UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Maja ZOROVIĆ

STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE ZNAČILNOSTI VIBRACIJSKIH NEVRONOV V TORAKALNIH GANGLIJIH STENICE *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae)

DOKTORSKA DISERTACIJA

MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF VIBRATIONAL NEURONES IN THORACIC GANGLIA OF THE STINKBUG *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae)

DISSERTATION THESIS

Ljubljana, 2005

'Protect me from knowing what I don't need to know.

Protect me from even knowing that there are things to know that I don't know.

Protect me from knowing that I decided not to know about the things that I decided not to know about.'

Douglas Adams

'We don't know a millionth of one percent about anything.'

Thomas A. Edison

Praktični del doktorske disertacije je bil v celoti opravljen v laboratorijih Oddelka za entomologijo Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani. Senat Biotehniške fakultete je za mentorja doktorskega dela imenoval prof. dr. Andreja Čokla.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	doc. dr. Kazimir Drašlar Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Mentor in član:	prof. dr. Andrej Čokl Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za entomologijo
Mentor:	prof. dr. Dušan Devetak Univerza v Mariboru, Pedagoška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 2. november 2005

Disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maja Zorović

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

- DK 591.18:595.75(043.3)=863
- KG Nezara viridula/žuželke/vibracijska komunikacija/internevroni/receptorske celice
- AV ZOROVIĆ, Maja, univ. dipl. biol., mag. znanosti
- SA ČOKL, Andrej (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2005
- IN STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE ZNAČILNOSTI VIBRACIJSKIH NEVRONOV V TORAKALNIH GANGLIJIH STENICE *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae)
- TD Doktorska disertacija
- OP X, 133 str., 1 tab., 71 sl., 1 pril., 187 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Nevrobiološki nivo vibracijske komunikacije je pri žuželkah, pri katerih komunikacija s signali preko podlage predstavlja primarni komunikacijski kanal, v veliki meri neraziskan. Za osvetlitev mehanizmov centralnega procesiranja vibracijskih signalov in orientacije žuželk na podlagi vibracij smo kot poskusno žival izbrali stenico vrste Nezara viridula (L.), zeleno smrdljivko, pri kateri je vibracijska komunikacija, kot pomemben del paritvenega vedenja, na vedenjskem nivoju že zelo dobro obdelana. Samica in samec producirata vibracijske signale s tresenjem zadka, vibracije pa se nato preko nog prenesejo na rastlino. Tako pri samcih kot pri samicah poznamo več napevov, ki so vezani na specifične vedenjske situacije. Med tem ko mirujoča samica oddaja t.i. samičin pozivni napev (FCS), ji samec odgovarja in se premika proti njej. Komunikacija med njima zahteva razpoznavanje lastne vrste in orientacijo v smeri vira vibracij. V pričujočem delu smo opisali centralno procesiranje vibracijskih signalov ter kodiranje sprememb v časovno-frekvenčni strukturi vibracijskih signalov, do katerih pride med prenosom signalov po rastlinah. Z laserskim vibrometrom smo snemali vibracijske signale FCS na različnih delih rastlin in ti posnetki so sestavljali del stimulacijskega programa, s katerim smo preko računalnika in tresalnika dražili poskusno žival. S tehniko znotrajceličnega odvajanja električne aktivnosti nevronov v centralnih ganglijih in sočasnim ionoforetičnim vnašanjem barvila Lucifer yellow smo identificirali dva morfološka tipa receptorskih nevronov ter devet morfoloških tipov vibracijskih internevronov, med njimi lokalne internevrone, omejene na centralni ganglij, internevrone, podobne DUM celicam ravnokrilcev in vzpenjajoče nevrone, ki nosijo informacijo v možgane. Opisani tipi celic tvorijo dve skupini: nizkofrekvenčne, uglašene na 50 Hz in srednjefrekvenčne, uglašene na 100-300 Hz. Vzdražni prag nizkofrekvenčnih internevronov je višji (10-20 cm/ s^2) od srednjefrekvenčnih (0,5 cm/ s^2). Na podlagi lege vhodnih in izhodnih regij ter latenc odgovorov smo opisali povezljivost identificiranih nevronov in hipotetično živčno mrežo za procesiranje vibracijskih signalov. Z analizo odzivov nevronov na signale FCS smo ugotovili, da so spremembe v amplitudnih razmerjih posameznih frekvenčnih vrhov, do katerih pride med prenosom vibracijskih signalov po rastlini, dovolj velike, da jih živčni sistem zazna. Na osnovi analize prenosa vibracijskih signalov preko križišča in fizioloških lastnosti vibracijskih nevronov sklepamo, da se živali na križišču orientirajo na podlagi časovnih zamikov med receptorji posameznih nog.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd

- DC 591.18:595.75(043.3)=863
- CX Nezara viridula/insects/vibrational communication/interneurones/receptor cells
- AU ZOROVIĆ, Maja
- AA ČOKL, Andrej (supervisor)
- PP SI-1000, Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotehnical faculty, Department of biology
- PY 2005
- TI MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF VIBRATIONAL NEURONES IN THORACIC GANGLIA OF THE STINKBUG

Nezara viridula (Heteroptera: Pentatomidae)

- DT Doctoral Dissertation
- NO X, 133 p., 1 tab., 71 fig., 1 ann., 187 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Although communication using vibration signals propagating through the substrate is more widespread among insects than any other form of mechanical signalling, the data on neural processing of these signals is still lacking. Because the behavioural level of vibrational communication for this species has been studied in great detail, the southern green stinkbug, Nezara viridula (L.), was an ideal experimental animal for studying central processing of vibration signals and orientation towards the vibration source. Both the males and females produce vibration signals by vibrating the abdomen and the vibrations are transmitted through their legs to the underlying plant tissue. They produce several songs, differing in temporal parameters, that are related to specific behavioural contexts. While the stationary female is emitting the female calling song (FCS), the male moves towards her, pausing occasionally and emitting the signals of the male calling song. For their communication to be effective, species recognition and orientation of the male towards the vibration source is necessary. In the present thesis we describe central processing of vibration signals and coding of changes in the temporal and spectral structure of the vibration signals that occur with propagation of the signals through plants. Laser vibrometer was used to record signals of the FCS on different parts of the plant and these recordings were a part of stimulation programme designed to vibrate the legs of the experimental animal with a minishaker. Using intracellular recording combined with electrophoretic staining techniques we identified two morphological types of receptor cells and nine types of vibrational interneurones, of which some are local neurones, limited to the central ganglion, some resemble DUM cells of Orthoptera and the rest are mainly ascending interneurones, carrying information to the brain. All identified neurones fall into two distinct groups: the low frequency neurones are tuned to 50 Hz and middle frequency neurons are tuned to 100-300 Hz. The middle frequency interneurones have lower thresholds (0.5 cm/s^2) than those tuned to lower frequencies ($10-20 \text{ cm/s}^2$). The connectivity of the neurones was described through their response latencies and input/output regions and the model neural network for processing vibration signals was proposed. Analysis of the neurones' responses to the signals of FCS showed that the changes in relative amplitudes of different frequency peaks resulting from propagation of signals through plants are large enough to be detected by the nervous system. Based on analysis of transmission of vibration signals through the crossing point we concluded that the animals orientate using time-ofarrival differences between different receptors rather than intensity differences.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO TABEL	X

1 UVOD1
1.1 KOMUNIKACIJA ŽUŽELK1
1.1.1 Vibracijska komunikacija
1.2 NEZARA VIRIDULA – ZELENA SMRDLJIVKA
1.2.1 Vloga vibracijske komunikacije v paritvenem vedenju stenice <i>N. viridula</i>
1.3 RASTLINE KOT MEDIJ ZA PRENOS VIBRACIJSKIH SIGNALOV 4
1.4 ZGRADBA CENTRALNEGA ŽIVČNEGA SISTEMA
1.5 VIBRACIJSKI RECEPTORJI
1.5.1 Zgradba organov
1.5.2 Receptorske živčne celice
1.5.2.1 Delovanje
1.5.2.2 Centralne projekcije
1.6 VIBRACIJSKI INTERNEVRONI
1.6.1 Delovanje
1.6.2 Morfologija
1.7 ORIENTACIJA
1.8 KODIRANJE SPEKTRALNIH IN ČASOVNIH PARAMETROV NARAVNIH NAPEVOV
1.9 NAMEN NALOGE
2 MATERIAL IN METODE
2.1 ŽIVALI
2.1.1 Gojenje
2.1.2 Preparacija za nevrofiziološke poskuse
2.2 SNEMANJE VIBRACIJSKIH SIGNALOV NA RASTLINI
2.3 IZVEDBA FIZIOLOŠKEGA POSKUSA
2.3.1 Postavitev poskusa in beleženje aktivnosti celic

2.3.2 Draženje	21
2.3.2.1 Naravni vibracijski signali	21
2.3.2.2 Umetno sintetizirani vibracijski signali	
2.3.3 Označevanje celic	23
2.3.4 Obdelava tkiva in mikroskopiranje	23
2.4 ANALIZA REZULTATOV	24
2.4.1 Analiza elektrofizioloških podatkov	24
2.4.1.1 Odzivi na signale samičinega pozivnega napeva	24
2.4.1.2 Odzivi na umetno sintetizirane vibracijske signale	24
2.4.2 Analiza oblike živčnih celic	
2.5 POIMENOVANJE ŽIVČNIH CELIC	27
3 REZULTATI	28
3.1 RECEPTORSKE CELICE	
3.1.1 LFR – oblika in delovanje	
3.1.2 MFR – oblika in delovanje	32
3. 2 INTERNEVRONI	
3.2.1 Internevroni CG-AC	37
3.2.1.1 CG-AC-1	37
3.2.1.2 CG-AC-2	45
3.2.1.3 CG-AC-3 in CG-AC-4	50
3.2.1.4 CG-AC-5	54
3.2.2 CG-AB	57
3.2.3 Lokalni internevroni CG-L	62
3.2.4 PTG-DC	67
3.2.5 Neidentificirani internevroni	70
3.2.5.1 V-1	70
3.2.5.2 V-2	72
3.2.5.3 V-3	74
3.3 ČASOVNI ZAMIK IN AMPLITUDNA RAZLIKA	77
3.3.1 Časovni zamik	77
3.3.1 Amplitudna razlika	
3.4 KODIRANJE PARAMETROV NARAVNIH NAPEVOV	79
3.4.1 Fižol	79
3.4.2 Ciperus	85

4 RAZPRAVA IN SKLEPI	91
4.1 RECEPTORSKE CELICE	91
4.1.1 Oblika	91
4.1.2 Delovanje	94
4.1.3 Spontana aktivnost in izvor inhibicije v receptorskih celicah	96
4.2 OBLIKA, DELOVANJE IN POVEZLJIVOST INTERNEVRONOV	98
4.2.1 Interindividualna variabilnost ali različni nevroni?	98
4.2.2 Povezava med obliko in delovanjem internevronov	99
4.2.2.1 Internevroni CG-AC-1	
4.2.2.2 Internevroni CG-AC-2	
4.2.2.3 Internevroni CG-AC-3 in CG-AC-4	
4.2.2.4 Internevroni CG-AC-5	
4.2.2.5 Internevroni CG-AB	103
4.2.2.6 Internevroni CG-L	103
4.2.2.7 Internevron PTG-DC	104
4.2.2.8 Neidentificirani internevroni V-1, V-2 in V-3	104
4.2.3 Uglašenost in občutljivost internevronov	105
4.2.4 Fazično-tonični odziv ali adaptacija celic?	107
4.3 KODIRANJE PARAMETROV NARAVNIH NAPEVOV	107
4.4 ORIENTACIJA V SMERI VIRA VIBRACIJSKIH SIGNALOV	109
4.4.1 Amplitudne razlike	109
4.4.2 Časovni zamik	110
4.5 MODEL ŽIVČNE MREŽE ZA PROCESIRANJE VIBRACIJSKIH SIGN	ALOV111
4.6 SKLEPI	114
5 POVZETEK	115
6 SUMMARY	117
7 VIRI	119
ZAHVALA	
PRILOGA	

KAZALO SLIK

Slika	1: Zelena smrdljivka Nezara viridula (L.)	. 2
Slika	2: Fotografija centralnega živčnega sistema stenice <i>N. viridula</i>	5
Slika	3: Morfologija hordotonalnih organov v nogah stenice <i>N. viridula</i>	7
Slika	4: Točke na fižolu in ciperusu	19
Slika	5: Shema postavitve poskusa (<i>set-up</i>)	20
Slika	6: Zaporedji vibracijskih signalov samičinega pozivnega napeva	21
Slika	7: Umetno sintetiziran vibracijski signal	22
Slika	8: Prikaz poimenovanja smeri pri opisu lege živčnih celic v gangliju	26
Slika	9: Primer poimenovanja internevrona	27
Slika	10: Morfologija nizkofrekvenčnih receptorskih celic LFR	29
Slika	11: Krivulje vzdražnega praga in zapisi odgovorov LFR	30
Slika	12: Izointenzitetne, intenzitetne in latenčne krivulje LFR	31
Slika	13: Morfologija srednjefrekvenčnih receptorskih celic MFR	32
Slika	14: Krivulje vzdražnega praga in zapisi odgovorov MFR	34
Slika	15: Izointenzitetne, intenzitetne in latenčne krivulje MFR	35
Slika	16: Morfologija CG-AC-1	37
Slika	17: Morfologija CG-AC-1	38
Slika	18: Morfologija CG-AC-1	39
Slika	19: Morfologija CG-AC-1	40
Slika	20: Zapisi odgovorov CG-AC-1	40
Slika	21: Zapisi odgovorov CG-AC-1	41
Slika	22: Zapisi odgovorov CG-AC-1	42
Slika	23: Krivulje vzdražnega praga CG-AC-1	42
Slika	24: Izointenzitetne krivulje CG-AC-1	43
Slika	25: Intenzitetne krivulje CG-AC-1	43
Slika	26: Latenčne krivulje CG-AC-1	44
Slika	27: Morfologija CG-AC-2	45
Slika	28: Morfologija CG-AC-2	46
Slika	29: Zapisi odgovorov CG-AC-2	46
Slika	30: Zapisi odgovorov CG-AC-2	47
Slika	31: Krivulje vzdražnega praga CG-AC-2	48

Slika	32:	Intenzitetne in latenčne krivulje CG-AC-2	.49
Slika	33:	Morfologija CG-AC-3 in CG-AC-4	50
Slika	34:	Zapisi odgovorov in krivulji vzdražnega praga CG-AC-3 in CG-AC-4	52
Slika	35:	Izointenzitetne, intenzitetne in latenčne krivulje CG-AC-3 in CG-AC-4	53
Slika	36:	Morfologija CG-AC-5	54
Slika	37:	Krivulja vzdražnega praga in zapisi odgovorov CG-AC-5	55
Slika	38:	Izointenzitetne, intenzitetne in latenčne krivulje CG-AC-5	56
Slika	39:	Morfologija CG-AB	58
Slika	40:	Zapisi odgovorov in krivulje vzdražnih pragov CG-AB	60
Slika	41:	Izointenzitetne, intenzitetne in latenčne krivulje CG-AB	61
Slika	42:	Morfologija lokalnih internevronov CG-L	.64
Slika	43:	Zapisi odgovorov in krivulje vzdražnih pragov CG-L-1, 2, 3	.65
Slika	44:	Izointenzitetne, intenzitetne in latenčne krivulje CG-L-1.	.66
Slika	45:	Morfologija PTG-DC	.67
Slika	46:	Zapisi odgovorov in krivulja vzdražnega praga PTG-DC	.68
Slika	47:	Izointenzitetne, intenzitetne in latenčne krivulje PTG-DC	.69
Slika	48:	Morfologija V-1	70
Slika	49:	Zapisi odgovorov in krivulja vzdražnega praga V-1	71
Slika	50:	Izointenzitetne, intenzitetne in latenčne krivulje V-1	71
Slika	51:	Morfologija V-2	.72
Slika	52:	Zapisi odgovorov ter intenzitetna in latenčna krivulja V-2	73
Slika	53:	Morfologija V-3	.74
Slika	54:	Zapisi odgovorov in krivulja vzdražnega praga V-3	75
Slika	55:	Hitrost širjenja vibracijskih signalov po rastlini	.77
Slika	56:	Intenziteta vibracijskih signalov na listnih pecljih	.78
Slika	57:	Zapisi odgovorov na vibracijski signal samičinega pozivnega napeva; fižol	.79
Slika	58:	Oscilogram in sonogram signala FCS ter rasterski diagram odzivov; fižol	.81
Slika	59:	Krivulje vzdražnih pragov celic skupine A, B in C	.82
Slika	60:	Graf kumulativih frekvenc proženja akcijskih potencialov; fižol	.83
Slika	61:	Dendrogram podobnosti 51 internevronov v odzivu na signal FCS; fižol	84
Slika	62:	Relativna intenziteta frekvenčnih vrhov v signalu FCS	86
Slika	63:	Oscilograma in sonograma signalov FCS ter rasterska diagrama; ciperus	87
Slika	64:	Grafa kumulativnih frekvenc proženja akcijskih potencialov; ciperus	.88

Slike 65: Dendrograma podobnosti 30 internevronov v odzivu na signala FCS; c	iperus89
Slika 66: Korelacijski diagram odzivov internevronov na signala FCS	90
Slika 67: Ostanki členjenosti v centralnem gangliju	92
Slika 68: Območja senzoričnih nevropil v centralnem gangliju	
Slika 69: Osnovni morfološki tipi vibracijskih internevronov pri stenici N. viridu	<i>la</i> 101
Slika 70: Krivulje vzdražnega praga identificiranih vibracijskih internevronov	
Slika 71: Modela živčnih mrež	

KAZALO TABEL

1 UVOD

1.1 KOMUNIKACIJA ŽUŽELK

Čeprav za pojem *komunikacija* obstaja verjetno prav toliko definicij, kolikor je bilo na to temo napisanih knjig, so si vsi avtorji edini v tem, da gre pri komunikaciji za izmenjavo informacije med oddajnikom in sprejemnikom, pri čemer lahko oba pričakujeta od izmenjave takšno ali drugačno korist (Bradbury in Veherencamp, 1998; Greenfield, 2002). Pri komunikaciji žuželk pa ne gre zgolj za miniatuarizacijo istih in bolje poznanih procesov pri vretenčarjih, saj majhna telesna velikost omejuje naravo signalov, ki jih te živali lahko producirajo in zaznavajo, natančnost, s katero jih lahko lokalizirajo ter vrsto informacije, ki jo sprejemnik lahko povzame iz signala. Zato pri raziskavah na področju komunikacije žuželk nenehno srečujemo ilustrativne primere vpliva velikosti v biologiji ter prilagoditve živali na strukturnem, živčnem in vedenjskem nivoju na omejitve, ki jih predstavljajo fizikalni zakoni (Bennet-Clark, 1999; Greenfield, 2002).

Pri nekaterih skupinah žuželk (murni, črički, kobilice, škržati) je zelo dobro razvita zvočna komunikacija, ki je tudi eno najbolje raziskanih področij nevrobiologije žuželk. Neko telo pa lahko učinkovito oddaja zvočno valovanje le, če je veliko v primerjavi z valovno dolžino oddanega zvoka. Mejno velikost telesa določa pogoj $2r > \lambda/\pi$, kjer r predstavlja polmer krogle s površino ekvivalentno površini telesa žuželke, λ pa valovno dolžino. Za učinkovito zvočno komunikacijo mora biti tako premer telesa živali večji od 1/3 valovne dolžine zvoka (Markl, 1983; Bennet-Clark, 1998). To pomeni, da je za žuželke, velike ok. 1 cm, akustična komunikacija učinkovita v le frekvenčnem območju nad 10 kHz. Komunikacijska razdalja takih signalov pa je omejena, saj se visokofrekvenčni signali (nad 10 kHz) v gosti vegetaciji hitro dušijo (Michelsen in Larsen, 1983). Zato je za manjše žuželke primernejša komunikacija z vibracijskimi signali, ki se prenašajo po podlagi, to pa lahko dopolnjuje komunikacija s feromoni na večje razdalje ter z vidom in dotikom na krajše (Borges in sod., 1987; Kon in sod., 1988).

1.1.1 Vibracijska komunikacija

Vibracijska komunikacija je pri žuželkah splošno razširjena in prevladujoča, ne glede na to, ali štejemo po vrstah, družinah ali filogenetski razširjenosti (Cocroft in Rodríguez, 2005). Pri murnih, čričkih, kobilicah in škržatih zaznavanje vibracij podlage dopolnjuje zvočno komunikacijo (Čokl in sod., 1977; Kalmring in sod., 1996, 1997a in b; Stölting in sod., 2002). Pri zeleni smrdljivki, ki je predmet naše raziskave (glej 1.2), je vibracijska komunikacija

pomemben del paritvenega vedenja. Vedenjske študije opisujejo vibracijsko komunikacijo kot del paritvenega vedenja tudi pri ravnokrilcih (Loher in Dambach, 1989; Field in Bailey 1997), vrbnicah (Stewart, 1997), škržatih (Claridge, 1985), raznokrilcih (Wilcox, 1995; Čokl in Virant-Doberlet, 2003), mrežekrilcih (Henry, 1994; Devetak, 1998), hroščih (Birch in Keenlyside, 1991; Hirschberger, 2001), škorpijonskih muhah (Rupprecht, 1974), dvokrilcih (Hoy in sod., 1988) in mladoletnicah (Ivanov, 1993) (pregled v: Virant-Doberlet in Čokl, 2004). Nekatere žuželke na podlagi vibracij zgolj locirajo plen, kot na primer larva volkca *Myrmeleonformicarius* (Devetak, 1985) ali gostitelja, kot na primer parazitske ose (Meyhöfer in Casas, 1999). Med členonožci je vibracijska komunikacija oz. zaznavanje vibracij opisana tudi pri pajkih (Barth, 1998), škorpijonih (Brownell, 1977; Brownell in Farley, 1979) in rakih (Aicher in Tautz, 1990). Za produkcijo vibracijskih signalov uporabljajo členonožci različne mehanizme – iztiskanje zraka, timbal, stridulacija, vibracije različnih delov telesa, trkanje z zadkom ali drugimi deli telesa po podlagi ipd. (Ewing, 1989).

1.2 NEZARA VIRIDULA – ZELENA SMRDLJIVKA

V želji čim bolje razumeti vibracijsko komunikacijo majhnih žuželk smo sledili principu Augusta Krogh-a, ki pravi: 'Za veliko različnih problemov obstaja žival, na kateri lahko ta problem (mehanizem ipd.) najbolj enostavno preučujemo' (*For many problems there is an animal on which it can be most conveniently studied*) (Sanford et al., 2002). Kot najprimernejšo eksperimentalno žival smo izbrali stenico vrste *Nezara viridula* L., ki jo lahko gojimo v laboratoriju in pri kateri je že zelo dobro obdelan vedenjski nivo vibracijske komunikacije (Čokl in sod., 1999, 2000a, 2000b, 2001, 2005; Stritih in sod., 2000; Miklas in sod., 2001, 2003a, 2003b; Čokl in Virant-Doberlet, 2003; Virant-Doberlet in Čokl, 2004), znana pa je tudi struktura vibracijskih receptorjev (Michel in sod., 1983).



Slika 1: Zelena smrdljivka Nezara viridula (L.) na listu fižola.

Zelena smrdljivka (*Nezara viridula* L.) (sl. 1) je žuželka iz družine Pentatomidae, red Heteroptera (stenice). Sklepajo, da vrsta izvira iz Etiopske biogeografske regije, od koder se je v zadnjih 250 letih razširila po vsem svetu (Hokkanen, 1986; Jones, 1988); tako jo danes najdemo na vseh kontinentih med 45° severne in južne zemljepisne širine (Todd, 1989). Zelena smrdljivka je polifagna vrsta, ekonomsko pomembna kot škodljivec na bombažu, fižolu, soji, paradižniku in drugih kulturnih rastlinah (Panizzi, 1997).

V Sloveniji je *Nezara viridula* edina predstavnica svojega rodu. Razširjena je v primorski regiji do kraškega roba (Gogala in Gogala, 1989). Zimo stenice preživijo v stanju diapavze; takrat so obarvane rjavo. Ko se zgodaj spomladi dvigne temperatura in podaljša dan, zimsko obarvane stenice pridejo iz prezimovališč, iščejo hrano, se obarvajo zeleno in poiščejo partnerja (Michieli in Žener, 1968). Po parjenju samice ležejo jajca rumenkaste barve v poligonalnih jajčnih masah. Inkubacija traja poleti v povprečju pet dni, zgodaj spomladi in pozno jeseni pa tudi do 45 dni. Razvoj do odraslega osebka poteka preko petih larvalnih stadijev. Življenjski cikel traja od 50 do 70 dni, na leto se zamenja štiri do pet generacij, odvisno od temperature na določenem območju. Optimalna temperatura za razvoj od jajčeca do odraslega osebka je 30°C (Walker in Jones, 1985; Todd, 1989).

1.2.1 Vloga vibracijske komunikacije v paritvenem vedenju stenice N. viridula

Komunikacija med osebki zelene smrdljivke v sklopu paritvenega vedenja poteka v dveh fazah: komunikaciji s feromoni na večje razdalje sledi vibracijska komunikacija, ki poteka na krajših razdaljah (Borges in sod., 1987) in v sklopu katere imajo fermoni modulacijsko vlogo (Miklas s sod., 2003b). Spolni feromoni, ki jih izločajo le samci, privabijo samice v njihovo bližino in prožijo oddajanje pozivnega napeva samic, kar lahko traja tudi več kot pol ure. Tako samci kot samice producirajo vibracijske signale s tresenjem zadka, ki se pri tem ne dotika podlage, vibracije pa se preko nog prenašajo na rastlino. Samica med petjem pozivnega napeva ostaja na istem mestu, samec pa se premika v smeri vira vibracij in odgovarja s svojim pozivnim napevom (Ota in Čokl, 1991; Čokl in sod., 1999). Pozivni napev samca in njegov napev dvorjenja vzdržujeta ter modulirata oddajanje samičinega pozivnega napeva (Čokl in Bogataj, 1982), medtem ko slednji povratno vpliva na izločanje samčevih feromonov (Miklas s sod., 2003b). Z orientacijo in premikanjem v smeri vira vibracij samec naposled pride do samice. Ko sta v neposredni bližini, imajo pomembno vlogo pri parjenju tudi signali drugih modalitet (vidni, taktilni in kemični dražljaji) (Borges in sod., 1987; Kon in sod., 1988).

Različni napevi zelene smrdljivke se razlikujejo predvsem po časovnih parametrih. Tako poznamo poleg samičinega in samčevega pozivnega napeva še napeva dvorjenja ter rivalni napev samca in zavrnitveni napev samic (Čokl in sod., 2000a). Dominantni frekvenčni vrh vseh napevov se giblje med 90 in 120 Hz, z višjefrekvenčnimi harmoničnimi vrhovi ter subdominantnimi vrhovi (Čokl in sod., 2000a, 2000b, 2005b). Pri nekaterih napevih je prisotna tudi frekvenčna modulacija. Samičin pozivni napev sestavljajo 1,5 do 2 s dolgi vibracijski signali, ki se ponavljajo enakomerno vsakih 4-6 s.

1.3 RASTLINE KOT MEDIJ ZA PRENOS VIBRACIJSKIH SIGNALOV

Uspešnost prenosa informacije je odvisna od učinkovitosti oddajnika, občutljivosti sprejemnika in od lastnosti medija za prenos signalov. Uglašenost vseh treh komponent zagotavlja optimalno učinkovitost komunikacije. Nedavne raziskave so pokazale, da učinkovit prenos vibracijskih signalov pri zeleni smrdljivki temelji na uglašenosti frekvenčnih parametrov vibracijskih napevov s frekvenčno občutljivostjo vibracijskih receptorjev in resonančnimi lastnostmi zelenih rastlin (Čokl in sod., 2005b).

Zelene rastline so zaradi majhnega dušenja dober medij za prenos vibracijskih signalov. (Michelsen in sod., 1982; Markl, 1983; Barth, 2002). Vedenjski poskusi so pokazali, da samci zelene smrdljivke alternirajo s samicami na razdalji dveh metrov skozi sosednji stebli ciperusa, ki sta mehansko povezani zgolj skozi koreninski sistem, izmerjena intenziteta vibracijskih signalov samičinega pozivnega napeva na razdalji 1 m od vira vibracij na steblu ciperusa pa je upadla za manj kot 5 dB (Čokl, osebna komunikacija). Vibracije vzbujajo v rastlinah različne tipe valov – longitudinalne, kvazi longitudinalne, transverzalne (torzijske), Rayleigheve in upogibne (bending waves) (Markl, 1983; Gogala, 1985; Barth, 1998, 2002). Žuželke za sporazumevanje z vibracijskimi signali preko rastlinskega tkiva uporabljajo upogibne valove, katerih glavna značilnost je relativno nizka hitrost prevajanja in frekvenčno odvisna hitrost širjenja (Michelsen in sod., 1982; Barth, 1998). Zaradi odbojev valovanja na vrhu rastline in pri koreninah pride v paličastih delih rastlin do pojava stoječega valovanja, kar dodatno doprinese k distorziji izhodiščnega vibracijskega signala. Razdalje med vozli (mesta minimalne intenzitete vibracijskega signala) padajo z naraščajočo frekvenco (Čokl, 1988). Domnevajo, da take spremembe časovnih in spektralnih karakteristik vibracijskega signala omogočajo samcu, da se orientira proti viru vibracij (Čokl, 1988). Hitrost prenosa vibracij je poleg frekvence v veliki meri odvisna tudi od mehanskih lastnosti rastlin. Tako so na bobu izmerili hitrosti od 36 m/s (200 Hz) do 120 m/s (2000 Hz) (Michelsen in sod., 1982), na agavi pa je hitrost signalov frekvence 30 Hz na apikalni tretjini lista znašala 4,4 m/s, na bazalnem delu pa kar 35,7 m/s (Barth, 1998).

1.4 ZGRADBA CENTRALNEGA ŽIVČNEGA SISTEMA

Centralni živčni sistem žuželk je sestavljen iz možganskega dela, ki leži nad anteriornim delom stomodeuma v glavini kapsuli in trebušnjače, ki se razteza v torakalnem in abdominalnem delu telesa (Chapman, 1998). Telesa živčnih celic so združena v ganglije. Trebušnjačo običajno sestavlja serija segmentalnih ganglijev tik nad ventralno steno telesa. Kot pri mnogih drugih redovih žuželk je tudi pri skupini Heteroptera prišlo do modifikacije tega splošnega modela. Pri stenici *Oncopeltus fasciatus* iz družine Lygeidae je prišlo do kondenzacije in centralizacije ganglijev, kar je imelo za posledico podaljšanje abdominalnih lateralnih živcev (Rutschky in Stryjak, 1955). Podobno je pri zeleni smrdljivki: subezofagealnemu gangliju sledita protorakalni ganglij in centralni ganglij; slednji je nastal kot posledica zlitja meso- in metatorakalnega ter abdominalnih ganglijev (sl. 2).



Slika 2: Fotografija centralnega živčnega sistema stenice *Nezara viridula*. OŽ - optični živec; OL - optični lobus; PCL - protocerebralni lobus; PTG - protorakalni ganglij; CG - centralni ganglij; NŽ1-3 - nožni živci prvega, drugega in tretjega para nog; ABŽ - abdominalni živci (živci abdominalnih segmentov); GŽ - genitalni živec.

1.5 VIBRACIJSKI RECEPTORJI

1.5.1 Zgradba organov

Čutilni organi žuželk, ki so najbolj občutljivi za zaznavanje vibracij podlage, se nahajajo v nogah; to so kampaniformne senzile in hordotonalni organi. Kampaniformne senzile so integumentni mehanoreceptorji, pri katerih je dendritski končič pritrjen na kutikulo, oblikovano v kupolo oz. kapo (Keil, 1998). Deformacija kutikule se prenese na septum med kupolo in kutikulo okoli nje ter deluje na dendrit. Pri mnogih žuželkah so kampaniformne senzile organizirane v receptivna polja ob sklepih (Grosch in sod., 1985; Keil, 1998; Devetak in sod., 2004), medtem ko so pri zeleni smrdljivki razporejene po vsej površini noge (Čokl in sod., 2005a), večinoma po femurju in tibiji (lastna opažanja). Hordotonalni organi ležijo znotraj nog ob sklepih in se distalno pritrjajo na različne strukture. Njihovi osnovni gradniki so skolopidiji. Skolopidij je sestavljen iz bipolarnega čutilnega nevrona, skolopalne, pritrjevalne (kapne) celice ter ovojne celice (Field in Matheson, 1998). Ugotovili so, da so na vibracije podlage pri zeleni smrdljivki občutljive tudi kampaniformne senzile ter Johnstonov organ na oz. v antenah. Njihova občutljivost je manjša od čutilnih organov nog (Jeram in Čokl, 1996; Jeram in Pabst, 1996).

N. viridula ima v vsaki nogi po štiri hordotonalne organe (sl. 3): femoralni hordotonalni organ (FCO), subgenualni organ (SO), tibialno-distalni hordotonalni organ (TDCO) ter tarzopretarzalni hordotonalni organ (TPCO) (Michel in sod., 1983). Najobčutljivejši čutilni organ za vibracije podlage je subgenualni organ, ki se nahaja v tibiji vseh šestih nog, distalno od sklepa med femurjem in tibijo (Debaisieux, 1938; Devetak, 1998; Vilhelmsen in sod., 2001). SO zaznava odmike podlage, manjše od 1 nm ter pospeške, manjše od 1 cm/s² (Kühne, 1982a; Shaw, 1994b; Devetak, 1998). Frekvenčno območje največje občutljivosti SO se pri različnih skupinah žuželk giblje od 200 pa tja do 2000 Hz (Čokl, 1983; Shaw, 1994a, b; Devetak in Amon, 1997). Tudi struktura SO se med različnimi skupinami žuželk precej razlikuje. Pri ravnokrilcih in ščurkih je sestavljen iz 20 do 40 skolopidijev, ki so v obliki zastave napeti prečno prek skoraj celotnega hemolimfnega kanala proksimalne tibije (Schnorbus, 1971; Lakes in Schikorski, 1990), pri osah iz družine Orussidae pa ga sestavlja tudi do 400 čutilnih celic (Vilhelmsen in sod., 2001). Pri stenici Pyrrhocoris apterus (Pyrrhocoridae) je v primerjavi z ravnokrilci opaziti redukcijo števila skolopidijev v vseh skolopidialnih organih (Debaisieux, 1938). SO tako sestavljata le dve receptorski celici. Enako je pri stenici N. viridula; subgenualni organ v proksimalnem delu tibije sestavljata dva skolopidija, vsak s po eno čutilno celico. Kapni celici tvorita ligament, ki je v začetnem delu okrogel, nato pa se splošči in razdeli v dve krpi, ki se pritrjata na steno tibije. Ligament je pritrjen ohlapno



Slika 3: Morfologija hordotonalnih organov v nogah stenice *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 μ m (a, b) in 100 μ m (c, d). Mod. po Michel in sod., 1983.

in lahko bolj ali manj prosto niha v kanalu hemolimfe (Michel in sod., 1983). Podobno je zgrajen SO tenčičarice *Chrysoperla carnea* (Neuroptera) – sestavljajo ga trije skolopidiji, ekvivalent ligamentu pa predstavlja velum lečaste oblike, ki leži prečno v hemolimfnem kanalu ter se ohlapno pritrja na trahejo in stene tibije (Devetak in Pabst, 1994). Do sedaj so subgenualni organ opisali že pri vseh krilatih žuželkah (Pterygota), razen pri hroščih (Coleoptera) in dvokrilcih (Diptera) (Virant-Doberlet in Čokl, 2004).

Michel in sod. (1983) so natančno opisali tudi ostale hordotonalne organe pri vrsti *N. viridula*. FCO leži v lateralni distalni tretjini femurja in je sestavljen iz dvanajstih skolopidijev, od katerih vsak vsebuje po dve čutilni celici. Prvih osem skolopidijev tvori t.i. kondenzirani skoloparij v proksimalnem delu FCO, medtem ko ostali skolopidiji tvorijo t.i. disperzni skoloparij. FCO se pritja na apodemo (kutikularni greben) in mišice na distalnem delu femurja, ob sklepu s tibijo. TDCO leži v distalnem delu tibije ob tibialno-tarzalnem sklepu. Sestavljen je iz dveh skolopidijev, od tega ima eden eno in drugi dve čutilni celici. Kapni celici tvorita okroglasto oblikovan ligament, ki se pritrja na membrano v sklepu med tibijo in prvim členom tarzusa. TPCO leži v zadnjem tarzalnem členu. Enako kot FCO je sestavljen iz dveh skoloparijev: proksimalnega tvorita dva skolopidija, distalnega pa trije. Kapne celice skolopidijev se pritrjajo na različne distalne strukture v stopalcu.

1.5.2 Receptorske živčne celice

1.5.2.1 Delovanje

Največ informacij o delovanju receptorskih celic, občutljivih na vibracije podlage, je rezultat raziskav slušne komunikacije ravnokrilcev (Orthoptera). Žuželke, ki se sporazumevajo z zvokom, zaznavajo namreč tudi vibracije podlage. Domnevajo, da sta se akustično signaliziranje in sluh razvila iz vibracijske komunikacije (Stumpner in von Helversen, 2001).

Kompleksni tibialni organ v prvem paru nog dolgorogih kobilic (Tettigoniidae) sestavljajo tri skupine receptorskih celic: zvočno, vibracijsko-zvočno in vibracijsko občutljive celice (Kalmring in sod., 1978). Fiziologijo receptorskih celic kompleksnega tibialnega organa v skupini Tettigoniidae so opisali Kalmring in sod. (1978, 1996). Kühne (1982a) je primerjal funkcionalne lastnosti vibroreceptorjev pri kratkorogih (Acrididae, vrsta *Locusta migratoria*) in dolgorogih (*Tettigonia cantans, Decticus verrucivorus*) kobilicah. Sočasno procesiranje vibracijskih in akustičnih dražljajev ter fiziologijo receptorskih celic so opisali tudi pri murnu (Gryllidae) (Kühne in sod., 1984; Dambach, 1989). Mason (1991) je opisal delovanje receptorskih celic tibialnega organa pri primitivnih dolgorogih kobilicah družine Haglidae. Čokl in sod. (1995) so opisali fiziologijo tibialnega organa pri jamski kobilici *Troglophilus neglectus* iz družine dolgorogih kobilic Rhaphidophoridae, pri katerih je tibialni organ v primerjavi z ostalimi dolgorogimi kobilicami okrnjen – manjka t.i. crista acoustica, del tibialnega organa, ki je namenjen zaznavanju zvoka.

Ščurki (Blattidae) so znani po domnevno enem od najobčutljivejših subgenualnih organov. Po prvih raziskavah naj bi se odzival že na odmike podlage velikosti 0,002 nm (Schnorbus, 1971). Ponovna vrednotenja vzdražnega praga (Shaw, 1994b) so pokazala, da leži precej višje, in sicer pri 0,2 nm. Pri ostalih skupinah žuželk so med drugim opisali funkcionalne lastnosti vibroreceptorjev pri tenčičarici (Chrysoperla carnea) (Devetak in Amon, 1997) in paličnjaku (Stein in Sauer, 1999). V skupini Heteroptera so raziskave na tem področju še precej skope. Devetak in sod. (1978) so opisali funkcionalne lastnosti vibracijskih receptorjev pri stenicah iz družine Cydnidae. Čokl (1983) je opisal funkcionalne lastnosti vibroreceptorjev pri vrsti N. viridula. Nizkofrekvenčni receptorji (low frequency receptors – LFR) se odzivajo na vibracije podlage v frekvenčnem območju pod 400 Hz; najnižje testirana frekvenca je bila 30 Hz, domnevajo, da sega območje delovanja še nižje. Ti receptorji do 120 Hz odgovarjajo fazno-vezano. Krivulja vzdražnega praga sledi liniji enakega odmika od ravnovesne lege (okoli 100 nm) med 50 in 400 Hz. Vzdražni prag pri 50 Hz, izražen kot pospešek, je pri 1,6 cm/s² (oz. 5 x 10⁻⁵ m/s). Srednjefrekvenčni receptorji (*middle frequency receptors* – MFR) odgovarjajo na dražljaje v frekvenčnem območju od 100 Hz do 1kHz z največjo občutljivostjo pri 200 Hz, kjer je vzdražni prag pri 1 cm/s² (oz. 10⁻⁵ m/s). Pod 200 Hz sledi krivulja njihovega vzdražnega praga liniji enakega pospeška (okoli 1 cm/s²), pri 200 Hz se ostro obrne in sledi liniji enakih odmikov od ravnovesne lege (med 10 in 100 nm). Visokofrekvenčni receptorji (high frequency receptors - HFR) delujejo v območju od 100 Hz do 5 kHz, z največjo občutljivostjo med 750 in 1000 Hz. V tem območju je vzdražni prag pri 0,9 cm/s² (oz. 2 x 10⁻⁶ m/s). Pod 1000 Hz sledi krivulja vzdražnega praga liniji enakega pospeška (okoli 1 cm/s²), nad 1000 Hz pa sledi liniji enakega odmika iz ravnovesne lege (med 0,1 in 1 nm). Tipa MFR in HFR kažeta pri pražnih intenzitetah podobne karakteristike odzivov, medtem ko nad vzdražnim pragom pride do razlik v frekvenčno-intenzitetnem kodiranju. Pri obeh tipih pride pri dražljajih frekvence 200 Hz do podaljšanega odgovora. Domnevajo, da je to posledica pojava resonance ligamenta, ki ga tvorita kapni celici subgenualnega organa (Čokl, 1983).

Glede na frekvenčno območje delovanja in najmanjšo občutljivost na vibracije podlage izmed vseh treh opisanih tipov, odgovori LFR receptorjev najverjetneje izvirajo iz kampaniformnih senzil in/ali sklepnih hordotonalnih organov. O takem izvoru izvoru teh vibroreceptorjev sklepamo na podlagi raziskav na drugih skupinah žuželk (Devetak in sod., 1978; Kühne, 1982a; Čokl, 1983; Kühne s sod., 1984; Dambach, 1989; Devetak in Amon, 1997).

Dosedanje raziskave subgenualnega organa pri različnih vrstah žuželk so potrdile njegovo visoko občutljivost na vibracije podlage in zaznavanje signalov v širokem frekvenčnem razponu do nekaj kHz (Schnorbus, 1971; Devetak s sod, 1978; Kühne, 1982a; Čokl, 1983; Kühne s sod., 1984; Dambach, 1989; Devetak in Amon, 1997). Na podlagi funkcionalnih lastnosti MFR in HFR nevronov pri zeleni smrdljivki pa lahko sklepamo, da izvirajo v subgenualnem organu. Čeprav za to trditev neposredni dokazi še manjkajo, pa raziskave

Devetaka s sod. (1978) pri družini Cydnidae ter raziskave na tenčičarici (Devetak in Amon, 1997) potrjujejo to hipotezo.

MFR in HFR celice kažejo mnogo podobnih lastnosti, a se razlikujejo v frekvenčnointenzitetni občutljivosti. Če izhajamo iz domneve, da obe receptorski celici izvirata v SO, lahko razlike pripišemo njuni medsebojni prostorski organiziranosti. Čokl (1983) meni, da na skolopidij, ki leži bolj medialno, vibracije vplivajo drugače kot na tistega, ki leži bolj lateralno, tik ob steni tibije, posledica česar so razlike v odgovoru obeh tipov receptorskih nevronov.

1.5.2.2 Centralne projekcije

Aksoni celic tibialnega organa ravnokrilcev vstopajo v trebušnjačo prek glavnega nožnega živca in se razvejijo v ipsilateralni polovici segmentalnega ganglija (Kalmring in sod., 1978; Eibl in Huber, 1979; Esch in sod., 1980). Končne razvejitve aksonov tvorijo nevropilo v antero-ventralnem področju protorakalnega ganglija, imenovanem aRT (*anterior ring tract* (Tyrer in Gregory, 1982)). Aksoni zvočno občutljivih receptorskih celic tvorijo akustično nevropilo na sredini aRT, aksoni vibracijskih in bimodalnih čutilnih celic tibialnega organa pa nevropilo na antero- in postero-lateralnem robu aRT (Römer, 1985; Kalmring in sod., 1996). Dejstvo, da so poteki senzoričnih vlaken tibialnega organa in kampaniformnih senzil v posameznem paru nog, ter cone, v katere projicirajo, prostorsko skoraj identični, kaže na to, da imajo senzorične strukture, ki se ponavljajo v zaporednih segmentih, podobno prostorsko organizacijo znotraj ganglija (Eibl in Huber, 1979). Grosch in sod. (1985) so primerjali centralne projekcije vibracijskih receptorjev pri petem larvalnem stadiju in odraslih osebkih kratkorogih kobilic iz družine Acrididae in ugotovili, da med projekcijskimi vzorci ni znatnih razlik. Mücke in Lakes-Harlan (1995) sta opisala centralne projekcije senzoričnih nevronov iz drugega para nog pri kratkorogi kobilici *Schistocerca gregaria*.

Razen pri ravnokrilcih je morfologija vibroreceptorskih nevronov pri žuželkah še povsem neraziskana. Oblika senzorične nevropile je delno opisana le pri stenici *N. viridula* (Čokl in Amon, 1980). Enako kot pri ravnokrilcih je le-ta omejena na ipsilateralno polovico ganglija. Vsako nevropilo sestavljajo tri dobro definirane regije: frontalna, centralna in kavdalna regija. Večina nevronov, katerih terminalne razvejitve tvorijo frontalni del nevropile, so motonevroni, katerih telesa ležijo v latero-frontalnem delu ipsilateralne strani protorakalnega ganglija. Med frontalnim in kavdalnim delom je okroglasto oblikovan centralni del, ki leži lateralno med aksoni, ki potekajo v kavdalno in frontalno regijo. Nevropile različnih nog se med seboj strukturno ne razlikujejo (Čokl in Amon, 1980).

1.6 VIBRACIJSKI INTERNEVRONI

1.6.1 Delovanje

Tudi na področju delovanja vibracijskih internevronov je največ raziskav do sedaj bilo narejenih na ravnokrilcih, pri katerih je osnovna komunikacija z zvokom. Enako, kot velja za receptorske celice kompleksnega tibialnega organa dolgorogih kobilic (Kalmring s sod., 1978; Kühne, 1982a), so tudi na nivoju internevronov ravnokrilcev prisotni trije fiziološki tipi: slušni (S), vibracijsko-slušni (VS) ter vibracijski (V) internevroni (Kühne, 1982b; Kalmring, 1983; Kalmring in sod., 1997), pri čemer je treba upoštevati dejstvo, da je bimodalnost receptorskih celic pogojena s samo zgradbo kompleksnega tibialnega organa, medtem ko je bimodalnost internevronov posledica nevronalnih povezav. Čeprav se frekvenčna uglašenost posameznih internevronov med različnimi vrstami dolgorogih kobilic precej razlikuje, pa velja, da je največja občutljivost slušnih internevronov v območju dominantnih frekvenčnih vrhov njihovih napevov (med 10 in 20 kHz), medtem ko so vibracijski internevroni najbolj občutljivi v nizkofrekvenčnem območju, pod 1 kHz (Silver in sod., 1980; Kalmring in sod., 1997; Nebeling, 2000). Bimodalni nevroni delujejo v širokem frekvenčnem območju in prejemajo vhode tako slušnih kot vibracijskih receptorjev (Čokl in sod., 1977). Občutljivost bimodalnih internevronov za vibracije podlage izboljšuje njihove sposobnosti frekvenčnoamplitudnega kodiranja pri sočasni stimulaciji s konspecifičnimi napevi ter vibracijskimi signali (Kühne, 1982b; Kalmring in sod., 1983). Jamske kobilice (Rhaphidophoridae) so v nasprotju z večino dnevno aktivnih travniških kobilic in talno živečih murnov popolnoma brez kril, ne stridulirajo in imajo okrnjen slušni organ (Čokl in sod., 1995). Funkcionalne (Čokl in sod., 1995; Stritih, 2001) in morfološke lastnosti njihovih na vibracije podlage občutljivih internevronov kažejo na homolognost dela vibracijskih in slušnih živčnih mrež, kar potrjuje domnevo, da so se tibialni slušni organi dolgorogih kobilic (Ensifera) razvili iz organov, podobnih vibroreceptorskim organom gluhih jamskih kobilic (Stritih, 2001). Čeprav so t.i. V internevroni pri ravnokrilcih občutljivi zgolj na vibracije podlage oz. nespecifično tudi na zvočne dražljaje zelo visokih intenzitet v frekvenčem območju napevov lastne vrste, je Silver s sodelavci (1980) opisala pri vrsti dolgorogih kobilic Decticus verrucivorus tudi V internevron, ki je prejemal inhibitorne vhode iz ultrazvočni receptorjev. Koprocesiranje zvoka in vibracij na istih nevronih je pri murnih podobno kot pri skupini Tettigoniidae, z bolj poudarjeno frekvenčno selektivnostjo na centralnem nivoju (Kühne in sod., 1984; Kühne in sod., 1985).

Pri kratkorogi kobilici vrste *Locusta migratoria* so opisali tri tipe na vibracije podlage občutljivih internevronov: bimodalne internevrone, ki so funkcionalno primerljivi z VS

internevroni dolgorogih kobilic; vzpenjajoče vibracijske internevrone, ki integrirajo vhode iz vibracijskih receptorjev vseh šestih nog ter vibracijske internevrone, ki so omejeni na torakalni del centralnega živčnega sistema in pri katerih je vhod enega para nog dominanten (Čokl in sod., 1977, 1985). Vzorci odzivov bimodalnih internevronov na zvok in na vibracije podlage se razlikujejo; medtem ko so prvi rezultat kompleksnih ekscitatornih in/ali inhibitornih interakcij signalov iz obeh timpanalnih organov, gre pri drugih za bolj nekoliko bolj preprosto integracijo senzoričnih vhodov iz vseh nog; senzorični vhodi imajo namreč na posamezen internevron ekscitatorni ali inhibitorni vpliv, nikoli pa kombinacije obeh (Čokl in sod., 1977). Bickmeyer in sod. (1992) domnevajo, da so med vibracijskimi receptorji ter vzpenjanjočimi bimodalnimi nevroni interkalirani segmentalno in intersegmentalno ležeči vibracijski internevroni prvega reda. To hipotezo podpirajo s prostorskim sovpadanjem dendritskih razvejitev vibracijskih internevronov in projekcijskega vzorca receptorskih celic ter z vrednotenjem latenc odgovorov posameznih celic na poti procesiranja vibracijskih dražljajev.

Funkcionalne lastnosti vibracijskih internevronov so opisali tudi pri čebelah (Kilpinen in Michelsen, 1994), paličnjaku (Sauer in Stein, 1999) ter zeleni smrdljivki (Čokl in Amon, 1980). Občutljivost vibracijskih internevronov čebel je bolj ali manj frekvenčno neodvisna (odzivajo se v širokem frekvenčnem pasu), različni internevroni pa se kljub podobnim krivuljam vzdražnega praga precej razlikujejo glede na vzorce proženja akcijskih potencialov (Kilpinen in Michelsen, 1994). Raziskave senzorično-motorične poti procesiranja vibracijskih signalov femoralnega hordotonalnega organa pri paličnjaku so pokazale veliko vlogo internevronov, ki ne prožijo akcijskih potencialov (*non-spiking interneurons*) (Sauer in Stein, 1999). Ti internevroni imajo velik vpliv pri integraciji in komunikaciji med nevroni zaradi stopnjevanja vpliva na membranski potencial svojih postsinaptičnih celic (Burrows, 1996).

Čokl in Amon (1980) sta pri stenici *N. viridula* opisala štiri funkcionalne tipe vibracijskih internevronov. Nizkofrekvenčni vibracijski internevroni (LFVI – low frequency vibratory interneuron), nizkofrekvenčni T vibracijski internevron (LFTVI – low frequency through vibratory interneuron) in nizkofrekvenčni segmentalni vibracijski internevron (LFSVI – low frequency segmental interneuron) so najobčutljivejši v območju frekvenc med 100 in 600 Hz, medtem ko je četrti tip, visokofrekvenčni vibracijski internevron (HFVI – high frequency vibratory interneuron) najobčutljivejši v območju med 600 in 1500 Hz. LFVI odgovarja v frekvenčnem območju od 50 do 600 Hz in je najobčutljivejši pri 100 Hz. LFTVI je najobčutljivejši med 150 in 200 Hz, deluje pa v frekvenčnem območju od 100 do nad 2000 Hz. LFSVI je najobčutljivejši med 150 in 600 Hz, deluje pa v območju od 100 do

preko 2500 Hz. HFVI, visokofrekvenčni vibracijski internevron, kaže največjo občutljivost pri frekvencah od 600 do 1500 Hz. Vsi štirje tipi so ekscitatorni in se na dražljaje odzivajo fazično-tonično.

1.6.2 Morfologija

Nebeling (2000) je primerjal morfologijo slušnih, vibracijskih ter bimodalnih vzpenjajočih internevronov v možganih, subezofagealnem ter protorakalnem gangliju dolgorogih kobilic (Tettigoniidae). Prvi imajo izhodne regije v vseh treh ganglijih, međtem so izhodne regije vibracijskih in bimodalnih internevronov praviloma le v možganih. Stritih (2001) je vibracijske internevrone v protorakalnem gangliju jamske kobilice razdelila v 10 morfoloških tipov. Podobnosti z morfologijo slušnih internevronov ravnokrilcev potrjujejo domneve o evoluciji slušnih sistemov pri žuželkah (Stumpner in von Helversen, 2001). Čokl in sod. (1985) so pri kobilici *Locusta migratoria* identificirali internevron, občutljiv izključno na vibracije podlage, ki je omejen na torakalne ganglije. Pripisujejo mu funkcijo povezovalnega nevrona med vibracijskimi receptorji ter vzpenjajočimi vibracijskimi in bimodalnimi internevroni. Bickmeyer in sod. (1992) so opisali morfologijo nekaterih intersegmentalnih vibracijskih (VI1 in VI2) ter bimodalnih (G in V-3) internevronov pri isti vrsti. Čokl in Amon (1980) sta opisala morfologijo nevrona LFTVI pri stenici *N. viridula*. Ta nizkofrekvenčna celica je omejena na torakalni del živčnega sistema: somo in dendritske razvejitve ima v protorakalnem gangliju, izhodne regije pa v centralnem gangliju.

1.7 ORIENTACIJA

Vedenjski poskusi so pokazali sposobnost orientacije v smeri vira vibracij pri mnogih skupinah žuželk v različnih vedenjskih kontekstih – iskanje partnerja (Kraus, 1989; Stiedl in Kalmring, 1989; Abbott in Stewart, 1993; Goulson in sod., 1994; Čokl in sod., 1999; Hunt, 1994; Cocroft in Rodríguez, 2005), plena (Markl in sod., 1973; Jackson in Walls, 1998), gostitelja (Meyhöfer in sod., 1997) ali druge hrane (Roces in sod., 1993; Cocroft, 2001); pregled v: Virant-Doberlet in sod. (2005). Pri zeleni smrdljivki se samec orientira proti pojoči samici; stacionarne samice kontinuirano oddajajo signale pozivnega napeva, medtem ko se samci usmerjeno gibljejo proti njim (Čokl in sod., 1999). Na razvejitvah se samci ustavijo, postavijo noge in antene na peclje oz. stranske veje okoli 'križišča', počakajo na samičin signal, ter se šele nato premaknejo naprej (Ota in Čokl, 1991).

Obstaja več hipotez o tem, kateri parameter prejetega signala igra glavno vlogo pri orientaciji žuželk. Podlaga za zaznavanje smeri izvora signala je zaznavanje intenzitetnih ali časovnih razlik med posameznimi receptorji. V primeru zvoka so to navadno razlike v intenziteti med enim in drugim ušesom (Pollack, 1998), saj je časovni zamik, ki nastane pri potovanju zvoka po zraku namreč za večino žuželk premajhen, da bi ga živčni sistem zaznal. Izjema so majhne žuželke, kjer sta ušesi tako blizu skupaj, da med njima ne nastane nadpražna intenzitetna razlika; te žuželke so razvile posebne mehanizme, ki jim kljub omejitvam omogočajo orientacijo na podlagi zakasnitve dražljaja. Primer takega organizma je parazitska mušica Ormia ochracea, ki se je sposobna orientirati na podlagi časovnega zamika med ušesoma v velikosti 25 ns (Mason in sod., 2001). Njena slušna organa sta namreč anatomsko in funkcionalno povezana; v takem sistemu se neznatni časovni zamik med ušesoma ojači, nastanejo pa tudi intenzitetne razlike, ki omogočijo specializiranemu živčnemu sistemu zaznavanje smeri zvoka (Robert in sod., 1998). V primeru zaznavanja vibracijskih signalov, ki se prevajajo po podlagi (rastline, pesek, vodna površina), pa je časovni zamik, ki nastane med potovanjem signalov od enega do drugega receptorja, navadno dovolj velik, da ga živali lahko zaznajo. Vedenjski poskusi kažejo, da lahko škorpijoni, pri katerih je časovna zakasnitev med posameznimi receptorji vodilni parameter za orientacijo, zaznajo zamik 0,2 ms (Brownell in Farley, 1979). Upoštevaje izmerjene hitrosti potovanja vibracijskih signalov po posameznih odsekih različnih rastlin (Michelsen, 1982; Barth, 1998, 2002) sklepamo, da so zamiki, vsaj na določenih delih rastline, dovolj veliki, da jih živčni sistem žuželk lahko zazna (Stritih in sod., 2000). Hergenröder in Barth (1983) sta pri pajkih opisala enostavno živčno mrežo za procesiranje prostorsko-časovne informacije iz zunanjega okolja. Podoben model interakcij sta predlagala Brownell in van Hemmen (2001) pri škorpijonih. Gre za model inhibitornih triad v sistemu osmih prostorsko ločenih receptorjev. Zaznavanje smeri vira vibracij pa lahko poteka tudi na podlagi analize razlik v intenziteti (Keuper in Kühne, 1983; Čokl, 1988) ali časovnem zamiku med posameznimi frekvenčnimi komponentami v vibracijskem signalu (Michelsen in sod., 1982; Čokl in sod., 1999). Pri žuželkah s specifično obliko telesa, npr. pri vrsti Umbonia crassicornis iz družine Membracidae (ang. thorn bug), ki ima pronotum povečan in oblikovan kot trn vrtnice, je informacija o smeri vibracijkih dražljajev lahko skrita v mehanskem odgovoru telesa na vibracije podlage (Cocroft in sod., 2000).

Nevrobiološka podlaga orientacije s pomočjo vibracijskih signalov je slabo obdelana. Največ podatkov o centralnem procesiranju vibracijskih signalov izvira iz raziskav na kobilicah in murnih, pri katerih je pomembnejša komunikacija z zvokom in za katere orientacija proti viru vibracij ni bila dokazana (kratkoroge kobilice) ali pa je relativno šibka (murni). Iz raziskav na murnih lahko strnemo temeljne zakonitosti centralne integracije senzoričnih vhodov na

podlagi naslednjih dognanj: a) večina vzpenjajočih vibracijskih internevronov sprejema ekscitatorne vhode iz subgenualnih organov vseh šestih nog (Dambach, 1972; Kühne in sod., 1984, 1985; Virant-Doberlet, 1989); b) vhodi enega (navadno drugega) para nog so dominantni (Kühne in sod., 1984, 1985; Virant-Doberlet, 1989); c) v odgovoru nekaterih internevronov so opazni vplivi kontralateralne inhibicije (Kühne in sod., 1984, 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 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 internevronov so bile večinoma omejene na en torakalni ganglij, poleg tega pa se vhodi iz različnih nog med seboj razlikujejo v latencah odgovorov (Virant-Doberlet, 1989).

Pri kratkorogi kobilici *Locusta migratoria* se odziv internevronov spreminja v odvisnosti od zaporedja draženja različnih parov nog, kar kaže jasno odvisnost vzorcev proženja akcijskih potencialov od smeri dražljaja (Čokl in sod., 1985). Ta se je pri nekaterih internevronih še dodatno povečala ob hkratni simulaciji dušenja signalov (nižja intenziteta 'kasnejših' signalov). Kot pri murnu so tudi pri kratkorogi kobilici opazili vplive kontralateralne inhibicije; zabeležili so pa tudi aktivnost internevronov, omejenih na torkalne ganglije, ki so se selektivno odzivali na draženje enega samega para nog (Čokl in sod., 1985). Domnevajo, da ti internevroni povezujejo senzorične vhode posameznih nog z vzpenjajočimi internevroni.

1.8 KODIRANJE SPEKTRALNIH IN ČASOVNIH PARAMETROV NARAVNIH NAPEVOV

Tudi na področju kodiranja frekvenčnih in časovnih parametrov je zvočna komunikacija žuželk neprimerno bolj raziskana kot vibracijska. Pri razpoznavanju zvočnih napevov lastne vrste igrajo pri ravnokrilcih glavno vlogo časovni parametri, kot npr. dolžina signalov, njihova ponavljalna frekvenca ali dolžina premorov (Stumpner in Ronacher, 1994; von Helversen in von Helversen, 1998; Pollack, 2000). Pri kratkorogih kobilicah spreminjanje dolžine zvočnih signalov in njihove ponavljalne frekvence odločilno vpliva na prepoznavanje vrstno specifičnih signalov (Ronacher in sod., 2000).

Zvočni in vibracijski nevroni so običajno široko uglašeni, z največjo občutljivostjo v frekvenčnem območju dominantne frekvence napeva lastne vrste. Pri murnu *Teleogryllus*

oceanicus najdemo na primer dva vrhova občutljivosti – pri 4,5 kHz (dominantna frekvenca napevov) ter pri 25-50 kHz, frekvenci, ki jo uporabljajo netopirji pri eholokaciji. Tu je funkcija slušnega sistema dvojna – lociranje spolnih partnerjev ter opozarjanje na nevarnost (Pollack in Imaizumi, 1999).

Vibracijski napevi stenic iz družine Pentatomidae so vrstno specifični. Signali različnih vrst se med seboj razlikujejo predvsem v časovnih parametrih vibracijskih signalov in njihovi frekvenčni modulaciji, dominantna frekvenca vseh napevov pa se giblje med 70 in 130 Hz (Čokl in sod., 2001; Blassioli Moraes in sod., 2005). Vedenjski poskusi so pokazali, da signali samičinega pozivnega napeva vrste *Acrosternum hilare* (Pentatomidae) ne prožijo odziva pri samcih vrste *N. viridula* (Miklas in sod., 2003a), prav tako pa so samci zelene smrdljivke sposobni razločevanja med napevi samic iste vrste in simpatričnih vrst *Thyanta pallidovirens* in *T. custator accera* (Hrabar in sod., 2004). K sistemu vrstno specifičnega razpoznavanja ob omenjenih razlikah v parametrih vibracijskih napevov pa doprinesejo tudi razlike v kemični sestavi feromonov (Aldrich in sod., 1987; Baker in sod., 1987; Aldrich in sod., 1989; McBrien in Millar, 1999).

Pri zeleni smrdljivki je ena od receptorskih celic subgenualnega organa uglašena na 200 Hz, kar odstopa od dominantne frekvence napevov (Čokl, 1983). Uglašenost sovpada z resonančnim spektrom zelenih rastlin gostiteljic (Čokl in sod., 2005). Druga celica je uglašena na višje frekvence in najverjetneje nima pomembnejše vloge v intraspecifični komunikaciji. Receptorske celice, uglašene med 60 in 80 Hz, pa so lahko občutljive na enega od subdominantnih vrhov napevov.

1.9 NAMEN NALOGE

Vedenjski aspekt vibracijske komunikacije je pri stenici *Nezara viridula* (L.), zeleni smrdljivki, že obsežno raziskan, kar predstavlja primerno izhodišče za pričujočo nalogo. Samci zelene smrdljivke so sposobni orientacije v smeri vira vibracij v kompleksnem okolju in na relativno velike razdalje. Za razliko od ravnokrilcev, pri katerih je do sedaj bilo opravljenih največ raziskav o procesiranju vibracij, čeprav pri njih zaznavanje le-teh zgolj dopolnjuje komunikacijo z zvokom, pa je pri zeleni smrdljivki vibracijska komunikacija osrednjega pomena v paritvenem vedenju. Namen naloge je opisati vlogo delovanja živčevja pri vođenju procesov v okviru vibracijske komunikacije ter integriranje senzoričnih vhodov in centralno procesiranje vibracijskih signalov. V nalogi smo prvič morfološko opisali vibracijske nevrone pri žuželkah, pri katerih je primarna komunikacija z vibracijskimi signali.

Z umetno sintetiziranimi vibracijskimi signali in tehniko intracelularnega odvajanja aktivnosti s hkratnim barvanjem živčnih celic smo fiziološko in morfološko identificirali vibracijske internevrone v centralnem gangliju in receptorske celice, ki projicirajo v centralni ganglij iz drugega in tretjega para nog. Na podlagi lege vhodnih in izhodnih regij posameznih internevronov ter latence in tipa odgovora na vibracijske dražljaje smo sklepali na njihovo povezljivost. Funkcijo in obliko identificiranih celic smo primerjali z doslej opisanimi vibracijskimi in bimodalnimi nevroni ravnokrilcev.

Da bi simulirali naravne razmere, s katerimi se žival srečuje na rastlinah, smo posneli vibracijske signale pozivnega napeva samice na različnih delih rastline in jih nato uporabili kot dražljaj pri zunajceličnem odvajanju aktivnosti iz internevronov in receptorskih celic v centralnem gangliju. Z analizo odzivov celic na te signale smo ugotavljali, kateri parametri imajo pomembno vlogo pri orientaciji živali proti viru vibracij in kako so v odzivu celic kodirane spremembe v spektralni, intenzitetni in časovni strukturi signalov, do katerih pride med prevajanjem vibracij po rastlinah.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 ŽIVALI

2.1.1 Gojenje

Vse poskuse smo izvedli na odraslih stenicah vrste *Nezara viridula* L. (Heteroptera: Pentatomidae), ki so bile starejše od 10 dni po zadnji levitvi. Uporabili smo osebke obeh spolov (skupno 105 živali). Živali so izhajale iz kalifornijske, japonske, francoske ter slovenske populacije. Gojili smo jih v laboratoriju v plastičnih posodah (38x23x23 cm) pri 22-26°C, 70-80% relativni zračni vlagi ter pri dnevno-nočnem ciklu 16h:8h. Živali smo hranili s sončničnimi semeni (*Helianthus anuus* L.), z rastlinami in stroki fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) ter z arašidi (*Arachis hypogaea* L.).

2.1.2 Preparacija živali za nevrofiziološke poskuse

Poskusno žival smo s segreto mešanico kolofonije in voska pritrdili z dorzalno stranjo navzgor na kovinski nosilec v obliki črke U. Odrezali smo ji ščitek (scutelum) in protorakalni tergit (pronotum) ter odstranili mišično maso v oprsju in večino notranjih organov. Tako smo izpostavili centralni ganglij. Da bi preprečili izsušitev, smo ganglij ves čas poskusa vlažili s fiziološko raztopino (Priloga).

2.2 SNEMANJE VIBRACIJSKIH SIGNALOV NA RASTLINI

Naravne vibracijske signale spolno zrelih samic smo snemali z laserskim vibrometrom (Polytec, Waldbronn, Germany; OFV-353 – senzorska glava, OFV-2200 – kontrolni del) na rastlinah fižola (*Phaseolus vulgaris*) in na ciperusu (*Cyperus sp.*). Samico smo postavili na rastlino ter ji približali samca. Ko je začela oddajati signale t.i. samičinega pozivnega napeva, smo laserski žarek usmerjali na različne točke na rastlini, predhodno označene s korekturnim belilom zaradi boljšega odboja svetlobe. Nekaj meritev smo opravili tudi tako, da smo na listno bazo pritrdili magnet in ga vibrirali z elektromagnetom, ki je bil od njega oddaljen 0,5-1 cm. Magnet je tehtal 26 g, kar približno ustreza teži odraslih samic.

Na fižolu smo izbrali štiri točke okoli križišča (dve na listnih pecljih, dve na steblu), ki so bile od razvejitve oddaljene po 1 cm (sl. 4). Na ciperusu smo signale snemali na 19-ih točkah, ki so si sledile na razdalji 1-2 cm od vrha do baze stebla. Samica je med oddajanjem pozivnega napeva stala ves čas na istem mestu na enem od listov, blizu listne baze (sl 4).

Na vsaki točki smo posneli po 10 signalov, ki smo jih shranjevali v računalnik s programom Cool Edit Pro 2.0 (Syntrillium Software Corporation, Phoenix, ZDA).



Slika 4: Točke na fižolu (4 točke) in ciperusu (19 točk), na katerih smo posneli vibracijske signale samičinega pozivnega napeva.

2. 3 IZVEDBA FIZIOLOŠKEGA POSKUSA

2.3.1 Postavitev poskusa in beleženje aktivnosti celic

Poskuse smo izvajali v Faradayevi kletki (sl. 5). Jekleno mizo, na kateri smo izvajali poskuse, smo podložili z gumijastimi podstavki debeline 5 cm; tako smo zagotovili dovolj učinkovito dušenje tresljajev iz okolja. Nosilec s stenico smo pritrdili na mikromanipulator (M-152; Narishige, Tokio, Japonska) ter žival namestili nad vibracijski vzbujevalnik - *ang. minishaker* (tip 4810, Bruel & Kjær, Nærum, Danska). Vseh šest nog smo z mešanico voska in kolofonije s pomočjo zobotrebcev pritrdili na konico vibracijskega vzbujevalnika. Da bi omejili premikanje centralnega ganglija tekom poskusa in olajšali dostop z elektrodo, smo ga podložili z jekleno žičko ter rahlo privzdignili. V zadek živali smo namestili srebrno žičko, ki je služila kot indiferentna elektroda.

Za zunajcelično beleženje aktivnosti živčnih celic smo uporabljali borosilikatne elektrode s filamentom (tip BF 100-58-15; Sutter Instrument, Novato, ZDA), za znotrajcelične odvode pa prav tako borosilikatne elektrode, a z nekoliko debelejšo steno (tip BF 120-69-15; Sutter Instruments, Novato, ZDA). Elektrode smo izdelali s horizontalnim vlečnikom

(Micropipette Puller P-87; Sutter Instrument, Novato, ZDA). Elektrode za zunajcelične odvode smo napolnili s 3M raztopino KCl. Njihova upornost je znašala med 20 in 35 M Ω . Elektrode za znotrajcelično odvajanje aktivnosti živčnih celic pa smo pripravili tako, da smo konico napolnili s 5% raztopino barvila Lucifer Yellow (L0259, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, ZDA) v 0,5M LiCl, preostali del elektrode pa z 0,5M LiCl; njihova upornost je znašala 80 do 120 M Ω .

Elektrodo smo pritrdili v polčlen, tega pa namestili na sondo znotrajceličnega ojačevalnika (Cyto 721; WPI, Sarasota, ZDA). Sondo smo vpeli v držalo na mikromanipulatorju (Leitz, Wetzlar, Nemčija). Odzive celic smo beležili iz medialnega dela centralnega ganglija. Ojačane živčne impulze smo skupaj z dražljaji (te smo ojačali preko ojačevalnika, izdelanega v laboratoriju, intenziteto pa smo spreminjali z v laboratoriju narejenim stikalom) opazovali na osciloskopu (OS 5020P; Goldstar, Koreja). Draženje in odzive celic smo na dveh kanalih shranjevali v standardni PC s programom Cool Edit Pro 2.0. Podatke smo zajemali s stopnjo



Slika 5: Shema postavitve poskusa (set-up).

vzorčenja 44100 Hz. Zapise zunajceličnih odvodov smo za nadaljnjo obdelavo shranili v program Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, VB) preko A/D pretvornika (CED 1401 plus).

2.3.2 Draženje

Z vibracijskim vzbujevalnikom smo hkrati tresli vseh šest nog stenice. Živali smo dražili z naravnimi in umetnimi vibracijskimi signali.

2.3.2.1 Naravni vibracijskih signali

Za draženje smo izbrali zaporedje vibracijskih signalov samičinega pozivnega napeva, posnetih z laserskim vibrometrom na fižolu (zaporedje je sestavljalo po 10 signalov z vsake od štirih točk okoli križišča (sl. 6, A)) ter zaporedje signalov, posnetih na ciperusu (zaporedje so sestavljali po štirje signali z vsake od 19-ih točk (sl. 6, B)).



Slika 6: Zaporedji vibracijskih signalov samičinega pozivnega napeva, posnetih na fižolu (A) in steblu ciperusa (B).

2.3.2.2 Umetno sintetizirani vibracijski signali

Sinusne signale smo naredili s pomočjo računalniškega programa Sound Forge 4.0 (Sonic Foundry; Madison, ZDA) in jih ojačali z močnostnim ojačevalnikom Startech A-50 (StarTech, Groveport, ZDA). Močnostni ojačevalnik je bil povezan z vibracijskim vzbujevalnikom, na katerega smo pritrdili noge poskusne živali. Intenziteto dražljajev na vibracijskem vzbujevalniku smo umerili z laserskim vibrometrom. Z v laboratoriju narejenim stikalom smo spreminjali intenziteto dražljajev med posameznimi serijami v stimulacijskem protokolu.

Dolžina signalov je bila 100 ms, z 10 ms trajajočo fazo naraščanja amplitude na začetku ter 10 ms trajajočo fazo upadanja na koncu signala (sl. 7). Njihova ponavljalna frekvenca je bila 2 Hz (400 ms trajajoč interval med enim in drugim dražljajem).



Slika 7: Umetno sintetiziran vibracijski signal frekvence 300 Hz.

Ostale parametre dražljajev (frekvenco in intenziteto signalov) v stimulacijskem programu smo izbrali glede na znano območje delovanja vibracijskih receptorjev pri zeleni smrdljivki (Čokl, 1983).

STIMULACIJSKI PROTOKOL:

Žival smo dražili z osmimi serijami 14-ih dražljajev naslednjih frekvenc:

50, 70, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 3000 in 4000 Hz.

Znotraj ene serije so imeli dražljaji isto intenziteto. Serije dražljajev so si sledile od tiste z najvišjo do tiste z najnižjo intenziteto:

100, 70, 50, 20, 10, 5, 1 in 0[•]5 cm/s².

Sledil je še t.i. intenzitetni test – sekvenca enajstih dražljajev frekvence 100 Hz z naraščajočo intenziteto od 50 do 7500 cm/s² (50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 5000 in 7500 cm/s²).

Pri vseh živalih smo opravili osem serij 14-ih dražljajev; če je bil signal celice stabilen, smo serije 1-2 krat ponovili. Intenzitetni test smo izvedli 1-3 krat, prav tako v odvisnosti od

stabilnosti signala celice. Dražljajem najmočnejših intenzitet je sledil premor, dolg vsaj 1 s. Pri spontano aktivnih celicah smo posneli nekaj sekund aktivnosti brez draženja, tako da smo lahko ovrednotili stopnjo spontane aktivnosti.

2.3.3 Označevanje celic

V sklopu poskusov znotrajceličnega odvajanja živčnih implulzov smo po zaključku fiziološkega testiranja vsako od celic, pri katerih smo zabeležili odzive na vibracijske signale, pobarvali z znotrajceličnim fluorescentnim barvilom Lucifer Yellow (metoda opisana v Stewart, 1978). Barvilo smo injicirali v celico s konstantnim hiperpolarizacijskim tokom (2-4 nA, 1-5 min). Amplituda akcijskih potencialov se je po hiperpolarizaciji povečala. Moč hiperpolarizacijskega toka smo povečevali do stopnje, pri kateri smo še lahko spremljali odziv celice na draženje. Pri vsaki poskusni živali smo s hiperpolarizacijo barvali največ po eno celico.

2.3.4 Obdelava tkiva in mikroskopiranje

Po končanem barvanju smo prsno votlino živali navlažili s fiziološko raztopino ter jo dali za nekaj minut v temo, da je barvilo še nekaj časa difundiralo po celici. Nato smo iz živali izpreparirali protorakalni in centralni ganglij ter ju 1-2 uri fiksirali v 4% raztopini formaldehida v fosfatnem pufru (PB) (Priloga). Po spiranju v PB (2 x 10 min.) smo preparat dehidrirali v alkoholni vrsti (1 x po 10 min. v 50, 70, 90 in 96% etanolu ter 2 x po 10 min v 100% etanolu) ter ga nazadnje zbistrili v metil salicilatu (5-10 min.). Tako je bil preparat pripravljen za opazovanje pod mikroskopom.

Na objektno stekelce smo kanili kapljico metil salicilata in preparat položili vanjo. Okoli kapljice smo nanesli silikonski gel, da krovno stekelce ne bi sploščilo preparata. Preparate smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom (Leica DMRB/E, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Nemčija) pri različnih povečavah (100, 160, 250 in 400 x). Presvetljevali smo jih z modro svetlobo valovne dolžine 430 nm in jih opazovali kot fluorescenten objekt v temnem polju. Preparate smo fotografirali s kamero AxioCam MR (Carl Zeiss, Oberkcohen, Nemčija) s pomočjo programa AxioVision 3.1 (Zeiss) v različnih ravninah. Zabeležili smo razdalje med glavnimi deli živčne celice (telo, akson in dendritska regija) v tretji dimenziji in njihovo medsebojno lego. V programu Photoshop 8.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, ZDA) smo fotografije različnih ravnin nalagali eno na drugo ter s pomočjo sistema Graphire 2 (grafična tabla in brezžično pero, Wacom Europe, Krefeld, Nemčija) izrisali celotno celico.

2.4 ANALIZA REZULTATOV

2.4.1 Analiza elektrofizioloških podatkov

2.4.1.1 Odzivi na signale samičinega pozivnega napeva

S programom Spike 2 5.11 (CED, Cambridge, VB) smo analizirali odzive internevronov v centralnem gangliju na vibracijske signale samičinega pozivnega napeva, posnete na fižolu in ciperusu. Analizirali smo odgovore 51 celic 37 živali na signal, posnet na ipsilateralnem peclju na fižolu, 3 cm stran od samice, ki je oddajala samičin pozivni napev in odgovore 30 celic 23 živali na signala, posneta na steblu ciperusa na razdaljah 9 in 15 cm od samice (zaradi obsežnosti naloge smo se omejili zgolj na analizo odzivov na tri signale naravnih napevov). Akcijske potenciale (v nadaljevanju AP) smo kot dogodke v času predstavili v obliki rasterskega diagrama. Obravnavane dražljaje smo predstavili v obliki oscilogramov in sonogramov, izdelanih s programom SoundForge in Raven 1.2 (Cornell Lab of Ornithology, Bioacoustics Research program). Odgovore različnih celic na isti dražljaj smo predstavili tudi v obliki grafa kumulativnih frekvenc ter analizirali podobnosti in razlike med njihovimi vzorci proženja akcijskih potencialov s klastrsko analizo, katere rezultati so predstavljeni v obliki dendrogramov. Za klastrsko analizo smo uporabili standardizirano evklidsko razdaljo in metodo skupinskega povprečja (group average). Mera za primerjavo aktivnosti posameznih celic med draženjem je bila stopnja proženja akcijskih potencialov v času. Za analize smo uporabili program Excell in program za statistično obdelavo podatkov R 2.1.0 (vir: www.r-project.org).

2.4.1.2 Odzivi na umetno sintetizirane vibracijske signale

Odzive 38 celic 38 živali smo analizirali v programu Sound Forge (Sonic Foundry; Madison, ZDA). Nekatere celice so prožile AP neodvisno od draženja, kar imenujemo *spontana aktivnost*. Pri takih celicah smo odgovor ovrednotili z odštevanjem spontane aktivnosti. Kot odgovor celice smo šteli število AP v intervalu 300 ms od nastopa dražljaja oz. od nastopa dražljaja do začetka pojava hiperpolarizacije (pri celicah z izraženo hiperpolarizacijo po ekscitacijskem odgovoru). Povprečno frekvenco spontane aktivnosti celice smo ovrednotili tako, da smo prešteli število akcijskih potencialov v 10 naključno izbranih intervalih brez draženja v trajanju 500-1000 ms. Če je bila spontana aktivnost izjemno neenakomerna, smo jo določali v časovnem oknu 300 ms neposredno pred določenim dražljajem. Število AP v enakem časovnem intervalu, kot je bil tisti, v katerem smo določali odziv celice, smo odšteli od odgovora celice. Če je bil rezultat pozitiven, smo odgovor ovrednotili kot ekscitacijo, če pa je bil negativen, pa kot inhibicijo. Enak način vrednotenja smo uporabljali tudi pri celicah, kjer sta bila v odgovoru jasno vidna tako inhibitorni kot ekscitatorni input.

Za vsako celico smo določili *vzdražni prag* pri posamezni frekvenci dražljajev. Vzdražni prag za ekscitacijo smo definirali kot najnižjo intenziteto dražljaja, pri kateri je vsaj v polovici ponovitev prišlo do pojava AP v odzivu. V primeru, da je celica spontano prožila AP, smo vzdražni prag za ekscitacijo definirali kot najnižjo intenziteto dražljaja, pri kateri smo vsaj v polovici ponovitev dobili pozitivno vrednost pri oceni jakosti odziva celice na opisani način. Vzdražni prag za inhibicijo smo nasprotno definirali kot najnižjo intenziteto, pri kateri smo vsaj v polovici ponovitev dobili negativno vrednost. Frekvenčno odvisnost vzdražnega praga smo prikazali v <u>krivuljah vzdražnega praga</u>.

Kot merilo za *jakost odgovora* smo obravnavali število AP na dražljaj. <u>Izointenzitetne</u> <u>krivulje</u> prikazujejo odvisnost jakosti oz. velikosti odgovora celice od frekvence dražljaja pri konstantnem pospešku 100 cm/s². <u>Intenzitetne krivulje</u> kažejo odvisnost jakosti odziva od intenzitete dražljaja. Prikazali smo jo pri frekvenci največje občutljivosti posamezne celice, nekajkrat pa tudi pri več frekvencah.

Latenco odziva smo definirali kot čas od začetka dražljaja do vrha prvega AP v odzivu. Pri celicah z neprestanim spontanim proženjem AP relativno konstantne frekvence smo ocenili, kje bi se po nastopu dražljaja pojavil naslednji AP, upoštevaje frekvenco spontane aktivnosti, če draženja ne bi bilo. Če se je AP pojavil prej, smo latenco ekscitacijskega odgovora definirali kot čas od začetka nastopa dražljaja do vrha omenjenega AP. Če je prišlo do izpada AP na pričakovanem mestu, smo čas med začetkom dražljaja in mestom, kjer naj bi se le-ta pojavil ob nemoteni spontani aktivnosti ocenili kot latenco inhibicije. Z <u>latenčnimi krivuljami</u> smo prikazali latence odzivov v odvisnosti od intenzitete dražljajev.

Pri intenzitetnih in latenčnih krivuljah smo intenziteto dražljaja izrazili v decibelih (dB), in sicer relativno glede na intenziteto vzdražnega praga pri določeni frekvenci (vrednosti so navedene ob grafih). Relativno intenziteto vibracij smo izračunali po naslednji enačbi: dB = $20 \log (x/x_{ref})$;

pri tem je x pospešek vibracijskega dražljaja pri določeni frekvenci, x_{ref} pa je pospešek pražnega dražljaja za to frekvenco.
2.4.2 Analiza oblike živčnih celic

Pri opisovanju lege celic v gangliju smo uporabili naslednje termine (sl. 8):

lateralno pomeni v smeri proti levemu oz. desnemu robu ganglija;
medialno pomeni proti sredini med lateralnima robovoma ganglija;
anteriorno označuje sprednji del ganglija, bližje glavi;
posteriorno označuje del ganglija, ki je bližje zadku;
dorzalno opisuje smer proti zgornjemu, hrbtnemu delu ganglija;
ventralno označuje smer proti spodnjemu, trebušnemu delu ganglija;
ipsilateralno se nanaša na lateralno polovico ganglija, v kateri leži celično telo (soma);
kontralateralno se nanaša na nasprotno ganglijsko polovico, kjer ni some;
bilateralno označuje lego v obeh polovicah ganglija.

Na skicah ganglijev so prikazani konektiv v protorakalni oz. subezofagealni ganglij (anteriorno), vhodi nožnih živcev (lateralno) ter vhod genitalnega živca (posteriorno).



Slika 8: Prikaz poimenovanja smeri pri opisu lege živčnih celic v gangliju. PTG - protorakalni ganglij; CG - centralni ganglij.

2.5 POIMENOVANJE ŽIVČNIH CELIC

Receptorske celice smo poimenovali glede na njihove fiziološke značilnosti (frekvenčno območje največje občutljivosti oz. uglašenost). Za poimenovanje internevronov oz. njihovih tipov smo uporabili poimenovanje glede na morfologijo celice, kot ga je za slušne internevrone ravnokrilcev uvedel Hedwig (1986). Izhodišče takega poimenovanja je lokacija some celice v živčnem sistemu (sl. 9). Ker pri treh nevronih, ki smo jih opisali, lega some ni znana, smo jih začasno poimenovali V-1, 2 in 3 (vibracijski internevron 1, 2 in 3).



1. Lega some:

PTG = protorakalni ganglij

CG = centralni ganglij

2. Potek aksona:

- $\mathbf{A} = ascending vzpenjajoči se akson$
- $\mathbf{D} = descending spuščajoči se akson$
- $\mathbf{L} = local lokalni akson$

3. Lega aksona glede na somo:

- I = *ipsilateral* ipsilateralno; v isti lateralni polovici ganglija
- **C** = *contralateral* kontralateralno; v nasprotni lateralni polovici ganglija
- $\mathbf{B} = bilateral$ bilateralno; v obeh lateralnih ganglijskih polovicah
- 4. Zaporedna številka opisanega tipa celice (poljubno)

3 REZULTATI

3.1 RECEPTORSKE CELICE

Pri različnih osebkih smo obarvali pet na vibracije podlage občutljivih čutilnih celic iz drugega in tretjega para nog. Na podlagi strukture in funkcije smo jih razdelili v dve skupini; poimenovali smo jih glede na frekvenčno območje največje občutljivosti:

a) LFR (low frequency receptors) - nizkofrekvenčne in

b) MFR (middle frequency receptors) - srednjefrekvenčne receptorske celice.

Visokofrekvenčnih receptorskih celic nismo identificirali.

3.1.1 LFR – oblika in delovanje

Oblika

Centralne projekcije tega tipa celic smo pobarvali pri dveh živalih. Čutilni akson vstopa v centralni ganglij v posteriorni tretjini glavnega nožnega živca in v obliki loka projicira anteriorno do medialne linije ganglija (sl. 10). Anteriorno izraščajo iz aksona kolaterale, ki so vse krajše proti sredini ganglija. Akson je omejen na ipsilateralni del centralnega ganglija.

Delovanje

Obe LFR celici sta se odzivali na dražljaje frekvenc 50-300 Hz z vrhom občutljivosti pri najnižji testni frekvenci – 50 Hz. Krivulji vzdražnega praga obeh celic sta enaki (sl. 11, A). Vzdražni prag pri 50 Hz leži pod najnižjo testirano intenziteto (0,5 cm/s² oz. 1,6 x 10⁻⁵ m/s). Prva celica je občasno spontano prožila akcijske potenciale (v nadaljevanju AP) s frekvenco do 45 Hz. Drugo celico je označevala enakomerna spontana aktivnost s frekvenco okoli 12 Hz. Celici sta odgovarjali fazno vezano do frekvence 150 Hz (sl.11, B). Pri dražljaju frekvence 50 Hz celici odgovarjata z 1-4 AP na fazo. Število AP na fazo je večje v začetnem delu dražljaja in narašča z naraščajočo intenziteto dražljaja (sl. 11, C).

Izointenzitetni krivulji obeh celic sta podobni na glavo obrnjeni krivulji njunega vzdražnega praga (sl. 12, A); število AP na dražljaj je upadalo s 13-15 pri 50 Hz preko 10 pri 70 in 100 Hz do 1-4 pri 300 Hz.

Intenzitetne krivulje kažejo spreminjanje jakosti odziva celic z naraščajočo intenziteto (sl. 12, B). Pri celici **a** je bil odziv pri 100 Hz konstanten (8-9 AP) v vsem merjenem območju, medtem ko je pri celici **b** narasel od 1 na 10 AP že v območju med 0 in 7 dB ter ostal na istem nivoju v območju med 7 in 26 dB nad vzdražnim pragom.

Latence odzivov pri 50 Hz so bile ob vzdražnem pragu 14 oz. 18 ms; do 25 dB nad vzdražnim pragom so se krajšale in se ustalile pri 9 oz. 13 ms (sl. 12, C). Pri 100 Hz so bile latence odzivov bolj ali manj konstantne med 10 in 13 ms v vsem območju draženja.



Slika 10: Morfologija nizkofrekvenčnih receptorskih celic LFR. Risbe in fotografija celic, napolnjenih z barvilom Lucifer yellow, v centralnem gangliju. Celici sta enako orientirani zaradi lažje primerjave (celica \mathbf{a} – ventralni pogled, celica \mathbf{b} – dorzalni pogled).



Slika 11: A. Krivulji vzdražnega praga celic **a** in **b** tipa LFR (morfologija na str. 29). Bel znak kaže frekvenco, pri kateri vzdražni prag leži verjetno pod prikazanimi (najnižjimi testiranimi) intenzitetami. **B.** Fazno-vezan odgovor celice **b** na dražljaj frekvence 100 Hz, intenzitete 100 cm/s² in trajanja 100 ms. **C.** Zapis odgovorov celice **b** na dražljaje različnih frekvenc in intenzitet. Dražljaji so prikazani pod odzivi celic.



Slika 12: Izointenzitetne (A), intenzitetne (B) ter latenčne (C) krivulje celic **a** in **b** tipa LFR (morf. na str. 29). A. Jakost odziva celic **a** in **b** pri različnih frekvencah ter intenziteti 100 cm/s². Pri celici **a** krivulja prikazuje povprečje treh meritev, pri celici **b** pa povprečje dveh meritev. Posamezni znaki prikazujejo posamezne meritve. **B**, **C**. Krivulje so prikaz ene meritve. *Referenčne intenzitete* (0 dB): pri 50 Hz – 0,5 cm/s², pri 100 Hz – 5 cm/s².

3.1.2 MFR – oblika in delovanje

Oblika

Pobarvali smo tri receptorske celice tipa MFR (sl. 13). Akson vstopa v centralni ganglij v posteriorni tretjini glavnega nožnega živca in projicira medio-anteriorno do medialne linije ganglija. Končne razvejitve so zelo goste in omejene na medialno polovico ipsilateralne polovice ganglija. Dobro so vidne terminalne zadebelitve.



Slika 13: Morfologija srednjefrekvenčnih receptorskih celic MFR v centralnem gangliju. Risbe celic **a**, **b** in **c** ter fotografija celice **a**, napolnjene z barvilom Lucifer yellow. Vse dorzalni pogled.

Delovanje

Zabeležili smo odzive celic z oznakama **a** in **b**; celica **c** se je obarvala hkrati z enim od internevronov (str. 38), katerega aktivnost smo posneli. V nasprotju s precej podobno obliko se po funkciji celici **a** in **b** precej razlikujeta. Celica **a** je spontano prožila AP frekvenco 52 \pm 16 Hz, mestoma v skupkih po 4-10 AP (sl. 14, A). V frekvenčnem območju med 50 in 100 Hz je med draženjem prišlo do inhibicije, a le pri nizkih intenzitetah dražljaja (sl. 14; B, C). Vzdražni prag za inhibicijo je bil pri intenziteti 1 cm/s² (2,3 x 10⁻⁵ m/s pri 70 Hz; 1,6 x 10⁻⁵ m/s pri 100 Hz). Nad 20 cm/s² inhibicija ni bila vidna; pri 70 in 100 Hz je bil pri visokih intenzitetah opazna celo ekscitacija (sl. 14, C). V frekvenčnem območju med 150 in 1000 Hz je imela celica vrh občutljivosti med 300 in 500 Hz, kjer je bil vzdražni prag pri 5 cm/s² (2,6 x 10⁻⁵ m/s pri 300 Hz; 2 x 10⁻⁵ m/s pri 400 Hz; 1,6 x 10⁻⁵ m/s pri 500 Hz). Pri 300 Hz je pri intenziteti nad 50 cm/s² prišlo do podaljšanega odziva (sl. 14, C). Celica **b** se je odzivala z enim samim AP vrh ekscitatornega postsinaptičnega potenciala do nekaj AP na dražljaj (sl. 14, D). Odzivala se je med 50 in 700 Hz, z vrhom občutljivosti pri 100-150 Hz, kjer je bil vzdražni prag verjetno nižji od najnižje testirane intenzitete dražljajev – 0,5 cm/s² (8 x 10⁻⁶ m/s pri 100 Hz; 5,3 x 10⁻⁶ m/s pri 150 Hz).

Izointenzitetni krivulji obeh celic sta zvonasti (sl. 15, A); pri celici **a** je jakost odgovora maksimalna pri 300 Hz, pri celici **b** pa med 100 in 200 Hz. Jakost odgovora obeh celic je najvišja pri frekvenci, kjer je celica najbolj občutljiva. Izointenzitetna krivulja celice **a** je veliko bolj strma, jakost odgovora med posameznimi frekvencami se razlikuje za faktor 10, medtem ko so razlike pri celici **b** manjše (število AP se poveča za faktor 2-3).

Jakost odzivov smo izmerili pri frekvenci, pri kateri je bila posamezna celica najbolj občutljiva (sl. 15, B). Jakost odziva je pri celici **a** enakomerno naraščala od 5 AP na dražljaj pri vzdražnem pragu do 19 AP pri najvišjih merjenih intenzitetah. Pri celici **b** je prišlo do manjšega porasta jakosti odziva – število AP se je povečalo od 2 pri vzdražnem pragu do 8 pri 45 dB.

Latence smo izmerili le pri celici **a** (sl. 15, C). Latence odgovorov pri dražljajih frekvence 300 in 400 Hz so se enakomerno krajšale z naraščajočo intenziteto dražljajev, od 21-22 ms na dražljaj so upadle na do 7-10 ms pri 23 dB nad vzdražnim pragom, ter se pri najvišji merjeni intenziteti znova nekoliko podaljšale.



Slika 14: A. Zapis spontane aktivnosti celice **a** tipa MFR (morfologija na str. 32). **B.** Krivulji vzdražnega praga celic MFR. Prikazane so vrednosti za celici **a** in **b**. S sivimi znaki je pri celici **a** prikazano območje inhibicije. Beli znaki kažejo frekevenčno območje, znotraj katerega leži vzdražni prag verjetno pod prikazanimi (najnižjimi testiranimi) intenzitetami. **C, D.** Zapis odgovorov celice **a** (C) in celice **b** (D) na dražljaje različnih frekvenc in intenzitet. Dolžina dražljajev, shematično prikazanih pod odgovori, je 100 ms.



Slika 15: Izointenzitetne (A), intenzitetne (B) in latenčne (C) krivulje celic MFR (morfologija na str. 32). **A.** Jakost odziva pri različnih frekvencah ter intenziteti 100 cm/s². Pri celici **a** krivulja prikazuje povprečje treh, pri celici **b** pa povprečje dveh meritev. Posamezni znaki prikazujejo posamezne meritve. **B, C.** Krivulje so prikaz po ene meritve. *Referenčne intenzitete* (0 dB): celica **a**: pri 300 in 400 Hz – 5 cm/s²; celica **b**: pri 100 Hz – 0,5 cm/s².

3. 2 INTERNEVRONI

Pri različnih osebkih smo pobarvali 29 na vibracije podlage občutljivih internevronov. Na osnovi oblike, lege in funkcijskih lastnosti smo jih razvrstili v 9 skupin oz. tipov. Poimenovali smo jih z oznakami, ki opisujejo njihovo obliko in lego znotraj torakalnih ganglijev (glej str. 27).

25 celic ima somo v centralnem gangliju. Največ celic je v skupini CG-AC (19). To so celice s somo v centralnem gangliju in kontralateralno ležečim vzpenjajočim aksonom. Glede na razlike v strukturi in funkciji smo jih razdelili v pet tipov (CG-AC-1, 2, 3, 4 in 5). Pobarvali smo še 3 nevrone z dvema vzpenjajočima aksonoma, ki projicirata anteriorno v protorakalni ganglij (tip CG-AB) ter 3 lokalne nevrone, omejene na centralni ganglij (tip CG-L). Soma slednjih leži približno v medialni liniji centralnega ganglija.

Identificirali smo en nevron s somo v protorakalnem gangliju in kontralateralno ležečim spuščajočim aksonom (tip PTG-DC).

Pobarvali smo tudi 3 celice, za katere zaenkrat še ne poznamo lokacije some (celice V-1, V-2 in V-3).

3.2.1 Internevroni CG-AC

3.2.1.1 CG-AC-1

Oblika

Pobarvali smo 13 celic tipa CG-AC-1 (sl. 16-19); čeprav se v podrobnostih razvejitev med seboj nekoliko razlikujejo, je vsem skupna lega some med vstopoma živcev drugega in tretjega para nog v centralni ganglij oz. med nevropilama druge in tretje noge. Pri celicah z oznakama g in h je lega some nekoliko drugačna, vendar domnevamo, da so te razlike zgolj posledica delne sploščitve ganglija pri opazovanju pod imerzijo pri večjih povečavah. Dendritsko drevo s končiči gladkega videza leži v celoti v ipsilateralni polovici ganglija, in sicer v senzorični nevropili zadnje ipsilateralne noge, kar lahko sklepamo iz hkratnega obarvanja receptorske celice in internevrona (celici i in i'). Aksonske razvejitve z dobro vidnimi odebelitvami na terminalnih končičih so omejene na kontralateralno polovico centralnega in protorakalnega ganglija. Akson prečka medialno linijo ganglija in tvori razvejitev v nevropili zadnje kontralateralne noge. Pri celicah a, b in j' opazimo na tem mestu dve izraziti veji, ena je usmerjena lateralno in druga posteriorno. Pri ostalih celicah razvejitev pokriva območje ovalne oblike. Od tam se akson pod kotom 90° usmeri anteriorno proti protorakalnemu gangliju. Vzpenjajoči akson je omejen na medialno polovico kontralateralne polovice ganglija. Druga aksonska razvejitev je na nivoju nevropile druge kontralateralne noge. Pri nekaterih celicah (a, b, d, f, g, i, j') vidimo eno ali dve močnejši veji z grahastimi odebelitvami na terminalnih odrastkih, ki potekata lateralno proti nožnemu živcu. Pri ostalih celicah je razvejitev strnjena, brez izrazitih vej. Na medialni strani aksona ni močnejših izrastkov, opazimo zgolj posamezne odebelitve terminalnih končičev. Akson se vzpenja v



Slika 16: Morfologija celic **a** in **b** tipa CG-AC-1; risbi celic v centralnem gangliju ter fotografija celice **b**, napolnjene z barvilom Lucifer yellow. Orientacija celic je enotna zaradi lažje primerjave (\mathbf{a} – ventralni pogled, \mathbf{b} – dorzalni pogled).



Slika 17: Morfologija celic c, d, e, f, g in h tipa CG-AC-1; risbe celic v centralnem oz. centralnem in protorakalnem gangliju. Desno fotografije celic, napolnjenih z barvilom Lucifer yellow. Orientacija celic je enotna zaradi lažje primerjave (c, e, h – ventralni pogled; d, f, g – dorzalni pogled).

protorakalni ganglij in pri celicah \mathbf{e} , \mathbf{f} , \mathbf{g} , \mathbf{h} in \mathbf{k} vidimo, da tvori razvejitev tudi v nevropili prve kontralateralne noge. Pri omenjenih celicah (razen pri \mathbf{e} in \mathbf{g}) je bilo jasno vidno, da se akson iz protorakalnega ganglija vzpenja naprej v subezofagealni ganglij.

Pri preparatih z oznakami **i**, **j**, **k** sta se obarvali po dve celici. Pri **i** je šlo za hkratno obarvanje receptorske celice in internevrona, čeprav smo zabeležili le odzive internevrona. Pri preparatu **j** se je pobarval bilateralno simetrični par celic (domnevamo, da sta celici fiziološko enaki, ne moremo pa z gotovostjo trditi, iz katere od obeh smo odvajali impulze). Pri preparatu **k** sta se pobarvali morfološko zelo podobni celici, katerih aksona potekata tesno drug ob drugem.



Slika 18: Morfologija celic **i** in **j** tipa CG-AC-1. Risbe in fotografije celic, napolnjenih z barvilom Lucifer yellow, v centralnem gangliju. Vse dorzalni pogled.



Slika 19: Morfologija celice **k** tipa CG-AC-1; risba in fotografija celice, napolnjene z barvilom Lucifer yellow, v centralnem in protorakalnem gangliju. Dorzalni pogled.

Delovanje

Od enajstih celic so štiri spontano prožile AP. Za celico **i** je bila značilna zelo neenakomerna spontana aktivnost, frekvenca proženja AP je nihala med 13 in 27 Hz. Od vseh ostalih se je razlikovala po obliki krivulje vzdražnega praga; največjo občutljivost je kazala pri 100 in 150 Hz z vzdražnim pragom pri 5 cm/s², čeprav je bil pri višjih intenzitetah draženja odgovor močnejši pri najnižjih testnih frekvencah, tako kot pri vseh ostalih celicah iz te skupine. Spontano aktivne so bile tudi celice **h**, **j** in **k**, s frekvenco proženja AP med 8 in 18 Hz. Nekatere celice so se na dražljaje do 100 Hz pri visokih intenzitetah odzivale fazno vezano (sl. 20). Odzivi celic kažejo različno dinamiko proženja AP kot odziv na dražljaj in različne stopnje adaptacije (sl. 21, 22).



Slika 20: Zapis fazno vezanega odgovora celice **j** tipa CG-AC-1 (morf. na sl. 18) na dražljaj frekvence 100 Hz, intenzitete 200 cm/s² in dolžine 100 ms.



Slika 21: Zapis odgovorov celic **b** (A), **i** (B) in **j** (C) tipa CG-AC (morfologija na str. 37 in 39) na dražljaje naraščajočih frekvenc in intenzitet. Dražljaji so shematsko prikazani pod odzivi, njihova dolžina je 100 ms.



Slika 22: Zapis odgovorov celice f tipa CG-AC-1 (morfologija na str. 38) na dražljaje naraščajočih frekvenc in intenzitet. Dolžina dražljajev je 100 ms; shematsko so prikazani pod odzivi.

Vse celice v skupini CG-AC-1 so bile najbolj občutljive pri najnižji testni frekvenci, 50 Hz, razen celice i (največja občutljivost pri 100 in 150 Hz z vzdražnim pragom pri 5 cm/s² (oz. 8 x 10⁻⁵ m/s pri 100 Hz in 5,3 x 10⁻⁵ m/s)) (sl. 23), vendar pa so se precej razlikovale po legi vzdražnega praga, ki je segal od 1 cm/s² (3,2 x 10⁻⁵ m/s) pri celicah **c** in **j** do 100 cm/s² (1,6 x 10⁻³ m/s) pri celicah **d** in **h** (za ti dve celici krivulja ni prikazana). Večina celic je odgovarjala na dražljaje v območju med 50 in 200 Hz (celici **f** in **i** do 300 Hz).



Slika 23: Krivulje vzdražnega praga celic tipa CG-AC-1 (morfologija str. 37-40). Pri celicah \mathbf{c} in \mathbf{f} so bile vrednosti določene po dveh meritvah, pri ostalih celicah je bila opravljena po ena meritev.

Glede na izointenzitetne krivulje lahko razdelimo celice v dve skupini, in sicer tiste, pri katerih je bil največji odgovor 8 ali več AP na dražljaj in tiste, pri katerih največji odgovor ni presegel 5 AP na dražljaj (sl. 24). Pri vseh je bil pri maksimalni testni intenziteti 100 cm/s² največji odgovor pri 50 Hz in je strmo upadel na en akcijski potencial pri 200 oz. 300 Hz.



Slika 24: Izointenzitetne krivulje celic tipa CG-AC-1 (morfologija na str. 37-40) pri 100 cm/s². Krivulje predstavljajo eno meritev oz. povprečje dveh (b, c, i, j), treh (f) ali sedmih (g) meritev.

Intenzitetne krivulje prav tako razdelijo celice v dve skupini na podlagi jakosti odgovora (sl. 25), ki je bila pri vseh frekvenčno odvisna in je bolj ali manj enakomerno naraščala od vzdražnega praga do najvišje testne intenzitete. Razen pri celici **f** je jakost odgovora od vzdražnega praga do najvišje intenzitete vedno najbolj narasla pri 50 Hz.



Slika 25: Intenzitetne krivulje celic tipa CG-AC-1 (morfologija na str. 37-40). Krivulje predstavljajo eno meritev oz. povprečje dveh (a, f), treh (d, j, k) ali štirih (b-100 Hz) meritev.

Latence odgovora celic so se na nivoju vzdražnega praga gibale med 30 in 40 ms; z višanjem intenzitete dražljaja so se močno skrajševale in se ustalile pri 15 do 25 ms (sl. 26, levo). Pri nekaterih celicah so bile ob vzdražnem pragu latence daljše; znašale so tudi do 70 ms (sl. 26, desno), z naraščanjem intenzitete draženja pa so se skrajšale na okoli 20 (**b**) oz. 45 ms (**e**).



Slika 26: Latenčne krivulje celic tipa CG-AC-1 (morfologija na str. 37-40). Krivulje predstavljajo eno meritev oz. povprečje dveh (a, c, f, h) ali treh (b, k) meritev.

Referenčne intenzitete (0 dB) (sl. 25 in 26): celica **a**: pri 100 Hz – 20 cm/s²; celica **b**: pri 50 in 100 Hz – 5 cm/s²; celica **c**: pri 50 Hz – 50 cm/s², pri 100 Hz – 100 cm/s²; celica **d**: pri 100 Hz – 100 cm/s²; celica **e**: pri 50 Hz – 10 cm/s², pri 70 Hz – 20 cm/s²; celica **f**: pri 50 Hz – 5 cm/s², pri 100 Hz – 10 cm/s²; celica **g**: pri 50 in 70 Hz – 1 cm/s², pri 100 Hz – 5 cm/s²; celica **h**: pri 100 Hz – 100 cm/s²; celica **i**: pri 100 Hz – 5 cm/s²; celica **j**: pri 100 Hz – 5 cm/s²; celica **k**: pri 50 Hz – 70 cm/s², pri 100 Hz – 100 cm/s².

3.2.1.2 CG-AC-2

Oblika

Pobarvali smo tri celice tega tipa. Celici **a** in **b** imata skoraj identično obliko, medtem ko se celica **c** nekoliko razlikuje (sl. 27 in 28). Glede lege some in vzpenjajočega aksona so celice podobne tipu CG-AC-1, vendar pa jih krivulja vzdražnega praga od omenjene skupine ločuje in hkrati povezuje v poseben tip. Njihova soma leži med nevropilama druge in tretje noge, v lateralni četrtini ipsilateralne polovice ganglija. Primarni izrastek some, dolg približno eno tretjino širine ganglija teče medialno proti sredini ganglija. V centralnem delu ganglija iz glavne veje izraščajo kratke kolaterale posteriorno-lateralno v smeri nevropil tretjega para nog in anteriorno. Vsi končiči v centralnem gangliju so gladkega videza. Znotraj medialne tretjine kontralateralne polovice ganglija se akson usmeri anteriorno. Na nivoju drugega para nog izraščajo kratke kolaterale proti nevropili kontralateralne (**a**, **b**) in ipsilateralne noge (**c**). Akson zapušča centralni ganglij v medialni polovici kontralateralne polovice konektiva s protorakalnim ganglijem.

Delovanje

Vse celice so spontano prožile AP v neenakomernem ritmu s frekvenco med 15 in 35 Hz (**a** 19,6 \pm 3,4 Hz; **b** 22,5 \pm 2,5 Hz; **c** 29,8 \pm 3,8 Hz). Celica **a** je na dražljaje odgovarjala z ekscitacijo (sl. 29), medtem ko so bili odgovori pri celicah **b** in **c** rezultat seštevanja različno intenzitetno odvisnih ekscitatornih ter inhibitornih vhodov (sl. 30).



Slika 27: Morfologija celice **a** tipa CG-AC-2. Risba in fotografija celice, napolnjene z barvilom Lucifer yellow v centralnem gangliju. Dorzalni pogled.



Slika 28: Morfologija celic **b** in **c** tipa CG-AC-2. Risbe in fotografije celic, napolnjenih z barvilom Lucifer yellow, v centralnem gangliju. Oboje dorzalni pogled.

Slika 29: Zapis odgovorov celice **a** tipa CG-AC-2 (morf. na sl. 27) na dražljaj frekvence 100 Hz, dolžine 100 ms in naraščajočih intenzitet. Dražljaj je shematsko prikazan pod odgovori.





Slika 30: A. Zapis odgovorov celice b in B. Zapis odgovorov celice c tipa CG-AC-2 (morf. na sl. 28) na dražljaje naraščajočih frekvenc in intenzitet. Dražljaji so shematsko prikazani pod odgovori celic; njihova dolžina je 100 ms.

Celici **a** in **c** sta imeli vrh občutljivosti pri 100-150 Hz z vzdražnim pragom pod 0,5 cm/s² (8 x 10⁻⁶ m/s pri 100 Hz; 5,3 x 10⁻⁶ m/s pri 150 Hz), celica **b** pa je bila najbolj občutljiva na dražljaje frekvenc 200-300 Hz, vzdražni prag pa je tudi pri tej celici verjetno nižji od najnižje testirane intenzitete (4 x 10⁻⁶ m/s pri 200 Hz; 2,6 x 10⁻⁶ m/s pri 300 Hz) (sl. 31, A in B). Kot inhibicijo spontane aktivnosti smo pri celici **b** ovrednotili le odziv na najnižje intenzitete pri frekvenci 50 Hz, saj je pri višjih intenzitetah dražljaja prevladal ekscitatorni vhod, čeprav je vpliv inhibicije v začetnem delu odgovora opazen tudi pri višjih intenzitetah. Ravno nasprotno pa pri celici **c** pride do prevlade inhibicije pri višjih intenzitetah najnižje testirane frekvence (50 Hz).



Slika 31: Krivulje vzdražnega praga (A, B) in enakega pospeška (C) celic **a**, **b** in **c** tipa CG-AC-2 (morf. celic na sl. 27 in 28). **A**, **B**. - Krivulje (in oznake) vzdražnega praga so rezultat ene (**a**), dveh (**b**) oz. treh (**c**) meritev. Beli znaki kažejo frekvenčno območje, v katerem leži vzdražni prag verjetno pod prikazanimi (najnižjimi testiranimi) intenzitetami. **C**. Izointenzitetna krivulja za pospešek 100 cm/s² prikazuje vrednosti ene (**a**) oz povprečje dveh meritev (**b**), posamezni znaki prikazujejo posamezne meritve.

Spreminjanje odgovora s frekvenco pri najvišji testni intenziteti dražljaja (100 cm/s²) smo kvantitativno ovrednotili le za celici **a** in **b** (sl. 31, C). Pri prvi se je velikost odgovora gibala med 10 in 18, pri drugi pa med 2 in 10 AP na dražljaj. Maksimalen odgovor smo pri obeh celicah zabeležili v frekvenčnem območju največje občutljivosti.

Zaradi odsotnosti inhibitornih vhodov intenzitetna krivulja celice **a** enakomerno narašča pri različnih testnih frekvencah od 2-5 AP na dražljaj pri vzdražnem pragu do 18 AP pri najvišjih intenzitetah (sl. 32, A). Pri celicah **b** in **c** opazimo pri nekaterih frekvencah vpliv inhibicije: jakost odziva je od vzdražnega praga z višanjem intenzitete dražljaja najprej naraščala, nato pa je na določenem intenzitetnem nivoju začela upadati (sl. 32, A in B). Pri celici **c** pri 400 Hz dražljaju tega pojava več ne opazimo; celica je verjetno prejemala inhibitorni input le v območju nizkih frekvenc.

Latence odgovora celice **a** na dražljaje so bile frekvenčno odvisne; najkrajše so bile pri 50 Hz (18-23 ms) (sl. 32, C). Medtem ko so latence odgovorov pri celicah **a** in **c** z višanjem intenzitete draženja bolj ali manj enakomerno upadale od 23-41 ms na 15-23 ms, pa so se pri celici **b** v vsem intenzitetnem razponu gibale med 30 in 35 ms.



3.2.1.3 CG-AC-3 inCG-AC-4

Oblika

Celici tipa CG-AC-3 in CG-AC-4 imata podobno lego some in razvejitev v centralnem gangliju (sl. 33), zato ju obravnavamo skupaj, vendar pa zaradi razlik v podrobnostih zgradbe in v samem delovanju sklepamo, da gre za dva različna internevrona. Soma pri obeh leži v centralnem gangliju, v območju nevropile tretjega para nog, približno v sredini med medialno linijo ganglija in njegovim robom. Primarni odrastek je pri prvi celici nekoliko daljši; pri obeh pa je usmerjen antero-lateralno in se, ko doseže sredino, usmeri anteriorno. Za obe celici je značilna medialna lega vzpenjajočega aksona v centralnem gangliju. V območju med navideznima linijama, ki povezujeta nožne živce drugega in tretjega para nog, iz aksona izraščajo lateralno kolaterale proti nevropilam srednjih in zadnjih nog. Pri celici



Slika 33: Morfologija celic CG-AC-3 in CG-AC-4. Risbi in fotografiji celic, napolnjenih z barvilom Lucifer yellow. Vse dorzalni pogled.

CG-AC-3 se na nivoju tretjega nožnega živca od aksona lateralno v kontralateralno polovico ganglija odcepi veja, ki tvori razvejitev v nevropili nožnega živca. Antero-lateralno se od aksona odcepi veja, ki se v kontralateralni strani ganglija v loku vzpne do nivoja drugega nožnega živca in tam tvori razvejitev. Od nje se takoj za odcepom od aksona oddeli veja, ki preči medialno linijo in se na ipsilateralni strani razcepi na krajšo razvejitev v smeri nožnega živca tretje noge in na daljšo vejo, ki tvori razvejitev na ravni nožnega živca druge noge na ipsilateralni strani. Pri celici CG-AC-4 se kolaterale na kontralateralni strani odcepijo na treh mestih; sicer pa je lega razvejitev podobna kot pri prej opisani celici. Pri drugi celici smo pobarvali tudi del v protorakalnem gangliju – iz aksona na kontralateralni strani izraščajo kolaterale v območju nevropile sprednje noge. Na vseh razvejitvah so opazne terminalne in *en passant* odebelitve (glej fotografijo celice CG-AC-3).

Delovanje

Celica CG-AC-3 ni bila spontano aktivna in se je na dražljaje odzivala z ekscitacijo (sl. 34, A). Celica CG-AC-4 je spontano prožila akcijske potenciale s frekvenco 27 ± 4 Hz, med draženjem pa je prišlo do inhibicije spontane aktivnosti ali pa so se v odzivu sešteli inhibitorni in ekscitatorni vhodi (v večini primerov je bila celična aktivnost inhibirana le v prvem delu dražljaja, medtem ko je v drugem delu odgovora prevladal ekscitacijski vhod) (sl. 34, C). Celica CG-AC-3 je odgovarjala v območju med 50 in 2000 Hz, celica CG-AC-4 pa med 50 in 1000 Hz (sl. 34, B). Obe celici sta bili najbolj občutljivi v območju med 50 in 200 (300) Hz, z vzdražnim pragom pri 0,5 cm/s² (1,6 x 10⁻⁵ m/s pri 50 Hz; 4 x 10⁻⁶ m/s pri 200 Hz; 2,6 x 10⁻⁶ m/s).

Krivulja enakega pospeška pri 100 cm/s² ima pri celici CG-AC-3 dva vrhova; pri 100 Hz in 400 Hz (sl. 35). V celotnem intervalu testnih frekvenc se je jakost odziva povečala od enega na v povprečju 7 AP na dražljaj. Celica CG-AC-4 ima le en vrh, in sicer med 400 in 700 Hz; v tem območju je bila jakost odziva 8 AP na dražljaj (sl. 35).

Pri celici CG-AC-3 se je jakost odgovora z intenziteto draženja pri frekvencah 50 in 70 Hz višala do 30 dB nad vzdražnim pragom (na 5 oz. 7 AP), nato pa spet upadala do najvišje testirane intenzitete dražljaja (sl. 35, B). Podobno zvonasto obliko ima krivulja pri 100 Hz, le da je maksimum odziva pomaknjen do 40 dB. Pri 400 Hz dražljajih je jakost odziva narasla od enega do šest AP v območju do 20 dB nad vzdražnim pragom. Pri celici CG-AC-3 se je tako s frekvenco spreminjala predvsem lega krivulje, medtem ko je nagib ostajal isti. Pri celici CG-AC-4 ste se spreminjala lega in nagib; jakost odziva je najbolj strmo naraščala pri najvišji merjeni frekvenci – 500 Hz, kjer je narasla v območju do 25 dB nad vzdražnim pragom od 3 do 8 AP, medtem ko se pri najnižji frekvenci – 500 Hz – jakost odziva v glavnem ni spreminjala z naraščanjem intenzitete dražljaja.

Pri celici CG-AC-3 so bile latence odgovorov med 30 in 35 ms na 50 in 100 Hz dražljaje pri vzdražnem pragu in so hiperbolično upadale do 16-18 ms pri 46 dB nad nad njim (sl. 35, C). Pri celici CG-AC-4 so bile latence bolj odvisne od frekvence dražljaja; najkrajše so bile pri 700 Hz (od 28 ms pri vzdražnem pragu so se skrajšale do 21 ms pri 18 dB). Pri dražljajih frekvence 50 (100) Hz so latence strmo upadle od 43 (38) ms do 25 (27) ms v območju do 20 dB nad vzdražnim pragom. Pri frekvenci 50 Hz so se nato spet podaljševale do 40 dB, pri 100 Hz pa so še naprej upadale do 22 ms pri intenziteti 46 dB nad vzdražnim pragom.



Slika 34: A. Zapis odgovora celice CG-AC-3 na dražljaje frekvenc 100 in 500 Hz ter naraščajočih intenzitet. B. Krivulji vzdražnega praga celic CG-AC-3 in CG-AC-4 (morfologija na str. 50; ena meritev za vsako celico). Beli znaki kažejo frekvenčno območje, v katerem leži vzdražni prag verjetno pod prikazanimi (najnižjimi testnimi) vrednostmi. C. Zapis odgovorov celice CG-AC-4 na dražljaje različnih frekvenc in intenzitet. A, C. Dražljaji so shematično prikazani pod odgovori.



3.2.1.4 CG-AC-5

Oblika

Morfološko smo identificirali eno celico tega tipa (sl. 36). Soma leži v posteriornem delu nevropile zadnje noge; vzpenjajoči akson je omejen na kontraletralno polovico ganglija. Primarni izrastek some poteka anteromedialno in se priključi na vejo, ki preči medialno linijo ganglija. Na nivoju, kjer se primarni odrastek iz some priključi na osrednjo močnejšo vejo, se na kontralateralni strani odcepi akson, ki poteka najprej lateralno, nato pa se usmeri anteriorno in se vzpenja v protorakalni ganglij; omejen je na medialno tretjino kontralateralne polovice ganglija. Osrednja veja, ki preči medialno linijo ganglija, se na mestih, kjer se priključi primarni odrastek some oz. odcepi akson, obrne na obeh straneh anteriorno ter tvori zrcalno podobne razvejitve v obeh polovicah ganglija. Prvi lateralni razvejitvi sta daljši, segata v nevropili zadnjega para nog, razvejitvi na nivoju vstopov živcev drugega para nog sta manjši, ovalne oblike in krajši, omejeni na medialno tretjino ganglija. Vsi končiči so gladkega videza.



Slika 36: Morfologija celice CG-AC-5. Levo risba celice v centralnem gangliju, desno fotografija celice, napolnjene z barvilom Lucifer yellow. Oboje dorzalni pogled.

Delovanje

Celica CG-AC-5 je odgovarjala na dražljaje v frekvenčnem območju od 50 do 1000 Hz, z največjo občutljivostjo med 70 in 200 Hz, kjer je imela vzdražni prag pri pospešku 1 cm/s² (2,3 x 10⁻⁵ m/s pri 70 Hz do 8 x 10⁻⁶ pri 200 Hz) (sl. 37, A). Dinamika proženja AP kot odziv na dražljaj in adaptacija celic (str. 106) med draženjem sta bili frekvenčno in intenzitetno odvisni (sl. 37, B). Pri nizkih frekvencah je bilo opaziti vplive inhibitornih vhodov. Čeprav smo vpliv inhibicije opazili tudi pri višjih intenzitetah 100 Hz dražljajev (jakost odgovora je upadala z višanjem intenzitete dražljaja), smo kot inhibicijski odgovor ovrednotili zgolj odzive pri višje intenzitetah 50 Hz dražljajev, kjer smo dejansko med samim draženjem opazili upad v številu akcijskih potencialov glede na spontano aktivnost celice. Celica je zelo neenakomerno in sporadično spontano prožila akcijske potenciale s frekvenco 26,3 \pm 7,2 Hz.



Slika 37: A. Krivulja in oznaka vzdražnega praga celice CG-AC-5 (ena meritev). **B.** Zapis odgovora celice CG-AC-5 na dražljaje naraščajočih frekvenc in intenzitet. Dolžina dražljajev je 100 ms; shematsko so prikazani pod odzivi celic.



Vrh jakosti odgovora pri pospešku 100 cm/s² je glede na vrh občutljivosti celice zamaknjen nekoliko v desno (sl. 38, A). Jakost odgovora celice je strmo naraščala od 3-4 AP pri 70 Hz in dosegla maksimalno vrednost pri 300 Hz (8-9 AP), nato pa je hitro upadla na 1-2 AP pri frekvenci 1000 Hz.

Z višanjem intenzitete dražljaja je jakost odgovora celice naraščala v območju od 0 do 25 dB nad vzdražnim pragom, in sicer do 9-11 AP na dražljaj (sl. 38, B), nato se je med 25 in 35 dB znižala ter se ustalila pri 8-9 AP na dražljaj pri najvišji testni intenziteti. Pri dražljajih frekvence 100 Hz se je jakost odgovora pri najvišjih intenzitetah znižala na 5 AP na dražljaj.

Kvantitativno smo ovrednotili latence odgovorov za dražljaje treh različnih frekvenc (100, 150 in 200 Hz); večinoma so bile neodvisne od frekvence dražljaja (sl. 38, C). Pri 0 dB so latence znašale 30 do 35 ms, do intenzitete 25 dB nad vzdražnim pragom pa so se skrajšale na približno 20 ms ter se v oklici te vrednosti tudi ustalile in se z nadaljnjim višanjem intenzitete dražljajev niso več krajšale.



3.2.2 CG-AB

Celico tipa CG-AB smo pobarvali pri treh živalih (sl. 39). Soma celice leži dorzalno, v sredini anteriorne polovice centralnega ganglija; na liniji, ki povezuje nožna živca drugega para nog. Del celice v centralnem gangliju je zvezdaste oblike, z razvejitvami, ki projicirajo v nevropile drugega in tretjega para nog. Primarni izrastek some poteka posteriorno, je kratek in se razveji v lateralno in posteriorno usmerjene veje. Dve lateralni veji se razvejita v nevropilah drugega para nog, drugi dve prečita vsaka eno tretjino širine ganglija levo in desno ter se razcepita na dve veji. Ena potuje anteriorno v protorakalni ganglij – vzpenjajoči akson, druga pa posteriorno. Ta spuščajoča veja se v ravnini nožnega živca zadnje noge usmeri proti nevropili ter se tam razveji. Veji, ki izraščata posteriorno iz primarnega izrastka some, se v loku spuščata proti sredini ganglija ter tvorita ovalni razvejitvi, ki se lateralno navezujeta na zgoraj omenjene razvejitve v nevropilah zadnjega para nog. Pri celici a je levi vzpenjajoči akson obarvan le delno, medtem ko se desni razveji v nevropili prvega para nog. Pri celicah b in c sta se obarvali obe razvejitvi v nevropilah prvega para nog. Nikjer ni bilo videti, da bi aksoni projicirali anteriorno iz protorakalnega ganglija, zato sklepamo, da so celice omejene na torakalne ganglije. Pri vseh terminalnih odrastkih so so jasno vidne grahaste odebelitve (sl. 39, fotografija).



Slika 39: Morfologija celic tipa CG-AB. Risbe celic v centralnem in protorakalnem gangliju ter fotografija celice **c**, napolnjene z barvilom Lucifer yellow. Vse dorzalni pogled.

Delovanje

Celici **a** in **b** sta spontano prožili akcijske potenciale s frekvenco 38 ± 7 Hz (a) in 19 ± 6 Hz (b); med draženjem so se v odzivih seštevali ekscitatorni in inhibitorni vhodi (sl. 40; A, C). Pri obeh smo v določenem frekvenčnem in intenzitetnem območju lahko v prvi polovici odziva opazili inhibicijo, ki se je pri celici **a** pojavljala pri 100 in 150 Hz pri intenzitetah nad 5 cm/s² in pri 200 Hz nad 20 cm/s². Pri celici **b** se je pojavljala pri 50 in 70 Hz pri intenziteti nad 20 cm/s², pri 150 Hz nad 10 cm/s² in pri 100 Hz nad 5 cm/s². Celica **c** se je odzivala z ekscitacijo; AP je prožila le med draženjem (sl. 40, B). Krivulji vzdražnega praga celic **a** in **b** sta med seboj zelo podobni, obe sta odgovarjali na dražljaje v frekvenčnem območju med 50 in 700 Hz in sta bili najbolj občutljivi na dražljaje frekvence 100 Hz (sl. 40, D). Celica **c** je odgovarjala na dražljaje v širšem frekvenčnem območju – med 50 in 2000 Hz (sl. 40, E) z največjo občutljivosti verjetno nižji od 0,5 cm/s² (od 8 x 10⁻⁶ m/s pri 100 Hz do 2 x 10⁻⁶ m/s pri 400 Hz).

Vrh občutljivosti pri najvišji testirani intenziteti dražljaja (100 cm/s²) je jasno razviden iz krivulj enakega pospeška, ki so za vse celice izrazito zvonaste (sl. 41, A). Pri celicah **a** in **b** se vrh občutljivosti nahaja med 100 in 200 Hz, pri celici **c** je vrh občutljivosti pomaknjen v območje višjih frekvenc (500-1000 Hz).

Jakost odgovora z višanjem intenzitete dražljaja pri frekvenci 100 Hz je pri celici **a** enakomerno naraščala – od enega AP pri vzdražnem pragu do enajstih pri 45 dB nad vzdražnim pragom (sl. 41, B). Oblika intenzitetne krivulje celice **b** je zvonasta; jakost odziva je od vzdražnega praga narasla od 6 do 11 AP, dosegla maksimum pri 25 dB nad vzdražnim pragom, nato pa začela upadati in padla na 3 AP pri 60 dB nad vzdražnim pragom pri frekvenci 100 Hz. Pri celici **c** smo ugotavljali spreminanje jakosti odziva z intenziteto pri frekvenci 300 Hz. Jakost odziva je enakomerno naraščala od 0 do 25 dB, od tam pa je krivulja rahlo upadala do najvišje testirane intenzitete.

Zaradi različnih vplivov inhibicije, vidnih pri odzivih celic \mathbf{a} in \mathbf{b} , smo latence lahko natančneje izmerili le za celico \mathbf{c} (sl. 41, C). Latenca odgovora je enakomerno upadala z višanjem intenzitete dražljaja. Od 30 ms pri vzdražnem pragu se je skrajšala na okoli 20 ms pri višjih intenzitetah. Ocenjene latence odgovorov celic \mathbf{a} in \mathbf{b} pri najvišjih intenzitetah se prav tako gibljejo okoli 20 ms.



Slika 40: A, B. Odgovora celice a (A) in celice c (B) tipa CG-AB na posamezen dražljaj (morfologija celic na str. 58). Dražljaja trajanja 100 ms in intenzitete 10 in 1 cm/s² sta prikazana pod odzivoma. C. Prikaz odgovorov celice b na dražljaje različnih frekvenc in naraščajočih intenzitet. Dražljaji so shematično prikazani pod odzivi.
D, E. Krivulje vzdražnih pragov celic CG-AB. Beli znaki kažejo frekvenčno območje, v katerem leži vzdražni prag verjetno pod prikazanimi (najnižjimi testnimi) intenzitetami.



Slika 41: Izointenzitetne (A), intenzitetne (B) in latenčne (C) krivulje celic CG-AB (morfologija celic na sl. 39). A. Jakost odziva pri različnih frekvencah ter intenziteti 100 cm/s². Krivulja celice **a** prikazuje povprečje dveh meritev, krivulji celic **b** in **c** pa povprečji štirih meritev. Posamezni znaki prikazujejo posamezne meritve. **B**. Pri celici **a** je prikazana ena meritev, pri celici **b** je krivulja povprečje treh, pri celici **c** pa dveh meritev. Posamezni znaki ponazarjajo posamezne meritve. **C**. Vse krivulje predstavljajo povprečje dveh meritev; posamezni znaki pomenijo posamezne meritve. *Referenčne intenzitete* (0 dB): celice **a**, **b** in **c**: pri 100 Hz – 0,5 cm/s²; celica **c**: pri 300 Hz – 0,5 cm/s² in pri 700 Hz – 10 cm/s².
3.2.3 Lokalni internevroni CG-L

Oblika

Pobarvali smo tri internevrone, ki so omejeni na centralni ganglij (sl. 42) in katerih some ležijo približno v medialni liniji ganglija. Razvejitve v vhodnem, dendritskem delu celice, iz katere izrašča primarni odrastek some, so gladke, medtem ko so v drugem delu celice jasno vidne *en passant* in terminalne odebelitve.

Celica **CG-L-1**: Soma leži v medialni liniji ganglija, na sredini med navideznimi linijami, ki povezujejo nožne živce drugega in tretjega para nog. Latero-anteriorno iz some izrašča primarni odrastek, ki se razveji v dve veji. Gladki, dendritski del celice tvori ovalno strnjeno (iz dorzalnega pogleda) razvejitev v področju nevropile drugega para nog. Dve veji iz dendritskega dela celice prečita medialno linijo ganglija in prehajata v aksonski del. Ta je omejen na medialno polovico nasprotne polovice ganglija in se razteza do območja nevropile tretjega para nog.

Celica **CG-L-2**: Soma leži medialno, v liniji živcev drugega para nog. Kratek primarni izrastek v latero-posteriorni smeri se kmalu priključi glavni dendritski veji. Dendritski in aksonski del sta približno enako velika, vsak na svoji strani ganglija omejena na medialno polovico, raztezata se od linije med živcema drugega do linije med živcema tretjega para nog.

Celica **CG-L-3**: Soma ima podobno lego kot pri celici CG-L-2 in tudi dendritska ter aksonska razvejitev potekata podobno; vendar pa anteriorno dosežeta konektiv s protorakalnim ganglijem, posteriorno pa projicirata v abdominalni del ganglija.

Delovanje

Celica CG-L-1 ni bila spontano aktivna; na dražljaje se je odzivala z ekscitacijo, opazna je bila hitra adaptacija celice (str. 106) na draženje (sl. 43, A). Največjo občutljivost je celica pokazala pri 50-100 Hz, z vzdražnim pragom pri 20 cm/s² (od 6,4 x 10⁻⁴ m/s pri 50 Hz do 3,2 x 10⁻⁴ m/s) (sl. 43, B). Za celici CG-L-2 in CG-L-3 je bila značilna neprekinjena spontana aktivnost. Frekvenca proženja AP je nihala med 30 in 40 Hz. Ob draženju je v frekvenčnem območju med 50 in 200 Hz prišlo do inhibicije spontane aktivnosti (sl. 43, C). Vrh občutljivosti obeh celic je bil pri 50 Hz z vzdražnim pragom pri 20 cm/s² (6,4 x 10⁻⁴ m/s) (sl. 43, D). Z višanjem intenzitete draženja se je podaljševalo trajanje inhibicije; kvantitativno jakosti odziva nismo ovrednotili.

Odvisnost jakosti odziva od frekvence in intenzitete smo izmerili le za celico CG-L-1. Krivulja enakega pospeška (sl. 44, A) je pokazala pri intenziteti 100 cm/s² največji odziv pri 50 Hz, in sicer 7-8 AP na dražljaj. Jakost odziva je enakomerno upadala do enega AP pri 200 Hz.

Tako pri 50 kot pri 200 Hz je jakost odziva enakomerno naraščala z višanjem intenzitete dražljaja (sl. 44, B). Pri 50 Hz se je odziv od vzdražnega praga do 14 dB nad njim v povprečju povečal za 6 AP, pri 100 Hz pa za 5. Med 14 in 30 dB nad vzdražnim pragom se je odziv na dražljaj frekvence 100 Hz povečal še za 6 AP.

Latence ekscitacijskih odzivov na dražljaje frekvence 50 (100) Hz so ob vzdražnem pragu znašale v povprečju 35 (40) ms (sl. 44, C). V testiranem intenzitetnem območju so se skrajšale v povprečju na 14-15 ms za obe frekvenci. Velike razlike v latenci odgovora pri vzdražnem pragu so verjetno posledica tega, da je ob tako nizkih intenzitetah celica prožila kvečjemu en AP, ki pa se je pojavil z različnimi zakasnitvami zaradi intrinzične variabilnosti v odzivu celice na isti dražljaj. Ocenjene latence inhibicije celic CG-L-2 in 3 znašajo 25-30 ms.









Slika 42: Morfologija treh lokalnih vibracijskih internevronov v centralnem gangliju: CG-L-1, CG-L-2 in CG-L-3. Levo risbe, desno fotografije nevronov CG-L-1 (na dveh ravneh) in CG-L-2, napolnjenih z znotrajceličnim barvilom Lucifer yellow. Vse dorzalni pogled.



Slika 43: Zapisi odgovorov in krivulje vzdražnih pragov celic CG-L (morfologija na sl. 42). A. Zapisi odgovorov celice CG-L-1 na dražljaje frekvence 50 Hz in naraščajočih intenzitet. Dražljaj je shematično prikazan pod odgovori. B. Krivulja vzdražnega praga celice CG-L-1. Krivulja je rezultat treh meritev. Posamezni znaki prikazujejo posamezne meritve. C. Zapisi odgovorov celice CG-L-2 na dražljaje frekvenc 50 in 100 Hz ter naraščajočih intenzitet. Dražljaji so shematično prikazani pod odgovori. D. Krivulji vzdražnih pragov celic CG-L-2 in CG-L-3. Obe krivulji prikazujeta vrednosti ene meritve.



Slika 44: Izointenzitetne (A), intenzitetne (B) in latenčne krivulje (C) celice CG-L-1 (morfologija na sl. 42). **A.** Krivulja odvisnosti jakosti odgovora od intenzitete dražljaja pri 100 cm/s² prikazuje povprečje treh meritev. **B, C.** Krivulji prikazujeta povprečje treh (50 Hz) oz. petih meritev (100 Hz). **A, B, C.** Posamezni znaki pomenijo posamezne meritve. *Referenčne intenzitete* (0 dB): pri obeh prikazanih frekvencah – 20 cm/s².

3.2.4 PTG-DC

Oblika

Obliko tipa PTG-DC smo določili pri eni celici (sl. 45). Soma celice leži v protorakalnem gangliju, v območju anteriorne nevropile prvih nog. Primarni odrastek some poteka posteriorno lateralno in nad konektivom s centralnim ganglijem preči medialno linijo protorakalnega ganglija. Tam se razcepi v kratek in močno razvejan medialni odrastek ter v daljšo vejo, ki se razveji v nevropili kontralateralne prednje noge. Z istega mesta projicira posteriorno v centralni ganglijakson, ki je omejen na medialno tretjino kontraleteralne polovice ganglija. V navideznih linijah med živcema drugega in tretjega para nog proti medialni liniji ganglija izraščata kratki veji s kroglastima (iz dorzalnega pogleda) terminalnima razvejitvama z dobro vidnimi odebelitvami, medtem ko so dendritske razvejitve v protorakalnem gangliju gladkega videza.



Slika 45: Morfologija celice PTG-DC; levo risba celotne celice v protorakalnem in centralnem gangliju, desno fotografija dela celice v centralnem gangliju, pobarvane z barvilom Lucifer yellow. Dorzalni pogled.

Delovanje

Celica PTG-DC je občasno spontano prožila akcijske potenciale s frekvenco do 12 Hz. Na dražljaje je odgovarjala z ekscitacijo; adaptacija celice na dražljaj (str. 106) je bila komaj opazna (sl 46, A). Odzivala se je v relativno ozkem frekvenčem intervalu, med 50 in 150 Hz, z največjo občutljivostjo pri 50 Hz, kjer je bil vzdražni prag med 10 in 20 cm/s² (3,2 x 10^{-4} do 6,4 x 10^{-4} m/s) (sl. 46, B).

Krivulja enakega pospeška pri 100 cm/s² kaže vrh odziva (v povprečju 10 AP) pri 50 Hz (sl. 47, A). Z višanjem frekvence je jakost odziva strmo upadala do 2 AP pri 150 Hz. Spreminjanje jakosti odziva z naraščanjem intenzitete dražljajev smo vrednotili pri 50 in 100 Hz (sl. 47, B). Pri obeh frekvencah je odziv enakomerno naraščal; od 1-3 AP pri vzdražnem pragu do 10 AP pri najvišji testirani intenziteti dražljaja 50 Hz (20 dB) in do 17 AP pri najvišji testirani intenziteti za dražljaje frekvence 100 Hz (30 dB).

Latence odgovora so bile pri 50 in 100 Hz dražljajih podobne (sl. 47, C). Od vzdražnega praga so hiperbolično upadale od 26-33 ms do 13-17 ms pri najvišji testirani intenziteti za posamezno frekvenco.



Slika 46: A. Zapis odgovora celice PTG-DC na dražljaj frekvence 50 Hz in naraščajočih intenzitet. Dražljaj je shematsko prikazan pod odgovori celice. **B.** Krivulja vzdražnega praga celice PTG-DC je rezultat dveh meritev.



Slika 47: Izointenzitetne (A), intenzitetne (B) in latenčne (C) krivulje celice PTG-DC. **A.** Spreminjanje jakosti odgovora celice s frekvenco pri pospešku 100 cm/s². Krivulja prikazuje povprečje dveh meritev. **B, C.** Krivulji prikazujeta povprečje dveh (50 Hz) oz. štirih (100 Hz) meritev. **A, B, C.** Posamezni znaki ponazarjajo posamezne meritve. *Referenčne intenzitete* (0 dB): pri 50 Hz – 10 cm/s²; pri 100 Hz – 20 cm/s².

3.2.5 Neidentificirani internevroni

3.2.5.1 V-1

Oblika

Delno smo obarvali eno celico tega tipa (sl. 48). Spuščajoči akson je omejen na eno lateralno polovico centralnega ganglija. Lateralno in lateralno-posteriorno izraščajoče aksonalne kolaterale tvorijo dve večji skupini v območju nevropil drugega in tretjega nožnega živca. Na končičih kolateral so dobro vidne terminalne in *en passant* zadebelitve.



Slika 48: Morfologija celice V-1. Risba in fotografija celice, napolnjene z barvilom Lucifer yellow. Dorzalni pogled.

Delovanje

Celica V-1 ni spontano prožila AP, odzivala se je z ekscitacijo, brez adaptacije (str. 106) v okviru trajanja dražljaja (sl. 49, A), in v relativno ozkem frekvenčnem območju med 50 in 150 Hz. Vrh občutljivosti je imela pri 50 Hz, kjer je bil vzdražni prag pri 10 cm/s² (3,2 x 10⁴ m/s) (sl. 49, B). Izointenzitetna krivulja pri pospešku 100 cm/s² kaže obrnjeno sliko – jakost odgovora je največja pri 50 Hz (v povprečju 13 AP) in strmo upade na en sam AP na 150 Hz dražljaj (sl. 50, A). Spreminjanje jakosti odgovora z intenziteto dražljaja smo merili pri 50 Hz dražljajih (sl. 50, B). Pri vzdražnem pragu ta znaša v povprečju 3 AP in do največje testne intenzitete, 20 dB, parabolično naraste do 14 AP. Latence odgovorov pri 50 in 70 Hz dražljajih so bile ob vzdražnem pragu med 60 in 66 ms, pri 100 Hz dražljajih pa med 38 in 48 ms (sl. 50, C). Pri 50 in 70 Hz dražljajih so do 20 dB nad vzdražnim pragom upadle na 25-30 ms. Pri 100 Hz je bila najvišja testna intenziteta 14 dB nad vzdražnim pragom; tam smo izmerili latenco odgovora 30 ms.



Slika 49: A. Zapis odgovora celice V-1 na dražljaje naraščajočih intenzitet. Dražljaj je shematično prikazan pod odgovori. **B.** Krivulja vzdražnega praga je rezultat dveh meritev.





Slika 50: Izointenzitetne (A), intenzitetne (B) in latenčne (C) krivulje celice V-1.

A, B. Krivulji predstavljata povprečji dveh meritev. Izointenzitetna krivulja kaže spreminjanje jakosti odgovora s frekvenco pri pospešku 100 cm/s². C. Krivulje prikazujejo povprečje dveh meritev za vsako frekvenco. A, B, C. Posamezni znaki pomenijo posamezne meritve. *Referenčne intenzitete* (0 dB): pri 50 in 70 Hz – 10 cm/s²; pri 100 Hz – 20 cm/s².

3.2.5.2 V-2

Oblika

Delno smo obarvali eno celico tega tipa, in sicer njen spuščajoči akson v centralnem gangliju (sl. 51). Lege some zaenkrat še nismo določili. Akson se iz protorakalnega ganglija spušča po medialni liniji centralnega ganglija v abdominalni del centralnega ganglija in sega do približno 6/7 njegove dolžine. Iz aksona po vsej dolžini in v obe smeri izraščajo kratke kolaterale. Na nivoju živcev drugega para nog izrašča nekaj daljših kolateral, ki pa ne presežejo meja medialne tretjine ganglija. Nekoliko bolj posteriorno izraščata daljši kolaterali, ki segata v nevropili tretjega para nog. Na vseh odrastkih so jasno vidne terminalne in *en passant* odebelitve.



Slika 51: Morfologija celice tipa V-2. Risba celice v centralnem gangliju in fotografija (montaža dveh posnetkov) posteriornega dela celice, naplonjene z barvilom Lucifer yellow. Oboje dorzalni pogled.

Delovanje

Za celico tipa V-2 je bilo značilno enakomerno spontano proženje akcijskih potencialov s frekvenco 10 ± 2 Hz. Na dražljaje se je odzivala z ekscitacijo, brez vidne adaptacije (sl. 52, A). Vzdražni prag je bil visok, na dražljaje frekvence 100 Hz je celica pričela odgovarjati šele pri intenziteti 200 cm/s² (6,4 x 10⁻³ m/s). Do najvišje merjene intenzitete, 750 cm/s², je jakost odgovora narasla z 1 na 4 AP na dražljaj (sl. 52, B). Ocenjena latenca odgovorov je znašala ob vzdražnem pragu v povprečju 50 ms in se je skrajšala na 30 ms pri intenziteti 12 dB (sl. 52, C).

A



Slika 52: A. Zapis odgovora celice V-2 (morfologija na sl. 51) na dražljaj frekvence 100 Hz. Sinusno valovanje majhne amplitude v odgovoru celice je posledica presluha zaradi visokih intenzitet dražljaja; dražljaj je shematsko prikazan pod odgovori. **B.** Intenzitetna krivulja predstavlja povprečje štirih meritev. **C.** Latenčna krivulja predstavlja povprečje dveh meritev. **B, C.** Posamezni znaki pomenijo posamezne meritve. Krivulji prikazujeta meritve pri frekvenci 100 Hz. *Referenčna intenziteta* (0 dB) je 200 cm/s².

3.2.5.3 V-3

Oblika

Delno smo obarvali eno celico tega tipa (sl. 53). Domnevamo, da je pobarvan dendritski oz. vhodni del celice, saj so vsi končiči gladkega videza. Glavna veja poteka po medialni liniji centralnega in protorakalnega ganglija ter nadaljuje pot v subezofagealni ganglij. V centralnem gangliju je večja kroglasta (dorzalni pogled) razvejitev v abdominalnem predelu. Anteriorno se iz osrednje veje odcepljajo izrastki izmenoma v levo in desno polovico ganglija. Prva, trikotno oblikovana (dorzalni pogled) razvejitev, sega približno do sredine leve polovice ganglija, v nevropilo leve zadnje noge. Naslednja, daljša veja, je usmerjena latero-posteriorno in tvori razvejitev v nevropili desne zadnje noge. Sledi kratka razvejitev, ki pa ne preseže sredine leve polovice ganglija. Zadnja razvejitev v centralnem gangliju je znova trikotne oblike (dorzalni pogled) – iz lateralne veje se odcepljajo proti nevropili druge desne noge čedalje krajše kolaterale. V protorakalnem gangliju opazimo nekaj krajših kolateral v smeri nevropil prvega para nog.



Slika 53: Morfologija clice V-3. Levo risba celice v centralnem in protorakalnem gangliju, desno fotografija celice, napolnjene z barvilom Lucifer yellow. Oboje dorzalni pogled.

Delovanje

Za celico V-3 je bilo značilno enkomerno spontano proženje akcijskih potencialov s frekvenco 38-40 Hz. Ob draženju je v frekvenčnem območju med 50 in 150 Hz prišlo do inhibicije spontane aktivnosti (sl. 54, A). Vrh občutljivosti smo zabeležili pri 50 Hz z vzdražnim pragom pri 10 cm/s² (sl. 54, B).

Z nižanjem frekvence in višanjem intenzitete dražljaja se je podaljševalo trajanje inhibicije in povečevala hiperpolarizacija. Kvantitativno jakosti odziva nismo ovrednotili. Ocenjena latenca odgovora je znašala okoli 30 ms in je bila frekvenčno ter intenzitetno odvisna.



Slika 54: A. Zapis odgovora celice V-3 na dražljaj frekvence 70 Hz in intenzitete 50 cm/s². **B.** Krivulja vzdražnega praga celice V-3 (ena meritev).

Tip in oblika internevrona		Območje delovanja	Frekvenca največje občutljivosti	Vzdražni prag	Min. latenca odgovora
CG-AC-1		50-300 Hz	50 Hz	1-70 cm/s ²	14-25 ms
CG-AC-2		50-1000 Hz	100-300 Hz	0,5 cm/s²	18-23 ms
CG-AC-3 in CG-AC-4		50-2000 Hz	70-300 Hz	0,5 cm/s²	16-21 ms
CG-AC-5		50-1000 Hz	70-200 Hz	1 cm/s ²	17-18 ms
CG-AB		50-2000 Hz	70-400 Hz	0,5 cm/s²	14-18 ms
CG-L		50-200 Hz	50 Hz	10-20 cm/s ²	14-16 ms
PTG-DC		50-150 Hz	50 Hz	10 cm/s ²	13-15 ms
V-1, 2, 3		50-150 Hz	50 Hz	10 cm/s ²	26-30 ms

3.3 ČASOVNI ZAMIK IN AMPLITUDNA RAZLIKA NA KRIŽIŠČU

3.3.1 Časovni zamik

Časovni zamik med točkama I (ipsilateralno, v smeri vira vibracij) in K (kontralateralno, v nasprotni smeri od vira vibracij), ki sta bili med seboj oddaljeni 2 cm, je znašal od 2 do 5 ms (sl 52). V primeru B (sl. 55) je na ipsilateralnem listu stala samica, v primeru C (sl. 55) pa je na istem mestu bil pritrjen v magnetek, s pomočjo katerega smo rastlino vibrirali s predhodno posnetimi vibracijskimi signali. Vibracijske signale na točkah I in K smo snemali z dvema laserjema hkrati. Meritve so bile opravljene z osmimi samicami na treh rastlinah fižola (10 signalov vsake samice) in s pomočjo magnetka na enem fižolu (10 signalov).



Slika 55: Hitrost širjenja vibracijskih signalov po rastlini. A. Razvejitev na fižolu z označenima točkama I (ipsilateralno) in K (kontralateralno), s katerih je bil hkrati z dvema laserjema posnet vibracijski signal naravnega napeva. B, C. Zapis dela vibracijskega signala, posnetega na točkah I in K med petjem samice na listu fižola (B) oz. umetnim draženjem preko magnetka, pritrjenega na listni bazi (C).

3.3.2 Amplitudna razlika

Primerjali smo tudi intenziteto vibracijskih signalov samičinega pozivnega napeva, posnetih hkrati z dvema laserjema na točkah I in K (sl. 55, A). Na sliki 56 so prikazane relativne intenzitete vibracijskega signala na točkah I in K. Kot intenziteto posameznega signala smo upoštevali maksimalno intenziteto celotnega signala. Meritve so bile opravljene z osmimi samicami na treh različnih rastlinah fižola (10 signalov pri vsaki samici).



Slika 56: Intenziteta vibracijskih signalov samičinega pozivnega napeva na listnih pecljih 1 cm od stebla fižola. Vsaka točka označuje eno meritev (intenziteta posameznega signala na točkah I in K).

Iz grafa (sl. 56) je razvidno, da amplituda vibracijskega signala ni bila vedno večja na ipsilateralni strani, temveč je v več kot eni tretjini primerov signal bil močnejši na kontralateralni strani stebla. Točke so namreč razporejene tako nad kot tudi pod linijo, ki označuje enake amplitude signala na obeh točkah.

3.4 KODIRANJE ČASOVNIH, INTENZITETNIH IN SPEKTRALNIH PARAMETROV NARAVNIH NAPEVOV

3.4.1 Fižol

Za analizo odzivov internevronov v centralnem gangliju na vibracijske signale samičinega pozivnega napeva smo izbrali signal, posnet na ipsilateralnem listnem peclju fižola, na oddaljenosti 3 cm od samice. Na sl. 57 je prikazan odgovor nekaterih internevronov na ta signal. Dolžina signala je bila 1450 ms, maksimalna intenziteta 206 cm/s² (naravna intenziteta signala, izmerjena na rastlini), dominantna frekvenca 99 Hz in frekvence subdominantnih vrhov 198 in 309 Hz (sl. 58). Iz sonograma je jasno razvidna frekvenčna modulacija, ki v veliki meri sovpada z amplitudno modulacijo. Frekvenčna modulacija je najbolj izrazita v prvem delu signala, medtem ko je amplitudna modulacija ves čas jasno izražena; signal je sestavljen iz delno zlitih pulzov. Rasterski diagram odzivov 51 internevronov kaže jasen vpliv amplitudne in/ali frekvenčne modulacije na vzorec proženja akcijskih potencialov. Celice tvorijo tri pasove: v prvem so celice z oznakami od 1 do 16 (skupina A), v drugem celice z oznakami od 17 do 33 (skupina B) in v tretjem celice z oznakami od 34 do 51 (skupina C).



Slika 57: Zapisi odgovorov izbranih internevronov na vibracijski signal samičinega pozivnega napeva (prikazan je pod odzivi). Internevroni so označeni z istimi zaporednimi številkami, kot so razporejeni v rasterskem diagramu (str. 80) in dendrogramu (str. 82).

Celice v skupini A so spontano aktivne celice z vrhom občutljivosti pri 200 Hz (sl. 59, A). Odgovarjajo v frekvenčnem območju med 50 in 3000 Hz. Med draženjem je praviloma prišlo do ekscitacije, pri eni od celic pa smo pri frekvencah nad 1500 Hz zabeležili tudi inhibicijski odgovor. Tudi večina celic v skupini B je bilo spontano aktivnih, vendar krivulje vzdražnega praga niso tako enotne kot v skupini A (sl. 59, B). Nekatere celice so bile najbolj občutljive pri 50 Hz, pri čemer je imela ena od njih dodatni vrh občutljivosti pri 2000 Hz. Med draženjem je prišlo do ekscitacije ali inhibicije. V skupini B so bile tudi celice s podobno krivuljo vzdražnega praga kot celice v skupini A, z največjo občutljivostjo pri 200 Hz. V skupini C so bile celice po svojih funkcionalnih lastnostih najbolj raznolike (sl. 59, C). Nekatere so občasno spontano neenakomerno prožile akcijske potenciale, večina celic v tej skupini pa ni bila spontano aktivnih. Frekvenca največje občutljivosti je bila pri 50 Hz ali pri 100-150 Hz, pri nekaterih celicah pa smo zabeležili dva vrha občutljivosti, in sicer pri 200 Hz ter nad 500 Hz. Med draženjem je večinoma prihajalo do ekscitacije, pri nekaterih celicah pa je bil tip odziva pri dani frekvenci in intenziteti seštevek inhibicijskih in ekscitacijskih vhodov, pri čemer je v določenem frekvenčno-intenzitetnem območju en tip vhodov prevladal. Graf kumulativnih frekvenc (sl. 60) kaže spreminjanje hitrosti proženja akcijskih potencialov v času. Dendrogram (sl. 61) razvršča celice v skupine na podlagi podobnosti oz. razlik v dinamiki proženja akcijskih potencialov kot odgovor na vibracijski signal samičinega pozivnega napeva. Skupine v dendrogramu se skladajo s pasovi v rasterskem diagramu.



Slika 58: Oscilogram (**spodaj**) in sonogram (**v sredini**) vibracijskega signala samičinega pozivnega napeva ter rasterski diagram (**zgoraj**), ki prikazuje odzive 51 internevronov v centralnem gangliju na spodnji signal. Internevroni so razporejeni glede na vrstni red v dendrogramu. Vibracijski signal je bil posnet na fižolu, in sicer na listnem peclju 3 cm od lista, na katerem je stala pojoča samica.



Slika 59: Krivulje vzdražnih pragov celic skupin A (celice od 1 do 16), B (celice od 17 do 33) in C (celice od 34 do 51). Celice so razdeljene na osnovi pasov v rasterskem diagramu (str. 80) oz. skupin v dendrogramu (str. 83).

Slika 60 (str. 82): Graf kumulativih frekvenc proženja akcijskih potencialov 51 internevronov v centralnem gangliju kot odgovor na vibracijski signal samičinega pozivnega napeva.





Slika 61: Dendrogram podobnosti 51 internevronov v odzivu na vibracijski signal samičinega pozivnega napeva (str. 80), posnet na fižolu.

3.4.2 Ciperus

Spreminjanje maksimalne intenzitete vibracijskih signalov samičinega pozivnega napeva po steblu ciperusa je podobno spreminjanju intenzitete dominantnega frekvenčnega vrha (105 Hz) (sl. 62, A in B). Vozli in vmesne ojačitve, ki so nastali zaradi stoječega valovanja v steblu, so za različne frekvence na različnih točkah (sl. 62, B), kar je posledica disperznega širjenja upogibnih valov. Analizirali smo odgovore 31 internevronov na vibracijska signala samičinega pozivnega napeva, posneta na steblu ciperusa na oddaljenosti 9 (signal 1) in 15 cm (signal 2) od samice (sl. 62). Signala sta se razlikovala po časovnih in spektralnih lastnostih (sl. 62 in 63). Pri signalu 1 je izstopal dominantni vrh (105 Hz), ki je imel intenziteto 46 dB višjo kot prvi subdominantni vrh (60 Hz). Pri drugem signalu je bil dominantni frekvenčni vrh še vedno pri isti frekvenci, vendar pa je njegova intenziteta glede na signal 1 upadla za 10 dB, medtem ko se je intenziteta subdominantnih frekvenčnih vrhov povečala. Posledica tega je sprememba v razmerjih med intenzitetami posameznih frekvenčnih vrhov znotraj vibracijskega signala. Rasterski diagram odzivov 30 internevronov na oba signala kaže jasen vpliv spremembe časovnih parametrov (sl. 63). Delno zliti pulzi signala 1 so se pri signalu 2 povsem zlili, kar se odraža v vzorcu proženja akcijskih potencialov. Grafa kumulativnih frekvenc (sl. 64) kažeta spreminjanje hitrosti proženja akcijskih potencialov v času. Grafa se razlikujeta po naklonih krivulj in njihovi razporeditvi. Dendrograma (sl. 65) razvrščata celice v skupine na podlagi podobnosti oz. razlik v dinamiki proženja akcijskih potencialov kot odgovor na vibracijski signal samičinega pozivnega napeva. Tako dendrograma kot grafa kumulativnih frekvenc odražata različne funkcionalne lastnosti celic in različne odzive na spremembe v spektralnih in časovnih parametrih napevov, do katerih pride med prenosom vibracijskih signalov po rastlinah. Korelacijski diagram odziva celic na signal 1 in signal 2 kaže, da je pri večjem delu celic kumulativna frekvenca proženja akcijskih potencialov nekoliko višja pri signalu 1 (sl. 66). Najbolj odstopata celici 6 in 30. Pri prvi se frekvenca proženja akcijskih potencialov zniža s 70-80 pri signalu 1 na 20-30 pri signalu 2. Pri drugi pa se frekvenca pri odgovoru na signal 2 zviša približno za faktor dva v primerjavi z odzivom na signal 1.



Slika 62: A. Spreminjanje intenzitete signala samičinega pozivnega napeva po steblu ciperusa navzdol.
B. Spreminjanje relativnih intenzitet posameznih frekvenčnih vrhov v signalu samičinega pozivnega napeva.
C. Relativna intenziteta frekvenčnih vrhov v vibracijskem signalu samičinega pozivnega napeva – spektralne lastnosti dveh signalov, posnetih na razdalji 9 cm (signal 1) in 15 cm (signal 2) od samice.



Slika 63: Oscilograma (**spodaj**) in sonograma (**v sredini**) vibracijskih signalov samičinega pozivnega napeva ter rasterska diagrama (**zgoraj**), ki prikazujeta odzive 30 internevronov v centralnem gangliju na spodnja signala. Diagram na levi in diagram na desni prikazujeta odgovore istih internevronov v istem vrstnem redu. Vibracijska signala sta bila posneta na steblu ciperusa medtem, ko je samica, ki je oddajala vibracijske signale, stala na enem izmed listov blizu listne baze. Signal 1 je bil posnet na razdalji 9 cm, signal 2 pa na razdalji 15 cm od samice.



Slika 64: Grafa kumulativnih frekvenc proženja akcijskih potencialov 30 internevronov v centralnem gangliju kot odgovor na vibracijska signala samičinega pozivnega napeva (predstavljena sta na str. 77).



Slike 65: Dendrograma podobnosti 30 internevronov v odzivu na vibracijska signala samičinega pozivnega napeva, posneta na ciperusu na različnih razdaljah od vira vibracij (str. 85). **A.** Dendrogram podobnosti odziva celic na signal 1. **B.** Dendrogram podobnosti odziva celic na signal 2.



Slika 66: Korelacijski diagram odzivov 30 internevronov na vibracijska signala samičinega pozivnega napeva, posneta na ciperusu na različnih razdaljah od vira vibracij (str. 85).

4 RAZPRAVA IN SKLEPI

Kljub obilici raziskav vibracijske komunikacije žuželk na vedenjskem nivoju je centralno procesiranje vibracijskih signalov še v veliki meri neraziskano. Večina informacij izvira iz raziskav na murnih in kobilicah, pri katerih je prevladujoča zvočna komunikacija in pri katerih orientacija v smeri vira vibracij ni bila opisana (kratkoroge kobilice) ali pa je relativno šibka (murni). V pričujoči disertaciji smo prvič morfološko in fiziološko identificirali vibracijske nevrone pri žuželkah, pri katerih je sporazumevanje z vibracijskimi signali preko podlage osnovni komunikacijski kanal. Pri zeleni smrdljivki (*Nezara viridula* (L.)) smo opisali strukturo in funkcijo dveh tipov receptorskih celic in devetih tipov vibracijskih internevronov. Z analizo odzivov vibracijskih internevronov na naravne napeve stenice, posnete na različnih delih rastline, smo osvetlili mehanizme za orientacijo v smeri vira vibracijskih signalov.

4.1 RECEPTORSKE CELICE

4.1.1 Oblika receptorskih celic in členjenost centralnega ganglija

Obliko centralnih projekcij identificiranih receptorskih celic lahko primerjamo s centralnimi projekcijami vibracijskih receptorjev kompleksnega tibialnega organa, femoralnega hordotonalnega organa in kampaniformnih senzil ravnokrilcev. Enako kot pri ravnokrilcih (Eibl in Huber, 1979; Esch in sod., 1980; Grosch in sod, 1985; Römer in sod., 1988) so tudi pri zeleni smrdljivki centralne projekcije vibracijskih receptorjev omejene na ipsilateralno polovico ganglija. Raziskave vibracijsko-slušnega receptorskega sistema pri murnih so pokazale veliko podobnost med torakalnimi gangliji v tipih in projekcijah senzoričnih vlaken (Eibl in Huber, 1979). Iz tega sledi, da so si serijsko homonimne senzorične strukture v posameznih nogah podobne v območjih svojih centralnih projekcij in zato tudi v svoji povezavah z ostalimi živčnimi podsistemi v sklopu torakalnih ganglijev. Čeprav je centralni živčni sistem zelene smrdljivke v primerjavi z ravnokrilci v veliki meri centraliziran in reduciran (manjše število ganglijev kot posledica fuzije), pa je v centralnem gangliju še vedno opazen ostanek členjenosti – ločimo lahko mezotorakalni, metatorakalni in abdominalni del ganglija (sl. 67). V pričujočem delu smo opisali centralne projekcije dveh nizkofrekvenčnih (LFR) in treh srednjefrekvenčnih (MFR) receptorskih celic zelene smrdljivke. Med projekcijami receptorskih celic v mezotorakalno (iz drugega para nog) oz. metatorakalno (iz tretjega para nog) regijo centralnega ganglija ni bilo opaziti večjih strukturnih razlik, kar kaže na ostanek členjenosti znotraj reduciranega in centraliziranega živčnega sistema zelene smrdljivke in podpira domnevo, da se nevropile posameznih nog pri zeleni smrdljivki med seboj strukturno ne razlikujejo (Čokl in Amon, 1980). Prav tako so tudi posamezne razvejitve internevronov navadno omejene na eno regijo ganglija.



Slika 67: Ostanki členjenosti centralnega živčnega sistema v centralnem gangliju stenice *N. viridula*.

Pri ravnokrilcih sta vibracijski in slušni del nevropile ločena, bimodalni receptorji pa projicirajo v obe področji (Eibl in Huber, 1979; Römer, 1985; Kalmring in sod., 1996). Za centralne projekcije vibracijskih receptorjev murnov in dolgorogih kobilic je značilno, da se razvejijo takoj po vstopu v ganglij. Za kampaniformne senzile in hordotonalne organe je značilen bifurkacijski vzorec razvejitve, ki ga pri centralnih projekcijah subgenualnih receptorskih nevronov niso zasledili (Eibl in Huber, 1979; Grosch in sod., 1985; Bickmeyer in sod., 1992). Aksoni LFR celic zelene smrdljivke se prav tako razvejijo ob vstopu v ganglij, vendar so vse kolaterale aksona na frontalni strani. Najdaljša je prva kolaterala v frontalni smeri, podobno kot pri centralnih projekcijah receptorskih celic femoralnega hordotonalnega organa pri kratkorogih kobilicah (Matheson, 1992). Pri kratkorogih kobilicah so centralne projekcije subgenualnega organa podobne kot pri ostalih ravnokrilcih, medtem ko je morfologija aksonov dlačnih čutnic podobna centralnim projekcijam MFR nevronov zelene smrdljivke: gol akson brez kolateral z gosto razvejitvijo ob medialni liniji (Mücke in Lakes-Harlan, 1995). Centralne projekcije opisanih MFR receptorjev so tako strukturno kot po svoji legi precej podobne tudi tistim pri slušnih senzoričnih vlaknih tipa 5 pri murnu (Eibl in Huber, 1979; Esch in sod., 1980) in centralnim projekcijam slušnih receptorjev dolgorogih kobilic (Tettigoniidae) (Römer in sod., 1988); pri obeh gre za anteriorno-medialno usmerjeno projekcijo slušnega aksona z gosto terminalno razvejitvijo ob medialni liniji ganglija.



Slika 68: Območja senzoričnih nevropil v centralnem gangliju. Zelena barva - LFR nevroni; modra in rdeča barva - MFR nevroni. Zaradi lažje predstavitve prostorske urejenosti aksonov znotraj posamezne nevropile so vse centralne projekcije na isti strani ganglija.

Slušna nevropila ravnokrilcev je, prav tako kot čutnice na periferiji, urejena tonotopično – čutilne celice, uglašene na nižje frekvence zvoka, projicirajo v anteriorni del, tiste celice, ki pa se odzivajo na višje frekvence zvoka, pa v bolj posteriorni del nevropile (Oldfield, 1983; Römer in sod., 1988). Na podlagi svojih rezultatov lahko sklepamo na določeno stopnjo tonotopične organizacije tudi pri vibracijskem sistemu zelene smrdljivke, saj centralne projekcije različno uglašenih receptorskih celic pokrivajo prostorsko ločena področja v senzorični nevropili (sl. 68). Tako LFR kot MFR nevroni projicirajo v antero-medialni smeri do medialne linije ganglija. Prvi, z največjo občutljivostjo pri 50 Hz, pokrivajo anteriorni del nevropile od vhoda nožnega živca v ganglij do medialne linije, medtem ko MFR nevroni, z največjo občutljivostjo med 100 in 600 Hz s svojimi terminalnimi razvejitvami pokrivajo medialni del senzorične nevropile v območju medialne tretjine ipsilateralne polovice ganglija.

Razen pri ravnokrilcih so centralne projekcije vibroreceptorjev delno opisane le še pri receptorskih celicah femoralnega hordotonalnega organa pri paličnjakih. Receptorski celici, ki ju je opisal Büschges (1994) in celica, ki sta jo opisala Stein in Sauer (1999) so podobne tistim pri ravnokrilcih in so prav tako omejene na ipsilateralno polovico ganglija.

4.1.2 Delovanje

Kühne (1982a) je razdelil vibracijske receptorje ravnokrilcev v štiri funkcijske tipe: tip I (domnevno kampaniformne senzile) se odziva fazno vezano na vibracijske signale v frekvenčnem območju med 30 in 200 Hz, vzdražni prag odraža občutljivost na odmik iz ravnovesne lege, izražen kot pospešek znaša 3 cm/s²; tip II ima podobno delovanje kot tip I in v istem frekvenčnem območju, a je odvisen od pospeška dražljaja, njihov vzdražni prag je pri 100 cm/s² (domnevno hordotonalni receptorji v sklepih (FCO) (Field in Pflüger, 1989)); tip III in IV predstavljajo receptorske celice subgenualnega organa, ki so občutljive na vibracije med 30 in 5000 Hz, njihovi odzivi pa izražajo občutljivost na pospešek. Tip III je najbolj občutljiv med 200 in 1000 Hz z vzdražnim pragom pri 1 cm/s², medtem ko je občutljivost tipa IV nekoliko manjša. Tip I je fiziološko povsem primerljiv z LFR nevroni zelene smrdljivke, medtem ko celice tipa MFR glede na svojo uglašenost najverjetneje izvirajo v subgenualnem organu. Maksimalno občutljivost imajo med 100 in 600 Hz z vzdražnim pragom med 0,5 in 5 cm/s² (v poglavju 4.1.3 spekuliramo o dugačnem izvoru celice a tipa MFR).

Druge raziskave funkcionalnih lastnosti vibroreceptorskih celic pri različnih skupinah ravnokrilcev (Römer, 1985; Grosch in sod. 1985; Kühne in sod., 1984; Kalmring in sod., 1994) se večinoma ujemajo z opisano delitvijo v štiri skupine, ki jo je vpeljal Kühne (1982a). Po raziskavah Bickmeyerja (1992) naj bi bile receptorske celice femoralnega hordotonalnega organa pri kratkorogi kobilici Locusta migratoria celo nekoliko bolj občutljive (prag pod 1 cm/s^2 pri frekvenci največje občutljivosti – 50 Hz) kot subgenualni organ (prag okoli 5 cm/s² pri 200-500 Hz). Kalmring in sod. (1978) so opisali fiziološke lastnosti slušnih, bimodalnih in vibracijskih receptorjev pri dolgorogih kobilicah. Kljub težavam s pripisovanjem posameznih skupin receptorjev regijam v kompleksnem tibialnem organu je izvor enega tipa receptorjev bil zelo jasen - to so bili nizkofrekvenčni receptorji, ki so odgovarjali fazno vezano in so bili maksimalno občutljivi pri 50 Hz, kjer je bil vzdražni prag pri 3 cm/s² – izvirali so iz kampaniformnih senzil. Sklepamo, da identificirani nizkofrekvenčni receptorji zelene smrdljivke (LFR) prav tako izvirajo v kampaniformnih senzilah, vendar je potrebno izpostaviti, da je njihov vzdražni prag najnižji od doslej opisanih. Grosch in sod. (1985) so primerjali delovanje vibracijskih receptorjev pri petem larvalnem stadiju in pri odraslem osebku kratkorogih kobilic (Locusta migratoria). Ugotovili so, da večjih razlik ni, le receptorji tipa III. (subgenualni organ) so pri larvalnem stadiju nekoliko manj občutljivi. Poskusi na dolgorogi kobilici Polysarcus denticauda so pokazali, da so vzdražni pragi vibracijskih receptorjev drugega para nog značilno nižji od vzdražnega praga receptorjev prvih in zadnjih nog (Kalmring in sod., 1996). Vendar pa je to verjetno odvisno od posamezne vrste, saj so odgovori vibroreceptorjev pri dolgorogi kobilici Gampsocleis gratiosa enaki pri vseh parih nog (Kalmring in sod., 1994). Krivulji vzdražnega praga LFR receptorjev zelene smrdljivke sta identični, medtem ko se pri MFR receptorjih precej razlikujeta. Celica **b** prejema v območju nizkih frekvenc inhibitorni input, celica **a** pa odgovarja le z ekscitacijo. Lahko spekuliramo, da bi z blokiranjem inhibitornega inputa pri celici **b** prišli do krivulje, enake celici **a**, saj lahko pri višjih intenzitetah dražljaja frekvence 70 Hz opazimo v začetnem delu odgovora celice **b** ekscitacijski odgovor.

Čeprav so bile sprva zmožnosti subgenualnega organa pri ščurku za zaznavanja vibracij podlage nekoliko precenjene (izmerjeni vzdražni prag je znašal 0,002 nm (Schnorbus, 1971)), saj se je kasneje izkazalo, da je ta vrednost nekoliko višje (0,2 nm (Shaw, 1994)), velja še vedno za enega najobčuljivejših vibracijskih receptorjev, ki so bili kadarkoli opisani v živalskem kraljestvu (Kalmring in sod., 1997). Vendar pa pri ravnokrilcih subgenualni organ ni nujno najobčutljivejši vibracijski receptor. Intermediarni organ, del kompleksnega tibialnega organa ravnokrilcev, je občutljiv tako na vibracije podlage kot na zvok. Raziskave Kalmringa in sod. (1994) na dolgorogih kobilicah ter Čokla in sod. (1995) na jamskih kobilicah so pokazale, da je ta organ celo bolj občutljiv za zaznavanje vibracij podlage (vzdražni prag med 1 in 2 cm/s²) kot specializirani subgenualni organ (vzdražni prag med 3 in 10 cm/s²).

Z metodo ablacije (selektivno uničenje posameznih receptorskih organov), ki jo je uporabil Dambach (1972) na murnih, so Devetak in Amon (1997) ter Devetak in sod. (2004) ugotavljali fiziološke značilnosti vibracijskih receptorjev posameznih hordotonalnih organov in kampaniformnih senzil v/na nogah tenčičarice. Pri tenčičarici sta le dva od štirih hordotonalnih organov v nogah občutljiva na vibracije podlage, in sicer subgenualni in femoralni hordotonalni organ. Frekvenčno območje največje občutljivosti subgenualnega organa je pomaknjeno nekoliko višje v primerjavi z ravnokrilci - med 1500 in 2000 Hz, z vzdražnim pragom pri 2 cm/s² (oz. 0,2 nm), femoralni hordotonalni organ pa ima v območju med 50 in 300 Hz vzdražni prag pri 10 cm/s², med 400 in 2000 Hz pa je vzdražni prag še nekoliko nižji. Najmanj so na vibracije občutljive kampaniformne senzile, ki so pri tenčičarici razporejene po celotni površini nog, ob sklepih pa tvorijo urejene skupine. Po svoji karakteristični frekvenci (600 Hz) se razlikujejo od tistih pri ravnokrilcih, tudi njihov vzdražni prag je višji - 1 m/s².

Femoralni hordotonalni organi paličnjakov se odzivajo na vibracije podlage med 10 Hz in 4 kHz, najbolj so občutljivi v območju pod 100 Hz z vzdražnim pragom okoli 10 cm/s² (Stein in Sauer, 1999).

Čokl je leta 1983 opisal funkcionalne lastnosti vibracijskih receptorjev pri zeleni smrdljivki. Razdelil jih je v tri tipe: nizkofrekvenčne (LFR), srednjefrekvenčne (MFR) in visokofrekvenčne (HFR). V pričujočem delu smo opisali morfologijo prvih dveh tipov, medtem ko tretjega tipa nismo zabeležili. Delovanje LFR receptorjev se povsem sklada z opisanim leta 1983, medtem ko se celici tipa MFR nekoliko razlikujeta od karakteristik celic, opisanih v omenjenem članku, vendar delujeta v enakem frekvenčnem območju in imata podoben vzdražni prag. Celica **a** ima dva vrhova občutljivosti, in sicer za inhibicijski vhod pri 70-100 Hz in 1 cm/s², za ekscitacijski vhod pa med 300 in 500 Hz pri 5 cm/s² (sl. 14, B). Celica **b** odgovarja sicer le z ekscitacijo, vendar pa je frekvenca največje občutljivosti pomaknjena nekoliko nižje, namesto pri 200 Hz je celica najbolj občutljiva pri 100-150 Hz (sl. 14, B). Čokl (1983) je opisal pri celicah MFR in HFR podaljšan odziv na dražljaje frekvence 200 Hz, kar je pripisal resonanci kapnih celic subgenualnega organa, ki oblikujeta filament. Enako smo zabeležili pri celici **a** tipa MFR, in sicer pri 200 in 300 Hz (sl. 14, C).

Na podlagi rezultatov omenjenih raziskav sklepamo, da so LFR receptorji kampaniformne senzile, MFR receptorji pa skolopidiji subgenualnega organa ali drugih hordotonalnih organov. Latence odgovorov receptorskih celic zelene smrdljivke so v istem velikostnem razredu kot latence odgovorov čutilnih celic tibialnega organa, ki se na dražljaj odzovejo z latencami okoli 8 do 11 ms (Stumpner in sod., 1995; Schul, 1997) in latence odgovorov proksimalnih kampaniformnih senzil pri ščurku (3 do 16 ms, odvisno od smeri dražljaja) (Ridgel in sod., 2001).

4.1.3 Spontana aktivnost in izvor inhibicije v receptorskih celicah

Zmožnost čutilnih organov za zaznavanje in razlikovanje dražljajev različnih intenzitet je pri živalih z majhnim številom receptorskih celic reducirana. Ena od strategij za povečanje območja vzdražnosti receptorskih celic je spontana aktivnost oz. spontano proženje akcijskih potencialov. Receptorske celice olfaktornega sistema žuželk signalizirajo prisotnost določenih molekul s povečanjem oz. zmanjšanjem frekvence proženja akcijskih potencialov (Chapman, 1998; Park in Cork, 1999). Spontana aktivnost omogoča smerno občutljivost nekaterih mehanoreceptorjev žuželk (nitaste čutilne dlačice pri ščurku *Periplaneta americana* (Buño in sod., 1981), trihobotriji stenice *Pyrrhocoris apterus* (Drašlar, 1973)). Odmik v eno smer poveča stopnjo proženja akcijskih potencialov (ekscitacija), odmik v drugo smer pa jo zmanjša (inhibicija). Spontano aktivnost so opisali tudi pri femoralnem hordotonalnem organu (FCO) paličnjakov (Büschges, 1994; Stein in Schmitz, 1999; Stein in Sauer, 1999) in kratkorogih kobilic (Burrows in Laurent, 1993; Burrows in Matheson,

1994; Wolf in Burrows, 1995). Celice tega skolopidialnega organa se na spremembe v legi femoralno-tibialnega sklepa (fleksija, ekstenzija) odzivajo s povečanim oz. zmanjšanim proženjem akcijskih potencialov. Pri zeleni smrdljivki smo zabeležili spontano aktivnost pri receptorski celici **a** tipa MFR (sl. 14, C). Glede na občutljivost in uglašenost celice smo sprva domnevali, da izvira v subgenualnem organu, vendar pa zabeležena spontana aktivnost celice nakazuje večjo verjetnost, da celica izvira v enem od ostalih vibracijskih organov v nogah. Od skolopidialnih organov v nogi stenice *N. viridula* je subgenualni organ edini, ki je omejen zgolj na en nožni člen. Vsi ostali (FCO, TDCO, TPCO; sl. 3) povezujejo dva člena noge in zaznavajo njuno medsebojno lego. Domnevamo, da je spontana aktivnost prisotna v skolopidialnih organih sklepov, ki so smerno občutljivi, ne pa tudi pri subgenualnem organu, ki je omejen na tibijo in zaznava zgolj prisotnost oz. odsotnost vibracij. Omenjena celica tako najverjetneje izvira iz femoralnega hordotonalnega organa, saj sta TDCO in TPCO na vibracije podlage manj oz. ne-občutljiva (raziskave na tenčicaricah; Devetak in Amon, 1997). Čokl (1983) v raziskavi funkcionalnih lastnosti vibracijskih receptorjev zelene smrdljivke ni zabeležil spontano aktivnih celic.

Pri isti celici (celica a tipa MFR, sl. 13 in 14) smo pri dražljajih nizkih frekvenc (50-100 Hz) opazili vplive inhibicije. Sklepamo, da gre za presinaptično inhibicijo sproščanja nevrotransmiterjev iz primarnih senzoričnih nevronov, ki je zelo razširjena strategija za regulacijo senzoričnega inputa v centralni živčni sistem (Clarac in Cattaert, 1999). Presinaptična inhibicija slušnih receptorjev pri murnu preprečuje desenzitizacijo in mu omogoča, da se odziva na zunanje zvočne signale med lastnim petjem (Poulet in Hedwig, 2002; Poulet in Hedwig, 2003). Pri paličnjakih presinaptična inhibicija receptorjev v femoralno-tibijalnem sklepu omogoča mimikrijsko kataleptično držo telesa (Sauer in sod., 1997). Celični mehanizem aferentne presinaptične inhibicije je navadno znižanje amplitude akcijskih potencialov. Poskusi odvajanja živčnih impulzov iz terminalnih aksonskih razvejitev celic femoralnega hordotonalnega organa pri kratkorogi kobilici so pokazali, da so med draženjem akcijski potenciali receptorskih celic naloženi na depolarizirajočih IPSP-jih (oz. PAD-ih – primary afferent depolarization), ki jih indirektno generirajo aferentne celice istega organa (Burrows in Matheson, 1994). Inhibicija rezultira v redukciji ortodromnih aferentnih akcijskih potencialov za 12-28% in redukciji amplitude EPSP v postsinaptičnih celicah za 50 %. Tako je učinkovitost izhodnih sinaps individualnih receptorskih celic regulirana s strani mreže hordotonalnih receptorskih celic, ki se odzivajo na enake dražljaje. To je del mehanizma, ki omogoča, da se hoteni gibi lahko odvijajo v prisotnosti vpliva senzoričnih povratnih zank, ki jih to gibanje generira in ki bi sicer lahko to gibanje ovirale (Hedwig in Burrows, 1996; Wolf in Burrows, 1995). Znižanje akcijskih potencialov in depolarizirajoče IPSP-je lahko vidimo v odzivu celice a tipa MFR zelene smrdljivke na dražljaj frekvence
500 Hz in intenzitete 70 cm/s² (sl. 14), medtem ko se je v odzivu na dražljaj frekvence 70 Hz in intenzitete 5 cm/s² inhibicija odrazila v popolnem prenehanju proženja akcijskih potencialov med draženjem. Ena od možnosti je, da ta dražljaj predstavlja za receptorske celice femoralnega hordotonalnega organa premik femoralno-tibialnega sklepa, na katerega se odzovejo s prenehanjem spontane aktivnosti (Burrows, 1996). Domnevamo, da celica prejema različne inhibicijske vhode, ki se na različen način odražajo v njenem delovanju. Možno je, da je pri samici med poskusom prišlo v centralnem živčevju do signala za generiranje vibracijskega napeva in posledično do inhibicije oz. regulacije prenosa vzburjenja od receptorskih celic na postsinaptične celice. Po analogiji z murnom tako morda pri zeleni smrdljivki podoben mehanizem onemogoča desenzitizacijo receptorskih celic med lastnim produciranjem vibracijskih signalov. Depolarizacija pri celici b tipa MFR je verjetno prav tako rezultat presinaptične inhibicije. Obstajajo namreč tudi depolarizacijski IPSP-ji (inhibitorni postsinaptični potenciali); npr. v primeru sinapse, kjer kot živčni prenašalec nastopa GABA in je mirovni membranski potencial postsinaptične celice nižji od reverznega potenciala za klorove ione. Ioni klora bodo zapuščali celico in tako dejansko povzročili depolarizacijo, vendar pa bo sinapsa kljub temu inhibitorna, ker bo vzdrževala membranski potencial celice na nivoju, nižjem od pražnega potenciala za generiranje AP. Vir inhibicije so poleg ostalih receptorskih celic istega hordotonalnega organa lahko tudi receptorske celice drugih mehanoreceptorjev na nogah (Stein in Schmitz, 1999) ali pa internevroni centralnega živčnega sistema (Poulet in Hedwig, 2003).

4.2 OBLIKA, DELOVANJE IN POVEZLJIVOST VIBRACIJSKIH INTERNEVRONOV

4.2.1 Interindividualna variabilnost ali različni nevroni?

Posebnost živčnega sistema žuželk so t.i. prepoznavni oz. identificirani nevroni (*identified neurons*). To so celice značilne oblike in delovanja ter vhodno-izhodnih regij, ki jih lahko najdemo pri vsakem posamezniku določene vrste (Comer in Robertson, 2001). Posamezne internevrone lahko razpoznamo že po obliki, različne celice s podobno obliko in lego v živčevju pa se med seboj dobro ločijo v delovanju. Vsaka oblika nevrona (razen izjem, ki jih bomo obravnavali v nadaljevanju) se pojavlja kot zrcalno simetričen par celic na obeh straneh živčnega sistema (Wohlers in Huber, 1982; Burrows, 1996). Na sl. 18 (**j**, **j**') je obarvan zrcalno simetričen par internevronov tipa CG-AC-1. Vzrok za hkratno obarvanje je najverjetneje poškodba druge celice med barvanjem prve, možno je pa tudi, da je do hkratnega obarvanja (*dye coupling*) prišlo preko električnih sinaps (*gap junctions*).

Evolucijsko lahko novi internevroni nastanejo s podvojitvijo že obstoječih internevronov (Goodman in sod., 1979). Internevroni, ki so na tak način nastali recentno, so morfološko težko razločljivi, zato jih je težko identificirati. Tak primer slušnih internevronov sta našla Römer in Marquart (1984) pri kratkorogi kobilici *Locusta migratoria* in ju poimenovala 'celici dvojčici' (*twin cells*). Projekcije teh dveh internevronov se tako prekrivajo, da jih je na nekaterih mestih nemogoče razločiti. Podobno v protorakalnem gangliju bramorja soobstajata lokalna omega internevrona nestalnih morfoloških razlik, ki so ju prav tako hkrati obarvali pri istem osebku (Mason in sod., 1998). Enak primer smo našli pri zeleni smrdljivki , kjer sta se hkrati obarvala dva internevrona tipa CG-AC-1 (sl. 19).

Raziskave identificiranih nevronov žuželk so pokazale veliko mero variabilnosti, ki so povezane s spolom in socialnimi izkušnjami posameznega osebka (Comer in Robertson, 2001). V pričujočem delu je zato prikazana morfologija posameznega tipa internevrona pri vseh poskusnih živalih. Posamezen tip internevrona označuje relativna konstantnost v legi celičnega telesa, v poteku in legi aksona glede na telo celice ter v obliki in legi dendritskih in aksonskih razvejitev. Interindividualna variabilnost na nivoju oblike celic zajema predvsem natančen vzorec in obliko razvejitev v gangliju. Na nivoju variabilnosti delovanja celic smo dopuščali večja odstopanja. Dejstvo je namreč, da noge živali niso bile pri vseh poskusih povsem enako pritrjene, poleg tega pa je nekaterim poskusnim živalim manjkala posamezna noga. Domnevamo, da so lahko nekatere variabilnosti posledica časovno zamaknjenih oz. izpadlih vibracijskih vhodov, ki so se odrazili v odgovorih internevronov na dražljaje. Na podlagi naše raziskave ne moremo ugotoviti, ali posamezne celice tipov CG-AC in CG-AB kažejo široko variabilnost v delovanju enega internevrona ali pa smo odzive dejansko zabeležili iz sestrskih internevronov. Nedvoumen pokazatelj soobstoja večih različnih celic z enako morfologijo je le njihovo hkratno obarvanje pri istem osebku.

4.2.2 Povezava med obliko in delovanjem internevronov – vhodne in izhodne regije ter povezljivost z receptorskimi celicami

Internevroni zelene smrdljivke imajo končiče dveh oblik; končiče gladkega videza in končiče s terminalnimi in *en passant* (vmesnimi) odebelitvami, ki imajo videz nitke, na katero so nanizane kroglice (sl. 33; 39c; 42). Pri odvajanju živčnih impulzov iz različnih delov zvočno občutljivih internevronov kratkorogih kobilic so ugotovili, da razvejitve gladkega videza predstavljajo pretežno vhodne regije, razvejitve s številnimi odebelitvami pa pretežno izhodne, presinaptične regije (Römer in Marquart, 1984; Peters in sod., 1986). Zvočno občutljiva omega nevrona murna (ON1 in ON2) imata na ipsilateralni strani gladke razvejitve in na

kontralateralni strani razvejitve z odebelitvami. Podrobna histološka in imunocitokemična raziskava je pokazala, da je na ipsilateralni strani približno 90% vseh vhodnih sinaps celice, medtem ko je približno 70% vseh izhodnih sinaps celice na kontralateralni strani (Watson in Hardt, 1996).

Čutilne celice tibialnega organa ravnokrilcev se na dražljaj odzovejo z latencami od 8 do 11 ms (Hennig, 1988; Stumpner in sod., 1995; Schul, 1997), vibracijski receptorji vseh treh parov nog pri kratkorogi kobilici *Locusta migratoria* pa z latencami 5-7 ms, medtem ko časovni zamiki odzivov med čutilnimi celicami in internevroni prvega reda ležijo v razredu med 0,5 in 2 ms (Kalmring in sod., 1975; Römer in sod., 1988; Hennig, 1988). Najkrajše latence slušnih internevronov murna *Telleogryllus oceanicus* (13 in 15 ms) avtorji navajajo kot dokaz njihove monosinaptične povezave s čutilnimi celicami slušnega organa (Atkins in Pollack, 1987). Latence LFR in MFR receptorjev zelene smrdljivke so pri frekvenci največje občutljivosti in največji merjeni intenziteti znašale od 6 do 13 ms. Sklepamo, da so internevroni z latencami odgovora med 9 in 16 ms z njimi povezani monosinaptično.

4.2.2.1 Internevroni CG-AC-1

Internevroni tipa CG-AC-1 (sl. 69) zelene smrdljivke prejemajo vhod pretežno iz tretje ipsilateralne noge (pri nekaterih celicah segajo dendritske razvejitve tudi v nevropilo druge ipsilateralne noge (sl. 18i, sl. 19)) in prenašajo informacijo v kontralateralno polovico centralnega ganglija. Izhodne regije so v nevropilah vseh kontralateralnih nog, kar je vidno na preparatih s protorakalnim ganglijem (sl. 17 in 19). Pri treh celicah (**f**, **h** in **k**) se akson vzpenja iz protorakalnega ganglija v možganski del centralnega živčnega sistema. Pri celicah e in g se vzpenjajoči akson bodisi ni obarval, bodisi gre za variacijo tipa celice brez vzpenjajočega aksona, ali pa je prisotnost vzpenjajočega aksona odvisna od starosti živali, kot so to ugotovili za omega nevron ON1 pri murnu (Atkins in Pollack, 1986). Po obliki so internevroni tipa CG-AC-1 podobni intersegmentalnim internevronom kratkoroge kobilice (Locusta sp.), ki so udeleženi pri koordinaciji gibanja. Enako kot celice CG-AC-1 prejemajo senzorične vhode iz ene noge, njihovi aksoni pa projicirajo v nevropile ostalih nog in kontrolirajo njihovo gibanje (Burrows, 1996).Glede na latence odgovorov, ki se gibljejo med 15 in 30 ms (sl. 26), sklepamo, da ta morfološka skupina obsega tako internevrone prvega reda kot tudi internevrone, ki so z receptorskimi celicami povezani posredno, preko vsaj enega internevrona. Celica i, pri kateri je prišlo do hkratnega obarvanja receptorske celice in internevrona (sl. 18), ima najmanjšo latenco odgovorov 16 ms; na podlagi tega podatka ter jasnega prekrivanja izhodnih regij receptorskega aksona z dendritskimi razvejitvami



Slika 69: Osnovni morfološki tipi vibracijskih internevronov pri stenici N. viridula.

internevrona domnevamo, da gre v tem primeru za monosinaptično povezavo med celicama. Do hkratnega obarvanja obeh celic je prišlo najverjetneje zaradi poškodbe receptorske celice ob barvanju internevrona oz. prodiranju elektrode skozi ganglij, možno pa je tudi, da sta celici povezani preko električnih sinaps. V skupini CG-AC-1 nismo zabeležili vplivov inhibicije (sl. 21 in 22).

4.2.2.2 Internevroni CG-AC-2

Pri internevronih tipa CG-AC-2 so vsi končiči v centralnem gangliju gladkega videza, zato sklepamo, da celice tega tipa prejemajo vhode iz drugega in tretjega para nog (sl. 27 in 28, sl. 69). Po obliki so internevroni CG-AC-2 podobni slušnemu vzpenjajočemu internevronu TH3-AC5 pri kratkorogi kobilici *Omocestus viridulis*, s somo v metatorakalnem gangliju (Hedwig in Elsner, 1985). Pri celici **a**, ki je na dražljaje odgovarjala s tonično ekscitacijo (sl.

29), gre glede na kratke latence odgovorov (15 ms) verjetno za monosinaptično povezavo z receptorskimi celicami, medtem ko je pri celicah **b** in **c** kompleksen odgovor na dražljaj (sl. 30) rezultat sumacije ekscitacijskih in inhibicijskih vhodov, latence pa se gibljejo med 25 in 35 ms, kar kaže, da sta to internevrona višjega reda. Območje največje občutljivosti je različno za ekscitacijske in inhibicijske vhode, kar rezultira v kompleksnih odzivih in odvisnosti prevlade vpliva enega ali drugega tipa vhodov od frekvence in/ali intenzitete dražljaja. Pri teh in ostalih celicah s kompleksnimi vplivi različnih vhodov igra pomembno vlogo tudi mesto v celici, iz katerega odvajamo akcijske potenciale (Römer in Marquart, 1984). Če odvajamo pred regijo, kjer celica prejema inhibicijske vhode, jih ne bomo zabeležili, zato določen zapis odziva neke celice velja zgolj za določeno regijo in ni osnova, na podlagi katere bi lahko razvrščali celice v funkcijske tipe. Pri celici **b** je vpliv inhibicije viden v začetku odgovora celice, zato sklepamo, da je latenca za inhibicijo krajša kot latenca za ekscitacijo (sl. 30, A). Pri zapisih odzivov celice **c** vidimo, da se inhibicija pojavi pri višjih intenzitetah; od tod zvonasta intenzitetna krivulja celice. Lega izhodnih regij za ta tip internevronov ni znana.

4.2.2.3 Internevroni CG-AC-3 in CG-AC-4

Celici CG-AC-3 in CG-AC-4, čeprav podobne oblike (sl. 33 in sl. 69), se verjetno precej razlikujeta glede povezljivosti z drugimi celicami. Prva ima namreč jasno vidne odebelitve na vseh končičih v centralnem gangliju; ti segajo v nevropile drugega in tretjega para nog. Sklepamo, da ima ta tip internevrona v centralnem gangliju pretežno izhodne regije. Glede na najkrajše latence odziva (16-18 ms) sklepamo, daje to internevron prvega ali drugega reda. Internevron CG-AC-4 pa ima, nasprotno, v centralnem gangliju končiče gladkega videza, medtem ko vzpenjajoči akson tvori v protorakalnem gangliju kolaterale z odebelitvami v nevropili prve kontralateralne noge. Sklepamo, da prejema vhode iz drugega in tretjega para nog ter prenaša informacijo do prve kontralateralne noge ter naprej anteriorno v področje možganov. Latence odzivov nad 20 ms z veliko frekvenčno odvisnostjo (sl. 32, C) in kompleksni odgovori (inhibicija in ekscitacija) (sl. 34) kažejo, da gre za internevron višjega reda, ki prejema vhode iz različnih presinaptičnih celic.

4.2.2.4 Internevron CG-AC-5

Čeprav povsem drugačne oblike kot celica CG-AC-3, ima celica CG-AC-5 (sl. 36 in sl. 69) podobno lego vhodnih regij v nevropilah drugega in tretjega para nog. V centralnem gangliju

ni opaziti končičev z odebelitvami, ki bi označevali izhodne regije celice, zato sklepamo, da ima ta celica v centralnem gangliju pretežno vhodne regije. Pri višjih intenzitetah dražljajev prejema inhibicijske vhode (sl. 37), kar kaže, da je s čutilnimi celicami povezana posredno, prek vsaj enega (inhibitornega) internevrona. Po svoji morfologiji je zelo podobna bimodalnemu internevronu G_1 kratkoroge kobilice *Locusta migratoria* (Kalmring, 1975; Čokl in sod., 1977). Tudi latence, izmerjene pri odgovoru internevrona G_1 , ki jih avtorji navajajo kot dokaz polisinaptične povezave z vibracijskimi receptorji, so podobne latencam celice CG-AC-5 zelene smrdljivke (18-22 ms; sl. 38, C).

4.2.2.5 Internevroni CG-AB

Končiči internevronov CG-AB projicirajo v nevropile vseh treh parov nog (sl. 39 in sl. 69). Na nobenem od preparatov ni videti, da bi se aksona vzpenjala iz protorakalnega ganglija v možgane. Na vseh končičih so jasno vidne terminalne in *en passant* odebelitve, kar kaže, da prevladujejo izhodne sinapse. Po svoji obliki (dorzalna lega some in bilateralna simetrija) so celice tipa CG-AB zelo podobne t.i. intersegmentalnim DUM (dorsal unpaired median) internevronom ravnokrilcev (Burrows, 1996; Bräunig, 1997). DUM internevroni imajo običajno nevromodulatorno funkcijo, pri nekaterih je transmiter oktopamin (Grolleau in Lapied, 2000), nekateri kažejo imunoreaktivnost za nevrotransmiter GABA, kar pomeni, da imajo verjetno inhibicijske učinke (Burrows, 1996). Ena od posebnosti DUM internevronov je v sposobnosti generiranja spontanih akcijskih potencialov v somi celice. Celice tipa CG-AB prejemajo kompleksne vhode, odgovori celic pa so sumacija inhibicijskih in ekscitacijskih učinkov drugih internevronov. Z receptorskimi celicami so povezane posredno, preko vsaj enega vmesnega internevrona.

4.2.2.6 Internevroni CG-L

CG-L so lokalni internevroni, omejeni na centralni ganglij (sl. 42 in sl. 69). Po svoji morfologiji so podobni lokalnim nevronom ravnokrilcev, ki prenašajo vzburjenje iz ene v drugo polovico ganglija. Na ipsilateralni strani, od kođer izrašča primarni odrastek some, so končiči gladkega videza, kar kaže, da je ta regija pretežno vhodna, međtem ko so na končičih na kontralateralni strani celice jasno vidne terminalne in *en passant* odebelitve, kar kaže, da je ta regija pretežno izhodna. Vse dolgoroge kobilice, ki zaznavajo zvok, imajo v protorakalnem gangliju vsaj en par lokalnih internevronov, ki vodi vzburjenje iz ene v nasprotno polovico ganglija (Wohlers in Huber, 1978; Römer, 1985; Stiedl in sod., 1997;

Mason in Schildberger, 1993). Delovanje teh nevronov je najbolje raziskano pri murnih; omega nevron 1 (ON1) posreduje inhibicijo na kontralateralno celico v paru ter na enega od vzpenjajočih aksonov in s tem ojačuje lateralni kontrast intenzitete zvoka (Horseman in Huber, 1994a, b). Sklepamo, da imajo internevroni zelene smrdljivke podobno funkcijo. Latence celice **a**, ki je odgovarjala z ekscitacijo (sl. 43), znašajo pri največji jakosti dražljaja 15 ms (sl. 44), kar kaže na verjetno monosinaptično povezavo z receptorskimi celicami. Pri celicah **b** in **c** smo zabeležili inhibicijo, zato domnevamo, da sta celici z receptorskimi celicami povezani posredno, preko vsaj enega (inhibicijskega) internevrona. Interpretacija povezav celic je seveda odvisna od mesta v celici, iz katerega smo odvajali akcijske potenciale (Römer in Marquart, 1984).

4.2.2.7 Internevron PTG-DC

Internevron PTG-DC (sl. 45 in sl. 69) je morfološko in fiziološko zelo podoben edinemu že opisanemu vibracijskemu internevronu zelene smrdljivke (LFTVI; Čokl in Amon, 1980). Prej opisana celica se od tukaj opisane razlikuje po dodatnem vzpenjajočem aksonu iz protorakalnega ganglija v možgane ter nekoliko nižjem vzdražnem pragu in po frekvenčnem območju delovanja. Zaradi enake specifične oblike celice in razporeditve vhodnih in izhodnih regij pa domnevamo, da gre zgolj za variaciji iste celice. Vhodne regije celice PTG-DC so omejene na nevropilo prve kontralateralne noge v protorakalnem gangliju, izhodne regije pa so v centralnem gangliju tik ob medialni liniji, na nivoju drugega in tretjega nožnega živca; izhoda sta orientirana v smeri ipsilateralnih nog. Domnevamo, da celica prevaja vzburjenje od prve desne noge k drugi in tretji levi nogi in obratno. Minimalna latenca odgovora celice je 14 ms, kar kaže na monosinaptično povezavo z receptorskimi nevroni.

4.2.2.8 Neidentificirani internevroni V-1, V-2 in V-3

Za neidentificirane celice V-1, V-2 in V-3 lega celičnega telesa ni znana. Celici V-1 in V-2 imata v centralnem gangliju pretežno izhodne regije z jasno vidnimi terminalnimi in *en passant* odebelitvami (sl. 48, 51 in 69), odzivata pa se z ekscitacijo. Prva je omejena na eno lateralno polovico ganglija. Domnevamo, da prenaša vzburjenje iz bolj anteriorno ležečih centrov do nevropil druge in tretje noge na eni strani telesa. Latence odziva (nad 20 ms) kažejo, da gre za internevron višjega reda. Velika razlika v latencah odgovora celice V-1 pri različnih frekvencah draženja kaže na različne vhode. Celica V-2 projicira v nevropile drugega in tretjega para nog, sega pa tudi v abdominalni del centralnega ganglija. Internevron

V-3 se od prvih dveh razlikuje, njegovi končiči so gladkega videza, odziva pa se z inhibicijo spontane aktivnosti. Domnevamo, da prevaja vzburjenje iz vhodnih regij v centralnem gangliju anteriorno v smeri možganov. Celici V-2 in V-3 sta prav tako internevrona višjega reda, saj latence njunih odgovorov presegajo 30 ms.

Zaznavanje vibracij podlage je med členonožci splošno razširjeno, medtem ko je zaznavanje zvoka omejeno zgolj na nekatere skupine žuželk. Podobnosti v morfologiji med vibracijskimi internevroni zelene smrdljivke in nekaterimi slušnimi, bimodalnimi oz. vibracijskimi internevroni ravnokrilcev podpirajo domnevo o razvoju slušnih timpanalnih organov iz hordotonalnih prekurzorjev (Stumpner in von Helversen, 2001). Čeprav ravnokrilci prav tako zaznavajo vibracije podlage, je zvočna komunikacija pri njih pomembnejša in prehod s sistema s šestimi vhodi na sistem z dvema vhodoma se odraža v enostavnejši organizaciji živčne mreže.

4.2.3 Uglašenost in občutljivost internevronov

Čokl s sod. (1977) je prvi dokazal, da slušni internevroni kratkoroge kobilice *Locusta migratoria* prejemajo vhode tudi iz vibracijskih receptorjev. Na različen tip dražljaja pa se ti internevroni odzivajo v različni meri in na podlagi tega so jih razdelili v tri skupine: V (vibracijski), VS (vibracijsko-slušni) in S (slušni) nevroni (Kühne, 1982b; Kalmring, 1983; Kalmring in sod., 1997). Del V nevronov prejema vhode iz kampaniformnih senzil



Slika 70: Krivulje vzdražnega praga vibracijskih internevronov v torakalnih ganglijih stenice *N. viridula*.

in drugih nizkofrekvenčnih receptorjev (delovanje v frekvenčnem območju 30-300 Hz z največjo občutljivostjo ok. 150 Hz), ostali V nevroni in VS nevroni pa v največji meri iz subgenualnih receptorjev (delovanje v frekvenčnem območju 30-5000 Hz z največjo občutljivostjo okoli 700 Hz). Čeprav ta razdelitev v splošnem velja za vse ravnokrilce, so med posameznimi vrstami razlike v občutljivosti in uglašenosti posameznih vibracijsko občutljivih internevronov (Kühne in sod., 1984).

Identificirani vibracijski internevroni zelene smrdljivke se odzivajo na dražljaje v frekvenčnem območju med 50 in 2000 Hz. Na podlagi rezultatov v svoji disertaciji in rezultatov Čokla (1983) domnevamo, da je spodnja meja frekvenčnega območja delovanja še nekoliko nižje. Glede frekvence največje občutljivosti lahko vibracijske internevrone zelene smrdljivke razdelimo v skupino z največjo občutljivostjo pri 50 Hz (CG-AC-1, CG-L, PTG-DC, V-1 in V-3) in skupino z največjo občutljivostjo pri 200 Hz (70-400 Hz) (CG-AC-2 do 5 in CG-AB). Domnevamo, da prva skupina prejema večino vhodov iz LFR receptorjev, druga skupina pa iz MFR receptorjev. Celica i skupine CG-AC-1 je edina uglašena na srednje frekvence; prav tako je receptorska celica, ki se je obarvala hkrati z njo po svoji morfologiji zelo podobna MFR receptorjem, kar potrjuje domnevo, da srednjefrekvenčni internevroni prejemajo vhode iz MFR, nizkofrekvenčni pa iz LFR receptorskih celic. Vzdražni pragi internevronov v največji skupini (CG-AC-1) so zelo različni, od 1 do 70 cm/s² kar kaže na veliko interindividualno variabilnost v delovanju celic tega tipa. Ostale internevrone lahko glede nivoja vzdražnega praga razdelimo v bolj občutljive, ki se odzivajo že na dražljaje pospeška 0,5 oz 1 cm/s² (CG-AC-2 do 5 in CG-AB), in manj občutljive, pri katerih leži vzdražni prag pri 10 cm/s² ali višje (CG-L, CG-PTR, V-1 in V-3). Vidimo, da so internevroni, ki se domnevno povezujejo z receptorji tipa MFR, bolj občutljivi od tistih, ki se domnevno povezjujejo z nizkofrekvenčnimi receptorji (LFR). Nizkofrekvenčni internevroni so ozko uglašeni – na dražljaje odgovarjajo le v frekvenčnem območju od 50 do 150 (PTG-DC, V-1 in V-3), 200 (CG-L) oz. 300 Hz (CG-AC-1), medtem ko ostali tipi internevronov delujejo v širšem frekvenčnem območju, in sicer od 50 do 1000 (CG-AC-2 in CG-AC-5) oz. 2000 Hz (CG-AC-3, CG-AC-4 in CG-AB). Opisani fiziološki skupini se ujemata z dvema od treh fizioloških skupin, opisanih pri zeleni smrdljivki na podlagi analiz zunajceličnega beleženja aktivnosti nevronov v centralnem gangliju (Zorović, 2003) ter z dvema fiziološkima skupinama, v katere lahko razdelimo vibracijsko občutljive internevrone pri ravnokrilcih (Kühne, 1982b).

4.2.4 Fazično-tonični odziv ali adaptacija celic?

Nizkofrekvenčne receptorske celice LFR so se na dražljaje nizkih frekvenc odzivale fazno vezano; pri višjih intenzitetah teh dražljajev je število AP na fazo upadalo od začetka proti koncu dražljaja, vzrok je bila adaptacija celic. Posamezen sinusni dražljaj lahko namreč obravnavamo kot serijo kratkih dražljajev, pri katerih gre za periodično spreminjanje parametrov dražljaja (pospešek, hitrost, odmik iz ravnovesne lege). Zato opisanega odziva nizkofrekvenčnih receptorskih celic, kot tudi odzivov internevronov, kjer se frekvenca proženja AP niža tekom enega dražljaja (sl. 21, B; 22; 34; 43, A; 49), ne moremo obravnavati kot fazično-tonične odgovore, temveč zgolj kot adaptacijske procese celic. Omenjeno obliko odziva bi lahko pojmovali kot fazično ali fazično-tonično, če bi bil dražljaj drugačen, in sicer t.i. *ramp* oz. graduiran dražljaj, kjer lahko ločimo fazo naraščanja intenzitete (hitrosti, pospeška ipd.) in fazo konstantne intenzitete (tak dražljaj je npr. odmik čutilne dlake). V primeru sinusnih vibracijskih dražljajev enakomerna ali upadajoča frekvenca proženja AP tekom enega dražljaja kaže zgolj na različne stopnje adaptacije posameznih celic na nespremenjen dražljaj.

4.3 KODIRANJE SPEKTRALNIH, INTENZITETNIH IN ČASOVNIH PARAMETROV NARAVNIH NAPEVOV

Napevi žuželk so sestavljeni iz ritmičnih zaporedij bolj ali manj podobnih kratkih pulzov (signalov) in so navadno brez melodije, ki je značilna za komunikacijske signale vretenčarjev (Pollack, 2000). Receptorski sistemi mnogih žuželk so sposobni analize frekvenčnega spektra napeva, ki je v veliko primerih lahko informativen, a v večini primerov je najpomembnejši nosilec informacije časovna struktura napevov – dolžine signalov, njihova ponavljalna frekvenca in združevanje v signale višjega reda (Pollack, 2000). Čeprav je slednja trditev zapisana za zvočne napeve žuželk, pa v veliki meri velja tudi za vibracijske napeve.

Receptorske celice in vibracijske internevrone zelene smrdljivke lahko razdelimo v dve skupini (sl. 69): v prvi so celice, uglašene na 50 Hz (oz. nižje), v drugi pa celice, uglašene na 100-300 Hz. Noben od identificiranih vibracijskih nevronov ni ozko uglašen na dominantno frekvenco napeva lastne vrste (ok. 80-120 Hz), medtem ko jih večina natančno kopira trajanje vibracijskega signala ter njegovo amplitudno modulacijo (sl. 57 in 58). To seveda ne velja za celice, pri katerih je odgovor seštevek ekscitacijskih in inhibicijskih vhodov, kar prekine pot kopiranja vhodnega signala. Slušni nevroni ravnokrilcev prav tako pri večini vrst niso ozko uglašeni na frekvenco napeva lastne vrste (Atkins in Pollack, 1987; Kalmring in sod., 1997) in

tudi vedenjski poskusi so pokazali široko toleranco živali do spreminjanja frekvence napeva, medtem ko lahko že manjše spremembe v njegovem časovnem vzorcu spremenijo njihov odziv. Receptorske celice kopirajo amplitudno modulacijo zvočnega dražljaja skozi vzorec proženja akcijskih potencialov, vzpenjajoči internevroni pa predstavljajo skupino celic z raznolikimi tipi odzivov z mnogoterimi interakcijami ekscitacije in inhibicije (Ronacher in Stumpner, 1988). Nekateri, npr. AN1, enako kot receptorske celice natančno kopirajo napeve z različnimi časovnimi vzorci (variacije v dolžini signala in njihovi ponavljalni frekvenci), medtem ko pri drugih, npr. AN2, odziv ni kopija časovnega vzorca signala (Schildberger, 1984). Receptorske celice in vzpenjajoči nevroni ravnokrilcev niso uglašeni na časovni vzorec napeva lastne vrste, temveč se selektivnost za določen časovni vzorec napeva pojavi šele na nivoju višjih asociacijskih centrov v možganih (Schildberger, 1984). Znano je, da tudi vrstna specifičnost napeva zelene smrdljivke temelji predvsem na časovnih parametrih napevov in manj na samem frekvenčnem spektru, že zaradi tega, ker so posamezni napevi po frekvenčni sestavi med seboj zelo podobni (Čokl in sod., 1978; Hrabar in sod., 2004). Analiza frekvenčne in amplitudne modulacije znotraj posameznega signala samičinega pozivnega napeva nam pokaže, da oba tipa modulacije sovpadata le v drugem delu signala, medtem ko v prvem delu maksimum frekvenčnega spektra nastopi pred amplitudnim. Razlika v intenziteti med dominantnim in prvim subdominantnim frekvenčnim vrhom v vibracijskem signalu samičinega pozivnega napeva na sl. 58 znaša 22 dB. Na podlagi intenzitetnih krivulj posameznih tipov identificiranih receptorskih celic in internevronov sklepamo, da so takšne razlike v intenziteti posameznih frekvenčnih vrhov zadosti velike, da jih živčni sistem stenice zazna. Skupine celic z različno uglašenostjo se na isti signal odzovejo z različnim vzorcem proženja akcijskih potencialov (sl. 58-60). Krivulje kumulativnih frekvenc kažejo, da frekvence proženja akcijskih potencialov najbolj naraščajo v delih signala, ko frekvenca in amplituda naraščata, in se ustalijo v delu signala, ko frekvenca in amplituda spet nekoliko upadeta. Znižanje intenzitete med posameznimi pulzi signala sovpada s 'pavzami' v rasterskem diagramu odzivov internevronov. Absolutna intenziteta v teh 'vozlih' znaša okoli 10 cm/s², kar je za večino identificiranih celic nadpražna jakost. Domnevamo, da do prenehanja proženja akcijskih potencialov pride zaradi desenzitizacije po delu dražljaja z visoko intenziteto (Poulet in Hedwig, 2002), kar omogoča da se časovno-intenzitetni vzorec signala kopira v vzorcu akcijskih potencialov.

Vzrok za razhajanje med uglašenostjo receptorjev in dominantno frekvenco vibracijskih napevov zelene smrdljivke lahko iščemo v dejstvu, da je komunikacija najbolj učinkovita takrat, ko je zagotovljena optimalna uglasitev med oddajnikom, medijem za prenos signalov in sprejemnikom signala. Ker sta prvi in zadnji segment komunikacijskega sistema pri zeleni smrdljivki poznana, je treba odgovore za razhajanje poiskati pri zelenih rastlinah, ki

so gostiteljice zelene smrdljivke. Dominantna resonančna frekvenca teh rastlin je 160-215 Hz, kar sovpada z območjem največje občutljivosti srednjefrekvenčnih receptorjev, medtem ko subdominantni resonančni vrhovi okoli in pod 100 Hz ležijo blizu dominantne frekvence samega vibracijskega napeva in največje občutljivosti nizkofrekvenčnih receptorjev (Čokl in sod., 2005).

4.4 ORIENTACIJA V SMERI VIRA VIBRACIJSKIH SIGNALOV

4.4.1 Amplitudne razlike

Na podlagi rezultatov (sl. 56) domnevamo, da amplitudni gradienti oz. amplitudne razlike med steblom rastline in peclji oz. stranskimi vejami niso zanesljiv znak za orientacijo. Vzrok so specifične fizikalne zakonitosti prenosa vibracijskih signalov po rastlinah (Michelsen in sod., 1982; Barth 1998, 2002). Na rastlinah amplituda vibracijskega signala ne upada monotono z razdaljo od vira vibracij, temveč oscilira. Signali so lahko na vrhu rastline ali na listu močnejši kot pa na steblu v bližini pojoče samice (Michelsen in sod., 1982; Čokl, 1988), pri prenosu skozi listno ploskev pa je dušenje signala večje kot pri prenosu skozi žile (Čokl in sod., 2004).

Zaradi pojava stoječega valovanja in disperznega prenosa vibracij po rastlinah se razmerja med intenzitetami posameznih frekvenčnih komponent znotraj vibracijskega signala spreminjajo z oddaljenostjo od vira vibracij (sl. 62, B in C). Razlike v razmerjih med posameznimi frekvenčnimi vrhovi, do katerih pride med prevajanjem signala po rastlini, so dovolj velike, da jih identificirani vibracijski nevroni pri zeleni smrdljivki lahko zaznajo, kar je razvidno iz intenzitetnih krivulj posameznih identificiranih receptorskih celic in internevronov. S tem potrjujemo, da na podlagi funkcijskih lastnosti identificiranih celic obstaja možnost, da omenjene razlike med posameznimi frekvenčnimi vrhovi živalim lahko služijo kot parameter za določanje razdalje do vira vibracij, kot so predlagali v raziskavah Keuper in Kühne (1983), Čokl (1988) ter Čokl in sod. (1999). Da bi omenjene parametre živali lahko uporabljale tudi za orientacijo, pa mora nujno obstajati neka zveznost oz. predvidljivost v spreminjanju signala od oddajnika do sprejemnika. Zaradi različnih relativnih intenzitet frekvenčnih vrhov znotraj vibracijskih signalov, posnetih na različnih oddaljenostih od pojoče samice na vrhu ciperusa, je vzorec aktivnosti vibracijskih nevronov različen za signala 1 in 2 (sl. 63 in 64). To pomeni, da se različni tipi internevronov različno odzovejo na spremembe v frekvenčnem spektru signala. Odgovor na signal z nižjo intenziteto ni enostavno šibkejši odgovor na prvi signal, temveč je pri različnih celicah stopnja zmanjšanja aktivnosti različna, pri nekaterih pa se ta celo poveča (sl. 66). Zaradi sprememb v relativnih intenzitetah frekvenčnih komponent se spremeni tudi sama dinamika proženja akcijskih potencialov tekom dražljaja (različno za različne celice), kar rezultira v različni razporeditvi krivulj kumulativnih frekvenc in različnih dendrogramih za oba signala (sl. 64, 65).

4.4.2 Časovni zamik

Uporaba časovnega zamika kot parametra za orientacijo na podlagi vibracijskih signalov je bila pri majhnih žuželkah dolgo časa vprašljiva. Omejitev so predstavljale kratke razdalje med receptorskimi strukturami – razpon nog pri zeleni smrdljivki znaša na primer 1 cm. Domnevali so, da na tako kratki razdalji ne morejo nastati dovolj veliki časovni zamiki, da bi jih živčni sistem zaznal. Najkrajši vedenjski prag za časovni zamik so izmerili pri škorpijonih, ki so se lahko orientirali na podlagi zakasnitve 0,2 ms med posameznimi receptorji (Brownell in Farley, 1979). Ena od strategij, ki jih živali uporabljajo za povečanje razdalje med receptorji, je npr. specifična razporeditev nog na vejah okoli križišča (Ota in Čokl, 1991; Čokl in sod., 1999); tako je lahko na križišču razdalja, ki jo mora prepotovati dražljaj od enega do drugega receptorja, dejansko večja od samega razpona nog.

Časovni zamik med prihodom vibracijskega signala na dve točki, med seboj oddaljeni 2 cm, ki smo ga izmerili na ipsilateralni in kontralateralni strani razvejitve na fižolu, znaša več kot 2 ms. Iz izmerjenih zamikov izračunana hitrost prenosa signala znaša 5-10 m/s. Tak zamik je dovolj velik, da ga živčni sistem lahko zazna. Izračunana hitrost je precej nižja od hitrosti, izmerjene na bobu (36 m/s za signal frekvence 200 Hz) (Michelsen in sod., 1982). Domnevamo, da so majhne hitrosti povezane s specifično mehansko zgradbo določenega dela rastline. Barth (1998) navaja velik vpliv mehanskih lastnosti posameznih delov rastline na hitrost prevajanja vibracijskih signalov: hitrost signalov frekvence 30 Hz je na bazalnem delu lista agave znašala 35,7 m/s, na apikalnem delu lista pa zgolj 4,4 m/s, kar je primerljivo z našimi rezultati. Kljub temu moramo biti pri oceni hitrosti prenosa signalov previdni; upoštevati moramo, da smo izmerili zgolj fazni zamik. Fazna hitrost signala (*phase velocity*) pa se lahko precej razlikuje od skupne hitrosti signala (*group velocity*) (Kremer in Heckl, 1973). Zamiki, ki smo jih izmerili, so namreč lahko zgolj posledica nihanja celotne rastline zaradi odbojev valovanja na vrhu rastline in pri koreninskem sistemu, kar pomeni, da je ocena skupne hitrosti signala iz izmerjenih vrednosti zgolj orientacijska vrednost.

Fazne zamike, ki se pojavijo pri prenosu signala preko križišča lahko z gotovostjo zaznajo receptorske celice, ki se na signale odzivajo fazno vezano (sl. 11). Zamik, ki nastane med proženjem akcijskih potencialov senzoričnih vhodov na eni in drugi strani telesa lahko ojačijo lokalni internevroni, ki povezujejo lateralni polovici ustreznega ganglija. Domnevamo, da

so pri orientaciji zelene smrdljivke udeleženi CG-L internevroni, ki podobno kot omega nevroni ravnokrilcev (Römer in sod., 1981; Horseman in Huber, 1994a, b; Faulkes in Pollack, 2000) posredujejo lateralno inhibicijo na kontralateralno celico v paru in selektivno ojačijo vhode na ipsilateralni strani telesa ter ojačijo razliko v času prihoda vibracijskega signala do posameznih receptorjev. Glede na lego vhodnih in izhodnih regij ter latence odgovorov sklepamo, da so v mehanizmih orientacije udeleženi tudi internevroni tipa CG-AC-1 in PTG-DC.

4.5 MODEL ŽIVČNE MREŽE ZA PROCESIRANJE VIBRACIJSKIH SIGNALOV PRI ZELENI SMRDLJIVKI

Reeve in Webbova (2003) sta na podlagi doslej opisanih strukturnih in funkcijskih lastnosti slušnih celic pri murnu skonstruirala model živčnih povezav za fonotaksijo oz. usmerjeno gibanje proti viru zvočnih signalov. Omenjeni model, predstavljen na sl. 71, A, so vgradili v robota, ki je uspešno prestal 'vedenjske' poskuse. Avtorji so v model vključili celice, katerih delovanje je najbolje raziskano: omega nevron ON1 v protorakalnem gangliju, vzpenjajoči internevron AN1, ki nosi vzburjenje iz protorakalnega ganglija v možgane in možganska internevrona BNC1 in BNC2. Tako AN1 kot ON1 sta monosinaptično povezana z receptorskimi celicami. AN1 nosi vzburjenje po ipsilateralni strani v možgane, medtem ko omega nevron prečka medialno linijo ganglija in inhibira delovanje kontralateralno ležeče celice AN1 ter bilateralno simetričnega omega nevrona s somo v nasprotni polovici ganglija. Omega nevroni tako ojačujejo lateralni kontrast intenzitete zvoka.

Znani modeli živčnih mrež za orientacijo proti viru vibracij pri členonožcih so primeri umetnih živčnih mrež (ANN - *artificial neural network* = connectionist network) (Hergenröder in Barth, 1983 (pajki); Brownell in van Hemmen, 2001 (škorpijoni); Snyder, 1998 (vodni drsalci)). Te ne temeljijo na dejanskih identificiranih nevronih, kot opisani model pri murnu, temveč zgolj na rezultatih vedenjskih poskusov. Pri takih modelih mrež ne gre za dejansko posnemanje delovanja posameznih nevronov v živčnem sistemu temveč zgolj za to, da umetna mreža čim bolj uspešno posnema določen odziv živali na nek dražljaj (npr. orientacija v smeri dražljaja). Zaradi manjše omejenosti z natančnim upoštevanjem funkcionalnih lastnosti posameznih nevronov v modelu so te mreže primerne za modeliranje kompleksnejših živčnih sistemov.

V naslednjih vrsticah podajamo prvi model živčne mreže za vibrotaksijo (sl. 71, B), ki temelji na dejanskih identificiranih nevronih in njihovih karakteristikah. Pri izdelavi modela smo se naslanjali na model za fonotaksijo murna. Zaradi lažje predstave smo se omejili na vhoda iz zadnjega para nog oz. na metatorakalni del centralnega ganglija ter na celice tipov LFR, CG-L in CG-AC-1, vse uglašene na 50 Hz. Na podlagi strukture in lege CG-L celic zelene smrdljivke domnevamo, da imajo podobno vlogo kot ON1 murna. Glede na latenco odzivov ekscitirane celice (str. 65) obstaja verjetnost monosinaptične povezave z receptorskimi celicami. Pri ostalih dveh lokalnih internevronih smo zabeležili inhibicijo; domnevamo, da je eden od virov lahko bilateralno simetrična celica v paru. V model smo ob CG-L nevronih vključili še najpogosteje obarvan tip internevrona, CG-L-1. Latence odzivov kažejo, da so vsaj nekatere celice iz te skupine z receptorskimi celicami povezane neposredno. Kot AN1 nevron murna tudi celica CG-AC-1 prevaja informacijo o dražljaju proti možganom, vendar ne ostaja na ipsilateralni strani ganglija, temveč takoj prečka medialno linijo in teče anteriorno po kontralateralni strani živčnega sistema. Lokalni nevroni prejemajo vhode na eni strani ganglija ter na drugi strani inhibirajo CG-AC-1 in svoj bilateralno simetrični par. CG-AC-1 celice poleg tega, da prevajajo informacijo iz receptorskih celic v možgane, tvorijo izhodne sinapse v nevropilah kontralateralnih nog. Domnevamo, da s presinaptično inhibicijo receptorskih celic povečajo lateralni kontrast vibracijskega dražljaja. Pri tem so lahko udeleženi tudi lokalni nevroni. Procesiranje vibracijskih dražljajev v možganih zelene smrdljivke zaenkrat še ni znano.

Kljub temu, da smo se pri poskusu modeliranja živčne mreže omejili zgolj na dva senzorična vhoda, kaže, da stoji za procesiranjem vibracijskih signalov veliko bolj kompleksen sistem kot je mreža za procesiranje zvoka pri murnu. Za razumevanje delovanja celotnega sistema pa moramo upoštevati še vhode iz ostalih nog, iz anten, prispevek ostalih tipov internevronov ter dejstvo, da poleg asociacijskih nevronov v možganih verjetno obstaja še kopica neidentificiranih celic tudi v torakalnih ganglijih. V protorakalnem gangliju pričakujemo dodatne lokalne internevrone, vzpenjajoče nevrone in spuščajoče nevrone, podobne celici PTG-DC, ki verjetno prav tako sodeluje pri orientaciji živali, saj vzburjene prenaša iz prve kontralateralne noge v drugo in tretjo ipsilateralno. Predstavljena živčna mreža je tako le zelo poenostavljen poskus razumevanja analize vibracijskih signalov v centralnem živčevju.



Slika 71: Modela živčnih mrež. A. Živčna mreža za fonotaksijo, temelječa na nevroanatomiji murna. ON – omega nevron; AN – vzpenjajoči (*ascending*) nevron; BNC – možganski (*brain*) nevroni. Po Reeve in Webb, 2003. B. Model dela živčne mreže za 'vibrotaksijo' (usmerjeno gibanje proti viru vibracij), temelječe na nevroanatomiji zelene smrdljivke.

4.6 SKLEPI

V primerjavi s kompleksnostjo vedenjskega nivoja vibracijske komunikacije pri zeleni smrdljivki in zapletenimi fizikalnimi zakonitostmi prenosa vibracijskih signalov po rastlinah je receptorski nivo procesiranja vibracijskih signalov relativno enostaven. Zato smo domnevali, da je centralno procesiranje veliko bolj kompleksno. Ugotovili smo, da je podprto z mrežo internevronov, katerih odzivi na vibracijske signale so rezultat mnogoterih interakcij inhibicijskih in ekscitacijskih vhodov, ki modulirajo osnovno časovno in frekvenčno (ne)uglašenost vibracijskega sistema.

Receptorske celice so omejene na ipsilateralno polovico ganglijev, v zgradbi senzoričnih nevropil v centralnem gangliju pa smo opazili določeno mero tonotopije. Območje delovanja in prenos informacije od določenih receptorskih celic na postsinaptične internevrone je uravnavano s presinaptično inhibicijo. Opisali smo devet tipov internevronov, ki so uglašeni na 50 Hz oz. na 100-200 Hz. Na podlagi latenc njihovih odgovorov ter lege vhodnih in izhodnih regij v ganglijih smo ugotavljali povezljivost posameznih tipov. Celice CG-AB so podobne DUM celicam ravnokrilcev, domnevamo, da imajo podobno, nevromodulatorno funkcijo. Opisali smo tudi tri lokalne internevrone (CG-L), ki imajo verjetno podobno vlogo kot omega nevroni ravnokrilcev in omogočajo orientacijo živali na podlagi lateralne inhibicije. Domnevamo, da se živali na križiščih na rastlinah orientirajo na podlagi časovnih zamikov, saj so ti večji od 2 ms in jih opisan živčni sistem lahko zazna. Prav tako je živčni sistem zelene smrdljivke sposoben zaznati spremembe v relativnih intenzitetah posameznih frekvenčnih komponent znotraj posameznega vibracijskega signala, do katerih pride med prenosom vibracij po rastlini. Te razlike bi lahko živalim služile za določanje oddaljenosti vira vibracijskih signalov in/ali orientacijo.

Dosedanje raziskave nevrobiološke ravni zaznavanja vibracij temeljijo predvsem na skupinah žuželk, ki za komunikacijo uporabljajo primarno zvočne signale in pri katerih je zaznavanje vibracij stranskega pomena oz. zgolj dopolnjuje zvočno komunikacijo in ne omogoča (ali pa le delno) orientacije proti viru vibracij. S pričujočo nalogo smo zapolnili vrzel v raziskavah procesiranja vibracijskih signalov, saj smo prvič opisali funkcijo in strukturo vibroreceptorskih celic in internevronov pri vrsti žuželk, pri kateri komunikacija z vibracijskimi signali predstavlja primarni kanal za sporazumevanje. Na podlagi vibracijskih signalov so osebki zelene smrdljivke sposobni razpoznati vrsto in spol živali ter se orientirati proti viru vibracij.

5 POVZETEK

Čeprav je vibracijska komunikacija najpogostejši način komuniciranja med žuželkami, je bila v preteklosti deležna neprimerno manj pozornosti kot zvočna komunikacija. Večina raziskav je omejena na vedenjski nivo, nevrobiološka raven vibracijske komunikacije pa je še v veliki meri neraziskana. Večina informacij o centralnem procesiranju vibracijskih signalov izvira iz raziskav na ravnokrilcih, pri katerih je primarna komunikacija z zvokom in orientacija na podlagi vibracij vedenjsko ni bila dokazana (kratkoroge kobilice) ali pa je relativno šibka (murni).

Pri stenici vrste *Nezara viridula* (L.) je vedenjski nivo vibracijske komunikacije že dobro raziskan. Tako samci kot samice producirajo vibracijske signale s tresenjem zadka, vibracije pa se nato preko nog prenašajo na rastlino. Opisanih je bilo več različnih vibracijskih napevov, značilnih za specifične vedenjske situacije. Eden od teh je samičin pozivni napev frekvence 80-100 Hz, ki ga oddaja mirujoča samica, medtem ko samec odgovarja s pozivnim napevom samca ter se premika proti njej. Na križiščih se mora samec orientirati v smeri vira vibracij.

Z laserskim vibrometrom smo snemali vibracijske signale samičinega pozivnega napeva na različnih točkah na ciperusu in fižolu. Ugotovili smo, da razlike v intenziteti med posameznimi točkami okoli križišča na fižolu (točka, kjer se odcepita listna peclja prvih dveh listov od stebla) niso zanesljiv parameter za orientacijo samca proti samici, saj intenziteta signala ni nujno višja na točki, ki je bližje viru vibracij. To je posledica disperzne propagacije vibracij po rastlinah in pojava stoječega valovanja zaradi odbojev na vrhu rastline in pri koreninah. Hitrost širjenja vibracij skozi križišče na fižolu je v primerjavi s hitrostmi, ki so jih izmerili na steblu rastline, precej nizka (5-10 m/s²), domnevamo, da zaradi specifičnih mehanskih lastnosti tega dela rastline. Časovni zamiki, ki nastanejo med prihodi vibracijskega signala do posameznih receptorjev so dovolj veliki (2-4 ms), da jih živčni sistem zelene smrdljivke zazna.

V sklopu elektrofizioloških poskusov smo živali dražili s serijo umetno sintetiziranih vibracijskih signalov različnih frekvenc (50-4000 Hz) in intenzitet (0,5-100 cm/s²) ter s serijo signalov samičinega pozivnega napeva, posnetih z laserskim vibrometrom na ciperusu in fižolu. Obliko in delovanje nevronov smo opisali z znotrajceličnim odvajanjem električne aktivnosti in sočasnim ionoforetičnim vnašanjem barvila Lucifer Yellow. Posamezne

nevrone smo združili v skupine na osnovi njihove morfologije ter jih poimenovali glede na frekvenčno območje največje občutljivosti (receptorske celice) oz. glede na lego some in potek aksona (internevroni).

Opisali smo dva tipa receptorskih celic, nizkofrekvenčne (LFR) in srednjefrekvenčne (MFR), ki projicirajo v centralni ganglij. Njihovi aksoni so omejeni na ipsilateralno polovico ganglija. Receptorske celice tipa LFR so najbolj občutljive pri 50 Hz in do 150 Hz odgovarjajo fazno vezano. Celice tipa MFR so bolj raznolike v svojem delovanju, pri eni od njih smo zabeležili vpliv presinaptične inhibicije. Projekcije receptorskih celic v senzorični nevropili kažejo tonotopično razporeditev.

Opisali smo 29 internevronov, ki smo jih razdelili v devet morfoloških tipov. V skupini CG-AC so celice s somo v centralnem gangliju in kontralateralno ležečim vzpenjajočim aksonom. Celice tipa CG-AB imajo dva vzpenjajoča aksona, po svoji obliki pa so podobne DUM celicam ravnokrilcev. Domnevamo, da imajo nevromodulatorno vlogo. Trije lokalni internevroni CG-L so omejeni na centralni ganglij. Zaradi njihove oblike in lege vhodnih ter izhodnih regij domnevamo, da podobno kot omega nevroni ravnokrilcev posredujejo lateralno inhibicijo in tako povečajo lateralni kontrast med vhodi z nasprotnih strani telesa ter sodelujejo pri orientaciji živali v smeri vira vibracij. Nevron PTG-DC ima somo v protorakalnem gangliju; domnevamo, da prejema vhode iz prve kontralateralne noge ter posreduje vzburjenje v območje nevropil druge in tretje ipsilateralne noge.

Internevrone v centralnem gangliju lahko na osnovi odziva na vibracijski signal samičinega pozivnega napeva razdelimo v tri večje skupine, v katerih so internevroni z različno frekvenčno uglašenostjo. Najvišjo frekvenco proženja akcijskih potencialov imajo internevroni z visoko spontano aktivnostjo, uglašeni na ok. 200 Hz (internevroni tipov CG-AC-2 do 5 oz. CG-AB). Vsi tipi internevronov relativno dobro kopirajo amplitudno modulacijo signala, na dinamiko proženja akcijskih potencialov pa vpliva tudi frekvenčna modulacija, ki v večjem delu vibracijskega signala sovpada z amplitudno.

Iz odzivov tridesetih internevronov na vibracijska signala, posneta na ciperusu na različnih oddaljenostih od pojoče samice smo ugotovili, da živali lahko zaznajo spremembe v relativnih intenzitetah posameznih frekvenčnih komponent, do katerih pride med prenosom vibracijskih signalov po rastlinah; te razlike lahko uporabijo za določanje smeri in/ali lokacije vira vibracij.

6 SUMMARY

Although vibrational communication is the most common form of communication among the insects, it has received much less attention than sound communication. The majority of research in the field of vibrations has been limited to the behavioural level of communication, while the neurobiological aspect is still largely unknown. Most of the available information about central processing of vibrational signals derives from research done on locusts and crickets that primarily rely on air-borne sound communication and for which either behavioural vibrational directionality has not been established (locusts) or is relatively weak (crickets).

In the southern green stinkbug, *Nezara viridula* (L.), the behavioural level of vibrational communication has been very well documented, which renders this species especially suitable for further research on central processing. Both males and females produce vibrational signals by vibrating the abdomen and the vibrations of the body are transmitted through the legs to the underlying plant tissue. A number of vibrational songs, characteristic for various behavioural situations, have been described. One of them is the female calling song with dominant frequency peak at 80-100 Hz. This type of song is emitted by the stationary female. The male responds with the male calling song while walking towards her and stopping at crossing points in order to orientate towards the source of vibrations.

Using the laser vibrometer we recorded vibrational signals of the female calling song from various points on cyperus and bean plants. We conclude that the intensity differences between different points around the branching are not a reliable orientation cue as the intensity of the signal is not necessarily higher on the branch leading to the vibration source. This is the result of dispersive propagation of vibration signals through plants and the occurrence of the standing wave conditions with nodes and internodes. The propagation velocity through the branching point is relatively low (5-10 cm/s²) compared to the velocities previously measured on other parts of the plant. The resulting time-of-arrival differences of the signal to vibration receptors in different legs are sufficiently large for the nervous system to detect (2-4 ms).

In electrophysiological experiments the animals' legs were stimulated by a series of computersynthesised vibrational signals of various frequencies (50-4000 Hz) and intensities (0,5-100 cm/s^2) and a series of signals of the female calling song, pre-recorded from cyperus and bean plants. We described morphology and physiology of neurones using intracellular recording of neural activity combined with ionophoretic staining of cells with intracellular dye Lucifer Yellow. Neurons were divided into groups based on their morphology and named based on the frequency sensitivity (receptor cells) or their general shape (interneurones).

We described two types of receptor cells, projecting to the central ganglion: the low frequency receptors (LFR) and the middle-frequency receptors (MFR). Their axons are limited to the ipsilateral side of the ganglion. LFR show highest sensitivity at 50 Hz and respond in a phase-locked manner up to 150 Hz. MFR cells are more heterogeneous in their physiology and in one of them presynaptic inhibition has been recorded. Central projections of receptor cells exhibit a certain level of tonotopy in the neuropils of the middle and hind legs in the central ganglion.

Twenty-nine interneurones were described and grouped into nine morphological types. Interneurones in group CG-AC have the cell body positioned in the central ganglion and an axon ascending to the prothoracic ganglion contralaterally. The CG-AB cells have two ascending neurones and are similar in gross morphology to the DUM neurons of Orthoptera. We presume those neurons are involved in neuromodulation. Three local interneurones (CG-L) exhibit morphology similar to the omega neuron in crickets. Based on the location of their input and output regions we assume those neurons are involved in enhancing the lateral contrast through lateral inhibition, thus enabling orientation. The cell body of PTG-DC neuron is located in the prothoracic ganglion; the neuron receives input from the first contralateral leg and carries information to the middle and hind leg on the ipsilateral side.

Based on the responses to vibrational signals of the female calling song the interneurones in the central ganglion can be divided into three groups with different tuning and sensitivity. Neurons with a high rate of spontaneous activity and best frequency sensitivity at 200 Hz exhibit the highest firing rate in response to the signal (types CG-AC-2 through 5 and CG-AB). All interneurones copy the amplitude modulation of the signal relatively well. Frequency modulation that coincides with amplitude modulation throughout most of the vibration signal also affects the dynamics of firing.

Analysis of the responses of thirty interneurones to vibrational signals, recorded on different distances from the singing female on a cyperus revealed that the stinkbugs are capable of detecting the changes in the relative intensities of different frequency components of the signal that occur with the propagation of signal through a plant. The animal may use this rough frequency and intensity analysis as a cue for orientation and/or distance estimation.

7 VIRI

- Abbott J. C., Stewart K. W. 1993. Male search behavior of the stonefly, *Pteronarcella badia* (Hagen) (Plecoptera, Pteronarcyidae), in relation to drumming. Journal of Insect Behaviour, 6(4): 467-481
- Aicher B., Tautz J. 1990. Vibrational communication in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Journal of Comparative Physiology, 243: 345-353
- Aldrich J. R., Lusby W. R. 1989. Pheromone blends of green stink bugs and possible parasitoid selection. Naturwissenschaften, 76: 173-175
- Aldrich J. R., Oliver J. E., Lusby W. R., Kochansky J. P., Lockwood J. A. 1987. Pheromone strains of the cosmopolitan pest, *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). Journal of Experimental Biology, 244: 171-175
- Atkins G., Pollack G. S. 1986. Age-dependent occurrence of an ascending axon on the omega neuron in the cricket *Telleogryllus oceanicus*. Journal of Comparative Neurology, 243: 527-534
- Atkins G., Pollack G. S. 1987. Response properties of prothoracic, interganglionic, soundactivated interneurons in the cricket *Teleogryllus oceanicus*. Journal of Comparative Physiology A, 161: 681-693
- Baker R., Borges M., Cooke N. G., Herbert R. H. 1987. Identification and synthesis of (Z)-(1'S,3'R,4'S)(–)-2-(3',4'-Epoxy-4'-methylcyclohexyl)-6-methylhepta-2,5-diene, the sex pheromone of the souhtern green stinkbug, *Nezara viridula* (L.). Journal of the Chemical Society, Chemical communication, 00: 414-416
- Barth F. G. 1998. The vibrational sense of spiders. V: Comparative Hearing: Insects. Hoy R. R., Popper A. N., Fay R. R. (ur.). New York, Springer Verlag(7): 228-278
- Barth F. G. 2002: A spider's world. Senses and behavior. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Bennet-Clark H. C. 1998. Size and scale effects as constraints in insect sound communication. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 353(1367): 407-419
- Bennet-Clark H. C. 1999. Resonators in insect sound production: How insects produce loud pure-tone songs. Journal of Experimental Biology, 202: 3347-3357
- Bickmeyer U., Kalmring K., Halex H., Mücke A. 1992. The bimodal auditory-vibratory system of the thoracic ventral nerve cord in *Locusta migratoria* (Acrididae, Locustinae, Oedipodini). Journal of Experimental Zoology, 264(4): 381-394

- 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: 257-263
- Blasiolli Moraes M. C., Laumann R. A., Čokl A., Borges M. 2005. Vibratory signals of four Neotropical stink bug species. Physiological Entomology, 30: 175-188
- 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. Entomologia Experimentalis et Applicata, 44: 205-212
- Bradbury J. W., Veherencamp S. L. 1998. Principles of Animal Communication. Sinauer, Sunderland, Massachusetts
- Bräunig P. 1997. The peripheral branching pattern of identified dorsal unpaired median (DUM) neurones of the locust. Cell & Tissue Research, 290: 641-654
- Brownell P. 1977. Compressional and surface waves in sand: Used by desert scorpions to locate prey. Science, 197: 479-482
- Brownell P., Farley R. D. 1979. Orientation to vibrations in sand by the nocturnal scorpion *Paruroctonus mesaensis* Mechanism of target localization. Journal of Comparative Physiology, 131(1): 31-38
- Brownell P. H., van Hemmen J. L. 2001. Vibration sensitivity and a computational theory for prey-localizing behavior in sand scorpions. American Zoologist, 41(5): 1229-1240
- Buño W., Monti-Bloch L., Mateos A., Handler P. 1981. Dynamic properties of cockroach cercal "threadlike" hair sensilla. Journal of Neurobiology, 12(2): 123-141
- Burrows M. 1996. The neurobiology of an insect brain. New York, Oxford University Press, Inc., 682 str.
- Burrows M., Laurent G. 1993. Synaptic potentials in the central terminals of locust proprioreceptive afferents generated by other afferents from the same sense organ. Journal of Neuroscience, 13(2): 808-819
- Burrows M., Matheson T. 1994. A presynaptic gain control mechanism among sensory neurons of a locust leg proprioreceptor. Journal of Neuroscience, 14(1): 272-282
- Büschges A. 1994. The physiology of the sensory cells in the ventral scoloparium of the stick insect femoral chordotonal organ. Journal of Experimental Biology, 189: 285-292
- Chapman R. F. 1998. The Insects. Structure and function. Cambridge, Cambridge University Press 4: 546-547

- Clarac F., Cattaert D. 1999. Functional multimodality of axonal tree in invertebrate neurons. Journal of Physiology, 93: 319-327
- Claridge M. F. 1985. Acoustic signals in the Homoptera Behavior, taxonomy and evolution. Annual Revue of Entomology, 30: 297-317
- Cocroft R. B. 2001. Vibrational communication and the ecology of group-living herbivorous insects. American Zoologist, 41: 1215-1221
- 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
- Cocroft R. B., Rodríguez R. L. 2005. The behavioral ecology of insect vibrational communication. BioScience, 55(4): 323-334
- Comer C. M., Robertson R. M. 2001. Identified nerve cells and insect behavior. Progress in Neurobiology, 63: 409-439
- 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. 1988. Vibratory signal transmission in plants as measured by laser vibrometry. Periodicum Biologorum, 90(2): 193-196
- Čokl A., Amon T. 1980. Vibratory interneurons in the central nervous system of *Nezara viridula* L. (Pentatomidae, Heteroptera). Journal of Comparative Physiology, 139(1): 87-95
- Čokl A., Bogataj E. 1982. Faktorji, ki vplivajo na vibracijsko komunikacijo pri stenici *Nezara viridula* L. (Heteroptera, Pentatomidae). Biološki vestnik 30(1): 1-20
- Čokl A., Gogala M., Blaževič A. 1978. Principles of sound recognition in three Pentatomide bug species (Heteroptera). Biološki vestnik, 26(2): 81-94
- Čokl A., Kalmring K., Rossler W. 1995. Physiology of atympanate tibial organs in forelegs and midlegs of the cave-living Ensifera, *Troglophilus neglectus* (Raphidophoridae, Gryllacridoidea). Journal of Experimental Zoology, 273(5): 376-388
- 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., McBrien H., Millar J. G. 2001. Comparison of substrate-borne vibrational signals of two stink bug species, *Acrosternum hilare* and *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). Annals of the Entomological Society of America 94(3): 471-479

- 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, 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: 1-10
- Čokl A., Virant-Doberlet M. 2003. Communication with substrate-borne signals in small plant-dwelling insects. Annual Review of Entomology, 48: 29-50
- Čokl A., Virant-Doberlet M., McDowell A. 1999. Vibrational directionality in the southern green stink bug *Nezara viridula* (L.) is mediated by female song. Animal Behaviour, 58: 1277-1283
- Čokl A., Virant-Doberlet M., Stritih N. 2000a. Temporal and spectral properties of the songs of the southern green stink bug *Nezara viridula* (L.) from Slovenia. European Journal of Physiology, 439: 168-170
- Čokl A., Virant-Doberlet M., Stritih N. 2000b. The structure and function of songs emitted by southern green stink bugs from Brazil, Florida, Italy and Slovenia. Physiological Entomology, 25: 196-205
- Čokl A., Virant-Doberlet M., Zorović M. 2005a. 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, *v tisku*
- Čokl A., Zorović M., Žunič A., Virant-Doberlet M. 2005b. Tuning of host plants with vibratory songs of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). Journal of Experimental Biology, 208: 1481-1488
- Dambach M. 1972. Der Vibrationssinn von Gryllen. II. Antvorten von Neuronen im Bauchmark. Journal of Comparative Physiology A, 79: 305-324
- Dambach M. 1989. Vibrational Responses. V: Cricket Behaviour and Neurobiology. Huber F., Moore J. E., Loher W. (ur.). Ithaca, London, Cornell University Press (6): 178-197
- Debaisieux P. 1938. Organes scolopidiaux des pattes d'Insectes. II. La Cellule, 47: 77-202
- 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., Amon T. 1997. Substrate vibration sensitivity of the leg scolopidial organs in the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. Journal of Insect Physiology, 43(5): 433-437

- Devetak D., Gogala M., Čokl A. 1978. Prispevek k fiziologiji vibroreceptorjev stenic iz družine Cydnidae (Heteroptera). Biološki vestnik, 26(2): 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 Delakorda S. 2004. Leg chordotonal organs and campaniform sensilla in *Chrysoperla* Steinmann 1964 (Neuroptera): structure and function. Denisia, 13: 163-171
- Drašlar K. 1973. Functional properties of trichobothria in the bug *Pyrrhocoris apterus*. Journal of Comparative Physiology, 84: 175-184
- 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
- Esch H., Huber F., Wholers D. W. 1980. Primary auditory neurons in crickets: physiology and central projections. Journal of Comparative Physiology, 137: 27-38
- Ewing A. W. 1989. Mechanisms of sound production. V: Arthropod bioacoustics: Neurobiology and behaviour. Edinburgh, Edinburgh University Press: 16-57
- Faulkes Z., Pollack G. S. 2000. Effects of inhibitory timing on contrast enhancement in auditory circuits in crickets (*Teleogryllus oceanicus*). Journal of Neurophysiology, 84(3): 1247-1255
- Field L. H., Bailey W. J. 1997. Sound production in primitive Orthoptera from western Australia: Sounds used in defence and social communication in *Ametrus* sp. and *Hadrogryllacris* sp. (Gryllacrididae: Orthoptera). Journal of Natural History 31: 1127-1141
- Field L. H., Pflüger H. J. 1989. The femoral chordotonal organ. A bifunctional orthopteran (*Locusta migratoria*) sense organ. Comparative Biochemistry and Physiology, 93A: 729-743
- Field L. H., Matheson T. 1998. Chordotonal Organs of Insects. Academic Press. London, 229 str.
- Gogala A., Gogala M. 1989. True bugs of Slovenia (Insecta: Heteroptera). Biološki vestnik, 37(1): 11-44
- Goodman C. S., Pearson K. G., Heitler W. J. 1979. Variability of identified neurons in grasshoppers. Comparative Biochemistry and Physiology A, 64: 455-462
- Goulson D., Birch M. C., Wyatt T. D. 1994. Mate location in the deathwatch beetle, *Xestobium rufovillosum* De-Geer (Anobiidae) Orientation to substrate vibrations. Animal Behaviour, 47(4): 899-907

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. Journal of Experimental Biology, 203: 1633-1648
- Grosch A., Callender F., Petersen M., Čokl A., 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 Verlag: 151-161
- 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., Burrows M. 1996. Presynaptic inhibition of sensory neurons during kicking movements of the locust. Journal of Neurophysiology, 75: 1221-1232
- Hedwig B., 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). Berlin, Paul Parey Verlag: 61-72
- Hennig R. M. 1988. Ascending auditory interneurons in the cricket *Teleogryllus commodus* (Walker): comparative physiology and direct connections with afferents. Journal of Comparative Physiology A, 163: 153-143
- Henry C. S. 1994. Singing and cryptic speciation in insects. Trends in Ecology & Evolution, 9: 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: 361-371
- 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: 69-88
- Hokkanen H. 1986. Polymorphism, parasites, and the native area of *Nezara viridula* (Hemiptera, Pentatomidae). Annales Entomologicae Fennicae, 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*. Journal of Comparative Physiology, 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. Journal of Comparative Physiology A, 175: 399-413

- Hoy R. R., Hoikkala A., Kaneshiro K. 1988. Hawaiian courtship songs Evolutionary innovation in communication signals of *Drosophila*. Science, 240: 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
- Hunt R. E. 1994. Vibrational signals associated with mating bahavior in the treehopper, *Enchenopa binotata* Say (Hemiptera: Homoptera: Membracidae). Journal of the New York Entomological Society, 102: 266-270
- Ivanov V. D. 1993. Principles of sexual communication in caddisflies (Insecta, Trichoptera).V: Sensory systems of arthropods. Gribakin F. G., Popov A. V., Renneinger G. (ur.).Birkenhäuser Verlag, Basel, str.: 609-626
- Jackson R. R., Walls E. I. 1998. Predatory and scavenging behaviour of *Microvelia macgregori* (Hemiptera : Veliidae), a water-surface bug from New Zealand. New Zealand Journal of Zoology, 25(1): 23-28
- Jeram S., Čokl A. 1996. Mechanoreceptors in insects: Johnston's organ in Nezara viridula (L.) (Pentatomidae, Heteroptera). European Journal of Physiology, 431 (Suppl): R281-R282
- 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. 1988. World review of the parasitoids of the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). Annals of the Entomological Society of America, 81(2): 262-273
- Kalmring K. 1975. The afferent auditory pathway in the ventral cord of *Locusta migratoria* (Acrididae). I. Synaptic connectivity and information processing among the auditory neurons in the ventral cord. Journal of Comparative Physiology, 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. Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag
- Kalmring K., Hoffmann E., Jatho M., Sickmann T., Grossbach M. 1996. The auditoryvibratory sensory system of the bushcricket *Polysarcus denticauda* (Phaneropteriane, Tettigoniidae). II. Physiology of receptor cells. The Journal of Experimental Zoology, 276: 315-329
- Kalmring K., Jatho M., Rössler W., Sickmann T. 1997a. Acousto-vibratory communication in bushcrickets (Orthoptera: Tettigoniidae). Entomologia Generalis, 21(4): 265-291

- Kalmring K., Kühne 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
- Kalmring K., Lewis B., Eichendorf 1978. The physiological characteristics of primary neurons of the complex tibial organ of *Decticus verrucivorus* L. (Orthoptera, Tettigoniidae). Journal of Comparative Physiology, 127: 109-121
- Kalmring K., Rössler W., Unrast C. 1994. Complex tibial organs in the forelegs, midlegs, and hindlegs of the bushcricket *Gampsocleis gratiosa* (Tettigoniidae): Comparison of the physiology of the organs. The Journal of Experimental Zoology 270: 155-161
- Kalmring K., Sickmann T., Jatho M., Zhantiev R., Grossbach M. 1997b. The auditoryvibratory sensory system of *Polysarcus denticauda* (Phaneropterinae, Tettigoniidae): III. Physiology of the ventral cord neurons ascending to the head ganglia. The Journal of Experimental Zoology, 279: 9-28
- Keil T. A. 1998. The structure of integumental mechanoreceptors. V: Microscopic anatomy of invertebrates. Vol. 11: Insecta. Wiley-Liss, Inc., str.: 385-404
- Keuper A., Kühne R. 1983. The acoustic behaviour of the bushcricket *Tettigonia cantans*.II. Transmission of airborne sound and vibration signals in the biotope. Behavioral Processes 8:125-145
- Kilpinen O., Michelsen A. 1994. Vibration sensitive neurons in the honeybee, *Apis mellifera*. Elsner N., Breer H. (ur.). Stuttgart, Georg Thieme Verlag, II, str.: 324-324
- Kon M., Oe A., Numata H., Hidaka T. 1988. Comparison of the mating behaviour between two sympatric species, *Nezara antennata* and *N. viridula* (Heteroptera: Pentatomidae), with special reference to sound emission. Journal of Ethology, 6(2): 91-98
- Kraus W. F. 1989. Surface wave communication during courtship in the giant water bug, *Abedus indentatus* (Heteroptera, Belostomatidae). Journal of the Kansas Entomological Society, 62(3): 316-328
- Kremer L., Heckl M. 1973. Structure-borne sound. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag: str. 103-115
- Kühne R. 1982a. Neurophysiology of the vibration sense in locusts and bushcrickets: Response characteristics of single receptor units. Journal of Insect Physiology, 28: 155-163
- Kühne R. 1982b. 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., 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
- Lakes R., Schikorski T. 1990. Neuroanatomy of Tettigoniids. V: The Tettigoniidae: Biology, systematics and evolution. Bailey W. J., Rentz.W.J. (ur.). Bathurst, Crawford House Press
- Loher W., Dambach M. 1989. Reproductive behaviour. V: Cricket behaviour and neurobiology. Huber F., Moore J. E., Loher W. (ur.). Ithaca, London, Cornell University Press, str.: 43-82
- Markl H. 1983. Vibrational communication. V: Neuroethology and Behavioral Physiology. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag, str.: 332-353
- Markl H., Lang H., Wiese K. 1973. Die Genauigkeit der Ortung eines Wellenzentrums durch ein Rückenscwimmer *Notonecta glauca* L.. Journal of Comparative Physiology, 86: 359-364
- Mason A. C. 1991. Hearing in a primitive ensiferan: the auditory system of *Cyphoderis monstrosa* (Orthoptera: Haglidae). Journal of Comparative Physiology, 168: 351-363
- Mason A. C., Forrest T. G., Hoy R. R. 1998. Hearing in mole crickets (Orthoptera, Gryllotalpidae) at sonic and ultrasonic frequencies. Journal of Experimental Biology, 201: 1967-1979
- Mason A. C., Oshinsky M. L., Hoy R. R. 2001. Hyperacute directional hearing in a microscale auditory system. Nature, 410: 686-690
- Mason A., Schildberger K. 1993. Auditory interneurones in *Cyphoderris monstrosa* (Orthoptera, Haglidae). Journal of Comparative Physiology, 168: 351-363
- Matheson T. 1992. Morphology of the central projections of physiologically characterised neurones from the locust metathoracic femoral chordotonal organ. Journal of Comparative Physiology, 170: 101-120
- McBrien H., Millar J. G. 1999. Phytophagous bugs. V: Pheromones of non-Lepidopteran insects associated with agricultural plants. Hardie J., Minks A. K. (ur.). Wallingford, CAB International, str.: 277-304
- Meyhöfer 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 B, 264(1379): 261-266
- Michel K., Amon T., Čokl A. 1983. The morphology of the leg scolopidial organs in *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera, Pentatomidae). Revue Canadienne de Biologie Experimentale, 42(2): 139-150
- Michelsen A., Fink F., Gogala M., Traue D. 1982. Plants as transmission channels for insect vibrational songs. Behavior, Ecology and Sociobiology, 11: 269-281
- Michelsen A., Kirchner W. H., Lindauer M. 1986. Sound and vibrational signals in the dance language of the honeybee, *Apis mellifera*. Behavior, Ecology and Sociobiology, 18: 207-212
- Michelsen A., Larsen O. N. 1983. Strategies for acoustic communication in complex environments. V: Neuroethology and behavioral physiology. Huber F., Markl F. (ur.). Berlin, Heidelberg, Springer Verlag, str.: 321-331
- Michieli S., Žener B. 1968. Der Sauerstoffverbrauch verschiedener Farbstadien bei der Wanze *Nezara viridula* (L.). Zeitschrift fur vergleichende Physiologie, 58: 223-224
- Miklas N., Stritih N., Čokl A., Virant-Doberlet M., Renou M. 2001. The influence of the substrate on the male responsiveness to the female calling song in *Nezara viridula*. Journal of Insect Behavior, 14(3): 313-332
- Miklas N., Čokl 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
- Mücke A., Lakes-Harlan R. 1995. Central projections of sensory cells of the midleg of the locust, *Schistocerca gregaria*. Cell & Tissue Research, 280: 391-400
- Nebeling B. 2000. Morphology and physiology of auditory and vibratory ascending interneurons in bushcricket. Journal of Experimental Zoology, 286: 219-230
- Oldfield B. P. 1983. Central projections of primary auditory fibres in Tettigoniidae (Orthoptera, Ensifera). Journal of Comparative Physiology, 151: 389-395
- 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 Behaviour, 4(4): 441-447

- Park K. C., Cork A. 1999. Electrophysiological responses of antennal receptor neurons in female Australian sheep blowflies, *Lucilia cuprina*, to host odours. Journal of Insect Physiology, 45: 85-91
- 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
- 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
- Pollack G. S. 1998. Neural processing of acoustic signals. V: Comparative hearing: Insects. Hoy R. R., Popper A. N., Fay R. R. (ur.). New York , Springer Verlag, str.: 139-196
- Pollack G. S. 2000. Who, what, where? Recognition and localization of acoustic signals by insects. Current Opinion in Neurobiology, 10: 763-767
- Pollack G. S., Imaizumi K. 1999. Neural analysis of sound frequency in insects. BioEssays, 21: 295-303
- Poulet J. F. A., Hedwig B. 2002. A corollary discharge maintains auditory sensitivity during sound production. Nature, 418: 872-876
- Poulet J. F. A., Hedwig B. 2003. A corollary discharge mechanism modulates central auditory processing in singing crickets. Journal of Neurophysiology, 89: 1528-1540
- Reeve R., Webb B. 2003. New neural circuits for robot phonotaxis. Philosophical Transactions of the Royal Society A, 361(1811): 2245-2266
- Ridgel A. L., Frazier S. F., Zill S. N. 2001. Dynamic responses of tibial campaniform sensilla studied by substrate displacement in freely moving cockroaches. Journal of Comparative Physiology, 187: 405-420
- Robert D., Miles R. N., Hoy R. H. 1998. Tympanal mechanics in the parasitoid fly *Ormia ocracea*: intertympanal coupling during mechanical vibration. Journal of Comparative Physiology, 183: 443-452
- Roces F., Tautz J., Hölldobler B. 1993. Stridulation in Leaf-Cutting Ants Short-Range Recruitment Through Plant-Borne Vibrations. Naturwissenschaften, 80(11): 521-524
- Römer H. 1985. Anatomical representation of frequency and intensity in the auditory system of Orthoptera. V: Acoustic and vibrational communication in insects. Kalmring K., Elsner N. (ur.). Berlin, Paul Parey Verlag, str.: 25-32
- Römer H., Marquart V. 1984. Morphology and physiology of auditory interneurons in the metathoracic ganglion of the locust. Journal of Comparative Physiology, 155: 249-262

- Römer H., Marquart V., Hardt M. 1988. Organisation of a sensory neuropile in the auditory pathway of two groups of Orthopterans. Journal of Comparative Neurology, 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., Stumpner A. 1988. Filtering of behaviourally relevant temporal parameters of a grasshopper's song by an auditory interneuron. Journal of Comparative Physiology, 163: 517-523
- Ronacher B., Krahe R., Hennig R. M. 2000. Effects of signal duration on the recognition of masked communication signals by the grasshopper *Chorthippus biguttulus*. Journal of Comparative Physiology, 186: 1065-1072
- Rupprecht R. 1974. Vibration signals during copulation of *Panorpa* (Mecoptera Insecta). Experientia, 30: 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
- Sanford G. M., Lutterschmidt W. I., Hutchison V. H. 2002. The comparative method revisited. BioScience, 52(9): 830-836
- Sauer A. E., Büschges A., Stein W. 1997. Role of presynaptic inputs to proprioreceptive afferents in tuning sensorimotor pathways of an insect joint control network. Journal of Neurobiology, 32: 359-376
- Sauer A. E., Stein W. 1999. Sensorimotor pathways processing vibratory signals from the femoral chordotonal organ of the stick insect. Journal of Comparative Physiology, 185: 21-31
- Schildberger K. 1984. Temporal selscitvity of identified auditory neurons in the cricket brain. Journal of Comparative Physiology, 155: 171-185
- Schnorbus H. 1971. Die subgenualen Sinnesorgane von *Periplaneta americana*: Histologie und Vibrationsschwellen. Zeitschrift für vergleichende Physiologie, 71: 14-48
- Schul J. 1997. Neuronal basis of phonotactic behaviour in *Tettigonia viridissima*: processing of behaviourally relevant signals by auditory afferents and thoracic interneurons. Journal of Comparative Physiology, 180: 573-583
- Shaw S. 1994a. 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

- Shaw S. R. 1994b. Re-evaluation of the absolute threshold and response mode of the most sensitive known vibration detector, the cockroach's subgenual organ – A cochlea-like displacement threshold and a direct response to sound. Journal of Neurobiology, 25(9): 1167-1185
- 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
- Snyder M. R. 1998. A functionally equivalent artificial neural network model of the prey orientation behavior of waterstriders (Gerridae). Ethology 104: 285-297
- Stein W., Sauer A. E. 1999. Physiology of vibration-sensitive afferents in the femoral chordotonal organ of the stick insect. Journal of Comparative Physiology, 184(3): 253-263
- Stein W., Schmitz J. 1999. Multimodal convergence of presynaptic afferent inhibition in insect proprioreceptors. The Journal of Neurophysiology, 82(1): 512-514
- Stewart, W. 1978. Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. Cell 14: 741-759
- Stewart K. W. 1997. Vibrational communication in insects. American Entomologist 43: 81-91
- 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
- Stiedl O., Kalmring K. 1989. The importance of song and vibratory signals in the behavior of the bushcricket *Ephippiger ephippiger* Fiebig (Orthoptera, Tettigoniidae): Taxis by females. Oecologia, 80(1): 142-144
- Stölting H., Moore T. E., Lakes-Harlan R. 2002. Substrate vibrations during acoustic signalling in the cicada *Okanagana rimosa*. Journal of Insect Science, 2: 2
- Stritih N. 2001. Vibracijski internevroni protorakalnega ganglija jamske kobilice *Troglophilus neglectus* (Krauss). Magistrsko delo. 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(3): R190-R192
- Stumpner A., Atkins G., Stout J. F. 1995. Processing of unilateral and bilateral auditory inputs by the ON1 and L1 interneurons of the cricket *Acheta domesticus* and comparison to other cricket species. Journal of Comparative Physiology 177: 379-388

- Stumpner A., Ronacher B. 1994. Neurophysiological aspects of song pattern recognition and sound localization in grasshoppers. American Zoologist, 34: 696-705
- Stumpner A., von Helversen D. 2001. Evolution and function of auditory system in insects. Naturwissenschaften, 88: 159-170
- Todd J. W. 1989. Ecology and behavior of *Nezara viridula*. Annual Review of Entomology, 34: 273-292
- Tyrer N. M., Gregory G. E. 1982. A guide to the neuroanatomy of locust subesophageal and thoracic ganglia. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Phil, 297: 91-123
- 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*). Magistrsko delo. 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., Zorović M. 2005. Use of substrate vibrations for orientation: From behaviour to physiology. V: Insect Sounds and Communication. Claridge M. F., Drosopoulos S. (ur.). Boca Raton, Florida, CRC Press LCC, v tisku
- von Helversen D., von Helversen O. 1998. Acoustic pattern recognition in a grasshoppers: Processing in the time or frequency domain? Biological Cybernetics, 79: 467-476
- Walker A., Jones JR. 1985. Nezara viridula. V: Handbook of Insect Rearing. Singh P., Moore R. F. (ur.). Amsterdam, Elsevier Science Publishers B. V., str.: 339-343
- Watson A. H. D., Hardt M. 1996. Distribution of synapses on two local auditory interneurones, ON1 and ON2, in the prothoracic ganglion of the cricket: relationships with GABAimmunoreactive neurones. Cell & Tissue Ressearch, 238: 231-246
- Wilcox R. S. 1995. Ripple communication in aquatic and semiaquatic insects. Ecoscience 2: 109-115
- Wohlers D. W., Huber F. 1978. Intracellular recordings and staining of cricket auditory interneurons (*Gryllus campestris* L., *Gryllus bimaculatus* DeGeer). Journal of Comparative Physiology, 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* L.. Journal of Comparative Physiology 146: 161-173
- Wolf H., Burrows M. 1995. Proprioreceptive sensory neurons of a locust leg receive rhythmic presynaptic inhibition during walking. Journal of Neuroscience, 15: 5623-5636
- Zorović M. 2003. Funkcionalne lastnosti vibracijskih internevronov v centralnem gangliju stenice vrste *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
ZAHVALA

Svojemu mentorju prof. dr. Andreju Čoklu se zahvaljujem za svobodo, motivacijo, spodbudo ter zanimivo temo doktorske disertacije. Delovni mentorici dr. Meti Virant-Doberlet se zahvaljujem za razumevanje in potrpežljivo prenašanje tarnanja nad nekooperativnimi poskusnimi objekti, za nadvse koristne nasvete in konstruktivne pripombe, ki so pripomogli k boljši končni podobi pričujočega dela in za hitro prvo pomoč ob pomanjkanju literature iz njenega skrajno urejenega ustvarjalnega nereda. Doc. dr. Kazimirju Drašlarju se zahvaljujem za opozarjanje na hude neumnosti in odpiranje vrat v sanjarije, prof. dr. Dušanu Devetaku pa za kritično prebiranje dela in koristne pripombe. Doc. dr. Andreju Blejcu se zahvaljujem za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Nataši gre zahvala za uvajanje v tehniko znotrajceličnega odvajanja živčnih impulzov in nesebično pomoč, kadarkoli se je kaj zataknilo, Petri za prijetno delovno okolje in zvrhano mero humorja, Janezu za reševanje majhnih in velikih tehničnih težav, Alenki za prevzem ISO bremena in pripravljenost vedno priskočiti na pomoč, Verici za slane palčke, muffine in kruhke ter vsem ostalim sodelavcem za prijetno delovno vzdušje, za pogovore ob čaju in pomoč, takšno in drugačno.

Srčna hvala tudi staršem in bratu, za to, da so mi venomer vlivali pogum in mi stali ob strani, ko se je zoblačilo, ter se z menoj veselili sonca; in seveda fantu Jožetu, za to, da je.

PRILOGA

Priprava fiziološke raztopine in fosfatnega pufra:

A) Fiziološka raztopina Dawenport (1000 ml); pH = 7,2

NaCl	6,7 g
KC1	0,15 g
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,12 g
NaHCO ₃	0,15 g
dest. H ₂ O	do 1000 ml

B) Fosfatni pufer (PBS); pH = 7,2

8,0 g
0,2 g
1,44 g
0,24 g
do 1000 ml