

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Barbara BUH

**MORFOLOŠKA IN FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA
VIBRACIJSKIH RECEPTORSKIH NEVRONOV PRI JAMSKIH
KOBILICAH RODU *Troglophilus* (Orthoptera, Rhaphidophoridae)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF
VIBRATORY RECEPTOR NEURONES IN CAVE CRICKETS OF THE
GENUS *Troglophilus* (Orthoptera, Rhaphidophoridae)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. V celoti je bilo opravljeno v laboratorijih Oddelka za entomologijo Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani.

Študijska komisija je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Andreja Čokla in za somentorja doc. dr. Petra Stuška.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter TRONTELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Andrej ČOKL
Nacionalni inštitut za biologijo v Ljubljani, Oddelek za
entomologijo

Član: doc. dr. Peter STUŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: izr. prof. dr. Kazimir DRAŠLAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 20.10.2011

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

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Barbara Buh

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 612.8:595.7(043.2)=163.6
KG	<i>Troglophilus</i> / Ensifera/ Raphidophoridae/ vibracijski receptorski nevroni/ morfologija/ fiziologija
AV	BUH, Barbara
SA	ČOKL, Andrej (mentor)/ STUŠEK, Peter (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2011
IN	MORFOLOŠKA IN FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA VIBRACIJSKIH RECEPTORSKIH NEVRONOV PRI JAMSKIH KOBILICAH RODU <i>Troglophilus</i> (Orthoptera, Raphidophoridae)
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	VIII, 57 str., 12 sl., 98 vir.
IJ	sl
JI	sl/eng
AI	Zaznavanje in oddajanje vibracijskih signalov, ki se prevajajo preko podlage, ima pomembno vlogo pri komunikaciji žuželk. Nevronalna osnova zaznavanja vibracij je bila najbolj raziskana pri ravnokrilcih (Orthoptera), pri katerih je vibracijski čut tesno povezan s sluhom. Raziskave na receptorskem nivoju so pokazale poudarek na zaznavi vibracij visokih frekvenc, a povečini niso vključevale morfološke identifikacije merjenih nevronov. Pri primitivnih, gluhih jamskih kobilicah (Raphidophoridae) iz rodu <i>Troglophilus</i> je frekvenčna občutljivost vibracijskih interneuronov v trebušnjači nakazala visok delež nizkofrekvenčnih vhodov v centralno živčevje. Namen naloge je bil določiti izvor te občutljivosti ter obenem opraviti prvo sistematično raziskavo funkcionalnih in morfoloških lastnosti vibracijskih receptorskih nevronov pri ravnokrilcih. S tehniko znotrajceličnega merjenja elektrofiziološke aktivnosti in iontoforetičnega vnašanja »barvila« smo pri vrstah <i>T. neglectus</i> in <i>T. cavicola</i> v prvem oprsnem gangliju trebušnjače merili vibracijsko občutljivost receptorskih nevronov sprednje noge ter določili obliko in lego njihovih centralnih razvejitev. Identificirali smo 8 morfo-funkcionalnih tipov nevronov ter en funkcionalni tip brez obarvanja. Trije od njih imajo vrh občutljivosti v območju nizkih (50-300 Hz), šest pa v območju visokih frekvenc (200-2000 Hz). Terminalne razvejitve šestih tipov nevronov tvorijo zgostitev srpaste oblike mediano ipsilateralno v gangliju, pri enem tipu oblikujejo široko bifurkacijo, pri enem pa prekrivajo večino ipsilateralne polovice ganglija. Morfološko podobni tipi nevronov imajo podobno frekvenčno občutljivost. Na podlagi primerjalnih podatkov jih lahko pripišemo naslednjim izvorom: šest tipov kompleksnemu tibialnemu organu, en tip femoralnemu hordotonalnemu organu, en tip kampaniformnim senzilam, medtem ko enega tipa na podlagi poznanih podatkov ne moremo razvrstiti. Prevladujoča in hkrati najvišja absolutna občutljivost na vibracije visokih frekvenc med identificiranimi receptorskimi nevroni kaže podobno sliko kot prejšnje, ekstracelularne študije. Izvora prevladujoče občutljivosti centralno-živčnih elementov jamskih kobilic na vibracije nizkih frekvenc naši rezultati tako ne razjasnjujejo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
 DC UDC 612.8:595.7(043.2)=163.6
 CX *Troglophilus*/ Ensifera/ Raphidophoridae / vibrational receptor neurons/ morphology/ fiziology
 AU BUH, Barbara
 AA ČOKL, Andrej (supervisor)/ STUŠEK, Peter (co-supervisor)
 PP SI- 1000 Ljubljana, Večna pot 111
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
 PY 2011
 TI MORPHOLOGICAL AND FUNKCIONAL KARAKTERIZATION OF VIBRATORY RECEPTOR NEURONES OF THE CAVE CRICKET GENUS *Troglophilus* (Orthoptera, Rhaphidophoridae)
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO VIII, 57 p., 12 fig., 98 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Detection and production of substrate-born vibrations plays an important role in insect communication. The neuronal basis of vibration detection is known mostly from the hearing Orthoptera, in which the vibratory sense is functionally closely connected to hearing. Investigations at the receptor level have shown predominant receptor inputs with also highest sensitivity in the high-frequency range, but rarely included morphological identification of the measured neurons. In primitive, non-hearing cave crickets (Rhaphidophoridae) of the genus *Troglophilus*, predominant sensitivity of vibratory interneurons in the ventral chord indicated, on the other hand, a high degree of low-frequency tuned receptor inputs. The aim of our study was to determine the origin of this sensitivity and at the same time conduct the first research of both functional and morphological properties of vibrational receptor neurons in the Orthoptera. Using the combined intracellular recording and staining technique we measured vibrational sensitivity and determined the morphology and neuropile location for central projections of receptor neurons from the first legs of *T. neglectus* and *T. cavicola*. Eight morpho-functional types of neurons was described and one functional type without the staining. Three are tuned to low-frequencies (50-300 Hz), while the other six have highest sensitivity in the high-frequency range (200-2000 Hz). Terminal arborisations of six neurone types form a crescent-shaped neuropile medially ipsilaterally in the ganglion, one has a wide bifurcation and arborisations of one type are spread almost over the whole hemiganglion. Morphologically similar types of neurons express similar frequency sensitivity. Based on comparative data we could attribute them to the following origins: six types to the complex tibial organ, one to the femoral chordotonal organ, one to campaniform sensilla, while one type could not be classified based on the available data. Predominant and also highest sensitivity in the absolute terms measured among the high-frequency tuned receptor neurons is comparable with findings of the previous, extracellular studies. The source of the low-frequency sensitivity of central neural elements in cave crickets could thus not be explained.

KAZALO VSEBINE

<i>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</i>	III
<i>KEY WORDS DOCUMENTATION</i>	IV
<i>KAZALO VSEBINE</i>	V
<i>KAZALO SLIK</i>	VII
<i>OKRAJŠAVE</i>	VIII
1. UVOD	1
2. PREGLED OBJAV	2
2.1 VIBRACIJSKA KOMUNIKACIJA ŽUŽELK	2
2.2 JAMSKE KOBILICE	3
2.3 TIPI MEHANORECEPTORJEV ŽUŽELK IN NJIHOVA FUNKCIJA.....	4
2.3.1 <i>Hordotonalni organi</i>	4
2.3.1.1 Femoralni hordotonalni organ	5
2.3.1.2 Tibialni organ	6
2.3.1.2.1 Subgenualni organ	
2.3.1.2.2 Intermediani organ	
2.3.1.2.3 <i>Crista acustica</i>	
2.3.1.3 Kampaniformne senzile.....	8
2.4 OŽIVČENOST VIBRACIJSKIH RECEPTORJEV	8
2.5 CENTRALNE PROJEKCIJE MEHANORECEPTORSKIH NEVRONOV.....	9
2.5.1 <i>Centralne razvejitve SGO in IO</i>	10
2.5.2 <i>Centralne razvejitve CS</i>	10
2.5.3 <i>Centralne razvejitve FeCO</i>	10
2.6 PROCESIRANJE VIBRACIJSKE INFORMACIJE V CENTRALNEM ŽIVČEVJU (POMEN SENZORIČNIH VHODOV)	11
2.7 NAMEN NALOGE	12
3. MATERIAL IN METODE	13
3.1 POSKUSNE ŽIVALI	13
3.2 KOMBINIRANA TEHNIKA INTRACELULARNEGA ODVAJANJA AKTIVNOSTI IN VNAŠANJA BARVILA	13
3.2.1 <i>Preparacija</i>	13
3.2.2 <i>Poskusna postavitvev in izvedba poskusa</i>	14
3.2.3 <i>Označevanje celic</i>	15
3.2.4 <i>Obdelava tkiva</i>	16
3.3 ANALIZA ELEKTROFIZIOLOŠKIH PODATKOV	17
3.4 ANALIZA OBLIKE ŽIVČNIH CELIC	18
4. REZULTATI	19

4.1	OBLIKA IN FUNKCIONALNE LASTNOSTI RECEPTORSKIH NEVRONOV	19
4.1.1	<i>TN09</i>	19
4.1.2	<i>TN 10</i>	21
4.1.3	<i>TN 12</i>	23
4.1.4	<i>TN 14</i>	25
4.1.5	<i>TN 15</i>	27
4.1.6	<i>TC2</i>	29
4.1.7	<i>TC5</i>	31
4.1.8	<i>TN 26 in TN 27</i>	33
4.1.9	<i>TN 28</i>	33
4.2	PREGLED REZULTATOV	36
5.	RAZPRAVA	40
5.1	CENTRALNE PROJEKCIJE VIBRACIJSKIH RECEPTORJEV	40
5.2	PRIMERJAVA OBLIKE IN OBČUTLJIVOSTI OBARVANIH NEVRONOV	41
5.2.1	<i>Subgenualni organ</i>	41
5.2.2	<i>Intermediani organ</i>	42
5.2.3	<i>5.2.3. Femoralni hordotonalni organ</i>	42
5.2.4	<i>5.2.4. Kampaniformne senzile</i>	43
5.2.5	<i>5.2.5. Ostali vibracijsko občutljivi receptorji</i>	43
5.3	FREKVENČNA OBČUTLJIVOST VIBRACIJSKIH RECEPTORJEV – POVZETEK	44
5.4	CENTRALNO PROCESIRANJE VIBRACIJSKE INFORMACIJE IN VEDENJSKI POMEN	44
5.5	BARVILA IN TRAJANJE TOKOVNEGA INJICIRANJA	46
6.	POVZETEK	47
7.	VIRI	49

ZAHVALA

KAZALO SLIK

SLIKA 1. RECEPTORSKI NEVRON »TN09«.....	20
SLIKA 2. RECEPTORSKI NEVRON »TN10«.....	22
SLIKA 3. RECEPTORSKI NEVRON »TN12«.....	24
SLIKA 4. RECEPTORSKI NEVRON »TN14«.....	26
SLIKA 5. RECEPTORSKI NEVRON »TN15«.....	28
SLIKA 6. RECEPTORSKI NEVRON »TC2«.....	30
SLIKA 7. RECEPTORSKI NEVRON »TC5«.....	32
SLIKA 8. RECEPTORSKA NEVRONA »TN26 IN TN27«.....	34
SLIKA 9. RECEPTORSKI NEVRON »TN28 «.....	35
SLIKA 10: ZDRUŽENE PROJEKCIJE TERMINALNIH RAZVEJITEV ČUTILNIH NEVRONOV TN10, TN12, TN14, TN15, TC2 IN TC5.....	37
SLIKA 11: ZDRUŽENE PROJEKCIJE TERMINALNIH RAZVEJITEV ČUTILNIH NEVRONOV TN26 IN TN28.....	38
SLIKA 12: PRIKAZ KRIVULJ VZDRAŽNEGA PRAGA ZA CELICE TN09, TN10, TN12, TN15, TC2 IN TC5.....	39

OKRAJŠAVE

AO	akcesorni organ
aRT	anterior ring tract
CA	<i>Crista acustica</i>
CS	Kampaniformne senzile
DAB reakcija	reakcija z diaminobenzidinom
FeCO	Femoralni hordotonalni organ
IO	Intermediani organ
LAC	lateralni asociacijski center
mVAC	medio-ventralni asociacijski center
N5	nožni živec
N5B1	anteriorna veja nožnega živca
N5B2	posteriorna veja nožnega živca
PB	fosfatni pufer
PBST	detergentom triton x-100
SGO	Subgenualni organ
TO	tibialni organ
V	vibracijski vzpenjajoči nevroni
VZ	vibracijsko zvočni vzpenjajoči nevroni
Z	zvočni vzpenjajoči nevroni

1. UVOD

Vibracijski čut je eden glavnih čutov, ki členonožcem omogočajo komunikacijo in orientacijo v prostoru. Večina žuželk pri komunikaciji znotraj vrste oddaja vibracijske signale, ki se prevajajo preko podlage (Cocroft in Rodriguez, 2005). Te signale in vibracije, ki nastajajo med premikanjem žuželke, izkoriščajo tudi njihovi plenilci (Greenfield, 2002). Pri ravnokrilcih sta vibracijska komunikacija in zaznavanje vibracij tesno povezana z zvočno komunikacijo in sluhom.

Večina organov za zaznavanje vibracij je nameščenih v nogah. Subgenualni organ je specializiran organ za zaznavanje vibracij podlage v tibijah nog večine žuželk, ki se odziva na širok spekter vibracijskih frekvenc (Autrum in Schneider, 1948). Pri ravnokrilcih (Orthoptera) sta distalno tik ob njem razviti še ena oz. dve dodatni skupini čutilnih nevronov, ki se v kombinaciji s pomožnimi strukturami odzivata na vibracije podlage in/oz. zvok (Ball s sod., 1989; Lakes in Schikorski, 1990). Na vibracije nizkih frekvenc se odzivajo tudi drugi mehanoreceptorski organi, nameščeni v sklepih in kutikuli (Lakes in Schikorski, 1990, Čokl in sod., 2005), ki primarno služijo zaznavanju položaja, premikov ter sil v okončinah (propiorecepciji).

Večino informacij o vibracijskem čutu imamo iz raziskav pri ravnokrilcih, ki za komunikacijo uporabljajo zvok. Na podlagi različnih pogojev stimulacije in selektivnega uničevanja posameznih delov nog so ob merjenju elektrofiziološke aktivnosti nožnega živca skleпали o občutljivosti posameznih organov oz. senzil (Schnorbus, 1971; Dambach, 1972). Kasneje so merili aktivnost posameznih vibracijskih čutilno-živčnih celic (receptorskih nevronov) z ekstracelularno tehniko registracije (Kalmring s sod., 1994; Kühne, 1982; Čokl s sod., 1995) in pri tem nekatera merjena živčna vlakna večjega premera tudi obarvali (Grosch s sod., 1985; Lakes in Schikorski, 1990).

Sistematična raziskava različnih funkcionalnih tipov čutilnih nevronov, ki se odzivajo na vibracije, s tehniko znotrajceličnega merjenja aktivnosti in hkratnega barvanja pri ravnokrilcih oz. žuželkah še ni bila opravljena. Le intracelularna tehnika omogoča, poleg selektivnega merjenja, tudi obarvanje manjših nevronskih vlaken in potencialno polnjenje njihovih odrastkov na večje razdalje.

Jamske kobilice (Raphidophoridae) v tibialnem organu nimajo razvite najbolj distalne skupine čutilnih nevronov, ki pri murnih (Gryllidae) in kobilicah (Tettigoniidae) tvorijo timpanalni slušni organ. Pri vrsti *Troglophilus neglectus*, ki naseljuje slovensko podzemlje, so pokazali, da je struktura in odzivnost vibracijsko-občutljivega dela tibialnega organa primerljiva z ostalimi ravnokrilci (Čokl s sod., 1995; Jeram s sod., 1995). Zaradi tega predstavljajo jamske kobilice primeren eksperimentalni objekt za raziskave živčne osnove vibracijskega čuta.

2. PREGLED OBJAV

2.1 VIBRACIJSKA KOMUNIKACIJA ŽUŽELK

Komunikacijski signali morajo izraziti določeno sporočilo, npr. sporočiti identiteto in lokacijo pošiljatelja in z razdaljo čim dlje ohraniti to informacijo. Pri zvočni komunikaciji je uspešnost sporočanja odvisna od velikosti osebka in frekvence zvočnega signala. Za učinkovito komunikacijo morajo biti osebki relativno veliki glede na valovno dolžino oddanega zvoka. Manjše žuželke morajo oddajati zvok z višjo frekvenco, vendar pri visokofrekvenčnem zvoku pri razširjanju prihaja do večjega popačenja in izgube signalne strukture kot pri nizkofrekvenčnem (Markl 1983, Bennet-Clark, 1998). Prednost komunikacije s signali, ki se prevajajo preko podlage, je v manjšem vložku energije in velikem dosegu - predvsem za manjše žuželke (Markl 1983, Virant-Doberlet in Čokl, 2004).

Vse žuželke so sposobne zaznavanja vibracij podlage, primarno pa se je ta čut najverjetneje razvil kot eden od mehanizmov zaznavanja naravnih sovražnikov (Friedel, 1999; Greenfield, 2002). Vsak premik žuželčjega telesa sproži vibracije v podlagi in tudi takšni na videz nepomembni signali so lahko pomembni pri medvrstnih in znotrajvrstnih interakcijah (Hanrahan in Kirscher, 1994). Produkcija signalov je vrstno specifična ter vključuje specifično gibanje telesa in/ali posebnih struktur. Najbolj preprosta in razširjena mehanizma ustvarjanja vibracij sta udarjanje z deli telesa ob podlago (bobnanje oz. perkusija) ter potresavanje telesa ali njegovega dela (tremulacija); pri slednji se vibracije telesa prenašajo na substrat preko nog (Virant-Doberlet in Čokl, 2004). Vibracije nastajajo

skupaj z zvočnimi signali tudi pri medsebojnem drgnjenju delov telesa (stridulaciji; Ewing, 1989).

Plenilci in parazitoidi lahko izrabljajo vibracije za detekcijo in lokalizacijo svojega plena (Mencinger-Vračko in Devetak, 2008). Raznovrstne skupine žuželk uporabljajo vibracijske signale za komunikacijo pri spolnem vedenju. Z vibracijami omogočajo ločevanje signalov lastne vrste od drugih signalov, sporočajo spol pošiljatelja signala, prav tako pa preko vibracij določajo pozicijo partnerja. Pogosto je vibracijska komunikacija ključna pri koordinaciji vedenja v skupini in pri kompleksnih socialnih interakcijah, kot so signaliziranje nevarnosti, pri obrambi pred plenilci, pri skrbi za zarod in sporočanju lokacije vira hrane (Virant-Doberlet in Čokl, 2004).

Pri ravnokrilcih v podredu dolgotipalčnic (Ensifera) komunikacija na večje razdalje (v funkciji privabljanja partnerjev) poteka večinoma z zvočnimi signali. Pri izmenjavi informacij na kratke razdalje, v okviru dvorjenja, lociranja partnerja in postkopulacijskih interakcij, pa zvok pogosto dopolnjujejo ali nadomestijo vibracije podlage (Kalmring s sod., 1997; Morris, 1980; Virant-Doberlet in Čokl, 2004).

2.2 JAMSKE KOBILICE

Jamske kobilice (Raphidophoridae) so dolgotipalčnice, ki ne producirajo zvoka in so po mnenju nekaterih avtorjev v tej skupini žuželk primitivne (Desutter-Grandcolas, 2003; Stritih in Stumpner, 2009). Družina je kozmopolitska; dva predstavnika rodu *Troglophilus* naseljujeta tudi jame Slovenskega krasa, kjer predstavljata najštevilčnejšo populacijo členonožcev (Novak in Kuštor, 1982). Največkrat jih najdemo v mešanih populacijah, razmerje med vrstama je verjetno odvisno od okoljskih dejavnikov (Novak in Kuštor, 1983). Življenjski cikel vrste *T. neglectus* traja dve do dve leti in pol s 7-8 mesečnim embrionalnim razvojem, 14-15 mesecev trajajočim larvalnim obdobjem in s 3-10 meseci odraslega življenja (Pehani s sod., 1997). Imajo aktivno poletno nadzemno ter neaktivno zimsko podzemno obdobje (Novak in Kuštor, 1983). Zimski čas živali prebijejo v velikih skupinah v jamah, najverjetneje pa se v tem času ne prehranjujejo. V ostalem delu leta ponoči zapustijo zatočišča in si iščejo hrano, podnevi pa se vračajo v jame oz. si poiščejo vlažna skrivališča v skalnih razpokah, pod lubjem in listjem. Parjenje pri vrsti *T. neglectus*

poteka v poznem poletju in zgodnji jeseni (Pehani s sod., 1997), pri vrsti *T. cavicola* pa zgodaj spomladi (Novak in Kuštor, 1983). Samci imajo na zadku vonjalne žleze, ki jih izbočijo v času pred parjenjem (Seliškar, 1923), kar najverjetneje služi privabljanju samic. Pri vrsti *T. neglectus* so pred kratkim opisali vibracijske signale, ki jih samci oddajajo med dvorjenjem s potresavanjem zadka ter po končanem parjenju s stresanjem celotnega telesa (Stritih in Čokl, poslano v revizijo). Dominantne frekvence teh signalov so zelo nizke; ležijo v območju med 20 in 100 Hz.

2.3 TIPI MEHANORECEPTORJEV ŽUŽELK IN NJIHOVA FUNKCIJA

2.3.1 Hordotonalni organi

Hordotonalne organe najdemo pri žuželkah in raki. Pri žuželkah se v veliki morfološki pestrosti pojavljajo v skoraj vsakem sklepu eksoskeleta; nameščeni so med sklepi v udih in telesnih segmentih. Vsi hordotonalni organi so mehanoreceptorji in imajo lahko proprioreptorno vlogo ali pa vlogo visoko specifičnih mehanoreceptorjev (sluh). Morfološko je hordotonalni organ skupek senzil, ki so pripete na premikajoči se del skeletne kutikule ali pa so vpete v vezivno tkivo. Senzile nekaterih hordotonalnih organov so organizirane v morfološko ločene skupke (skoloparije). Tak je npr. femoralni hordotonalni organ v nogah ravnokrilcev (Field in Matheson, 1998).

Čutilna enota hordotonalnega organa (senzila) je sestavljena iz enega ali več bipolarnih čutilnih nevronov, katerih dendriti so na distalnem koncu opremljeni s cilijami. Cilijo ovijata dve specializirani celici – skolopalna celica in pritrditvena (kapna) celica ter glia celica. Skolopalna celica tvori ovoj iz skolopalnih fibroznih vlaken, ki obdajajo cilijo (oz. cilije) in je distalno vstavljena v kompaktno kapico, ki jo tvori pritrditvena celica (Scumacher, 1979; Field in Matheson, 1998).

Hordotonalne senzile žuželk opravljajo zelo različne čutilne funkcije. V povezavi z različnimi notranjimi tkivi in kutikularnimi strukturami ima lahko hordotonalni organ funkcijo sklepnega proprioreceptorja v udih, krilih ali zadku; je detektor vibracij podlage (subgenualni organ) ali vibracij zraka (timpanalni organ); detektor gibanja anten, ki so posledica premikanja zraka, gravitacijskih sil ali nizko frekvenčnih vibracij zraka

(Johnstonov organ); kontrolira premike kutikule v krilih in ustnih delih (konektivni hordotonalni organi (Field in Matheson, 1998).

2.3.1.1 Femoralni hordotonalni organ

Femoralni hordotonalni organ (FeCO) je pripet anterio-dorzalno na hipodermis proksimalno v femurju in se distalno pripenja na tanek kutikularni apodem, ki je vstavljen v tibijo. Sestavlja ga 100-400 bipolarnih senzoričnih nevronov in je tako eden največjih proprioreceptorjev pri žuželkah (Nishino, 2000). Verjetno se pojavlja pri vseh skupinah žuželk, najbolje pa je raziskan pri ravnokrilcih. Pri teh je sestavljen iz dveh funkcionalno različnih skoloparijev; ventralnega in dorzalnega. Pri kratkotipalčnicah (Caelifera) se med posameznimi nogami strukturno razlikuje, pri dolgotipalčnicah (Ensifera) pa ni razlik med sprednjim (pro-), srednjim (meso-) in zadnjim (metatorakalnim) parom nog. Med različnimi skupinami ravnokrilcev obstajajo razlike v stopnji spajanja skoloparijev; pri kratkotipalčnicah je metatorakalni FeCO popolnoma spojen, delno spojen je pri dolgotipalčnicah (Nishino in Sakai, 1997), nespojen pa je v pro- in mesotorakalnih nogah kratkotipalčnic (Field in Matheson, 1998). Pri jamskih kobilicah ima FeCO strukturo značilno za dolgotipalčnice, z delno spojenima dorzalnim in ventralnim skoloparijem (Stritih, neobjavljeno).

Začetne študije so kazale, da celoten FeCO posreduje v centralno živčevje informacijo o položaju in premikih femuro-tibialnega sklepa, izkazalo pa se je, da se skoloparija funkcionalno razlikujeta. Nevroni ventralnega skoloparija imajo proprioreceptivno vlogo in sodelujejo pri refleksnem uravnavanju napetosti femoralnih mišic (Field in Pflüger, 1989; Nishino in sod, 1999), medtem ko se nevroni dorzalnega skoloparija odzivajo na nizkofrekvenčne vibracije receptorskega apodema (najmočnejše pod 100 Hz; Field in Pflüger, 1989; Kittman in Schmitz, 1992). Pri dolgotipalčnicah prihaja do funkcionalnega prekrivanja med skoloparijema, kar je posledica njunega delnega anatomskega spajanja (Nishino 2000, 2003).

2.3.1.2 Tibialni organ

Pri ravnokrilcih in ščurkih (Orthopteroidea) najdemo proksimalno v tibiji nog kompleks dveh oz. treh skupin skolopidijev, ki tvorijo t.i. kompleksni tibialni organ (TO). Najbolj proksimalno leži subgenualni organ (SGO), sledita mu intermediani organ (IO) ter distalno pri nekaterih dolgotipalčnicah še vrsta senzil imenovana *crista acoustica* (CA).

2.3.1.2.1 Subgenualni organ

SGO leži v dorzalnem hemolimfnem kanalu tibije ter je pri ravnokrilcih in ščurkih obsežnejši v primerjavi s kožokrilci (Hymenoptera), termiti (Isoptera) in metulji (Lepidoptera); McIver, 1985); medtem ko je pri drugih žuželkah najverjetneje odsoten (Howse, 1968; McIver, 1985). Senzorične celice so organizirane v polkrogu na dorzalno-anteriornem delu noge, njihovi aksoni tvorijo dva živca – timpanalni živec, ki pri kobilicah oživčuje okoli 20 senzil, ter subgenualni živec (Lakes in Schikorski, 1990; Eibl in Huber, 1979). Čutilne celice so vstavljene v pritrditvene celice, ki tvorijo membrano pahljačaste oblike in se pripenjajo na dorzalno posteriorni del hipodermisa noge. SGO je v vseh treh parih nog podobno grajen, število celic je podobno; v vsaki nogi je sestavljen iz približno 30-50 skolopidijev (Schumacher, 1979; Young in Ball, 1974; Ball in Field, 1981). Vrh občutljivosti za vibracije je pri različnih ravnokrilcih podoben in leži v območju med 200 in 2000 Hz (Čokl in sod., 1995; Čokl in Virant-Doberlet, 1997). Organ se odziva tudi na nizkofrekvenčni zvok visokih intenzitet (>3000 Hz; Shaw, 1994; Stumpner, 1996). Pri jamski kobilici *T. neglectus* SGO sestavlja 30 skolopidijev, število celic je v vseh nogah enako (Jeram s sod., 1995). Čokl in sod. (1995) so v protorakalnem gangliju te vrste merili odzive posameznih čutilnih nevronov na vibracije in odzive z vrhom občutljivosti med 200 in 700 Hz pripisali senzilam SGO.

2.3.1.2.2 Intermediani organ

Intermediarni organ (IO) je razvit le pri dolgotipalčnicah (Ensifera). Leži distalno tik ob SGO, razdeljen je v dva dela (Friedrichs, 1927) z ločeno orientacijo senzil in različno oživčenostjo. Skolopidiji so podobni tistim v SGO, manjkajo akcesorne celice (Schumacher 1979). Zaporedno nameščeni skolopidiji se pripenjajo na povečano nožno

trahejo, ki poteka vzdolž tibie. Velikost celic se manjša z oddaljenostjo od femuro-tibialnega sklepa. Na distalni strani se kolona celic nadaljuje s strukturo CA. Mejo med IO in CA določa oživčenje (Lakes in Schikorski, 1990).

Organ se med posameznimi nogami razlikuje v številu celic, ki upada od sprednje proti zadnji nogi. V sprednjih nogah se pri vrstah, ki imajo razvite strukture za sprejem zvoka (glej spodaj), odziva tako na vibracije podlage (okrog 1-2 kHz) kot nizkofrekvenčni zvok 1-10 kHz (Kalmring in sod., 1994), medtem ko se v ostalih nogah odziva samo na vibracije podlage. Pri jamski kobilici proksimalni del organa sestavlja 8-9 skolopidijev, distalni del pa 5-6. Leži ob SGO in se ne razteza tako distalno kot pri vrstah, ki slišijo (Jeram s sod., 1995). Čokl in sod. (1995) so vibracijske odzive čutilnih nevronov z vrhom občutljivosti med 700 in 2000 Hz pripisali IO.

2.3.1.2.3 *Crista acustica*

Strukturo *crista acoustica* (CA) sestavlja vrsta skolopalnih senzil nameščenih vzdolž anteriorne nožne traheje (akustična traheja). Konča se preden se traheji ponovno združita (Lakes in Schikorski, 1990). Receptorske celice so na eni strani pritrjene na dorzalno steno akustične traheje, na drugi pa na krovno membrano (tektorialna membrana, Schumacher, 1979; Stölting in Stumpner, 1998). V sprednjih nogah večine vrst murnov in kobilic so senzile CA funkcionalno povezane s pomožnimi strukturami, ki služijo sprejemu in prevajanju zvoka do organa; timpanalno membrano na površini nog, odprtini (spirakli) na protoraksu in prej omenjeno povečano anteriorno nožno trahejo (Kalmring in sod., 1994). Skupaj s pomožnimi strukturami predstavlja CA zelo občutljiv organ za detekcijo zvoka (timpanalni organ) v območju okrog 10 kHz do vsaj 50 kHz (Oldfield, 1984, Stölting in Stumpner, 1998), medtem ko na ostalih nogah pomožne strukture manjkajo (Young in Ball, 1974; Rössler, 1992a) in homologni organ CA se odziva na vibracije podlage (Kalmring s sod., 1994). Za CA je značilna tonotopična ureditev. Velikost senzil upada od proksimalne proti distalni, pri čemer se spreminja tudi njihova frekvenčna občutljivost; v sprednjih nogah se proksimalni čutilni nevroni odzivajo na nizke frekvence, distalni pa na visoke frekvence zvoka (Stumpner, 1996). V drugih in tretjih nogah ter pri vrstah, ki ne zaznavajo zvoka, je število receptorskih celic reducirano (Lakes s sod., 1991; Lin s sod., 1994).

Pri jamskih kobilicah *CA* ni razvita v nobenem paru nog, tudi pomožne strukture za dovajanje zvoka manjkajo (Jeram s sod., 1995). Pri visokih intenzitetah so sicer zabeležili odzive organa na zvok, ki pa so verjetno posledica posrednih učinkov vibriranja celotne noge (Čokl in sod., 1995). Struktura tibialnega organa jamskih kobilic predstavlja v primerjavi z vrstami, ki slišijo, verjetno izvorno in ne reducirano stanje (Jeram s sod., 1995; Desutter-Grandcolas, 2003; Stritih in Stumpner, 2009). Občutljivost na vibracijsko stimulacijo je primerljiva s tisto v srednjih nogah kobilic družine Tettigoniidae (Čokl s sod., 1995).

2.3.1.3 Kampaniformne senzile

Kampaniformne senzile (CS) so manj specializirani vibracijski receptorji (Schnorbus, 1971; Čokl in sod., 2005). Primarno so mehanoreceptorji občutljivi na deformacijo integumenta (zaznavajo spremembe napetosti v eksoskeletu; Zill s sod., 1999), občutljive pa so tudi na vibracije podlage, kar je bilo najprej pokazano pri ščurkih (Schnoburs, 1971). Njihovi dendritski končiči so vpeti v kutikulo, ki je oblikovana kot kupola oz. kapa (Kiel, 1998). Deformacija kutikule se preko septuma prenese na dendritske končiče. Pri mnogih žuželkah so CS nameščene okrog sklepa v tako imenovanih receptivnih poljih (Grosch in sod., 1985; Devetak in sod., 2004), pri nekaterih pa so posejane po vsej površini noge (Zorović, 2005).

2.4 OŽIVČENOST VIBRACIJSKIH RECEPTORJEV

Aksoni receptorskih nevronov kampaniformnih senzil in raznovrstnih hordotonalnih organov (glej zgoraj) pri jamskih kobilicah potekajo po nožnem živcu (N5), tako kot pri murnih in ostalih dolgotipalčnih (Grosch in sod., 1985; Mücke in Lakes, 1988). N5 se proksimalno v femurju razdeli na anteriorno (N5B1) in posteriorno vejo (N5B2). N5B1 ali »timpanalni živec« vsebuje aksone dela čutilnih dlak ter CS proksimalnega dela tibie ter večino kompleksnega tibialnega organa (Eibl in Huber, 1979; Lakes in Mücke, 1989). N5B2 ali »subgenualni živec« pa vsebuje aksone posteriornega skolopidija SGO, CS, ki ležijo pod SGO ter čutilnih dlačic na posteriornem proksimalnem delu tibie (Field in Matheson, 1998). Aksoni FeCO, ki se nahaja v proksimalnem delu femurja, se po kratkem

odcepu pridružijo N5 (Nisino in Sakai, 2000), ki se mu postopoma pridružujejo tudi aksoni CS, nameščenih po celotni površini noge.

Organizacija TO se med kobilicami iz skupin kratkotipalčnic (so. Caelifera) in dolgotipalčnic (so. Ensifera) razlikuje. Pri prvih je organ sestavljen iz dveh delov, in sicer iz SGO in distalnega organa (Michel, 1974; Ball in sod, 1989), timpanalni organ pa se nahaja v abdomnu. Živec, ki po legi ustreza timpanalnemu, imenujemo subgenualni živec (Mücke in Lakes, 1988). Pri drugih pa ga pri večini družin (izključujoč Rhabdiphoridae) sestavljajo trije deli: SGO, IO in CA (kompleksni tibialni organ; Lakes in Schikorski, 1990). Pri jamskih kobilicah je struktura TO dvodelna in tako najbolj spominja na tisto pri kratkotipalčnicah (Jeram s sod., 1995). Sestavljata ga SGO in IO, zato tudi živec, ki po legi ustreza timpanalnemu živcu pri jamskih kobilicah, lahko imenujemo subgenualni živec.

2.5 CENTRALNE PROJEKCIJE MEHANORECEPTORSKIH NEVRONOV

Lega in način razvejitve receptorskih nevronov v centralnem živčevju sta različna za različne tipe receptorjev in pogosto odvisna tudi od njihove lokacije na periferiji. Odrastki se v splošnem lahko odcepljajo vzdolž celotne dolžine aksona, takoj po njegovem vstopu v ganglij, ali pa pretežno v terminalnem (medianem) delu, pri čemer tvorijo različne vzorce.

Aksoni senzoričnih nevronov TO, FeCO in CS vstopajo v segmentalni ganglij trebušnjače prek glavnega nožnega živca (N5). Odrastki TO potekajo s kratkimi stranskimi razvejitvami vzdolž tretje korenine nožnega živca in se končno razvejijo anterio-ventralno na ipsilateralni strani ganglija (Ball in Field, 1981; Eibl in Huber, 1979; Esch s sod., 1980; Kalmring s sod., 1978; Mason, 1991), kjer tvorijo nevropilo imenovano anterior ring tract (aRT; Tyrer in Gregory, 1982) oz. mVAC (medio-ventralni asociacijski center (mVAC; Pflüger s sod., 1988). Pri kobilicah se aksoni na zvok občutljivih receptorskih nevronov končno razvejijo na sredini aRT, na vibracije občutljivi pa na antero- in posterolateralnem robu aRT (Römer, 1985; Kalmring s sod., 1996). Pri dolgotipalčnicah je tako npr. vidna očitna razlika med projekcijami vibracijsko občutljivih aferentov iz kompleksnega TO (SGO in IO) ter zvočnih receptorjev iz CA (Römer, 1985; Kalmring in sod. 1990a). Zvočno občutljivi receptorji projicirajo v mediani del nevropile (aRT; Römer in sod., 1988), vibracijsko občutljivi receptorji pa v antero- in posterolateralni del aRT (Field in

Matheson, 1998). Pri zvočno občutljivih receptorjih je razporeditev odrastkov znotraj aRT tonotopična, pri čemer receptorji občutljivi na nižje frekvence projecirajo v anteriorni del te »slušne nevropile«, receptorji z občutljivostjo na višje frekvence pa bolj posteriorno. (Oldfield, 1982, 1983; Römer in sod., 1988; Stumpner, 1996; Rössler in sod., 2006). Pri kobilicah brez funkcionalnih ušes (tistih brez timpanalne membrane) receptorji iz dela, ki je homologen strukturi CA, projecirajo v enake predele nevropile, kot pri vrstah, ki slišijo. Za razliko od slišočih vrst pa aRT ni tako obsežen, kar kaže na zmanjšane potrebe pri centralnem procesiranju dohodnih informacij. Spominja na stanje v mezo- in metatorakalnih nogah pri slušočih vrstah (Lakes-Harlan in sod., 1991).

2.5.1 Centralne razvejitve SGO in IO

Po vstopu v ganglij se od aferentov SGO odcepljajo anteriorne in posteriorne stranske veje. Ko dosežejo mediani del nevropile, se glavno deblo razcepi na posteriorno in anteriorno vejo in projecirajo v skrajno anteriorni del aRT na ipsilateralni strani, posteriorna veja pa se zaključi nekoliko prej. Nasprotno, aferenti IO se po vstopu v ganglij ne razcepijo, temveč se zaključujejo v posteriornih dveh tretjinah aRT na ipsilateralni strani (Nishino in Field, 2003).

2.5.2 Centralne razvejitve CS

Značilnost projekcij CS v nogah je antero-posteriorna razvejitev blizu vstopa N5 tik preden oz. ko dosežejo nevropilo. Od obeh vej, anteriorne in posteriorne, se odcepljajo stranske razvejitve. Terminalni deli se približujejo mediani liniji ganglija (Hustert in sod., 1981; Bräuning in sod, 1983) in se zaključijo v regijah, kjer imajo svoje izhode motonevroni (Hustert, 1978).

2.5.3 Centralne razvejitve FeCO

Od glavnega debla se v osrednjem delu nevropile odcepi nekoliko močnejša posteriorna stranska veja. Glavna veja se približa mediani liniji ganglija in se terminalno zaključi v anteriornem delu aRT. Selektivno retrogradno barvanje nevronov FeCO pri murnih je pokazalo, da nevroni dorzalnega skoloparija projecirajo izključno v aRT (Nishino, 2000),

medtem ko nevroni ventralnega skoloparija projecirajo tako v lateralne asociacijske centre (LAC), kjer je motorična nevropila (Field in Pflüger, 1989), kot v aRT (Nishino, 2000). Ureditev aksonov FeCO pri murnih bi v grobem lahko označili kot somatotopično, če skoloparija obravnavamo ločeno (Nishino in sod., 1999), vendar pri vrstah z delno spojenima skoloparijema prihaja do prekrivanj v centralnih projekcijah med skoloparijema. Nas so zanimali vibracijsko občutljivi nevroni ne glede na izvor. Po vstopu aferentov FeCO v nevropilo se od glavnega debla odcepljajo nekoliko daljše anteriorne in krajše posteriorne stranske veje (Mücke, 1989). Glede na obliko terminalnih razvejitev ločimo 2 tipa celic FeCO, ki projecirajo v aRT: prve se razcepijo in projecirajo v anteriorni in posteriorni del aRT, druge pa se ne razcepijo in projecirajo v anteriorni del aRT. Aferenti FeCo imajo skoraj identične centralne projekcije kot nekateri aferenti iz SGO (Nishino, 2003).

2.6 PROCESIRANJE VIBRACIJSKE INFORMACIJE V CENTRALNEM ŽIVČEVJU (pomen senzoričnih vhodov)

Centralno procesiranje vibracijske informacije je bilo opisano večinoma pri vrstah ravnokrilcev, predvsem pri kobilicah in murnih, ki komunicirajo zvočno. Največ podatkov imamo o nevronih, ki se vzpenjajo proti možganom (Čokl in sod., 1977; Kühne in sod., 1982; Kalmring in sod., 1997). Ti kažejo, da se vzburjenje iz različnih vibracijskih in zvočnih receptorjev iz posameznih nog prenaša po istih vzpenjajočih nevronih. Te nevrone je Kühne (1982) glede na informacijo, ki jo prenašajo, razdelil v 3 skupine: vibracijsko zvočni (VZ), zvočni (Z) ter vibracijski (V). Vibracijski nevroni tipa V1, V4 in V5 so uglašeni na frekvence nižje od 500Hz, medtem ko imajo nevroni tipa V2, V3 in VZ širši razpon, najbolj pa se odzivajo na frekvence med 500 in 1000 Hz. Med slednjimi so zabeležili najvišjo občutljivost na vibracije.

Frekvenčna občutljivost vibracijskih internevronov merjenih v protorakalnem gangliju jamske kobilice *T. neglectus* kaže, v nasprotju z vrstami ki slišijo, poudarek na zaznavanju vibracij nizkih frekvenc (pod 200 Hz). Med prevladujočimi nizkofrekvenčnimi nevroni so hkrati tudi tisti, ki so najbolj občutljivi (Stritih, 2009). Nevroni z vrhom občutljivosti pri frekvencah med 50 in 200 Hz imajo vzdražni prag pri nižji intenziteti, kot je bila izmerjena za najobčutljivejše celice TO pri tej vrsti (Čokl s sod., 1995). Ta občutljivost hkrati precej

presega tisto, ki je bila izmerjena za različne mehanoreceptorične organe oz. senzile, ki se primarno odzivajo na vibracije nizkih frekvenc (Lakes in Schikorski, 1990; Grosch s sod., 1995; Mücke, 1991). Ni jasno od kod v centralni živčni sistem prihaja informacija o nizko frekvenčnih vibracijah, na katere se odzivajo internevroni jamskih kobilic.

2.7 NAMEN NALOGE

Namen naloge je pri jamskih kobilicah vrst *T. neglectus* in *T. cavicola* beležiti aktivnost vibracijsko občutljivih receptorskih nevronov sprednjih nog z njihovega aksonalnega dela v prvem oprsnem (protorakalnem) gangliju in določiti obliko centralnih razvejitev merjenih nevronov. Pričakujemo, da bomo z uporabo visoko selektivnih elektrod našli večji delež nizko-frekvenčno občutljivih receptorskih nevronov, kot so jih pokazale prejšnje študije vibracijskega čuta pri ravnokrilcih. Testirali bomo intenzitetno občutljivost nevronov na sintetizirane vibracijske pulze različnih frekvenc ter jih po končanem merjenju napolnili z označevalcem oz. barvilom. Pri tem bomo testirali učinkovitost različnih znotrajceličnih barvil in poizkušali merjene nevrone obarvati čim dlje proti periferiji. Iz kombinacije frekvenčne občutljivosti in oblike razvejitev želimo ugotoviti, kateremu organu na periferiji pripada merjeni nevron, ter ali imajo nevroni skupnega izvora in različnimi frekvenčnimi občutljivostmi različno pozicijo v nevrotilu.

3. MATERIAL IN METODE

3.1 POSKUSNE ŽIVALI

Vse poskuse smo izvajali na odraslih osebkih in zadnjih larvalnih fazah jamskih kobilic iz rodu *Troglophilus neglectus* in *T. cavicola* obeh spolov. Živali smo nabrali v jamah in umetnih rovih na lokacijah: Brje na Krasu, Špegličeva jama pri Žalcu ter v jami na Kozlovem robu nad Tolminom. Hranili smo jih v steklenem terariju, ki smo ga obložili z mahom, kamenjem in lubjem. Občasno smo jih hranili s hrano za akvarijske ribice, skrbeli pa smo tudi da so imele vodo za pitje. V prvem delu poskusov smo jih imeli v hladilniku, kjer smo jim poskušali zagotoviti jamske pogoje (dnevno (8h)/nočni ritem (16h), temperature $11 \pm 2^\circ\text{C}$, 70-80% vlažnost). Zaradi rednih poginov živali smo jih predstavili v jamski laboratorij, kjer verjetno zaradi boljše prezračenosti do poginov ni prihajalo. Zaradi zamika v razvojem ciklu med vrstama smo poskuse praktično lahko izvajali skozi vse leto; na vrsti *T. neglectus* poleti oz. jeseni, na vrsti *T. cavicola* pa pozimi oz. spomladi.

3.2 KOMBINIRANA TEHNIKA INTRACELULARNEGA ODVAJANJA AKTIVNOSTI IN VNAŠANJA BARVILA

Z namenom da bi določili fiziološke in morfološke lastnosti vibracijsko občutljivih receptorskih nevronov sprednjih nog, ki projecirajo v protorakalni ganglij, smo ob tresenju sprednje leve noge beležili odziv nevronov ob vstopu nožnega živca v ganglij ter jih po ustreznem fiziološkem testiranju obarvali z znotrajceličnimi barvili oz. označevalci.

3.2.1 Preparacija

Žival smo omrtvičili s CO_2 in jo z mešanico voska in kolofonije pritrdili z ventralno stranjo navzgor na kovinsko mizico na magnetnem stojalu. Tretji par nog smo odstranili, drugega pa pritrdili ob telo. Prvi par nog smo s plastelinom začasno pritrdili na žički, ki sta bili vpeti v strukturi stojala mizice. Z voskom smo zalili celotno glavo in s tem preprečili njeno premikanje in pa požiranje zraka v prebavilo. Z voskom pa smo zalili tudi vse vrzeli med kolki nog, kolki in glavo ter kolki in zadkom. Tako je nastal nepropusten bazenček, v katerega smo dodajali fiziološko raztopino in s tem preprečili, da bi se preparat izsušil.

Prerezali smo opno od glave do prve oprsne trebušne plošče in le-to odstranili. Pri tem smo pazili, da nismo poškodovali nožnega živca in ganglija ter prebavil. Ganglij smo nato podložili z jekleno žličko, žličko vpeli v nosilec in s tem ganglij nekoliko privzdignili. Da bi omogočili lažje prodiranje elektrod v ganglij, smo ovojnico obdelali z encimom (Kolagenaza, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA). Najprej smo površino ganglija osušili s koščki papirnatih brisač in nato nanj položili majhen košček kristalizirane kolagenaze (Sigma, kolagenaza tip IV). Počakali smo približno eno minuto in nato encim spirali s fiziološko raztopino, ki smo jo popivnali s papirjem in to večkrat ponovili.

3.2.2 Poskusna postavitvev in izvedba poskusa

Elektrofiziološke meritve smo izvajali v Faradayevi kletki. Magnetno stojalo smo pritrdili na jekleno mizo, ki duši tresljaje iz okolice – vedno na isto mesto zaradi celotne postavitve aparatur. Tarze sprednje leve noge smo z voskom fiksirali na paličico pritrjeno na vibracijski vzbujevalnik (Bruel&Kjaer, tip 4810, Nærum, Danska). V zadek živali smo vstavili klorirano srebrno žičko, ki je služila kot indiferentna elektroda. Znotrajcelični odziv nevronov na tresljaje smo beležili s borosilikatno pipeto s filamentom (Sutter Instruments, Novato, ZDA). Izdelali smo jih z horizontalnim vlečnikom (Sutter Instruments, tip P-87, Novato, ZDA), na katerem smo nastavili vse potrebne parametre, ki so nam dali elektrode s tanko konico in pravo upornostjo. Konico smo napolnili z označevalcem Nevrobotinom oz. barvilom Lucifer yellow. Ob uporabi Nevrobotina smo konico pipete napolnili s 5% raztopino označevalca v 1M kalijevev acetatu, zadnji del pipete pa z 1M kalijevev acetatom, ki je služil kot elektrolit. Pri uporabi Lucifer yellow nam je kot elektrolit služil 1M litijev klorid. Upornost tako izdelanih elektrod je bila 100-120 MΩ. Odzive receptorskih nevronov smo beležili v končnem delu nožnega živca tik pred vstopom v ganglij ter v lateralnem delu ganglija tik po vstopu živca. Prodirali smo z ventralne strani živčevja. Pozicijo elektrode smo uravnavali in z njo prodirali v tkivo s pomočjo mikromanipulatorja (Leitz, Wetzlar, Nemčija). Celični potencial, zabeležen z elektrodo, se je ojačal ob prehodu prek intracelularnega ojačevalca (Electrometer Duo 773, WPI, Sarasota, ZDA), zdigitaliziral (CED, 1401 plus, Cambridge, VB) in shranil v računalnik s programom Spike 2 (6.07, CED, Cambridge, VB). Stimulacijske programe izdelane s programom Sound Forge (Sonic Foundry, 4.0, Middleton, ZDA) in Cool Edit

Pro (Syntrillium, 2.0, Cambridge, VB) smo prožili po sekvencah s pritiskom na tipke na tastaturi (bližnjice), kar je omogočilo hitro testiranje intracelularno zaznanih celic. Intenzitete in frekvence dražljajev smo določili na podlagi že poznane občutljivosti vibracijskih receptorjev, ki so jih merili ekstracelularno Čokl in sodelavci (1995) ter občutljivosti interneuronov pri tem rodu kobilic (Stritih, 2006). Dražljaji so bili sinusni pulzi dolžine 100 ms, ponavljalnega časa 500 ms ter osnovnih frekvenc med 30 in 5000 Hz. Intenzitete dražljajev so bile v območju med 0,005 in 1,6 m/s² (celice »TN«), oz. do 4 m/s² (celice »TC«). Intenziteto, nastavljeno v programu, smo ojačali z napetostnim ojačevalnikom (Neurolog, Digitimer, Welwyn Garden City, VB), umeritev izhodnih intenzitet pa opravili z laserskim vibrometrom (Polytec, OFV 353, OFV 2200; Waldbronn, NEM). Uporabljali smo fiksne stimulacijske sekvence dražljajev naraščajoče intenzitete (z razponom po 5dB) za vsako od testnih frekvenc. Te sekvence smo uporabljali za testiranje vzdražnega praga celice. Celice smo testirali tudi z zaporedjem pulzov enake intenzitete in naraščajočih frekvenc. Ta test je služil za hitro testiranje frekvenčne občutljivosti takoj po prodoru v celico. Med samim prodiranjem v tkivo pa smo kot 'iskalno' sekvenco uporabljali zaporedje treh pulzov s frekvencami 50, 700 oziroma 1400 Hz in takoj po penetraciji v celico tudi v grobem ugotovili frekvenčno območje njene največje občutljivosti.

3.2.3 Označevanje celic

Po zaključku fiziološkega testiranja smo v vsako celico iontoforentično vnesli barvilo oz. označevalec. Uporabljali smo znotrajcelični označevalec Neurobiotin oz. barvilo Lucifer yellow. V celico smo ga injicirali s konstantnim depolarizacijskim tokom z jakostjo 3.5–4 nA. Moč obarvanja smo uravnavali z močjo toka in časom tokovnega injiciranja. Moč toka smo počasi povečevali do približno 4 nanoamperov in sproti preverjali ali še imamo stabilen celični odziv. Obarvanja so tako trajala največ 5 minut. V nasprotnem primeru je lahko prišlo do obarvanja okolnega tkiva in tako do slabšega kontrasta oz. terminalne razvejitve nevronov niso bile vidne. Pri vsaki poskusni živali smo testirali in barvali po en nevron.

3.2.4 Obdelava tkiva

Takoj po končanem označevanju celice z barvilom smo fiksativ (4% formalin v fosfatnem puftru) najprej nalili v žival in tako ustavili nadaljnje širjenje barvila. Nato smo ganglij izpreparirali iz živali ter ga najmanj 1 uro, navadno pa čez noč, fiksirali v enakem fiksativu. Po končani fiksaciji smo ganglij 2-3 sprali v fosfatnem puftru (PB) z detergentom triton x-100 (PBST).

Preparate obarvane z Lucifer yellow smo dehidrirali v akoholni vrsti (1x10 min. 50, 70, 90 in 96% etanol ter 2x 100% etanol) in ga nato zbistrali v metilsalicilatu (nekaj min.). Preparat je bil pripravljen za opazovanje pod svetlobnim mikroskopom. Presvetljevali smo jih z modro svetlobo in obarvane nevrone opazovali kot fluorescentno zelene objekte v temnem polju.

Na preparate, barvane z Nevrobiotinom, je bilo potrebno vezati barvilo, saj je le ta brezbarven. Uporabljali smo dva načina. Postopek se razlikuje v končnem delu v odvisnosti od tega ali potrebujemo črno-prozorno kontrasten trajni preparat ali pa preparat, ki fluorescira. Ganglij smo najprej dehidrirali v alkoholni vrsti (50, 70, 90, 96, 2x100% etanolu), v vsaki koncentraciji po 10 minut. Po končani dehidraciji smo ganglij za 3-5 minut prenesli v xylol in ga nato ponovno hidrirali (96, 90, 70% etanol po 5 minut; 50, 30 % etanol in bidestilirana voda po 10 minut). Sledilo je spiranje v PB (3x10 minut). Ganglij smo prenesli v PB, ki smo mu dodali 1mg kolagenaze in 1mg hialuronidaze na 1 ml, in ga segrevali na 37°C 1 uro. Sledilo je spiranje v PBST (3x10 min). Nato smo ganglij preko noči inkubirali v kompleksu Avidin-Biotin (1 kapljica avidina + 1 kapljica biotina (kit – Vector laboratories, Burlingame, ZDA) na 2,5 ml PBST – priprava pol ure pred inkubacijo) pri sobni temperaturi in nato izpirali s PB 3x10min. Sledila je DAB reakcija z diaminobenzidinom, kjer je prišlo do obarvanja. Dodali smo ga 2 kapljici v 3 ml PBST in ganglij inkubirali 1 uro. Nato smo ganglij oksidirali v raztopini H₂O₂ (1 kapljica H₂O₂ v 3ml PBST) nekaj sekund (10 s). Dalj časa kot je ganglij v tej raztopini, intenzivnejše je obarvanje. Reakcija se ustavi po prenosu v ohlajen PB. Sledi ponovna dehidracija v alkoholni vrsti (50, 70, 90, 96, 2x100% etanol; 10 min vsaka konc.) Zadnji korak je čiščenje ganglija z metilsalicilatom, s katerim ganglij zbistrimo. Tako je pripravljen za opazovanje pod mikroskopom. Tako obdelan preparat je kontrastno črno prozorne barve

(celica je črne barve). Če namesto Avidin- Biotin kompleksa uporabimo Avidin (Streptavidin Cy3), ki ga razredčimo v razmerju 1:200 v PBST, izpiranju ne sledita DAB reakcija in oksidacija v raztopini H₂O₂, vendar le še postopek dehidracije, ter čiščenje z metilsalicilatom. Tako obdelan preparat pa fluorescira in je rdeče – črno kontrasten (celica rdeče fluorescira).

3.3 ANALIZA ELEKTROFIZIOLOŠKIH PODATKOV

Zapise celične aktivnosti smo shranjevali skupaj z dražljaji direktno prek A/D pretvornika v standardni računalnik s programom Spike 2 za Windows (6.07, CED, Cambridge, VB). V tem programu smo podatke tudi analizirali. Ovrednotili smo naslednje parametre odziva.

- Kot merilo ODZIVA nam je služilo povprečno število akcijskih potencialov na dražljaj.
- Akcijske potenciale, ki so se v celici prožili neodvisno od draženja, imenujemo SPONTANA AKTIVNOST. Da ni prihajalo do popačenja rezultatov, je bilo potrebno pri analizi takšno aktivnost odšteti, saj bi drugače dobili večjo jakost odziva od realne. Spontano aktivnost smo merili v časovnem intervalu 300ms pred pričetkom dražljaja. Na podlagi povprečne stopnje proženja, izračunane na podlagi vsaj 10 takih intervalov, smo od dolžine trajanja ekscitacijskega odziva odšteli ustrezno število akcijskih potencialov.
- Kot VZDRAŽNI PRAG smo definirali tisto intenziteto dražljaja, ki je vsaj v polovici ponovitev povzročila proženje vsaj enega akcijskega potenciala v odzivu oz. kjer smo v primeru spontane aktivnosti dobili pozitivno vrednost pri oceni jakosti odziva celice.
- Pri vsaki celici smo poskušali vzdražni prag določiti pri vsaki od testnih frekvenc in na podlagi teh podatkov izrisali KRIVULJO VZDRAŽNEGA PRAGA, pri čemer smo intenziteto dražljajev izrazili kot pospešek.
- LATENCA ODZIVA je čas med nastopom dražljaja in vrhom prvega akcijskega potenciala v odzivu.
- S testiranjem s sekvenco dražljajev enake intenzitete in naraščajočih frekvenc smo za posamezno celico prikazali KRIVULJO IZOINTENZITETNEGA ODZIVA; t.j. jakost odziva pri posamezni frekvenci dražljaja.

3.4 ANALIZA OBLIKE ŽIVČNIH CELIC

Ganglij, očiščen z metilsalicilatom, smo opazovali s svetlobnim mikroskopom (Leica DMRB/E; Wetzlar, Nemčija) pod navadno belo svetlobo oz. osvetlitvijo za fluorescenco (modro) – odvisno od vrste označevalca. Preparate smo fotografirali z analogno kamero (Leica, Wild MPS52/48, Wetzlar, Nemčija) pri različnih povečavah (100, 160x) in v različnih ravninah z razmikom 2 μm . S programom Photoshop 7.0 (Adobe) in grafično kartico (Graphire 2, Wacom, Vancouver, ZDA) smo na podlagi fotografij izrisali lego in obliko terminalnih razvejitev nevrone v gangliju. Lego razvejitev smo opisovali z naslednjimi izrazi: lateralno (pomeni proti stranskemu robu ganglija), mediano (proti sredini ganglija), anteriorno (v smeri proti glavi) in posteriorno (usmerjeno proti zadku). Z besedo ipsilateralno smo označevali vse na isti lateralni polovici ganglija, ki je vseboval obarvan nevron. Na skicah ganglija (glej rezultate) je prikazana le ipsilateralna polovica ganglija. Na njej je prikazan vstop nožnega živca v ganglij (lateralno), ganglijski živec št. 3 (anterolateralno), konektiva med protorakalnim in subesophagealnim ganglijem (anteriorno) ter med protorakalnim in mezotorakalnim ganglijem (posteriorno).

4. REZULTATI

Pri elektrofizioloških poskusih sem uspela penetrirati 30 čutilnih nevronov, ki so se odzivali na tresenje sprednje leve noge. Od teh sem v 20 primerih penetracijo izgubila še pred zaključeno meritvijo, v enem primeru sem opravila kompletno meritev frekvenčne občutljivosti brez obarvanja, 9 nevronov pa sem fiziološko testirala in uspešno obarvala lumen njihovih terminalnih razvejitev. Polnjenje nevronov z označevalcem oz. barvilom vse do mesta perifernega izvora mi kljub posameznim dolgotrajnim injiciranjem toka ni uspelo. V rezultatih prikazujem obliko aksonalnih razvejitev v ipsilateralnem delu prorakalnega ganglija, primer zapisa elektrofiziološkega odziva na dražljaj ter frekvenčno občutljivost posameznih nevronov. Posamezni primeri so označeni s črkami TN oziroma TC in zaporedno številko pridobljenega posnetka celičnega odziva. Pod oznako TN sem vodila evidenco posnetkov pri *T. neglectus*, s kratico TC pa sem označevala posnetke pri vrsti *T. cavicola*.

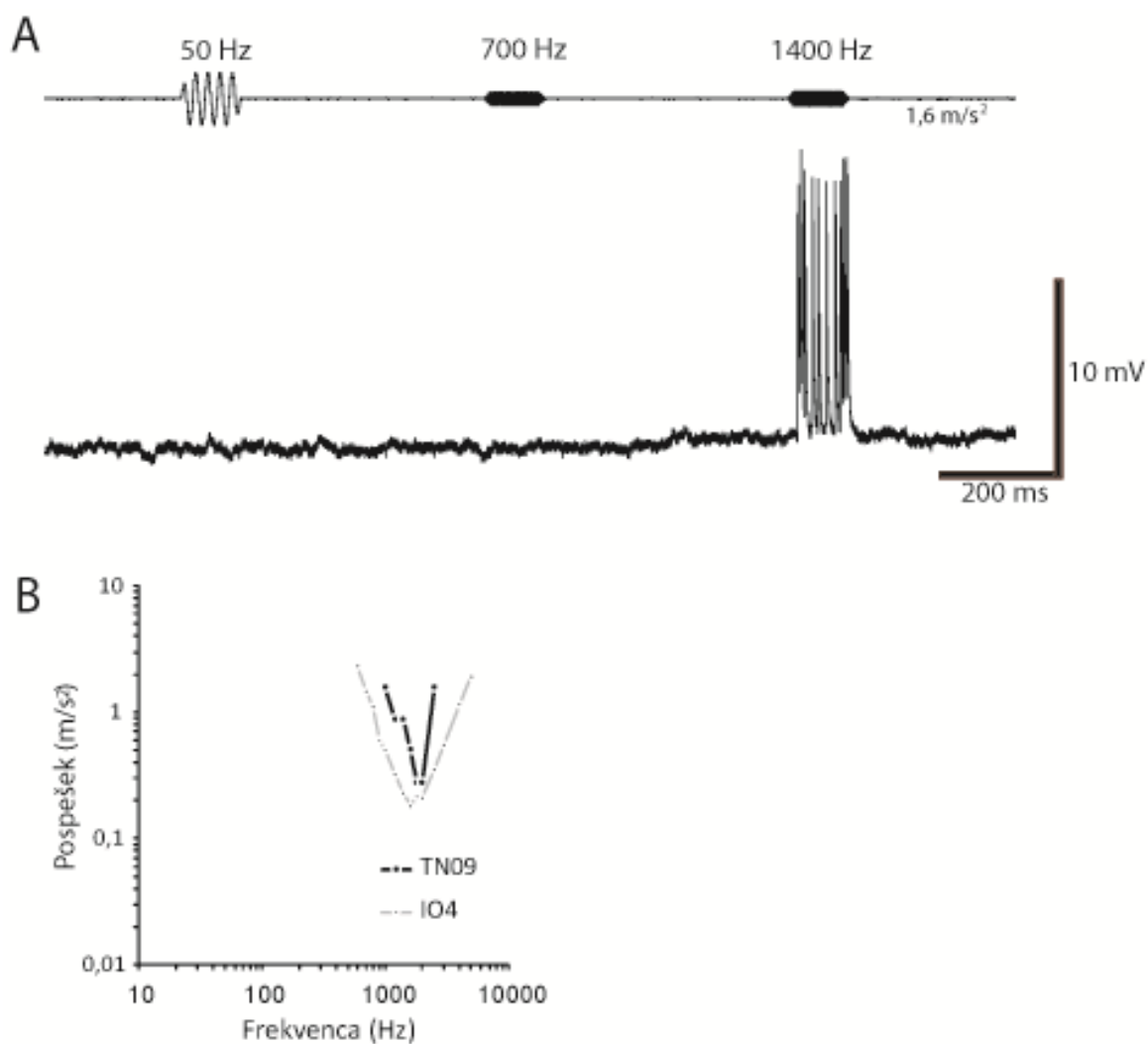
4.1 OBLIKA IN FUNKCIONALNE LASTNOSTI RECEPTORSKIH NEVRONOV

4.1.1 TN09

Celici TN09 sem uspela določiti frekvenčno občutljivost oz. vzdražni prag, po končanem fiziološkem testiranju pa sem penetracijo izgubila.

Celica se je odzivala na najvišjo od frekvenc v »iskalnem nizu«, predvajanem pri pospešku $1,6 \text{ m/s}^2$ (1400 Hz; slika 1A). Na te dražljaje se je odzivala s 5–7 akcijskimi potenciali ter latencami med 18–20 ms.

Celica se je odzivala na ozko območje frekvenc med 1000 in 2500 Hz (slika 1B). Vrh občutljivosti je bil izražen pri 1800–2000 Hz z vzdražnim pragom pri pospešku $0,28 \text{ m/s}^2$. Z višanjem oz. nižanjem frekvence je vzdražni prag močno narastel (na $1,6 \text{ m/s}^2$ pri 1000 oz. 2500 Hz). Poleg krivulje vzdražnega praga TN09 prikazujem uglasitveno krivuljo IO4, ki so jo na podlagi zunajceličnih meritev Čokl in sodelavci (1995) pripisali receptorjem intemedianega organa. Medtem, ko vrh omenjenih krivulj leži pri podobnih vrednostih frekvenc in intenzitet, je uglasitev celice TN09 precej ožja od skupine ekstracelularno merjenih celic.



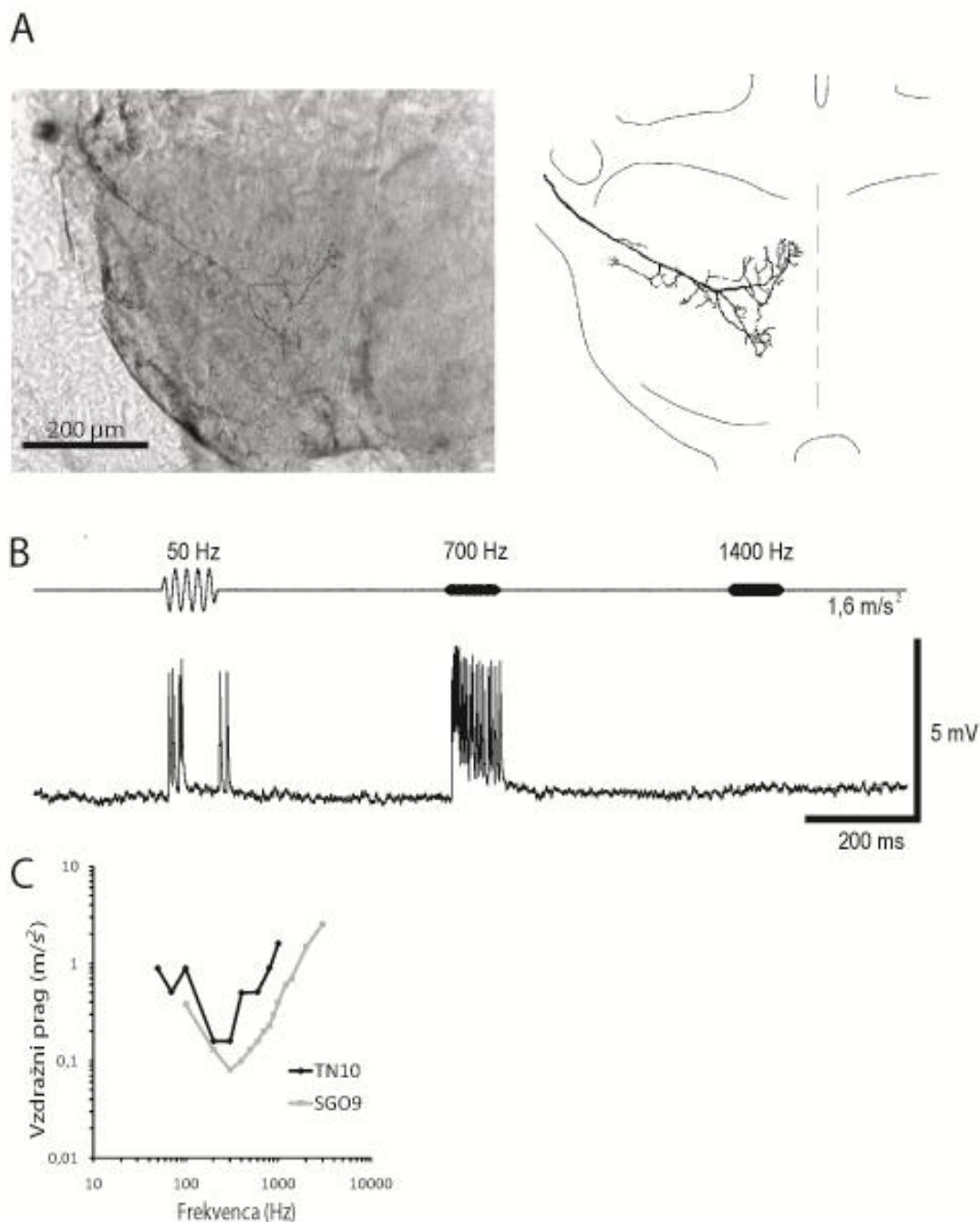
Slika 1. Receptorski nevron »TN09«. A. Zapis elektrofizioloških odzivov na draženje z "iskalnim nizom" frekvenc. B. Krivulja vzdražnega praga ter primerjava z uglasitveno krivuljo 4, ki so jo Čokl in sod. (1995) pripisali receptorjem intermedianega organa.

4.1.2 TN 10

Celica TN 10 vstopa v ganglij po nožnem živcu (N5) in se nato usmeri proti medianemu delu protorakalnega ganglija (slika 2A). V lateralnem delu aksona se odcepljajo krajše razvejitve predvsem v posteriorni smeri, mediano pa se akson razcepi na obsežnejšo anteriorno in manj obsežno posteriorno razvejitev, ki tvorita srpasto obliko. Anteriorna razvejitev sega za približno tretjino svoje dolžine bližje mediani liniji ganglija od posteriorne.

Iz odziva na iskalni niz je razvidno, da je celica občutljiva na širok razpon frekvenc (slika 2B). Pri 50 Hz se je odzivala s po 4–8 akcijskimi potenciali na dražljaj, pri 700 Hz pa z 15–18 akcijskimi potenciali na dražljaj. Pri 50 Hz je prišlo do proženja akcijskih potencialov v dveh ločenih skupkih, izraženih na začetku oz. ob koncu dražljaja. Latenca odziva na te dražljaje ($1,6 \text{ m/s}^2$) je 12–20 ms pri 50 Hz oz. 11–12 ms pri 700 Hz.

Frekvenčno občutljivost celice smo določili na podlagi intenzitetnega testiranja, kot je opisano v poglavju 2. Celica se je na draženje do intenzitete $1,6 \text{ m/s}^2$ odzivala v frekvenčnem območju med 50 in 1000 Hz, z vrhom občutljivosti med 200 in 300 Hz, kjer je bil vzdražni prag pri pospešku $0,16 \text{ m/s}^2$ (slika 2C). Pri 50 Hz je pospešek, potreben za odziv, narastel na $0,89 \text{ m/s}^2$, pri 1000 Hz pa na $1,6 \text{ m/s}^2$. Poleg krivulje vzdražnega praga TN10 prikazujem uglasitveno krivuljo SGO 9, ki so jo Čokl in sodelavci (1995) pripisali receptorjem subgenualnega organa.



Slika 2. Receptorski nevron »TN10«. A. Mikrografija protorakalnega ganglija z obarvanim terminalnim delom aksona (levo; neurobiotin) ter risba istega preparata (desno). B. Zapisi elektroфизиoloških odzivov na draženje ipsilateralne sprednje noge z "iskalnim" nizom sekvenc. C. Krivulja vzdražnega praga in primerjava z uglasitveno krivuljo 9, ki so jo Čokl in sod. (1995) pripisali subgenualnemu organu.

4.1.3 TN 12

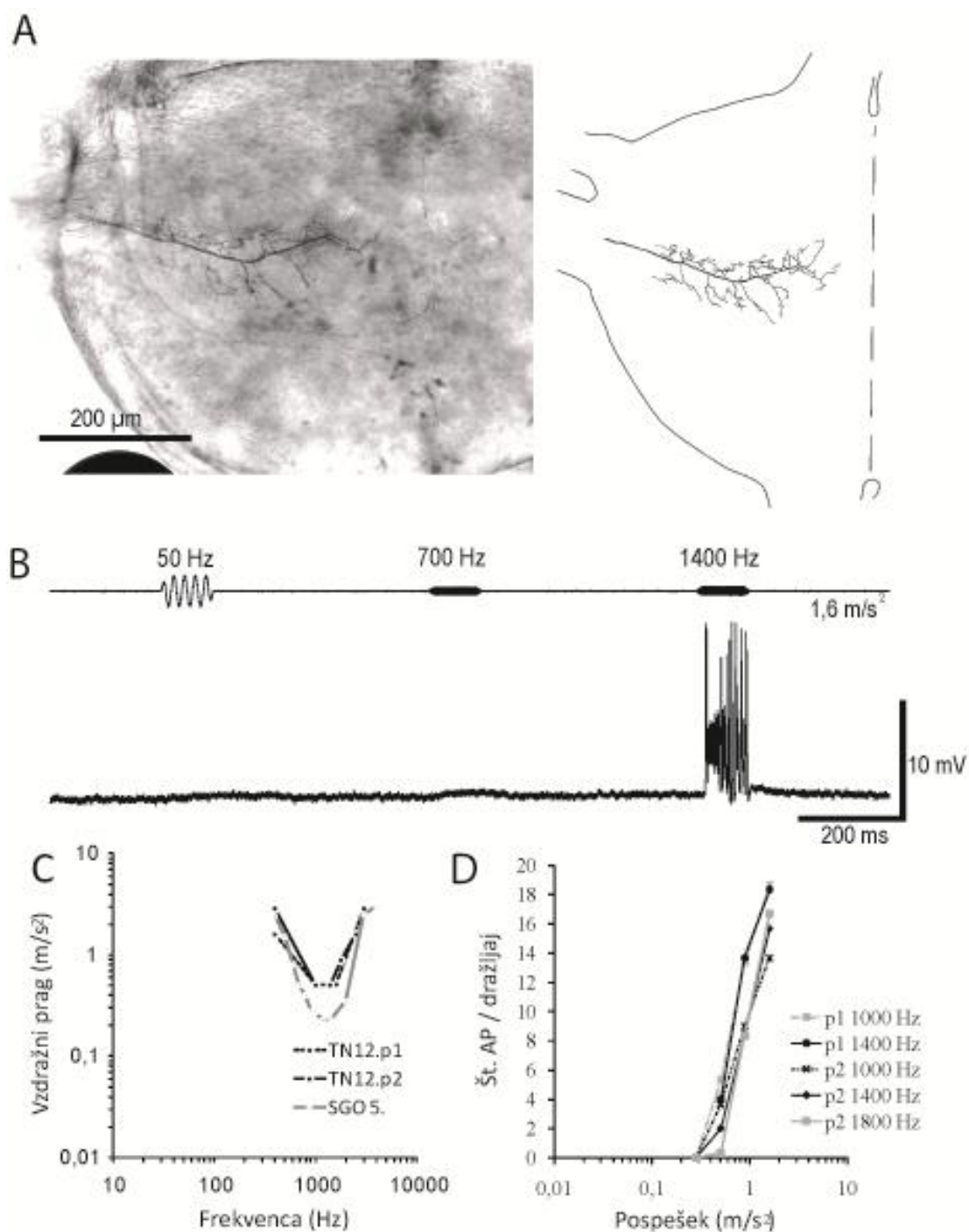
Celica TN 12 vstopa v ganglij po osrednjem delu nožnega živca, projicira proti medianemu delu protorakalnega ganglija (slika 3A) ter se zaključi v njegovem mediano anteriornemu delu. Odrastki podobne dolžine se iz osrednjega vlakna odcepljajo v anteriorni in posteriorni smeri vse od vstopa v ganglij pa do terminalnega dela.

Za nevron TN12 smo pridobili 2 posnetka (TN12-n1 in TN12-n2) in obakrat je po testiranju sledilo barvanje. V prvem primeru sem po nekaj manj kot 2 minutah prenehala barvati, ker sem izgubila odziv. Po ponovni penetraciji je barvanje trajalo nekaj več kot 6 minut. Glede na to da se je obarvala le ena celica in da je uglasitev, dobljena iz različnih posnetkov praktično enaka, lahko sklepamo, da je bil v obeh primerih testiran in barvan isti nevron.

Celica se je odzivala le na 1400 Hz v iskalnem nizu frekvenc (slika 3B). Na te dražljaje se je odzivala s 13–18 akcijskimi potenciali z latenco med 15–17 ms.

Celica se je odzivala v frekvenčnem območju med 400 in 3000 Hz z vrhom občutljivosti med 1000 in 1400 Hz (slika 3C), kjer je bil vzdražni prag pri pospešku okrog $0,5 \text{ m/s}^2$. Pri 400 Hz in 2500 oz. 3000 Hz je vzdražni prag narastel na 1,6 oz. $2,84 \text{ m/s}^2$. Poleg krivulje vzdražnega praga TN12 zaradi primerjave frekvenčne občutljivosti prikazujem uglasitveno krivuljo SGO5 (Čokl s sod, 1995), s tem da je absolutna občutljivost TN12 nekoliko nižja.

Jakost odziva smo merili pri frekvencah 1000, 1400 in 1800 Hz v območju 10 dB nad vzdražnim pragom. Pri vseh frekvencah se jakost odziva linearno povečuje v celotnem območju testiranih intenzitet. Z naraščajočo intenziteto draženja se je jakost odziva pri 1000 Hz povečala iz 4 na 14 akcijskih potencialov na dražljaj, pri 1400 Hz iz 2 na 16, pri 1800 Hz iz 1 na 17 akcijskih potencialov na dražljaj (Slika 3D).

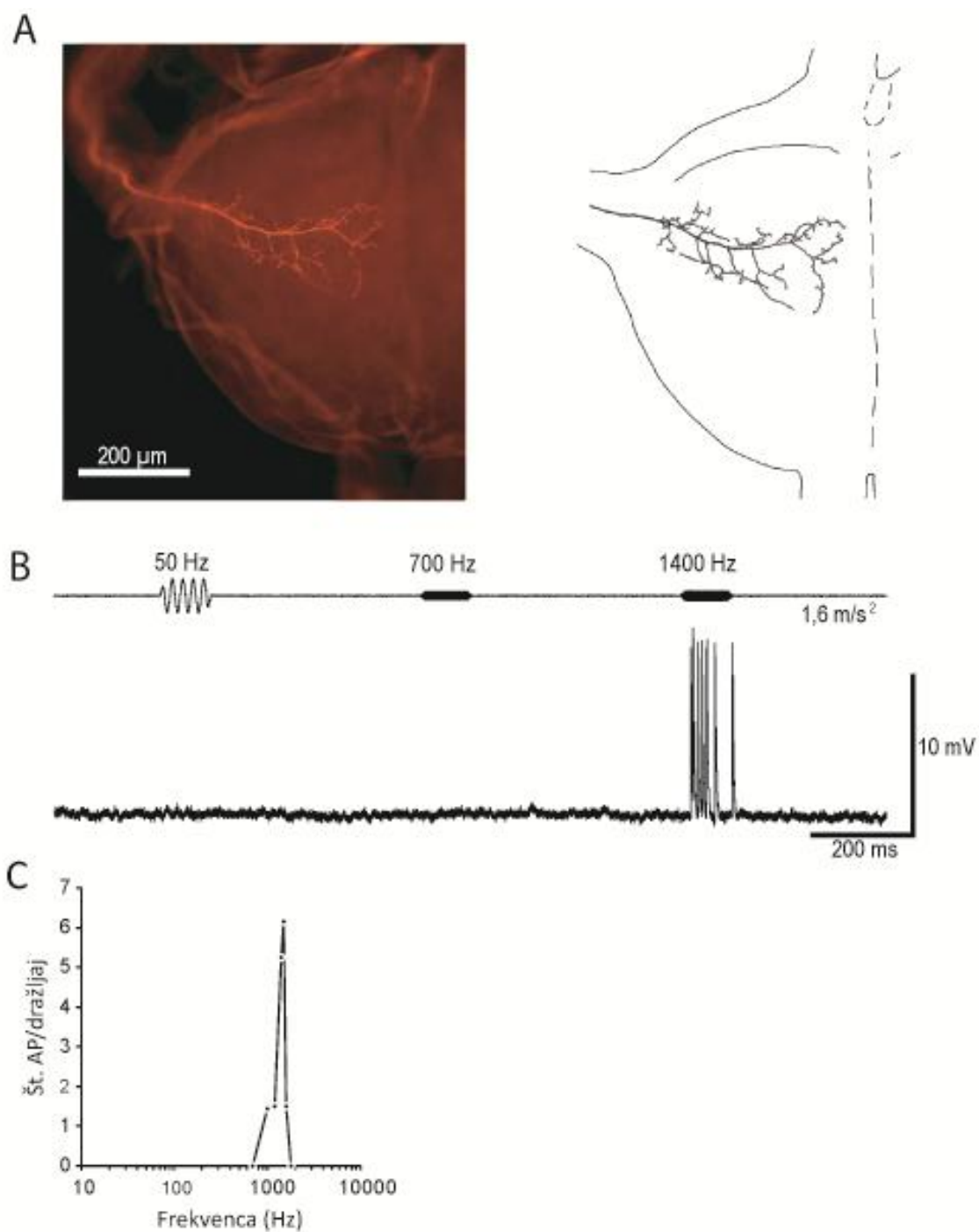


Slika 3. Receptorski nevron »TN12«. A. Mikrografija protorakalnega ganglija z obarvanim terminalnim delom aksona (levo; nevrobiotin) ter risba istega preparata (desno). B. Zapisi elektro-fizioloških odzivov na draženje ipsilateralne sprednje noge z "iskalnim" nizom frekvenc. C. Krivulja vzdražnega praga za oba posnetka ter primerjava z uglasitveno krivuljo 5, ki so jo Čokl in sod. (1995) pripisali subgenualnemu organu D. Intenzitetne krivulje pri frekvencah največje občutljivosti (povprečje 3 odzivov za posamezno frekvenco; oba posnetka - p1 in p2).

4.1.4 TN 14

Celica TN14 je po obliki zelo podobna celici TN12 (slika 4A). Takoj po vstopu v nevropilo preko osrednjega dela nožnega živca se vzdolž centralnega dela aksona odcepljajo anteriorni in posteriori odrastki. Za razliko od terminalnih razvejitev nevrone TN12 ima mediano dva daljša odrastka, ki projecirata posteriorno. Celica se je odzivala na najvišjo od iskalnih frekvenc, predvajanih pri $1,6 \text{ m/s}^2$ (1400 Hz; slika 4B), in sicer s 5–7 akcijskimi potenciali na dražljaj. Ti odzivi imajo latenco med 18–20 ms.

Celica se je odzivala v zelo ozkem frekvenčnem območju med 1000 in 1600 Hz z vzdražnim pragom pri pospešku $1,6 \text{ m/s}^2$ (slika 4C). Krivulja frekvenčne odvisnosti odziva pri tej jakosti draženja kaže ostro uglasitev na 1500 Hz, kjer je bil odziv v povprečju 6 akcijskih potencialov na dražljaj.



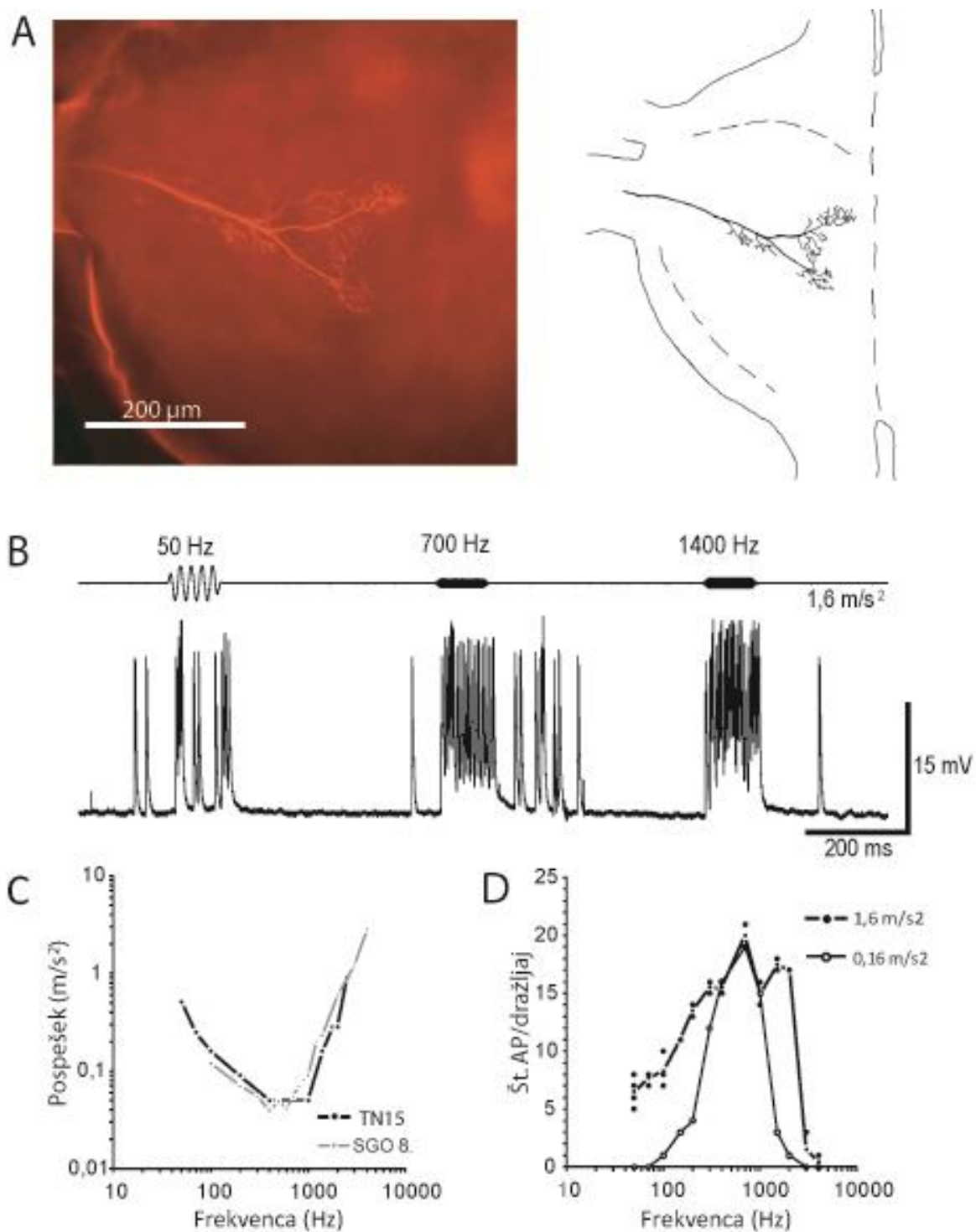
Slika 4. Receptorski nevron »TN14«. A. Mikrografija protorakalnega ganglija z obarvanim terminalnim delom aksona (levo; barvilo: nevrobiotin; fluorescenca) ter risba istega preparata (desno). B. Zapisi elektroфизиoloških odzivov na draženje ipsilateralne sprednje noge z "iskalnim" nizom frekvenc. C. Frekvenčna odvisnost odziva pri konstantnem pospešku ($1,6 \text{ m/s}^2$).

4.1.5 TN 15

Celica TN15 vstopa v ganglij po osrednjem delu nožnega živca in nato projecira mediano. (slika 5A). Iz lateralnega dela aksona izraščajo krajši odrastki v posteriorni smeri. Mediano se akson razdeli na anteriorno in posteriorno razvejitev, ki tvorita srpasto obliko. Anteriorna veja je obsežnejša in sega za približno tretjino svoje dolžine bolj proti mediani liniji ganglija kot posteriorna.

Že iz odziva na iskalni niz je razvidno, da je celica občutljiva na širok razpon frekvenc (slika 5B). Pri 50 Hz se je odzivala s 4–6, pri 700 Hz s 15–16 in pri 1400 Hz s 17–18 akcijskimi potenciali na dražljaj (pri čemer smo občasno spontano aktivnost odšteli od jakosti odziva). Latenca odziva (pri pospešku $1,6 \text{ m/s}^2$) je bila pri 50 Hz 10–14 ms, pri 700 Hz 6–11 ms in pri 1400 Hz 11–13 ms.

Celica se je pri draženju z intenziteto do $1,6 \text{ m/s}^2$ odzivala na frekvence med 50 in 2500 Hz (slika 5C). Vrh občutljivosti je v območju med 400 in 1000 Hz z zelo nizkim vzdražnim pragom (pri pospešku okrog $0,05 \text{ m/s}^2$, pri 50 Hz vzdražni prag pri $0,51 \text{ m/s}^2$, pri 2500 Hz pa pri $0,89 \text{ m/s}^2$). Poleg krivulje vzdražnega praga TN15 prikazujem uglasitveno krivuljo SGO 8 (Čokl in sod., 1995). Celico smo dražili tudi s konstantnim pospeškom (pri $1,6 \text{ m/s}^2$ in $0,16 \text{ m/s}^2$) – skozi celotno serijo testnih frekvenc (50–5000 Hz; (Slika 5D). Pri višji intenziteti smo opravili 2–4 ponovitve draženja, pri nižji intenziteti pa eno. Vrh odziva pri obeh intenzitetah leži pri 700 Hz. Pri višji intenziteti se celica pri 50 Hz odziva s 7 AP na dražljaj, jakost odziva narašča do 700 Hz (19–21 akcijskih potencialov na dražljaj) in nato pri 2500 Hz strmo pade. Pri nižji intenziteti je krivulja bolj strma; celica se močno odziva v območju med 400 in 1000 Hz (s 15–19 akcijskimi potenciali na dražljaj), z višanjem oz. nižanjem frekvence pa jakost odziva hitro upade (tako da zadnji odziv beležimo pri 100 oz. 2000 Hz).



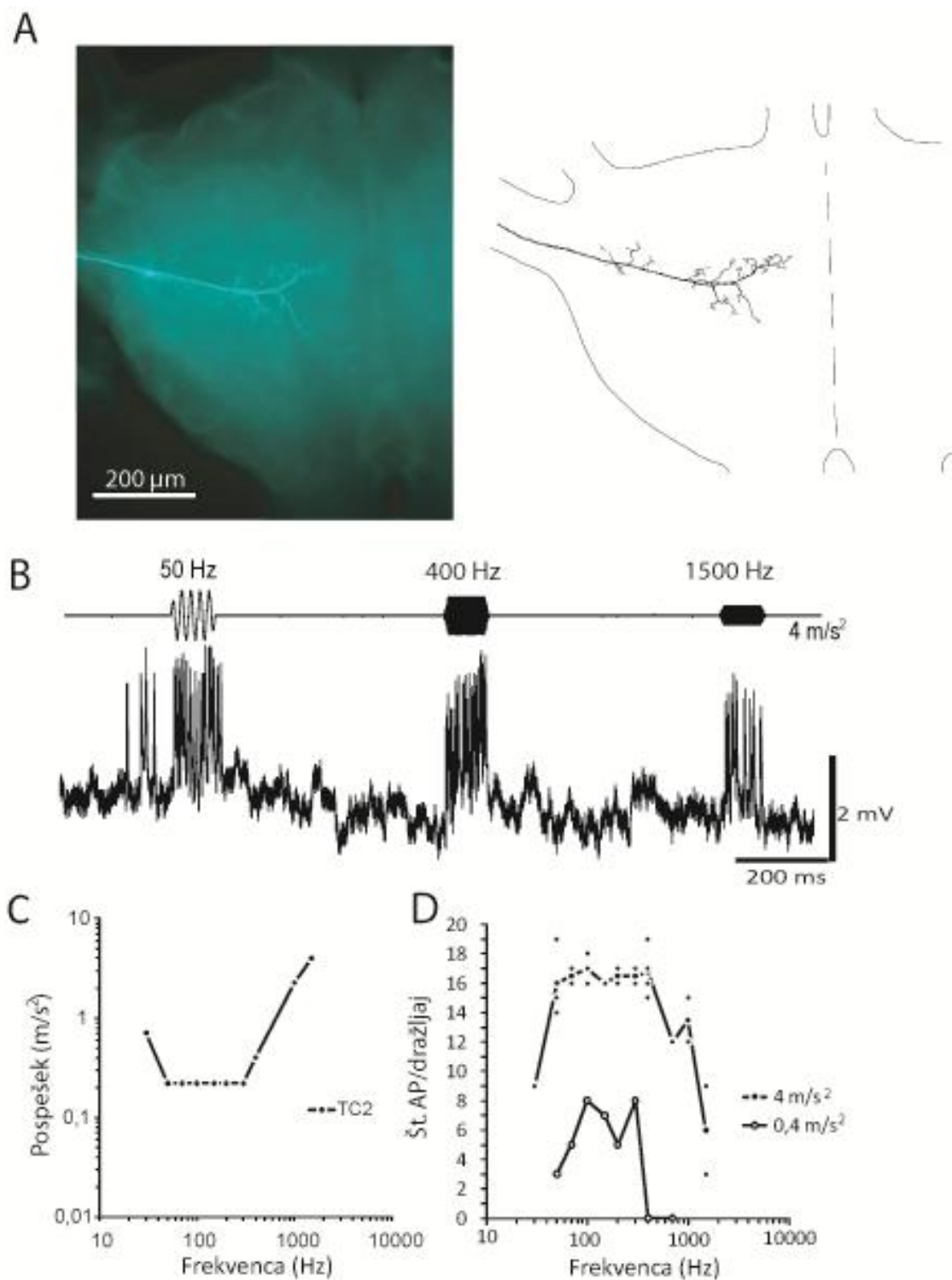
Slika 5. Receptorski nevron »TN15«. A. Mikrografija protorakalnega ganglija z obarvanim terminalnim delom aksona (levo; nevrobiotin; fluorescenca) ter risba istega preparata (desno). B. Zapisi elektrofizioloških odzivov na draženje ipsilateralne sprednje noge z "iskalnim" nizom frekvenc. C. Krivulja vzdražnega praga ter primerjava z uglasitveno krivuljo 8, ki so jo Čokl in sod. (1995) pripisali subgenualnemu organu. D. Frekvenčna odvisnost odziva pri konstantnem pospešku ($1,6 \text{ m/s}^2$: 2-4 odzivi in povprečje; $0,16 \text{ m/s}^2$: en odziv).

4.1.6 TC2

Celica TC2 (slika 6A) vstopa v ganglij po osrednjem delu nožnega živca. Iz lateralnega dela aksona izrašča nekaj zelo kratkih anteriornih odcepitev, mediano pa se vlakno obsežneje razveji. Mediani anteriorni odrastki so številčnejši in se končujejo bližje mediani liniji, kot posteriorni, ki se hkrati končajo pred posteriorno polovico nevropile.

Celica je občutljiva na širok razpon frekvenc, kar je razvidno iz odziva na iskalni niz (slika 6B). Pri 50 Hz se je odzivala s 13-17, pri 400 Hz s 16-17, pri 1500 Hz z 8-10 AP na dražljaj (latenca odziva pri 50 Hz 13–14 ms, pri 700 Hz 13–15 ms in pri 1400 Hz 22–26 ms pri pospešku 4 m/s. Pri draženju z intenziteto do 4 m/s² se je celica odzivala na frekvence med 30 in 1500 Hz (slika 6C) z vrhom občutljivosti med 50 in 300 Hz, kjer je bil vzdražni prag pri pospešku okrog 0,22 m/s². Pri 30 Hz je bil vzdražni prag pri 0,71 m/s², pri 1500 Hz pa pri 4 m/s².

Krivulji frekvenčne odvisnosti odziva (pri 0,4 oz. 4m/s²; slika 6D) kažeta podobno občutljivost kot krivulja vzdražnega praga. Pri višji intenziteti je odziv najmočnejši pri frekvencah med 50 in 400 Hz, kjer variira med 14 in 19 akcijskimi potenciali na dražljaj. Pri nižji intenziteti je krivulja ožja, odziv pa je najmočnejši med 70 in 300 Hz, kjer niha med 5 in 8 akcijskimi potenciali na dražljaj.



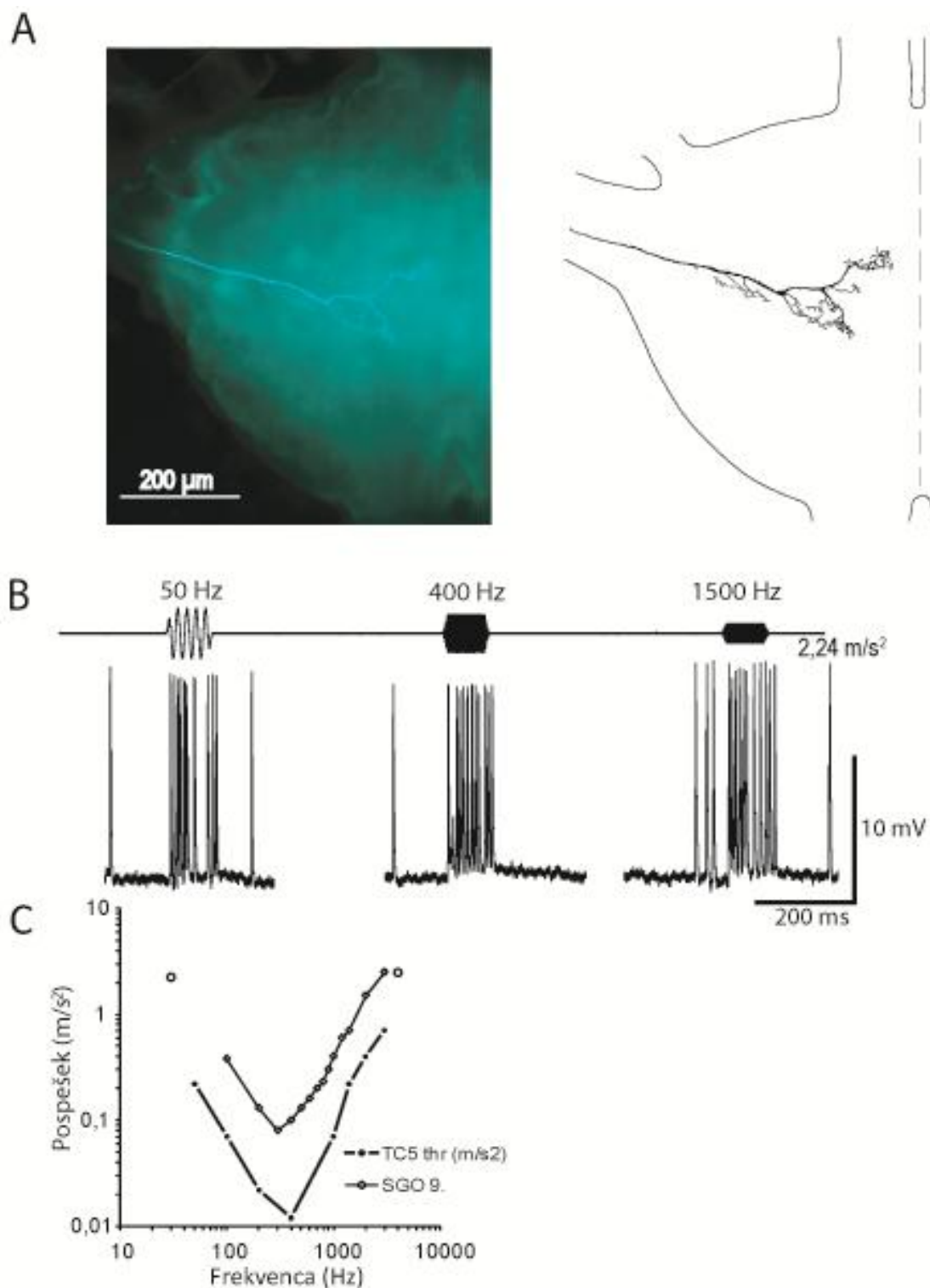
Slika 6. Receptorski nevron »TC2«. A. Mikrografija protorakalnega ganglija z obarvanim terminalnim delom aksona (levo; Lucifer yellow; fluorescenca) ter risba istega preparata (desno). B. Zapis elektrofizioloških odzivov na draženje ipsilateralne sprednje noge z "iskalnim nizom frekvenc. C. Krivulja vzdražnega praga. D. Frekvenčna odvisnost odziva pri konstantnem pospešku (4 m/s²: 1-4 odzivi in povprečje; 0,4 m/s²: en odziv).

4.1.7 TC5

Celica TC5 (slika 7A) vstopa v ganglij po osrednjem delu nožnega živca. Lateralno se od aksona odcepljajo kratki posteriorni odrastki, mediano pa se osrednje aksonsko vlakno usmeri anteriorno in se šibko razveji blizu mediane linije ganglija. Hkrati več krajših medianih odrastkov projecira posteriorno in se, podobno kot pri celici TC2, konča še v anteriorni polovici nevropile, pri čemer ne sega toliko proti mediani kot anteriorni del projekcije.

Celica se je odzivala na vse tri frekvence v iskalnem nizu (slika 7B). Latenca odziva pri pospešku $2,24 \text{ m/s}^2$ je bila pri 50 Hz 11 ms, pri 400 Hz 11 ms in pri 1400 Hz 11 ms.

Celica se je odzivala v frekvenčnem območju med 50 in 3000 Hz (slika 7C) z vrhom občutljivosti pri 400 Hz, kjer je bil vzdražni prag pri pospešku $0,012 \text{ m/s}^2$. Pri 50 Hz je bil vzdražni prag pri $0,22 \text{ m/s}^2$, pri 3000 Hz pa pri $0,71 \text{ m/s}^2$. Potek uglasitvene krivulje celice TC5 primerjamo s krivuljo SGO 9 (Čokl in sod., 1995), medtem ko je absolutna občutljivost celice TC5 za okrog 15 dB večja.



Slika 7. Receptorski nevron »TC5«. A. Mikrografija protorakalnega ganglija z obarvanim terminalnim delom aksona (levo; lucifer yellow) ter risba istega preparata (desno). B. Zapis elektrofizioloških odzivov na draženje ipsilateralne sprednje noge pri "iskalnem" nizu frekvenc - sestavljena iz podatkov hitrega testa C. Krivulja vzdražnega praga ter primerjava z uglasitveno krivuljo 9, ki so jo Čokl in sod (1995) pripisali subgenualnemu organu.

4.1.8 TN 26 in TN 27

Oblika in lega celic TN26 in TN 27 v gangliju je zelo podobna, prav tako pa odziv na draženje, zato ju predstavljamo skupaj.

Pri preparatu TN26 (slika 8A; levo in sredina) sta se obarvali 2 celici praktično enake oblike. Aksona vstopata v ganglij prek anteriornega dela nožnega živca, označuje pa ju široka bifurkacija kmalu po vstopu v nevropilo in šibko razvejanje odcepov, ki po vsej dolžini nosita kratke anteriorne in posteriorne odrastke. Medtem ko anteriorna veja projecira mediano tik ob anteriornem robu nevropile, druga projecira najprej posteriorno, se nato usmeri mediano ter se zaključi blizu mediane linije ganglija.

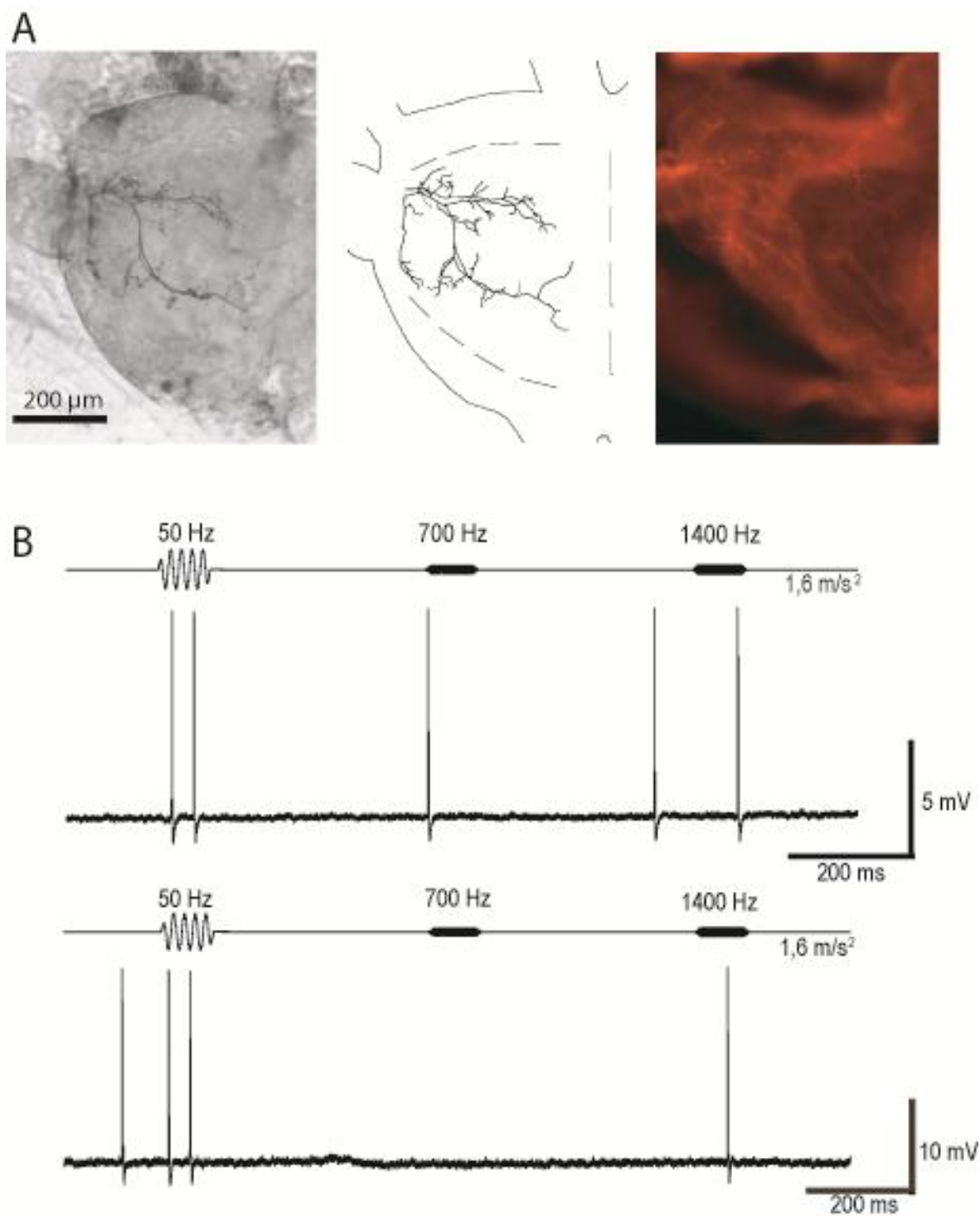
Pri preparatu TN27 (slika 8A; desno) je zaradi napake pri histološkem postopku prišlo do deformacije oblike ganglija in tako otežene prepoznavne oblike. Še vedno pa je razvidno da se celica TN27 tako kot TN26 razveji takoj po vstopu v ganglij, objame ipsilateralno sredino ganglija ter se terminalno zaključi v anteriornem in posteriornem delu.

Oba preparata sta se šibko odzivala samo na najvišje testne intenzitete ($1,6 \text{ m/s}^2$) 30 in 50 Hz dražljajev, kjer so se nad nivojem spontane aktivnosti prožili 1–3 akcijske potenciale na dražljaj (slika 8B). Latenca odziva pri pospešku $1,6 \text{ m/s}^2$ je pri T 26 variirala v območju med 20–45 ms, pri T27 pa med 14–90 ms.

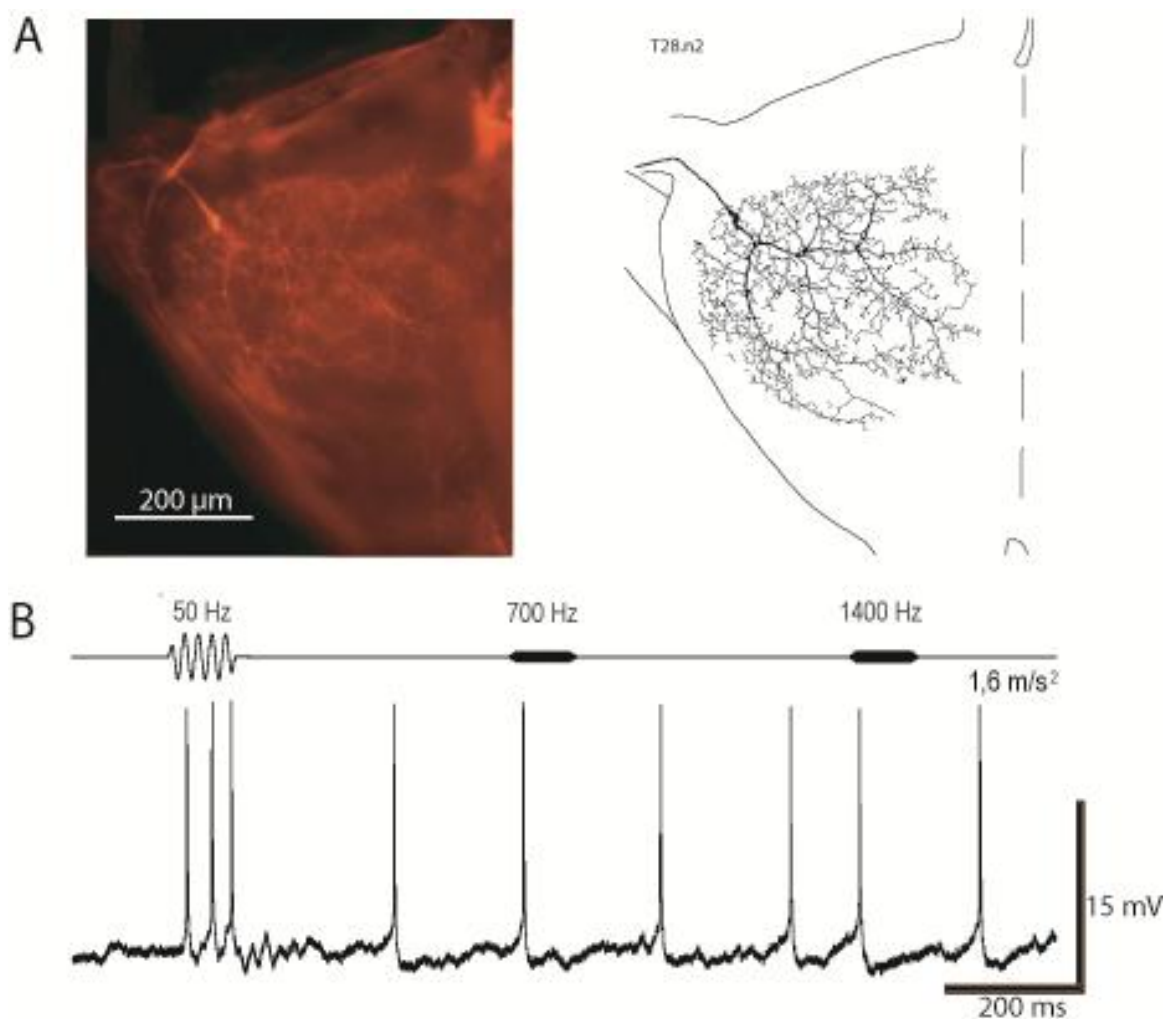
4.1.9 TN 28

Celica TN28 (slika 9A) se po vstopu v ganglij zelo obširno razveji, tako da s svojimi odrastki pokrije bolj ali manj celoten lateralni in centralni del ipsilateralne polovice ganglija, razen skrajno posteriornega in medianega dela.

Celica se je odzivala na 50 Hz iskalne sekvence z 1-2 AP nad nivojem spontanega proženja (slika 9B), z latenco med 12 in 40 ms. Najvišja intenziteta draženja ($1,6 \text{ m/s}^2$) hkrati predstavlja vzdražni prag celice pri 30 in 50 Hz.



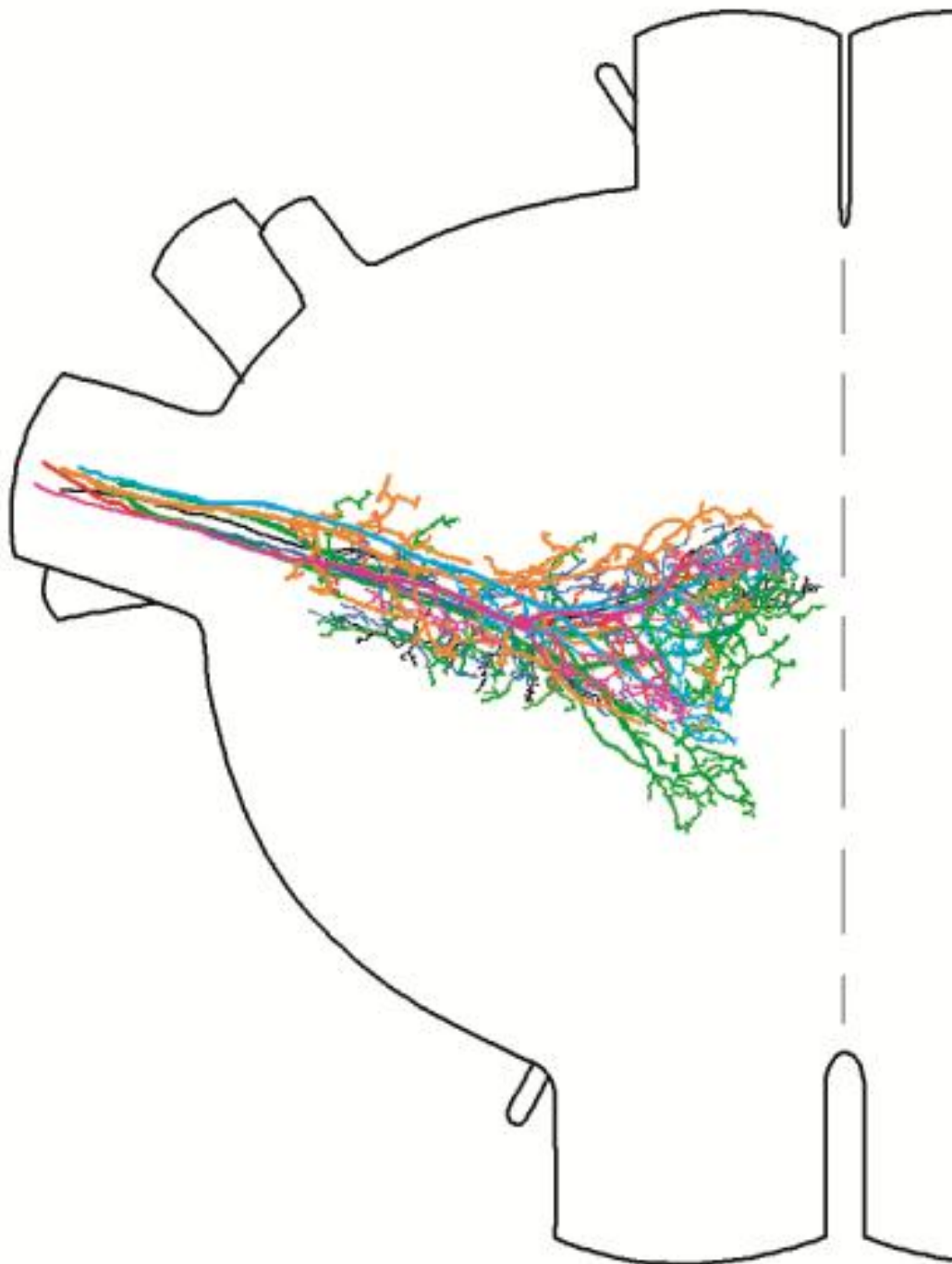
Slika 8. Receptorska nevrona »TN26 in TN27«. A. Mikrografija protorakalnega ganglija z obarvanim terminalnim delom aksona TN26 (levo; nevrobiotin) in risba istega preparata (sredina), ter TN27 pri katerem je prišlo do deformacije oblike med histološko obdelavo tkiva (desno; nevrobiotin; fluorescenca). B. Zapisi elektrofizioloških odzivov na draženje ipsilateralne sprednje noge z "iskalnim" nizom frekvenc za celico TN26 (zgoraj) in celico TN27 (spodaj) - pri obeh celicah pride do povečanja spontanega proženja pri 50 Hz za 1-2 akcijska potenciala na dražljaj.



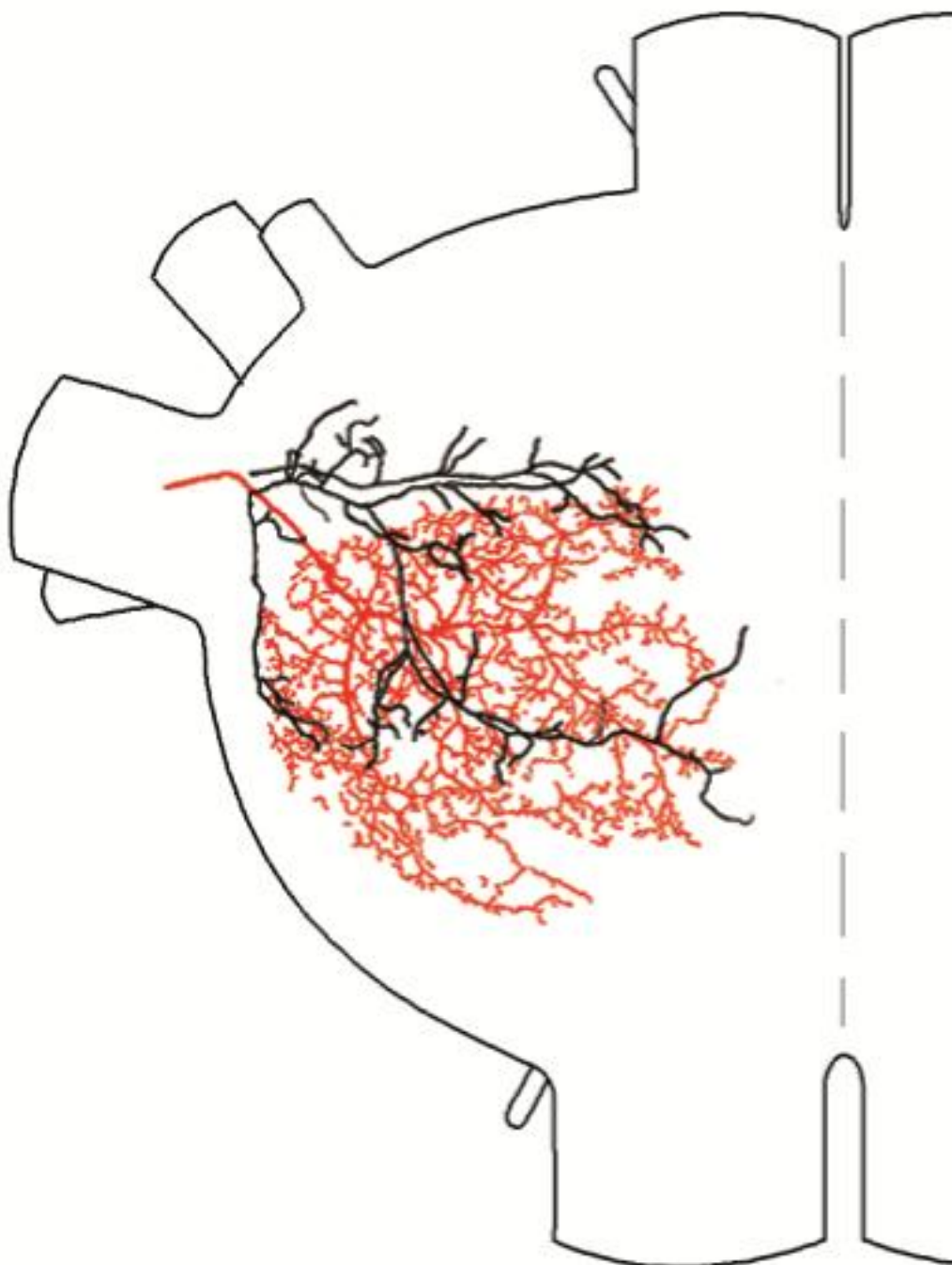
Slika 9. Receptorski nevron »TN28«. A. Mikrografija protorakalnega ganglija z obarvanim terminalnim delom aksona (levo; nevrobiotin; fluorescenca) ter risba istega preparata (desno). B. Zapisi elektrofizioloških odzivov na draženje ipsilateralne sprednje noge z "iskalnim" nizom frekvenc. Pri 50 Hz pride do povečanja spontanega proženja za 1-2 akcijska potenciala/ dražljaj.

4.2 PREGLED REZULTATOV

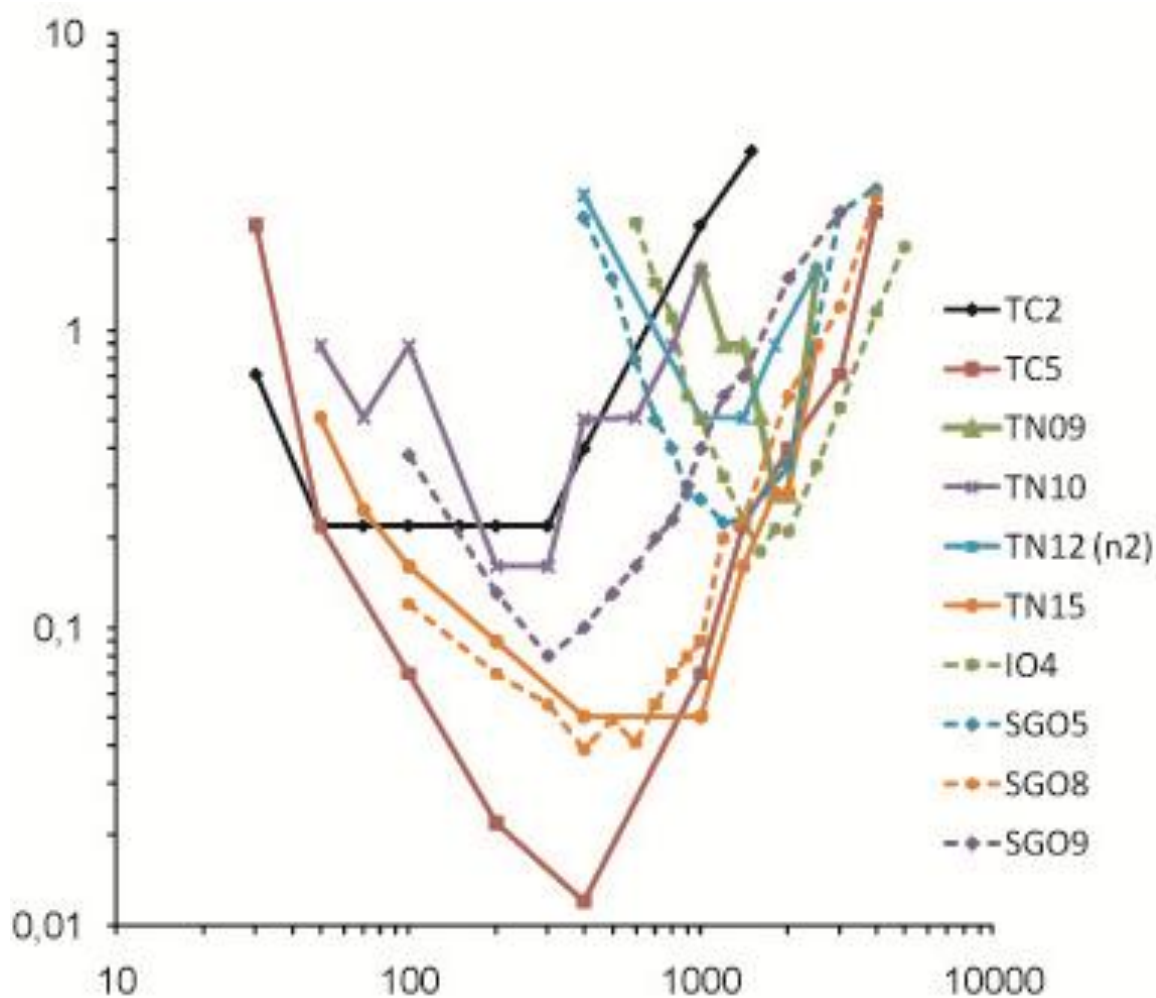
Vse celice, ki smo jih opisali in uspešno obarvali, vstopajo v protorakalni ganglij po nožnem živcu. Z izjemo TN28 vse projecirajo v mediani del ganglija, kjer terminalne razvejitve celic TN10, TN12, TN14, TN15, TC2 in TC5 tvorijo kompaktno zgostitev srpaste oblike mediano v gangliju (slika 10), medtem ko celice TN26 in TN27 oblikujejo široko »podkvasto« bifurkacijo (slika 11). Celica TN28 (slika 11) s svojo obsežno razvejitvijo pokriva skoraj celotno ipsilateralno polovico ganglija, vendar ne doseže območja terminalnih razvejitev celic, ki tvorijo mediano zgostitev. Glede na vrh občutljivosti lahko omenjene terminalne razvejitve nevron razdelimo v 4 skupine. V prvi so celice TN26, TN27 in TN28, ki se odzivajo le na zelo nizke frekvence (med 30 in 50 Hz), s precej višjimi vzdražnimi pragi kot preostale celice ($1,6 \text{ m/s}^2$). V drugo skupino spadata celici TC2 in TN10, ki imata vrh občutljivosti med 50 in 300 Hz pri pospešku med $0,16$ in $0,22 \text{ m/s}^2$ (slika 12) V tretjo skupino lahko uvrstimo celici TC5 in TN15, ki se najbolje odzivata na frekvence med 200 in 1000 Hz z najnižjimi vzdražnimi pragi med testiranimi nevroni (med $0,02$ in $0,05 \text{ m/s}^2$; slika 12). V zadnjo skupino spadajo celice TN12, TN14 in TN09, ki so najbolj občutljive na visoke frekvence, z najnižjim vzdražnim pragom med 1000 in 2000 Hz pri pospešku med $0,04$ in $0,5 \text{ m/s}^2$ (slika 12).



Slika 10: Združene projekcije terminalnih razvejitev čutilnih nevronov TN10, TN12, TN14, TN15, TC2 in TC5, ki projecirajo proti medianemu delu ganglija, kjer s svojimi končnimi odrastki tvorijo nevpilno polkrožne oblike.



Slika 11: Združene projekcije terminalnih razvejitev čutilnih nevronov TN26 in TN28. Celica TN26 tvori široko bifurkacijo podkvaste oblike, medtem ko celica TN 28 pokriva skoraj celotno ipsilateralno polovico ganglija; obe izven območja polkrožne terminalne razvejitve celic na sliki 10.



Slika 12: Prikaz krivulj vzdražnega praga za celice TN09, TN10, TN12, TN15, TC2 in TC5, ter primerjava s krivuljami, ki so jih Čokl in sodelavci (1995) pripisali subgenualnemu organu (SGO 5, 8 in 9) in intermedianemu organu (IO4). Celica T14 ni prikazana, saj na osnovi pridobljenih podatkov nismo morali izrisati krivulje vzdražnega praga. Prav tako niso prikazane celice, ki so se šibko odzivale le na najnižjo izmed testnih frekvenc (TN26 in 27, TN28; odziv na 50 Hz).

5. RAZPRAVA

Jamske kobilice iz družine Rhabdophoridae nimajo razvitega sluha, dobro pa zaznavajo vibracije podlage. V rezultatih sem prikazala obliko in elektrofiziološki odziv na vibracije devetih tipov receptorskih nevronov v prednjih nogah pri vrstah *T. neglectus* in *T. cavicola*. V razpravi bom te celice na podlagi znanih podatkov o legi v nevropili, morfologiji terminalnih razvejitev ter frekvenčni in absolutni občutljivosti na vibracije pri ostalih žuželkah oz. ravnokrilcih poskušala uvrstiti v posamezne organe. Razpravljala bom o vedenjski vlogi zaznave različnih vibracijskih frekvenc za žuželke oz. za ravnokrilce ter ugotavljala kakšno vlogo imajo pri tem različni vibracijski organi oz. senzile. Na kratko bom pokomentirala še svoje izkušnje ob uporabi različnih znotrajceličnih barvil pri znotrajcelični registraciji aktivnosti in barvanju nevronov .

5.1 CENTRALNE PROJEKCIJE VIBRACIJSKIH RECEPTORJEV

Vsakega od primerov vibracijskih receptorskih nevronov opisanega v tej nalogi lahko glede na morfologijo končnih razvejitev in v kombinaciji z lastnostmi odziva na vibracijske signale uvrstimo v določen organ. Najbolj neposredne podatke o izvoru bi nam sicer dale celice obarvane vse do periferije, vendar nam to kljub posamičnim dolgotrajnim barvanjem ni uspelo.

Terminalne razvejitve projekcij receptorskih celic TN10, TN12, TN14, TN 15, TC2 in TC5 pri jamskih kobilicah oblikujejo polkrožno, »srpasto« obliko, kakršna je značilna za omenjene projekcije zvočnih oz. vibracijskih receptorjev celic TO oz. FeCO dolgotipalčnic. Oblika omenjenih receptorskih razvejitev jamskih kobilic najbolj spominja na tiste, ki so bile opisane pri murnih (Imaizumi in Pollack, 2005). Nevropila aRT je pri jamskih kobilicah in murnih orientirana v medio-lateralni smeri (Wholers in Huber, 1985; Imaizumi in Pollack, 2005; Stritih in Stumpner, 2009), medtem ko je pri kobilicah družine Tettigoniidae orientirana v anterio-posteriorni smeri in močno povečana, kar je posledica različne lokacije in obsega razraščanja končnih razvejitev celic TO pri omenjenih vrstah (Römer, 1985; Stumpner, 1996).

5.2 PRIMERJAVA OBLIKE IN OBČUTLJIVOSTI OBARVANIH NEVRONOV

5.2.1 Subgenualni organ

SGO pri dolgotipalčnicah gradi med 50 in 63 skolopidijev (Schumacher, 1979), medtem ko ga pri jamskih kobilicah sestavlja okrog 30 skolopidijev (Jeram in sod., 1995). Za dolgotipalčnice je značilna oblika centralnih razvejitev z anteriornimi in posteriornimi odcepitvami ter z bifurkacijo v medianem delu. Celice projecirajo v anteriorni del aRT ter bolj ali manj izrazito v posteriorni rob aRT (Nishino in Field, 2003). Takšno obliko imajo tudi celice TN10, TN12, TN14, TN15 in TC5.

Nishino in Field (2003) sta pri primitivnih dolgotipalčnicah iz družine Anostomatidae, ki sicer že slišijo (imajo timpanalni organ), na podlagi selektivnih retrogradnih barvanj različnih perifernih vej(ic) subgenualnega in timpanalnega živca SGO razdelila v več podskupin glede na lokacijo some in vzorca inervacije: distalni, anteriorni, osrednji in posteriorni del SGO ter akcesorni organ (AO). Glede na obliko centralnih razvejitev bi celice, ki smo jih obarvali, lahko razvrstili tako: TN10 najverjetneje izhaja iz anteriornega oz. osrednjega dela SGO, TN12 je najbližje projekcijam nevronov posteriornega SGO, TN14 je najbližje projekcijam AO, TN15 in TC5 pa sta najverjetneje nevrone distalnega oz. anteriornega dela SGO.

Vrh občutljivosti se pri ščurkih (Čokl in Virant-Doberlet, 1997), kobilicah družine Tettigonidae (Kalmring in sod., 1993, 1994) in kratkotipalčnicah (Acrididae; Kühne, 1982) nahaja med 300 oz. 400 Hz in 700 oz. 800 Hz, enako pa smo izmerili tudi pri jamskih kobilicah (kot tudi Čokl s sod., 1995). Vzdražni prag, ki so ga izmerili Čokl in sod. (1995), se nahaja pri pospeških med 0,04 in 0,07 m/s², kar smo izmerili tudi v naši nalogi. Čokl in sod. (1995) so pri jamski kobilici *T. neglectus* celice, ki domnevno pripadajo SGO, razdelili v 9 funkcionalnih tipov. Te skupine so zasnovali na osnovi občutljivosti SGO in IO v srednjih in zadnjih nogah pri kobilici vrste *Gampsocleis gratiosa* (Kalmring in sod., 1994, 1995), ki ima zelo podoben odziv receptorskih celic kot jamske kobilice. Celice, ki smo jih obarvali, bi lahko uvrstili v funkcionalne tipe SGO5 (TN12), SGO8 (TN15) in SGO9 (TN10, TC5).

5.2.2 Intermediani organ

IO najdemo pri dolgotipalčnicah iz družin Haglidae in Tettigonidae in je glede na občutljivost primerljiv z distalnim organom pri ščurkih (Lin in sod., 1995; Kalmring in sod., 1994; Čokl in Virant-Doberlet, 1997). IO jamskih kobilic je v primerjavi z dolgotipalčnicami, ki slišijo, nepopolno razvit. Proksimalni del je podobno razvit, distalni del pa vsebuje le 5-6 skolopidijev (Čokl in sod., 1995). Navedeno dokazujejo tudi podatki o občutljivosti, saj se v primerjavi s slušnimi dolgotipalčnicami organ ne odziva na vibracije frekvenc med 2 in 3 kHz (Čokl in sod., 1995). Celice intermedianega organa projecirajo v anteriorni del aRT brez bifurkacije, ki je značilna za celice SGO (Nishino in Field, 2003). Celice s takšno obliko v naši raziskavi nismo uspeli obarvati oz. je tej obliki še najbližja razvejitev celice TN14, ki pa bi jo po odzivu lahko pripisali SGO. Odziv, ki bi ga lahko pripisali IO, smo posneli le pri celici TN09. Ta ima obliko uglasitvene krivulje ter občutljivost, kot so jo opisali Čokl in sod., (1995) z najnižjim vzdražnim pragom pri $0,03 \text{ m/s}^2$. Čokl in sod. (1995) so celice IO razdelili v 4 različne funkcionalne tipe. Celico T09 bi na podlagi poteka krivulje in občutljivosti lahko umestili v 4 skupino.

5.2.3 5.2.3. Femoralni hordotonalni organ

Oživčenost in morfologija FeCO pri murnih (Nishino in Sakai, 1997) in Tettigonidah (Theophilidis, 1986) se med nogami ne razlikuje. Raziskave kažejo, da distalni skoloparij FeCO pri različnih skupinah ravnokrilcev projecirajo v aRT, pri dolgotipalčnicah, za katere je značilno delno spajanje skoloparijev, pa v „vibracijsko-slušno“ nevropilo svoje terminalne odrastke projecira tudi dorzalni del ventralnega skoloparija (Nishino in Sakai 1997). Razlikujemo dva tipa centralnih razvejitvev nevronov FeCO. Za prvega je značilna bifurkacija in projekcija v antero- in posterolateralni rob aRT, drugi pa brez razcepitve projecira v anteriorni del aRT (Nishino 2000, 2003). Celica TC2 pri jamski kobilici ima obliko značilno za tip dve, opisan pri murnih (Nishino, 2000). Z vrhom občutljivosti med 50 in 300 Hz ter z vdražnim pragom pri pospešku $0,22 \text{ m/s}^2$ se ujema z odzivnostjo, ki sta jo izmerila Stein in Sauer (1999) pri FeCO paličnjaka.

Oblika terminalnih razvejitvev nevronov FeCO je zelo podobna razvejitvam aferentov SGO (Nishino, 2003), kar se je pokazalo tudi v naši nalogi. Obliko celice TC2 bi lahko primerjali z obliko celic TN12 in TN14, ki najverjetneje pripadajo SGO (Čokl in sod., 1995). V ločene

organe jih lahko uvrstimo predvsem na podlagi občutljivosti. Pri FeCO je največja pri frekvencah pod 200 Hz in pospešku nad 0,2 m/s² (Stein in Sauer, 1999), pri SGO pa nad 200 Hz in pri pospeških nižjih od 0,1 m/s² (Čokl s sod., 1995).

5.2.4 5.2.4. Kampaniformne senzile

Centralne projekcije CS pri dolgotipalčnicah (Lakes in Schikorski, 1990; Hustert, 1978) in kratkotipalčnicah (Hustert in sod, 1981) so zelo podobne. V centralni živčni sistem projicirajo zelo uniformno, ne glede na to na kateri nogi se nahajajo (Hustert in sod., 1981). Vse se široko razvejijo v anteriorni in posteriorni smeri kmalu po vstopu skozi nožni živec v ganglij. Od glavnih vej se odcepljajo manjše odcepitve v anteriorni in posteriorni smeri. Ena ali obe glavni veji se zaključita blizu mediane linije ganglija, v liniji vstopa ipsilateralnih konektivov (Huster, 1978). Obliko, tipično za receptorske nevrone CS ravnokrilcev, imajo tudi celice TN26 in TN27, ki smo jih obarvali pri jamskih kobilicah. Vibracijski odzivi z vrhom občutljivosti v območju pod 100 Hz in relativno visokim vzdražnim pragom (0,44-4,4 m/s²), ki so jih Kühne s sod. (1982) ter Grosch s sod. (1985) pripisali CS, se ujemajo z odzivnostjo omenjenih celic pri jamskih kobilicah.

5.2.5 5.2.5. Ostali vibracijsko občutljivi receptorji

V raziskavi smo obarvali tudi celico TN28, ki jo na podlagi centralne razvejitve in odziva ne moremo uvrstiti v nobenega od zgoraj omenjenih vibracijsko občutljivih organov. Celica se je odzivala na frekvence pod 100 Hz pri relativno visokem vzdražnem pragu 1,6 m/s², tako kot CS. Celica bi glede na občutljivost lahko pripadala eksteroreceptorju, za katere je značilno zaznavanje dotika oz. zračnih tokov npr. čutilnim dlačicam (Burrows, 1996). Podatkov o receptorski celici s takšno obliko razvejitev med nam poznano literaturo nismo našli. Oblika celice po drugi strani spominja na obliko dendritskega drevesa lokalnih interneuronov, ki pokrivajo skoraj celotno območje ipsilateralne polovice ganglija in so opisane v sklopu mehanoreptoričnih mrež pri ravnokrilcih (Burrows in Siegler, 1984). Taka oblika dendritskega drevesa je značilna tudi za enega od nizkofrekvenčno uglasenih tipov vibracijskih interneuronov pri jamski kobilici *T. neglectus* (Stritih, 2009).

5.3 FREKVENČNA OBČUTLJIVOST VIBRACIJSKIH RECEPTORJEV – POVZETEK

Na podlagi ekstracelularnih študij pri ravnokrilcih je bilo ugotovljeno, da imajo za vibracije najbolj občutljivi receptorski nevroni vrh odzivnosti pri frekvencah nad 200 Hz, medtem ko so tisti z vrhom odzivnosti pri nižjih frekvencah najmanj občutljivi (Kühne, 1982; Grosch s sod., 1985; Lakes in Shikorski, 1990). Prvo skupino receptorjev so pripisali kompleksnemu tibialnemu organu, skupino »nizkofrekvenčnih« receptorjev pa CS oz. različnim sklepnim hordotonalnim organom. Enaka slika periferne občutljivosti je razvidna tudi iz rezultatov intracelularnih posnetkov pričujoče naloge (slika 12), kjer pa smo poleg elektrofiziološkega odziva opisali tudi morfologijo merjenih nevronov in na tej podlagi ugotavljali verjeten izvor merjenih receptorskih enot (slika 10, slika 11). Po drugi strani pa se to razmerje v občutljivosti nizko- oz. visokofrekventno uglašeni celic ne ujema niti z občutljivostjo vibracijskih interneuronov, merjenih pri jamski kobilici, in tudi ne s poznano vedenjsko vlogo, ki jo imajo vibracije nizkih frekvenc tako pri jamski kobilici kot tudi pri ostalih ravnokrilcih in je prodrobneje obravnavana v sledečem poglavju.

5.4 CENTRALNO PROCESIRANJE VIBRACIJSKE INFORMACIJE IN VEDENJSKI POMEN

Vrh občutljivosti najnižje uglašeni receptorskih celic TO pri jamski kobilici *T. neglectus* je bil izmerjen pri frekvenci okrog 300 Hz (Čokl in sod, 1995), medtem ko je večina vibracijsko občutljivih interneuronov nižjega reda pri tej vrsti uglašeni na vibracije nižjih frekvenc (50-200 Hz; Stritih, 2009). Pražna občutljivost nekaterih od teh nizko-frekvenčno elementov centralnega živčevja je precej višja (do 20 dB) od občutljivosti receptorjev TO v omenjenem območju frekvenc. Kakšen je periferni izvor občutljivosti na nizke frekvence vibracij, razvidne na centralno-živčnem nivoju jamskih kobilic, ni v celoti jasno. Vibracijsko občutljivi receptorji distalnega skoloparia FeCO ter kampaniformnih senzil, ki se odzivajo na frekvence med 30 in 50 Hz, projecirajo v regije izven »vibracijske nevropile« (Field in Pfluger, 1989; Nishino, 2000), kjer ležijo odrastki le manjšega dela vibracijskih interneuronov jamskih kobilic (Stritih, 2009). Večina interneuronov jamskih kobilic se razrašča v območju aRT, kamor izmed »nizko-frekventnih« receptorjev projecirajo le nevroni proksimalnega skoloparija FeCO (Field in Pfluger, 1989; Nishino,

2000), vendar je njihova do sedaj poznana občutljivost na vibracije relativno nizka (vzdražni prag, izmerjen na podlagi sumarične aktivnosti nevronov pri kratkotipalčnicah, leži nad $0,2 \text{ m/s}^2$).

Glede na to da se je vibracijski čut razvil primarno za zaznavanje naravnih sovražnikov (Greenfield, 2002), je velika občutljivost na nizke frekvence najverjetneje povezana s pobegom oz. alarmnim vedenjem. Posredne dokaze za to najdemo pri različnih vrstah ravnokrilcev. Murni npr. ob znakih nevarnosti prenehajo s stridulacijo, kar sprožijo vibracije frekvenc med 50-400 Hz pri zelo nizkem vzdražnem pragu ($0.001-0.005 \text{ m/s}^2$; Dambach 1989). Ta občutljivost se ujema tudi z občutljivostjo interneuronov pri vrsti *T. neglectus* (Stritih, 2009), kar kaže na morebitno prisotnosti homolognih vibracijskih mrež s podobno funkcijo tako pri vrstah, ki slišijo, kot pri tistih, ki ne slišijo. Vedenje analogno prenehanju petja pri murnih bi lahko bila pri jamskih kobilicah začasna inhibicija hoje (freezing response).

Vibracijski odziv "zdrznjenja" (startle response), ki je bil opisan pri puščavski kobilici (Friedel, 1999), je prav tako povezan z izogibom predatorjem in ga sprožijo vibracije nizkih frekvenc. Tak odziv je bil ugotovljen tudi ob predvajanju vibracij jamskim kobilicam *T. neglectus* (Stritih, neobjavljeno). Sunek nog in telesa, ki je priprava na skok ob nevarnosti, je pri obeh vrstah uglasen na okrog 50 Hz z najnižjim vzdražnim pragom okrog $0.5-0.7 \text{ m/s}^2$.

Signali nizkih frekvenc pri jamskih kobilicah ne igrajo vloge samo pri omenjenih medvrstnih interakcijah, pač pa so tudi sestavni del znotrajvrstne komunikacije v času parjenja. Samci vrste *T. neglectus* med dvorjenjem ritmično potresavajo z zadkom, po končani kopulaciji pa stresajo celotno telo (tremulirajo), kar povzroči nastanek vibracijskih pulzov v podlagi. Te vibracije, ki jih zaznavajo tako samice kot tudi rivali, locirani v bližini, imajo dominantno frekvenco okrog 100 Hz in najvišje amplitude pri pospeških med $0,05$ in $0,09 \text{ m/s}^2$ (Stritih in Čokl, poslano v revizijo), kar se ujema z najvišjo občutljivostjo vibracijskih interneuronov v omenjenem območju frekvenc (Stritih, 2009).

Naša naloga izvora omenjene občutljivosti centralnega živčevja na vibracije nizkih frekvenc ni razjasnila, kar je lahko posledica dejstva, da jo v centralni živčni sistem posredujejo receptorski nevroni z aksoni zelo majhnega premera, ki so zelo težko dostopni

za intracelularne študije. Zelo tanka aksonalna vlakna imajo receptorski nevroni proksimalnega skolparije FeCO ravnokrilcev, ki projecirajo v aRT (Nishino, 2000, 2003) in so tako verjeten izvor omenjene občutljivosti.

5.5 BARVILA IN TRAJANJE TOKOVNEGA INJICIRANJA

Kot barvilo sem uporabljala Neurobiotin (Horikawa and Armstrong, 1988) ter Lucifer yellow (Stewart, 1978). Neurobiotin je za intracelularno barvanje primeren zaradi njegove nizke molekularne mase in zaradi velike afinitete za Avidin, na katerega lahko vežemo različne histokemične markerje (Field in Matheson, 1998). Tako obdelan preparat je v našem primeru ob vezavi citokroma Cy3 flouesciral v rdečem. Takšna histološka obdelava tkiva se jev primeru uporave neurobiotina izkazala kot boljša, saj je bil tako obdelan preparat bolj kontrasten. Prednost uporabe Neurobiotina je tudi v tem, da so preparati barvani s tem barvilom trajni, poleg tega pa se zaradi njegove sestave konice mikroelektrode manjkrajt zamašijo (Field in Matheson, 1998), kar sem med potekom poizkusov ugotovila tudi sama. Prednosti barvila Lucifer yellow omogočajo po eni strani možnost hitrega preverjanja rezultatov obarvanja, hkrati pa tudi večjo uporabnost preparatov za eventuelno histološko analizo, ki jo olajšuje fuoesciranje anatomskih struktur ganglija (Stritih, 2009). Slabost uporabe barvila Lucifer yellow je v tem, da preparati niso trajni.

Za zaključek bi pokomentirala še čas in s tem povezan uspeh obarvanja oz. razdaljo obarvanja receptorskih vlaken proti periferiji. Čas barvanja celic je v primerih uspešnega obarvanja receptorskih projekcij variiral med 2-6 min, kar je ob uporabi toka okrog 3-4 nA dovolj tudi za kompletno obarvanje razvejitev interneuronov znotraj istega segmenta živčevja (npr. Stritih in Stumpner, 2009; Zorović in Hedwig, 2011). Da bi se celice pobarvale vse do periferije, bi bilo potrebno čas vnašanja barvila oz. označevalca podaljšati – glede na razdaljo in debelino vlaken na vsaj pol ure (Stritih, osebno). To pa je kljub dobri mehanski stabilizaciji preparata pri intracelularni tehniki težko dosegljivo in je do sedaj uspelo le redkim raziskovalcem (Stumpner, 1996; Stölting in Sumpner, 1998).

6. POVZETEK

Zaznavanje in tvorjenje vibracij podlage igrata pomembno vlogo v medvrstni in znotrajvrstni komunikaciji žuželk. Nevrobiološka osnova vibracijskega čuta je bila najbolj raziskana pri ravnokrilcih (Orthoptera), ki komunicirajo z zvokom in obenem producirajo tudi visokofrekvenčne vibracijske signale, ki se prevajajo preko podlage. Pri teh vrstah so študije funkcionalnih lastnosti vibracijskih receptorjev pokazale najvišjo frekvenčno občutljivost receptorjev, ki imajo vrh odzivnosti v področju med 200 in 2000 Hz in domnevno pripadajo t.i. kompleksnemu tibialnemu organu, ter manjšo občutljivost receptorjev uglasenih na frekvence pod 100 Hz, ki so jih pripisali različnim sklepnim hordotonalnim organom in kampaniformnim senzilam v kutikuli. Raziskava odzivnosti vibracijskih receptorskih nevronov ob njihovi hkratni morfološki identifikaciji doslej še ni bila opravljena.

Pri gluhih jamskih kobilicah (Orthoptera: Ensifera: Rhaphidophoridae) iz rodu *Troglophilus* so v prejšnjih raziskavah ugotovili primerljive funkcionalne tipe visokofrekvenčnih vibracijskih receptorjev s tistimi pri ostalih dolgotipalčnicah. V nasprotju s prejšnjimi podatki o centralnem procesiranju vibracijske informacije pa je bilo ugotovljeno, da je pretežni del internevronov v trebušnjači jamskih kobilic najbolj občutljiv na vibracije nizkih frekvenc. To je pokazalo na večji pomen nizkofrekvenčnih vhodov v centralno živčevje kot je bilo razumljeno poprej. Namen naloge je bil identificirati izvor omenjene občutljivosti na vibracije nizkih frekvenc ter obenem opraviti prvo sistematično raziskavo funkcionalnih lastnosti vibroreceptorskih nevronov ravnokrilcev ob njihovi hkratni morfološki identifikaciji.

Pri jamskih kobilicah vrst *T. neglectus* in *T. cavicola* smo z uporabo tehnike znotrajcelične registracije aktivnosti in iontoforetičnega barvanja nevronov testirali odzivnost receptorskih nevronov sprednje noge na sintetizirane vibracije različnih nosilnih frekvenc in intenzitet ter opisali morfologijo njihovih centralnih, aksonalnih razvejitev. Identificirali smo osem morfo-funkcionalnih tipov nevronov ter opisali en dodaten funkcionalni tip brez obarvanja. Na podlagi že poznanih tipov vibroreptoričnih odzivov pri ravnokrilcih in oblik terminalnih razvejitev, kot so jih pokazala predvsem retrogradna barvanja perifernih živcev, smo jih lahko pripisali naslednjim izvorom: šest tipov nevronov tibialnemu organu

(TO; od tega pet subgenualnemu organu (SGO) in enega intermedianemu organu (IO)), en tip femoralnemu hordotonalnemu organu (FeCO), en tip kampaniformnim senzilam (CS), medtem ko enega tipa na podlagi poznanih podatkov nismo mogli razvrstiti. V skladu z obstoječimi študijami imajo receptorski nevroni SGO vrh odziva v frekvenčnem območju med 200 in 1000 Hz, nevroni IO pa med 700 in 2000 Hz; slednji imajo hkrati najvišjo absolutno občutljivost (pri pospeških med 0,01 in 0,03 m/s²). Receptorski nevron z izvorom v FeCO se najmočneje odziva na vibracije med 50 in 300 Hz, tisti iz CS ter z neznanim izvorom pa na 50 Hz vibracije, pri čemer imajo vsi relativno visok vzdražni prag (pri pospešku med 0,44 in 4,4 m/s²).

Vsi opisani tipi receptorskih nevronov se končno razvejijo v strogo ipsilateralni polovici protorakalnega ganglija. Razvejitve nevronov, ki pripadajo TO in FeCO, oblikujejo mediano in rahlo anteriorno v gangliju področje polkrožne, »srpaste« oblike, značilno za t.i. slušno in/oz. vibracijsko asociacijsko središče (nevropilo) ravnokrilcev, imenovano »anterior ring tract« (aRT). Oblika terminalnih razvejitev teh nevronov jamskih kobilic je najbolj podobna projekcijam nevronov TO in FeCO pri murnih. Po drugi strani nevroni, ki pripadajo CS, tvorijo široko bifurkacijo podkvaste oblike izven območja aRT, praktično identično projekcijam CS ostalih dolgo- in kratkotipalčnic. Prav tako v aRT ne segajo razvejitve nevrona, ki pokriva skoraj celotno ipsilateralno polovico ganglija in ga ne moremo pripisati nobenemu od poznanih virov in bi po obliki sodeč lahko imel modulatorno vlogo.

V skladu s prešnjimi raziskavami, ki so vključevale ekstracelularne meritve študijami funkcionalnih lastnosti vibracijskih receptorjev pri ravnokrilcih smo opisali največje število receptorskih nevronov z vrhom odzivnosti v območju relativno visokih frekvenc (nad 200 Hz), ki so hkrati tudi absolutno najbolj občutljivi. Taka slika periferne občutljivosti na vibracije se ne sklada z razmerjem in občutljivostjo »nizkofrekvenčnih« in »visokofrekvenčnih« interneuronov v trebušnjači, kot tudi s spektralnimi lastnostmi komunikacijskih signalov ter vedenjskimi odzivi na vibracije opisanimi tako pri jamskih kobilicah kot ostalih ravnokrilcih. Verjeten, a še vedno nepotrjen izvor občutljivosti na vibracije nizkih frekvenc predstavljajo receptorski nevroni proksimalnega skoloparija FeCO, za katere so značilne projekcije v aRT, njihovi aksoni pa so izredno majhnega premera in so tako težko dostopni za intracelularne študije.

7. VIRI

- Autrum H., Schneider W. 1948. Vergleichende Untersuchungen über den Erschütterungssinn der Insecten. *Z Vergl Physiol* 31: 77-88
- Ball E. E. in Field L. H. 1981. Structure of the auditory system of the weta *Hemideina crassidens* (Blanchard, 1851) (Orthoptera, Ensifera, Gryllacridoidea, Stenopelmatidae). 1. Morphology and histology. *Cell Tissue Res.* 217: 321-343
- Ball E. E., Oldfield B. P., Michael Rudolph, K. 1989. The auditory organ structure, development and function. In: Cricket behaviour and neurobiology. Huber, F., Moore, T. E., Loher, W. (Hrsg.), Cornell University Press, Ithaca, London, 391-421
- Bennet-Clark H.C. 1998. Multimodal communication by the blackhorned tree cricket, *Oecanthus nigricornis* (Walker) (Orthoptera: Gryllidae). *Can. J. Zool.* 58: 1861-1868
- Bräuning P., Pflüger H.J., Hustert R. (1983). The specificity of central nervous projections of locust mechanoreceptors. *J Comp Neurology* 218: 197-207
- Burrows M. 1996. The neurobiology of an Insect Brain. Oxford University press
- Burrows M. in Siegler M.V.S. 1984. The morphological diversity and receptive fields of spiking local interneurons in the locust metathoracic ganglion. *J Comp Neurology* 224, 483-508
- Cocroft R., Rodriguez R. 2005. Behavioral ecology of insect vibrational communication, *Bioscience* 55: 323-334
- Cocroft R.B. 2001. Vibrational communication and the ecology of group-living, herbivorous insects. *Am Zool* 41:1215-1221
- Čokl A., Virant-Doberlet M. 1997. Tuning of tibial receptor cells in *Periplaneta americana* L. *J Exp Zool* 278: 395-404
- Čokl A., Virant-Doberlet M. 2003. Communication with substrateborne signals in small plant-dwelling insects. *Annu Rev Entomol* 48:29-50

- Čokl A., Kalmring K., Rössler W. 1995. Physiology of atympanate tibial organs in forelegs and midlegs of the cave-living Ensifera, *Troglophilus neglectus* (Raphidophorida, Gryllacridoidea). *J Exp Zool* 273: 376-388
- Čokl A., Kalmring K., Wittig H. 1977. The responses of auditory ventral-cord neurones of *Locusta migratoria* to vibration stimuli. *J Comp Physiol A* 120: 161-172
- Čokl A., Virant-Doberlet M., Zorović M. 2005. Sense organs involved in the vibratory communication of bugs (Hemiptera: Heteroptera) V: Drosopolus S., Claridge M.F., editors. *Insects sounds and communication*. Boca Raton, F.L.:CRC Press. P 71-80
- Dambach M. 1972. Der Vibrationssins der Gryllen. I. Schwellenmessungen an Beinen freibeweglicher Tiere. *J Comp Physiol A* 79: 281-304
- Dambach M. 1989. Vibrational responses. In: *Cricket Behaviour and Neurobiology*. (Ed. by F. Huber, T. E. Moore & W. Loher), pp. 179-197. Ithaca, London: Cornell University Press.
- Desutter-Grandcolas L. 2003. Phylogeny and the evolution of acoustic communication in extant Ensifera (Insecta, Orthoptera). *Zool Scripta* 32: 525-261
- Devetak D., Pabst M.A. in Lipovšek Delakorda S. 2004. Leg chordotonal organs and campaniform sensilla in *Chrysoperla* Steinmann 1964 (Neuroptera): structure and function. *Denisia* 13, 163-171
- Eibl E., Huber F. 1979 Central projections of the tibial sensory fibres within the three thoracic ganglia of the cricket (*Gryllus campestris* L., *Gryllus bimaculatus* De Geer). *Zoomorph* 92: 1-7
- Esch H., Huber F., Wholers D.W. 1980. Primary auditory neurones in crickets: physiology and central projections. *J Comp Physiol A* 137: 27-38
- Ewing A.W. 1989. *Arthropod bioacoustics*. Edinburgh University Press, Edinburgh, 260 str.
- Field L.H., Pflüger H.J. 1989. The femoral chordotonal organ: a bifunctional orthopteran (*Locusta migratoria*) sense organ. *Comp. Biochem. Physiol.* 93A: 729-743

- Field, L.H., Matheson, T. 1998. Chordotonal organs of insects. *Adv Insect Physiol* 27; 1-228
- Friedel T. 1999. The Vibrational startle response of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *J Exp Bio* 202: 2151-2159
- Friedrich H. 1927. Untersuchungen über die tibialen Sinnesapparate in den mittleren und hinteren Extremitäten von Locustiden. I. *Zool. Anz.* 73: 42-48
- Greenfield M.D. 2002. *Signalers and receivers*. Oxford University Press, New York, 414 str.
- Grosch A., Callender F., Petersen M., Čokl A. in Kalmring K. 1985. Vibration receptors of larvae and of imagines in locusts: location on the legs, central projections and physiology. In *Acoustic and Vibrational Communication in Insects* (ed. Kalmring, K. and Elsner, N.), pp 151-161. Berlin, Hamburg: Paul Parey.
- Hanrahan S.A. in W.H. Kirchner. 1994. Acoustic orientation and communication in desert tenebrionid beetles in sand dunes. *Ethol* 97: 26-32
- Horikawa K. in Armstrong W.E. 1988. A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detections with avidin conjugates. *J. Neurosci. Methods* 25: 1-11
- Hustert R. 1978. Segmental and interganglionic projections from primary fibres of insect mechanoreceptors. *Cell Tiss. Res.* 194: 337-351
- Hustert R., Pflüger J.H., Bräuning P. 1981. Distribution and specific central projections of mechanoreceptors in the thorax and proximal leg joints in Locusts. III. The external mechanoreceptors: The Campaniform sensilla. *Cell tissue Res.* 216: 97-111
- Imaizumi K., Pollack G.S. 2005. Central projections of auditory receptor neurones of crickets. *J Comp Neurol* 493: 439-447
- Jeram S, Rössler W, Čokl A, Kalmring K. 1995. Structure of atympanate tibial organs in legs of the cave-living Ensifera, *Troglophilus*, *Neglectus* (Gryllacridoidea, Raphidophoridae). *J Morphol* 223:109-118

- Kalmring K., Hoffman E., Jatho M., Sickmann T., Grossbach M. 1996. The auditory-vibratory sensory system of the bushcricket *Polysarcus denticauda*. (Phaneropterinae, Tettigoniidae) II. Physiology of receptor cells. *J Exp Zool* 267: 315-329
- Kalmring K., Jatho M., Rossler W., Sickmann T 1997 Acusto-vibratory Communication in bushcrickets (Orthoptera: Tettigoniidae). *Entomologia Generalis* 21: 265-291
- Kalmring K., Ebendt R., Ahi J., Hellweg J., Young, D., Halex H., Lakes R., Rössler W. in Schröder, J. 1990. Comparative investigation on the morphology and physiology of the auditory receptor organs of seven species of bushcrickets. In: *Sensory Systems and Communication in Arthropods* (ed. Gribakin, F. G., Wiese, K. and Popov, A. V.), pp 241-247. Basel: Birkhäuser Verlag
- Kalmring K., Lewis B. in Eichendorf, A. 1978. The physiological characteristics of the primary sensory neurons of the complex tibial organ of *Dicticus verrucivorus* L. (Orthoptera, Tettigoniidae). *J. comp. Physiol.* 127: 109-121
- Kalmring K., W. Rössler C. Unrast. 1994. The complex tibial organs in the forelegs, midlegs and hindlegs of the bushcricket *Gampsocleis gratiosa* (Tettigoniidae): Comparison of the physiology of the organs. *J. Exp. Zool.* 270:151-161
- Keil T.A. 1998. The structure of integumental mechanoreceptors. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, pp. 385-404. Wiley-Liss, Inc
- Kittmann R. in Schmitz J. 1992. Functional specialization of the scoloparia of the femoral chordotonal organ in stick insects. *J. Exp. Biol.* 173: 91-108
- Kühne R. 1982. Neurophysiology of the vibration sense in locusts and bushcrickets: response characteristics of single receptor units. *J. Ins. Physiol.* 28: 155-163
- Lakes R., Schikorski T. 1990. Neuroanatomy of Tettigoniids. In: *Tettigoniidae: Biology, Systems and evolution* (Bailey W.J., Rentz W.J. (Eds), eds), Crawford, House Press, Bathurst
- Lakes R. in Mücke A. 1989. Regeneration of foreleg tibia and tarsi of *Ephippiger ephippiger* (Orthoptera: Tettigoniidae). *J. Exp. Biol.* 60: 821-837

- Lakes-Harlan R., Bailey W.J. in Schikorski, T. 1991. The auditory system of an atympanate bushcricket *Phasmodes ranatriliformes* (Westwood) (Tettigoniidae: Orthoptera). *J. Exp. Biol.* 158: 307-324.
- Lin Y., Rössler W., Kalmring K. 1994. Complex tibial organs in the fore-, mid-, and hindlegs of the bushcricket *Gampsocleis gratiosa* (Tettigoniidae): Comparison of the morphology of the organs. *J. Morphol.* 221: 191-198
- Lin Y., Rössler W., Kalmring K. 1995. Morphology of the tibial organs of the Acrididae: comparison of the subgenual- and distal- organs of the fore-, mid- and hindlegs of *Schistocerca gregaria* (Acrididae, Cantantopinae) and *Locusta migratoria* (Acrididae, Oedipodinae). *J. Morphol.*, 226: 351-360
- Markl H. 1983. Vibrational communication, p. 332-353. V F. Huber & H. Markl eds. *Neuroethology and behavioral physiology*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 421 str.
- Markl H. 1983. Vibrational communication. In: Huber F, Markl H, eds. *Neuroethology and behavioural physiology*. Berlin: Springer. P 332-353
- Mason A. 1991. Hearing in a primitive ensiferan: the auditory system of *Cyphoderris monstrosa* (Orthoptera, Haglidae). *J Comp Physiol A* 168: 351-363
- Mencinger-Vračko B., Devetak D. 2008. Orientation of the pit-building antlion larva *Euloleon* (Neuroptera, Myrmeleontidae) to the direction of substrate vibrations caused by prey. *Zool* 111:2-8
- Michel K. 1974. Das Tympanalorgan von *Gryllus bimaculatus* de Geer (Saltatoria, Gryllidae). *Z. Morphol. Tiere.* 77: 285-315
- Michelsen A. in Larsen O.N. 1985. Hearing and sound. In: *Comparative Insect Biochemistry and Physiology*, vol 6 (ed. Kerkut, G. A. and Gilbert, L. I.), pp 495-556. Oxford, U. K. Pergamon Press
- Morris G.K. 1980. Calling display and matting behaviour of *Copiphora rhinoceros* Pictet (Orthoptera: Tettigoniidae). *Animal behaviour* 28, 42-51

- Mücke A. in Lakes R. 1988. Sensory nervous system of intact and regenerated legs of locusts. Proc 16th Gottingen Neurobiology Conference. Eds. N. Elsner in F.G. Barth. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 34
- Mücke A. 1991. Innervation pattern and sensory supply of the midleg of *Schistocerca gregaria* (Insecta, Orthoptera). Zoomorph. 110: 175-187
- Mücke A. 1989. Das Periphere Nervensystem Und Die Zentralprojektion Der Rezeptoren Intakter Und Regenerierten Beine Von *Schistocerca Gregaria* Und *Locusta Migratoria*. Phillips Universistät Marburg.
- Nishino H., Sakai M. 1997. Three neural groups in the femoral chordotonal organ of the cricket *Gryllus bimaculatus*: central projections and soma arrangement and displacement during joint flexion. J Exp Biol 200: 2583–2595
- Nishino H. 2000. Topographic mapping of the axons of the femoral chordotonal organ neurons in the cricket *Gryllus bimaculatus*. Cell Tissue Res 299: 145-157
- Nishino H. 2003. Somatotopic Mapping of Chordotonal Organ Neurons in a Primitive Ensiferan, the New Zealand Tree Weta *Hemideina femorata*: I. Femoral Chordotonal Organ. J Comp Neurol. 464:312–326
- Nishino H. in Field L.H. 2003. Somatotopic mapping of chordotonal organ neurons in a primitive Ensiferan, the New Zeland Tree Weta *Hemideina femorata*: II. Complex tibial organ. J Comp Neurol. 464: 327-342
- Nishino H., 2000. Topographic mapping of the axons of the femoral chordotonal organ neurons in the cricket *Gryllus bimaculatus*. Cell Tissue Res 299:145–157
- Nishino H., Sakai M., Field L.H. 1999. Two antagonistic functions of neural groups of the femoral chordotonal organ underlie thanatosis in the cricket *Gryllus bimaculatus* DeGeer. Journal of Comparative Physiology A, 185: 143-155
- Nishino H. in Field L.H. 2003. Somatotopic mapping of chordotonal organ neurons in a primitive Ensiferan, the New Zealand tree weta *Hemideina femorata*: II. Complex tibial organ. Jour.Comp. Neuro. 464: 327-342

- Novak T. in Kuštor V. 1982. Contribution à la connaissance de la biomasse et du bilan énergétique de la faune des entrées de grottes en Slovénie (Yugoslavie). *Mémoires de Biospéologie*, 8:27-32
- Novak T. in Kuštor V. 1983. On *Troglophilus* (Rhapidophoridae, Saltatoria) from north Slovenia (YU). *Mémoires de Biospéologie*, 10: 127-137
- Oldfield B.P. 1984. Physiology of auditory receptors in two species of tettigoniidae (Orthoptera, Ensifera). Alternative tonotopic organizations of auditory organ. *J. Comp. Physiol.* 155:689-696
- Oldfield B.P. 1982. Tonotopic organisation of auditory receptors in Tettigoniidae (Orthoptera: Ensifera). *J. Comp. Physiol. A* 147: 461-469
- Oldfield B.P. 1983. Central projections of primary auditory fibres in Tettigoniidae (Orthoptera: Ensifera). *J. Comp. Physiol.* 151: 389-395
- Pehani Š., Virant-Doberlet M., Jeram S. 1997. The life cycle of the cave cricket *Troglophilus neglectus* Krauss with a note on *T. cavicola* Kollar (Orthoptera: Rhaphidophoridae). *Entomol* 116 (3): 224-238
- Pflüger H. J., Bräunig P. and Hustert R. 1988. The organization of mechanosensory neuropiles in locust thoracic ganglia. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B* 321: 1-26
- Römer H., Tautz J. 1992. Invertebrate auditory receptors. *Adv Comp Env Phys* 10: 185-212
- Römer H. 1985. Anatomical representation of frequency and intensity in the auditory system of Orthoptera. In *Acoustical and Vibrational Communication in Insects* (ed. Kalmring, K. and Elsner, N.), pp 25-32. Berlin, Hamburg, Paul Parey.
- Römer H., Marquart V. and Hardt M. 1988. Organization of a sensory neuropile in the auditory pathway of two groups of orthoptera. *J. Comp. Neurol.* 275: 201-215.
- Rössler W, Jahto M, Kalmring K. 2006. The auditory-vibratory sensory system in bushcrickets (Tettigoniidae, Ensifera, Orthoptera. In: *Drosopolus S, Claridge M, editor.*

- Insect sounds and communication: physiology, behavior, ecology and evolution. Boca Raton, FL: CRC Press. P 35-69
- Rössler W. 1992. Functional morphology and development of tibial tympanal organs in the legs I, II and III of the bushcricket *Ephippiger ephippiger* (Insecta, Ensifera). *Zoomorph.* 112: 181-188.
- Schnorbus H. 1971. Die subgenualen Sinnesorgane von *Periplaneta Americana*: Histologie und Vibrationsschwellen. *Z. Vgl. Physiol.* 71: 14-47
- Schumacher R. 1973. Morphologische Untersuchungen der tibialen Tympanalorgane von neun einheimischen Laubheuschrecken. *Z. Morphol. Tiere* 75: 267-282.
- Schumacher R. 1979. Zur funktionellen Morphologie des auditiven Systems der Laubheuschrecken (Orthoptera: Tettigoniidae). *Entomol. Gen.* 5:321-356.
- Seliškar A. 1923. Die männlichen Duftorgane der Höhlenheuschrecke *Troglophilus*: *Zoologischer Anzeiger*, 57: 253-268.
- Shaw S.R. 1994. Detection of airborne sound by cockroach 'vibration detector': a possible missing link in insect auditory evolution. *J Exp Biol* 193:13-47
- Shaw S.R. 1994. Detection of the airborne sound by cockroach 'vibration detector': a possible missing link in insect auditory evolution. *J Exp Biol* 193:13-47
- Stein W. in Sauer A.E. 1999. Physiology of vibration-sensitive afferents in the femoral chordotonal organ of the stick insect. *J Comp Physiol A* 184, 253-263.
- Stewart W. D. 1978. Functional connections between cells revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell* 14:741-759.
- Stölting H., Stumpner A. 1998. Tonmotopic organization of auditory receptors of the bushcricket *Pholidoptera griseoaptera* (Tettigonidae, Decticinae). *Cell Tissue Res* 294: 377-386.

- Strauß J., Lakes-Harlan R., 2010. Neuroanatomy of the complex tibial organ in the Splay-footed cricket *Comiscus calcaris* Irish 1986 (Orthoptera; Ensifera: Schizodactylidae). *J.Comp.Neurol.* 518:4567-4580
- Stritih N. 2009. Anatomy and physiology of a Set of Low-Frequency Vibratory Interneurons in a Nonhearing Ensiferan (*Troglophilus neglectus*, Rhabdophoridae). *The Journal of Comparative Neurology* 516: 519-532.
- Stritih N., Stumpner A. 2009. Vibratory interneurons of the non-hearing cave cricket indicate evolutionary origin of sound processing elements in Ensifera. *Zoology* 112: 48-68.
- Stritih N., Čokl A. (poslano v revizijo). Chemical and Vibratory Signalling in a Non-hearing Cave Cricket and Implications for Evolution of Ensiferan Communication
- Stumpner A. 1996. Tonotopic organization of the hearing organ in a bushcricket. *Naturwissenschaften* 83:81-84.
- Stumpner A. 1996. Tonotopic organization of the hearing organ in a bushcricket: Physiological characterization and complete staining of auditory receptor cells. *Naturwissenschaften* 83:81-84
- Tyrer N.M. and Gregory G.E. 1982. A guide to the neuroanatomy of locust suboesophageal and thoracic ganglia. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B* 297: 91-123.
- Virant-Doberlet M., Čokl A. 2004. Vibrational Communication in Insects. *Neotropical Entomol* 33(2): 121-134
- Wholers D.W., Huber F. 1985. Topographical organization of the auditory pathway within the prothoracic ganglion of the cricket, *Gryllus campestris* L. *Cell Tissue Res* 239: 555-565.
- Yager D.D. 1999. Structure, development, and evolution of insect auditory systems. *Microsc Res Tech* 47:380-400

- Young D., Ball E. 1974. Structure and development of the auditory system in the prothoracic leg of the cricket *Teleogryllus commodus* (Walker). *Z Zellforsch* 147:325-334
- Zill S.N., Ridgel A.L., DiCaprio R.A.M. Frazier S. F. 1999. Loading signalling by cocroach trochanteral campaniform sensilla. *Brain Res* 822: 271-275
- Zorović M. Strukturne in funkcionalne značilnosti vibracijskih nevronov v torakalnih ganglijih stenice *Nezara viridula* (Heteroptera: Pantatomidae). 2005. Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo. Doktorska disertacija.
- Zorović M., Hedwig B. 2011 Processing of species-specific auditory patterns in the cricket brain by ascending, local, and descending neurons during standing and walking. *J neurophysiol*, vol. 105, no. 5, str. 2181-2194.

ZAHVALA

Ta zahvala je namenjena predvsem mami in očetu, ki sta me vsa ta leta podpirala, spodbujala in usmerjala, pri tem pa me nikoli nista omejevala pri mojih željah in sanjah. Hvala ker sta verjela vame.

Hvala tudi Nataši Stritih, ki me je vodila skozi celoten nastanek te diplome, me usmerjala pri delu v laboratoriju, ter svoje znanje in nasvete delila z mano in mi dajala vedno nov zagon.

Zahvaljujem se tudi mentorju prof.dr. Andreju Čoklu za pregled diplomskega dela in dodatne koristne nasvete.

Izr. prof. dr. Kazimirju Drašlerju se zahvaljujem za skrbno končno recenzijo diplomske naloge in za pomoč pri strokovnem izražanju.

In nenazadnje še mojim sošolkam in sošolcem, prijateljicam in prijateljem. Predvsem Žani in Mateji, pa tudi Darji, Mojci, Ivi, Stini, Simoni, Gregorju, Andreju, Poloni... s katerimi sem se učila, delala, doživela in preživela vsa ta lepa študentska leta.