

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Polona RASPOR

**VPLIV TEMPERATURNE AKLIMACIJE NA DELOVANJE
FILIFORMNIH SENZIL STENICE *Pyrrhocoris apterus***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ACCLIMATION ON THE
ACTIVITY OF FILIFORM SENSILLA IN THE BUG *Pyrrhocoris
apterus***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za nevrobiologijo, fiziologijo in etologijo na Univerzi v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.

Senat Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenoval doc. dr. Gregorja Zupančiča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc.dr. Rudi VEROVNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Član: doc. dr. Gregor ZUPANČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: dr. Aleš ŠKORJANC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 5. 10. 2012

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Spodaj 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.

Polona Raspor

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 595.754(043.2)=163.6
KG temperaturna aklimacija/filiformne senzile/spontana aktivnost/odziv na dražljaj/
Pyrrhocoris apterus
AV RASPOR, Polona
SA ZUPANČIČ, Gregor (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2012
IN Vpliv temperaturne aklimacije na delovanje filiformnih senzil stenice *Pyrrhocoris apterus*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 47 str., 20 sl., 60 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Stenice vrste *Pyrrhocoris apterus* so aktivne tudi v zimskem času. V sončnih dneh zlezejo na debela dreves, kjer se zaradi insolacije lahko ogrejejo do poletnih temperatur. Zanimalo nas je, kako v takšnih razmerah delujejo receptorji in kako na nanje vpliva temperaturna aklimacija. Osredotočili smo se na spontano aktivnost filiformnih senzil tipa T_1 in T_2 na petem členu zadka ter njihov odziv na standarden trapezast dražljaj. Vse meritve smo izvedli v mesecu februarju in marcu, in sicer na živalih, ki so bile aklimirane na zunanje okolje (hladno aklimirane) ter na živalih, aklimiranih na laboratorijsko okolje (toplo aklimirane). 1) Spontana aktivnost. Spontano aktivnost smo izmerili takoj po prenosu živali v laboratorij in nato vsak dan prvih sedem dni po prenosu. Z nadgrajenim eksperimentalnim protokolom ter aklimacijo živali na drugačne zimske razmere, glede na predhodno raziskavo (Lipičnik, 2009), smo potrdili, da je pri hladno aklimiranih živalih nivo spontane aktivnosti nižji, da temperatura preparata nad 20 °C povzroči značilno znižanje aktivnosti T_2 ter da je prehod iz hladne v toplo aklimacijo hitrejši pri senzili T_1 kot T_2 . 2) Odziv na dražljaj. Z meritvami odziva senzil smo želeli ugotoviti, ali se senzile enako odzivajo na standarden trapezast dražljaj pri hladno in toplo aklimiranih živalih. Določili smo odzivno krivuljo fazičnega in toničnega dela odziva, vpliv adaptacije na premik fazične odzivne krivulje ter hitrost vzpostavitve izhodnega stanja senzile po draženju. Ugotovili smo, da temperaturna aklimacija ne vpliva na fazičen del odziva ter na vzpostavitev izhodnega stanja senzile, povzroči pa hladna aklimacija znižanje nivoja toničnega dela odziva za enak faktor kot pri spontani aktivnosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 595.754(043.2)=163.6
CX temperature acclimation/filiform sensillum/response stimuli/*Pyrrhocoris apterus*
AU RASPOR, Polona
AA ZUPANČIČ, Gregor (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
PY 2012
TI The influence of temperature acclimatization on the activity of filiform sensilla in the bug *Pyrrhocoris apterus*
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 47 p., 20 fig., 60 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Bugs *Pyrrhocoris apterus* are active also in winter time. On a sunny day they move from the litter to the tree trunks and get warmed to summer-like temperatures because of insolation. We were interested in the function of receptors in such conditions and how their properties are influenced by temperature acclimation. We focused on the spontaneous activity of filiform sensilla of type T₁ and T₂ on the fifth abdominal segment and their response to standard ramp stimulus. All experiments were done in February and March on animals acclimated to natural conditions (cold acclimated) and animals acclimated to laboratory conditions (warm acclimated). 1) Spontaneous activity. We measured the spontaneous activity immediately after the transfer of the animals into the laboratory and then every day for the first seven days after the transfer. With a modified experimental protocol and acclimation of animals to different winter conditions, compared to previous research (Lipičnik, 2009), we confirmed lower spontaneous activity in cold acclimated animals, as well as a suppressing effect of preparation temperatures above 20 °C on T₂ spontaneous activity and a faster transition from cold to warm acclimation in T₁ sensilla. 2) Response to stimulation. The aim of the stimulus response measurements was to find out if the response of the sensilla is the same in cold and warm acclimated animals. We measured the response curve of the phasic and tonic response to a ramp stimulus, the adaptive shift of the response curve and the time course of the sensilla recovery after stimulation. We showed that the temperature acclimation does not influence the phasic response, nor the recovery of sensilla after stimulation, however, it shifts the tonic response amplitude towards lower spike frequencies for the same factor as it shifts the spontaneous activity.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija.....	III
Key words documentation.....	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic.....	VII
Kazalo slik.....	VIII
Okrajšave in simboli.....	X
1 UVOD	1
1.1 FILIFORMNE SENZILE.....	1
1.1.1 Zgradba filiformne senzile.....	1
1.1.2 Delovanje filiformnih senzil.....	3
1.1.3 Zgradba in delovanje senzil stenice <i>Pyrrhocoris apterus</i>	6
1.1.4 Senzila stenice <i>P. apterus</i> kot znanstveni subjekt	10
1.2 AKLIMACIZACIJA STENICE <i>P. APTERUS</i> NA NIZKE TEMPERATURE.....	10
1.2.1 Življenjski cikel stenice <i>Pyrrhocoris apterus</i>	10
1.2.1 Aklimatizacija na zimske razmere.....	10
2 NAMEN IN HIPOTEZE	11
2.1 NAMEN	11
2.2 HIPOTEZE.....	11
3 MATERIAL IN METODE.....	12
3.1 POSKUSNE ŽIVALI.....	12
3.1.1 Osnovni podatki o živalih	12
3.1.2 Namestitev in hrana	12
3.1.3 Aklimacija živali.....	12
3.1.3.1 Hladna aklimacija.....	12
3.1.3.2 Topla aklimacija.....	12
3.1.4 Protokol aklimacije pred meritvami spontane aktivnosti senzil.....	12
3.1.5 Protokol aklimacije pred meritvami odziva senzil na standarden dražljaj.....	12
3.2 PRIPRAVA PREPARATA.....	13
3.3 ELEKTROFIZIOLOŠKE MERITVE.....	13

3.4	URAVNAVANJE TEMPERATURE PREPARATA.....	13
3.5	DRAŽENJE SENZIL	14
3.6	ANALIZA PODATKOV IN STATISTIČNE METODE.....	14
4	REZULTATI	16
4.1	SPONTANA AKTIVNOST.....	16
4.1	VPLIV TEMPERATURNE AKLIMATIZACIJE NA ODZIV SENZILE.....	19
4.1.1	Odziv senzile na standarden trapezast dražljaj.....	19
4.1.2	Vpliv temperature aklimacije na odzivno krivuljo fazičnega in toničnega dela odziva.....	24
4.1.3	Vpliv temperature aklimacije na adaptacijski premik odzivnih krivulj fazičnega dela odziva.....	29
4.1.4	Vpliv temperature aklimacije na hitrost vzpostavitve izhodnega stanja po draženju.....	31
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	35
5.1	VPLIV TEMPERATURNE AKLIMACIJE NA SPONTANO AKTIVNOST	35
5.2	VPLIV TEMPERATURNE AKLIMACIJE NA ODZIV NA DRAŽLJAJ	37
6	POVZETEK (SUMMARY)	40
6.1	POVZETEK	40
6.2	SUMMARY	41
7	VIRI	43
	ZAHVALA	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Temperatura zraka v zunanjem zaboju tik pred prenosom živali v laboratorij..	16
Preglednica 2: Število preparatov in datum meritev za določen dan aklimacije.	16

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba mehansko občutljive senzile žuželk.....	2
Slika 2: Odziv filiformne senzile na dražljaj.....	4
Slika 3: Razporeditev filiformnih senzil na zadku stenice <i>P. apterus</i>	6
Slika 4: Vzdolžni prerez senzile T ₁	8
Slika 5: Vzdolžni prerez senzile T ₃	9
Slika 6: Temperaturna odvisnost frekvence spontane aktivnosti pred začetkom tople aklimacije (dan 0) in zadnji dan aklimacije (dan 7) pri senzili T ₁ (A) in T ₂ (B).....	17
Slika 7: Spontana aktivnost senzil tipa T ₁ in T ₂ med aklimacijo na laboratorijsko okolje..	18
Slika 8: Ekscitacijski odziv senzile T ₁ na trapezast dražljaj.....	20
Slika 9: Inhibicijski odziv senzile T ₁ na trapezast dražljaj.....	21
Slika 10: Povprečen odziv senzile T ₁ na odklon laska v ekscitacijsko smer pri hladno (A) in toplo aklimiranih (B) živalih.....	22
Slika 11: Povprečen odziv senzile T ₂ na odklon laska v ekscitacijsko smer pri hladno (A) in toplo aklimiranih (B) živalih.....	23
Slika 12: Odzivne krivulje senzile T ₁ pri hladno in toplo aklimiranih osebkih.....	25
Slika 13: Odzivne krivulje senzile T ₂ pri hladno in toplo aklimiranih osebkih.....	26
Slika 14: Primerjava absolutnih (i) ter relativnih vrednosti (ii) med hladno in toplo aklimiranimi osebki pri odklonu senzile T ₁ za kot +9,25 (A) in -5,24° (B).....	27
Slika 15: Primerjava absolutnih (i) ter relativnih vrednosti (ii) med hladno in toplo aklimiranimi osebki pri odklonu senzile T ₂ za kot +9,25 (A) in -5,24° (B).....	28
Slika 16: Vpliv temperaturne aklimacije na adaptacijski premik odzivnih krivulj fazičnega dela odziva senzile T ₁ (A) in T ₂ (B).....	30
Slika 17: Hitrost vzpostavitve izhodnega stanja po draženju senzile T ₂ pri toplo aklimiranem osebku.....	31
Slika 18: Krivulji vzpostavitve izhodnega stanja po draženju senzile T ₁ pri hladno (A) in toplo aklimiranih (B) osebkih.....	32
Slika 19: Krivulji vzpostavitve izhodnega stanja po draženju senzile T ₂ pri hladno (A) in toplo aklimiranih (B) osebkih.....	33

Slika 20: Logaritemski prikaz vzpostavitve izhodnega stanja v senzili T₁ (A) in T₂ (B) po draženju..... 34

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>P. apterus</i>	<i>Pyrrhocoris apterus</i>
PE	fosfatidiletanolamin
PC	fosfatidilholin
K ⁺	kalijev ion/-i
Na ⁺	natrijev ion/-i
T1	senzila T1
T2	senzila T2
SD	standardna deviacija
SN	standardna napaka

1 UVOD

Stenice vrste *Pyrrhocoris apterus* imajo široko območje temperaturne tolerance. Poleti se lahko ogrejejo več kot 30 °C, pozimi pa ohladijo globoko pod temperaturo ledišča. Zimo preživijo v stadiju imaga. Njihova odpornost na mraz je posledica fizioloških sprememb, ki jih sprožita diapavza in prilagoditev na nizke temperature (Koštal, Šlachta, Šimek, 2001). Med drugim pride do sprememb membranskih fosfolipidov (Hodkova, 2002), v telesu pa se začnejo kopičiti krioprotektanti iz vrst poliolov (Koštal, Šlachta, Šimek, 2001). Kljub nizkim temperaturam so stenice aktivne tudi v zimskem času. Sončni žarki privabijo osebke iz stelje na debela dreves, kjer se ogrejejo na več kot 30 °C (Batagelj, 2004). Pri premiku iz stelje na drevo in nazaj se morajo stenice zanesti na svoja čutila. To odpira vprašanje, kako temperaturna aklimacija vpliva na delovanje čutil. V tem diplomskem delu smo se osredotočili na spontano aktivnost ter odziv filiformnih senzil T₁ in T₂ na dražljaj pri hladno in toplo aklimiranih osebkih.

1.1 FILIFORMNE SENZILE

Filiformne senzile spadajo med čutila členonožcev. V skupino mehansko občutljivih senzil poleg filiformnih senzil sodijo še ščetine, kampaniformne senzile in skolopidiji. Za vse senzile je značilna preprosta notranja zgradba iz ene ali več receptorskih celic ter nekaj spremljevalnih celic, ki se z vrsto delitev razvijejo iz ene same zarodne epitelne celice (slika 1). Zunanji del pri večini senzil predstavlja kutikularna struktura (Keil, 1997a). Ta je pri filiformnih senzilah oblikovana v hitinski lasek, ki je s kutikularno membrano gibljivo vpet v kutikulo. Odkloni ga že šibek zračni tok ali pa nizkofrekvenčni zvok oziroma vibracija medija (Dahl, 1883; Tautz, 1977, 1978; Gnatzy, Tautz, 1980), kar filiformne senzile uvršča med mehanoreceptorje.

Mehanorecepcija je zaznava mehanskega dražljaja, ki ga lahko povzročijo zunanji dejavniki, kot so dotik, vibracije, itd., ali pa notranji dejavniki, kot je npr. kontrakcija mišic (McIver, 1975). Če je žival obdana s trdim eksoskeletom, kot je to v primeru členonožcev, je recepcija omejena le na območje, kjer je kutikula ustrezno diferencirana za sprejem dražljaja (Keil, Steinbrech, 1984).

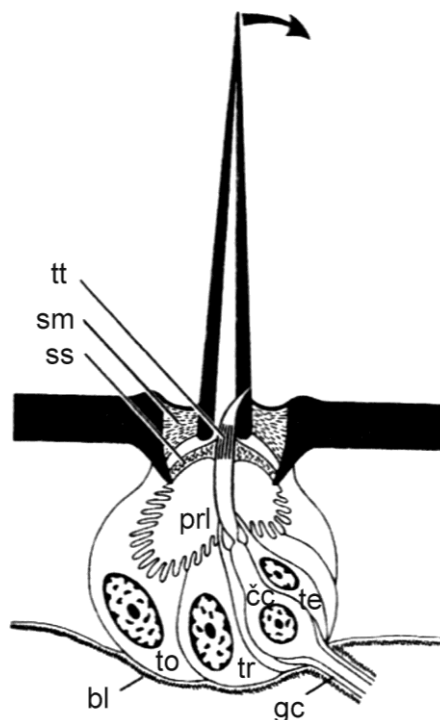
1.1.1 Zgradba filiformne senzile

Filiformne senzile žuželk imajo hitinast lasek, ki je v kutikularno čašo vpet z gibljivo sklepno membrano (Dahl, 1883; Tautz, 1977, 1978; Gnatzy, Tautz, 1980, Shimosawa, Kanou, 1984a, Škorjanc, 2008). Konica laska je ostra. Njegova površina nima nobenih por ali drugih odprtin, lahko pa ima kutikularne strukture, kot so žlebovi in bodice. Znotraj je baza laska povezana z dendritom čutilne celice (McIver, 1975).

Dendrit se na notranji in zunanji segment predeli s ciliarno regijo ali fibrilarnim telesom. To območje sestavlja devet parov mikrotubulov brez osrednjega para. V notranjem segmentu je normalen nabor celičnih elementov, ki ima tik pod ciliarno regijo ali

fibrilarnim telesom par centriolov z zgradbo devetih tripletov mikrotubulov. Zunanji del dendrita se tik pod bazo hitinaste laska močno razširi, saj ima čisto v terminalnem delu tubularno telo iz 50-100 mikrotubulov enakega premera kot so tisti v ciliarni regiji. Število mikrotubulov proti ciliarni regiji počasi upada. Tubularno telo je prek posebnih struktur povezano s celično membrano (Thurm, 1983).

Najbolj notranja pomožna celica senzile je tekogena celica. V ciliarni regiji se razširi in tvori notranji prostor receptorske limfe (Keil, Steinbrecht, 1984). Kompleks nevrona in tekogene celice obdajata še dve pomožni celici, in sicer trihogena in najbolj zunanja tormogena celica. Vpeti sta v epidermis in tvorita velik subkutikularni prostor receptorske limfe (Keil, 1997). Ta vsebuje visoke koncentracije K^+ in nizke koncentracije Na^+ (Thurm, Küppers, 1980), ima pa tudi proteoglikane (Grünter, Gnatzy, 1987a). Na bazalni strani trihogena in tormogena celica prihajata v stik z bazalno membrano in se preko obsežnega bazalnega labirinta povezujeta z hemolimfo (Keil, Thurm, 1979).



Slika1: Zgradba mehansko občutljive senzile žuželk. Pomožne celice tormogena (to), trihogena (tr) in tekogena (te) obdajajo telo čutilne celice (čc). Njen akson ovija glia celica (gc). Zunanji del dendrita je obdan s prostorom receptorske limfe (prl). V njegovi konici se nahajajo tubularne strukture (tt). Dendrit je pritrjen na bazo laska, podpira pa ga vsadiščni pretin ali »socket septum« (ss). Lasek je v kutikulo pripet s sklepno membrano (sm). Če se lasek premakne v desno (ukrivljena puščica), potem se baza premakne v levo in vzdraži konico dendrita (prirejeno po Keil in Steinbrecht, 1984; povzeto po Škorjanc, 2008).

Med celicami senzile so različni celični stiki. Apikalno je adhezijski pas s sidriščnimi povezavami. Pod njim ionsko bariero med receptorsko limfo in hemolimfo predstavljajo

septalni stiki (Keil, Thurm, 1979). Najnižje so presledkovni stiki, ki služijo povezavi citoplazem sosednjih celic ter tako ustvarjajo funkcionalni sincicij. Med nevronom in tekogeno celico presledkovnih stikov niso našli (Keil, Steinbrecht, 1984). Med tormogeno celico in kutikulo je tesen stik, katerega namen je ločitev receptorske limfe od preostalega subkutikularnega prostora, hkrati pa predstavlja velik električni upor med sosednjimi senzilami (Thurm, 1974a,b; De Kramer et al., 1984; Keil, Steinbrecht, 1984).

1.1.2 Delovanje filiformnih senzil

1.1.2.1 Spontana aktivnost

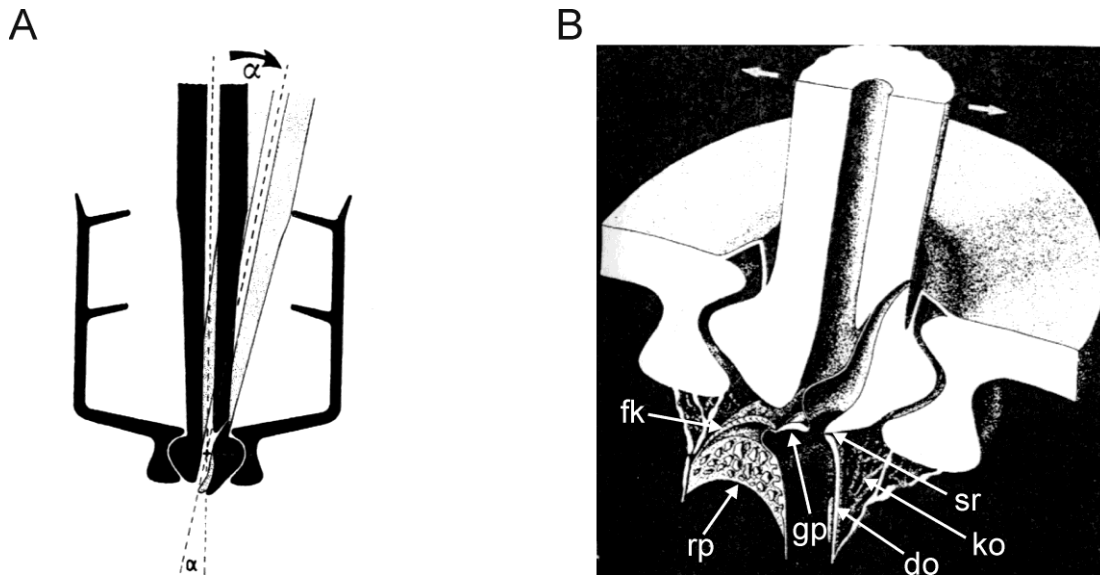
Tudi v odsotnosti dražljaja lahko pri mnogih filiformnih senzilah zasledimo spontano proženje živčnih impulzov. Medtem ko je pri senzilah murna in ščurka spontana aktivnost omejena le na dolge in smerno občutljive laske, je pri senzilah stenice *P. apterus* prisotna pri vseh, neglede na dolžino in smerno občutljivost (Škorjanc, 2002). Ta proces daje senzili zmožnosti »ničelnega inštrumenta«, saj z neprestanim delovanjem določa začetno frekvenco, iz katere se glede na odklon laska slednja poveča ali zmanjša. Hkrati pa poveča občutljivost receptorja, ki se zaradi neprestane aktivacije lahko odzove tudi na dražljaje, ki bi bili sicer podpražni (Thurm, 2001). Mirovna aktivnost je temperaturno odvisna. Z višjo telesno temperaturo se praviloma njena hitrost zvišuje (Škorjanc, 2008; Škorjanc et al., 2009).

Ena od razlag nastanka spontane aktivnosti je neprestana detekcija zračnih tokov (Dumpert, Gnatzy, 1977). Vendar pa so mnoge raziskave pokazale, da kljub odstranitvi oziroma krajšanju laske pri večini senzil ne pride do bistvenih sprememb v frekvenci spontane aktivnosti (Škorjan et al., 2009; Buno et al., 1981; Dagan, Volman, 1982; Hamon, Gullet, 1994; Landorfa, Miller, 1995). Thurm predlaga razlago, kjer je del transdukcijskih kanalov odprt tudi v mirovnem stanju. Posledična depolarizacija bi lahko privedla do proženja spontanih akcijskih potencialov (Thurm, 2001). Druga možnost je obstoj ritmovnika, ki je ločen od mesta transdukcije (Hamon, Guillet, 1994; Škorjanc, 2002, 2008; Škorjanc et al. 2009). Tak ritmovnik je bil predlagan v anteriornih gastričnih receptorjih jastoga (Combes et al., 1993), termoreceptorjih pajka (Gingl, Tichy, 2006) ter filiformnih senzilah T₁ stenice *Pyrrhocoris apterus*.

1.1.2.1 Odziv na dražljaj

Delovanje filiformnih senzil so dobro preučili pri ravnokrilcih, in sicer ščurku (*Periplaneta americana*), cvrčku (*Acheta domesticus*) ter murnu (*Gryllus bimaculatus*) (Nicklaus, 1967; Gnatzy, Schmidt, 1971; Edwards, Palka, 1974; Gnatzy, 1976; Gnatzy, Tautz, 1980; Keil, Steinbrecht, 1984, Keil, 1997b). Filiformne senzile murna so razdeljene v dva tipa – tip z daljšim in tip s krajšim laskom (Schmozawa, Kanou, 1984a,b). Največ raziskav je bilo narejenih na tipu z daljšim laskom.

Mehanski dražljaj premakne lasek. Pri tem lasek deluje na način vzvoda prvega reda (slika 2). Konica naredi velik premik, baza pa se premakne malo in to v nasprotno smer kot konica. Lasek se lahko odklanja le v določeni ravnini, ki jo določata dva okrogla stranska izrastka baze ali »ležaja«, in sicer pravokotno na njuno os. Približno 1-2 μm pod osjo rotacije dendrit vstopa v bazo laska. Iz ene strani se v dendrit v področju tubularnih teles zajeda stimulirajoči rob baze. Prav tu ob nagibu laska potečejo največje deformacije dendrita. Pod bazo laska dendrit podpirajo zapletene strukture. Na ventralni strani je krožno kutikularno ogrodje, ki se razteza okrog pretina vsadiščne jamice. Pretin se na nasprotni strani stimulirajočega roba nekoliko odebeli. Tu dendriška ovojnica tvori grebenasto ploščo, v enaki ravnini pa se razvije tudi fibrilarna kupolasta struktura. Ko se lasek premakne v smeri stimulirajočega roba se membrana depolarizira, v nasprotni smeri pa hiperpolarizira (Thurm, 1983).



Slika 2: Odziv filiformne senzile na dražljaj. A – Lasek kot vzvod prvega reda. Ko konica naredi velik premik, se baza premakne le malo in to v nasprotno smer kot konica. B – Podroben pregled baze laska in podpornih struktur. Iz ene strani se v dendrit zajeda stimulirajoči rob (sr) baze laska. Pod bazo laska je na ventralni strani krožno kutikularno ogrodje (ko), ki se razteza okrog pretina vsadiščne jamice. Na nasprotni strani stimulirajočega roba se pretin odebeli (rp). Tu dendriška ovojnica (do) tvori grebenasto ploščo (gp), v enaki ravnini pa se razvije tudi fibrilarna kupolasta struktura (fk) (prirejeno iz Keil, Steinbrecht, 1984; povzeto po Škorjanc, 2008).

Deformacija izzove spremembe na dendritski membrani. Odprejo se ionski kanali, zaradi česar se spremeni polariteta membranskega potenciala. Latenca - čas med premikom laska in odzivom mehanoceptorjev - je zelo kratka, kar kaže, da je učinek sile na kanalčke neposreden in izključuje delovanje encimske kaskade (Thurm, 1983). Vendar dejanski mehanizem odpiranja kanalov še ni znan. V literaturi sta obveljali dve možni razlagi. Prva je ta, da so kanali zaprti z nekakšno loputo, na katero so vezane sidrne povezave. Premiku laska sledijo tudi sidrne povezave, ki za seboj povlečejo loputo ter tako odprejo kanal in omogočijo prehod ionov. Druga pa predpostavlja, da so sidrne povezave direktno povezane

s kanali. Poteg sidrnih povezav povzroči spremembo lege kanalskih beljakovin. Spremenijo se sile med kanali ter fosfolipidi, kar vodi v odprtje kanalov (Kung, 2005). Takrat lahko skozi steče tok kationov, ki ga poganja transepitelna napetost. Ker je ta napetost zelo velika, lahko že odprtje manjšega števila kanalov povzroči nastanek nesorazmerno velikega receptorskega toka. Njegova intenziteta z oddaljenostjo od mesta nastanka upada (Thurm, 2001).

Pod mejo celičnih stikov se receptorski tok transformira v akcijske potenciale (Morita, Yamashita, 1959; Thurm, 1963; Wolbarst, 1965; Wolbrast, Hanson, 1965). To se lahko zgodi med aksonom in telesom čutilne celice (Stockbridge, French, 1991) ali pa na bazalnem delu dendrita (Mellon, Kennedy, 1964; Mendelson, 1996; Erler, Thurm, 1981). Impulzi se ne širijo le centripetalno temveč lahko v nekaterih primerih tudi centrifugalno, proti konici dendrita, kar pomeni, da je električno aktiven tudi ta del čutilne celice (Seyfarth et al., 1982; Hamon et al., 1988; Hansen-Delkeskamp, 1992). Nekatere meritve nakazujejo možnost spreminjanja mesta generatorja akcijskih potencialov glede na jakost mehanskega dražljaja (Erler, Thurm, 1981; Hamon et al., 1988).

1.1.2.1.1 Čutilna adaptacija

Posledica čutilne adaptacije je zmanjšanje odziva receptorja pri nespremenjenem draženju. Za fazične receptorje je značilna hitra adaptacija, za tonične pa počasna. To omogoča fazičnim receptorjem, da se odzovejo predvsem na hitre dražljaje, toničnim pa, da se odzovejo tudi na počasne dražljaje. Nekateri receptorji imajo odziv, ki povzema značilnosti obeh tipov. Imenujemo ga fazično-toničen tip odziva. Takšen receptor ima značilen odziv na trapezast dražljaj. Na začetno dinamično fazo, v kateri se dražljaj hitro spreminja, se odzove z veliko spremembo frekvence impulzov. Govorimo o fazičnem delu odziva. V statični fazi dražljaja pa zaradi adaptacije odziv pade in se ustali na nivoju, ki je sorazmeren z velikostjo dražljaja. Govorimo o toničnem delu odziva.

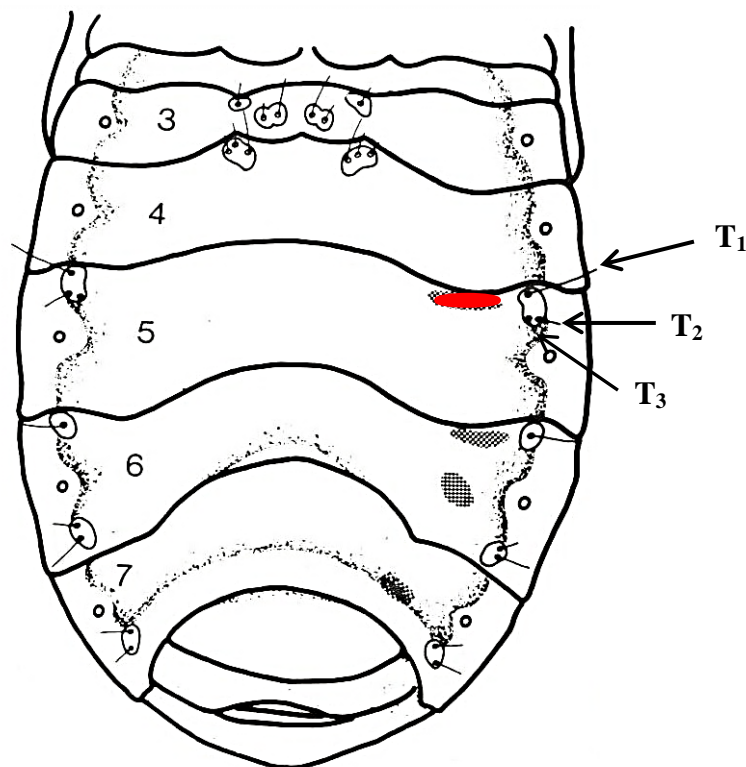
Adaptacijski mehanizmi lahko potečejo na katerikoli stopnji čutilnega procesa. Na prvi stopnji, pri deformaciji dendrita, predpostavljamo pasivno ali aktivno adaptacijo. Pasivno omogočajo viskozno elastične lastnosti prenašalnih struktur, ki filtrirajo dražljaj (French, Torkkeli, 1994; Hamon, Guillet, 1994). Aktivno adaptacijo pa lahko dosežejo z aktivnim spreminjanjem dolžine sidrnih povezav, ki ionske kanale vpenjajo v zunanje in notranje celične strukture, ali pa z njihovim aktivnim drsenjem vzdolž citoskeleta s pomočjo motornih proteinov, ki bi preko mehanske napetosti lahko zmanjšala verjetnost odprtega stanja kanalčkov (Gillespie, Walker, 2001). Na nivoju transdukcije in tvorbe akcijskega potenciala so možni vzroki adaptacije različni ionski tokovi. Med njimi sta najpomembnejša napetostno odvisen K^+ tok ter od Ca^{2+} odvisen K^+ tok ter počasna reaktivacija napetostno odvisnih Na^+ kanalov. Na transdukcijo lahko poleg tega vpliva tudi dinamika odpiranja in zapiranja ionskih kanalov (Hamon, Guillet, 1994). Med nastankom akcijskega impulza aktivirani adaptacijski mehanizmi zmanjšajo občutljivost generatorja za vhodne depolarizacijske tokove. V primeru visoke frekvence impulzov, so intervali med

impulzi kratki in aktivacija adaptacijskih mehanizmov je velika. V kolikor je frekvenca impulzov nizka, intervali med impulzi pa so daljši, so adaptacijski mehanizmi ob koncu intervala šibki (povzeto po Škorjanc, 2008)

1.1.3 Zgradba in delovanje senzil stenice *Pyrrhocoris apterus*

V skupino filiformnih senzil spadajo tudi senzile stenice *Pyrrhocoris apterus*. Zanje se v literaturi uporablja še eno ime, in sicer trihobotriji (Tullgren, 1918). Sama beseda izhaja iz izraza *botrium* - čaša, saj oblika jamice, v kateri leži lasek, spominja nanjo. To poimenovanje se uporablja tudi za filiformne senzile pajkovcev. Ker pa se je tako poimenovanje najprej uveljavilo pri pajkovcih, se zaradi lažjega razumevanja izraz *trihobotrij* pri stenicah opušta.

Filiformne senzile so pri stenici *P. apterus* nameščene simetrično, na ventralni strani zadka. Na 3. in 4. členu zadka so nameščene mediano, na 5., 6. in 7. pa lateralno. Vseh senzil na zadku je 28. Med njimi ločimo tri tipe: T₁, T₂ in T₃. Ena senzila ima značilnosti tipa T₁ in T₂, zato so jo označili kot svoj tip T₁₂. Peti člen vsebuje vse tri tipe T₁, T₂ in T₃ na enem polju skupaj. Šesti člen ima dva polja, na enem je tip T₁ in T₁₂, na drugem pa samo T₁. Na sedmem členu je eno polje s tipom T₁ in T₂ (Drašlar, 1980; Škorjanc, 2008).

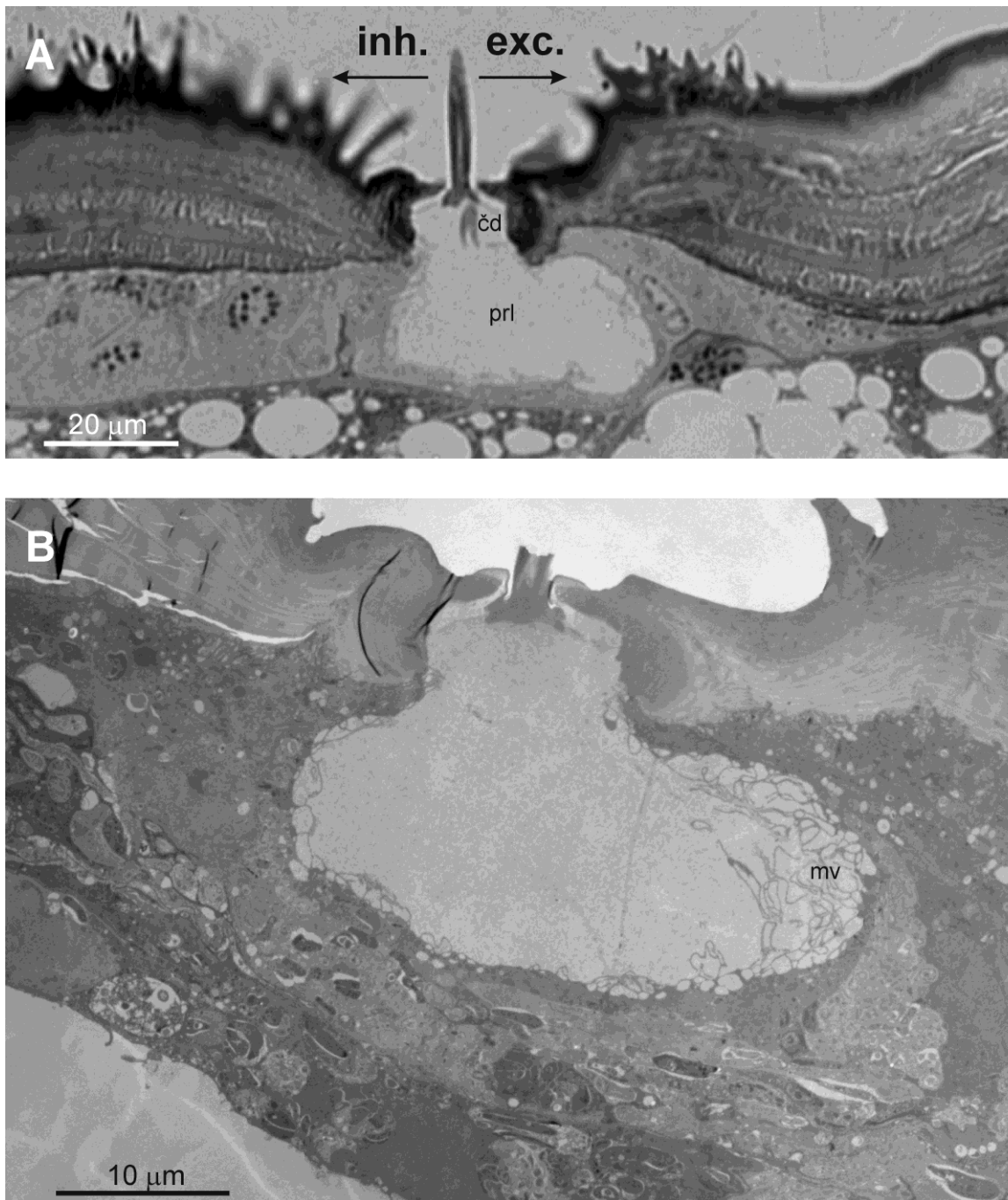


Slika 3: Razporeditev filiformnih senzil na zadku stenice *P. apterus*. Segmenti so označeni s številko. Na petem členu zadka so s puščico označene posamezne senzile: T₁, T₂ in T₃. Lise predstavljajo najboljša mesta za odvajanje potencialov, pri tem rdeča lisa pomeni položaj merilne elektrode v naših raziskavah.

1.1.3.1 Senzila T₁

Tip T₁ ima najdaljši lasek in meri v dolžino 330 do 360 μm. Zanj je značilna visoka mirovna aktivnost (45 do 68 imp/s), enakomerno pojavljanje impulzov, majhna amplituda živčnih impulzov, fazično-toničen tip odziva in smerna občutljivost. Zadnja pomeni, da lasek pri odklonu v eno smer izzove povečanje frekvence impulzov, medtem ko pri odklonu v drugo smer izzove njeno zmanjšanje pod spontano aktivnost. Odziv senzile je lahko ekscitacijski v kranialno ali kavdalno smer, kar zavisi od posamezne senzile v določenem čutilnem polju enega od členov zadka. Endogen izvor spontane aktivnosti je pri tem tipu najverjetneje povezan z vsaj dvema mehanizmoma. Prvi se nanaša na transdukcijske kanale, ki prehajajo iz odprtega v zaprto stanje tudi v odsotnosti dražljajev. Odpiranje kanalov ima visoko aktivacijsko energijo in prispeva veliko šuma v sistem. Drugi del pa se nanaša na generator živčnih impulzov, mehanizem ločen od transdukcijskih kanalov. Ta prispeva minimalno količino šuma in zaradi lastne nižje aktivacijske energije zniža nivo celokupne aktivacijske energije (Škorjanc, 2008).

Na vzdolžnem prerezu senzile vidimo, da so celice razporejene v tankem epitelnem sloju med kutikulo in bazalno lamino (slika 4). Med njimi je receptorski prostor, ki je precej velik v primerjavi s senzilo. Vertikalno je razprostrt čez celotno debelino epitelnega sloja in obdaja čutilni dendrit, v horizontalni smeri pa je asimetričen. Kavdalno je njegova stena vzporedna s steno vsadiščne jamice laska, kranialno pa se razteza daleč pod kutikulo. Preferenčna ravnina laska poteka čez sredino limfnega prostora in ga razdeli v dve simetrični polovici. V notranjosti prostor ni zapolnjen v celoti z membranskimi strukturami, temveč ima le na robu prostora tanek sloj mikrovilov, ki so na ekscitacijsko stran gostejši. Med njimi na ekscitacijski strani vstopi v limfni prostor dendrit. Poteka tik pod kutikulo in ostro zavije proti bazi laska. Nadaljuje v levitven kanal, kjer ga na nivoju tubularnega telesa obda asimetrična nožnica. Ta na ekscitacijski strani prehaja v tanko lamelo (Škorjanc, 2008).



Slika 4: Vzdolžni prerez senzile T_1 . A – Čutilni dendrit (čd), prostor receptorske limfe (prl) ter smeri premika (inh. – inhibitorna, eks. – ekscitatorna). B – V prostoru receptorske limfe so na ekscitatorni strani vidni mikrovili (mv) (Škorjanc, 2008; Drašlar, neobjavljeni podatki).

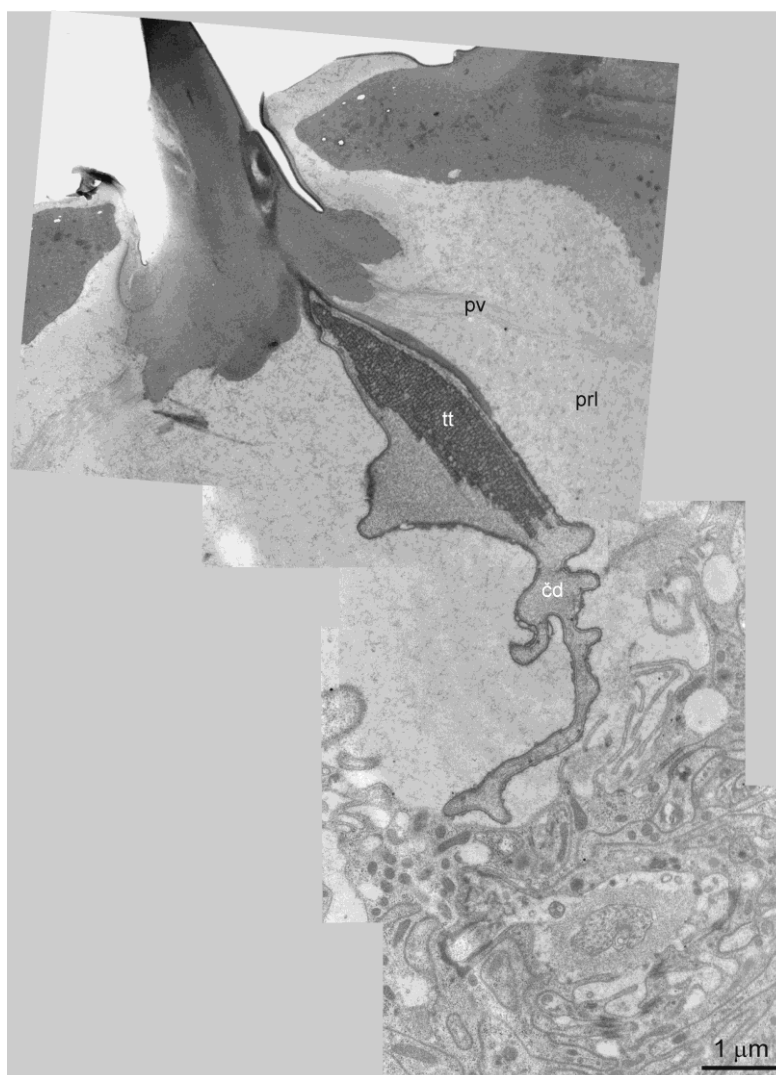
1.1.3.2 Senzila T_2

Tip T_2 ima srednje velik lasek in meri v dolžino 150 do 180 μm . Mirovna aktivnost se giblje okrog 1, 6 imp/s (spodnja meja 1 in zgornja 5 imp/s), impulzi se pojavljajo precej naključno, amplituda impulzov je velika in v primerjavi z drugima dvema tipoma senzil največja. Ima ravno tako fazično-toničen tip odziva, nima pa smerne občutljivost. V

katerokoli smer lasek odklonimo, se njegov odziv poveča glede na mirovno aktivnost. Endogen izvor mirovne aktivnosti je najverjetneje odvisen le od transdukcijskih kanalov (Škorjanc, 2008; Drašlar, neobjavljeni podatki).

1.1.3.3 Senzila T₃

Tip T₃ ima najkrajši lasek, ki meri v dolžino približno 80 μm. Mirovna aktivnost se pojavlja le pri nekaj odstotkih osebkov in je zelo nizka, okrog 0,6 imp/s. Impulzi se pojavljajo naključno. Amplituda živčnih impulzov je nekoliko večja kot pri odzivu T₁, vendar manjša kot pri T₂. Ima le fazičen tip odziva in nima smerne občutljivost. Prostor receptorske limfe ni asimetričen in je manjši kot pri tipu T₁ (slika 5). Dendrit čutilne celice vstopa iz spodnje strani in potuje naravnost proti bazi laska. Endogen izvor mirovne aktivnosti je najverjetneje povezan le s transdukcijskimi kanali (Škorjanc, 2008).



Slika 5: Vzdolžni prerez senzile T₃. Na sliki so vidne strukture: pv – pripjenjalna vlakna; čd – čutilni dendrit; tt – tubularno telo; prl – prostor receptorske limfe (Škorjanc, 2008).

1.1.4 Senzila stenice *P. apterus* kot znanstveni subjekt

Osebkke *P. apterus* zaradi svoje številčnosti relativno lahko dobimo v naravi, kar nam zagotavlja zadostno število raziskovalnih objektov. Hkrati senzile omogočajo zelo enostavno raziskovanje, saj imajo preprosto zgradbo iz ene receptorske in treh pomožnih celic. Registracija impulzov posamezne senzile je zanesljiva in ponovljiva. Na petem členu zadka senzile T₁, T₂ in T₃ ležijo blizu skupaj (manj kot 100 μm narazen), zato lahko sklepamo na podoben vpliv temperaturne aklimacije na vse tri senzile.

1.2 AKLIMACIZACIJA STENICE *P. APTERUS* NA NIZKE TEMPERATURE

1.2.1 Življenjski cikel stenice *Pyrrhocoris apterus*

Stenica *Pyrrhocoris apterus* je razširjena v celotnem zmernem pasu Evrope vse do južne Anglije, obale Sredozemskega morja in Skandinavije na severu (povzeto po Batagelj, 2005). Sega tudi do zahodne Sibirije, jugo zahodne Mongolije in severno zahodne Kitajske, našli pa so jo tudi v ZDA v centralni Ameriki in Indiji (Socha, 1993).

Paritvena sezona prezimulih odraslih osebkov se začne v aprilu (Koštal, Šimek, 2000). Izležena jajčeca se razvijejo do imaga v osmih tednih. Larve imajo pet zaporednih levitev in pet nimfnih stadijev, ki so podobni odraslim osebkom. Faza bube ni prisotna, kar jih uvršča med hemimetabolne vrste. Odrasli osebkki prve generacije se pojavijo v sredini junija. V tem času začne padati populacija prezimulih osebkov. V ugodnih razmerah se lahko del osebkov prve generacije začne razmnoževati že sredi poletja in odrasli osebkki druge generacije se pojavijo v oktobru. Le osebkki, ki so dosegli odraslo obliko pred prvim večjim padcem temperatur, bodo lahko preživelili zimo (Koštal, Šimek, 2004).

Skrajšana dolžina dneva (manj kot 17h) v jeseni sproži razmnoževalno diapavzo (Hodek, 1971). To je dinamičen proces, kjer se razmnoževanje sicer ustavi, a procesi kot so rast, premikanje in hranjenje lahko potekajo (Hodek, 2002). V decembru ali začetku januarja se proces diapavze zaključi (Hodek, 1971). Zimsko mirovanje živali nato vzdržujejo nizka temperatura v okolju. Ko nastopijo spomladanske temperature, se začne proces razvoja ovarijev ter razmnoževanje osebkov (Hodek, 1971).

1.2.1 Aklimatizacija na zimske razmere

P. apterus ne preživi zmrznjenja telesnih tekočin, zato so v njegovem telesu nujne fiziološke spremembe. Proti koncu poletja jih najprej sproži diapavza, kasneje v jeseni pa se ji pridruži še vpliv nizkih temperatur v okolju (hladna aklimatizacija). Zmanjša se koncentracija kristalizacijskih jeder, sintetizirajo in akumulirajo se zimski polioli (Tomcala et al., 2006), poveča se koncentracija Na⁺ in K⁺ v hemolimfi, zveča se osmolarnost hemolimfe, zmanjša se tudi porabe kisika, izgubi se telesne tekočine, poveča se količina palmitinske kisline v celičnih membranah, zveča se količina fosfatidiletanolamina (PE) in zmanjša količina fosfatidilholina v membranskih fosfolipidih, zveča se količina linolne in zmanjša oleinska kisline v PE (Šlachta, 2002; Hodková, 1999).

2 NAMEN IN HIPOTEZE

2.1 NAMEN

Diplomsko delo sodi v sklop širših raziskav o zgradbi in delovanju filiformnih senzil stenice *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). Njen namen je določitev vpliva temperaturne aklimacije na funkcionalne lastnosti senzil ter dopolnitev predhodnih raziskav letne dinamike spontane aktivnosti (Batagelj, 2005; Lipičnik, 2009).

2.2 HIPOTEZE

- a. Aklimacija na nizke zimske temperature ima primerljiv vpliv na spontano aktivnost filiformnih senzil T_1 in T_2 , ne glede na konkretne vremenske razmere v izbranem letu.
- b. V zimskem času, ko so živali hladno aklimirane in praviloma mirujejo, ostajajo senzile T_1 in T_2 funkcionalne in se odzivajo na standardni dražljaj podobno kot pri toplo aklimiranih živalih.
- c. Velikost odziva filiformnih senzil na standardni trapezast dražljaj je pri hladno aklimiranih osebkih nižja kot pri toplo aklimiranih.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POSKUSNE ŽIVALI

3.1.1 Osnovni podatki o živalih

Za poskuse smo uporabili odrasle samce vrste *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). Živali smo nabrali februarja 2012. Prvič v sredini meseca v bližini naselja Fužine v Ljubljani, drugič pa ob koncu meseca pri gradu Bogenšperk pri Litiji.

3.1.2 Namestitev in hrana

Živali smo shranili v steklenih posodah, kjer so imele na razpolago hrano (lipova semena) in vodo *ad libitum*.

3.1.3 Aklimacija živali

3.1.3.1 Hladna aklimacija

Steklene posode smo dali v zaboj, ki je bil zunaj v senčni legi, delno zakopan v zemljo. Odprtine v steni zaboja so omogočale vzpostavitev zunanjih razmer v zaboju ter potek aklimacije, ki je bil enak poteku aklimatizacije v naravnih pogojih. Ker se je v sredini meseca marca zunanja temperatura čez dan dvignila tudi do 20 °C smo kozarce iz zunanjega zaboja prenesli v hladilnik, kjer je bila temperatura 7 °C.

3.1.3.2 Topla aklimacija

Skladno s protokoli poskusov smo določeno število osebkov prenesli iz hladnega okolja v laboratorijsko, kjer je bila temperatura zraka 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Tu smo jih hranili do izvedbe poskusa.

3.1.4 Protokol aklimacije pred meritvami spontane aktivnosti senzil

Spontano aktivnost senzil smo merili v različnih fazah tople aklimacije. Začetno meritev smo naredili na osebkih, ki so bili preneseni v laboratorij tik pred poskusom, ko proces aklimacije še ni potekel (dan 0). Nato smo meritve izvedli prvi, drugi, tretji, četrti, peti, šesti in sedmi dan po prenosu v laboratorijsko okolje. Za vsak dan aklimacije smo naredili meritve na 10 preparatih (razen za dan 2). Osebkje za določen dan aklimacije smo prenesli v laboratorij večkrat, saj v enem dnevu nismo uspeli opraviti vseh meritev.

3.1.5 Protokol aklimacije pred meritvami odziva senzil na standarden dražljaj

Meritve smo opravili pri petih hladno in petih toplo aklimiranih osebkih. Meritve pri hladno aklimiranih osebkih smo opravili takoj po prenosu osebkov iz hladnega okolja v laboratorij. Pred izvedbo protokolov draženja smo na osnovi sprememb spontane aktivnosti preverili, če je potekla hladna aklimacija. Vpliv tople aklimacije na odziv senzil

smo določili pri osebkih, ki smo jih prenesli v laboratorij vsaj 14 dni pred poskusom, kar je bilo dovolj dolgo, da je aklimacije na toplo okolje že potekla.

3.2 PRIPRAVA PREPARATA

Meritve smo izvedli na samcih *P. apterus*, saj so pri predhodnih meritvah ugotovili, da so njihovi signali bolj stabilni in imajo manj šuma kot pri samicah. Izolirali smo zadek živali ter pred preparacijo žival s pomočjo čebeljega voska pritrdili s hrbtno stranjo na bakren trak. Odstranili smo glavo in trup ter tako preprečili vpliv iz centralnega živčevja in večino mišic. Rano smo prekrili s silikonskim kitom (Kwik-Sil, WPI, Sarasota, USA). Bakreni trak s preparatom smo prenesli na termostatisan nosilec.

3.3 ELEKTROFIZIOLOŠKE MERITVE

Vse poskuse smo izvedli od sredine februarja do sredine aprila. Merili smo v Faradeyevi kletki, ki je preprečevala vpliv elektromagnetni motenj iz okolice, hkrati pa je pena na notranji strani kletke zmanjšala vpliv zunanjih zračnih tokov na aktivnost senzil.

Signal smo merili na 5. členu zadka. Za zajemanje signala smo uporabili zunajcelični volframovi mikroelektrodi. Referenčna elektroda je bila narejena iz žice s premerom 250 μm , merilna pa iz 150 μm (Goodfellow, Cambridge, UK). Elektrode smo pripravili z elektrolitskim jedkanjem v nasičeni raztopini NaNO_3 . Referenčno elektrodo smo zabodli v zadnji člen zadka vzdolž telesne osi, merilno elektrodo pa v peti člen zadka.

Signal, ki smo ga zajeli z elektrodami, smo najprej speljali skozi predojačevalnik AI402 (Molecular Devices, USA). Končno stopnjo ojačanja in filtracije smo dosegli s pomočjo ojačevalnika CyberAmp 320 signal conditioner (Molecular Devices, USA). Signal smo nato pretvorili v digitalen zapis z laboratorijskim vmesnikom Power1401 interface (CED, Cambridge, UK). Na računalniku smo za zapis ter delno analizo signala uporabljali program Spike2 v.6.02 (CED, Cambridge, UK).

3.4 URAVNAVANJE TEMPERATURE PREPARATA

Vse meritve smo izvedli pri kontrolirani temperaturi preparata (± 0.2 °C). To smo zagotovili s pomočjo nosilca za preparat, ki je imel med zgornji in spodnji blok vstavljen Peltier-jev element (RO3.3-3.9, Conrad, Nemčija). Z jakostjo toka skozi Peltier-jev element smo regulirali temperaturo nosilca ter s tem posredno temperaturo preparata. Jakost smo med poskusom nastavljali ročno in po potrebi. Temperaturo zgornjega bloka smo merili s termočlenom (tip K, HH501DK, Omega, ZDA).

Meritve spontane aktivnosti smo izvedli pri treh različnih temperaturah: 10, 20 in 30 °C. Celoten postopek smo naredili v enakem zaporedju pri vseh preparatih.

Meritve odziva senzil smo naredili pri 25 °C, kar predstavlja kompromisno temperaturo. To je temperatura, ki jo živali dosežejo v zimskem obdobju, ko se začnejo aktivno pomikati na debela dreves ob sončnih dneh. Pri tej temperaturi lahko glede na meritve

spontane aktivnosti pričakujemo večji vpliv hladne aklimatizacije na odziv senzil, hkrati pa je pregrevanje preparata zaradi daljših dražilnih protokolov manjše kot pri višjih temperaturah.

3.5 DRAŽENJE SENZIL

Senzile smo odklanjali s piezo-keramičnim aktuatorjem (Multilayer »Bimorph« Actuator PL112.10 (Physik Instruments PI, Karlsruhe Nemčija), na katerega smo pritrdili kovinsko iglo. To smo s pomočjo mikromanipulatorja naslonili na os laska vzdolž njegove osi. S pomočjo algoritma, napisanega v programu Spike2 v.6.02 (CED, Cambridge, UK), smo lasek avtomatsko nastavili na začetni položaj ter dražili s poljubnim trapezastim dražljajem. Napetost potrebno za odklon aktuatorja smo generirali z laboratorijskim vmesnikom 1401 Power interface (CED, Cambridge, UK).

Za draženje smo uporabili odklon laska s trapezastim potekom, ki je imel definirano trajanje dinamične in statične faze ter kot odklona. Odklon v kavdalni smeri smo definirali kot odklon v pozitivni smeri, odklon v kranialni smeri pa kot odklon v negativni smeri. Uporabili smo tri protokole draženja, s katerimi smo določili:

(a) odzivno krivuljo. Lasek smo v kranialni smeri odklanjali od največjega kota odklona do najmanjšega, v kavdalno pa od najmanjšega do največjega. Največji kot odklona je bil $\pm 9,25^\circ$, najmanjši pa $\pm 0,01^\circ$. Trajanje dinamične faze je bilo 0,1 s ter statične 3 s.

(b) vpliv čutilne adaptacije na odzivno krivuljo odziva. Najprej smo lasek odklonili za izbran konstanten odklon. V tem položaju smo ga zadržali 10 s, da se je stanje stabiliziralo in je potekla čutilna adaptacija. Nato smo ga iz te pozicije dodatno odklanjali v kranialno smer od največjega do najmanjšega odklona ter v kavdalno smer od najmanjšega do največjega odklona. Največji odklon (konstanten in nadaljni odklon skupaj) je bil $\pm 9,25^\circ$, najmanjši (konstanten in nadaljni odklon skupaj) pa $\pm 0,01^\circ$. Trajanje dinamične faze je bilo 0,1 s ter statične 3 s. Pri senzili tipa T_1 smo za konstanten odklon vzeli kota 2 in -2° , pri senzili tipa T_2 pa -2° .

(c) hitrost vzpostavitve mirovnega stanja senzile po draženju. Uporabili smo parne dražljaje s trajanjem dinamične faze 0,2 s ter statične 5 s. Senzile smo odklanjali vedno za enak kot. Senzilo tipa T_1 smo odklanjali za kot -4° , senzilo tipa T_2 pa za kot 4° . Čas med proženjem prvega in drugega dražljaja smo povečevali devetkrat. Začeli smo s časom 0 s ter povečevali vse do 12 s. Med posameznimi pari dražljajev je poteklo 20 s. Ta protokol smo pri vsakem merjenju ponovili dvakrat.

3.6 ANALIZA PODATKOV IN STATISTIČNE METODE

Za končno analizo podatkov ter za statistično analizo smo uporabili program GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, California, USA). Statistično signifikantne razlike med podatki smo testirali z Mann Whitney-evim testom. Za grafični prikaz rezultatov smo poleg programa GraphPad Prism 4 uporabili še Matlab r.2007b. (TheMathWorks, Natick,

MA, USA). Na diagramih smo centralno tendenco podatkov prikazali z aritmetično sredino ali pa z mediano, variabilnost pa s standardno deviacijo (SD) oziroma interkvartilnim razmikom. Natančnost vzorčne ocene aritmetične sredine smo prikazali s standardno napako (SN).

4 REZULTATI

4.1 SPONTANA AKTIVNOST

Filiformne senzile stenice *Pyrrhocoris apterus* so spontano aktivne. V zimskih dneh se frekvenca njihove spontane aktivnosti zniža, a se s pojavom spomladanskih temperatur ponovno zviša. V zimskem času dinamika sprememb spontane aktivnosti po prenosu živali iz zunanjega okolja v laboratorij poteka drugače pri senzili T_1 kot pri T_2 . S ponovitvijo meritev, ki jih je izvedel že Lipičnik (Lipičnik, 2009), a z uporabo večjega števila osebkov, smo želeli natančneje določiti dinamiko sprememb. Hkrati pa smo želeli preveriti, če gre za značilne spremembe, ki niso odvisne od specifičnih pogojev posamezne zime.

Živali, ki smo jih nabrali v naravi, smo vzdrževali zunaj na hladnem. Preden smo jih prenesli v laboratorij, smo izmerili temperaturo zraka v zaboju, kjer smo jih vzdrževali (preglednica 1). Po prenosu živali v laboratorij smo prvo meritev izvedli takoj (dan 0) ter nato prvi, drugi, tretji, četrti, peti, šesti in sedmi dan po prenosu (preglednica 2). Za vsak dan tople aklimacije smo opravili meritve na desetih preparatih (razen dan 2), in sicer pri treh temperaturah preparata (10, 20 in 30 °C).

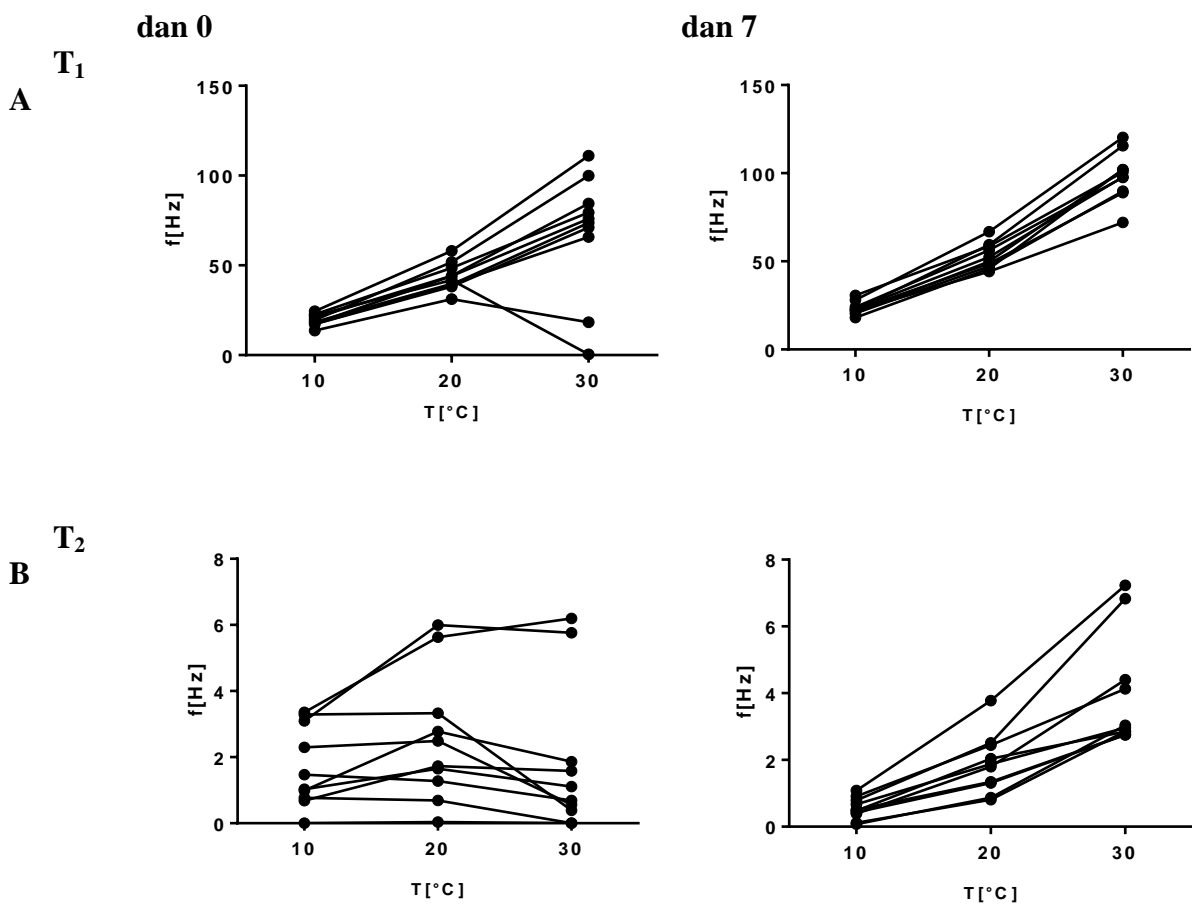
Preglednica 1: Temperatura zraka v zunanjem zaboju tik pred prenosom živali v laboratorij. Temperaturo smo izmerili okrog 10:00 zjutraj.

dan prenosa	20.2	21.2	22.2	23.2	24.2	27.2	28.2
temperatura [°C]	0.7	0.9	1.0	0.7	0.9	1.2	1.7

Preglednica 2: Število preparatov in datum meritev za določen dan aklimacije. Meritve za določen dan aklimacije smo opravili na desetih preparatih, razen drugi dan smo meritve opravili na devetih preparatih. V kolikor za posamezen dan aklimacije nismo mogli opraviti vseh meritev v enem dnevu, smo meritve izvedli v dveh ali treh dneh.

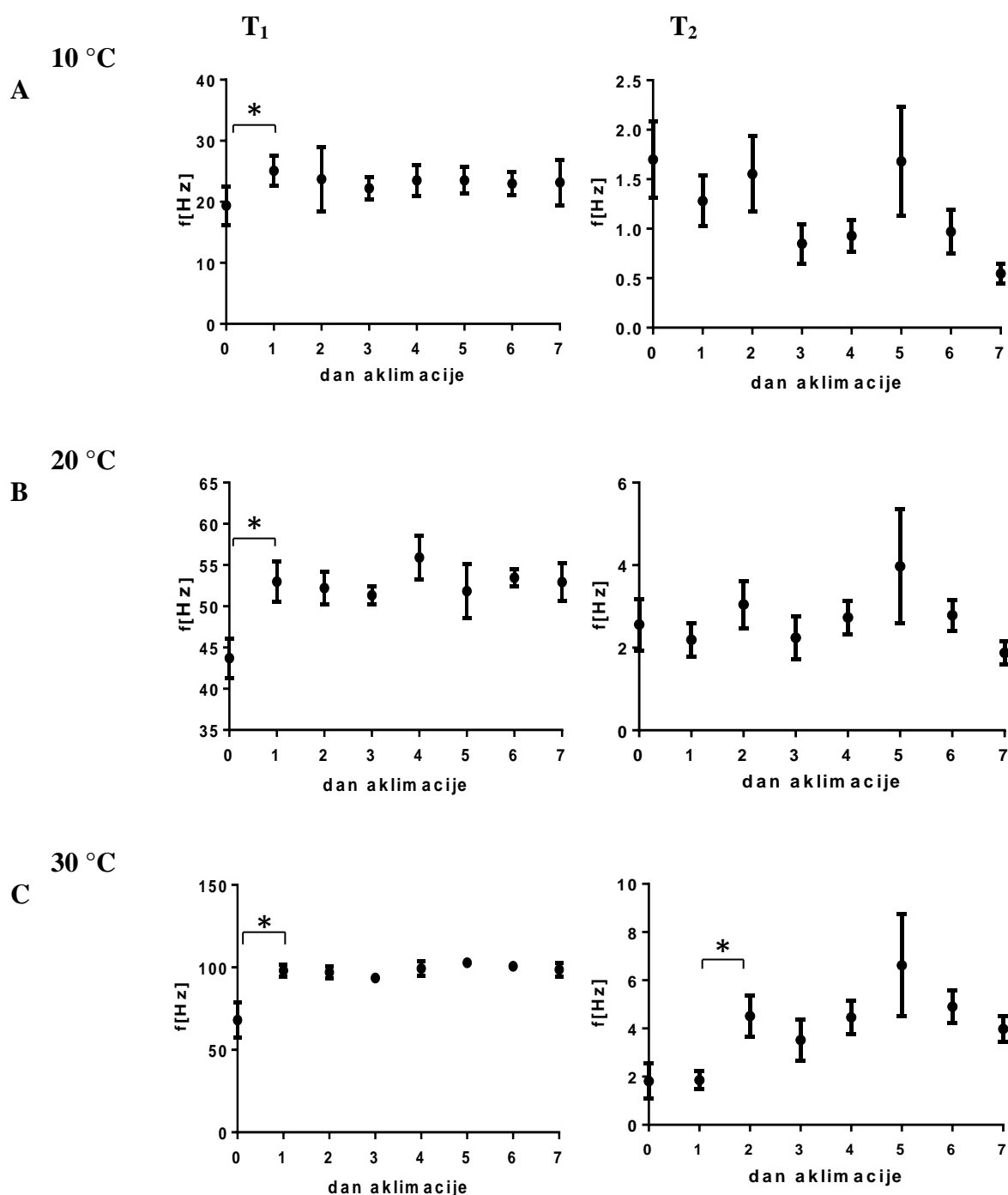
<i>dan aklimacije</i>	<i>datum meritev</i>	<i>število preparatov</i>
0	20.2.2012	10
1	21.2.2012	2
	22.2.2012	4
	23.2.2012	4
2	22.2.2012	2
	24.2.2012	7
3	27.2.2012	10
4	27.2.2012	4
	28.2.2012	6
5	27.2.2012	3
	28.2.2012	7
6	1.3.2012	10
7	5.3.2012	10

Na sliki 6 je prikazana frekvenca spontane aktivnosti T_1 in T_2 pri treh različnih temperaturah preparata takoj po prenosu živali iz zunanjega okolja v laboratorij (dan 0) in po sedmih dneh tople aklimacije. Pri senzili T_1 smo opazili, da se tako pri hladno aklimiranih osebkih (dan 0) kot pri toplo aklimiranih osebkih (dan 7) z višanjem temperature povečuje frekvenca spontane aktivnosti v celotnem območju med 10 in 30 °C. Pri senzili T_2 smo pred začetkom tople aklimacije opazili padec frekvence spontane aktivnosti pri temperaturi višji od 20 °C, vendar se je zadnji dan aklimacije tudi pri senzili T_2 frekvenca povečevala z naraščanjem temperature v celotnem območju.



Slika 6: Temperaturna odvisnost frekvence spontane aktivnosti pred začetkom tople aklimacije (dan 0) in zadnji dan aklimacije (dan 7) pri senzilih T_1 (A) in T_2 (B). Krivulje predstavljajo meritve na posameznem preparatu pri treh različnih temperaturah.

Dinamika sprememb spontane aktivnosti po prenosu živali iz zunanjega okolja v laboratorij se je razlikovala med senzilama T_1 in T_2 (slika 7). Pri senzili T_1 je prišlo do povišanja aktivnosti že prvi dan tople aklimacije, in sicer pri vseh temperaturah preparata (10, 20 in 30 °C). Nivo aktivnosti je nato od drugega do sedmega dne aklimacije stagniral in ni kazal več trenda povečevanja. Pri senzili T_2 je bila dinamika počasnejša. Do povišane aktivnosti je prišlo drugi dan aklimacije, a le pri 30 °C. Tudi pri T_2 je nivo aktivnosti, ki je bil dosežen drugi dan aklimacije, stagniral do sedmega dne.



Slika 7: Spontana aktivnost senzil tipa T₁ in T₂ med aklimacijo na laboratorijsko okolje. Frekvenco spontane aktivnosti smo izmerili pri treh temperaturah preparata: 10 °C (A), 20 °C (B) in 30 °C (C). Dan 0 predstavlja meritve takoj po prenosu osebkov iz zunanjega okolja v laboratorij, še pred potekom aklimacije, dnevi 1-7 pa trajanje tople aklimacije. Vsaka točka v grafu predstavlja povprečje frekvence desetih senzil (\pm SN), razen drugi dan, kjer predstavlja povprečje devetih meritev. Statistično značilne razlike smo testirali sekvenčno med sosednjimi dnevi z Mann Whitney-evim testom. Zvezdica označuje statistično značilno povečanje spontane aktivnosti 1. dan aklimacije pri senzili T₁ in 2. dan aklimacije pri T₂.

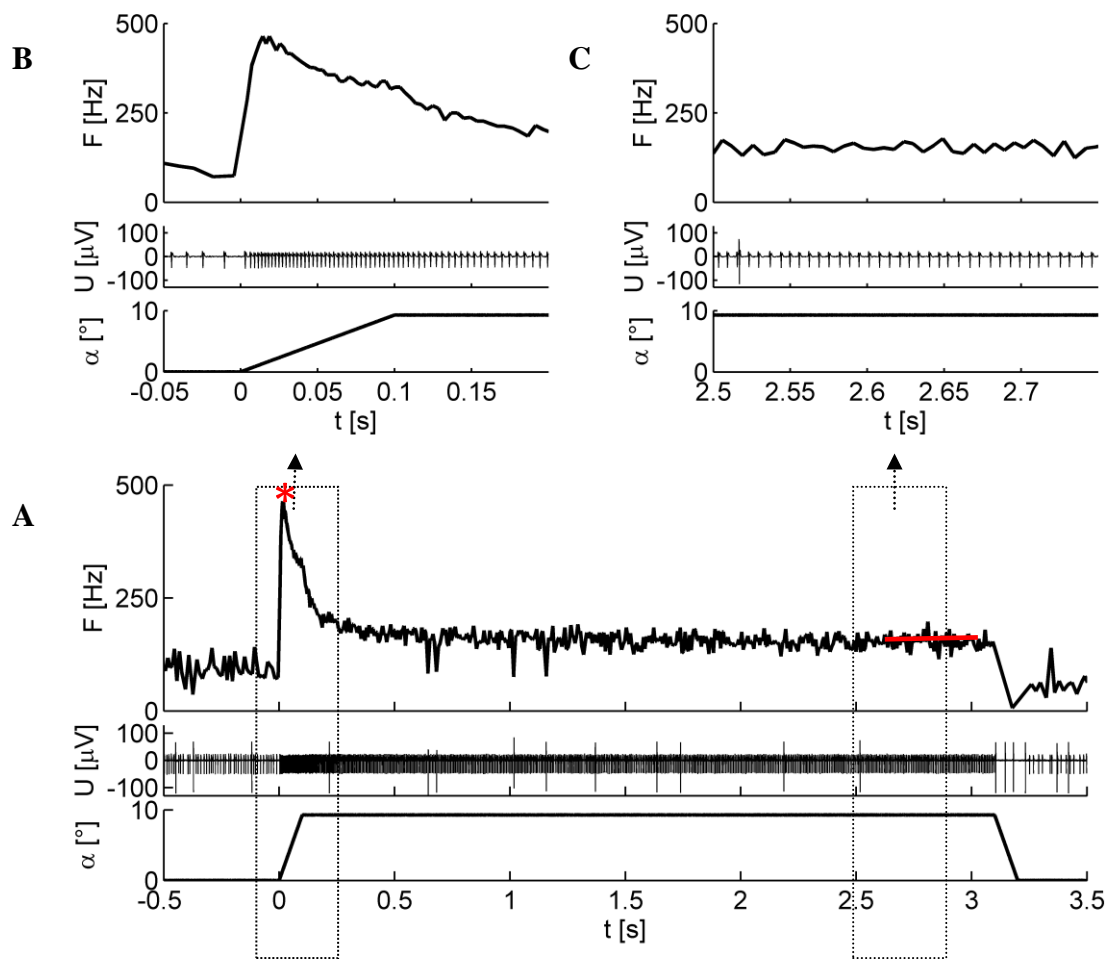
Naše meritve torej potrjujejo rezultate predhodne raziskave (Lipičnik, 2009). Temperaturna aklimacija značilno vpliva na frekvenco spontanega proženja živčnih impulzov pri senzilah T_1 in T_2 . Pri hladno aklimiranih osebkih lahko poleg nižje frekvence impulzov pri obeh tipih senzil opazimo pri senzili T_2 še prelom v temperaturni odvisnosti frekvence. Pri segrevanju preparata od 10 do 20 °C namreč le-ta narašča, nato pa začne pri temperaturi večji od 20 °C upadati. Prelom pri toplo aklimiranih osebkih ni prisoten, saj frekvenca narašča v celotnem območju med 10 in 30 °C. Če živali prenesemo v laboratorij, efekti hladne aklimacije izginejo. Pri senzili T_1 pride do spremembe že prvi dan po prenosu, pri senzili T_2 pa drugi dan.

4.1 VPLIV TEMPERATURNE AKLIMATIZACIJE NA ODZIV SENZILE

Stenice *P. apterus* so kljub nizkim temperaturam aktivne tudi v sončnih zimskih dneh. Iz stelje pogosto zlezejo na debela dreves, kjer se ogrejejo na več kot 30 °C. Pri tem morajo zaznati zunanje dražljaje, zato se zastavlja vprašanje, ali se čutila odzivajo na dražljaje enako pri hladno in toplo aklimiranih živalih. Da bi preverili delovanje filiformnih senzil v zimskem obdobju in vpliv aklimacije na lastnosti njihovega odziva, smo pri hladno in toplo aklimiranih živalih primerjali odziv senzil T_1 in T_2 na standarden trapezast dražljaj. Določili smo 1) odzivno krivuljo fazičnega in toničnega dela odziva, 2) vpliv čutilne adaptacije na premik odzivne krivulje fazičnega dela odziva ter 3) hitrost vzpostavitve izhodnega stanja po draženju. Vse meritve smo izvedli pri 25 °C. Uporabili smo pet hladno in pet toplo aklimiranih osebkov.

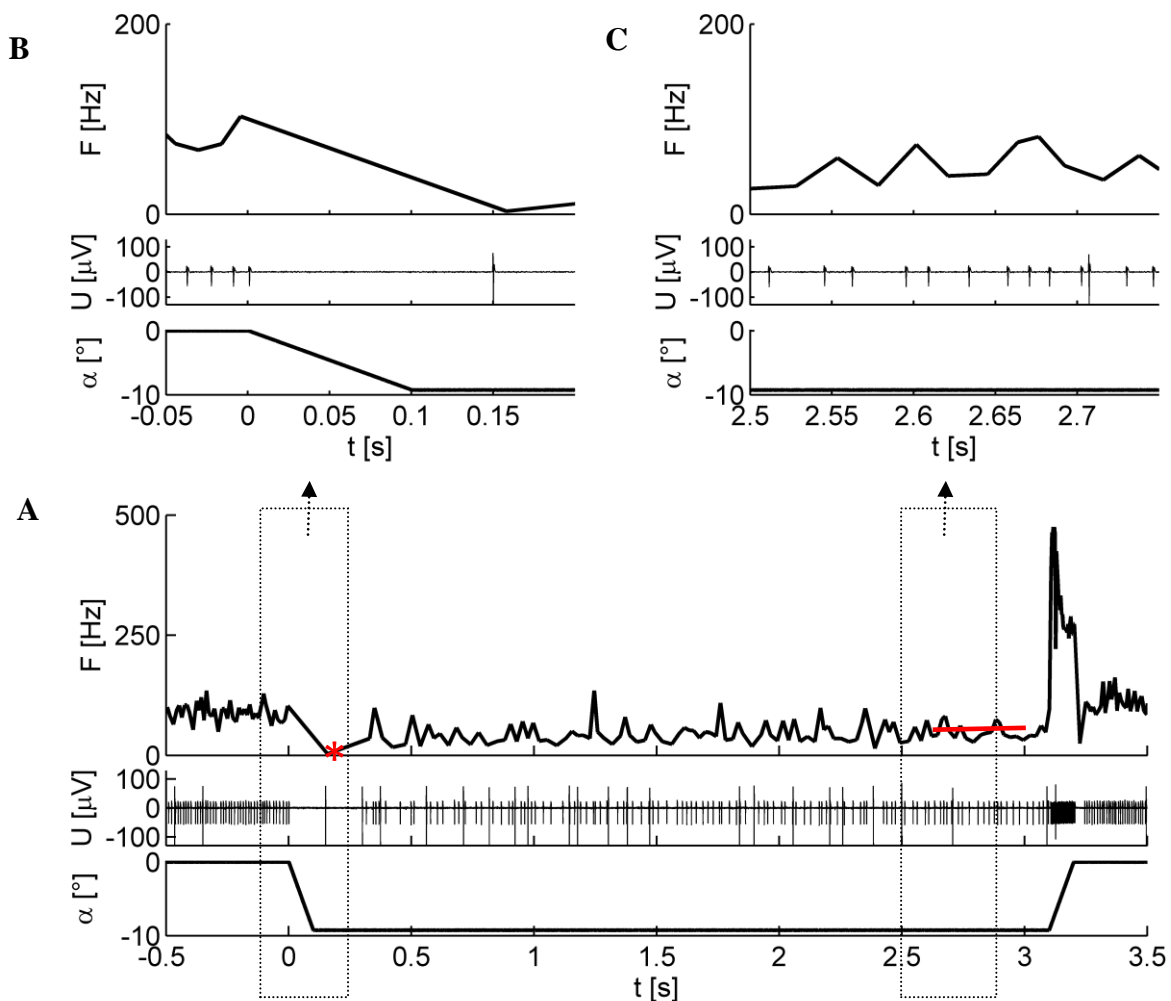
4.1.1 Odziv senzile na standarden trapezast dražljaj

Na sliki 8 je prikazan ekscitacijski odziv senzile T_1 na trapezast dražljaj, ki je imel 100 ms trajajočo dinamično in 3 s trajajočo statično fazo. V zgornjem levem kotu vidimo odziv na dinamično fazo dražljaja. V začetku odklanjanja se je senzila odzvala s strmim povečanjem frekvence impulzov (fazičen del odziva). Najvišjo frekvenco smo imenovali vrh fazičnega dela odziva (slika 8A, označen z zvezdico). V statični fazi se je lasek ustavil, frekvenca impulzov pa je zaradi čutilne adaptacije upadla. Odziv je pri tem prešel iz fazičnega v toničnega (C, desno zgoraj). Frekvenca impulzov se je ustalila na nivoju, ki je bil sorazmeren s kotom odklona.



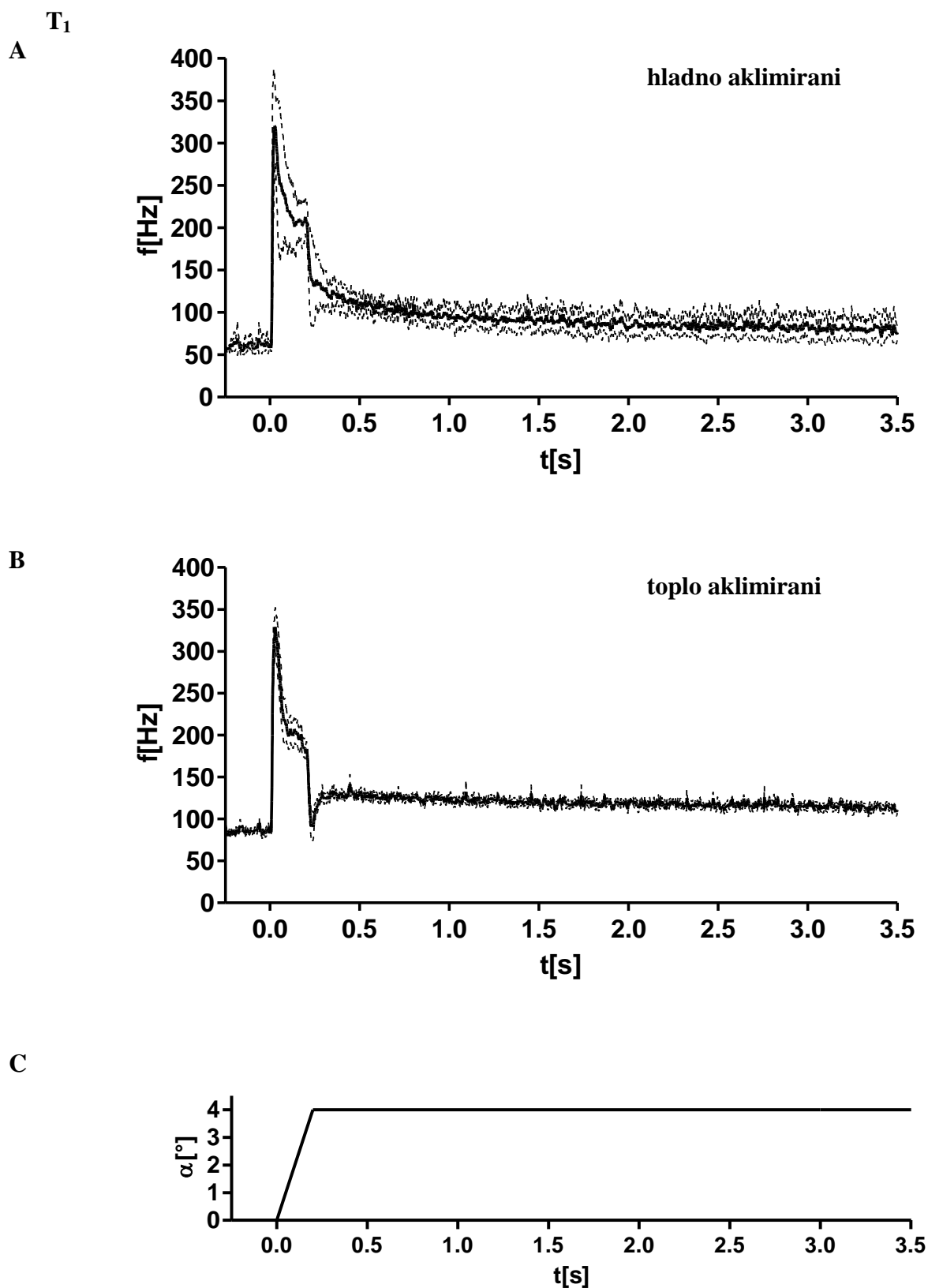
Slika 8: Ekscitacijski odziv senzile T_1 na trapezast dražljaj. A - Celoten odziv senzile T_1 na trapezast dražljaj. Na spodnji osi je prikazan trapezast dražljaj. Sledi zapis signala. Daljši impulzi pripadajo senzili T_2 , krajši in pogostejši pa senzili T_1 . Na najvišji osi je zabeležena povprečna frekvenca živčnih impulzov. Z rdečo zvezdico je označen vrh fazičnega dela odziva, z rdečo črto pa nivo toničnega dela odziva. B – Fazičen del odziva senzile T_1 na dinamičen del dražljaja. C – Toničen del odziva senzile T_1 na statičen del dražljaja.

Odklon laska v nasprotno smer je izzval inhibicijski odziv (slika 9). Najprej je dinamičen del trapezastega dražljaja sprožil fazičen del odziva (levi zgornji kot slike 9). Frekvenca impulzov je padla proti 0 Hz. V statičnem delu je bila frekvenca impulzov še vedno pod frekvenco spontane aktivnosti, vendar je nekoliko narastla in se ustalila na nivoju, sorazmernim s kotom odklona (desni zgornji kot slike 9).

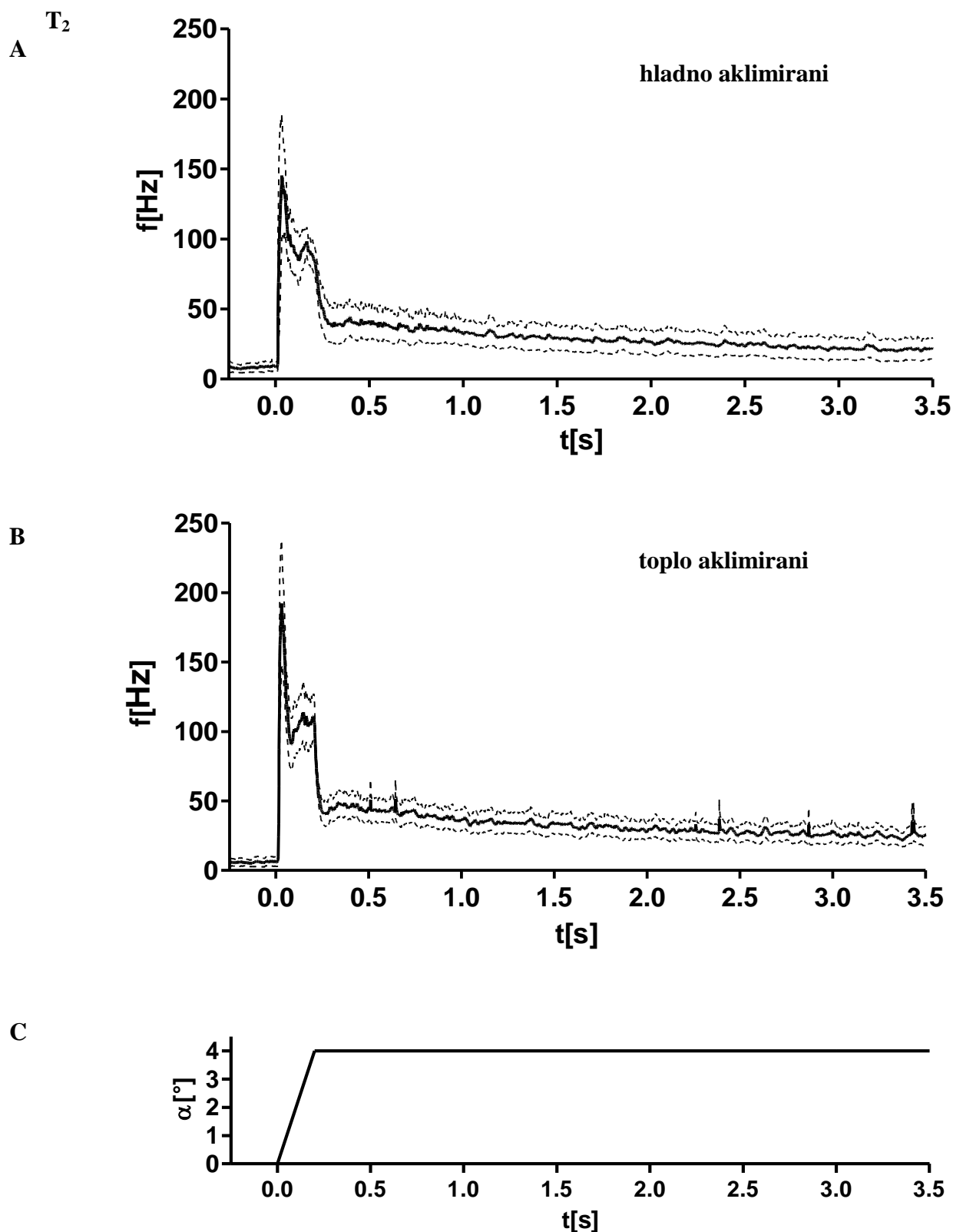


Slika 9: Inhibičijski odziv senzile T_1 na trapezast dražljaj. A - Celoten odziv senzile T_1 na trapezast dražljaj. Na spodnji osi je prikazan trapezast dražljaj. Sledi zapis signala. Večji impulzi pripadajo senzili T_2 , manjši pa senzili T_1 . Na najvišji osi je zabeležena povprečna frekvenca živčnih impulzov. Z rdečo zvezdico je označen nivo fazičnega dela odziva, z rdečo črto pa toničnega dela odziva. B – Fazičen del odziva senzile T_1 na dinamičen del dražljaja. C – Toničen del odziva senzile T_1 na statičen del dražljaja.

Pri hladno in toplo aklimiranih živalih smo določili povprečen odziv senzil T_1 (le na odklon laska v ekscitacijsko smer) ter T_2 na trapezast dražljaj z 200 ms dinamično in 5 s statično fazo. Vrh fazičnega dela odziva senzile T_1 je imel pri hladno in toplo aklimiranih živali približno enako vrednost frekvence impulzov, je pa bila variabilnost med posameznimi odzivi bistveno večja pri hladno aklimiranih živalih (slika 10). Vrh fazičnega dela odziva T_2 je bil pri hladno aklimiranih živalih nekoliko nižji kot pri toplo aklimiranih, vendar pa je bila variabilnost v odzivu tako pri hladno kot toplo aklimiranih živalih velika. Pri obeh senzilah je bila v toničnem delu odziva frekvenca impulzov pri hladno aklimiranih preparatih nižja kot pri toplo aklimiranih, torej je bil vpliv temperaturne aklimacije jasen. Prehod iz fazičnega odziva v toničen je bil bolj strm pri toplo aklimiranih kot pri hladno aklimiranih živalih, kar pomeni večjo hitrost čutilne adaptacije pri toplo aklimiranih živalih.



Slika 10: Povprečen odziv senzile T_1 na odklon laska v ekscitacijsko smer pri hladno (A) in toplo aklimiranih (B) živalih. C – Trapezast odklon z dinamičnim (trajanje 0,2s) in statičnim (trajanje 3,5s) delom. Povprečen odziv je pridobljen iz petih posameznih odzivov (\pm SD).



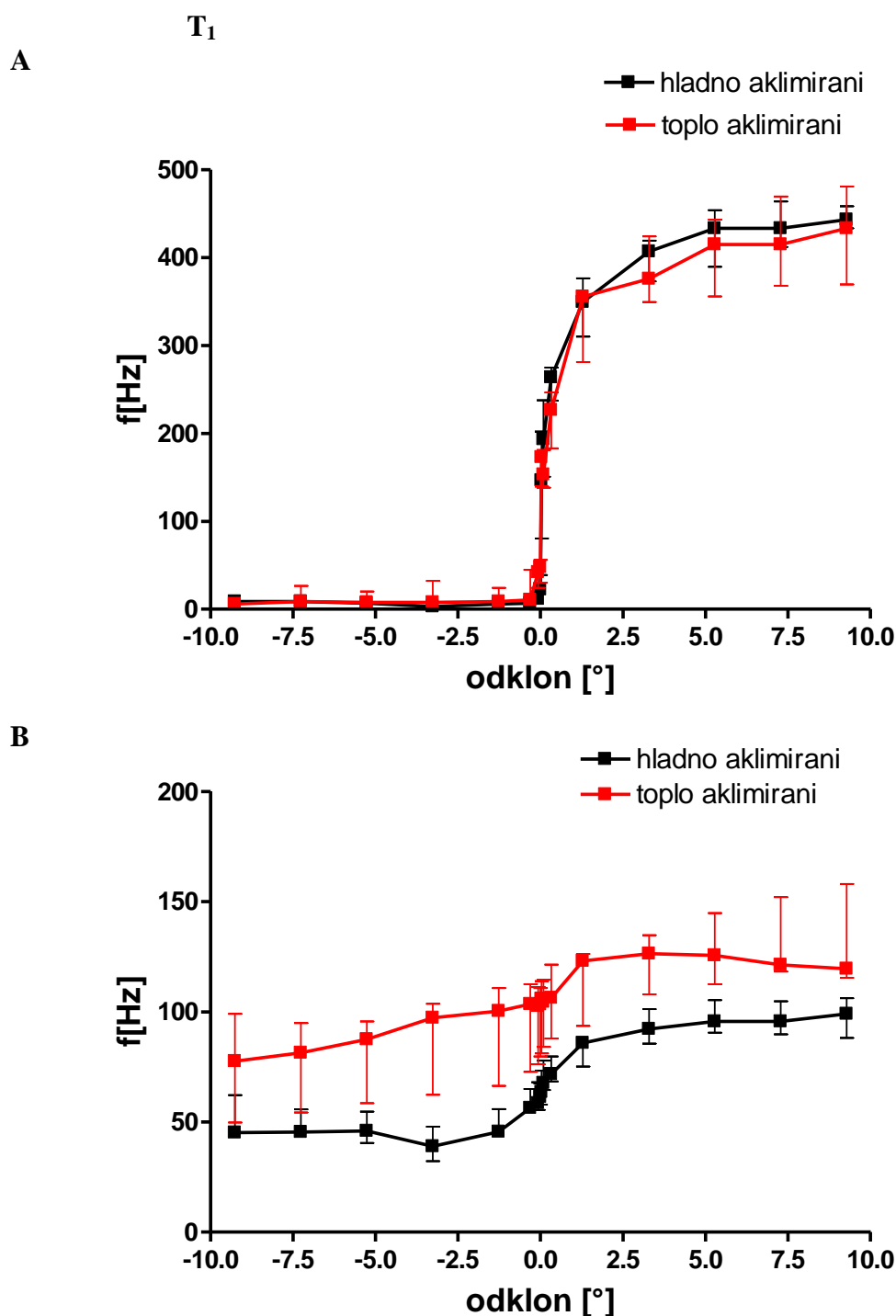
Slika 11: Povprečen odziv senzile T_2 na odklon laska v ekscitacijsko smer pri hladno (A) in toplo aklimiranih (B) živalih. C – Trapezast odklon z dinamičnim (trajanje 0,2s) in statičnim (trajanje 3,5s) delom. Povprečen odziv je pridobljen iz petih posameznih odzivov (\pm SD).

4.1.2 Vpliv temperaturne aklimacije na odzivno krivuljo fazičnega in toničnega dela odziva

Odzivna krivulja prikazuje odnos med kotom odklona laska in frekvenco živčnih impulzov. V primeru fazičnega dela odziva smo izmerili maksimalno frekvenco impulzov pri odklonu laska v ekscitatorno smer (slika 8, rdeča zvezdica), oziroma minimalno frekvenco pri odklonu v inhibitorno smer. V primeru toničnega dela odziva pa smo izmerili povprečno frekvenco v zadnji sekundi statične faze dražljaja (slika 8, rdeča črtica). Odzivna krivulja nam je omogočila primerjavo dinamičnega območja senzile in stopnjo ojačenja signala med hladno in toplo aklimiranimi živalmi. Dinamično območje senzile predstavlja razpon intenzitet dražljaja, pri katerih senzila še zazna spremembe dražljaja. Stopnja ojačenja pa pove, za koliko se bo odziv spremenil, če dražljaj spremenimo za nek faktor. Odzivna krivulja fazičnega dela odziva nam da vpogled v odziv na dražljaje, ki so hitrejši od adaptacije, odzivna krivulja toničnega dela pa v odziv na dražljaje, ki so počasnejši od adaptacije.

Senzilo T_1 (slika 12) in T_2 (slika 13) smo odklanjali sedemkrat v kavdalno in sedemkrat v kranialno smer. Začeli smo z odklonom (dinamična faza 0,1 s ter statična 3 s) v kranialno smer od največjega kota $-9,25^\circ$ do najmanjšega kota $-0,01^\circ$ ter nadaljevali z odklonom enake oblike v kavdalno smer od najmanjšega kota $0,01^\circ$ do največjega kota $9,25^\circ$. Pri senzili T_1 smo v kranialni smeri izzvali inhibicijo, zato so bili odzivi nižji od spontane aktivnosti. V kavdalno smer pa smo izzvali ekscitacijo, zato so bili odzivi višji od spontane aktivnosti in so se z večjim kotom odklona višali. Pri senzili T_2 smo v obe smeri izzvali ekscitacijo.

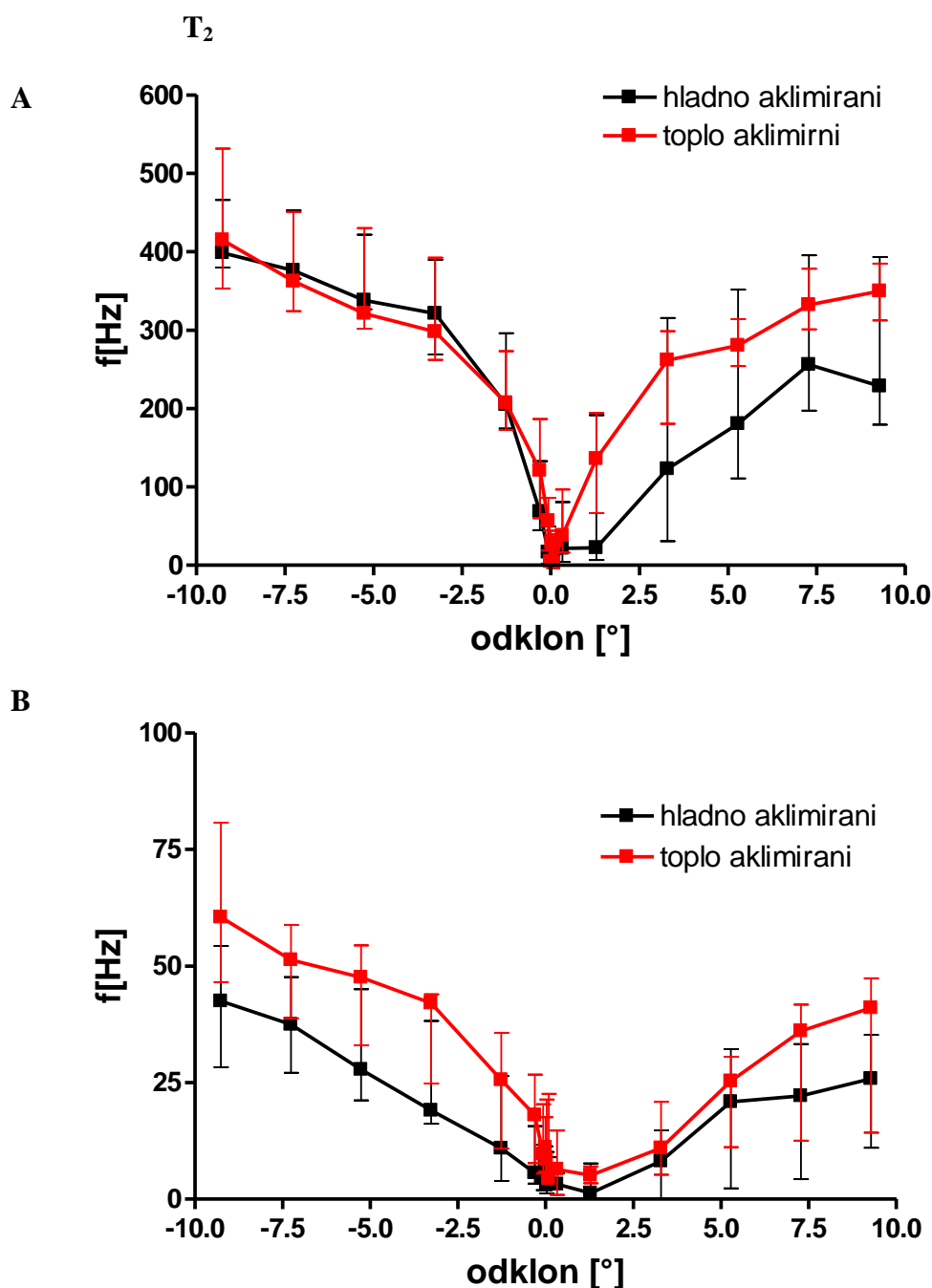
Temperaturna aklimacija je drugače vplivala na fazičen kot na toničen del odziva tako pri senzili T_1 kot tudi T_2 . V fazičnem delu odziva senzile T_1 sta se odzivni krivulji hladno in toplo aklimiranih živalih prekrivali. Razlike, ki so se pojavile v obeh smereh odklona, so bile zelo majhne. V toničnem delu odziva je bila frekvenca toplo aklimiranih živali v celoti opazno višja od frekvence hladno aklimiranih, a je bila oblika obeh krivulj zelo podobna. Temperaturna aklimacija torej ni imela bistvenega vpliva na dinamično območje in stopnjo ojačenja niti fazičnega niti toničnega dela odziva.



Slika 12: Odzivne krivulje senzile T_1 pri hladno in toplo aklimiranih osebkih. A – Primerjava fazičnega dela odziva senzile T_1 pri hladno in toplo aklimiranih osebkih. B – Primerjava toničnega dela odziva senzile T_1 pri hladno in toplo aklimiranih osebkih. Točke predstavljajo mediane vrednosti petih meritev (\pm interkvartili).

Senzila T_2 ni smerno občutljiva, zato se v obe smeri odklona odzove z ekscitacijo. Kljub temu smo tudi pri tej senzili opazili asimetrijo. Fazičen del odziva je bil pri odklanjanju v kranialno smer odklona večji, krivulji toplo in hladno aklimiranih osebkov pa sta se skoraj povsem prekrivali. V kavdalno smer je bil odziv manjši, krivulji med hladno in toplo aklimiranimi osebkoma pa sta se bistveno razlikovali. V toničnem delu odziva je pri enakih

odklonih krivulja hladno aklimiranih dosegla nižje vrednosti frekvence kot krivulja tople aklimiranih osebkov. Dinamično območje in stopnja ojačenja sta ostajala enaka pri hladno in tople aklimiranih osebkih, vendar so se razlike pojavile med fazičnim in toničnim delom odziva.

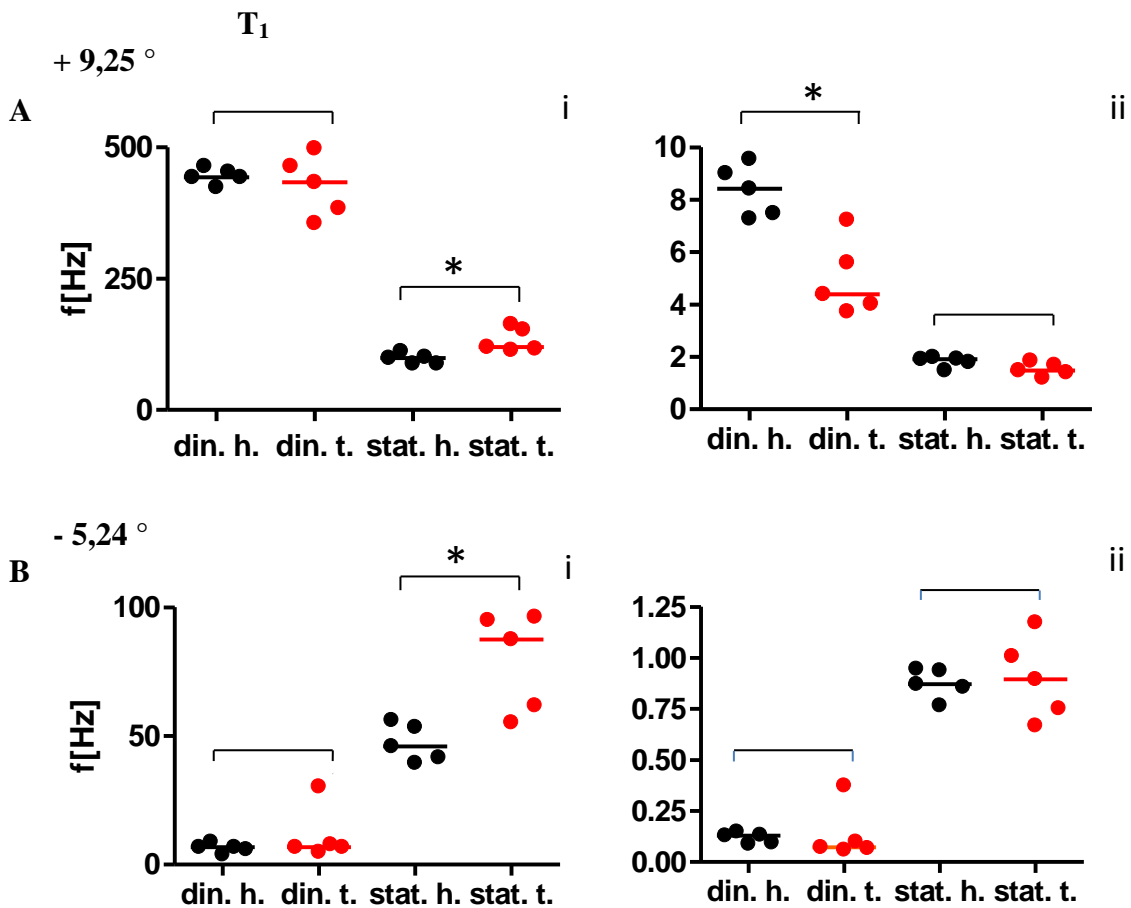


Slika 13: Odzivne krivulje senzile T_2 pri hladno in tople aklimiranih osebkih. A – Primerjava fazičnega dela odziva senzile T_2 pri hladno in tople aklimiranih osebkih. B – Primerjava toničnega dela odziva senzile T_2 pri hladno in tople aklimiranih osebkih. Točke predstavljajo mediane vrednosti petih meritev (\pm interkvartili).

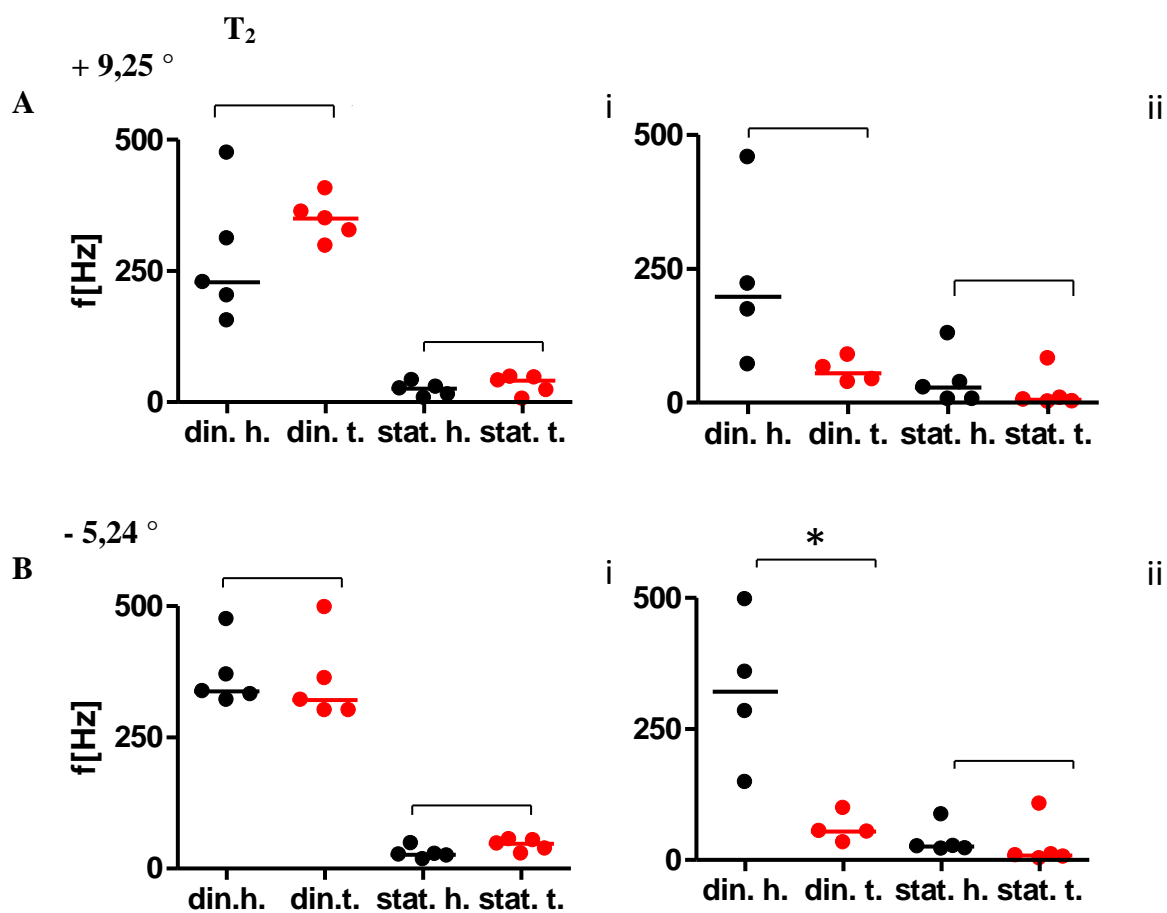
Primerjali smo absolutne in relativne vrednosti frekvence impulzov v izbranih odklonih (sliki 14 in 15). Za absolutne vrednosti smo uporabili podatke iz odzivnih krivulj fazičnega

in toničnega dela odziva (sliki 12 in 13). Relativne vrednosti smo pridobili tako, da smo absolutne vrednosti frekvence posamezne senzile delili z njeno frekvenco spontane aktivnosti pri 25°C. Na ta način smo želeli ugotoviti ali je faktor spremembe fazičnega in toničnega dela odziva enak kot pri spontani aktivnosti.

Absolutne vrednosti frekvence impulzov so bile v fazičnem delu odziva podobne. Če smo frekvenco delili s frekvenco spontane aktivnosti, pa so postale razlike očitne, kar je posledica različnih nivojev spontane aktivnosti pri hladno in toplo aklimiranih živalih. Nasprotno, so se zaradi vpliva temperaturne aklimacije absolutne vrednosti toničnega odziva med seboj razlikovale. Po normalizaciji s spontano aktivnostjo pa so postale enake, kar pomeni, da se je tonični odziv zaradi aklimacije spremenil za enak faktor kot spontana aktivnost.



Slika 14: Primerjava absolutnih (i) ter relativnih vrednosti (ii) med hladno in toplo aklimiranimi osebkami pri odklonu senzile T_1 za kot $+9,25^\circ$ (A) in $-5,24^\circ$ (B). Točke predstavljajo vrednosti posameznih osebkov, črte pa mediane vrednosti. S črno barvo so označeni zimsko aklimirani osebki, z rdečo pa toplo aklimirani. Relativne vrednosti smo dobili tako, da smo absolutne vrednosti delili s frekvenco spontane aktivnosti pri 25 °C. Kratice in oznaka faz. – fazični del odziva; ton. – tonični del odziva; h. – hladno aklimatizirani; t – toplo aklimirani; * - razlika je statistično signifikantna glede na Mann Whitneyev test.



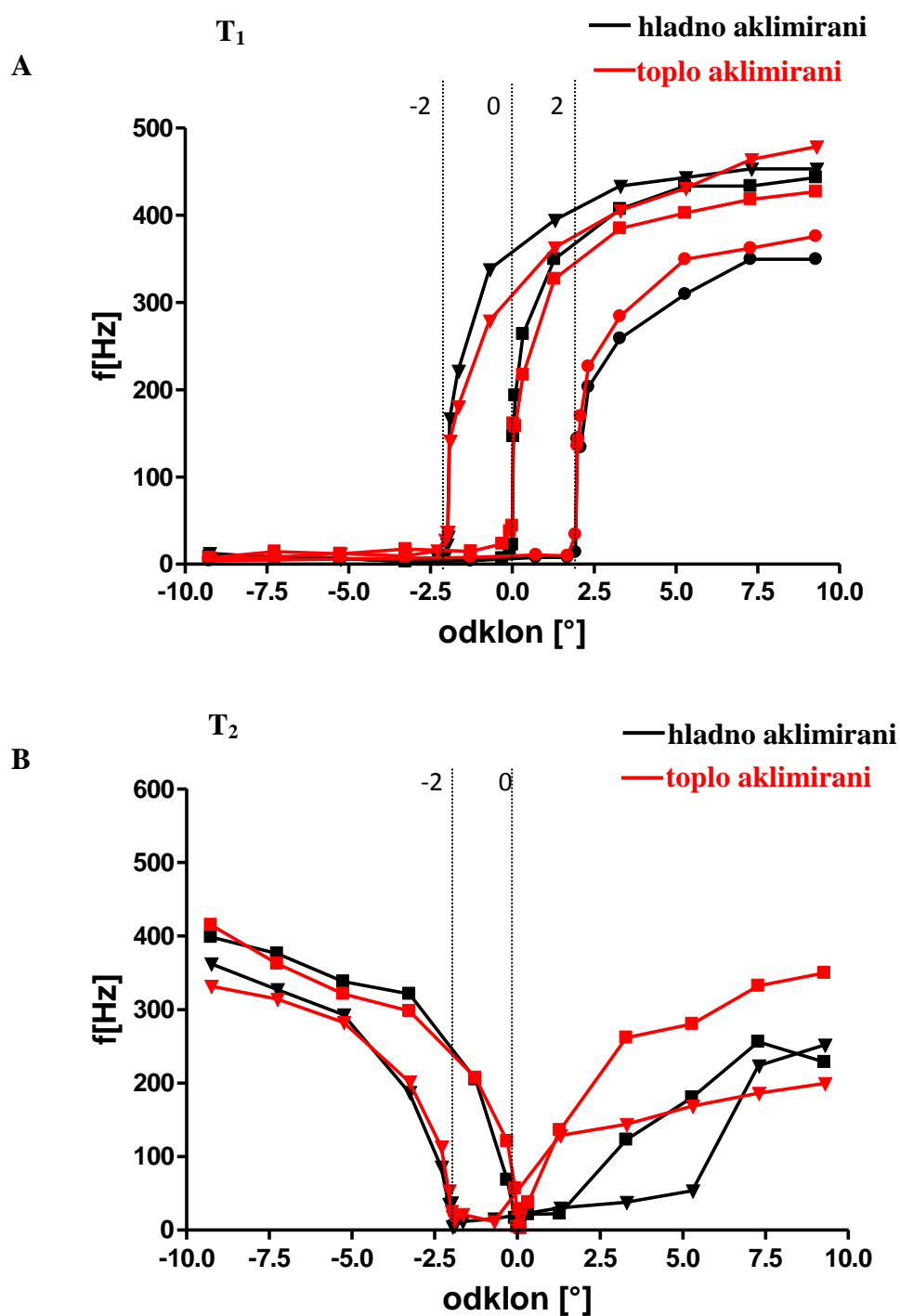
Slika 15: Primerjava absolutnih (i) ter relativnih vrednosti (ii) med hladno in toplo aklimiranimi osebkami pri odklonu senzile T_2 za kot $+9,25^\circ$ (A) in $-5,24^\circ$ (B). Točke predstavljajo vrednosti posameznih osebkov, črte pa mediane vrednosti. S črno barvo so označeni zimsko aklimirani osebki, z rdečo pa toplo aklimirani. Relativne vrednosti smo dobili tako, da smo absolutne vrednosti delili s frekvenco spontane aktivnosti pri 25°C . Kratice in oznaka faz. – fazični del odziva; ton. – tonični del odziva; h. – hladno aklimatizirani; t – toplo aklimirani; * - razlika je statistično signifikantna glede na Mann Whitneyev test.

4.1.3 Vpliv temperaturne aklimacije na adaptacijski premik odzivnih krivulj fazičnega dela odziva

Z določitvijo odzivne krivulje fazičnega dela odziva pri predhodni adaptaciji senzile smo želeli ugotoviti ali temperaturna aklimacija vpliva na fazičen odziv ob prisotnosti konstantnega dražljaja.

Lasek smo najprej odklonili za določen kot, in sicer pri senzili T_1 za 2 ali -2 stopinji, pri senzili T_2 pa za -2 stopinji. Počakali smo 10 s, da se je senzila adaptirala na konstanten dražljaj. Iz te lege smo nato s serijo trapezastih dražljajev z različno amplitudo določili odzivno krivuljo fazičnega dela odziva senzile kot v protokolu poglavja 4.2.2.

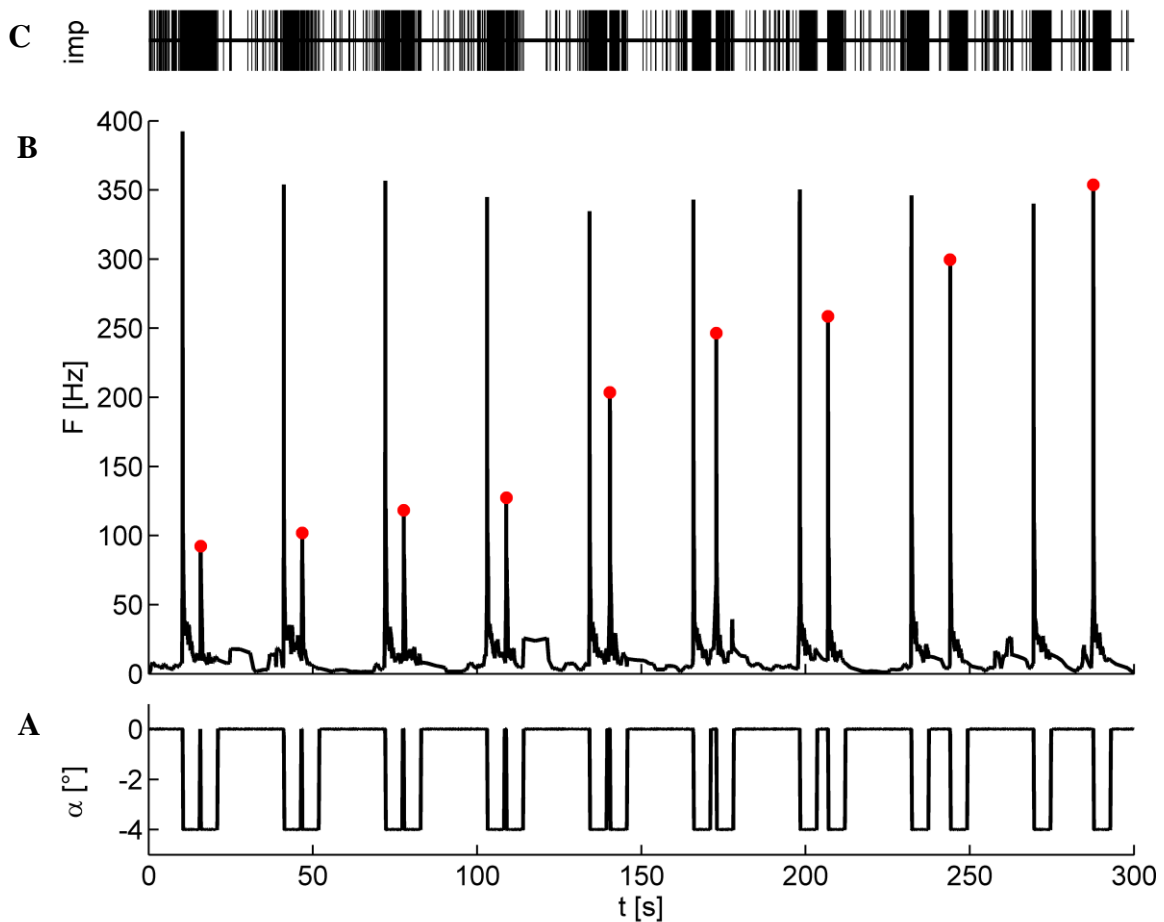
Adaptacija na konstanten dražljaj je povzročila pomik odzivne krivulje vzdolž x-osi (slika 16). V primeru predhodnega odklona laska v ekscitacijsko smer, se je zmanjšala občutljivost senzile na odklon laska v ekscitacijsko smer ter povečala na odklon laska v inhibitorno smer. V kolikor smo lasek najprej odklonili v inhibicijsko smer, je bila situacija obratna. Temperaturna aklimacija ni imela vpliva na premik krivulj po x-osi. Delovno dinamično območje senzile in stopnja ojačenja signala sta bila po premiku pri hladno in toplo aklimiranih živalih podobna. Izstopala je le krivulja senzile T_2 v kavdalno smer, kjer pa so bili odzivi zelo variabilni.



Slika 16: Vpliv temperaturne aklimacije na adaptacijski premik odzivnih krivulj fazičnega dela odziva senzile T₁(A) in T₂ (B). Senzilo T₁ smo najprej odklonili za kot 2 ali -2 stopinji. Po 10 s smo iz nove izhodiščne lege izmerili odzivno krivuljo fazičnega odziva. Če smo senzilo najprej dražili z inhibicijskim odklonom, se je krivulja pomaknila proti dražljajem z nižjo amplitudo, če pa smo jo dražili z ekscitacijskim odklonom, se je premaknila proti dražljajem z višjo amplitudo. Senzilo T₂ smo dražili s konstantnim odklonom -2 stopinji, kar predstavlja ekscitacijski odklon. Posamezna odzivna krivulja predstavlja mediano vrednost petih meritev.

4.1.4 Vpliv temperaturne aklimacije na hitrost vzpostavitve izhodnega stanja po draženju

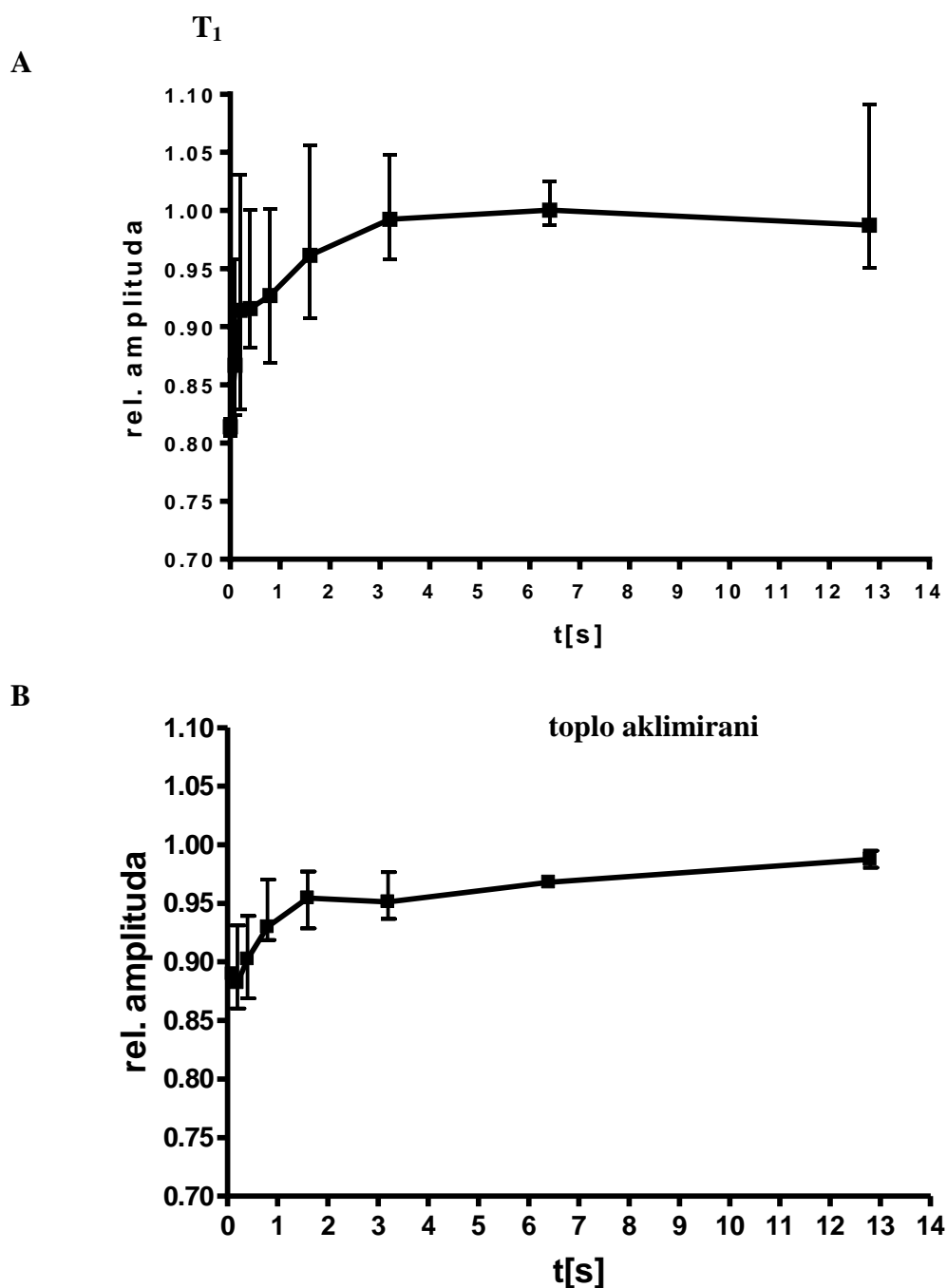
S serijo parnih dražljajev smo ugotavljali hitrost vzpostavitve izhodnega stanja senzile po draženju (slika 17). Parni dražljaji so bili med seboj povsem enaki, razlika je bila le v dolžini časovnega razmika med prvim in drugim dražljajem v paru, ki smo ga devetkrat povečevali. Začeli smo s časom 0s ter podaljševali vse do 12s. Senzile smo odklanjali vedno v ekscitacijsko smer. Pri senzili T_1 smo uporabili odklon 4° , pri senzili T_2 pa -4° . Razmik med parnima dražljajema je trajal 20 s.



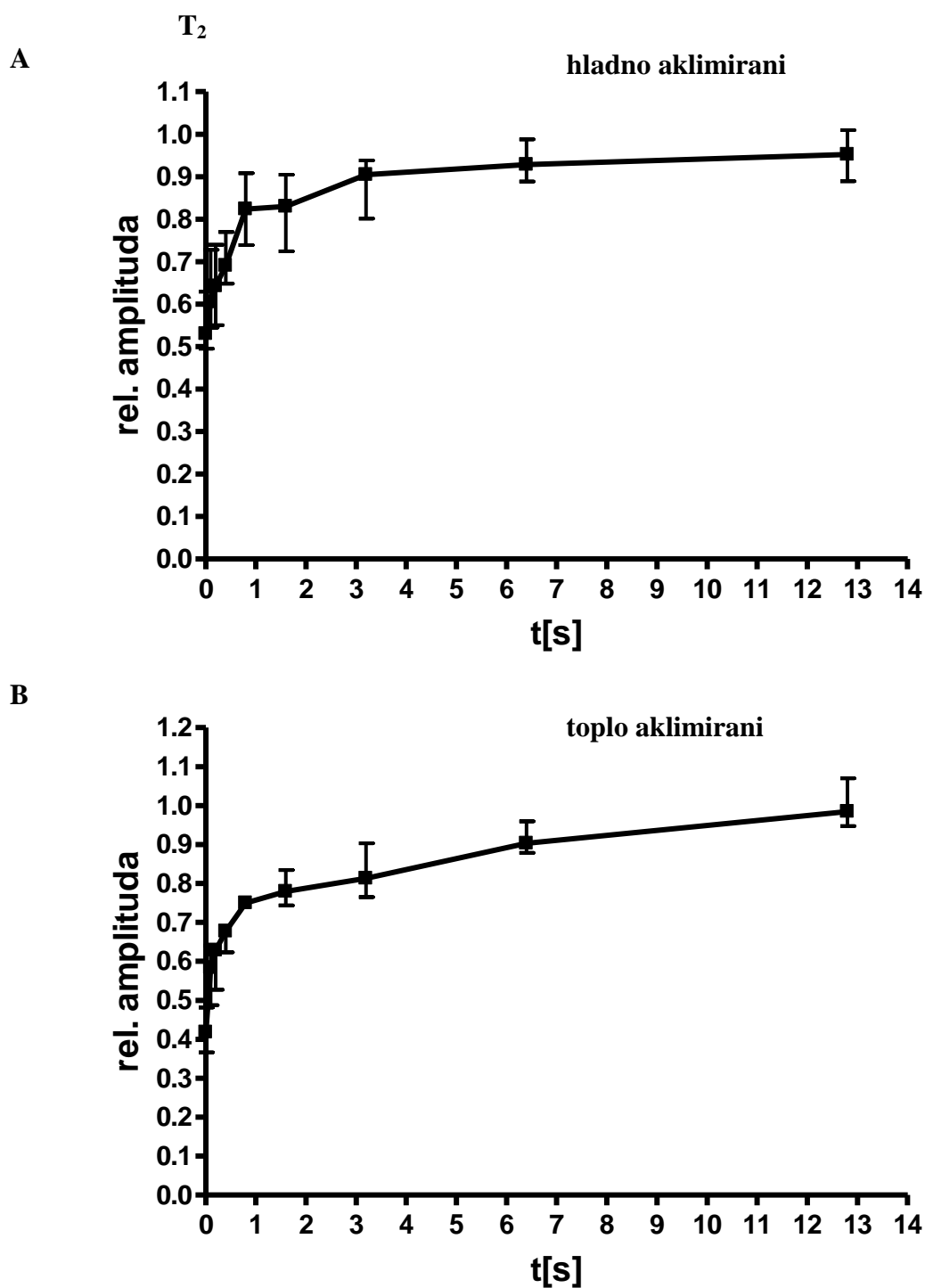
Slika 17: Hitrost vzpostavitve izhodnega stanja po draženju senzile T_2 pri toplo aklimiranem osebkcu. A - Potek parnih dražljajev z vedno večjim časovnim razmikom. B - Povprečna frekvenca impulzov senzile T_2 . C – Impulzi senzile T_2 . Povprečje impulzov smo določili z oknom povprečenja 0.09 s. V prvem parnem dražljaju je odziv na drugi dražljaj v paru precej nižji kot odziv na prvi dražljaj v paru. Rdeče pike predstavljajo odziv na drugi dražljaj v paru, ki se je s povečevanjem razmika med prvim in drugi dražljajem, povečeval

Amplitudo odziva na drugi dražljaj smo normirali glede na prvi dražljaj v paru. Na slikah 18 in 19 je prikazana mediana vrednost relativne amplitude drugega odziva v odvisnosti od časovnega razmika med dražljajema, na sliki 20 pa so vrednosti razmika logaritmirane. Pri

senzili T_1 je vrh fazičnega dela odziva na drugi dražljaj v paru le nekoliko nižji od vrha fazičnega dela odziva na prvi dražljaj, pri senzili T_2 pa je za polovico nižji kot odziv na prvi dražljaj. Prikaz na sliki 21 ki pa sta pri hladno in toplo aklimiranih podobna. Razlike nastanejo med tipi senzil. Logaritemski krivulji senzile T_1 se raztezata v precej ožjem amplitudnem območju kot senzili T_2 . Se pa amplitudna območje senzile T_1 prekriva z amplitudnim območjem senzile T_2 . Iz krivulj lahko razberemo, da sta prisotna vsaj dva mehanizma,

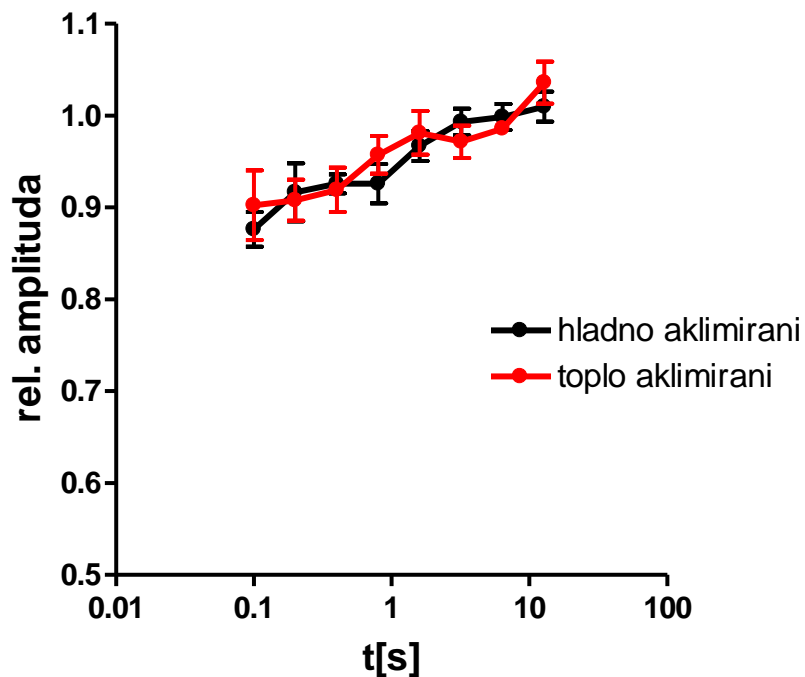


Slika 18: Krivulji vzpostavitve izhodnega stanja po draženju senzile T_1 pri hladno (A) in toplo aklimiranih (B) osebkih. Krivulja je izračunana iz mediane vrednosti štirih (A) oz. petih (B) osebkov (\pm interkvartili).

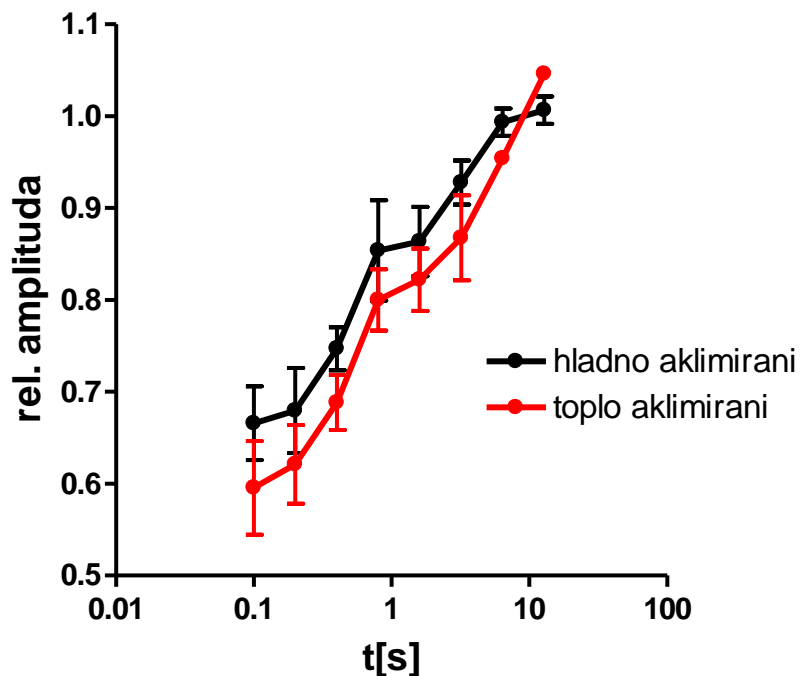


Slika 19: Krivulji vzpostavitve izhodnega stanja po draženju senzile T₂ pri hladno (A) in toplo aklimiranih (B) osebkih. Krivulja je izračunana iz medianih vrednosti petih osebkov (\pm interkvartili).

A



B



Slika 20: Logaritemski prikaz vzpostavitve izhodnega stanja v senzilih T_1 (A) in T_2 (B) po draženju. Vrednosti uporabljene na slikah 19 in 20 smo logaritmirali z logaritmom 10.

Temperaturna aklimacija ne vpliva na fazičen del odziva ter na vzpostavitev izhodnega stanja senzile, povzroči pa hladna aklimacija znižanje nivoja toničnega dela odziva za enak faktor kot pri spontani aktivnosti.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Stenice *P. apterus* so aktivne preko celega leta. V zimskih razmerah se lahko shladijo pod temperaturo ledišča. V sončnih dneh pogosto zlezejo iz stelje na debela dreves, kjer se njihovo telo lahko segreje tudi do 30 °C. Z našimi raziskavami smo želeli ugotoviti ali zimske razmere povzročijo spremembe v delovanju filiformnih senzil. Preučevali smo vpliv temperaturne aklimacije na njihovo spontano aktivnost ter na odziv na dražljaj.

5.1 VPLIV TEMPERATURNE AKLIMACIJE NA SPONTANO AKTIVNOST

Pri vseh tipih filiformnih senzil stenice *P. apterus* kljub odsotnosti dražljaja lahko zaznamo proženje živčnih impulzov, kar označujemo kot spontano aktivnost. Pri senzili T₁ ima spontana frekvenca nalogo »ničelnega« nivoja, saj se pri odklonu laska v eno smer poveča frekvenca impulzov nad spontano aktivnost, pri odklonu v drugo, pa zniža pod njen nivo. To za senzili T₂ in T₃, ki nista smerno občutljivi, ne velja, saj se pri odklonu v katerokoli smer iz ravnovesnega položaja laska odziv poveča (Škorjanc, 2009). Poleg tega je zaradi spontane aktivnosti senzila bolj občutljiva, saj je možna zaznava dražljajev, ki bi bili sicer podpražni (Škorjanc, 2008). Zaradi naštetih funkcij ocenjujemo spontano aktivnost kot pomembno za delovanje filiformnih senzil, zato smo se odločili, da preučimo, kakšen vpliv ima nanjo temperaturna aklimacija.

Raziskava letne dinamike spontane aktivnosti pri stenici *P. apterus*, ki je potekala od oktobra do maja v sezonah 2008 in 2009, je pokazala, da hladna aklimacija povzroči znižanje nivoja aktivnosti tako pri senzili T₁ kot T₂ (Lipičnik, 2009). Poleg tega pride pri senzili T₂ do sprememb v temperaturni odvisnosti spontane aktivnosti. Medtem ko pri T₁ spontana aktivnost vedno narašča, če preparat segrevamo od 5 do 35 °C, je za T₂ takšen trend značilen le v primeru toplo aklimiranih živali. Pri hladno aklimiranih namreč aktivnost narašča le do 20 oziroma 25 °C, nato pa začne z nadaljnjim zviševanjem temperature upadati. V tej raziskavi pa so poleg letne dinamike ugotavljali tudi dinamiko sprememb spontane aktivnosti po prenosu hladno aklimiranih osebkov v laboratorij. Meritve so opravili od 17. do 21. januarja ter od 11. do 15. februarja 2008. Spontano aktivnost so v januarju izmerili takoj ter prvi in četrti dan po prenosu, v februarju pa takoj ter prvi, drugi, tretji in četrti dan po prenosu. Pri tem so poskuse izvedli na dveh do šestih osebkih. Protokol je obsegal meritve pri sedmih temperaturah preparatov med 5 in 35 °C, v koraki po 5 °C. Ugotovili so, da je prehod spontane aktivnosti iz »hladno aklimirane« v »toplo aklimirano« hitrejši pri senzili T₁. Gre zanimive rezultate, ki pa so bili pridobljeni na manjšem številu osebkov in le v eni sezoni. Z nadgrajenim eksperimentalnim protokolom in uporabo večjega števila osebkov smo želeli ugotoviti, če gre za značilne spremembe, ki niso odvisne od specifičnih razmer določene zime. Meritve smo izvedli ravno tako na senzilah T₁ in T₂ na petem členu zadka, in sicer med 20. februarjem in 5. marcem 2012. Poskuse smo izvedli takoj po prenosu ter prvi, drugi, tretji, četrti, peti, šesti in sedmi dan aklimacije. Za vsak dan aklimacije smo meritve izvedli na desetih osebkih, le

drugi dan aklimacije na devetih. Protokol za posamezen osebek je vseboval meritve pri temperaturah preparata 10, 20 in 30 °C.

Meritve takoj po prenosu osebkov iz hladnega okolja na toplo so pokazale vrednosti spontane aktivnosti značilne za hladno aklimirane živali. V splošnem je bila frekvenca spontane aktivnosti nižja. Pri senzili T₁ se je z višanjem temperature preparata povečevala v celotnem območju med 10 in 30 °C, pri senzili T₂ pa je dosegla vrh pri 20 °C in je z nadaljnjim segrevanjem preparata padla. Pri toplo aklimiranih živali je frekvenca spontane aktivnosti senzil obeh tipov naraščala sorazmerno z zviševanjem temperature preparatov. Preskok nivoja spontane aktivnosti, značilnega za hladno aklimirane živali, na nivo, značilen za toplo aklimirane živali, je pri senzili T₁ potekel prvi dan tople aklimacije, pri senzili T₂ pa drugi dan.

Tudi Lipičnik je v svoji raziskavi opazil enako temperaturno odvisnost senzil T₁ in T₂. Razlike so bile le v prehodu iz hladne na toplo aklimacijo, ki je pri njegovi raziskavi potekel nekoliko kasneje. V mesecu januarju so opazili prehod četrty dan aklimacije, v mesecu februarju pa pri senzili T₁ drugi in pri senzili T₂ tretji dan aklimacije. Razlike so lahko posledica opravljanja meritev v različnih mesecih. Osebk, ki so bili izmerjeni januarja so lahko podvrženi večji stopnji hladne aklimacije in zato potrebujejo več dni, da preidejo iz hladne v toplo aklimacijo, kot pa osebk, izmerjeni konec februarja. Morda pa so razlike v prehodu rezultat drugačnih temperaturnih razmer v posamezni sezoni. Milejša zima lahko vpliva na nižjo stopnjo hladne aklimacije naših osebkov in s tem na hitrejši prehod v primerjavi s predhodnimi raziskavami. V času naših raziskav so zunanje temperature nihale med 0,7 in 1,7 °C, pri Lipičniku pa so bile nekatere dneve tudi pod 0 °C, saj so nihale med -0,7 in 1,7 °C. Povprečne dnevne temperature so bile v našem primeru za 1,32 °C višje kot pri predhodnji raziskavi.

Možen vzrok, da se frekvenca spontane aktivnosti med hladno in toplo aklimiranimi osebki razlikuje, lahko leži v transdukcijskih kanalih, ki naj bi bili vir spontane aktivnosti (Thurm, 2001). Ena od hipotez predvideva, da sprememba sile med kanali in sosednjimi membranskimi fosfolipidnimi molekulami povzroči odprtje kanalov (Kung, 2005). Med zimsko aklimacijo se sestava in značilnosti fosfolipidne membrane spremenijo (Šlachta, 2002). Zveča se število kislin s 16 ogljikovimi atomi (palmitinska kislina), medtem ko se število kislin s 18 ogljikovimi atomi zniža (linolna in oleinska kislina), oziroma ostaja enako (stearinska kislina). Z zmanjšanjem temperatur naraste količina fosfatidiletanolamina (PE), medtem ko količina fosfatidilholina (PC) upade. Spremembe v membrani so pomembne za ohranitev podobne fluidnosti pri različnih temperaturah (Hodková, 1999), hkrati pa lahko vplivajo na delovanje mehansko občutljivih kanalov. Prav zaradi tega morda spremembe v fosfolipidni membrani vodijo tudi do zmanjšane frekvence spontane aktivnosti.

Razlike v vplivu temperaturne aklimacije na aktivnost senzil T₁ in T₂ so lahko posledica različnih mehanizmov nastanka spontane aktivnosti. Pri senzili T₁ poleg transdukcijskih

kanalov pri nastajanju spontane aktivnosti sodeluje še dodaten ritmovnik, ločen od transdukcijskega mehanizma (Škorjanc, 2008, 2009, v pripravi). V primeru, da temperaturna aklimacija nanj ne bi vplivala, bi bil vpliv temperaturne aklimacije na frekvenco spontane aktivnosti drugačen pri senzili T_1 kot pri T_2 .

Naše meritve so torej potrdile, da ima temperaturna aklimacija značilen vpliv na spontano aktivnost senzil T_1 in T_2 pri stenici *P. apterus*, ki je primerljiv med različnimi leti, kljub sezonsko odvisnim razlikam v okoljskih razmerah.

5.2 VPLIV TEMPERATURNE AKLIMATIZACIJE NA ODZIV NA DRAŽLJAJ

Stenice *P. apterusa* se pozimi ob sončnem vremenu povzpnejo iz stelje na debela dreves, kjer se lahko ogrejejo do poletnih temperatur (Škorjanc et al, 2007). Če jih pri tem opazujemo, ugotovimo, da se na deblu gibljejo presenetljivo aktivno. Poleg tega je za njihovo preživetje ključno, da se pravočasno vrnejo v zavetje stelje ter se tako izognejo preveliki podhladitvi. Pri tem se zastavlja vprašanje, kako v takšnih razmerah delujejo njihova čutila, ki so nujno potrebna za detekcijo dražljajev iz okolja. Z našimi meritvami smo želeli ugotoviti ali temperaturna aklimacija vpliva na odziv filiformnih senzil. Na petih hladno in petih toplo aklimiranih osebkih smo določili odzivne krivulje fazičnega in toničnega dela odziva, vpliv adaptacije na odzivno krivuljo fazičnega dela odziva ter hitrost vzpostavitve izhodnega stanja senzile po draženju.

V vseh protokolih smo uporabili trapezast dražljaj. Njegove prednosti so definirana dolžina trajanja dinamične in statične faze, definiran kot odklona laska ter konstantna hitrost odklanjanja. Uporabili smo 100ms in 200ms dolgo dinamično fazo. To pri maksimalnem kotu odklona laska 10° zagotavlja dovolj počasne odklone, pri katerih se izognemo možnim mehanskim artefaktom, ki lahko nastanejo pri krajšem času dinamične faze, ko baza laska ne zmore slediti premikom konice laska. Omogoči pa nam tudi natančno spremljanje odziva v fazičnem delu (Škorjanc, 2008). V primeru, da je dolžina dinamične faze predolga, pa je vrh fazičnega odziva nižji, saj ekscitacijske procese že dohiti adaptacija, ki zniža frekvenco impulzov.

Vpliv temperaturne aklimacije na odziv smo najprej določili z odzivnimi krivuljami, ki prikazujejo odnos med kotom odklona laska in frekvenco živčnih impulzov. Ugotovili smo, da temperaturna aklimacija drugače vpliva na fazičen kot na toničen del odziva tako pri senzili T_1 kot tudi T_2 . V fazičnem delu odziva senzile T_1 se odzivni krivulji hladno in toplo aklimiranih živalih prekrivata. Razlike, ki se pojavljajo v obeh smereh odklona, so zelo majhne. V toničnem delu odziva je frekvenca impulzov pri toplo aklimiranih živalih v celoti opazno višja od frekvence pri hladno aklimiranih, a je oblika obeh krivulj zelo podobna. Temperaturna aklimacija torej ne vpliva bistveno niti na dinamično območje niti na stopnjo ojačenja fazičnega in toničnega dela odziva.

Senzila T_2 ni smerno občutljiva, zato se v obe smeri odklona odzove z ekscitacijo. Kljub temu smo tudi pri tej senzili opazili asimetrijo. Fazičen del odziva je bil pri odklanjanju v kranialno smer odklona večji, krivulji toplo in hladno aklimiranih osebkov pa sta se skoraj povsem prekrivali. V kavdalno smer je bil odziv manjši, krivulji med hladno in toplo aklimiranimi pa sta se bistveno razlikovali. V toničnem delu odziva pri enakih odklonih krivulja hladno aklimiranih osebkov dosega nižje vrednosti frekvence kot krivulja toplo aklimiranih, vendar so razlike v kranialno smer bolj očitne.

Odstopanja odzivne krivulje senzile T_2 pri odklonu laska v kavdalno smer niso prepričljiva zaradi velike variabilnosti podatkov. Te so lahko posledica nastavitve kristala, ki morda ni bil naravnan na izhodiščno lego senzile. Kristal smo namreč k senzili prislonili ročno (senzilo T_1 smo glede na frekvenco spontane aktivnosti namestili avtomatično s pomočjo vmesnika Power1401). Hkrati je senzila T_2 precej neodzivna okrog izhodiščne lege, kar še poveča stopnjo napake. Zaradi slabe ponovljivosti odziva ter velike variabilnosti med preparati pri odklonu laska v kavdalno smer smo te podatke pri zaključkih zanemarili in na osnovi odziva na odklon laska v kranialni smeri ugotovili, da dinamično območje in stopnja ojačenja ostajata enaka pri hladno in toplo aklimiranih osebkih, vendar se razlike pojavljajo med fazičnim in toničnim delom odziva.

Odzivne krivulje hladno in toplo aklimiranih osebkov smo normalizirali z vrednostjo spontane frekvence pri 25 °C. S tem smo želeli ugotoviti, ali temperaturna aklimacija vpliva na toničen del odziva enako kot na spontano aktivnost. Normirani rezultati so pokazali, da je faktor spremembe frekvence impulzov enak pri obeh procesih.

Razlike med fazičnim in toničnim delom odziva so opazili tudi pri poskusih draženja senzile v hipoksičnih razmerah (Škorjanc, 2008). Znižan parcialni tlak kisika je imel namreč bistveno večji vpliv na vrh fazičnega dela odziva kot na tonični del. To lahko pojasnimo z različno dinamiko ekscitacijskih in adaptacijskih procesov. Ob sprožitvi dražljaja se najprej močno aktivirajo ekscitacijski procesi, adaptacijski pa se začnejo povečevati s časovnim zamikom. Tako je odziv na dražljaj najprej velik (vrh fazičnega dela odziva), a se počasi zmanjšuje zaradi vse večjega delovanja adaptacijskih procesov. V toničnem delu že od vsega začetka delujeta oba procesa, ki se proti koncu tega dela odziva tudi ustalita (Škorjanc, 2008). Tudi pri spontani aktivnosti hkrati delujeta oba procesa ekscitacije in adaptacije, kot v toničnem delu.

Poleg vpliva aklimacije na odzivne krivulje nas je zanimal tudi vpliv aklimacije na spremembo delovnega dinamičnega območja fazičnega odziva zaradi prisotnosti konstantnega dražljaja. Slednjega smo dosegli s konstantnim odklonom laska, ki smo ga vzdrževali 10 s, kar je dovolj dolgo, da se je čutilna adaptacija stabilizirala. V primeru, da smo lasek odklonili v ekscitacijski smeri, so bili adaptacijski procesi višji, kot bi bili v mirovnem stanju, zato je bil ob nadaljnjem draženju vrh fazičnega dela odziva manjši. Torej se je občutljivost receptorja zmanjšala. Če je bil konstanten odklon inhibicijskega značaja, so bili adaptacijski procesi nekoliko nižji, kot bi bili v mirovnem stanju, kar se je

pri nadaljnjem odklonu odrazilo v večji občutljivosti receptorja. Na grafu smo to opazili kot premik odzivne krivulje po x-osi, pri čemer se ni bistveno spremenil niti faktor ojačenja signala niti obseg delovnega dinamičnega območja tako pri hladno kot toplo aklimiranih osebkih. To potrjuje, da aklimacija ne spremeni vpliva adaptacije na fazičen odziv senzil T_1 in T_2 .

S serijo parnih dražljajev smo želeli izmeriti hitrost vzpostavitve izhodnega stanja senzile po draženju. Primerjali smo vrh fazičnega odziva na prvi in drugi dražljaj v posameznem paru ter amplitudo odziva na drugi dražljaj izrazili kot delež amplitude odziva na prvi dražljaj. Prvi dražljaj v paru je sprožil adaptacijske mehanizme, ki so zmanjšali občutljivost senzile. Po prenehanju dražljaja so tej mehanizmi še vedno delovali, vendar je njihova intenziteta s časom upadala. Pri opazovanju prvega para dražljajev smo zaznali razliko pri vzpostavitvi izhodnega stanja med senzilo T_1 in T_2 . Pri senzili T_1 je vrh fazičnega dela odziva na drugi dražljaj le nekoliko nižji od vrha fazičnega dela odziva na prvi dražljaj. Pri senzili T_2 je odziv na drugi dražljaj precej manjši kot odziv na prvega. Ta opazovanja nakazujejo, da se pri senzili T_1 izhodno stanje vzpostavi prej kot pri senzili T_2 . Iz krivulj, ki prikazujejo odnos med trajanjem pavze med dražljajema v paru in relativno amplitudo odziva na drugi dražljaj lahko opazimo, da pri tem procesu sodelujeta vsaj dva mehanizma z dvema različnima časovnima konstantama, vendar pa bi morali zaradi zelo velike variabilnosti podatkov te trditve preveriti z večjim številom meritev.

Vzrok za razlike med senzilo T_1 in T_2 je lahko prostor receptorske limfe, ki je pri senzili T_1 večji kot pri senzili T_2 . Pri T_2 odziv na dražljaj hitreje izprazni manjši perlimfni prostor, zato je odziv na naslednji dražljaj precej manjši. Medtem ko večji prostor pri T_1 zagotavlja dovolj K^+ ionov, zato se naslednji odziv zmanjša le malo.

Naša sklepna ugotovitev je, da so senzile T_1 in T_2 funkcionalne tudi v zimskih razmerah. Odziv se sicer pri hladno aklimiranih živalih v primerjavi s toplo aklimiranimi nekoliko zmanjša. Razlike, ki so zelo podobne tistim pri spontani aktivnosti, lahko zaznamo v toničnem delu odziva. Vendar pa senzile kljub hladni aklimaciji ohranijo večino značilnih lastnosti fazičnega in toničnega dela odziva ter s tem sposobnost kodiranja dražljaja.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Stenice *P. apterus* so aktivne preko celega leta. V zimskih razmerah se lahko shladijo pod temperaturo ledišča, vendar pa se v sončnih zimskih dneh njihovo telo lahko segreje tudi do 30 °C. S tem diplomskim delom smo želeli ugotoviti ali zimske razmere vplivajo na delovanje filiformnih senzil. Preverili smo vpliv temperaturne aklimacije na spontano aktivnost senzil T_1 in T_2 na 5. členu zadka ter na njihov odziv na dražljaj.

Spontana aktivnost je proženje živčnih impulzov v odsotnosti dražljaja. Raziskave letne dinamike spontane aktivnosti senzil tipa T_1 in T_2 so pokazale, da pride v zimskem obdobju do sprememb spontane aktivnosti (Lipičnik, 2009; Škorjanc, 2008). Z nadgrajenim eksperimentalnim protokolom in uporabo večjega števila osebkov smo želeli ugotoviti, če gre za značilne spremembe, ki niso odvisne od specifičnih razmer določene zime. Hladno aklimirane osebkke smo iz zunanjega okolja prenesli v laboratorij. Spontano aktivnost smo izmerili takoj po prenosu ter prvi, drugi, tretji, četrti, peti, šesti in sedmi dan aklimacije. Meritve smo opravili pri temperaturi preparata 10, 20 in 30 °C. Naši rezultati so bili povsem primerljivi s predhodno raziskavo. Pri hladno aklimiranih osebkkih je bil nivo spontane aktivnosti nižji. Pri senzili T_1 je frekvenca impulzov naraščala v celotnem območju med 10 in 30 °C, medtem ko je pri senzili T_2 naraščala do 20 °C, višje temperature pa so povzročile padec frekvence. Pri toplo aklimiranih osebkkih je frekvenca tako pri T_1 kot pri T_2 naraščala v celotnem območju med 10 in 30 °C. Prehod iz hladne v toplo aklimacijo je pri senzili T_1 potekel prvi dan, pri T_2 pa drugi dan aklimacije. V predhodni raziskavi so ravno tako opazili hitrejši prehod pri T_1 , vendar pa se je le-ta zgodil pri obeh tipih senzil 1 do 3 dni kasneje kot v primeru naših meritvah. Ta zamik je verjetno posledica nekoliko drugačnih aklimacijskih razmer, ki so jim bili osebki izpostavljeni (povprečna zunanja temperatura pri naših meritvah je bila za 1,32 °C višja kot pri predhodnjih raziskavah).

V drugem delu raziskav smo želeli ugotoviti, ali temperaturna aklimacija vpliva na odziv senzil T_1 in T_2 na standarden trapezast dražljaj. Določili smo odzivno krivuljo fazičnega in toničnega dela odziva, vpliv adaptacije na premik odzivne krivulje fazičnega dela odziva ter hitrost vzpostavitve izhodnega stanja senzile po draženju. Vse meritve smo opravil pri temperaturi preparata 25 °C. Naši rezultati so pokazali, da je v primerjavi s toplo aklimiranimi osebkki nivo toničnega odziva pri hladno aklimiranih nižji za enak faktor kot spontana aktivnost, da pa temperaturna aklimacija ne vpliva na delovno dinamično območje ter faktor ojačenja signala niti fazičnega niti toničnega dela odziva. Adaptacija na konstanten dražljaj je pri odklonu laska v ekscitacijsko smer zmanjšala občutljivost senzile, na odklon laska v inhibitorno pa povečala. Posledica je bil premik odzivne krivulje fazičnega dela odziva po x-osi proti večjim oziroma manjšim amplitudam dražljaja, pri čemer se oblika krivulje ni bistveno spremenila tako pri hladno kot toplo aklimiranih osebkkih. To pomeni, da aklimacija ni imela vpliva na fazični odziv ob prisotnosti

konstantnega dražljaja. Testiranje senzil s parnimi pulzi, med katerimi smo povečevali razmik, je pokazalo, da je pri prvem parnem dražljaju odziv na drugi dražljaj v paru veliko manjši pri senzili T_2 kot pri T_1 ter, da ni očitnih razlik v poteku med hladno in toplo aklimiranimi osebki. Na osnovi zgoraj opisanih rezultatov sklepamo, da odziv senzil T_1 in T_2 pri stenici *P. apterus* pozimi ni prizadet, ter da senzile omogočajo recepcijo dražljajev preko celega leta.

6.2 SUMMARY

Bugs *P. apterus* are active throughout the whole year. In winter conditions they cool down below 0 °C but on a sunny winter day their bodies get warmed also to 30 °C. The aim of this graduation thesis was to determine the influence of temperature acclimation on filiform sensilla activity. We focused on the spontaneous activity and stimulus response of filiform sensilla T_1 and T_2 on the fifth abdominal segment.

Spontaneous activity means generating nerve impulses (spikes) in the absence of a stimulus. Seasonal dynamics of the spontaneous activity of T_1 and T_2 sensilla showed that the activity changes in winter time (Lipičnik, 2009; Škorjanc, 2008). By modified experimental protocol and higher number of animals we wanted to confirm that differences are specific and are stable also in changeable winter environment. Cold acclimated animals were transferred from outside into the laboratory. Spontaneous activity was measured right after the transfer and first, second, third, fourth, fifth, sixth and seventh day of warm acclimation. Measurements were done at preparation temperatures of 10, 20 and 30 °C. The results were comparable with the results of the previous research (Lipičnik, 2009). Cold acclimated animals had lower frequency of spontaneous activity. Spontaneous activity of T_1 sensilla increased with rising temperature from 10 to 30 °C, meanwhile frequency of sensilla T_2 increased to 20 °C and with higher temperatures decreased. In warm acclimated animals it always increased throughout the whole temperature range in both types. Sensilla T_1 transitioned from cold to warm acclimated state the first day of warm acclimation, whereas sensilla T_2 transitioned the second day. In the previous research the transition occurred one or two days later than in our results. These minor differences could be attributed to specific conditions of individual winters.

Second part of the research focused on the impact of temperature acclimation on stimulus response of T_1 and T_2 sensilla. We determined the response curve of the phasic and tonic part of the response, the adaptive shift of the response curve and the time course of sensilla recovery after stimulation. We used a standard ramp stimulus. All measurements were done at 25 °C. Our results showed that the tonic part of the response is lower in cold acclimated animals than in warm acclimated. The difference is the same as in the case of the spontaneous activity. Temperature acclimation, however, did not have an influence on the dynamic range and gain of neither phasic nor tonic response. Adaptation to a constant stimulus caused a shift of the phasic response curve along the x-axis. In the case of excitatory pre-conditioning the response shifted towards higher stimulus amplitudes, whereas the inhibitory pre-conditioning caused the response to shift towards lower

amplitudes. The shift and the shape of the curves was the same in cold and warm acclimated animals, meaning that temperature acclimation does not change the influence of a constant stimulus on the phasic response. With twin stimuli with increasing time interval between them we showed that temperature acclimation does not affect the recovery of sensilla after stimulation. To conclude, in bug *P. apterus* most of the properties of T_1 and T_2 response remain the same in cold and warm acclimated animals, suggesting that sensilla are functional through the whole year.

7 VIRI

- Batagelj S. 2005. Temperaturna odvisnost delovanja trihobotrija T1 pri zimsko in poletno adaptiranih stenicah vrste *Pyrrhocoris apterus*: diplomsko delo. Ljubljana, [S. Batagelj]: 60 str.
- Buno W., Monti-Bloch L., Mateos A., Handler P. 1981. Dynamic properties of cockroach »threadlike« hair sensilla. *Journal of Neurobiology*, 12, 2: 123-141
- Combes D., Simmers J., Nonnotte L., Moulins M. 1993. Tetrodotoksin-sensitive dendritic spiking and control of axonal firing in a lobster mechanoreceptors neurone. *The Journal of Physiology*, 460: 581-602
- Dagan D., Volman S. 1982. Sensory basis for directional wind detection in first instar cockroaches, *Periplaneta Americana*. *Journal of Comparative Physiology*, 147: 471-478
- Dahl F. 1883. Über die Hörhaare der Arachnoiden. *Zoologischer Anzeiger*, 6: 267-270
- De Kramer J.J., Kaissling K.-E. in Keil T. 1984. Passive electrical properties of isect olfactory sensilla may produce the biphasic shape of spikes. *Chemical Senses*, 8: 289-295
- Dumpert K., Gnatzy W. 1977. Cricket combined mehanoreceptors and kicking response. *Journal of Comparative Physiology*, 122: 9-25
- Edwards J.S., Palka J. 1974. The cerci and abdominal giant fibers of the house cricket, *Acheta domesticus*. I. Anatomy and physiology of normal adults. *Proceedings of the Royal Society [Biol.]*, 185: 83-103
- Erler G., Thurm U. 1981. Dendritic Impulse Initiation in an epithelial sensory Neuron. *Journal of Comparative Physiology*, 142: 237-249
- French A. S., Torkkeli P. H. 1994. The basis of rapid adaptation in mehanoreceptors. *Neural Information Processing Systems Foundation*, 9: 158-161
- Gillespie P. G., Walker R. G. 2001. Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature*, 413: 194-202
- Gingl E., Tichy H. 2006. Continuous tonic activity in spider warm cells in the absence of sensory input. *Journal of Neurophysiology*, 96: 989-997
- Gnatzy W. 1976. The ultrastructure of the thread-hairs on the cerci of the cockroach *Periplaneta americana* L. The intermoult phase. *Journal of Ultrastructure Research*, 1: 124-134

- Gnatzy W., Schmidt K. 1971. Die Feinstruktur der Sinneshaare auf den Cerci von *Gryllus bimaculatus* Deg. (Saltatoria, Gryllidae). I. Faden- und Keulenhaare. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie, 122: 190-209
- Gnatzy W., Tautz J. 1980. Ultrastructure and mechanical properties of an insect mechanoreceptor: stimulus-transmitting structures and sensory apparatus of the cercal filiform hairs of *Gryllus*. Cell and Tissue Research, 213: 441-463
- Grünter U., Gnatzy W. 1987a. Macromolecules in the receptor lymph of campaniform sensilla. Histochemistry, 86: 617-620
- Hamon A., Guillet J. C. 1994. Some electrical properties of the cercal anemoreceptors of the cockroach, *Periplaneta Americana*. Comparative Biochemistry and Physiology, A107: 357-368
- Hamon A., Guillet J. C., Callec J. J. 1988. Initiation and conduction of impulses in mechanosensory neurons: effect of hypoxia. Comparative Biochemistry and Physiology, A91: 797-805
- Hansen-Delkeskamp E. 1992. Functional characterization of antennal contact chemoreceptors in the cockroach *Periplaneta americana*. Journal of Insect Physiology, 38: 813-822
- Hodek I. 1971. Termination of adult diapause in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) in the field. Entomologia Experimentalist et applications, 14: 212 – 222
- Hodek I. 2002. Controversional aspects of diapause development. European Journal of Entomology, 99: 163 – 173
- Hodková M. et al. 1999. Seasonal changes in phospholipid composition in thoracic muscles of a heteropteran, *Pyrrhocoris apterus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 29: 367 – 376
- Hodkova M., Berkova P. in Zahradničkova H. 2002. Photoperiodic regulation of the phospholipid molecular species composition in thoracic muscles and fat body of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) via an endocrine gland, corpus allatum. Journal of Insect Physiology, 48: 1009-1019
- Hodkova M., Hodek I. 1994. Control of diapause and supercooling by the retrocerebral complex in *Pyrrhocoris apterus*. Entomologia Experimentalist et applications, 70: 237 – 245
- Keil T. A. 1997a. Comparative morphogenesis of sensilla: a review, International Journal of Insect Morphology and Embryology, 26, 3/4: 151-160

- Keil T. A. 1997b. Functional morphology of insect mechanoreceptors. *Microscopy Research and Technique*, 39: 506-531
- Keil T. A., Steinbrecht R. A. 1984. Mechanosensitive and Olfactory Sensilla of Insects. V: *Insect Ultrastructure: volume 2*. R.C. King, H. Akai (ur.). New York, Plenum Press: 477-515
- Keil T. A., Thurm U. 1979. Die Verteilung von Membrankontakten und Diffusionsbarrieren in epidermalen Sinnesorganen von Isekten. *Verhandlungen der Deutschen zoologischen Gesellschaft*, 72: 285
- Koštal V., Šimek P., 2000. Overwintering strategy in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera): the relations between life-cycle, chill tolerance and physiological adjustments. *Journal of Insect Physiology*, 46: 1321-1329
- Koštal V., Šlachta M., Šimek P. 2001. Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Insecta). *Comparative Biochemistry and Physiology*, B130: 365-374
- Kung C. 2005. A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature*, 463: 647-654
- Landorfa M. A., Miller J. P. 1995. Stimulus-response properties of cricket cercal filiform receptors. *Journal of Comparative Physiology*, A177: 749-757
- Lipičnik A. 2009. Vpliv temperaturne aklimacije na mirovno aktivnost trihobotrijev pri stenici vrste *Pyrrhocoris Apteris*: diplomsko delo. Ljubljana, [A. Lipičnik]: 50 str.
- McIver, S. B., 1975. Structure of cuticular mechanoreceptors of arthropods. *Annual Review of Entomology*, 20: 381-397
- Mellon D. J., Kennedy D. 1964. Impulse origin and propagation in bipolar sensory neuron. *The Journal of General Physiology*, 47: 487-499
- Mendelson M. 1966. The site of impulse initiation in bipolar receptor neurons of *Callinectes sapidus* L. *The Journal of General Physiology*, 47: 487-499
- Morita H., Yomashita S. 1959. The back-firing of impulses in a labellar chemosensory hair of the fly. *Mem Fac Sci Kyushu univ ser Biol*, 3: 81-87
- Nicklaus R. 1967. Zur Richtcharakteristik der Fadenhaare von *Periplaneta americana*. *Z Vgl Physiol*, 54: 434-437
- Seyfarth E. A., Bohnenberger J., Thorson J. 1982. Electrical and mechanical stimulation of a spider slit sensillum: outward currents excites. *Journal of Comparative Physiology*, 147: 423-432

- Shimozawa T., Kanou M. 1984a. Varieties of filiform hairs: range fractionation by sensory afferents and cercal interneurons of a cricket. *Journal of Comparative Physiology*, A155: 485-493
- Socha R. 1993. *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) – an experimental model species: a review. *European Journal of Entomology*, 90: 241 – 286
- Stockbridge L. L., French A. S. 1991. The morphological basis of intracellular measurements in the cockroach tactile spine neuron. *Journal of Comparative Physiology*, A169: 417-477
- Škorjanc A. 2002. Določitev funkcionalnih lastnosti trihobotrijev na petem členu zadka pri stenici *Pyrrhocoris apterus*: diplomska naloga. Ljubljana, [A. Škorjanc]: 86 str.
- Škorjanc A. 2008. Potek vzburjenja in adaptacije filiformnih senzil pri stenici *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera): doktorska disertacija. Ljubljana, [A. Škorjanc]: 131 str.
- Škorjanc A., Batagelj S. in Kazimir D. 2007. Thermal acclimatization does not affect the resting activity of type T₁ trichobothrium in the firebug (*Pyrrhocoris apterus*; Heteroptera). *Acta biologica Slovenica*, 50, 2: 85- 92
- Škorjanc A., Zupančič G., Drašlar K. 2009. Multiple mechanisms generate the resting activity of filiform sensilla in the bug (*Pyrrhocoris apterus* L.; Heteroptera). *Journal of Comparative Physiology*, 195: 651-661
- Šlachta M. et al. 2002. Physiology of cold-acclimation in non-diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *European Journal of Entomology*, 99: 181–187
- Tautz J. 1977. Reception of medium vibration by thoracic hairs of caterpillars of *Barathra brassicae* L. (Lepidoptera, Noctuidae): I. Mechanical properties of the receptor hairs. *Journal of Comparative Physiology*, A118: 13-31
- Tautz J. 1978. Reception of medium vibration by thoracic hairs of caterpillars of *Barathra brassicae* L. (Lepidoptera, Noctuidae): II. Response characteristic of the sensory cell. *Journal of Comparative Physiology*, A125: 67-77
- Thurm U. 1963. Die Beziehungen zwischen mechanischen Reizgrößen und stationären Erregungszuständen bei Borstfeld-Sensillen von Bienen. *Z Vergl Physiol*, 46: 351-382
- Thurm U. 1974a. Basics of the Generation of Receptor Potentials in Epidermal Mechanoreceptors of Insects. V: Sonderdruck aus Rheinisch-Westfälische Akademie der Wissenschaften. Schwartzkopff J. (ur.). Opladen, Westdeutscher Verlag: 355-385
- Thurm U. 1983. Mechano-electric transduction. V: Biophysics. Hoppe W., Lohmann W., Markl H., Ziegler H. (ur.). Berlin, Springer: 666-671

- Thurm U. 2001. Mechanosensorik. V: Neurowissenschaften: vom Molekül zur Kognition. Dudel J., Menzel R., Schmidt R. F. (ur.). Berlin, Springer: 331-338
- Thurm U., Küppers J. 1980. Epithelial physiology of insect sensilla. V: Insect Biology in the Future. Locke M., Smith D.S. (ur.). New York, Academic Press: 735-758
- Tomčala A. et al. 2006. Seasonal acquisition of chill tolerance and restructuring of membrane glycerophospholipids in an overwintering insect: triggering by low temperature, desiccation and diapause progression. *The Journal of Experimental Biology*, 209: 4102–4104
- Tullgren A., 1981. Zur Morphologie und Systematik der Hemipteren I. *Entomologisk Tidsskrift*, 39: 113-133
- Withers P. C. 1992. *Comparative Animal Physiology. International Edition.* Fort Worth, Saunders College Publishing: 949 str.
- Wolbarsht M. L. 1965. Receptor sites in insect chemoreceptors. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 30: 281-288
- Wolbarsht M. L., Hanson F. 1965. Electrical activity in the chemoreceptors of the blowfly: III. Dendritic action potentials. *The Journal of General Physiology*, 48: 673-683

ZAHVALA

V prvi vrsti bi se najprej rada zahvalila somenturju dr. Alešu Škorjancu, ki me je spremljal v celotnem procesu od eksperimentalnega dela do pisanja diplomske naloge. Hvala za zasnovo zanimivih poskusov, za pomoč pri zaključitvi meritev spontane aktivnosti, neutrudno razlago vseh mogočih procesov in pojmov pomembnih za naše raziskave, pa tudi vero, da zmorem diplomu napisati še boljše. ☺

Zahvaljujem se tudi doc. dr. Gregorju Zupančiču in prof. dr. Kazimirju Drašlarju za koristne nasvete in spodbude. Hkrati pa ne morem mimo celotne katedre, ki je s svojim vedrim duhom in pozornostjo, vedno popestrila še tako dolgočasne dneve.

Navsezadnje pa bi rada izpostavila tudi svojo družino in prijatelje, ki ste mi preprosto s tem da ste bili z mano in delili svoj čas z mojim, dali toliko energije, da sem lahko premagala tudi težke »momente« tekom tega študija.

Hvala vsem.