučinkovitejša za pravilno razvrstitev odzivov D0.5 - D5.0 po velikosti se je pokazala uporaba FSL in intervalov med prvimi tremi AP. Vendar je bil v tem primeru odziv na D0.5 prištet k odzivom Lx.x skupaj z odzivi D0.0. Podobno je bilo brez uporabe FSL s to razliko, da je bila tu prvotna nenatančnost večja: nepravilno so se razporedili odzivi D0.5 in L1.0 (slike 31, 32 in 33).



Slika 26. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TC-1 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju obeh nog prvega para (zgoraj), na draženje ipsilateralne - prednje leve - noge (sredina) in na draženje kontralateralne - prednje desne - noge (spodaj).



cas [s]

Prešern J. Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste *Nezara viridula...* proti viru vibracijskega signala. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani. BF, Odd. za biologijo, 2007

34





Slika 28. Prikaz latenc celice PTG-TC-1 pri testiranju frekvenčne občutljivosti. L označuje latence odzivov leve (ispilateralne noge), z D so označeni latence odzivov na frekvenčno testiranje desne (kontralateralne) noge. LinD označuje latence ob hkratno draženje obeh nog.

Slika 29. Prikaz relativnih jakosti odgovorov celice PTG-TC-1. L označuje odzive pri frekvenčnem testiranju leve (ispilateralne noge), z D so označeni odzivi pri frekvenčnem testiranju desne (kontralateralne) noge. LinD označuje odzive ob frekvenčnem testiranju obeh nog hkrati.





Slika 30. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TC-1 na draženje z večanjem časovnega zamika začetka draženja med eno in drugo nogo. Nad x osjo so odzivi celice ob zaostajanju začetka draženja desne (kontralateralne noge), pod x osjo so odzivi celice ob zaostajanju začetka draženja leve (ipsilateralne noge). Puščici označujeta skokovito povečanje latence pri odzivih na draženja od D0.5 do D5.0. Uporabili smo 100 Hz dražljaje.



Slika 31. Razvrstitev odzivov celice PTG-TC-1 na draženje z zamiki s 100 Hz po sorodnosti. Za razvrščanje smo uporabili FSL. Posebnost odzivov je precej pravilno razvrščanje odzivov na Dx.x draženja, z izjemo D0.5 in D0.0, ki naj bi bila bolj podobna odzivom na draženja s stimulusi Lx.x.



Slika 32. Razvrstitev odzivov celice PTG-TC-1 na draženje z zamiki s 100 Hz po sorodnosti. Za razvrščanje smo uporabili FSL in intevale med prvimi štirimi AP-ji.



Slika 33. Razvrstitev odzivov celice PTG-TC-1 na draženje z zamiki s 100 Hz po sorodnosti. Za razvrščanje smo uporabili intervale med prvimi štirimi APji - izpustili smo FSL.

#### PTG-TI-1

Soma celice leži v ventralni skorji desne polovice posteriornega dela protorakalnega ganglija. Na ipsilateralni strani izraščata iz primarnega vlakna dve veji. Prva se razcepi v en vzpenjajoči in en spuščajoči se akson, druga pa po nekaj ipsilateralnih razvejitvah preide na kontralateralno stran, kjer tudi tvori nekaj lateraliziranih razvejitev, izmed katerih imajo nekatere zadebeljene končiče (pretežno izhodna regija); zadebeljenih končičev na ipsilateralni strani ganglija nismo opazili. Vzpenjajoči in spuščajoči se akson nista bila opaznov od konektivov ganglija dalje (slika 34).

Mikropipeto smo vstavili v protorakalni ganglij. Testiranje frekvenčne občutljivosti internevrona je pokazalo, da ima celica vhod tako z leve kot desne prve noge. Na rastrskem prikazu odzivov ob hkratnem draženju obeh prednjih nog (LinD) je opazen prispevek posamične noge (slika 35). Vibracijski vhod preko leve prednje noge je bil frekvenčno ločen. Odzivi na dražljaje nizkih frekvenc (40-100 Hz) so imeli krajšo latenco - min. 26 ms pri 40 Hz (n = 11; Q1 = 24 ms, Q3 = 31) - kot odzivi na dražljaje višjih frekvenc (200-750Hz). Tu je bila minimalna latenca 106 ms pri 250 Hz (n = 10; Q1 = 54 ms, Q3 = 119 ms). Pri draženju D pojav ni bil tako izrazit – v manjši meri le pri 750 Hz (Slika 36 in 37). Celico smo testirali z zamiki pri 150 Hz. Na rastrskem prikazu je opazna razlika med odzivi na teste Lx.x in na teste Dx.x (slika 38). V odzivih D0.5 – D5.0 se je pojavila inhibicija, v odzivih L2.0 – L5.0 pa se FSL veča skupaj s povečevanjem razlike med začetkom draženja desne in leve noge. Odzive smo razvrstili po sorodnosti. Prvič smo razvrščanje opravili na podlagi FSL, drugič pa z upoštevanjem FSL ter intervala med prvim in drugim AP (sliki 39 in 40). V obeh primerih so se odzivi na L0.0 in D0.0 razvrstili skupaj, medtem ko ostali odzivi niso bili popolnoma ločeni po smeri. Kljub temu se je večina odzivov Lx.x razvrstila v eno, večina odzivov Dx.x pa v drugo vejo. Ločitev je bila boljša v prvem primeru. Nadalje smo odzive uredili po sorodnosti le z upoštevanjem intervala med prvim in drugim AP. V tem primeru odzivi na L0.0 in D0.0 na dendrogramu niso več izolirani od ostalih, ki niso razvrščeni glede na smer in velkost zamika (slika 41).

Slika 34. Oblika in lega celice PTG-TI-1. Celica ima en vzpenjajoč in en spuščajoč akson, ki sta se nepopolno napolnila z barvilom. Soma je v desnem protorakalnem hemigangliju.





Slika 35. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TI-1 med meritvami frekvenčne občutljivosti: ob hkratnem draženju obeh prvih nog (**zgoraj**), ob draženju kontralateralne (leve) noge (**sredina**) in ob draženju somi ipsilateralne (desne) noge (**spodaj**). Na zgornjem prikazu se vidi kombiniranost odziva z leve in desne noge.



Slika 36. Latence odzivov celice PTG-TI-1, L označuje latence odgovorov na draženje kontralateralne prednje noge, D označuje latence odgovorov na draženje ipsilateralne prednje noge, LinD označuje latence odgovorov na hkratno draženje obeh prednjih nog (zgoraj).

Slika 37. Relativna jakost odgovorov celice PTG-TI-1 na draženje kontralateralne prednje noge (L), na draženje ipsilateralne prednje noge (D) in na hkratno draženje obeh prednjih nog (LinD) (spodaj).

Slika 38. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TI-1 ob draženju obeh nog s 150 Hz s povečevanjem časovnega zamika med začetkom draženja ene in druge prednje noge. Nad absciso so prikazani odgovori na stimulacijo z zamikom začetka draženja desne (ipsilateralne) noge, pod absciso so prikazani odgovori na stimulacijo z zamaknjenim začetkom draženja prednje leve noge (kontralateralne). Puščici označujeta premik latence prvega AP oz. začetek inhibitornega vhoda.



Slika 39. Razvrstitev odzivov celice PTG-TI-1 na draženje z zamiki po podobnosti na podlagi FSL. Uporabili smo 150 Hz dražljaje. Pri razvrščanju smo upoštevali le FSL.



Slika 40. Razvrstitev odzivov celice PTG-TI-1 na draženje z zamiki po podobnosti z upoštevanjem FSL in intervala med prvima dvema akcijskima potencialoma. Uporabili smo 150 Hz dražljaje.



Slika 41. Razvrstitev odzivov celice PTG-TI-1 na draženje z zamiki po podobnosti z upoštevanjem intervala med prvim in drugim AP. Uporabili smo 150 Hz dražljaje.

#### PTG-TI-2

Telo celice leži v posteriornem delu protorakalnega ganglija blizu medianega roba levega konektiva. Telo je umeščeno v sredinsko višino, blizu mediane ravnine ganglija. Primarno vlakno se vzpenja v anteriorni smeri v levo polovico ganglija, kjer se razdeli v vzpenjajoč (sega v devtocerebrum) in spuščajoči (doseže centralni ganglij) se akson. Na mestu združitve primarnega vlakna z aksonom izhaja v mediani smeri manjša veja, ki se zaključi z zadebeljenimi končiči. V podžrelnem gangliju iz vzpenjajočega se aksona izrašča še ena manjša razvejitev, ravno tako z zadebeljenimi končiči. V devtocerebrumu se akson zaključi z večjo razvejitvijo z zadebeljenimi končiči. Spuščajoči se akson se zaključi v področju preklopov tretjega para nog z medialno usmerjeno vejo. Druga mediano usmerjena veja je na višini drugega para nog. Okoli obeh omenjenih vej so fine razvejitve, katerih končiči delujejo zadebeljeno vendar zaradi slabše obarvanosti tega ne moremo z gotovostjo trditi (slika 42).

Aktivnost celice PTG-TI-2 smo beležili v protorakalnem gangliju. Na draženje samo ipsilateralne noge in na hkratno draženje obeh nog je celica najšibkeje odgovarjala na frekvence 40 in 70 Hz, pri draženju desne (kontralateralne) noge pa so bili šibkejši odgovori na dražljaje frekvenc 40, 70 in 100 Hz (slika 45). Najkrajše latence odzivov smo zabeležili pri hkratnem draženju obeh nog (LinD) z 250 Hz dražljaji – 25 ms (n = 11; Q1 = 33 ms, Q3 = 31 ms). Celica je z največ AP odgovarjala na dražljaje frekvenc 200, 250 in 500 Hz ob hkratnem draženju obeh nog (slika 44). Celica je bila v času testiranja frekvenčne odvisnosti odgovarjanja neenakomerno spontano aktivna s ponavljalno frekvenco akcijskih potencialov med 3 in 10 na sekundo (n = 11).

V drugem delu poskusa smo merili odzive nevrona na draženje z zamiki med levo in desno stranjo 150 Hz dražljaji. Na rastrskem prikazu (slika 46) je opazno povečanje FSLpri draženju z dražljaji L0.5-L5.0 v velikostnem razredu 5-10 ms. Latence odgovorov na draženja z dražljaji Dx.x. Prvi dendrogram sorodnosti odzivov smo izrisali z upoštevanjem FSL, drugi dendrogram pa smo pripravili z upoštevanjem FSL in intervali med prvimi osmimi AP. Na prvem dendrogramu so odzivi na D0.0 in L0.0 dražljaje označeni kot sorodni, večji del odzivov na draženja serije L, razen L1.5, L1.0, L3.0 in D1.0, je ločen od serije D (slika 47). Razlog bi lahko iskali v omenjeni variabilnosti odzivov na serijo draženj D. Na drugem dendrogramu so odzivi na D0.0 in L0.0 urejeni skupaj (slika 48), ostali odzivi so premešani. V tem primeru menimo, da ima potencialno informativno vrednost le sprememba FSL. Na tretjem izrisu brez uporabe

FSL - le z upoštevanjem intervalov med prvimi osmimi APji so odzivi premešani; tudi odzivi na L0.0 in D0.0 niso razvrščeni skupaj (slika 49).



Slika 43. Latence odzivov celice PTG-TI-2 pri frekvenčnem testiranju ob hkratnem draženju obeh prednjih nog (LinD), ob draženju ipsilateralne - leve - noge (L) in ob draženju kontralateralne - desne - noge (D).

Slika 42. Oblika in lega celice PTG-TI-2 (levo). Soma celice leži v levem protorakalnem hemigangliju.





Slika 44. Prikaz relativne jakosti odgovorov celice PTG-TI-2 pri frekvenčnem testiranju ob hkratnem draženju obeh prednjih nog (LinD), ob draženju ipsilateralne - leve - noge (L) in ob draženju kontralateralne - desne - noge (D).



Slika 45. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TI-2 med meritvami frekvenčne občutljivosti: na hkratno draženje obeh prednjih nog (**zgoraj**), na draženje prednje leve - ipsilateralne - noge (**sredina**) in na draženje prednje desne - kontralateralne - noge (**spodaj**).



Slika 46. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TI-2 na draženje obeh nog s povečevanjem časovne razlike med začetkom draženja ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob zamikanju začetka draženja desne noge, pod absciso so odzivi celice ob zamikanju začetka draženja desne noge. Uporabili smo dražljaje frekvence 150 Hz.



Slika 47. Odzivi celice PTG-TI-2, razvrščeni po sorodnosti na podlagi FSL. Uporabljena frekvenca dražljaja je bila 150 Hz.



Slika 48. Odzivi celice PTG-TI-2 razvrščeni po sorodnosti na podlagi FSL in intervalov med prvimi osmimi akcijskimi potenciali. Tudi tu so odzivi na L0.0 in D0.0 dražljaje razvrščeni skupaj. Uporabljena frekvenca dražljaja je bila 150 Hz.



Slika 49. Odzivi celice PTG-TI-2 razvrščeni po sorodnosti na podlagi intervalov med prvimi osmimi APji (brez FSL). V tem primeru tudi odzivi na L0.0 in D0.0 dražljaje tu niso razvrščeni skupaj. Uporabili smo dražljaje frekvence 150 Hz.

#### PTG-DC-2

Soma celice leži levo od mediane ravnine v skorji protorakalnega ganglija. Primarno vlakno se dvigne do približno sredine, kjer v nevropili prvih nog tvori pletež gladkih in zadebeljenih živčnih končičev. Tu akson preide na kontralateralno stran in se po tej strani spusti v centralni ganglij, kjer se konča s pletežem zadebeljenih živčnih končičev v višini nevropile zadnje desne noge. V centralnem gangliju izhaja iz aksona v območje preklopov druge desne noge še ena krajša veja, ki se konča s pletežem zadebeljenih živčnih končičev. Enako velja tudi za vejo, ki izhaja iz aksona v protorakalnem gangliju in se zaključi v višini nevropile prvih nog. Vse omenjene kontralateralne razvejitve so po višini nekoliko nad nivojem poteka aksona, ipsilateralna razvejitev takoj za somo pa se razprostira nad in pod nivojem aksona (slika 50).

Beleženje aktivnosti celice smo opravili v protorakalnem gangliju. Pri draženju bodisi obeh nog hkrati (LinD) bodisi le desne - kontralateralne - noge je z največ AP nevron odgovarjal na 40 Hz in 750 Hz dražljaje (slika 52). Celica je pri draženju desne noge izkazovala precej manjšo občutljivost kot pri draženju leve, ipsilateralne noge. Najkrajše latence odgovorov smo izmerili pri draženju s 40 Hz (slika 51), in sicer 25 ms (LinD; n = 13; Q1 = 23 ms, Q3 = 25 ms), 26 ms (L; n = 12; Q1 = 25 ms, Q3 = 28 ms) in 43 ms (D; n = 11; Q1 = 38 ms, Q3 = 63 ms). Latenčna krivulja za odgovore ob draženju LinD je podobna krivulji latenc ob L draženju do frekvence 250 Hz, pri frekvencah 500 in 750 Hz pa je bolj sorodna krivulji latenc ob D draženju. Podobno se vedejo tudi krivulje relativne občutljivosti (slika 52). Pri hkratnem draženju obeh nog s 40 Hz dražljaji je celica odgovarjala fazno vezano s po dvema AP-jema na val dražilnega signala; fazno vezan odgovor je bil značilen tudi za odgovore na draženje leve noge s 40 Hz pulzi, le da je bilo število AP-jev manjše, običajno dva na prvi val stimulusa, nato pa po en (slika 53).

Po opravljenem testiranju frekvenčne občutljivosti, smo analizirali še odgovore celice na zamike z 40 in 750 Hz dražljaji. Na rastrskem prikazu odzivov ob uporabljenem 40 Hz dražljaju (slika 54) so vidni štirje »valovi« akcijskih potencialov v fazno-vezanem odgovoru na dražljaj. Pri odgovorih na dražljaje L0.0 in D0.0 je opazno, da je FSL krajša, kot pri odgovorih na ostale dražljaje. Opazna je tudi variabilnost FSL pri odgovorih na dražljaje D0.5 – D5.0. Odzive smo sortirali po sorodnosti, zato smo uporabili v prvem primeru uporabili le FSL, v drugem pa FSL in intervale med prvimi tremi AP. Na prvem dendrogramu so odzivi L0.0 in D0.0 razvrščeni ločeno od ostalih, ločeni pa so bili še L2.0 - L 5.0 na v eni in D0.5, D3.5 in D5.0 v drugi podveji. Na drugem dendrogramu so odzivi L0.0 in D0.0

razvrščeni skupaj, v isti veji so še L1.0, L2.5 in L3.5 ter D0.5, D1.0, D1.5, D2.0 in D3.0. V svojo podvejo so uvrščeni odzivi L0.5, L3.0-L5.0 in D3.5. V tretjo skupino so se razvrstili odzivi nasprotnega pola: D2.5, D4.0 – D5.0 in L2.0 ter L1.5. Verjetni vzrok za nepravilno razvrščanje odzivov je omenjena variabilnost latenc. Razvrščanje odzivov brez uporabe FSL je dalo podobno sliko: odzivi L0.0 in D0.0 so razvrščeni skupaj, vendar ne ločeno od ostalih odzivov (slika 56). Na rastrskem prikazu odzivov pri draženju z zamiki z 750 Hz je opazno neenakomerno odgovarjanje na dražljaje preko različnih stimulusov, vendar je vsem odgovorom skupna terminalna razporeditev akcijskih potencialov (slika 57), ki na rastrskem prikazu tvori »val«. Razvrščanje po sorodnosti ni pokazalo urejenih odnosov.

Slika 50. Oblika in lega celice PTG-DC-2. Soma leži v levem protorakalnem hemigangliju, spuščajoči akson leži ipsilateralno glede na somo.



Slika 51. Prikaz latenc odzivov celice PTG-DC-2 med meritvami frekvenčne občutljivosti: ob hkratnem draženju obeh prednjih nog (LinD), ob draženju ipsilateralne - leve - prednje noge (L) in ob draženju kontralateralne - desne - prednje noge (D).









Slika 53. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-DC-2 med meritvami frekvenčne občutljivosti: ob hkratnem draženju obeh nog prvega para (zgoraj), ob draženju ipsilateralne - leve - noge (sredina) in ob draženju kontralateralne - desne - noge (spodaj).




Slika 54. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-DC-2 na draženja leve in desne prednje noge s 40 Hz dražljaji ob povečevanju zamika med začetkom stimulacije z eno in drugo pobudno glavo. Nad absciso so odzivi celice ob povečevanju zamika pred začetkom draženja prednje desne (ipsilateralne) noge, pod absciso so odzivi celice ob povečevanju zamika pred začetkom draženja prednje leve (kontralateralne) noge. Izstopajoča odziva sta L0.0 in D0.0, ki imata krajšo latenco kot ostali odzivi.



Slika 55. Odzivi celice PTG-DC-2 na draženje z zamiki s 40 Hz dražljaji razvrščeni po sorodnosti na podlagi FSL (**levo**) ter na podlagi FSL in intervalov med prvimi tremi akcijski potenciali (**desno**). V obeh primerih se L0.0 razvrsti blizu D0.0, ločitev strani pa je pravilnejša v prvem primeru, saj se odzivi L0.0 in D0.0 ločita od ostalih odzivov (primerjaj z rastrskim prikazom).



Slika 56. Odzivi celice PTG-DC-2 na draženje z zamiki s 40 Hz razvrščeni po sorodnosti na podlagi intervalov med prvimi tremi APji (brez upoštevanja FSL). Tudi tu so odzivi premešani. L0.0 in D0.0 so sicer razvrščeni skupaj, vendar niso ločeni od ostalih odzivov.



Slika 57. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-DC-2 na draženja leve in desne prednje noge s 750 Hz dražljaji ob povečevanju zamika med začetkom stimulacije z eno in drugo pobudno glavo. Nad absciso so odzivi celice ob povečevanju zamika pred začetkom draženja prednje desne (ipsilateralne) noge, pod absciso so odzivi celice ob povečevanju zamika pred začetkom draženja prednje leve (kontralateralne) noge.

## 3.2.2 Draženje druge in tretje leve ter prve desne noge (situacija zadaj - spredaj)

## PTG-TC-2

Celica se je delno napolnila z barvilom. Soma celice leži lateralno v skorji sprednje desne polovice protorakalnega ganglija. Primarno vlakno preide na kontralateralno stran, kjer se razcepi v en vzpenjajoči in en spuščajoči se akson. Predtem se v posteriorni smeri blizu mediane linije odcepi manjše vlakno. Na kontalateralni strani protorakalnega ganglija so bile zabeležene še tri manjše veje, ki izraščajo v lateralni smeri; njihovi končiči izgledajo betičasto. Spuščajoči se akson se zaključi z dvema razvejitvama v centralnem gangliju, obe izraščata v lateralni smeri, tip končičev je nepoznan. Vzpenjajočemu se aksonu smo sledili v podžrelni ganglij, naprej ni bil opazen, vendar se po našem mnenju akson tam ne zaključi (slika 58).

Z internevronom smo vzpostavili kontakt v protorakalnem gangliju. Testiranje frekvenčne občutljivosti internevrona je pokazalo slabo odzivnost celice na draženje zadnjih kontralateralnih nog, celica je odgovarjala z maloštevilnimi akcijskimi potenciali predvsem na draženje s frekvencami med 250 in 750 Hz. Najmočneje se je celica odzivala pri hkratnem draženju z obema pobudnima glavama hkrati (slika 61); tudi latence so bile v tem primeru najkrajše – med 23 pri 500 Hz dražljajih (n = 11; Q1 = 21 ms, Q3 = 27 ms) in 30 ms pri 70 Hz (n = 11; Q1 = 28 ms, Q3 = 31 ms). Latence odgovorov pri draženju ipsilateralne prve noge so bile daljše – med 26 ms pri 40 Hz (n = 11; Q1 = 24 ms, Q3 = 38 ms) in 50 ms pri 500 Hz (n = 11; Q1 = 41 ms, Q3 = 73 ms); latence pri draženju prve ipsilateralne noge so pri draženju s 500 in 750 Hz daljše kot pri draženju zadnjih dveh kontralateralnih (levih) nog (40 ms pri 500 Hz; n = 12; Q1 = 38 ms, Q3 = 55 ms; slika 59).

Občutljivost na zamike v začetku draženja smo testirali s 150 Hz dražljaji. Na rastrskem prikazu (slika 62) je v odgovorih na draženje s serijo Lx.x opazno skoraj 10 ms povečanje FSL pri odgovorih na dražljaje od L0.5 naprej. Ta skok je viden tudi na dendrogramu sorodnosti, izrisanim na podlagi FSL. L0.0 se razvrsti kot soroden odzivom D0.0 – D3.0 z izjemo D2.5. Dendrogram kaže, da na podlagi povečanja FSL ni moč nadalje ločiti odzivov na serije L in D, saj se tudi pri odzivih na D4.0 – D4.5 poveča latenca prvega AP, hkrati pa se zmanjša latenca pri L3.0 (in L3.5). Razvrščanje po sorodnosti z upoštevanjem FSL in intervala med prvima dvema AP ne pokaže boljše informacijske vrednosti za kodiranje smeri izvora dražljaja (slika 63).



Slika 58. Oblika in lega celice PTG-TC-2. Soma je v desni polovici protorakalnega ganglija, večina razvejitev je omejena na kontralateralno stran centralnega živčnega sistema.



100

150

Frekvenca (Hz)

0.5

0

40

10

Slika 59. Latence odzivov celice PTG-TC-2 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju prve desne in zadnjih levih nog (LinD), ob draženju kontralateralne srednje in zadnje - levih - nog (L) in na draženje ipsilateralne prednje - desne - noge (D).



750

500

250

200



Slika 61. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TC-2 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju prednje desne (ipsilateralne) in zadnjih dveh levih (kontralateralnih) nog (zgoraj), na draženje zadnjih dveh levih (kontralateralnih) nog (sredina) in na draženje prednje desne (ipsilateralne) noge (spodaj).



Slika 62. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TC-2 na draženja prve desne in zadnjih levih nog ob povečevanju zamika med začetkom stimulacije z eno in drugo pobudno glavo. Nad absciso so odzivi celice ob povečevanju zamika pred začetkom draženja prednje desne (ipsilateralne) noge, pod absciso so odzivi celice ob povečevanju zamika pred začetkom draženja zadnjih dveh levih (kontralateralnih) nog. S puščicama je označeno skokovito povečanje prvega akcijskega potenciala. Uporabili smo dražljaje frekvence 150 Hz.



Slika 63. Odzivi celice PTG-TC-2 razvrščeni po sorodnosti na podlagi FSL (**levo**) ter na podlagi FSL in intervala med prvima dvema akcijskima potencialoma (**desno**). V obeh primerih se L0.0 razvrsti blizu D0.0. Uporabili smo dražljaje frekvence 150 Hz.

### 3.2.3 Draženje zadnjega para nog (situacija zadaj levo - zadaj desno)

### CG-AC-2a

Po obliki lahko internevron uvrstimo v tip CG-AC-2, ki ga je opisala Zorovićeva (2005). Soma celice je v skorji centralnega ganglija na skrajni levi strani, posteriorno za vhodom živca druge noge. Primarno vlakno poteka kontralateralno, tvori zanko in se vzpne kontralateralno somi preko protorakalnega v možganske ganglije. Še na ipsilateralni strani iz primarnega vlakna posteriorno izrašča pletež razvejitev proti izrastu živca leve zadnje noge, končiči so tako zadebeljeni kot gladki. Kontralateralno iz vzpenjajočega vlakna izraščata v smeri proti izstopu živcev zadnjih dveh desnih nog še dve sekundarni vlakni, ki v področju preklopov tvorita preplet z gladkimi in zadebeljenimi končiči. V protorakalnem gangliju iz omenjenega vlakna izraščata še dve majhni ravzejitvi, ena v medialni smeri (vendar ne čez sredinsko ravnino) in druga v lateralno smer, obe v ravnini živca prve desne noge (slika 64).

Za meritve smo mikropipeto vstavili v centralni ganglij. Opravili smo teste frekvenčne občutljivosti. Pri draženju LinD so imelo odgovori najkrajšo latenco pri draženju s 70 Hz dražljaji - 26 ms (n=15, Q1 = 22 ms, Q3 = 55 ms; slika 65), vendar je celica z največ AP odgovarjala na dražljaje frekvenc 200, 250, 500 in 750 Hz. Pri ipsilateralnem (levostranskem) draženju je bila latenca najmanjša pri 250 Hz, in sicer 53ms (n = 12; Q1 = 45 ms, Q3 = 57 ms), pri kontralateralnem (desnostranskem) pa pri 200 Hz - 67ms (n = 14; Q1 = 81 ms, Q3 = 81 ms). Pri levostranskem draženju se je celica najmočneje odzvala pri 200 in 250 Hz, pri desnostranskem pa je imela približno enakomerno močan odziv med 100 in 500 Hz, medtem ko se na draženja pri 40 in 750 Hz ni odzivala (slika 65).

Opravili smo test občutljivosti na zamike z 200 Hz dražljaji. Izrisa klastrskega dendrograma z upoštevanjem FSL v prvem primeru ter z upoštevanjem FSL in intervalov med prvimi tremi AP sta razvrstila odzive na Dx.x po velikosti, odzivi na Lx.x pa so bili na izrisu neurejeni – L0.0 je v sorodstvu z L4.5 in L4.0 je najbolj sorođen 0.0 (sliki 68 in 69). Na rastrskem izrisu (slika 67) je opazna inhibicija, ki je v meritvah D0.5 – D5.0 zamaknila odziv za skoraj 20 ms, med tem ko je pri meritvah D0.0 celica začela odgovarjati prej – tako kot v poskusih L0.0 – L5.0. Razvrščanje po sorodnosti brez uporabe FSL ne pokaže lateralizacije (slika 70).



Prešern J. Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste *Nezara viridula...* proti viru vibracijskega signala. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani. BF, Odd. za biologijo, 2007



Slika 66. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-2a ob hkratnem draženju zadnjega para nog (**zgoraj**), ob draženju leve - ipsilateralne - zadnje noge (**sredina**) in ob draženju desne zadnje - kontralateralne - noge (**spodaj**).



Slika 67. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-2a ob draženju z večanjem časovnega zamika med začetkom stimulacije z eno in drugo pobudno glavo. Opazno je skoraj 20 ms povečanje latence prvega AP pri odzivih na draženje z zamiki na desni strani, od 0.5 ms naprej (D0.5). Uporabili smo 200 Hz dražljaje.



*Slika 68. Dendrogram odzivov celice CG-AC-2a na testiranje z zamiki z 200 Hz dražljaji, razvrščenih po sorodnosti na podlagi FSL. Odziv D0.0 se razvršča med odzive Lx.x, med tem ko so ostali odzivi Dx.x ločeni.* 



Slika 69. Dendrogram odzivov celice CG-AC-2a na testiranje z zamiki z 200 Hz dražljaji, razvrščenih po sorodnosti na podlagi FSL in intervalov med prvimi tremi AP. Situacija je podobna kot na prejšnji sliki.



Slika 70. Dendrograma odzivov celice CG-AC-2a na testiranje z zamiki z 200 Hz dražljaji, razvrščenih po sorodnosti na podlagi intervalov med prvimi tremi akcijskimi potenciali (brez FSL). Odzivi niso urejeni glede na vodečo in zaostajajočo stran.

# 3.3. TIPI INTERNEVRONOV, KATERIH LATENCE ODGOVOROV ZVEZNO SLEDIJO VEČANJU ČASOVNE RAZLIKE V ZAČETKU DRAŽENJA.

Tu je predstavljenih 10 tipov internevronov, katerih odgovori so zvezno sledili povečevanju zamika v draženju z eno in drugo pobudno glavo s povečevanjem latence odzivov. V nekaterih primerih je bilo ta pojav možno slediti, ker je celica zaradi izbrane konfiguracije stimuliranih nog imela vhod le z ene strani. Latenca je bila v primeru nekaterih celic precej uniformna, v drugih pa so bile variacije zelo velike.

# 3.3.1 Draženje prvega para nog (situacija levo - desno)

# PTG-TB-1b

Soma celice leži v protorakalnem gangliju posteromediano blizu konektivov s centralnim ganglijem. Glavna razvejitev je v protorakalnem gangliju, od kođer izraščata dva aksona - prvi v CG in drugi v podžrelni ganglij, v samem protorakalnem pa je bilo opaznih mnogo razvejitev z zadebeljenimi končiči. Razvejitve spuščajočega se aksona v centralnem gangliju imajo končiče zadebeljenega tipa; tudi nekatere razvejitve v podžrelnem gangliju so takega tipa (Slika 71).

Odgovore celice na draženje smo beležili z mikropipeto vstavljeno v protorakalni ganglij. Latence odgovorov celice ob draženju LinD ter testih L - (draženje ipsilateralne noge) so bile podobne: med 14 ms (750 Hz LinD; n = 11; Q1 = 8 ms, Q3 = 15 ms) in 17 ms (70 Hz LinD; n = 11; Q1 = 15 ms, Q3 = 18 ms) v prvem primeru ter med 15 ms (500 Hz L; n = 12, Q1 = 15 ms, Q3 = 19 ms) in 19 ms (70 Hz L; n = 12, Q1 = 17 ms, Q3 = 21 ms; Slika 75). Celica je bila med meritvami spontano aktivna (slika 73), s frekvenco AP med 6.7 in 10 Hz (n = 11). Pri draženju kontralateralnega vhoda pa je bila celica večino časa spontano aktivna v enakem frekvenčnem območju in se je odzivala le na 150 Hz dražljaj (slika 73). Pomanjkanje odziva je v skladu z zabeleženo visoko variabilnostjo izmerjenih latenc odzivov - spontana aktivnost - ob draženju D z ostalimi frekvencami. Na prikazu relativne občutljivosti je zanimiv vrh pri odzivih na 150 Hz dražljaje, tako za draženje leve kot desne noge, za odzive na draženje LinD pa je značilno ravno obratno: majhna občutljivost pri 150 Hz in večja občutljivost pri 750 Hz.

Draženje z zamiki smo opravili z 40 in 150 Hz dražljaji. Na 40Hz dražljaje je celica odgovarjala fazno vezano, kar je opazno rastrskem prikazu (slika 76). Opazna je bila tudi

razlika v odgovorih pri daljšanju zamika med začetkoma draženja ene in druge noge: ob odgovorih na dražljaje Lx.x latence AP-jev sledijo večanju zamika. Podobno smo zabeležili tudi pri odzivih na Dx.x, vendar v precej manjši meri; prisotna je bila tudi večja variabilnost latenc AP pri večjih zamikih. Odzive smo uredili po sorodnosti, kot parameter smo uporabili FSL. Na drevesnem prikazu so odzivi na draženja L0.0 in D0.0 razvrščeni kot podobni, skupaj z D3.5. Odzivi L2.0 in L3.0 - L5.0 so razvrščeni kot podobni, med tem ko so preostali odzivi pomešani (slika 77, levo). Nadalje smo razvrščanje po sorodnosti opravili z upoštevanjem FSL in intervalov med prvimi petimi AP. Ločitev podobna kot v prejšnjem primeru, vendar odzivi na dražljaje L0.0 in D0.0 niso razvrščeni skupaj (slika 77, desno). Opravili smo še razvrstitev le z upoštevanjem intervalov med prvimi petimi akcijskimi potenciali. Razvrstitev je bila podobna kot v drugem primeru - odzivi na L0.0 in D0.0 so na prikazu ločeni. Hkrati smo po sorodnosti razvrstili tudi odzive na Lx.x in Dx.x ločeno. Odzivi na draženje z Lx.x so na prikazu skoraj pravilno urejeni naraščajočem zamiku, medtem ko se odzivi ob draženju Dx.x niso razvrščali po velikosti zamika (slika 79). Rastrski prikaz odzivov ob 150 Hz stimulaciji kaže fazično-toničen tip odziva (slika 80). Tudi tu večanje FSL sledilo večanju zamika draženja leve noge – hkrati se je variabilnost njihovih vrednosti povečala pri odzivih od L3.0 naprej. Odzivi na draženja z Dx.x so temu zamikanju sledili manj očitno – tudi variacija FSL je bila manjša (slika 69). Odzive smo razvrstili po sorodnosti z upoštevanjem FSL (slika 81, levo). Odzivi L0.0 in D0.0 so tu razvrščeni blizu skupaj, popolnoma ločeni so odzivi L2.5 - L5.0, med tem ko so ostali Lx.x odzivi premešani z D5.0, D4.0 in D3.5 v svoji podveji, ostali odzivi Dx.x pa skupaj z L0.0 tvorijo svojo podvejo. V naslednjem razvrščanju smo uporabili FSL in prve štiri intervale med AP in jih prikazali na dendrogramu (slika 81, desno). Nazadnje smo razvrstili odzive še z upoštevanjem intervalov med prvimi štirimi APji. Odzivi L0.0 in D0.0 niso bili razvrščeni skupaj, ostali odzivi pa so bili razvrščeni neurejeno po smeri in velikosti (slika 82).



Slika 71. Oblika in lega celice PTG-TB-1b. Celica ima dva aksona, enega vzpenjajočega na ipsilateralni strani in enega spuščajočega na kontralateralni strani (levo).



Slika 72. Rastrski prikaz relativne odzivov celice PTG-TB-1b med meritvami frekvenčne občutljivosti ob draženju prvega para nog hkrati (LinD; **zgoraj**), pri draženju prednje leve - ipsilateralne - noge (L; **sredina**) in ob draženju prednje desne - kontralateralne - noge (D; **spodaj**).



cas [s]

Prešern J. Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste *Nezara viridula...* proti viru vibracijskega signala. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani. BF, Odd. za biologijo, 2007

63



Prešern J. Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste *Nezara viridula*... proti viru vibracijskega signala. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani. BF, Odd. za biologijo, 2007

Slika 74. Prikaz relativne jakosti odzivov celice PTG-TB-1b med testiranjem frekvenčne občutljivosti celice: ob draženju prvega para nog hkrati (LinD), pri draženju prednje leve ipsilateralne - noge (L) in ob draženju prednje desne - kontralateralne - noge (D).

Slika 75. Prikaz latenc odzivov celice PTG-TBlb pri testiranju frekvenčne občutljivosti celice: ob draženju prvega para nog hkrati (LinD), pri draženju prednje leve - ipsilateralne - noge (L) in ob draženju prednje desne - kontralateralne noge (D).





Slika 76. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TB-1b na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateralne) noge, pod absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije leve (ipsilateralne) noge.



Slika 77. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-TB-1b na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Za **levi** prikaz smo uporabili FSL, za **desnega** pa FSL in intervale med prvimi petimi akcijskim potenciali. V prvem primeru se odzivi L0.0 in D0.0 razvrstijo skupaj, med tem ko so v drugem primeru razvrščeni narazen.



Slika 78. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-TB-1b na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Uporabili smo latenco prvega akcijskega potenciala in intervale med prvimi petimi akcijskim potenciali. Tudi v tem primeru odzivi L0.0 in D0.0 niso razvrščeni skupaj.



Slika 79. Po strani stimulacije ločen dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-TB-1b na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Uporabili smo FSL in intervale med prvimi petimi AP.



Slika 80. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-TB-1b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateralne) noge, pod absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije leve (ipsilateralne) noge.



Slika 81. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-TB-1b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Za **levi** prikaz je bila uporabljena FSL. L0.0 in D0.5 so urejeni kot podobni. Na **desnem** prikazu so bili uporabljeni FSL ter intervali med prvimi štirimi AP-ji. Ločitev v drugem primeru je slabša, saj sta L0.0 in D0.0 razvrščena ločeno.



Slika 82. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-TB-1b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Za prikaz so bili uporabljeni intervali med prvimi štirimi AP. Odzivi L0.0 in D0.0 so razvrščeni ločeno, v primerjavi z uporabo intervalov med prvimi 4 AP skupaj z latenco prvega AP je nadaljnje ločevanje slabše.

## PTG-?-?

Celica se je nepopolno napolnila z barvilom, zato nismo napravili popolne oznake. Soma celice leži ventralno v mediani ravnini posteriornega dela protorakalnega ganglija. Primarno vlakno se usmeri anteriorno, v sprednji polovici ganglija se obrne in prečka mediano ravnino. Še pred tem se iz vlakna odcepita dve oz. tri večje veje, ena v anteriorni smeri, ena dvojna v posteriorni smeri in tretja v prečni smeri, ki tudi prečka mediano ravnino. Slednja se razcepi v anteriorno in posteriorno vlakno, ki dalje nista vidna. Primarno vlakno se po prečkanju mediane ravnine razcepi v lateralno-anteriorno vejo in v posteriorno usmerjeno vejo. Tipi končičev zaradi slabega obarvanja niso bili razpoznavni (slika 83).

S celico smo vzpostavili kontakt v protorakalnem gangliju. Celica je bila ves čas poskusa enakomerno spontano aktivna 20 in 23 Hz (n = 11). Odzivala se je le na draženje posameznih ali obeh nog s 40 Hz dražljaji (slika 84). Izmerjene latence odgovorov na 40 Hz dražljaje so bile med 17 in 19 ms (n = 11). Z največ AP se je celica odzivala na hkratno draženje obeh nog (slika 85).

Rastrski prikaz (slika 86) kaže daljšanje FSL pri odgovorih na 40 Hz dražljaje D1.0 – D3.0, pri D3.5 – D5.0 pa se je hkrati povečevala variabilnost latenc akcijskih potencialov. Pri odgovorih na dražljaje serije Lx.x tega fenomena nismo opazili. Razvrščanje odzivov po sorodnosti z upoštevanjem FSL in intervalov med prvimi štirimi AP je pokazalo izrazito ločitev na stimuluse serije LX.X in serije DX.X, hkrati pa skupaj razvrstilo odgovore L0.0 in D0.0. Največja napaka pri razvrščanju odgovorov D0.5 – D5.0 je 2.0 ms, pri razvrščanju odgovorov L0.5 - L5.0 pa 3 ms (slika 87). Razrvščanje smo opravili še brez upoštevanja FSL - le na podlagi intervalov med prvimi štirimi akcijskimi potenciali. Dobili smo podoben prikaz: odzivi L0.0 in D0.0 so razvrščeni skupaj, ostali so ločeni po vodeči pobudni glavi. Pri nadaljnjem razvrščanju odzivov D0.5 - D5.0 je maksimalna zabeležena napaka 2 ms, pri razvrščanju odgovorov L0.5 - L5.0 pa 1.5 ms (slika 88). Menimo, da celica dobro kodira časovni zamik začetka draženja prednje desne noge. To je nekoliko presenetljivo, glede na dejstvo, da celica odgovarja predvsem na nizkofrekvenčne stimuluse.



Slika 83. Oblika in lega celice PTG-?-?. Soma celice leži v levem protorakalnem hemigangliju. Veja "Y" oblike v desni polovici protorakalnega ganglija je verjetno izhodišče za vzpenjajoči in za spuščajoči se akson.



Prešern J. Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste *Nezara viridula...* proti viru vibracijskega signala. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani. BF, Odd. za biologijo, 2007



Slika 85. Na **levi** sliki je prikaz latenc odzivov celice PTG-?-? pri frekvenčnem testiranju ob draženju prvega para nog hkrati (LinD), ob draženju ipsilateralne - leve - noge (L) in ob draženju kontralateralne - desne - noge (D). Celica je odgovarjala v glavnem na 40 Hz stimuluse. Na **desni** sliki so relativne jakosti odovorov na 40 Hz dražljaje med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju nog prvega para (LinD), ob draženju ipsilateralne - desne - noge (D).



Slika 86. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-?-? na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateralne) noge, pod absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije leve (ipsilateralne) noge.



Slika 87. Prikaz sorodnosti odzivov celice PTG-?-? na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Pri razvrščanju so bili uporabljeni FSL in intervali med prvimi štirimi AP.. Odzivi L0.0 in D0.0 so se razvrstili skupaj; preostali odzivi so se ločili po smeri. Največja napaka v razvrščanju med odzivi L0.5 - L5.0 je 3 ms, med odzivi D0.5 - D5.0 pa 2 ms.



Slika 88. Prikaz sorodnosti odzivov celice PTG-?-? na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Pri razvrščanju so bili uporabljeni intervali med prvimi štirimi APji (nismo vključili FSL). Odzivi L0.0 in D0.0 so se razvrstili skupaj; preostali odzivi so se ločili po smeri. Največja napaka v razvrščanju med odzivi L0.5 - L5.0 je 1.5 ms, med odzivi D0.5 - D5.0 pa 2 ms.

# PTG-LC-1

Soma celice leži ventralno na levi strani ganglija, preostali del celice pa v celoti na kontralateralni strani, kjer se razvejuje od ventralne do dorzalne strani (slika 89).

Odgovore celice na draženje prvega para nog smo registrirali v protorakalnem gangliju. Uporabili smo višjo amplitudo hitrosti signala kot ponavadi, in sicer 1x10<sup>-3</sup> m/s. Celica je odgovarjala z ekscitacijo le na draženje vhoda na tisti strani, na kateri ima pletež (somi kontralateralna stran) in na draženje obeh vhodov hkrati (slika 90). Celica je bila enakomerno spontano aktivna (5 Hz, n = 11). Na 40 Hz dražljaje je celica odgovarjala fazno vezano. Krivulji relativne občutljivosti nevrona ob hkratnem draženju obeh ali le desnega (kontralateralnega) vhoda noge si po obliki sledita (slika 92). Celica je z največ AP odgovarjala na 40 Hz dražljaje. Draženje kontralateralne noge je povzročilo močnejši odgovor na dražljaj določene frekvence v časovnem oknu 0.2 s po začetku dražljaja. Podoben fenomen smo opazili pri latencah posameznih AP-jev: FSL pri draženju obeh vhodov hkrati ali le kontralateralnega vhoda so si podobne. Krivulji latenc drugega AP-ja kažeta, da se pri dražljajih s frekvencami višjih od 40 Hz, latenca drugega AP-ja ob hkratnem draženju obeh vhodov podaljša. To kaže na vpliv draženja ipsilateralne (leve) noge, ki inhibira odgovor celice (slika 93). Kumulativni seštevki akcijskih potencialov so višji pri draženju kontralateralnega vhoda (v primerjavi s seštevki odzivov draženja obeh vhodov hkrati).

Celico smo testirali zamiki s 40 Hz dražljaji. Na izrisanem rastru odzivov se vidi, da odzivi sledijo zamiku draženja na kontralateralni strani (slika 94). Na prikazu je opazna velika variabilnost latenc odzivov, saj kvartilni rang pri zamiku 0.0 ms znaša 8 ms. Variabilnost latenc vpliva tudi na razvrščanje odzivov. Napake pri razvrščanju so večje, če poleg FSL upoštevamo še intervale med prvimi štirimi akcijskimi potenciali (slike 95, 96 in 97). Iz razporejanja po sorodnosti ne moremo sklepati na ponovljivost kodirane smerne informacije. Enostransko razvrščeni odzivi se ne razvrščajo urejeno po velikosti zamika. Kakor je to pričakovano pri odzivih na draženje Lx.x, pa je pri odzivih na draženje Dx.x variabilnost verjetno povzročila, da so se skupaj razvrstili odzivi na tako različne dražljaje, kot sta npr.: D0.0 in D3.5 (slika 98).

Slika 89. Oblika in lega celice PTG-LC-1. Soma celice leži v levi polovici protorakalnega ganglija. Vse razvejitve so v kontralateralnem hemigangliju.







73

Slika 91. Prikaz latenc odzivov celice PTG-LC-1 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju obeh prednjih nog (LinD) in ob draženju kontralateralne - desne noge (D).

6





Slika 92. Prikaz relativne jakosti odzivov celice PTG-LC-1 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju obeh prednjih nog (LinD) in ob draženju kontralateralne - desne - noge (D).







Slika 94. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-LC-1 na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateralne) noge, pod absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije leve (ipsilateralne) noge.



Slika 95. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-LC-1 na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Za razvrščanje smo uporabili FSL.



Slika 96. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-LC-1 na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Pri razvrščanju smo uporabili FSL in intervale med prvimi štirimi AP-ji.



Slika 97. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-LC-1 na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Pri razvrščanju smo uporabili intervale med prvimi štirimi akcijskimi potenciali (brez FSL).



Slika 98. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-LC-1 na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Uporabili smo FSL in intervale med prvimi štirimi AP-ji. Na **levi** sliki so odzivi s povečevanjem časovnega zamika pred začetkom draženja leve noge, na **desni** sliki isto za desno nogo.

### 3.3.2 Draženje druge in tretje leve ter prve desne noge (situacija zadaj - spredaj)

#### PTG-DC-3

Soma celice leži v ventralni skorji leve polovice protorakalnega ganglija, blizu mediane ravnine (slika 99). Primarno vlakno preide na kontralateralno stran. V distalnem delu protorakalnega ganglija se iz primarnega vlakna odcepljata dve veji: večja v lateralni smeri in manjša, ki ne preide sredinske ravnine pa v medialni smeri. Akson se spušča dalje po kontralateralni strani v centralni ganglij. Približno na sredini centralnega ganglija, med odcepom živcev za drugi in tretji par nog, se zaključi s polkrožno zanko, ki preide sredinsko ravnino. Večina končičev v tem delu je zadebeljenih, podobno kot pri razvejitvah v protorakalnem gangliju, kar označuje pretežno izhodno regijo.

Z internevronom smo vzpostavili kontakt v protorakalnem gangliju. Nevron se je odzival z ekscitacijo, ko smo dražili prednjo desno (kontralateralno) nogo ali pa le-to hkrati z nogama na levi (ipsilateralni) strani. Pri draženju somi ipsilateralnih levih nog celica ni odgovarjala z ekscitacijo, pač pa je razvila rahlo in neenkomerno spontano aktivnost. Izjema je bilo draženje s 70 Hz, kjer je celica odgovarjala s podaljšanimi vlaki akcijskih potencialov (slika 102). Latence odgovorov ob draženju LinD so bile med 25 (pri 250 Hz; n = 11; Q1 = 22 ms, Q3 = 26 ms) in 33 ms (pri 40 Hz; n= 11; Q1 = 26 ms, Q3 = 43 ms; slika 100). Ob draženju kontralateralne prednje noge so bile latence krajše: med 19 ms (pri 250; n = 10; Q1 = 19 ms, Q3 = 20 ms) in 23 ms pri 100 Hz (n=10; n = 10; Q1 = 22 ms, Q3 = 24 ms). Krajše latence odgovorov na draženje kontralateralnega vhoda bi lahko razložili z inhibitornim vplivom ipsilateralnih zadnjih nog, vendar se je občutljivost celice med meritvami frekvenčne občutljivosti spreminjala. Testiranje z zamiki smo v celoti izvedli le enostransko. Na rastrskem prikazu (slika 102) je opazno fazno vezanje prvih treh akcijskih potencialov odgovora, katerim se latenca zvezno povečuje s povečevanjem zamika začetka draženja prednje desne noge. Razvrščanje po podobnosti odzivov smo izdelali z uporabo le FSL in FSL skupaj z intervali med prvima dvema, tremi, štirimi in petimi AP-ji. Informacija je skoraj brez napake ohranjena pri razvrščanju po FSL (slika 104), med tem, ko se pri FSL in intervalu med prvima dvema AP že meša D3.0 z D1.5. Taka situacija se ohrani do dendrograma na podlagi FSL in intervalov med prvimi petimi AP, na katerem je opazno mešanje D1.0 in D3.0 ter D5.0 in D3.5 (slika 105). Menimo, da se natančnost sporočila zmanjšuje z večjim številom intervalov.



Slika 100. Latence odzivov celice PTG-DC-3 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju prednje desne noge iz zadnjih dveh levih nog (LinD) in latence ob draženju desne prednje - kontralateralne - noge (D).



Slika 101. Relativne jakosti odzivov celice PTG-DC-3 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju prednje desne noge iz zadnjih dveh levih nog (LinD) in latence ob draženju desne prednje - kontralateralne - noge (D).



Slika 102. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-DC-3 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju prednje desne in zadnjih dveh levih nog (LinD, **zgora**j), ob draženju zadnjih dveh levih - ipsilateralnih - nog (L; **sredina**) in ob draženju prednje desne - ipsilateralne - noge (D; **spodaj**).



Slika 103. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-DC-3 na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateralne) noge. Testov celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije leve (ipsilateralne) noge nismo opravili.



Slika 104. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-DC-3 na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Uporabili smo FSL.



Slika 105. Dendrogram sorodnosti odzivov celice PTG-DC-3 na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Uporabili smo FSL in intervale med prvimi petimi akcijskimi potenciali.

## CG-AC-2b

Soma celice leži ventralno na desni strani centralnega ganglija v območju nevromere zadnjih nog (slika 106). Primarno vlakno se razdeli na dva dela. Prvi se po somi ipsilateralni strani vzpne v prvo nevromero centralnega ganglija. V prvi in drugi nevromeri tvori gladke razvejitve. Drugi del preide mediano ravnino in se razdeli v akson, ki se po kontralateralni strani vzpne v devtocerebrum in v krajše vlakno, iz katerega v prvi in drugi nevromeri CG izraščajo veje z drobnimi razdelitvami. Večji dve od teh segata lateralno v področje razvejitev živca druge in tretje noge; fine razvejitve obeh vej so gladkega tipa. Tretja razvejitev je usmerjena mediano, ima zadebeljene končiče ki prečkajo mediano ravnino. Drugo področje z razvejitvami, ki se končajo z zadebljenimi končiči je mediano v drugi nevromeri CG. Vse razvejitve v centralnem ganliju so po višini približno v sredinski osi. V protorakalnem gangliju je v višini živca prvega para nog par izrastkov z zadebeljenimi živčnimi končiči in sicer eden v lateralni in drugi v mediani smeri. Pletež v PTG je po globini bližje ventralni strani ganglija. Veja, ki izrašča iz aksona v mediani smeri verjetno prečka mediano ravnino. Akson ima še dve manjši razvejitvi z zadebeljenimi končiči v podžrelnem gangliju, konča pa se v devtocerebrumu z razvejitvijo, ki ima jasno zadebeljene končiče.

S celico smo vzpostavili kontakt v centralnem gangliju. Značilni odziv na draženja LinD ter L je bil en AP, kateremu je v obeh primerih sledila inhibicija, tej pa še približno 80 ms vlak akcijskih potencialov (slika 109). FSL so bile v obeh primerih in pri dražljajih vseh frekvenc približno enake, razlikovale pa so se dolžine inhibicije, ki so bile najkrajše v odzivih na 750 Hz LinD dražljaj (slika 109). Odzivi na D serije draženj niso imeli izrazitega vodilnega AP, latence so bile daljše in bolj variabilne. Izpostaviti moramo podaljšan odgovor celice tudi pri draženju s 150 Hz, kateri je bil opazen tudi pri draženju LinD z enako frekvenco. Pri odgovorih na draženje LinD je bil opazen podaljšan odgovor na draženje s 70 Hz, ki sta ga prispevali levi zadnji nogi, kar je razvidno iz rastrskega prikaza. Z največ akcijskimi potenciali se je celica odzvala ob draženju levih nog pri 150 Hz in pa ob isti frekvenci ob draženju obeh nog (LinD; slika 108).

Celico smo testirali z zamiki s 150 Hz dražljaji. Na izdelanem rastrskem prikazu (slika 110) je opazno sledenje FSL večanju zamika začetka stimulacije leve noge za stimulacijo desne. Odzive smo uredili po sorodnosti, prvič na podlagi FSL, drugič pa smo ga pripravili z upoštevanjem FSL in intervalov med prvimi osmimi AP. V prvem primeru so na prikazu opazni urejeno razvrščeni odzivi na draženje Lx.x. Odzivi na draženje s serijo Dx.x na prikazu niso urejeni po podobnosti. Pri izrisu z uporabo metodi so se mešali odzivi serije D

in L0.0 – L2.0. Na dendrogramu, izrisanem z upoštevanjem FSL in intervalov med prvimi osmimi AP, so odzivi na draženje D0.0 in L0.0 razvrščeni skupaj, pri ostalih nismo ugotovili urejenosti (slika 112). Tretjič smo dendrogram izrisali še brez uporabe FSL - le s podatki za intervale med prvimi osmimi AP. V tem primeru odzivi L0.0 in D0.0 niso bili razvrščeni v isto podvejo. Ostali odzivi so bili glede na velikost zamika razvrščeni manj pravilno kot v prejšnjem primeru (slika 113).



Slika 106. Oblika in lega celice CG-AC-2b. Soma leži v desni polovici centralnega ganglija med drugim in tretjim nožnim živcem.

Slika 107. Latence odzivov celice CG-AC-2b med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju prve desne in zadnjih dveh levih nog (LinD), obdraženju zadnjih dveh levih kontralateralnih - nog (L) in ob draženju prednje desne - ipsilateralne noge (D).









Slika 110. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-2b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije prednje desne (ipsilateralne) noge, pod absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije zadnjih levih (kontralateralnih) nog. Puščica prikazuje skokovito povečanje latenc prvih akcijkih potencialov po inhibiciji že za stimuluse s časovno razliko 0.5 ms



Slika 111. Dendrogram sorodnosti odzivov celice CG-AC-2b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije prednje desne (ipsilateralne) in zadnjih dveh levih (kontralateralnih) nog v korakih po 0.5 ms. Za sliko je bila je bila uporabljena FSL. Odzivi L0.0 in D0.0 so razvrščeni blizu skupaj.


Slika 112. Dendrogram sorodnosti odzivov celice CG-AC-2b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije prednje desne (ipsilateralne) in zadnjih dveh levih (kontralateralnih) nog v korakih po 0.5 ms. Za sliko je bila uporabljena FSL in intervali med prvimi osmimi AP-ji. Odgovori L0.0 in D0.0 so razvrščeni kot sorodni.



Slika 113. Dendrogram sorodnosti odzivov celice CG-AC-2b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije prednje desne (ipsilateralne) in zadnjih dveh levih (kontralateralnih) nog v korakih po 0.5 ms. Za sliko so bili uporabljeni intervali med prvimi osmimi AP-ji. Odgovori L0.0 in D0.0 so v tem primeru razvrščeni v sosednji podveji.

### C3

Celica nismo napolnili z barvilom, oblika nevrona ni zabeležena.

Odgovore celice na draženje smo registrirali v protorakalnem gangliju. Celica je bila spontano aktivna s 5 do 13 akcijskimi potenciali na sekundo. Z ekscitacijo se je odzivala na draženje LinD s frekvencami med 40 in 250 Hz, med 40 in 750 Hz na draženje D in na draženje L s 40 Hz dražljajem(slika 114). Latenca odgovora celice v zadnjem primeru je bila 41 ms (n = 8; Q1 = 34 ms, Q3 = 41 ms) v ostalih primerih so bile mediane latence med 14 in 43 ms. Z največ AP se je celica odzivala ob hkratnem draženju vseh treh izbranih nog (8, n = 10) z dražljajem 40 Hz (slika 115).

Celico smo testirali z draženjem z zamiki; uporabili smo 40 in 150 Hz dražljaje. Na rastrskem prikazu (slika 116) je opazen fazno vezan odgovor celice na 40 Hz dražljaje. Ob večanju zamika se je večala tudi latenca akcijskih potencialov. Pri odgovorih na draženje s serijo Lx.x ta pojav ni bil opazen. Odgovore smo razporedili po sorodnosti na podlagi FSL in z uporabo FSL in intervalov med prvimi osmimi AP-ji (slika 117). Na prvem prikazu so odgovori na dražljaje D0.0 - D1.5 razvrščeni k odgovorom na dražljaje Lx.x, ki niso urejeni glede na velikost zamika. Odgovori D2.0 - D5.0 so ločeni, vendar ne popolnoma pravilno urejeni po velikosti. Na drugem prikazu odgovori na draženje D2.0 - D5.0 tvorijo eno podvejo, v drugi pa so združeni L0.0, L1.0, L2.0 in L3.0 ter D0.0, D1.0 in D1.5. Preostanek tvori drugo vejo. Mešanje odgovorov Lx.x k odgovorom Dx.x ni presenetljivo – na rastrskem prikazu je opazno, da je v izbrani eksperimentalni konfiguraciji nog največji vpliv imelo draženje prednje desne noge - kadar se začetek stimulacije le-te ni spreminjal, so si bili tudi odgovori podobni; na rastrskem prikazu se prekrivajo z odgovori na stimuluse Dx.x s krajšimi zamiki. Odzive smo razvrstili še na podlagi intervalov med prvimi osmimi APji - na prikazu nismo zasledili nobene urejenosti (slika 118). Na rastrskem prikazu odgovorov na draženje z zamiki s 150 Hz dražljaji je opazno večanje FSL skladno z večanjem zamika začetka draženja prednje desne noge (slika 119). Pri odgovorih D1.0 – 2.5 je za prvim AP opazno približno 10 ms dolgo obdobje neaktivnosti. Odgovore smo razvrstili po podobnosti na podlagi FSL in prvih štirih intervalov med akcijskimi potenciali vključujoč FSL kot prvi interval (slika 120). V prvem primeru se mešajo odgovori Lx.x in Dx.x do velikosti zamika 2.5 ms, v drugem primeru je podobno. Razvrstitev smo opravili še z uporabo intervalov med prvimi štirimi AP brez FSL, vendar nismo zabeležili urejenosti, niti po strani vodeče/zaostajajoče stimulacije, niti glede na velikost zamika (slika 121). V primeru draženja z zamiki s 40 Hz razvrstitev odzivov kaže zanesljivo kodiranje zamika, večjega od D2.0, če smo v analizi uporabili tudi FSL. Pri draženju z zamiki s 150 Hz dražljaji je razrvšanje pravilno z dražljaje Dx.x od D3.0



navzgor, če pri analizi upoštevamo FSL.

Slika 114. Rastrski prikaz odzivov celice C3 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju prve desne in zadnjih dveh levih nog (zgoraj), ob draženju zadnjih dveh levih - kontralateralnih - nog (sredina) in ob draženju prednje desne - ipsilateralne noge (spodaj).





Slika 115. **Levo:** latence odzivov celice C3 med testiranjem frekvenčne občutljivosti celice: ob hkratnem draženju prve desne in zadnjih dveh levih nog (LinD), ob draženju zadnjih dveh levih - kontralateralnih - nog (L) in ob draženju prednje desne - ipsilateralne noge (D). **Desno:** relativne jakosti odzivov celice C3 med testiranjem frekvenčne občutljivosti celice: ob hkratnem draženju prve desne in zadnjih dveh levih nog (LinD), ob draženju zadnjih dveh levih dveh levih nog (LinD), ob draženju zadnjih dveh levih - kontralateralnih - nog (L) in ob draženju prednje desne - ipsilateralne noge (D)



Slika 116. Rastrski prikaz odzivov celice C3 na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije prednje desne noge, pod absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije zadnjih levih nog.



Slika 117. Dendrogram sorodnosti odzivov celice C3 na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije zadnjih dveh levih nog in prednje desne noge v korakih po 0.5 ms. Za **levo** sliko je bila uporabljena FSL, za **desno** sliko je bilo uporabljeno osem intervalov vključujoč FSL kot prvi interval.



Slika 118. Dendrogram sorodnosti odzivov celice C3 na 40 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije zadnjih dveh levih nog in prednje desne noge v korakih po 0.5 ms. Uporabljenih so bili intervali med prvimi osmimi akcijskimi potenciali.



Slika 119. Rastrski prikaz odzivov celice C3 na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije prednje desne noge, pod absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije zadnjih dveh levih nog.



Slika 120. Dendrogram sorodnosti odzivov celice C3 na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije z eno in drugo pobudno glavo v korakih po 0.5 ms. Za **levo** sliko je bila uporabljena FSL, za **desno** sliko so bili FSL in intervali med prvimi štirimi AP-ji.



Slika 121. Dendrogram sorodnosti odzivov celice C3 na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije z eno in drugo pobudno glavo v korakih po 0.5 ms. Za sliko so bili uporabljeni intervali med prvimi štirimi akcijskimi potenciali.

## C4

Oblike celice nismo opisali, ker se je z barvilom napolnilo več celic.

Odgovore celice smo beležili v protorakalnem gangliju ob draženju prve leve noge z eno pobudno glavo in druge ter tretje leve noge z drugo pobudno glavo. Celica se je z navječ AP odzivaLA na draženje zadnjih dveh levih in prednje desne noge hkrati (LinD) ter na draženje sprednje desne noge (D). Latence odgovorov so se gibale med 29 in 48 ms, glede na frekvenco draženja. Celica se je odzivala tudi na draženje druge in tretje leve noge, vendar šibkeje in predvsem na dražljaje frekvenc 150, 200 in 250 Hz ter na 750 Hz (slika 122).

Celico smo testirali z zamiki s 150 Hz dražljajem. Na rastrskem prikazu (slika 124) je opazno večanje latence akcijskih potencialov ob draženju z dražljaji serije Dx.x od D2.0 – D5.0. Odzive smo razvrstili po sorodnosti na podlagi FSL v enem primeru ter na podlagi FSL in intervala med prvima dvema AP-jema v drugem primeru. Na prvem izrisu so ločeni odzivi D2.0-D5.0 z izjemo D4.0; v drugem primeru je ločevanje slabše (Slika 125). Celica verjetno ne kodira smerne informacije.



Slika 122. Prikaz latenc odzivov (**levo**) in relativne jakosti odzivov (**desno**) odzivov celice C4 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju zadnjih dveh levih nog in prednje desne noge (LinD), ob draženju zadnjih dveh levih nog (L) in ob draženju prednje desne noge (D).







Slika 124. Rastrski prikaz odzivov celice C4 na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije prednje desne noge, pod absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije zadnjih levih nog.



Slika 125. Dendrogram sorodnosti odzivov celice C4 na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije zadnjih dveh levih nog in prednje desne noge v korakih po 0.5 ms. Za **levo** sliko je bila uporabljena FSL, za **desno** sliko sta bila uporabljena FSL in interval med prvima dvema akcijskima potencialoma.

### 3.3.3 Draženje zadnjega para nog (situacija levo zadaj - desno zadaj)

### CG-AC-5

Soma celice leži dorzalno desno, v skorji nad področjem nevropile zadnje desne noge. Primarno vlakno v loku preide na kontralateralno stran in se z ostrim zavojem usmeri v anteriorno smer proti možganskim ganglijem. Ipsilateralno izrašča iz primarnega vlakna v anteriorni smeri veja, ki se razveji v področje preklopov živčnih vlaken druge in tretje noge. Podobna situacija je na kontralateralni strani, kjer iz aksona izraščata na ustrezni višini dve razvejitvi, ki se spuščata v področje preklopov levih nog. Hkrati iz loka primarnega vlakna v posteriorni smeri izraščata še dva odrastka. V višini prvega para nog je v protorakalnem gangliju opazna manjša razvejitev, omejena na somi kontralateralno stran. Med tem, ko razvejitvi na področju preklopov druge in tretje leve noge izgledata gladko, je okoli razvejitev v nevropilah ipsilateralnih zadnjih dveh nog opaziti tudi mrežo razvejitev z zadebeljenimi končiči. Sami razvejitvi imata gladke končiče (slika 126).

Mikropipeto smo za namen meritev vstavili v centralni ganglij. Ob testiranju frekvenčne občutljivosti smo opazili, da se je celica pri hkratnem draženju obeh nog odzivala pri vseh frekvencah, vendar je pri dražljajih pod 100 Hz njena odzivnost padla. Krivulja relativne jakosti odgovorov pri uporabljeni hitrosti siglana kaže dva vrhova občutljivosti, in sicer pri 150 in 750 Hz (slika 129). Draženje levih zadnjih (kontralateralnih) je nog povzroči nastanek akcijskih potencialov pri draženju z 250, 500 in 750 Hz dražljaji, pri nižjih frekvencah so bili opazni le EPSP-ji. Domnevamo, da je bila uporabljena hitrost blizu vzdražnega praga. Celica ima najkrajšo latenco pri 750 Hz (32 ms; n = 13; Q1 = 25 ms, Q3 = 26 ms). Na draženje ipsilateralne (desne) noge je celica odgovarjala na vse frekvence; latence so bile daljše kot pri draženju LinD, najkrajše pa so bile pri 500 Hz dražljajih (29 ms; n = 14; Q1 = 28 ms, Q3 = 30 ms; slika 128). Odgovore na zamike smo testirali z 200 in 250 Hz dražljaji. Z rastrskih prikazov je razvidno, da zamiki tako ene kot druge zadnje noge vplivajo na odgovore celice. Ti so si bili v veliki meri podobni, čeprav so bile pri draženju z Dx.x razlike med večje (sliki 130 in 131). Za izris klastrov za odzive na 250 Hz draženje z zamiki smo uporabili FSL in interval med prvima dvema akcijskima potencialoma. Na klastru, pri katerem smo upoštevali odzive na draženja z zamiki na levi in na desni, je opazno bližnja postavitev odzivov na oba ničelna zamika, med tem ko so ostali zamiki na prikazu premešani (slika 132). Podobno velja tudi za klastrski diagram, narejen na podlagi FSL (slika 130).



Slika 126. Oblika in lega celice CG-AC-5. Soma celice je v desni polovici centralnega ganglija, nekoliko anteriorno glede na mesto izstopa živca zadnje desne noge. Razvejitve v protorakalnem gangliju so omejene na kontralateralno stran, medtem ko ima celica v centralnem gangliju razvejitve tako na ipsi- kot na kontralateralni strani.

Slika 127. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-5 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju obeh nog zadnjega para (**zgoraj**), ob draženju leve - kontralateralne - noge (**sredina**) in ob draženju desne - ipsilateralne - noge (**spodaj**). Zanimivo je, da se celica na draženje na kontralateralni strani odziva le ob uporabi visokih frekvenc.





Slika 128. Latence celice CG-AC-5 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju obeh nogzadnjega para (LinD), ob draženju leve - kontralateralne - zadnje noge (L) in ob draženju desne ipsilateralne - zadnje noge (D).

Slika 129. Relativna jakost odgovorov celice CG-AC-5 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju obeh nog zadnjega para (LinD), ob draženju leve - kontralateralne - zadnje noge (L) in ob draženju desne - ipsilateralne - zadnje noge (D).

Slika 130. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-5 na 200 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (ipsilateralne) noge, pod absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije leve (kontralateralne) noge.





Prešern J. Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste *Nezara viridula...* proti viru vibracijskega signala. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani. BF, Odd. za biologijo, 2007

Slika 131. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-5 na 250 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (ipsilateralne) noge, pod absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije leve (kontralateralne) noge.



Slika 132. Dendrogram sorodnosti odzivov celice CG-AC-5 na 250 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Uporabljena sta bila FSL in interval med prvima dvema akcijskima potencialoma (FSL je bila obravnavana kot prvi interval).



Prešern J. Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste *Nezara viridula...* proti viru vibracijskega signala. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani. BF, Odd. za biologijo, 2007

Slika 133. Dendrogram sorodnosti odzivov celice CG-AC-5 na 250 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Uporabljena je bila FSL.

# CG-AC-6

Soma celice leži v centralnem gangliju, desno od mediane ravnine, posteriorno od živca zadnje desne noge po globini pod dorzalno skorjo. Od prečnega primarnega vlakna se dve razvejitvi odcepljata kavdalno. Akson se po kontralateralni strani vzpne proti protorakalnem gangliju. Ob njem je mnogo drobnih razvejitev z zadebeljenimi končiči. Hkrati iz aksona izrašča še odrastek v nevropilo zadnje leve noge, iz primarnega vlakna pa se dviguje v kranialni smeri še odrastek v nevropilo zadnje desne noge. Od prehoda iz CG v PTG akson ni bil sledljiv (slika 133).

Mikropipeto smo vstavili v centralni ganglij. Frekvenčno občutljivost celice smo ugotavljali le z LinD in L draženjem; tudi občutljivost na zamike smo opravili le z draženjem Dx.x. Celica je bila pri obojestranskem draženju najbolj občutljiva na 250 Hz dražljaje - latenco odziva je bila 27 ms (n = 12; Q1 = 26 ms, Q3 = 28 ms). Pri ostalih frekvencah je bila latenca ob obojestranskem draženju podobna, najdaljša je bila pri 40 Hz (35 ms; n = 12; Q1 = 33 ms, Q3 = 36 ms). Pri draženju L je celica z največ AP in z latenco 39 ms (n = 10; Q1 = 33 ms, Q3 = 42 ms) odgovarjala na100 Hz dražljaj (sliki 136 in 137). Rezultati klastrske analize testov z zamiki na ipsilateralni strani pri frekvencah 200, 500 in 750 Hz so enotni (slike 139, 141 in 143). Največja zamika, 4.5 in 5.0 ms sta najdlje od 0.0 ms, vendar je odgovor na ta dražljaj sorođen odgovorom na zamike 2.0, 2.5 in 3.0 ms, medtem ko je 0.5 ms zamik po odgovoru bližji 1.0, 1.5 in 3.5 in 4.0 ms. Pri vseh treh klastrskih analizah smo upoštevali FSL in intervale med prvimi petimi akcijskimi potenciali



400 µm

Slika 134. Oblika in lega celice CG-AC-6. Soma leži posteriorno za izrastom živca zadnje desne noge. Potek živčnega vlakna v protorakalnem gangliju ni poznan.



Slika 135. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-6 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob draženju obeh zadnjih nog hkrati (zgoraj) in ob draženju zadnje leve noge - kontralateralne - noge (spodaj). Frekvenčnega testiranje ob draženju zgolj ipsilateralne zadnje noge nismo opravili.



Slika 136. Prikaz latenc odzivov celice CG-AC-6 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob draženju obeh zadnjih nog hkrati (zgoraj) in ob draženju zadnje leve noge - kontralateralne - noge (spodaj). Frekvenčnega testiranje ob draženju zgolj ipsilateralne zadnje noge nismo opravili.



Slika 137. Prikaz relativne jakosti odgovorov celice CG-AC-6 ob draženju obeh zadnjih nog hkrati (zgoraj) in ob draženju zadnje leve noge - kontralateralne - noge (spodaj). Meritev frekvenčne občutljivosti nevronaob draženju zgolj ipsilateralne zadnje noge nismo opravili.



Slika 138. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-6 na 200 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateralne) noge. Testov celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije leve (ipsilateralne) noge nismo opravili.



Slika 139. Dendrogram sorodnosti odzivov celice CG-AC-6 na 200 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Uporabili smo 5 intervalov (FSL smo zajeli kot prvi interval).



Slika 140. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-6 na 500 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateralne) noge. Testov celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije leve (ipsilateralne) noge nismo opravili.



Slika 142. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-6 na 750 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije desne (kontralateralne) noge. Testov celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije leve (ipsilateralne) noge nismo opravili.





Slika 143. Dendrogram sorodnosti odzivov celice CG-AC-6 na 750 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge v korakih po 0.5 ms. Uporabili smo FSL in intervale med prvimi petimi AP-ji.

# CG-AC-7

Celico smo le delno napolnili z barvilom; opis njene oblike je nepopoln. Soma leži ventralno, v desni zadnji četrtini centralnega ganglija za vhodom nožnega živca tretje noge. Od some se primarno vlakno spusti v notranjost ganglija, preide na kontralateralno stran in po tej strani vzpenja do anteriornih konektivov protorakalnega ganglija. V protorakalnem gangliju ni bilo opaziti razvejitev, v centralnem gangliju pa so slabo opazne razvejitve v lateralni smeri predvsem v področju zadnjih dveh levih nog (slika 144).

Električno aktivnost nevrona smo registrirali v centralnem gangliju. Meritve frekvenčne občutljivosti celice smo opravili z vse tri kombinacije: LinD, L in D. Z rastrskega prikaza je razvidno, da se celica odziva na draženje L in LinD, med tem ko pri draženju D nismo zabeležili akcijskih potencialov, povezanih z dražljajem (slika 147); kot odgovor na dražljaj smo opazili le EPSP-je. Menimo, da je bila uporabljena intenziteta na spodnji meji zaznavnosti. Med draženjem D je bila celica spontano aktivna, aktivnost smo ocenili na 10 AP na sekundo (n = 11). Spontana aktivnost med merjenjem odzivov na draženje L oz. LinD je bila nižja: njena mediana vrednost je bila 3.3 AP na sekundo (n = 14). Celica se je na draženju L in LinD odzivala s podobno relativno občutljivostjo: z največ AP-ji se je odzivala na 750 Hz dražljaje, najkrajšo latenco (n=11) pa je imela pri draženju s 500 Hz (slika 145). Odzive nevrona bi morda lahko označili za fazično-tonične. V drugem delu poskusa smo opravili meritve z zamiki s 150 Hz dražljaji. Na rastru je opazen premor za urejeno vrsto AP-jev, ki mu sledi nekaj časovno neurejenih AP-jev (slika 148). Na klastrskem prikazu odzivov so napačno razvrščeni le odzivi na dražljaje L0.5. Dendrogram smo izrisali z upoštevanjem FSL in intervalov med prvimi tremi AP (slika 149).

Slika 144. Oblika in lega celice CG-AC-7. Soma leži posteriorno v abdominalnih segmentih desne polovice centralnega ganglija.





Slika 145. Prikaz latenc odzivov celice CG-AC-7 med meritvami frekvenčne občutljivosti na hkratno draženje obeh zadnjih nog (LinD) in na draženje kontralateralne - leve - zadnje noge (L).



Slika 146. Prikaz relativne jakosti odgovorov celice CG-AC-7 med meritvami frekvenčne občutljivosti na hkratno draženje obeh zadnjih nog (LinD) in na draženje kotralateralne leve - zadnje noge (L).



Slika 147. Rastrski prikazi odzivov celice CG-AC-7 na hkratno draženje obeh zadnjih nog (zgoraj), na draženje leve - kontralateralne - zadnje noge (sredina) in desne - ipsilateralne - zadnje noge (spodaj).



Slika 148. Rastrski prikaz odzivov celice CG-AC-7 na draženje s povečevanjem zamika med začetkom stimulacije leve in desne zadnje noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so prikazani odzivi celice ob zakasnjevanju začetka stimulacije desne (ipsilateralne) noge, pod absciso pa so prikazani odzivi celice ob zakasnjevanju začetka stimulacije leve (kontralateralne) noge. Uporabili smo 150 Hz dražljaje.

5.0 ms



Slika 149. Odzivi celice CG-AC-7 razporejeni po sorodnosti na podlagi FSL in intervalov med prvimi tremi AP-ji. Uporabili smo dražljaje frekvence 150 Hz.

### 3.4 CELICE S SOMO V MOŽGANSKIH GANGLIJIH

#### 3.4.1 Draženje prvega para nog (situacija levo - desno)

#### TC-DI-1a

Soma celice leži ventralno v desnem tritocerebrumu. Posteriorno se vlakno some priključuje loku, ki v mediani smeri vstopa v SEG in tvori dendritsko razvejitev z gladkimi končiči v mediani liniji ganglija. Druga polovica loka tvori na somi ipsilateralni strain spuščajoči se akson, ki poteka po sredinski osi (glede na globino) in tvori v področju nevropil vseh treh levih nog razvejitve z zadebeljenimi živčnimi končiči. Razvejitve so omejene na ipsilateralno stran ganglijev (slika 150).

S celico smo vzpostavili kontakt v protorakalnem gangliju. Spontano aktivna celica (46.7–60 Hz) se je odzivala na draženje z inhibicijo. Draženje LinD je pokazalo najšibkejšo odzivnost

celice na 70 Hz dražljaje. Latenca do začetka inhibicije je bila najkrajša pri 500 Hz (7 ms; Q1 = 5 ms, Q3 = 11 ms; n = 11). Pri ostalih frekvencah so bile latence odzivov med 10 in 19 ms. Inhibicija je bila najdaljša pri odzivih na 500 Hz dražljaje in je trajala 39 ms, medtem ko je pri drugih frekvencah trajala med 32 in 39 ms (Slika 152). Rastrski prikazi aktivnosti ob draženju posamezne noge prednjega para kažejo manjšo občutljivost (slika 151). Latence inhibicije v odzivih na draženje L ali D so bile daljše, razen pri draženju L s 70 Hz dražljaji. Celice nismo testirali z zamiki.



Slika 150. Oblika in lega celice TC-DC-1a. Razen tistih v podžrelnem gangliju je večina razvejitev omejena na desno stran centralnega živčnega sistema.



Prešern J. Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste *Nezara viridula...* proti viru vibracijskega signala. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani. BF, Odd. za biologijo, 2007

Slika 151. Rastrski prikaz odzivov celice TC-DI-1a med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju prvega para nog (**zgoraj**), ob draženju kontalateralne - leve - prednje noge (**sredina**) in ob draženju ipsilateralne - desne - prednje noge (**spodaj**).





Slika 152. Prikaz latenc odzivov celice TC-DI-1a ob hkratnem draženju nog prednjega para (LinD), ob draženju prednje leve - kontralateralne - noge (L) in ob draženju prednje desne - ipsilateralne - noge (D). Začetek inhibicije pomeni čas od začetka stimulusa do zadnjega akcijskega potenciala pred inhibicijo, konec inhibicje pa čas od začetka stimulusa do prvega akcijskega potenciala po inhibiciji.

### 3.4.2 Draženje druge in tretje leve ter prve desne noge (situacija zadaj - spredaj)

#### TC-DI-1b

Soma celice leži ventralno v levem tritocerebrumu. Posteriorno se vlakno some priključuje na lok, ki v medialni smeri vstopa v SEG in tvori dendritsko razvejitev z gladkimi končiči v mediani liniji ganglija. Druga polovica loka tvori spuščajoči se, glede na somo ipsilateralno ležeči akson. Ta poteka po sredinski osi (glede na globino), v področju nevropil vseh treh levih nog pa tvori razvejitve z zadebeljenimi živčnimi končiči, ki so omejene na ipsilateralno stran ganglijev (slika 153).

S celico smo vzpostavili stik v protorakalnem gangliju. Spontana aktivnost celice se je med poskusom dvignila z približno 30 na 36-40 AP na sekundo; hkrati se je zmanjšala občutljivost na dražljaje nižjih frekvenc. Pri draženju LinD je celica odgovarjala na vse uporabljene frekvence z inhibicijo. Ta je pri uporabi dražljajev s frekvencami od 70 – 750 Hz prešla v postinhibitorno ekscitacijo (slika 154). Na draženje zadnjih levih (ipsilateralnih) nog je celica z inhibicijo odgovarjala na dražljaje 100 in več Hz, postinhibitorne ekscitacije niso bile opazne. Na draženju prve desne noge je celica odgovarjala z inhibicijo in postinhibitorno

ekscitacijo. Celica je odgovarjala predvsem na draženje s frekvencami 100 Hz in višjimi. Ker je nevron svojo spontano proženje akcijskih potencialov prekinjal z inhibicijami, smo latenco izmerili od začetka stimulusa do zadnjega AP pred inhibicijo in od začetka stimulusa do prvega AP po končani inhibiciji. Celica je bila pri draženju LinD najmočneje odgovarjala na 200 Hz dražljaj, saj smo zadnji AP pred inhibicijo zabeležili komaj 6 ms (n = 11; Q1 = 2 ms, Q3 = 15 ms) po začetku stimulusa. Pri odzivih na dražljaje ostalih frekvenc so bile izmerjene latence med 8 in 20 ms. Celica je najhitreje nadaljevala proženje po 55 ms (n = 11, Q1 = 52 ms, Q3 = 56 ms), ravno tako pri draženju z 200 Hz dražljaji. Za odzive na ostale uporabljene frekvence draženja smo izmerili latence med 55 in 69 ms. Celica začne prožiti akcijske potenciale pri draženju LinD s 40, 70 in 100 Hz kasneje kot pri draženju le ene izmed nog (razlika je 13 oz. 19 ms pri 40 Hz). Prvi kvartil pri latencah ob hkratnem draženju obeh nog z 200 Hz je zalo majhen, vendar bi to lahko pripisali spontani aktivnosti v ozadju (slika 155).

Za draženje s časovnimi zamiki smo izbrali frekvenco 150 Hz. Narisali smo rastrski prikaz (slika 156) in odzive glede na mediane vrednosti intervalov med akcijskimi potenciali razvrstili po sorodnosti. Za izris smo uporabili FSL in intervale med prvimi petnajstimi APji. Na drevesnem prikazu nismo ugotovili nobene urejenosti (slika 157), zato smo na enak način ločeno razvrstili odzive na dražljaje Lx.x in Dx.x. Tudi na teh dveh prikazih nismo zabeležili nobene urejenosti (slika 158).



200 µm

Slika 153. Oblika in lega celice TC-DC-1b. Razen tistih v podžrelnem gangliju je večina razvejitev omejena na desno stran centralnega živčnega sistema.



Slika 154. Rastrski prikaz odzivov celice TC-DI-1b med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju zadnjih levih - ipsilateralnih - nog ter prednje desne - kontralateralne - noge (**zgoraj**), ob draženju zadnjih levih - ipsilateralnih - nog (**sredina**) in ob draženju prednje desne - kontralateralne - noge (**spodaj**).



Slika 155. Prikaz latenc odzivov celice TC-DI-1b ob hkratnem draženju zadnjih levih - ipsilateralnih - nog ter prednje desne - kontralateralne - noge (LinD), ob draženju zadnjih dveh levih - ipsilateralnih - nog (L) in ob draženju prednje desne - kontralateralne - noge (D). Začetek inhibicije pomeni čas od začetka stimulusa do zadnjega akcijskega potenciala pred inhibicijo, konec inhibicje pa čas od začetka stimulusa do prvega akcijskega potenciala po inhibiciji.



Slika 156. Rastrski prikaz odzivov celice TC-DI-1b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije levih zadnjih nog in prednje desne noge v korakih po 0.5 ms. Nad absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije prednje desne noge, pod absciso so odzivi celice ob časovnem zamikanju začetka stimulacije zadnjih levih nog.



Slika 157. Dendrogram sorodnosti odzivov celice TC-DI-1b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije zadnjih dveh levih nog in prednje desne noge v korakih po 0.5 ms. Uporabljenih je bilo petnajst intervalov, med katerimi je bila kot prvi interval zajeta FSL.



Slika 158. Dendrogram sorodnosti odzivov celice TC-DI-1b na 150 Hz draženje s povečevanjem časovne razlike med začetkom stimulacije zadnjih dveh levih nog in prednje desne noge v korakih po 0.5 ms. Na levi sliki so odzivi ob povečevanju zamika pred stimulacijo prednje desne (kontralateralne) noge; na desni sliki so odzivi ob povečevanju zamika pred stimulacijo zadnjih dveh levih nog.Uporabili smo FSL in intervale med prvimi petnajstimi akcijskimi potenciali.

# 3.5 DRUGE CELICE

## 3.5.1 Draženje prvega para nog (situacija levo - desno)

# PTG-DC-1

Fini izrastiki celice v centralnem gangliju se niso v celoti napolnili z barvilom. Soma internevrona leži v dorzalni skorji leve polovice protorakalnega ganglija. Primarno vlakno prečka mediano ravnino in se v višini konektiva živca prve desne noge usmeri navzdol proti centralnemu gangliju. Akson se terminalno razveji v višini konektivov zadnjega para nog z mediano orientirano razvejitvijo, ki pa ne prečka medialne ravnine. V višini konektivov drugega para nog je še ena podobna razvejitev. Tip živčnih končičev je bil zaradi slabe obarvanosti celice v centralnem gangliju nedoločljiv. V višini prve desne noge iz primarnega vlakna izhajata dve veji, prva v lateralni in druga v medialni smeri; slednja je omejena na somi kontralateralno polovico ganglija. Živčni končiči na teh dveh vejah so gladki (slika 159).

Meritve smo opravili z mikropipeto, vstavljeno v protorakalni ganglij. Nevron se je z ekscitacijo odzival se je na hkratno draženje obeh nog (LinD) in na draženje somi kontralateralne, torej desne noge (D). Celica je bila rahlo spontano aktivna. Med draženjem L se je spontana aktivnost nekoliko zvišala (iz 10 na16.7 Hz, n=5). Odgovori celice so bili fazno vezani pri stimulaciji s 40 Hz (slika 160). FSL v odgovorih celice (slika 161) so bile ob draženju LinD med 13 ms pri 150 Hz (n = 14; Q1 = 12 ms, Q3 = 16 ms) in 17 ms pri 750 Hz (n = 14; Q1 = 15 ms, Q3 = 18 ms). Pri draženju D so bile latence krajše: med 10 ms pri 500 Hz (n = 5; Q1 = 10 ms, Q3 = 12 ms) in 15 ms pri 40 Hz (n = 5: Q1 = 14 ms, Q3 = 16 ms). Zabeležili smo nekaj milisekundno zvišanje latence pri hkratnem draženju obeh nog z 200 Hz dražljaji. Krivulji relativne občutljivosti celice kažeta najmočnejši odgovor celice pri draženju z 250 Hz, pri čemer so bili odgovori močnejši pri draženju kontralateralne noge (slika 162).

Zorovićeva (2005) je opisala podobno celico in za njo napisala, da se je odzivala v relativno ozkem frekvenčnem pasu, med 50 in 150 Hz, vendar je hkrati dražila vseh šest nog. Verjetno ima celica inhibitorne vhode, ki pridejo do izraza ob draženju ostalih nog. To hipotezo podpira tudi povečanje latence ob draženju LinD, ki se pojavi pri odzivih na dražljaje od 200 do 750 Hz.



Slika 160. Rastrski prikaz odzivov celice PTG-DC-1 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju prednjega para nog (**zgoraj**), ob draženju ipsilateralne (leve) prednje noge (**sredina**) in ob draženju kontralateralne (desne) prednje noge (**spoda**j).





Slika 161. Prikaz latenc odzivov celice PTG-DC-1 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju prednjega para nog (LinD) in ob draženju kontralateralne (desne) prednje noge (D).



*Slika 162. Prikaz relativne jakosti odzivov celice PTG-DC-1 med meritvami frekvenčne občutljivosti ob hkratnem draženju prednjega para nog (LinD) in ob draženju kontralateralne (desne) prednje noge (D).* 

## 3.6 OBDELAVA ODZIVOV CELICE Z METODO PO VAN ROSSUM-U

Odgovore nekaterih internevronov smo obdelali še z metodo po Van Rossumu. Pri vsaki celici smo uporabili dve različni časovni konstanti (arbitrarno določeni): eno daljšo in eno krajšo. Uporabljene vrednosti za časovni konstanti sta bili 0.05 s za krajšo in 0.005 s za daljšo. V nekaterih primerih smo uporabili drugačne vrednosti. Za prikaz smo uporabili matrico z 22x22 polji (za vsak Lx.x in za vsak Dx.x dražljaj). Informacijo nosi barva polja; razpon barvne skale prikazov je od bele, ki označuje maksimalno relativno različnost do rdeče, ki označuje relativno maksimalno podobnost (slika 163).



Slika 163. Primer Van Rossumove matrike. Vsako posamezno polje predstavlja mediano vrednost primerjav vsake od desetih ponovitev poskusa z x osi z vsako od desetih ponovitev poskusa z y osi. Razpon barvne skale je 12 odtenkov od temno rdeče (maksimalna relativna podobnost) do bele (maksimalna relativna različnost). Na barvni skali je naveden razpon vrednosti van Rossumove matrike. Na primeru je L5.0 označen kot maksimalno različen v primerjavi z D0.0 - D5.0 & L0.0. Hkrati sta v medsebojni primerjavi L0.0 in D0.0 označena kot podobna, kar je razumljivo, saj gre za odzive na enak stimulus.

## PTG-TB-1a

V nasprotju z dendrogramskim prikazom razvrščanja odzivov po podobnosti (slika 20), razvrščanje odzivov po Van Rossumu ni pokazalo podobne natančnosti. Niti pri uporabi kratke (0.0025 s) niti pri uporabi dolge časovne konstante ločitev na Lx.x in Dx.x ni dobro vidna (slika 164). Odzivi L0.0 in D0.0 so bili pri daljši časovni konstanti označeni kot podobni, med tem ko so bili pri tc = 0.0025 označeni kot bolj različni kot npr. odzivi Dx.x med seboj.



Slika 164. Prikaz sorodnosti odzivov celice PTG-TB-1a na draženje z zamiki po obdelavi posnetkov z metodo po Van Rossumu. Na zgornjem prikazu je bila uporabljena časovna konstanta 0.05 ms, na spodnjem pa 0.025 ms.
#### PTG-DC-2

Obdelali smo odzive na teste z zamiki pri 40 in 750 Hz. Simetričnost odzivov, vidna na rastrskem prikazu je opazna tudi na van Rossumovi matriki: za obe frekvenci je pri daljši časovni konstanti opazna podobnost L0.0 z D0.0 in njuna različnost z vsemi ostalimi odzivi, ki pa so si med seboj podobni. Pri krajši časovni konstanti odzivi L0.0 in D0.0 pri obeh uporabljenih frekvencah niso več označeni kot podobni, zato nismo upoštevali razvrstitve ostalih zamikov. Nadaljnje razvrščanje po velikosti časovnega zamika ni bilo ugotovljeno pri nobeni od dveh uporabljenih frekvenc pri dolgi časovni konstanti (sliki 165 zgoraj in 166



zgoraj). Kot tretjo časovno konstanto smo pri odzivih na 40 Hz zamike uporabili vmesno vrednost 0.025 ms. V tem primeru je opazen pas, ki odzive D0.5 – D2.0 označuje kot različne od odzivov D2.5 – D5.0, hkrati pa so ti zadnji podobnejši odzivom L0.5-L5.0 kot D0.5 – D2.0. Vendar gre opozoriti, da je omenjena različnost/podobnost na nivoju podobnosti/ različnosti med L0.0 in D0.0. Informativna vrednost omenjene ločitve je zato vprašljiva.



#### CG-AC-2a

20 milisekundno povečanje latence prvega akcijskega potenciala je opazno tudi po obdelavi odzivov z metodo po Van Rossumu. Pri uporabi krajše časovne konstante se, tako kot je opazno na rastrskem prikazu in dendrogramu, odzivi D0.5 - D5.0 ločijo od ostalih odzivov po medsebojni podobnosti, med tem ko je variabilnost ostalih odzivov precej večja, kar kaže rumena barva v ustreznih poljih matrice. Nekaj podobnosti je opazne med L3.5 in D0.5 - D5.0 ter med L5.0 in D0.5 - D5.0. Daljša časovna konstanta kaže večjo lastno podobnost odzivov L0.5 – L5.0 in D0.5 – D5.0 samim sebi. Zabeležili smo tudi podobnost med D0.5 – D2.0 z L0.5 – L5.0 (slika 167). Glede na dendrogram (sliki 68 in 69) in rastrski prikaz (slika 67) sklepamo, da smo v tem primeru uporabili predolgo časovno konstanto.



*Slika 167. Prikaz sorodnosti odzivov celice CG-AC-2 na draženje z zamiki po obdelavi posnetkov z metodo po Van Rossumu. Na levem prikazu je bila uporabljena časovna konstanta 0.05 ms, na desnem pa 0.005 ms.* 

#### PTG-TB-1b

Analizirali smo odzive celice na draženje z zamiki pri 150 Hz. Rastrski prikaz kaže simetrično sliko odzivov, ne glede na to katera pobudna glava vodi in katera zaostaja. Na van Rossumovi matrici je ta simetrija prisotna pri dolgi in pri kratki časovni konstanti. V obeh primerih so L0.0 in D0.0 označeni kot podobni. Pri dolgi časovni konstanti se odzivi od D1.0, D0.5, D0.0, L0.0, L0.5 in L1.0 ločijo od odzivov L1.5 - L5.0 in D1.5 - D5.0, ki pa so si med seboj podobni. Pri kratki časovni konstanti so kot podobni označeni le L1.0, L0.5, L0.0, D0.0, D0.5 in D1.5; ostali odzivi so označeni kot različni (slika 168).



Slika 168. Prikaz sorodnosti odzivov celice PTG-TB-1b na draženje z zamiki po obdelavi posnetkov z metodo po Van Rossumu. Na **levem** prikazu je bila uporabljena časovna konstanta 0.05 ms, na **desnem** pa 0.005 ms.

#### C3

Testirali smo odzive na zamike pri 40 in 150 Hz. Pri analizi odzivov na 40 Hz draženje. se je kot uporabnejša izkazala krajša časovna konstanta, ki je pokazala lepo ločevanje na Lx.x in Dx.x odzive z izjemo L0.0 in D0.0, ki so bili označeni kot podobni. Po pričakovanjih (glede na rastrski prikaz) se je izkazalo, da so si odziviv na Lx.x draženja med seboj podobni, med tem ko se odzivi na Dx.x med seboj razlikujejo že na nivoju 1 ms (različne barve). Pri primerjavi odzivov Lx.x in Dx.x je zopet opazna medsebojna podobnost Lx.x odzivov – obarvanost polj kaže, da ima edini prispevek k spremembi odziva večanje zamika na desne noge (slika 169). Analiza odzivov na zamike 150 Hz dražljajev ni pokazala, da je v vlaku akcijskih potencialov odgovora celice vključena smerna informacija (slika 170).



Slika 169. Prikaz sorodnosti odzivov celice C3 na 40 Hz draženje z zamiki po obdelavi posnetkov z metodo po Van Rossumu. Na **levem** prikazu je bila uporabljena časovna konstanta 0.05 ms, na **desnem** pa 0.005 ms.



Prešern J. Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste *Nezara viridula...* proti viru vibracijskega signala. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani. BF, Odd. za biologijo, 2007

Slika 170. Prikaz sorodnosti odzivov celice C3 na 150 Hz draženje z zamiki po obdelavi posnetkov z metodo po Van Rossumu. Na **levem** prikazu je bila uporabljena časovna konstanta 0.05 ms, na **desnem** pa 0.005 ms.

## CG-AC-7

Odzive celice smo analizirali z obema časovnima konstantama. Bolj urejeno klasifikacijo odzivov je dala uporaba krajše. Odzivi pri testih z vodečo levo nogo (Dx.x) so v primeru uporabe krajše časovne konstante označeni kot medsebojno podobni. Odzivi pri vodeči desni nogi (Lx.x) se ločijo od L2.5 – L5.0, med tem ko nižje vrednosti niso tako zanesljivo ločene. Pri uporabi daljše časovne so bili podobni odzivi večkrat označeni kot različni (slika 171).



Prešern J. Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste *Nezara viridula...* proti viru vibracijskega signala. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani. BF, Odd. za biologijo, 2007

Slika 171. Prikaz sorodnosti odzivov celice CG-AC-7 na 150 Hz draženje z zamiki po obdelavi posnetkov z metodo po Van Rossumu. Na **levem** prikazu je bila uporabljena časovna konstanta 0.05 ms, na **desnem** pa 0.005 ms.

#### 3.7 PREGLEDNICA

	spol	kombinacija	wheel prijzbrani	000000	način kodiranja	minimalni zanaolijva	nadaljnje kodiranje	frekvenca, pri kateri
tip celice	poskusne	nog pri	vnou pri izbrani	Silleriid	spremembe	kediran namik	zamika večjega od	smo zabeležili
	živali	poskusu	kombinaciji nog	obcutijivost	zamika	Kodiran zamik	minimalnega	spremembo zamika
PTG-TB-1a	Ž	1.L - 1.D	<b>D</b> vostranski	DA	časi pojavov AP	2.0 ms	DA	150 Hz
C1	Ž	1.L - 1.D	<b>D</b> vostranski	DA	-	-	-	-
C2	m	2. in 3.L - 1.D	<b>D</b> vostranski	DA	-	-	-	-
PTG-TC-1	Ž	1.L - 1.D	<b>D</b> vostranski	DA	FSL	0.5 ms	DA	100 Hz
PTG-TI-1	ž	1.L - 1.D	<b>D</b> vostranski	NE	FSL	0.5 ms	NE	150 Hz
PTG-TI-2	m	1.L - 1.D	<b>D</b> vostranski	NE	FSL	0.5 ms	NE	150 Hz
PTG-DC-2	m	1.L - 1.D	<b>D</b> vostranski	NE	FSL	0.5 ms	NE	40 Hz
PTG-TC-2	m	2. in 3.L - 1.D	<b>D</b> vostranski	NE	FSL	0.5 ms	NE	150 Hz
CG-AC-2a	m	3.L - 3.D	<b>D</b> vostranski	DA	FSL	0.5 ms	NE	200 Hz
PTG-TB-1b	ž	1L-1D	<b>D</b> vostranski	NE	ni kodiranja zamika	ni kodiranja zamika	ni kodiranja zamika	ni kodiranja zamika
PTG-?-?	ž	1L-1D	<b>D</b> vostranski	DA	časi pojavov AP	0.5 ms	NE	40 Hz
PTG-LC-1	ž	1L-1D	<b>D</b> vostranski	NE	ni kodiranja zamika	ni kodiranja zamika	ni kodiranja zamika	ni kodiranja zamika
PTG-DC-3	ž	2. in 3.L - 1.D	<b>D</b> vostranski	-	-	-	-	-
CG-AC-2b	ž	2. in 3.L - 1.D	<b>D</b> vostranski	DA	FSL	2.5 ms	DA	150 Hz
C3	m	2. in 3.L - 1.D	Enostranski	-	FSL, časi poj. AP	2.5 ms	DA	150 Hz
C4	ž	2. in 3.L - 1.D	<b>D</b> vostranski	NE	ni kodiranja zamika	ni kodiranja zamika	ni kodiranja zamika	ni kodiranja zamika
CG-AC-5	m	3.L - 3.D	<b>D</b> vostranski	NE	FSL, časi poj. AP	0.5 ms	NE	250 Hz
CG-AC-6	m	3.L - 3.D	Enostranski	-	-	-	-	-
CG-AC-7	ž	3.L - 3.D	Enostranski	-	FSL, časi poj. AP	1.0 ms	DA	150 Hz
TC-DI-1a	ž	1.L - 1.D	<b>D</b> vostranski	NE	-	-	-	-
TC-DI-1b	m	2. in 3.L - 1.D	<b>D</b> vostranski	NE	-	-	-	-
PTG-DC-1	ž	1.L - 1.D	Enostranski	-	-	-	-	-

Tabela 1. Hitri pregled opisanih tipov celic. V prvem stolpcu je oznaka, v drugem spol poskusne živali, v tretjem kombinacija draženih nog (1.L - 1.D: prednja leva in prednja desna noga; 2. in 3.L - 1.D: srednja in zadnja leva noga ter prednja desna; 3.L - 3.D: zadnja leva in zadnja desna noga). Podatek v stolpcu "Vhod pri izbrani kombinaciji nog" pove koliko vhodov je imela celica pri izbrani kombinaciji stimuliranih nog. V stolpcu "Smerna občutljivost" je podatek, ali smo zabeležili kakršnokoli razliko, ki bi jo lahko povezali z (vodečo) stranjo draženja. Pri celicah z enostranskim vhodom teh meritev nismo opravili. Stolpca "Način kodiranja spremembe zamika" in "Minimalni zanesljivo kodiran zamik" nista odvisna od ugotovljene smerne občutljivosti. Nekatere celice kodirajo zamik, ne pa smeri (npr. PTG-DC-2). V prvem smo zabeležili nosilec informacije o velikosti zamika (FSL - latenca prvega akcijskega potenciala, Časi pojavov AP - "spike timing"), v slednjem pa najmanjši zamik, ki se pri uporabljeni analizi loči od ostalih zamikov. Ali je v odzivu celice kodirano tudi nadaljnje večanje zamika je zabeleženo v predzadnjem stolpcu. Nadaljne večanje zamika je skoraj v vseh primerih kodrano le enostransko, razen pri celici PTG-TB-1a. V zadnjem stolpcu je zabeležena frekvenca, pri kateri smo ugotovili kodiranje zamikov. Z **rumeno** so označeni tipi celic, ki se na draženje z ene strani odzivajo z ekscitacijo, pri draženju z druge pa z inhibicijo. Z zeleno so označeni tipi celic, ki se na spremembo zamika odzivajo s skokovito spremembo FSL. Z vijolično so označeni tipi celic, kateri odzivi zvezno sledijo večanju zamikov. Z modro sta označena tipa celic s somo v možganskih ganglijih. Z belo je označen tip celice, ki ne sodi v nobeno od teh kategorij. (-) ni meritve.

#### 4 DISKUSIJA

Ugotavljanje smeri vira dražljaja je proces, ki ga proučujejo mnoge raziskovalne skupine po svetu. Informacija o položaju plenilca, plena, partnerja ipd. je pomembna za osebek, ni pa nujna. Nek vedenjski odziv (beg, iskanje partnerja,...) sproži že sama prisotnost dražljaja ne glede na to, od kod prihaja (npr. zračni tok povzroči, da se zelena smrdljivka spusti podlage in pade). Komunikacija preko vibracij podlage je v primerjavi z akustično komunikacijo pri žuželkah verjetno prevladujoča (Greenfield, 2002; Cocroft in Rodríguez, 2005) in evolucijsko izvorna (Meier in Reichert, 1990; Yack in Fullard, 1990; Lakes-Harlan s sod., 1999; Stumpner in von Helversen, 2001; Greenfield, 2002; Stritih, 2006). Preučevanje smeri izvora signala vibracijskega signala na nevrofiziološkem nivoju pa je slabše poznano kot pri akustični komunikaciji. Pri proučevanju te problematike smo se osredotočili na časovni zamik v prihodu signala na dva prostorsko ločena vhoda. Uporaba zamika je v živalskem svetu pogost mehanizem za določanje smeri izvora signala in je bila dokazana pri različnih skupinah živali. Med vretenčarji je bila izraba zamika dokazana med drugimi pri pegasti sovi Tytus alba (pregled v: Konishi, 2003), kjer služi kot podatek za azimut vira zvoka, puščavskem skakaču (Brand s sod., 2002), mački, zajcu, makaku in človeku (pregled v: Palmer, 2004) ter pri nekaterih vrstah netopirjev (Fuzessery, 1997). Med nevretenčarji je bilo dokazana uporaba zamika pri škorpijonih in pajkih (Brownell in Farley, 1979; Hergenröder in Barth, 1983), med žuželkami pa pri muhi vrste Ormia ohracea (Mason s sod., 2001) in hrbtoplovki vrste Notonecta undulata (Wiese, 1972; Wiese, 1974). Murphey (1971) je mnenja, da zamik uporablja za orientacijo tudi vodni drsalec Gerris remigis. Von Helversen in Rheinlaender (1988) ter Rheinlaender in Mörchen (1979) so pokazali, da sta kobilici vrst Chorthippus biguttulus in Locusta migratoria ob konstantni intenziteti zvočnega dražljaja sposobni določiti njegovo smer s pomočjo časovnega zamika med enim in drugim ušesom. Vendar prevladuje mnenje, da naj bi večina žuželk za določanje smeri vira akustičnega signala uporabljale razliko v njegovi intenziteti med eno in drugo stranjo telesa, torej med enim in drugim ušesom. Vir intenzitetne razlike je difrakcija zvočnega valovanja na delu telesa med enim in drugim ušesom. Vir časovne razlike pa je različna razdalja, ki jo signal prepotuje in ta naj bi bila v večini primerov pri žuželkah predolga (Pollack, 2003).

Ugotavljali smo značilnosti odzivov internevronov ob draženju dveh izbranih vhodov (nog) s povečevanjem zamika med začetkom draženja enega in drugega vhoda. Nekateri v delu omenjeni tipi internevronov so opisani prvič, druge je opisala že Zorovićeva (2005). Kot vzrok razlikam med njenimi in našimi opisi funkcionalnih lastnosti tipov bi lahko omenili različen način testiranja (v številu draženih nog), mesto znotrajceličnega beleženja aktivnosti

in variabilnost morfološko sicer podobnih nevronov (Comer in Robertson, 2001). Evolucijsko so lahko morfološko si podobni nevroni nastali s podvojitvijo že obstoječih nevronov. Take celice dvojčice sta opisala Römer in Marquart (1984) pri kratkorogi kobilici *L. migratoria*, o podobnih najdbah pa poročata tudi Zorovićeva (2005) pri zeleni smrdljivki in Stritihova (2006) pri jamski kobilici.

Za uporabo živali obeh spolov smo se odločili, ker: 1. imajo nožni skolopidialni organi enako zgradbo pri obeh spolih v vseh treh parih nog (Michel s sod., 1983), 2. Molina in Stumpner (2005) za primer omega nevrona 1 (ON1) dolgotipalčnic vrste Ancistrura nigrovittata izrecno navajata enakost med spoloma, tako v funkciji kot v obliki. Strukturno podobnost med spoloma sta pri svojih poskusih na murnu Gryllus bimaculatus in G. campestris upoštevala tudi Wohlers in Huber (1978). Omega nevron 1 je pomemben pri medspolni komunikaciji in za fonotaksijo. Vendar v primeru omenjenih vrst izvaja fonotaksijo le samica 3. Ronacher in Stumpner (1993) pri kratkorogi kobilici vrste *C. biguttulus* ter Franz in Ronacher (2002) pri kratkorogi kobilice vrste L. migratoria so vzpenjajoče internevrone obravnavali kot enake pri obeh spolih in 4. namen orientacija proti viru vibracijskega dražljaja ni le lociranje partnerja, pač pa tudi lociranje možnega predatorja/parazitoida oz. plena (Podisus sp.). V naših rezultatih nismo zabeležili nobene razlike med spoloma (Tabela 1.); tako pri samicah kot pri samcih smo pri draženju z zamiki zabeležili vse tri tipe odzivov. To je skladno z ugotovitvami različnih avtorjev pri ravnokrilcih (Ronacher in Stumpner, 1993; Franz in Ronacher, 2002; Stumpner, 2002; Molina in Stumpner, 2005; Stumpner in Molina, 2006). Vedenjske razlike v odzivih na vibracijske oz. zvočne dražljaje, ki so izražene med spoloma, so najverjetneje posledice hormonalne regulacije ali razlik v povezanosti nevronov oz zgradbi živčnih mrež na višjih nivojih centralnega živčnega sistema (Stumpner, os. komunikacija). Pri vinski mušici vrst Drosophila spp. so bile zebeležene podobnosti med spoloma v nastanku, številu, življenjskemu ciklu, obliki in povezavah celic v nevronskih mrežah, ki so odgovorne za paritveno vedenje vinske mušice. Produkt gena *fru*, ki je v nevronih te mreže prisoten le pri samcih, verjetno vpliva na dinamiko in/ali kemijo nevrotransmiterjev (Stockinger s sod., 2005; Demir in Dickson, 2005).

Zabeležene celice smo razvrstili v več skupin na podlagi njihovih funkcionalnih lastnosti. Spodaj podajamo komentarje za vsako teh skupin; nato pa poskušamo dobljene rezultate povezati z obstoječimi deli.

#### 4.1 O CELICAH

#### 4.1.1 Tipi internevronov, ki odgovarjajo na draženje z inhibicijo in ekscitacijo

Opisali smo tri tipe nevronov, ki odgovarjajo na draženje enega vhoda z ekscitacijo, na draženje drugega pa z inhibicijo. Dva od teh tipov celic sta se tako odzivala ob draženju prvega para nog (PTG-TB-1a, C1), eden pa ob draženju nog po diagonali, torej sprednje desne noge in zadnjih levih nog (C2). Latenca ekscitacijskih odzivov pri tipu internevrona PTG-TB-1a je bila kratka, 9 ms, kar kaže da je ta tip celice v tej povezavi internevron prvega reda. Nasprotno so bile vrednosti latence inhibicije spontane aktivnosti ob draženju kontralateralne noge daljše - med 15 in 20 ms - presinaptični inhibitorni nevron je zato vsaj prvega če ne drugega reda. V primeru celice tipa PTG-TB-1a je bil prevladujoč vpliv vhod z ipsilateralne noge, kar se vidi po tem, da inhibicija postane očitna le, kadar ni vhoda z ipsilateralne strani (slika 16). Nasprotno je bil pri nevronu tipa C1 prevladujoč inhibitorni vhod, povečano proženje akcijskih potencialov je postalo očitno le ob draženju samo desne noge. Izmerjene latence odzivov so bile relativno dolge, 15-20 ms - sklepamo, da je celica vezana na internevron prvega reda (slika 21) (Rehbein s sod., 1974; Römer s sod., 1981). Celica tipa C2 je imela pravi kombiniran odziv, saj je bil odziv ob draženju LinD mešanica odzivov ob draženju L in odzivov ob draženju D. Zanimivo je, da se je inhibicija ob draženju vseh treh izbranih nog pojavila le pri višjih frekvencah, med tem ko se je ob draženju prednje desne noge pojavila pri vseh frekvencah. Tudi v primeru tipa C2 menimo, da ne gre za internevron prvega reda, saj so bile izmerjene latence predolge (~20 ms; slika 22). Römer s sodelavci (1981) je pri skupini internevronov kobilice vrste L. migratoria opazil, da je čas pojava inhibicije v odgovoru odvisen od pozicije vira zvoka - razlika v latenci inhibicije med nasprotnima pozicijama zvočila (ipsi- in kontralateralni) je bila 10 ms. Mi tako očitnega spreminjanja latence inhibicije ob večanju zamika nismo zabeležili. Hkrati so omenjeni avtorji pri različnih internevronih kobilice vrste L. migratoria zabeležili različen čas pojava inhibicije glede na ekscitacijo: v primerih, kjer je inhibicija v odgovoru vodilna, le-ta vpliva na latenco ekscitatornega odgovora in na število akcijskih potencialov, med tem ko v primerih, v katerih inhibicija sledi akcijskim potencialom ekscitacije, vpliva le na število akcijskih potencialov. Pri razvrščanju odzivov po sorodnosti smo pri odzivih celice tipa PTG-TB-1a na podlagi prvih dvanajstih intervalov ugotovili ločevanje med odzivi na Lx.x in Dx.x, z izjemo D0.5 in L2.0. Odzivi so se razvrstili z 1 do 2 ms velikimi napakami glede na velikost zamika med začetkom draženja ene in druge pobudne glave (slika 20). Razvrščanje odzivov nevrona tipa C2 po sorodnosti ni bilo urejeno (slika 24), vendar se je odzivnost celice med poskusom spreminjala. Oblika PTG-TB-1a zaradi nepopolne obarvanosti celice ni točno

določena; zabeležena sta bila dva aksona, en ipsilateralni vzpenjajoči in en kontralateralni spuščajoči (slika 15). Med identificiranimi tipi nevronov nismo našli nobenega, ki bi mu bil po morfologiji podoben (pregled v: Stritih, 2006), po tipu odgovora pa bi ustrezal tipu, opisanemu kot TH1-DC6 v delu Stritihove (2006).

# 4.1.2 Tipi internevronov, pri katerih smo zabeležili skokovito povečanje latence prvega akcijskega potenciala

Pri tej skupini internevronov smo zaznali skokovito povečanje latence prvega akcijskega potenciala (FSL) pri povečanju časovnega zamika med začetkom stimulacije z eno in drugo pobudno glavo. Kot skokovito smo označili povečanje FSL, ki je bilo večje od povečanja zamika. Velikost skoka se je razlikovala od tipa celice do tipa celice, največja je bila v primeru celice tipa CG-AC-2, skoraj 20 ms (slika 67). V vseh primerih je bila že 0.5 ms razlika med začetkom stimulacije z eno in drugo pobudno glavo dovolj velika, da je izzvala latenčni skok, hkrati pa je bil latenčni skok v treh primerih odvisen od vodeče pobudne glave. V enem primeru smo skok zabeležili ne glede na to, katera pobudna glava je bila vodilna (celica tipa PTG-DC-2; slika 54). Podobna skokovita povečanja FSL je pri svojih poskusih na mačkah opazil Eggermont (1998) za različne azimute zvočila. Hkrati smo taka skokovita povečanja zabeležili tako pri testiranju z zamiki s srednjefrekvenčnim dražljaji (100, 150 in 200 Hz; tabela 1) kot pri testiranju z nizkofrekvenčnimi dražljaji - 40 Hz (PTG-?-?). Skokovito, skoraj 20 ms povečanje latence prvega akcijskega potenciala pri tipu internevrona CG-AC-2a loči vodečo stran od zaostajajoče, nadaljnjega povečevanja latence ob povečevanju zamika pa nismo zabeležili: odzivi Dx.x so se razvrstili po sorodnosti z največjo napako 1.5 ms, odzivi Lx.x in D0.0 pa so pomešani brez očitnega reda (sliki 68 in 69). Pri internevronu tipa PTG-TC-2 je poleg skokovitega FSL pri dražljajih L0.5-L5.0 opazno tudi zvezno večanje latence odzivov na dražljaje D3.5-D5.0 (slika 62). Pri razvrščanju se zato odzivi D2.5 in D3.5 – D5.0 razvrstijo k odzivom Lx.x (slika 63 levo). Pri celici tipa PTG-TC-1 pa je po skoku FSL v odgovorih na dražljaje L0.5-L5.0 opazno tudi nadaljnje zvezno povečevanje latence odgovora (slika 30). Eggermont v svojem delu povezuje opaženo odsotnost/prisotnost skokovito večanje latence z intenziteto signala: latence so se pri določenem azimutu skokovito povečale, nadaljnje povečevanje azimuta pa ni prineslo statistično značilnih razlik med FSL. Pri nižjih nižjih intenzitetah pa je bila FSL odvisna od azimuta zvočila (Eggermont, 1998). Pri celici tipa PTG-TI-2 se pojavi nekaj milisekundni skok FSL, vendar ni zaslediti sledenja latenc povečevanju zamika začetka draženja. Latence prvega akcijskega potenciala so bile pri meritvah z dražljaji Dx.x zelo variabilne; nasprotno je bila ta variabilnost manjša v odzivih na teste L0.5-L5.0 - torej na teste, ki so povzročili skokovito povečanje latence (slika 46). V to skupino nevronov smo uvrstili tudi celico tipa

PTG-TI-1, pri kateri je FSL sledila povečevanju zamika med začetkom draženja prednje desne in prednje leve noge. Ob kontralateralnem povečevanju zamika je v odzivih vidna inhibicija, ki je latence prvih akcijskih potencialov povečala za dobrih 10 ms, hkrati pa povečevanje latenc sledi povečevanju zamika. Linija redkih akcijskih potencialov je opazna pred inhibicijo (slika 38). Odzivi internevrona tipa PTG-DC-2 so posebnost v tem, da je skokovito povečanje latence prvega akcijskega potenciala opazno ne glede na stran večanja časovnega zamika in sicer takoj, ko ta preseže časovno razliko 0.5 ms. Hkrati je variabilnost latenc akcijskih potencialov večja v odzivih na Dx.x (slika 54). Pri testiranju frekvenčne občutljivosti smo opazili, da je ipsilateralni vhod močnejši kot kontralateralni (slika 53). Celica je »L« oblike, razvejitve ima v nevropilah prvega para nog in v nevropilah druge in tretje desne noge (slika 50). Sodeč po obliki in podobnem odzivu na Lx.x in Dx.x testiranje je možno, da tak tip celice integrira vhode s sprednjih in zadnjih nog v smislu ločevanja smeri izvora dražljaja »spredaj – zadaj«, vendar med poskusi s simulacijo te situacije takega tipa celic nismo našli. Pri testiranju z zamiki pri frekvenci 750 Hz je celica odgovarjala z jasnim pasom akcijskih potencialov ob koncu dražljaja, zamaknjeno za dolžino latence odgovora (angl. 'off neuron'; slika 57). Izmed vseh celic tega tipa ima le celica tipa PTG-TC-1 latence odzivov pri izbrani frekvenci krajše od 20 ms, iz česar sklepamo, da je večina teh celic drugega ali višjega reda. Pri meritvah frekvenčne občutljivosti celic tipov CG-AC-2a in PTG-TC-2 smo pri testiranju LinD zabeležili močnejše odzive, kot bi pričakovali iz odgovorov na enostranska testiranja frekvenčne občutljivosti L in D (sliki 61 in 66). Pri celici tipa CG-AC-2a je močno sinergistično delovanje opazno tudi v frekvenčni občutljivosti pri draženju LinD – celica odgovarja tudi na 40 Hz in 70 Hz dražljaj, ki sta bila pri draženju L in pri draženju D podpražna (celica ni odgovarjala oz. skoraj ni odgovarjala v primeru 70 Hz dražljaja). Celica tipa PTG-TC-2 je na draženje L (draženje druge in tretje kontralateralne noge) odgovarjal zanemarljivo, pri draženju D so bili odgovori na 40 in 750 Hz redki – pri draženju LinD pa je bila celica precej enakomerno odzivna čez vse frekvence z manjšo latenco kot pri draženju ipsilateralne desne noge (draženje D).

# 4.1.3 Tipi internevronov, katerih latence odgovorov zvezno sledijo večanju časovne razlike v začetku draženja

To skupino internevronov povezuje zvezno večanje latenc odgovorov ob večanju časovne razlike med začetkom stimulacije z eno in drugo pobudno glavo. Nekateri izmed obravnavanih internevronov so se odzivali z ekscitacijo le ob draženju obeh oz. le enega vhoda, med tem ko ob draženju samo drugega vhoda niso kazali ekscitatornih odzivov (internevroni tipov PTG-LC-1, PTG-DC-3, C3 in CG-AC-7). Vendar smo pri pregledu latenc odzivov celic tipov PTG-LC-1 in PTG-DC-3 odkrili vpliv draženja nog na strani, ki se ni odzivala z ekscitacijo.

V obeh primerih je šlo za vhode na somi ipsilateralni strani. Celici obeh tipov sta odgovarjali z več akcijskimi potenciali ob draženju kontralateralne(-ih) noge(- ) kot pri hkratnem draženju obeh oz. vseh treh nog (sliki 92 in 98), v primeru celice tipa PTG-DC-3 pa so bile krajše tudi latence odzivov (slika 100). Pri internevronu tipa PTG-LC-1 so si latence prvega akcijskega potenciala podobne, latence drugega in tretjega akcijskega potenciala pa so bile daljše ob hkratnem draženju obeh nog, razen pri draženju s 40 Hz (slika 93). Domnevamo, da je v tem primeru šlo za inhibitorni vpliv z ipsilateralne strani, katerega latenca leži med 30 in 40 ms. Vzrok za podobne latence pri 40 Hz bi bil lahko nek nizkofrekvenčni vhod (LFR receptorji), ki ni inhibiran s kontralateralne smeri. Pri višjih frekvencah pa je prispevek MFR receptorjev že dovolj velik, da lahko povzroči opaženo inhibicijo. Menimo, da je ta vpliv preprečil nastanek akcijskega potenciala v tem časovnem oknu. Celica tipa CG-AC-7 je imela le enostranski ekscitatorni vhod (kontralateralni), latence in relativna jakost njenih odzivov pa nista kazali na obstoj ipsilateralnega inhibitornega vhoda. To sklepamo po skoraj identičnem poteku obeh krivulj relativne jakosti odzivov in latenc prvega akcijskega potenciala (sliki 145 in 146). Domnevamo, da gre za celico prvega reda, saj so bile vrednosti FSL manjše od 10 ms (slika 147). Stritihova (2006) je, podobno, opisala štiri internevrone, ki so imeli (večinoma) le enostranski vhod. Trije opisani internevroni so imeli ekscitatorni vhod s tiste strani ganglija, kjer so imeli dendritske razvejitve, četrti pa se je na ipsilateralno stimulacijo odzival z inhibicijo spontane aktivnosti. Vendar je pri enem od nevronov iz prve skupine avtorica zabeležila tudi šibek kontralateralni ekscitatorni vhod. Celice tipov PTG-TB-1b, PTG-?-?, CG-AC-2b, C4 in CG-AC-5 so se odzivale z ekscitacijo na draženje s katerokoli pobudno glavo v vsaj enem območju uporabljenih frekvenc (slike 73, 84, 109, 123 in 127). Zanimiv odziv je imela celica tipa PTG-TB-1b – odzivi na draženje ipsilateralne in obeh prednjih nog so imeli skoraj identične latence, relativna jakost odzivov pa je bila močnejša ob draženju le ipsilateralne noge za vse frekvence razen 40 in 70 Hz. Draženje kontralateralne noge ni povzročalo ekscitacijskih odzivov z izjemo 150 Hz dražljaja. Pri 150 Hz je imela vrh tudi krivulja relativne jakosti odzivov na draženje ipsilateralne noge. Hkratno draženje obeh nog pa je imelo ravno pri 150 Hz lokalni minimum. Celica tipa PTG-?-? se je odzivala na vse tri kombinacije (LinD, L, D) draženja nog, vendar le pri 40 Hz, pri čemer so imeli odzivi hkratnega draženja obeh nog najkrajše latence in najmočnejši odziv, vendar so bile razlike majhne. Celica tipa CG-AC-2b je imela vhod tako z ipsilateralne prednje noge kot s kontralateralnih zadnjih dveh nog - slednji je bil tudi dominanten; vhod z ipsilateralne prednje noge je prišel do izraza le, kadar je bila dražena le ta noga. Ob hkratnem draženju obeh strani je bil rastrski prikaz odzivov podoben rastru odzivov na draženje kontralateralnih nog (L): vodeči akcijski potencial, z latenco med 15 in 20 ms, ki mu je sledilo približno 20 ms dolgo polje inhibicije (slika 109). Nasprotno pa krivulje relativne jakosti odzivov kažejo podobnost ob draženju LinD in D - krivulji za ti dve seriji odgovorov imata vrh pri 150 Hz – ti odzivi so na rastrskem prikazu opazni kot zaporedje akcijskih potencialov, ki je daljša od trajanja dražljaja (slika 108). Pri testiranju z zamiki Lx.x je dominantnost kontralateralne stimulacije očitna – FSL se povečuje zvezno s povečevanjem zamika, hkrati pa dolžina polja inhibicije ostaja nespremenjena (slika 110). Pri meritvah z dražljaji pa je opazen inhibitorni prispevek ipsilateralne sprednje noge. Latenca drugega akcijskega potenciala je namreč pri odgovorih na D5.0 večja kot pri D0.0. Pri odgovorih celice C3 je na rastrskem prikazu odzivov na teste z zamiki z 40 Hz vidna fazna vezanost: vsak val (skupaj 4) v dražljaju je dal dva akcijska potenciala. Odgovori niso enakomerno razporejeni, pač pa sta si zadnji AP prejšnjega vala in prvi AP, ki je odgovor na naslednji val dražljaja bližje, kot AP-ja, ki sta posledica istega vala (slika 116).

#### 4.1.4 Tipi internevronov s somo v možganskih ganglijih

Opisali smo dva tipa celic s somo v možganskih ganglijih. Oba tipa sta si po obliki podobna in spontano aktivna. Frekvenca spontane aktivnosti je bila pri celici tipa TC-DI-1a višja. Celici obeh tipov sta se na draženje vhodov v katerikoli kombinaciji odzivali z inhibicijo spontane aktivnosti. Inhibicije so v vseh primerih nastopile po vsaj 20 ms po začetku draženja (sliki 152 in 155), kar kaže, da gre za tipa internevronov, ki so drugega ali višjega reda (Rehbein s sod., 1974; Römer s sod., 1981; Staudacher, 2001). Temu v prid govori tudi dejstvo, da imata opisana tipa nevronov gladke končiče (ki predstavljajo vhodno regijo) v podžrelnem gangliju, izhodne regije pa v nevropilah vseh treh ipsilateralnih nog (sliki 150 in 153). Opisana tipa spuščajoča nevrona bi lahko po Hedwigu in Heinrichu (1997) imela funkcijo komandnih nevronov, ki s tonično aktivnostjo kontrolirata generatorje vzorcev aktivnosti živčnih celic (Wiersma in Ikeda, 1964; Kupfermann M. in Weiss K.R., 1978; povzeto po: Hedwig in Heinrich, 1997) – kot npr. komandni motonevron. Njuna aktivnost je bila prekinjena s senzoričnim vhodom – vibracijami podlage – kot so to opisali pri možganskih spuščajočih nevronih murna Staudacher in Schildberger (1998) ter Staudacher (2001). Vendar nevroni, ki so jih avtorji opisali niso bili spontano aktivni, za aktivnost naših nevronov pa zaenkrat nimamo prave razlage. Kot možne vzroke bi lahko navedli poškodbo pri vstopu elektrode, nehoteno stimulacijo motorične mreže pri prehodu skozi ganglij z elektrodo ali le tendenco živali, da se premakne. Kodiranje smerne informacije smo preverjali le v primeru celice tipa TC-DI-1b, vendar nismo opazili sledenja latenc povečevanju časovnega zamika niti urejenosti na klastrskem diagramu (sliki 157 in 158).

#### 4.1.5 Internevron tipa PTG-DC-1

Ta tip celice je opisala že Zorovićeva (2005). Naše ugotovitve se dopolnjujejo z njenimi.

Pri draženju prednje desne noge na eni in druge ter tretje noge na drugi strani smo pokazali, da ima celica ob izbrani kombinaciji nog ekscitatorni vhod le s prednje desne strani (slika 160). Zorovičeva je ob draženju vseh šestih nog opazila, da se celica odziva le v ozkem frekvenčnem pasu med 50 in 150 Hz. Nasprotno pa smo mi ob draženju prednje desne in vseh treh izbranih nog hkrati zabeležili odzive celice na vse uporabljene frekvence (40 – 750 Hz). Vendar se je relativna jakost odzivov na hkratno draženje vseh treh izbranih nog zmanjšala pod nivo draženja prednje desne noge pri frekvencah draženja 100 Hz in več (slika 161), latence pa so se povečale pri odzivih na draženje od 150 Hz naprej (slika 162). Menimo, da imata zadnji kontralateralni nogi inhibitorni vpliv, iz rezultatov Zorovićeve (2005) pa sklepamo, da imata v frekvenčnem območju nad 100 Hz tak vpliv tudi zadnji ipsilateralni nogi in/ali kontralateralna prednja noga.

#### 4.2 PRAG KODIRANJA ČASOVNIH ZAMIKOV

V našem delu smo pokazali, da je 0.5 ms najkrajša razlika med začetkom draženja ene in druge strani, ki jo nevronske mreže pri stenicah vrste N. viridula zaznajo. Tej vrednosti so blizu rezultati vedenjskih poskusov, ki sta jih Brownell in Farley (1979) določila pri škorpijonu vrste Paruroctonus mesaensis in rezultati dela von Helversnove in Rheinlaenderja (1988), ki sta pri kobilici vrste Chorthippus biguttulus za 0.4 ms zamudo ugotovila 75% zanesljivost obrata v smer dražljaja. Nasprotno sta Rheinlaender in Mörchen (1979) pri vrsti Locusta migratoria določila vedenjski prag orientacije na 2 ms razliko med enim in drugim ušesom. Čokl s sod. (1985) je pri odzivih na vibracije podlage pri isti vrsti ugotovil sposobnost zaznave milisekundnih časovnih razlik med dvema izointenzitetnima vhodoma. Mason s sod. (2001) je pri parazitoidni muhi Ormia ochracea določil še precej nižjo pražno vrednost: le 0.01 ms! Ta vrednost je manjša od rezultatov meritev na vretenčarjih: pri mačkah naj bi bila pražna vrednost upoštevanja časovne razlike pri 0.4 ms (Yin in Chan, 1990), morskih prašičkih 0.33 ms, pri ljudeh pa je bil določen prag za razliko med prihodom signala na eno in drugo uho pri 0.7 ms (Palmer, 2004). Pegaste sove so pri tem bolj natančne, odzovejo se lahko na časovne razlike do 0.160 ms (Konishi, 2003). Med vretenčarji vodijo netopirji vrste Antrozus palllidus – vedenjski prag odziva na časovno razliko so raziskovalci določili pri 0.07 ms (Fuzessery, 1997). Pri tem je potrebno razlikovati rezultate vedenjskih in nevrofizioloških poskusov. Pri prvih je bilo dokazano, da organizmi dejansko lahko upoštevajo tako majhne zamike, pri naših rezultatih pa vemo le, da je razlika opazna na nivoju odzivov posameznih celic. Časovna razlika se v opisanih celicah kaže kot kontralateralna inhibicija, ki skokovito poveča latence prvega akcijskega potenciala in kot sprememba časovnega vzorca proženja akcijskih potencialov kot posledica dražljaja. Dodati moramo še, da je 0.5 ms minimalna časovna razlika, s katero smo testirali. Obstaja torej možnost, da je prag zaznave časovne

razlike v resnici še nižji.

#### 4.3 POMEN SPREMEMBE LATENCE PRVEGA AKCIJSKEGA POTENCIALA (FSL)

V nevrofiziologiji je eno od odprtih vprašanj ali je pomembnejši nosilec informacije povprečna frekvenca akcijskih potencialov v odgovoru ali časi le-teh. Raziskave v zadnjem desetletju kažejo, da je pri mnogih senzoričnih sistemih pomembnejša časovna razporeditev akcijskih potencialov (pregled v: Heil, 2004). V nekaterih primerih je lahko informacija kodirana le z enim akcijskim potencialom – pri muhah vrste Ormia ochracea (Robert in Göpfert, 2002) - v drugih pa latenca prvega akcijskega potenciala in frekvenca vseh akcijskih potencialov v odgovoru kodirata dve različni informaciji npr. pri mačkah (Phillips in Sark, 1991). V naši raziskavi smo zabeležili nekaj primerov celic, ki na določene časovne razlike med začetkom stimulacije ene in druge noge odgovarjajo s (skokovito) spremembo FSL. Pri teh celicah (npr. CG-AC-2a, PTG-TI-1) so na rastrskem prikazu ločeni odzivi Lx.x in Dx.x z izjemo D0.0, ki se razvršti k odzivom L0.0; ločitev smo potrdili tudi z razvrščanjem odzivov po sorodnosti na podlagi FSL in z uporabo večih AP intervalov vklučujoč FSL. V obeh primerih so se odzivi ločili po strani zaostanka že od D0.5 naprej, nadaljnje razvrščanje pa je bilo manj natančno: v primeru celice CG-AC-2a so bile napake v razvrščanju 1-2 ms pri odzivih serije Dx.x in do 3 ms pri odzivih Lx.x (sliki 68 in 69). V primeru celice PTG-TC-1 je bila situacija podobna: 1-2 ms, tako pri odzivih Lx.x in odzivih na Dx.x, ne glede na število uporabljenih intervalov (sliki 31 in 32). Odzive obravnavanih celic smo sicer v večini primerov razvrstili na tri načine, od katerih sta dva vključevala latenco prvega akcijskega potenciala, tretji pa ne. V nekaterih primerih odsotnost FSL ni poslabšala razvrščanja - velikost napake pri razvrščanju se ni povečala. Taki primeri so bili PTG-TB-1a (slika 20), PTG-?-? (slika 88) ter PTG-TC-1 (slika 33). Skupno odzivom prvih dveh celic je spontana aktivnost (sliki 18 in 83). Domnevamo, da je zaradi gostote odzivov vpliv kontralateralne inhibicije opazen na latencah večih zaporednih akcijskih potencialov in prispevek ene latence v skupnem razvrščanju ni tako velik. V odzivih tretje celice, PTG-TC-1 pa je opazno povečanje FSL, kar je zbližalo prva dva akcijska potenciala in tako omogočilo lateralizacijo odzivov (slika 30). Kljub tem trem izjemam je v prikazu razvrstitve po sorodnosti opazno največ napak ravno pri razvrščanju brez uporabe FSL. Pri ostalih celicah, pri kateri smo ugotovili smerno ločene odgovore, je uporaba FSL v razvrščanju po sorodnosti ključnega pomena. Latenca prvega akcijskega potenciala tako pomembno prispeva k delitvi odzivov po smeri, uporaba več kot enega intervala pa natančnosti v zgoraj navedenih primerih ne izboljša. Vendar je uporaba latence prvega akcijskega potenciala problematična, ker je podatek o času dražljaja sicer poznan le raziskovalcu - celica tega podatka nima. Jenison (2001) je pokazal, da organizem (mačka) iz aktivnosti populacije nevronov lahko pridobi za ugotavljanje smeri vira dražljaja

nujno potrebno časovno referenco o začetku stimulacije. Ugotovitev je problematična s stališča, da se zaradi povprečevanja lahko vnese korelacija med latencami populacije nevronov in zato informacijska vrednost latence prvega akcijskega potenciala pade. Chase in Young (2007) sta ugotovila, da temu ni nujno tako in da se informacijska vrednost (vsaj) v nekaterih primerih poveča. To je skladno s predhodno ugotovitvijo van Rossuma (2001b), ki meni, da prvi akcijski potencial nosi pomembno informacijo o transientnih pojavih v okolici organizma, saj sinaptična depresija in zmanjševanje frekvence AP-jev vplivata na sledeče akcijske potenciale. Možno je, da tudi v našem primeru preračunavanje časovne reference poteka iz populacijske aktivnosti, hkrati pa bi taka populacija nevronov lahko služila tudi za izravnavo časovne variabilnosti odzivov.

#### 4.4 KOMENTAR K REZULTATOM METODE PO VAN ROSSUM-U

Z metodo po van Rossumu (2001a) smo obdelali posnetke nekaterih celic, pri katerih smo z drugimi metodami (rastrski prikaz, latence akcijski potencialov, razvrščanje odzivov po sorodnosti) ugotovili razliko med draženjem s serijo Lx.x in s serijo Dx.x. Metoda po van Rossumu ima v primerjavi z nekaterimi drugimi pogosto uporabljanimi metodami za primerjavo vlakov akcijskih potencialov (metoda cene pretvorbe vlaka akcijskih potencialov A vlak B – ang. »cost-based spike train metrics« (Victor in Purpura, 1997); uporaba filtrov (Gauss/eksponencialni) pred računanjem korelacije med dvema vlakoma akcijskih potencialov (Schreiber s sod., 2003); računanje z eksponencialno funkcijo obtežene razdalje do najbližje sosednje vrednosti (Hunter in Milton, 2003) dve pomembni prednosti: prva je enostavnost računanja, druga pa način delovanja: metoda po van Rossumu ponuja možnost fiziološke interpretacije rezultatov, saj simulira enotočkovno sumacijo v času (Machens s sod., 2003; Wohlgemuth in Ronacher, 2007). Ugotovitev razlik v kodiranju različnih dražljajev ne pomeni, da se ugotovljene razlike prenesejo na postsinaptično/postsinaptične celice. Šibka stran te metode (in ostalih omenjenih metod) je zahteva po vnosu vsaj enega parametra s strani raziskovalca (npr.: vrednost časovne konstante, cena premika akcijskega potenciala, etc.). Kreuz s sod. (2007) je zato razvil metodo, temelječo na delu Quiroge s sod. (2002), ki temelji na sinhronizaciji dogodkov, hkrati pa je neodvisna od časovne ločljivosti in ne zahteva nobenega posega s strani raziskovalca. Kljub temu menimo, da je uporaba izbrane metode za naš namen smiselna ravno zaradi omenjenih prednosti. Za vsak obravnavani primer smo uporabili dve časovni konstanti, eno kratko in eno dolgo. Uporaba krajše časovne konstante da večji poudarek na času akcijskih potencialov, med tem ko daljša časovna konstanta da večjo težo številu akcijskih potencialov (Machens s sod., 2003). Sredinska polja prikaza (križišča L $0.0 \times$  L0.0, L $0.0 \times$  D0.0, D $0.0 \times$  L0.0 in D $0.0 \times$ D0.0) morajo biti označena kot medsebojno podobna, saj gre za odzive na enake dražljaje.

Razlike v križiščih L0.5–L5.0 × D0.5–D5.0 bi označevala lateralizacijo odzivov, razlike med dražljaji z večjimi in manjšimi zamiki na isti strani pa kodiranje velikosti časovnih razlik (slika 163). Kljub neujemanju sredinskih polj prikazov s kratko časovno konstanto pri celicah PTG-TB-1a (slika 164 spodaj), PTG-DC-2 (sliki 165 in 166 spodaj levo) in CG-AC-2a (slika 167 desno) ter prikazov z dolgo časovno konstanto pri celici C3 (slika 169 levo) rezultatov ne gre zanemariti, saj je v naši izvedbi metode barvna skala relativna. Za CG-AC-2a (slika 167), katere odzivi so podrejeni skokovitemu povečanju latence, so sredinska polja pri kratki časovni konstanti (0.05 s) označena kot različna, kvadrant D0.5–D5.0 × D0.5–D5.0 pa je obarvan rdeče. Rezultat tolmačimo v smislu, da so odzivi D0.5 - D5.0 manj variabilni kot odzivi Lx.x & D0.0. Van Rossumov prikaz odzivov celice PTG-TB-1a kaže, da je 0.05 ms časovna konstanta predolga za fino razlikovanje smernega kodiranja, uporaba konstante dolžine 0.0025 pa pokaže neujemanje sredinskega polja. Ker so hkrati polja D $0.5-D5.0 \times$ D0.5–D5.0 in L0.5–L5.0 × L0.5–L5.0 markirana kot podobna, menimo, da so razlike med odzivi minimalne (slika 164). Prenos smerne informacije na naslednji nivo bi bil v primeru enotočkovne časovne sumacije vprašljiv. PTG-DC-2 je celica, katere odzivi niso lateralizirani v primeru stimulacije levo – desno – latenčni skok se pojavi ob zamiku 0.5 ms ne glede na to katera stran vodi in katera sledi. Ta simetrija je evidentna tudi na van Rossumovih prikazih za obe uporabljeni frekvenci: 40 in 750 Hz. Časovna konstanta dolžine 0.05 s se je tudi tu pokazala primernejša, pri krajši časovni konstanti središčna polja niso označena kot podobna (sliki 165 in 166). Pri celici PTG-TB-1b smo z van Rossumom obdelali odzive na 150 Hz draženje z zamiki. Prikaza z dolgo (0.05 s) in kratko (0.005 s) sta si podobna po sredinskem polju, ki v obeh primerih prikazuje ujemanje. Enako označena (kot različna) so še področja vrst in stolpcev L0.0, L0.5, D0.0 in D0.5. Razen omenjenih je večina ostalih področij pri dolgi konstanti označenih kot podobna, pri kratki pa kot različna, v obeh primerih pa sta prikaza simetrična (slika 168). Simetričnost je opazna na rastrskem prikazu (slika 80), ne pa na klastrskem prikazu (slika 81) – tu je čas akcijski potencialov zelo pomemben in temu se približa tudi van Rossumov prikaz s kratko časovno konstanto. Polja različnosti na prikazu z dolgo časovno konstanto se na rastrskem prikazu vidijo kot področja brez dogodkov na obeh straneh x-osi prikaza. Z izjemo C3 pri 40 Hz in CG-AC-7 (sliki 167 in 169) smo mnenja, da je bolj uporabna časovna konstanta 0.05 s, kar je skladno z ugotovitvijo Machensa in sodelavcev (2003), da konstanta te dolžine najbolje simulira naravno situacijo. Za celici C3 in CG-AC-7, pri katerih se uporaba kratke časovne konstante izkaže bolje, je značilna majhna variabilnost latenc akcijskih potencialov in odsotnost spontane aktivnosti (sliki 116 in 148). Daljša časovna konstanta pomeni postsinaptično zlivanje akcijskih potencialov, ki so blizu skupaj. To pomeni, da se informacija z nevronov, ki na stimulus odgovarjajo z velikim številom AP in/ali so močno spontano aktivnih, ne more biti kodirana z spremembo frekvence akcijskih potencialov, saj razlike na postsinaptičnem internevronu ne bi bile

dovolj velike. Hkrati velika variabilnost latenc akcijskih potencialov, ugotovljena v večini obravnavanih internevronov, onemogoča ponovljivost prenosa informacije.

### 4.5 MOŽNI MEHANIZMI DOLOČANJA SMERI VIRA DRAŽLJAJA

Pri akustični orientaciji sta opisana dva mehanizma. Prvi je kontralateralna inhibicija, drugi pa je t.i. 'detektor sočasnosti' (angl. »coincidence detector«). Prvi deluje z inhibicijo vhoda z nasprotne strani. Tak sistem so pri žuželkah opisali pri skupinah Caelifera (Marquart, 1985; Stumpner in Ronacher, 1991) in Ensifera (Römer s sod., 1981; Wohlers in Huber, 1982; Horseman in Huber, 1994a; Horseman in Huber, 1994b; Schul, 1997; Stumpner, 1997; Stiedl s sod., 1997); Stritihova (2006) meni, da je podoben sistem prisoten tudi pri jamski kobilici. Detektor sočasnosti je kot model postavil Jeffres (1948) - predpostavil je dve seriji vzporedno potekajočih, a različno dolgih linij (aksonov), po katerih ista informacija potrebuje različno dolgo časa, da pride do internevrona naslednjega nivoja (detektor). Ta maksimalno odgovori le, kadar informacija z nasprotnih strani pride sočasno. Seriji aksonov sta organizirani tako, da sta na detektorskem internevronu priključena dva po dolžini nasprotno dolga aksona (npr. najkrajši ipsilateralni akson in najdaljši kontralateralni akson). Ta sistem so kot metodo lokalizacije vira akustičnega signala potrdili pri pegasti sovi (Carr in Konishi, 1990) in piščancih (Carr, 1999). Tudi pri mačkah (Smith s sod., 2004) je bil obstoj tega sistema dokazan, pri skakačih pa je Brand s sod. (2002) sicer potrdil obstoj takega sistema, vendar je pokazal, da je glavni mehanizem kontralateralna inhibicija, kar je primer tudi pri netopirjih (Covey in Casseday, 1999) in kuncih (Kuwada in Batra, 1999; pregled za sesalce v: Grothe in Klump, 2000). Pri nevretenčarjih sta tak sistem za ugotavljanje vira akustičnega dražljaja predpostavila Robert in Göpfert (2002) na podlagi dela Masona s sod. (2001). S sluhom povezan sočasnostni detektor pri žuželkah sta predlagala Ronacher in Römer (1985), vendar v funkciji prepoznavanja konspecifičnih napevov. Perez-Orive s sod. (2002) navaja primer sočasnostnega detektorja tudi pri drugi modaliteti - vonju - z vlogo prepoznave vonjav pri kratkorogi kobilici vrste L. migratoria. Pri rezultatih testiranja z zamiki smo opazili kontralateralno inhibicijo (glej celice: PTG-TB-1, C1, C2, PTG-TC-1, PTG-TI-1, PTG-TI-2, PTG-DC-2, PTG-TC-2, CG-AC-2a). Römer s sod. (1981) pri odzivih internevronov kratkoroge kobilice vrste L. migratoria navaja »selitev« inhibicije ekscitatornih odzivov glede na položaj vira zvoka – tako je v skrajnih kontralateralnih pozicijah vira IPSP nastopil pred EPSP-jem, v večini ostalih pozicij pa za EPSP-jem. Kot smo že omenili, Horseman in Huber (1994a) za latence inhibitornih vplivov navajata vrednosti med 14 in 18 ms; približno 18 ms je spodnja meja pojava inhibitornih vplivov tudi v našem delu. Inhibicija v večini primerih nastopa pred ekscitatornim odzivom, razen v odzivih celic PTG-TB-1a (sliki 16 in 18), C2 (slika 22) in PTG-TI-1 (slika 38). Pri prvih dveh celicah je ekscitatorni vhod pri uporabljeni

amplitudi hitrosti valovanja dominanten. Inhibicija, ki sledi ekscitatornemu odzivu ni nujno posledica draženja kontralateralne noge saj nastopi prepozno (seštevek trajanja dražljaja in latence odgovora). V primeru celice PTG-TI-1 pa se pri testiranju z zamiki Dx.x ob zadostnem povečanju časovne razlike (od D1.5 naprej) pred poljem inhibicije pojavi tudi ekscitatorni odziv (slika 38). Odzivi celice PTG-TB-1a se kljub dominantnosti ipsilateralnega vhoda (ekscitatornega) urejeno (pravilno) razvrstijo po sorodnosti – kontralateralni (inhibitorni) vhod ima očitno dovolj velik prispevek (slika 20). Smerna informacija je tu kodirana v časih akcijskih potencialov po začetku dražljaja. V odzivih testiranja smeri izvora vibracij smo zabeležili osamljen primer internevrona, katerega odzivi bi lahko ustrezali odzivom internevrona v funkciji sočasnostnega detektorja: PTG-DC-2, ki je imel maksimalni odziv ravno pri hkratnem draženju obeh prednjih nog (slika 54). Pri celicah CG-AC-2a in PTG-TC-2 smo pri merjenju frekvenčne občutljivosti sicer zabeležili odzive, ki so bili ob hkratnem draženju izbranih nog močnejši kot bi bila vsota odzivov obeh enostranskih draženj (sliki 61 in 66). Vendar menimo, da to ni posledica sistema sočasnostnega detektorja, saj pri testiranju z zamiki nismo opazili maksimalnega odziva celice pri določenem časovnem zamiku in slabšega odziva pri drugačnem zamiku.

#### 4.6 ČASOVNA VARIABILNOST ODZIVOV

V našem delu smo pri odzivih celic na dražljaje v nekaterih primerih odkrili precejšnjo variabilnost latenc akcijskih potencialov. Latence odgovorov celice CG-AC-7 so bile najmanj variabilne. Vrednosti interkvartilnih razmikov so bile med 0.1 in 0.9 ms (slika 145). Tako majhna variabilnost je bila v našem primeru izjema, saj je večina drugih celic izkazovala precej večje variacije, npr (razpon kvartilnih razmikov pri meritvah frekvenčne občutljivosti).: 5 – 16 ms (celica PTG-LC-1, slika 91), 3 – 19 ms (celica PTG-TC-1, slika 28) in 12-53 ms (celica CG-AC-2a; pri 200 Hz je kvartilni razmik 25 ms, slika 65). Kaj to pomeni za natančnost smernega kodiranja? Za električni čut rib so avtorji (Kawasaki s sod., 1988; Rose in Heiligenberg, 1985) predlagali določanje natančnih časovnih vrednosti iz odzivov populacije nevronov nižjega reda (ang.: hyperacuity). Ribe rodu Eigenmannia naj bi bile iz odgovorov populacije senzoričnih nevronov z variabilnostjo latence odzivov 0.07 ms sposobne odzivov na dražljaje z 0.007 ms časovno razliko. Podobno rešitev predlaga tudi Mason (2001) za muho vrste O. ochracea. Internevron višjega reda tako lahko zmanjša variabilnost s povprečevanjem čez več vhodov (van Rossum s sod., 2003). Vogel, Hennig in Ronacher (2005) so pri vrsti L. migratoria opazili povečanje variabilnosti od periferije proti višjim centrom. Vogel in Ronacher (2007) sta pri isti vrsti opazila tudi povečevanje korelacije in sinhronizacije med aktivnostjo nevronov z višjim nivojem. To navaja na sklep, da je v tem primeru frekvenca akcijskih potencialov tisti parameter, ki kodira informacijo. Večje število

senzoričnih celic bi v taki situaciji prispevalo k zanesljivosti. Toda avtorja menita, da bi na nivoju vzpenjajočih nevronov (posebej v situaciji, ko je teh malo – kot recimo pri vrsti *L. migratoria*), ki prenašajo akustično informacijo, velika variabilnost in višja korelacija prizadela natančnost informacije, ki bi bila kodirana s frekvenco akcijskih potencialov. Avtorja na tem mestu menita, da je v taki situaciji precej bolj ustrezna t.i. »population code«, torej kodiranje informacije preko več vzporednih poti. Druga možnost je šum ozadja oz. vnos šuma ozadja (t.i.spontana aktivnost), ki po mnenju van Rossuma (2002) preprečuje sinhronizacijo med populacijami vzporednih nevronov in s tem dosega boljše populacijsko kodiranje dražljaja. Ne za kodiranje informacije s frekvenco akcijskih potencialov ne za kodiranje s povprečevanjem čez populacijo nevronov nimamo pravih dokazov. Zadnjemu v prid vseeno govori dejstvo, da je bilo kar nekaj celic, ki smo jih opisali, spontano aktivnih.

#### 4.7 SKLEPI

Naše delo je prvo, ki se ukvarja z nevronalno podlago kodiranja smerne informacije pri vrsti žuželk, katere osebki se sporazumevajo preko vibracij podlage. Pokazali smo, da živčni sistem zelene smrdljivke lahko zazna časovni zamik v prihodu signala na dva različna vhoda v velikosti 0.5 ms. To smo ugotovili pri tipih celicah, identificiranih tako pri samicah kot pri samcih. Ugotovili smo, da lahko internevroni razliko takega velikostnega razreda kodirajo tako za situaciji »levo – desno« in situacijo »spredaj – zadaj«. Izmerjena časovna natančnost ustreza izmerjenim razlikam v prevajanju signala preko razvejitve fižola (2 – 4 ms, Zorović 2005); taka natančnost lahko zadosti zahtevam tudi pri komunikaciji po bolj olesenelih steblih, po katerih so hitrosti valovanja višje. Časovnih razlik, manjših kot 0.5 ms nismo testirali - zato puščamo spodnjo mejo nedoločeno. Odzivi na draženje s časovnimi razlikami, povečanimi v 0.5 ms korakih, se medsebojno ne ločujejo z 0.5 ms natančnostjo - razen v primerih, ko je celica imela le en vhod. Nenazadnje lahko iz naših rezultatov zaključimo, da je glavni mehanizem določanja smeri vira dražljaja kontralateralna inhibicija in ne sočasnostni detektor. Za konec se postavlja se vprašanje, kako natančno smerno informacijo potrebuje N. viridula. Zelena smrdljivka ni plenilec, toda ob iskanju partnerja na rastlini je natančnost pomembna predvsem zaradi krajšega časa iskanja, s tem pa večje možnosti za uspeh pred konkurenčnimi osebki in krajše izpostavljenosti osebka in partnerja predatorjem in parazitoidom.

# 5 IZVLEČEK (SUMMARY)

# 5.1 IZVLEČEK

Členonožci čut za vibracije podlage uporabljajo pri zaznavanju predatorja ali plena, ter pri interspecifični komunikaciji, npr. s spolnim partnerjem. Čut za vibracije podlage skupaj s komunikacijo preko podlage je v odnosu do zvočne komunikacije pri žuželkah evolucijsko izvoren. Med tem ko sta sluh in zvočna komunikacija dobro preučena z vseh vidikov je vibracijska komunikacija precej slabše raziskana. Zlasti pomanjkljivo so raziskane nevronalne osnove določanje lokacije partnerja oz. orientacije proti viru vibracijskih dražljajev. Večina raziskav na temo procesiranja vibracijskih signalov v centralnem živčnem sistemu žuželk je bilo opravljenih pri vrstah, pri katerih orientacija proti viru vibracij podlage vedenjsko ni bila dokazana, osebki pa med seboj komunicirajo z zvočnimi signali.

Vrsta stenice zelena smrdljivka *Nezara viridula* je primeren objekt za raziskavo tega problema. Njena biologija je dobro poznana in njena razširjenost dokumentirana. Hkrati je preučeno njeno vedenje in komunikacija, poznane pa so tudi lastnosti nekaterih nevronov v živčnem sistemu.

V sklopu predparitvenega vedenja pretežno mirujoča samica oddaja pozivni napev, samec pa ji odgovarja in jo išče na rastlini. Na križišču - razvejitvi stebla – se običajno ustavi in primerja signale na vejah tega križišča. Za določanje smeri izvora vibracije bi lahko zelena smrdljivka uporabila tako razliko v amplitudi signala na različnih vejah ali časovni zamik v prihodu signala na različne dele križišča. Ugotovljeno je bilo, da je amplituda vibracijskega signala nezanesljiv podatek, saj je bilo izmerjeno, da je v dobri tretjini višja na strani, ki je nasprotna viru. Nasprotno se je pokazalo, da bi bil časovni zamik uporabnejši parameter, saj so bili pri fižolu pri prehodu čez razvejišče izmerjeni 2 – 4 ms zamiki med eno in drugo vejo razvejitve.

Z znotrajcelično registracijo aktivnosti v centralnem in protorakalnem ganliju smo preučevali odzive internevronov na različno velike časovne zamike med prihodom dražljajev iste amplitude na različne noge (vhode). Hkrati smo po opravljenih meritvah nevron še označili z barvilom Lucifer Yellow oz. Alexa Fluor 568, kar smo uporabili za opis oblike celice in njeno identifikacijo.

Opisali smo 22 tipov internevronov, katere smo razdelili v 5 skupin. V prve tri smo uvrstili

tiste, pri katerih smo v odzivih na draženje z zamikih ugotovili prisotnost informacije o smeri in/ali velikosti zamika.

V sklopu nevronov prvih treh skupin smo pokazali, da živčni sistem zelene smrdljivke lahko zazna zamik velikosti 0,5 ms, kar bi zadostovalo za zaznavanje zgoraj omenjene časovne razlike. Sposobnost zaznave take velikostne razlike smo pokazali tako pri primerjanju vhodov iz istega para nog kot tudi pri primerjanju vhodov s sprednje in kontralateralnih zadnjih nog. Ob večanju časovnih razlik razvrščanje odzivov posamezne celice ni bilo tako natančno, napake pri razvrščanju so bile v nekaterih primerih velikostnega razreda treh milisekund.

Menimo, da je glavni mehanizem določanja smeri kontralateralna inhibicija. Ta je bila v primeru dominance kontralateralnega ekscitacijskega vhoda sicer prekrita z ekscitacijo, vendar je bil njen prispevek dovolj močan, da so se odzivi pri razvrščanju ločili. V večini primerov je bila inhibicija dominantna; njeno delovanje se je pokazalo kot povečanje latence prvega akcijskega potenciala. V nekaterih primerih pa smo zaznali inhibitorno delovanje le pri frekvenčnem testiranju, ko je bile latence odzivov večje in relativna jakost odzivov manjša pri istočasnem obojestranskem draženju.

V četrto skupino smo uvrstili dva tipa spuščajočih se internevronov s somo v možganskih ganglijih, ki sta bila spontano aktivna. Somi obeh tipov sta bili v tritocerebrumu, izhodne razvejitve pa unilateralno v nevropilah vseh treh nog. Po obliki in delovanju pa domnevamo, da gre za internevrone povratne zanke.

V peti skupini je le en tip internevrona. Ugotovitve se dopolnjujejo z opisom Zorovićeve (2005)

### 5.2 SUMMARY

Arthropods vibrational sense has multiple roles, the most important of which are detection of predators or prey, social and sexual communication. Although substrate vibration communication in insects appears to be evolutionary older and more widespread than acoustic communication, it has received much less attention. The most neglected areas is orientation towards a sexual partner i.e. determination of the direction of the vibration source at the level of neurophysiology.

Shieldbug *Nezara viridula* is a suitable object for tackling the problem of orientation towards the vibrational source and localisation of a sexual partner. Its biology and ecology as well as its behaviour and communication are well investigated. At the same time, the properties of some of the neurons in its central nervous system have already been described.

According to the described premating behaviour, a female *N. viridula* remains still on a plant during calling while a male responds to its song and searches for her. At a node, a male usually stops to compare the signal inputs between the branches. Amplitude difference and time delay could both be used as directional cues in such a situation. Amplitude difference has already been shown as unreliable, time delay, however, seems more informative as crossing of a node of a bean plant causes a 2 - 4 ms time delay in signal arrival to the two branches.

By recording intracellularly from the central and the prothoracic ganglion we studied interneuronal responses to time differences in the signal arrival time to the inputs (the legs). At the same, time we used dye iontophoresis to describe the morphology and anatomical position of the recorded neuron.

We have described 22 types of interneurons which we divided to five groups. In the first three groups we placed neurons in the responses of which we could find directional information and/or delay information.

By examining the neurons in the first three groups, we showed that the central nervous system of *N. viridula* can detect a time difference as small as 0.5 ms. This was demonstrated both when the legs of the same pair were stimulated and when we stimulated the contralateral front and hind legs. Responses to increasing time differences were correctly sorted by the leading side but in clustering, errors were as high as 3 ms. The main mechanism of directional orientation is contralateral inhibition. In the case of a stronger excitatory input, the inhibition

was masked by excitation, however, its influence on spike timing was large enough for the correct clustering of the responses. Inhibitory input was most often dominant and influenced the latency of the first spike of the response. In a couple of cases, we noticed inhibitory influence when performing frequency sensitivity tests: the relative strength of the response was lower and the latency was longer when both sides were stimulated simultaneously compared to the situation of one-sided stimulation.

In the fourth group, we placed two types of descending, spontaneously active neurons with somata in tritocerebrum. Both branch unilaterally in neuropils of each of the three legs. Considering their morphology and functional properties, we propose that they could be a part of a feedback loop.

In the fifth group, we placed only one type of the interneuron. The information obtained complemented the description provided by Zorović (2005).

#### 6 SLOVSTVO

Aicher B., Tautz J. 1990. Vibrational communication in the fiddler crab, *Uca pugilator*. 1. Signal transmission through the substratum. Journal of Comparative Physiology A-Sensory Neural and Behavioral Physiology, 166(3):345-353.

Amon, T. 1981. Histologija skolopalnih organov in živčevja v nogah stenice *Nezara viridula* L. (Heteroptera, Insecta). Magistrska naloga. VTO za biologijo Biotehniške fakultete, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani.

Barth F.G. 1993. Sensory guidance in spider pre-copulatory behaviour. Comparative Biochemistry and Physiology A - Physiology, 104A(4):717-733.

Barth F.G. 1998. The vibrational sense of spiders. V: Comparative Hearing: Insects. Hoy R.R., Popper A.N. in Fay R.R. (ur.). New York, Springer Verlag: 228-278.

Barth F.G. 2002. Vibratory signals and their propagation. V: A spider's world. Senses and behavior. Springer: 225-231.

Birch M.C., Keenlyside J.J. 1991. Tapping behavior is a rhythmic communication in the death-watch beetle, *Xestobium rufovillosum* (Coleoptera, Anobiidae). Journal of Insect Behavior, 4(2):257-263.

Bleckmann H., Barth F.G. 1984. Sensory ecology of a semi-aquatic spider (*Dolomedes triton*). 2. The release of predatory behavior by water surface waves. Behavioral Ecology and Sociobiology, 14(4):303-312.

Blejec A. 2005. Statistical methord for detection of firing rate changes in spontaneously active neurons. Neurocomputing, 65-66:557-563.

Borges M., Jepson P.C., Howse P.E. 1987. Long-range mate location and close-range courtship behaviour of the green stink bug, *Nezara viridula* and its mediation by sex pheromones. Entomol exp appl, 44:205-212.

Brand A., Behrend O., Marquardt T., McAlpine D., Grothe B. 2002. Precise inhibition is essential for microsecond interaural time difference coding. Nature, 417:543-547.

Brownell P.H. 1984. Prey detection by the sand scorpion. Scientific American, 251(6):86-97.

Brownell P.H., Farley R.D. 1979. Orientation to Vibrations in Sand by Nocturnal Scorpion *Paruroctonus mesaensis*: Mechanism of Target Localization. Journal of Comparative Physiology, 131:31-38.

Brownell P.H., Hemmen J.L.v. 2001. Vibration Sensitivity and a Computational Theory for Prey-Localizing Behavior in Sand Scorpions. American Zoologist, 41:1229-1240.

Burrows M. 1996. The neurobiology of an insect brain. New York, Oxford University Press, Inc. 682 str.

Carr C.E. 1999. Evolution of time coding systems. Neural Computation, 11:1-20.

Carr C.E., Konishi M. 1990. A circuit for detection of interaural time differences in the brain stem of the barn owl. Journal of Neuroscience, 10(10):3227-3246.

Casas J., Magal C., Sueur J. 2007. Dispersive and non-dispersive waves through plants: implications for arthropod vibratory communication. Proceedings of The Royal Society B, 247:1015-1092.

Chapman R.F. 1998. The Insects. Structure and function. 4 edition. Cambridge, Cambridge University Press. 547 str.

Chase S.M., Young E.D. 2007. First-spike latency information in single neurons increases when referenced to population onset. Proceedings of National Academy of Science, 104(12):5175-5180.

Claridge M.F. 1985. Acoustic signals in Homoptera: Behavior, Taxonomy, and Evolution. Annual Review of Entomology, 30:297-317.

Cocroft R.B. 1999. Offspring-parent communication in a subsocial treehopper (Hemiptera: Membracidae: *Umbonia crassicornis*). Behaviour, 136:1-21.

Cocroft R.B. 2001. Vibrational communication and the ecology of group-living, herbivorous insects. American Zoologist, 41(5):1215-1221.

Cocroft R.B., Rodríguez R.L. 2005. The Behavioral Ecology of Insect Vibrational Communication. Bioscience, 55(4):323-334.

Cocroft R.B., Tieu T.D., Hoy R.R., Miles R.N. 2000. Directionality in the mechanical response to substrate vibration in a treehopper (Hemiptera: Membracidae: *Umbonia crassicornis*). Journal of Comparative Physiology, 186:695-705.

Comer C.M., Robertson R.M. 2001. Identified nerve cells and insect behavior. Progress in Neurobiology, 63:409-439.

Covey E., Casseday J.H. 1999. Timing in the auditory system of the bat. Annual Review of Physiology, 61(1):457-476.

Cremer L. Heckl M. 1973. Structure-borne sound. 2 edition. Springer-Verlag. 520 str.

Čokl A. 1983. Functional Properties of Vibroreceptors in the Legs of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera, Pentatomidae). Journal of Comparative Physiology, 150:261-269.

Čokl A. 1985. Problems of sound communication in a land bug species *Nezara viridula* L. (Heteroptera, Pentatomidae). V: Acoustic and Vibrational Communication in Insects. Kalmring K., Elsner N. (ur.). Paul Parey: 163-168.

Čokl A. 2006. Stink bug communication through plants during mating. Razprave IV razreda SAZU, 47(3):7-35.

Čokl A., Amon T. 1980. Vibratory Interneurons in the Central Nervous System of *Nezara viridula* L. (Pentatomidae, Heteroptera). Journal of Comparative Physiology A, 139:87-95.

Čokl A., Bogataj E. 1982. Factors affecting vibrational communication in *Nezara viridula* L. (Heteroptera, Pentatomidae). Biološki vestnik, 30(1):1-20.

Čokl A., Kalmring K., Wittig H. 1977. The responses of auditory ventral-cord neurons of *Locusta migratoria* to vibration stimuli. Journal of Comparative Physiology, 120:161-172.

Čokl A., Otto C., Kalmring K. 1985. The processing of directional vibratory signals in the ventral nerve cord of *Locusta migratoria*. Journal of Comparative Physiology A, 156:45-52.

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, 29:372-380.

Čokl A., Virant-Doberlet M. in Zorović M. 2005. Sense organs involved in the vibratory communication of bugs (Hemiptera: Heteroptera). V: Insect sounds and communication. Claridge M.F., Drosopoulos S. (ur.). Boca Raton, Florida, CRC Press LCC.

Čokl A., Virant-Doberlet M. 2003a. Communication with subtrate-borne signals in small plant-dwelling insects. Annual Review of Entomology, 48:29-50.

Čokl A. in Virant-Doberlet M. 2003b. Vibrational communication. V: Encyclopedia of Insects. Resh V.H., Cardé R.T. (ur.). San Diego, Academic Press/Elsevier Science: 1167-1171.

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, 58:1277-1283.

Čokl A., Virant-Doberlet M., Stritih N. 2000. Temporal and spectral properties of the songs of the southern green stink bug *Nezara viridula* L.from Slovenia. Pflügers Arch - European Journal of Applied Physiology, 439(7):168-170.

Čokl A., Zorović M., Millar J.G. 2007. Vibrational communication along plants by the stink bugs *Nezara viridula* and *Murgantia histrionica*. Behavioural Processes, 75:40-54.

Dambach M. 1972. Der Vibrationssinn der Gryllen. I. Schwellenmessungen an Beinen frei beweglicher Tiere. J Comp Physiol A, 79:281-304.

Debaisieux P. 1937. Organes scolopidiaux des pattes d'insectes II. La Cellule, 47:79-202.

Demir E., Dickson B.J. 2005. fruitless Splicing Specifies Male Courtship Behavior in

Drosophila. Cell, 121(5):785-794.

Devetak D. 1985. Detection of substrate vibrations in the antlion larva *Myrmeleon formicarius* (Neuroptera: Myrmeleonidae). Biološki vestnik, 33(2):11-22.

Devetak D. 1998. Detection of substrate vibration in Neuropteroidea: a review. Acta Zoologica Fennica, 209:87-94.

Devetak D., Gogala M., Čokl A. 1978. Prispevek k fiziologiji vibroreceptorjev stenic iz družine Cydnidae (Heteroptera). Biološki vestnik, 26:131-139.

Devetak D., Pabst M.A. 1994. Structure of the subgenual organ in the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. Tissue & Cell, 26(2):249-257.

Devetak D., Pabst M.A., Lipovšek D. 2004. Leg chordotonal organs and campaniform sensilla in *Chrysoperla* Steinmann 1964 (Neuoroptera): structure and function. Denisia, 13:163-171.

Dierkes S., Barth F.G. 1995. Mechanism of signal production in the vibratory communication of the wandering spider *Cupiennius getazi* (Arachnida, Araneae). Journal of Comparative Physiology, 176:31-44.

Djemai I., Casas J., Magal C. 2001. Matching host reactions to parasitoid wasp vibrations. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 268(1484):2403-2408.

Eggermont J.J. 1998. Azimuth coding in primary auditory cortex of the cat. II. Relative latency and interspike interval representation. Journal of Neurophysiology, 80:2151-2161.

Eibl E., Huber F. 1979. Central projections of tibial sensory fibers within the three thoracic ganglia of crickets (*Gryllus campestris* L., *Gryllus bimaculatus* DeGeer). Zoomorphologie, 92:1-17.

Elias D.O., Mason A.C., Maddison W.P., Hoy R.R. 2003. Seismic signals in a courting male jumping spider (Araneae: Salticidae). Journal of Experimental Biology, 206(22):4029-4039.

Franz A., Ronacher B. 2002. Temperature dependence of temporal resolution in an insect nervous system. Journal of Comparative Physiology A, 188:261-271.

Fuzessery Z.M. 1997. Acute sensitivity to interaural time differnces in the inferior colliculus of a bat that relies on passive sound localization. Hearing Research, 109:46-62.

Gogala A., Gogala M. 1989. True bugs of Slovenia (Insecta: Heteroptera). Biološki vestnik, 37(1):11-44.

Gogala M. 1984. Vibration producing structures and songs of terrestrial Heteroptera as systematic character. Biološki vestnik, 32(1):19-36.

Gogala M. 1985. Vibrational communication in insects (biophysical and behavioural aspects).V: Acoustic and Vibrational Communication in Insects. Kalmring K., Elsner N. (ur.). Berlin,Paul Parey Verlag: 117-126.

Greenfield M.D. 2002. Signalers and Receivers. New York, Oxford University Press

Grolleau F., Lapied B. 2000. Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: Towards a better understanding of the ionical mechanisms underlying spontaneous electrical activity. The Journal of Experimental Biology, 203:1633-1648.

Grosch A., Callender F., Petersen M., Čokl A. in Kalmring K. 1985. Vibration receptors of larvae and of imagines in locusts: Location on the legs, central projections and physiology. V: Acoustic and Vibrational Communication in Insects. Kalmring K., Elsner N. (ur.). Berlin, Paul Parey: 151-161.

Grothe B., Klump G.M. 2000. Temporal processing in sensory systems. Current Opinion in Neurobiology, 10(4):467-473.

Hedwig B. 1986. On the role in stridulation of plurisegmental interneurons of the acridid grasshopper *Omocestus viridulus* L. I. Anatomy and physiology of descending cephalothoracic interneurons. Journal of Comparative Physiology, 158:413-427.

Hedwig B. in Elsner N. 1985. Sound production and sound detection in a stridulating acridid grasshopper (*Omocestus viridulus*). V: Acoustic and vibrational communication in insects. Kalmring K., Elsner N. (ur.). Paul Parey Berlin: 61-72.

Hedwig B., Heinrich R. 1997. Identified descending brain neurons control different stridulatory motor patterns in an acridid grasshopper. Journal of Comparative Physiology A, 180:285-294.

Heil P. 2004. First-spike latency of auditory neurons revisited. Current Opinion in Neurobiology, 14:461-467.

Henry C.S. 1994. Singing and cryptic speciation in insects. Trends in Ecology & Evolution, 9(10):388-392.

Hergenröder R., Barth F.G. 1983. Vibratory signals and spider behavior: How do the sensory inputs from the eight legs interact in orientation. Journal of Comparative Physiology, 152:316-371.

Hill P.S.M. 2001. Vibration and animal communication: a review. American Zoologist, 41:1135-1142.

Hill P.S.M., Shadley J.R. 2001. Talking back: Sending soil vibration signals to lekking prairie mole cricket males. American Zoologist, 41(5):1200-1214.

Hirschberger P. 2001. Stridulation in Aphodius Dung beetles: Behavioral context and intraspecific variability of song patterns in *Aphodius ater* (Scarabaeidae). Journal of Insect Behavior, 14(1):69-88.

Hokkanen H. 1986. Polymorphism, parasites, and the native area of *Nezara viridula* (Hemiptera, Pentatomidae). Annales Entomologici Fennici, 52(1):28-31.

Horseman G., Huber F. 1994a. Sound localisation in crickets. I. Contralaletral inhibition of an ascending auditory interneuron (AN1) in the cricket *Gryllus bimaculatus*. J Comp Physiol A, 175:389-398.

Horseman G., Huber F. 1994b. Sound localisation in crickets. II. Modelling the role of a simple neural network in the prothoracic ganglion. J Comp Physiol A, 175:399-413.

Hoy R.R., Hoikkala A., Kaneshiro K. 1988. Hawaiian courtship songs - Evolutionary innovation in communication signals of *Drosophila*. Science, 240(4849):217-219.

Hrabar N., Virant-Doberlet M., Čokl A. 2004. Species specificity of male southern green stink bug *Nezara viridula* (L.) reactions to the female calling song. Acta Zoologica Sinica, 50(4):566-575.

Hunter J.D., Milton J.G. 2003. Amplitude and frequency dependence of spike timing: implications for dynamic regulation. Journal of Neurophysiology, 90:387-394.

Ivanov V.D. 1993. Principles of sexual communication in caddisflies (Insecta, Trichoptera).V: Sensory Systems of Arthropods. Wiese K., Gribakin F.G., Popov A.V. in Renneinger G. (ur.). Basel, Birkenhäuser Verlag: 609-626.

Jeffres L.A. 1948. A place theory of sound localization. Journal of comparative physiology & psychology, 41:35-39.

Jenison R.L. 2001. Decoding first-spike latency: a likelihood approach. Neurocomputing, 38-40:239-248.

Jeram S., Čokl A. 1996. Mechanoreceptors in insects: Johnston's organ in *Nezara viridula* (L.) (Pentatomidae, Heteroptera). European Journal of Physiology, 431:281-282.

Jeram S., Pabst M.A. 1996. Johnston's organ and central organ in *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera, Pentatomidae). Tissue & Cell, 28(2):227-235.

Jones W.A. 1985. *Nezara viridula*. V: Handbook of Insect Rearing, Vol. 1. Singh P., Moore R.F. (ur.). Amsterdam, Elsevier: 339-343.

Kalmring K. 1975. The aferent auditory pathway in the ventral cord of *Locusta migratoria* (Acrididae). I. Synaptic conectivity and information processing among the auditory neurons of the ventral cord. J Comp Physiol, 104:103-142.

Kalmring K. 1983. Convergence of auditory and vibratory senses at the neuronal level of the ventral cord in grasshoppers; its probable importance for behaviour in the habitat. V: Fortschritte der Zoologie; Bd. 28: Horn (Hrsg.), Multimodal Convergences in Sensory Systems. Gustav Fischer; Verlag, Stuttgart, New York.

Kalmring K., Jatho M., Rossler W., Sickmann T. 1997. Acousto-Vibratory Communication

in Bushcrickets (Orthoptera: Tettigoniidae). Entomol Gener, 21(4):265-291.

Kalmring K., Kuhne R., Lewis B. 1983. The acoustic behavior of the bushcricket *Tettigonia cantans*. III. Coprocessing of auditory and vibratory information in the central nervous system. Behavioural Processes, 8(3):213-228.

Kawasaki M., Rose G., Heiligenberg W. 1988. Temporal hyperacuity in single neurons of electric fish. Nature, 336(6195):173-176.

Keil T.A. 1998. The structure of integumental mechanoreceptors. V: Microscopic anatomy of invertebrates. Wiley-Liss, Inc.: 385-404.

Kilpinen O. in Michelsen A. Vibration sensitive neurons in the honeybee, *Apis mellifera*. Elsner, N. in Breer, H. II, 324. 1994. Stuttgart, Georg Thieme verlag. Goettingen Neurobiology Report 1994.

Kirchner W.H., Broecker I., Tautz J. 1994. Vibrational alarm communication in the dampwood termite *Zootermopsis nevadensis*. Physiological Entomology, 19:187-190.

Klarner D., Barth F.G. 1982. Vibratory signals and prey capture in orb-weaving spiders (*Zygiella-X-notata*, *Nephila clavipes*, Araneidae). Journal of Comparative Physiology, 148(4):445-455.

Kon M., Oe A., Numata H., Hidaka T. 1988. Comparison of the mating behavior between two sympatric species, *Nezara antennata* and *N. viridula*. Journal of Ethology, 6(2):91-98.

Konishi M. 2003. Coding of auditory space. Annual Review of Neuroscience, 26:31-55.

Kreuz T., Haas J.S., Morelli A., Abarbanel H.D.I., Politi A. 2007. Measuring spike train synchronity. Journal of Neuroscience Methods, 165:151-161.

Kühne R. 1982. Neurophysiology of the vibration sense in locusts and bushcrickets: The responses of ventral-cord neurones. Journal of Insect Physiology, 28(7):615-623.

Kühne R., Silver S., Lewis B. 1984. Processing of vibratory and acoustic signals by ventral cord neurons in the cricket *Gryllus campestris*. Journal of Insect Physiology, 30(7):575-585.

Kühne R., Silver S. in Lewis B. 1985. Processing of vibratory signals in the central nervous system of the cricket. V: Acoustic and vibrational communication in insects. Kalmring K., Elsner N. (ur.). Berlin, Paul Parey Verlag: 183-192.

Kupfermann M., Weiss K.R. 1978. The command neuron concept. Brain and Behavioral Sciences, 1:3-39.

Kuwada S., Batra R. 1999. Coding of Sound Envelopes by Inhibitory Rebound in Neurons of the Superior Olivary Complex in the Unanesthetized Rabbit. Journal of Neuroscience, 19(6):2273-2287.

Lakes R. in Schikorski T. 1990. Neuroanatomy of Tettigoniids. V: The Tettigoniidae: Biology, systematics and evolution. Bailey W.J., Rentz.W.J.(Eds) (ur.). Crawford House Press, Bathurst.

Lakes-Harlan R., Stolting H., Stumpner A. 1999. Convergent evolution of insect hearing organs from a preadaptive structure. Proc R Soc Lond B, 266:1161-1167.

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, 73:637-649.

Lewis L.A., Schneider S.S., Degrandi-Hoffman G. 2002. Factors influencing the selection of recipients by workers performing vibration signals in colonies of the honeybee, Apis mellifera. Animal Behaviour, 63:361-367.

Loher W. in Dambach M. 1989. Reproductive behaviour. V: Cricket Behaviour and Neurobiology. Huber F., Moore J.E. in Loher W. (ur.). Ithaca, London, Cornell University Press: 43-82.

Machens C.K., Schütze H., Franz A., Kolesnikova O., Stemmler M.B., Ronacher B., Herz A.V.M. 2003. Single auditory neurons rapidly discriminate conspecific communication signals. Nature Neuroscience, 6(4):341-342.

Markl H. 1983. Vibrational Communication. V: Neuroethology and Behavioral Physiology. Huber F., Markl H. (ur.). Berlin Heidelberg, Springer Verlag: 332-353.
Marquart V. 1985. Local interneurons mediating excitation and inhibition onto ascending neurons in the auditory pathway of grasshoppers. Naturwissenschaften, 72:42-44.

Marten K., Marler P. 1977. Sound Transmission and Its Significance for Animal Vocalization I. Temperate Habitats. Behavioral Ecology and Sociobiology, 2:271-290.

Mason A.C., Oshinsky M.L., Hoy R.R. 2001. Hyperacute directional hearing in microscale auditory system. Nature, 410:686-690.

McNett G.D., Miles R.N., Homentcovschi D., Cocroft R.B. 2006. A method for twodimensional characterization of animal vibrational signals transmitted along plant stems. Journal of Comparative Physiology A, 192:1245-1251.

Meier T., Reichert H. 1990. Embryonic development and evolutionary origin of the orthopteran auditory organs. Journal of Neurobiology, 21:592-610.

Mencinger B. 1998. Prey recognition in larvae of the antlion *Euroleon nostras* (Neuroptera, Myrmeleontidae). Acta Zoologica Fennica, 209:157-161.

Mencinger-Vračko B., Devetak D. 2007. Orientation of the pit-building antlion larva *Euroleon* (Neuroptera, Myrmeleontidae) to the direction of substrate vibrations caused by prey. Zoology,

Meyhofer R., Casas J. 1999. Vibratory stimuli in host location by parasitic wasps. Journal of Insect Physiology, 45(11):967-971.

Meyhöfer R., Casas J., Dorn S. 1997. Vibration-mediated interactions in a host-parasitoid system. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 264(1379):261-266.

Michel K., Amon T., Čokl A. 1983. The morphology of the leg scolopidial organ in *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). Revue Canadienne de Biologie Experimentale, 42:139-150.

Michelsen A. 1999. The Dance Language of Honeybees: Recent Findings and Problems. V: The design of animal communication. Hauser M.D., Konishi M. (ur.). Cambridge, The MIT

Press.

Michelsen A., Flemming F., Gogala M., Traue D. 1982. Plants as transmission channels for insect vibrational songs. Behavioral Ecology and Sociobiology, 11:269-281.

Michelsen A. in Larsen O.N. 1983. Strategies for acoustic communication in complex environments. V: Neuroethology and behavioral physiology. Huber F., Markl H. (ur.). Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: 321-331.

Michieli S., Žener B. 1968. Der Sauerstoffverbrauch verschiedener Farbstadien bei der Wanze *Nezara viridula* (L.). Z Vergl Physiol, 58:223-224.

Miklas N., Cokl A., Renou M., Virant-Doberlet M. 2003a. Variability of vibratory signals and mate choice selectivity in the southern green stink bug. Behavioural Processes, 61(3):131-142.

Miklas N., Lasnier T., Renou M. 2003b. Male bugs modulate pheromone emission in response to vibratory signals from conspecifics. Journal of Chemical Ecology, 29(3):561-574.

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.

Molina J., Stumpner A. 2005. Effects of pharmacological treatment and photoinactivation on the directional responses of an insect neuron. Journal of Experimental Zoology, 303(A):1085-1103.

Murphey R.K. 1971. Sensory aspects of control of orientation to prey by waterstrider, *Gerris remigis*. Zeitschrift fur Vergleichende Physiologie, 72(2):168-&.

Murphey R.K. 1973. Mutual inhibition and organization of a non-visual orientation in *Notonecta*. Journal of Comparative Physiology, 84(1):31-40.

Nebeling B. 2000. Morphology and physiology of auditory and vibratory ascending interneurons in bushcricket. Journal of Experimental Zoology, 286:219-230.

Nieh J.C. 1998. The honey bee shaking signal: function and design of a modulatory

communication signal. Behavioral Ecology and Sociobiology, 42(1):23-36.

Oldfield B.P., Kleindienst H.U., Huber F. 1986. Physiology and tonotopic organisation of auditory receptors in the cricket *Gryllus bimaculatus* DeGeer. J Comp Physiol A, 159:457-464.

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.

Palmer A.R. 2004. Reassesing mechanisms of low-frequency sound localisation. Current Opinion in Neurobiology, 14:457-460.

Panizzi A.R. 1997. Wild hosts of Pentatomids: Ecological significance and role in their pest status on crops. Annual Review of Entomology, 42:99-122.

Panizzi A.R. 2002. Stink bugs on soybean in Northeastern Brazil and a new record on the southern green stink bug *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). Neotropical Entomology, 31(2):331-332.

Panizzi A.R., Niva C.C., Hirose E. 1995. Feeding preference by stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) for seeds within soybean pods. Journal of Entomological Science, 30(3):333-341.

Panizzi A.R., Parra J.R.P., Santos C.H., Carvalho D.R. 2000. Rearing the southern green stink bug using an artificial dry diet and an artificial plant. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 35(9):1709-1715.

Panizzi A.R., Slansky F. 1991. Suitability of selected legumes and the effect of nymphal and adult nutrition in the southern green stink bug (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). Journal of Economic Entomology, 84(1):103-113.

Perez-Orive J., Mazor O., Turner G.C., Cassenaer S., Wilson R.I., Laurent G. 2002. Oscillations and sparsening of odor representations in the mushroom body. Science, 297:359-365.

Peters B.H., Römer H., Marquart V. 1986. Spatial segregation of synaptic inputs and outputs in a locust auditory interneurone. Journal of Comparative Neurology, 254:34-50.

Phillips D.P., Sark S.A. 1991. Separate mechanisms control spike numbers and inter-spike intervals in transient responses of cat auditory cortex neurons. Hearing Research, 53(1):17-27.

Pollack G.S. 2003. Sensory cues for sound localization in the cricket *Teleogryllus oceanicus*: interaural difference in response strenght vestus interaural latency difference. Journal of Comparative Physiology A, 189:143-151.

Quiroga R.Q., Kreuz T., Grassberger P. 2002. Event synchronization: a simple and fast method to measure synchronicity and time delay patterns. Physical Review E, 66

Rehbein H.G., Kalmring K., Römer H. 1974. Structure and function of acoustic neurons in the thoracic ventral chord of *Locusta migratoria*. The Journal of Comparative Physiology A, 95:263-280.

Rheinlaender J., Morchen A. 1979. /`Time-intensity trading/' in locust auditory interneurones. Nature, 281(5733):672-674.

Riede K. 1997. Bioacoustic monitoring of insect communities in a Bornean rainforest canopy. V: Canopy arthropods. Stork N E, Adis J in Didham R K (ur.). London, Chapman & Hall: 442-452.

Robert D., Göpfert M.C. 2002. Novel schemes for hearing and orientation in insects. Current Opinion in Neurobiology, 12:715-720.

Römer H., Marquart V. 1984. Morphology and physiology of auditory interneurons in the metathoracic ganglion of the locust. J Comp Physiol A, 155:249-262.

Römer H., Marquart V., Hardt M. 1988. Organisation of a sensory neuropile in the auditory pathway of two groups of Orthopterans. J Comp Neurol, 275:201-215.

Römer H., Rheinlaender J., Dronse R. 1981. Intracellular studies on auditory processing in the metathoracic ganglion of the locust. Journal of Comparative Physiology, 144:305-312.

Ronacher B., Römer H. 1985. Spike synchronization of tympanic receptor fibres in a grasshopper (*Chorthippus biguttulus* L., Acrididae). Journal of Comparative Physiology,

Prešern J. Nevrobiološka osnova orientacije stenice vrste *Nezara viridula...* proti viru vibracijskega signala. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani. BF, Odd. za biologijo, 2007

157:631-642.

Ronacher B. in Stumpner A. Parallel processing of song pattern and sound direction by ascending auditory interneurons in the grasshopper *Chorthippus biguttulus*. Wiese, K. 376-384. 1993. Basel, Birkhäuser Verlag. Sensory Systems of Arthropods.

Rose G., Heiligenberg W. 1985. Temporal Hyperacuity in the Electric Sense of Fish. Nature, 318(6042):178-180.

Rössler W., Jatho M. in Kalmring K. 2006. The auditory-vibratory sensory system in bushcrickets. V: Insect sounds and communication. Physiology, behaviour, ecology, evolution. Drosopoulos S., Claridge M.F. (ur.). Boca Raton, CRC Press: 35-70.

Rovner J.S., Barth F.G. 1981. Vibratory Communication Through Living Plant by a Tropical Wandering Spider. Science, 214:464-465.

Rupprecht R. 1974. Vibration signals during copulation of *Panorpa* (Mecoptera Insecta). Experientia, 30(4):340-341.

Rutschky C.W., Stryjak E.R. 1955. A gross study of the nervous system of the large milkweed bug, *Oncopeltus facsiatus* (Dallas). Annual Revue of Entomological Society of America, 48:219-221.

Savoyard J.L., Gamboa G.J., Cummings D.L.D., Foster R.L. 1998. The communicative meaning of body oscillations in the social wasp, *Polistes fuscatus* (Hymenoptera, Vespidae). Insectes Sociaux, 45(2):215-230.

Schnorbus H. 1971. Die subgenualen Sinnesorgane von *Periplaneta americana*: Histologie und Vibrationsschwellen. Z Vergl Physiol, 71:14-48.

Schreiber S., Fellous J.M., Whitmer D., Tiesinga P., Sejnowksi T.J. 2003. A new correlationbased measure of spike timing reliability. Neurocomputing, 52-54:925-931.

Schuch W., Barth F.G. 1985. Temporal patterns in the vibratory courtship signals of the wandering spider *Cupiennius salei* Keys. Behavioral Ecology and Sociobiology, 16(3):263-271.

Schuch W., Barth F.G. 1990. Vibratory communication in a spider - Female responses to synthetic male vibrations. Journal of Comparative Physiology A-Sensory Neural and Behavioral Physiology, 166(6):817-826.

Schul J. 1997. Neuronal basis of phonotactic behaviour in *Tettigonia viridissima*: processing of behaviourally relevant signals by auditory afferents and thoracic interneurons. J Comp Physiol A, 180:573-583.

Shaw S. 1994. Detection of airborne sound by a cockroach "vibration detector": a possible missing link in insect auditory evolution. Journal of Experimental Biology, 193(1):13-47.

Silver S., Kalmring K., Kuhne R. 1980. The responses of central acoustic and vibratory interneurones in bushcrickets and locusts to ultrasonic stimulation. Physiological Entomology, 5(4):427-435.

Smith P.H., Joris P.X., Yin T.C.T. 2004. Projections of physiologically characterized spherical bushy cell axons from the cochlear nucleus of the cat: Evidence for delay lines to the medial superior olive. Current Opinion in Neurobiology, 14:457-460.

Staudacher E.M. 2001. Sensory responses of descending brain neurons in the walking cricket, *Gryllus bimaculatus*. Journal of Comparative Physiology A, 187:1-17.

Staudacher E.M., Schildberger K. 1998. Gating of sensory responses of descending brain neurones during walking in crickets. The Journal of Experimental Biology, 201:559-572.

Stewart K.W. Vibrational communication in insects. American Entomologist Summer, 81-91. 1997.

Stiedl O., Stumpner A., Mbongu D.N., Atkins G., Stout J.F. 1997. Morphology and physiology of the local auditory interneurones in the prothoracic ganglion of the cricket *Acheta domesticus*. Journal of Experimental Zoology, 279:43-53.

Stockinger P., Kvitsiani D., Rotkopf S., Tirian L., Dickson B.J. 2005. Neural Circuitry that Governs *Drosophila* Male Courtship Behavior. Cell, 121(5):795-807.

Stölting H., Stumpner A. 1998. Tonotopic organisation of auditory receptors of the bushcricket *Pholidoptera griseoaptera* (Tettigoniidae, Decticinae). Cell Tissue Res, 294:377-386.

Stölting H., Moore T.E., Lakes-Harlan R. 2002. Substrate vibrations during acoustic signalling in the cicada *Okanaga rimosa*. Journal of Insect Science, 2(2)

Stritih, N. 2006. Response properties, morphology and topographical organisation of the vibratory neurones in the prothoracic ganglion of the cave cricket *Troglophilus neglectus* (Orthoptera, Rhaphidophoridae). Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.

Stritih N., Virant-Doberlet M., Čokl A. 2000. Green stink bug *Nezara viridula* detects differences in amplitude between courtship song vibrations at stem and petiolus. European Journal of Physiology, 439:190-192.

Stumpner A. 1997. An auditory interneurone tuned to the male song frequency in the duetting bushcricket *Ancistrura nigrovittata* (Orthoptera, Phaneropteridae). The Journal of Experimental Biology, 200:1089-1101.

Stumpner A. 2002. A species-specific frequency filter through specific inhibition, not specific excitation. Journal of Comparative Physiology A, 188:239-248.

Stumpner A., Molina J. 2006. Diversity of intersegmental auditory neurons in a bush cricket. Journal of Comparative Physiology A, 192:1359-1376.

Stumpner A., Ronacher B. 1991. Auditory interneurones in the metathoracic ganglion of the grasshopper *Chorthippus biguttulus* I. Morphological and physiological characterisation. Journal of Experimental Biology, 158:391-410.

Stumpner A., von Helversen D. 2001. Evolution and function of auditory system in insects. Naturwissenschaften, 88:159-170.

Stürzl W., Kempter R., Hemmen J.L.v. 2000. Theory of Arachnid Prey Localization. Physical Review Letters, 84(24):5668-5671.

Todd J.W. 1989. Ecology and behavior of Nezara viridula. Ann Rev Entomol, 34:273-292.

van Rossum M.C.W. 2001a. A novel spike distance. Neural Computation, 13:751-763.

van Rossum M.C.W. 2001b. The transient precision of integrate and fire neurons: effect of

background activity and noise. Journal of Computational Neuroscience, 10:303-311.

van Rossum M.C.W., O'Brien B.J., Smith R.G. 2003. Effects of noise on the spike timing precision of retinal ganglion cells. Journal of Neurophysiology, 89:2406-2419.

van Rossum M.C.W., Turrigiano G.G., Nelson S.B. 2002. Fast propagation of firing rates through layered networks of noisy neurons. The Journal of Neuroscience, 22(5):1956-1966.

Victor J.D. 2005. Spike train metrics. Current Opinion in Neurobiology, 15:585-592.

Victor J.D., Purpura K.P. 1997. Metric-space analysis of spike trains: theory, algorithms, and application. Networks: Computations in Neural Systems, 8:127-164.

Vilhelmsen L., Isidoro N., Romani R., Basibuyuk H.H., Quicke D.L.J. 2001. Host location and oviposition in a basal group of parasitic wasps: the subgenual organ, ovipositor apparatus and associated structures in the Orussidae (Hymenoptera, Insecta). Zoomorphology, 121(2):63-84.

Virant-Doberlet, M. 1989. Analiza vibracijskih dražljajev v centralnem živčevju murna (*Gryllus campestris*). Magistrska naloga. Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, VTOZD za biologijo.

Virant-Doberlet M., Čokl A. 2004. Vibrational communication in insects. Neotropical Entomology, 33(2):121-134.

Virant-Doberlet M., Čokl A. in Zorović M. 2006. Use of substrate vibrations for orientation: from behaviour to physiology. V: Insect sounds and communication. Drosopoulos S., Claridge M.F. (ur.). Boca Raton USA, CRC Press: 81-97.

Vogel A., Hennig R.M., Ronacher B. 2005. Increase of neuronal response variability at higher processing levels as revealed by simultaneous recordings. Journal of Neurophysiology, 93:3548-3559.

Vogel A., Ronacher B. 2007. Neural correlations increase between consecutive processing levels in the auditory system of locusts. Journal of Neurophysiology, 97:3376-3385.

von Helversen D., Rheinlaender J. 1988. Interaural intensity and time discrimination in an unrestraint grasshopper: a tentative behavioural approach. Journal of Comparative Physiology A, 162:333-340.

Walker A. in Jones JR. 1985. *Nezara viridula*. V: Handbook of Insect Rearing. Singh P., Moore R.F. (ur.). Amsterdam, Elsevier Science Publishers B. V.: 339-343.

Watson A.H.D., Burrows M. 1982. The ultrastructure of identified locust motor neurones and their synaptic relationships. The Journal of Comparative Neurology, 205:383-397.

Watson A.H.D., Burrows M. 1983. The morphology, ultrastructure and distribution of synapses on an intersegmental interneurone of the locust. The Journal of Comparative Neurology, 214:154-169.

Wiersma C.A.G., Ikeda K. 1964. Interneurons commanding swimmeret movements in the crayfish, *Procambarus clarki* (Girard). Comparative Biochemistry and Physiology, 2:509-525.

Wiese K. 1972. Mechanoreceptive system of prey localization in *Notonecta*. 1. Function of tarsal scolopidial organ. Journal of Comparative Physiology, 78(1):83-102.

Wiese K. 1974. Mechanoreceptive system of prey localization in *Notonecta*. 2. Principle of prey localization. Journal of Comparative Physiology, 92(3):317-325.

Wilcox R.S. 1995. Ripple communication in aquatic and semiaquatic insects. Ecoscience, 2(2):109-115.

Wilson J.A., Phillips C.E. 1982. Locust local nonspiking interneurons which tonically drive antagonistic motor neurons: physiology, morphology and ultrastructure. The Journal of Comparative Neurology, 204:21-31.

Wohlers D.W., Huber F. 1978. Intracellular recording and staining of cricket auditory interneurons (*Gryllus campestris* L., *Gryllus bimaculatus* DeGeer). Journal of Comparative Physiology A, 127:11-28.

Wohlers D.W., Huber F. 1982. Processing of sound signals by six types of neurons in the prothoracic ganglion of the cricket, *Gryllus campestris*. Journal of Comparative Physiology

## 7 ZAHVALE

Tu je mesto zahvalam.

Prva gre seveda mentorici dr. Meti Virant-Doberlet in mentorju prof. dr. Andreju Čoklu za akademsko svobodo, pomoč in optimizem. Pa seveda za njuno toleranco, ko sem se sredi lèta odločil prestopiti na nevrofiziološki avion.

Doc. dr. Kazimirju Drašlarju bi izrazil hvaležnost za kritiko, drobne tehnične nasvete, navodila za rokovanje z mikromanipulatorji in srebrno žičko. Recenzentu profesorju dr. Dušanu Devetaku se moram zahvaliti za ekspresno obdelavo moje naloge.

Doc. dr. Andrej Blejec si na tej strani zasluži posebno mesto. Brez njegovega znanja in časa, ki si ga je vzel zame, tega dela ne bi bilo.

Dr. Maji Zorović gre zahvala za uvod v elektrofiziologijo. Nadaljnja hvala ji gre še za premlevanje mojih mojih rezultatov, branje osnutkov in za brezštevilne članke, ki mi jih je prijazno posredovala. Doc. dr. Gregor Zupančič je v poučevanju elektrofizologije nadaljeval tam, kjer je Maja končala. Dr. Nataša Stritih je bila v teh letih neusahljiv vir informacij o takih in drugačnih internevronih, hkrati pa si je vzela čas, da je vrgla "en kritičen uč" na moje delo. Dr. Špeli Schrader se moram zahvaliti za vse priložnosti, v katerih mi je s svojim kritičnim razmišljanjem pokazala tisto, z moje Zemlje nevidno stran Meseca. Potem gre hvala še Alenki Žunič za vzdrževanje steničje populacije, vedrost in prevoze. Dr. Petra Pavlovčič mi nikoli ni pokazala vrat, ko sem se zadnji trenutek prikazal s kakšnim angleškim prevodom. Tudi njej čast in slava. Ne smem pozabiti na en "hvala lepa" Viktorju Trilerju za telefonski klic in (zopet) Nataši, ki je prišepetovala.

Dr. Alešu Kladniku se moram zahvaliti za dostop do in lekcije o Apotomu. Ko sem v preveliki vnemi povozil lasten disk, je na pomoč priskočil Luka Malenšek in mi rešil živce. Naj mu gredo maratoni še bolje iz pod nog. Doc. dr. Petru Stušku gre hvala za jutranji, opoldanski, popoldanski in razvedrilni program, Primzu pa za suši.

Nenazadnje (pozna kdo ustreznico angleškemu "last but not least"?) se moram zahvaliti še staršema. Uprl sem se skušnjavi, da bi našteval, saj bi bil spisek predolg....

## PRILOGA 1.

1. Fiziološka raztopina po Dawenport-u (pH=7.2), 1000 ml

NaCl	6,7 g
KCl	0,15 g
$CaCl_2 \times H_2O$	0,12 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,15 g
$H_2O$ (destilirana)	dopolnimo do 1000 ml

2. Fosfatni pufer (PBS, pH=7,2), 1000 ml

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
H <sub>2</sub> O (destilirana)	dopolnemo do 1000 ml