

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Maja VUČNIK

**VOHALNO RAZLIKOVANJE ZMESI AMINOKISLIN
PRI CEBRICAH (*Danio rerio*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Maja VUČNIK

**VOHALNO RAZLIKOVANJE ZMESI AMINOKISLIN PRI CEBRICA
(*Danio rerio*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**OLFACTORY DISCRIMINATION OF MIXTURES OF AMINO ACIDS
IN ZEBRAFISH
(*Danio rerio*)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za etologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Tineta Valentinčiča.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: prof. dr. Tine VALENTINČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Janko BOŽIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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.

Datum zagovora: 5.2.2008

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maja Vučnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK 612.014:577.25:597(043.2)=163.6
KG voh/vedenje/ zmes/ aminokislina/ pogojevanje/ razlikovanje/ cebrice/ *Danio rerio*
AV VUČNIK, Maja
SA VALENTINČIČ, Tine (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2008
IN VOHALNO RAZLIKOVANJE ZMESI AMINOKISLIN PRI CEBRICAH (*Danio rerio*)
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP VI, 38 str., 8 sl., 61 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Cebrice (*Danio rerio*) so modelni organizem v raziskavah voha vretenčarjev. Ribe vedno zaznavajo zmesi mnogih vonjav kot drugačne od posameznih komponent zmesi, binarne in ternarne zmesi dveh različnih komponent pa prvotno zaznajo kot bolj učinkovito komponento zmesi. Vohalno razlikovanje zmesi aminokislin so do sedaj raziskovali samo na somičih. Raziskovali smo vohalno razlikovanje binarnih zmesi aminokislin pri cebricah. Učinkovitost aminokislin v zmesi smo določili glede na amplitudo EOG (elektroolfatografskih) odzivov na posamezne amino kisline. Binarno zmes smo sestavili tako, da je bila ena komponenta zmesi bolj učinkovita od druge. Vedenjski odziv rib na draženje z zmesmi aminokislin smo ocenili s štejem obratov večjih od 90 stopinj v času 90 sekund po vbrizganju dražljaja v akvarij. Po 30 pogojevanjih so se cebrice redno odzivale na pogojno binarno zmes L-Ala in L-Arg, z L-Ala kot učinkovitejšo komponento, z značilno večjo količino plavanja kot na nepogojni dražljaj. Cebrice niso razlikovale binarne zmesi od njene učinkovitejše sestavine, od nje pa so vedno razlikovale manj učinkovito sestavino zmesi in ostale aminokislina. Od pogojne zmesi so cebrice vedno razlikovale tudi binarno zmes z istima sestavinama v kateri je bila učinkovitejša sestavina L-Arg in L-Ala manj učinkovita sestavina. Cebrice so torej tako kot somiči v binarni zmesi najprej zaznale učinkovitejšo komponento zmesi. Po razlikovalnem treningu je večina cebric statistično razlikovala pogojno zmes od bolj učinkovite sestavine zmesi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC 612.014:577.25:597(043.2)=163.6
CX olfaction/ mixture/ aminoacids/ conditioning/ discrimination/ zebrafish/ *Danio rerio*
AU VUČNIK, Maja
AA VALENTINČIČ, Tine (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
PY 2008
TI OLFACTORY DISCRIMINATION OF MIXTURES OF AMINO ACIDS IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*)
DT Graduation Thesis (University studies)
NO VI, 38 p., 8 fig., 61 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The zebrafish (*Danio rerio*) are a model organism for studies of vertebrate olfaction. In fishes, large odorant mixtures are always perceived as different from single compounds, whereas binary and ternary mixtures of two unequal components are perceived initially as the more stimulatory component of the mixture. Olfactory discrimination of amino acid mixtures was studied only in catfish. We investigated olfactory discrimination of binary mixtures of amino acids in zebrafish. Using larger EOG (electro-olfactogram) amplitudes in response to single amino acids we made one component of the binary mixture more stimulatory than the other component. We assessed the zebrafish behavioral responses to stimulation with amino acid mixtures by counting the number of turns of fish greater than 90° during 90s after the stimulus delivery. After 30 conditioning sessions zebrafish started to respond regularly to the conditioned binary mixture of L-Ala and L-Arg, L-Ala being the more stimulatory component of the mixture, with a significantly greater swimming behavior than to the non-conditioned stimuli. The more stimulatory component of the binary mixture was not discriminated from its binary mixture; however the less stimulatory component of the mixture and all other amino acids were always discriminated from the mixture. The binary mixture with L-Arg as the more stimulatory component and L-Ala as the less stimulatory component was always discriminated from the conditioned binary mixture. Binary mixture of amino acids was, like in catfish, initially detected by zebrafish as its more stimulatory component, and after additional discrimination training most zebrafish discriminated statistically the conditioned mixture from its more stimulatory component alone.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
UVOD	1
PREGLED OBJAV	3
KEMIČNI DRAŽLJAJI IN KEMORECEPCIJA.....	3
ZGRADBA VOHALNEGA SISTEMA PRI CEBRICAH	4
Zgradba perifernega vohalnega organa cebric.....	5
Zgradba vohalnega bulbusa cebric	5
VOHALNI RECEPTORJI.....	6
Ekspresija genov za vohalne receptorje v vohalnih čutilnih celicah	7
Vohalna transdukcija	8
Občutljivost in specifičnost vohalnih receptorjev	8
KODIRANJE VOHALNIH DRAŽLJAJEV V GLUMERULARNI PLASTI VOHALNEGA BULBUSA	10
DOGODKI V VOHALNEM BULBUSU	11
ZAZNAVANJE ZMESI AMINOKISLIN	13
MATERIAL IN METODE DE LA.....	15
POSKUSNE ŽIVALI	15
DRAŽLJAJI	15
POTEK POSKUSOV	17
OVREDNOTENJE IN PRIKAZ REZULTATOV	19
REZULTATI.....	20
POGOJEVANJE.....	20
TESTIRANJE RAZLIKOVANJA AMINOKISLIN IN ZMESI AMINOKISLIN OD POGOJNE ZMESI	21
RAZLIKOVALNI TRENING.....	21
ODZIVI NA OKUŠALNE DRAŽLJAJE	22
RAZPRAVA.....	30
VIRI	34
ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 1: CEBRICA.....	2
Slika 2: POGOJEVANJE: Vedenjski odzivi cebric (N=15) med pogojevanjem na zmes 2×10^{-2} M L-Ala + 10^{-3} M L-Arg.....	23
Slika 3: PRVA IN DRUGA SERIJA TESTERANJA RAZLIKOVANJA POGOJNE ZMESI OD DESETIH AMINOKISLIN: Vedenjski odzivi cebric (N=15) pogojenih na zmes L-Ala+L-Arg, na raztopine testnih aminokislin.	24
Slika 4: DRUGA IN TRETJA SERIJA TESTERANJA RAZLIKOVANJA POGOJNE ZMESI OD DESETIH AMINOKISLIN: Vedenjski odzivi cebric (N=15 v seriji 2 in N=14 v seriji 3) pogojenih na zmes L-Ala+L-Arg, na raztopine testnih aminokislin. 25	
Slika 5: TESTERANJA RAZLIKOVANJA POGOJNE ZMESI OD DVEH BINARNIH ZMESI: Vedenjski odzivi cebric (N=15) pogojenih na zmes L-Ala+L-Arg, na raztopine dveh zmesi L-Ala in L-Arg (L-Ala+L-Arg in L-Ala+L-Arg).	26
Slika 6: RAZLIKOVALNI TRENING : Vedenjski odzivi cebric (N=15) pogojenih na zmes L-Ala+L-Arg, na raztopino L-Ala.....	27
Slika 7: RAZLIKOVALNI TRENING POSAMEZNE RIBE: Vedenjski odzivi posameznih cebric (N=15) pogojenih na zmes L-Ala+L-Arg, na raztopino L-Ala... ..	28
Slika 8: OKUŠALNI TESTI: Vedenjski odzivi cebric pogojenih na zmes L-Ala+L-Arg na raztopine 10^{-1} M L-Arg, v primerjavi z odzivi na pogojno zmes, zmes 10^{-1} M L-Ala + 10^{-1} M L-Pro, 10^{-1} M L-Ala in 10^{-1} M L-Pro.	29

UVOD

Vsejede ribe zaznavajo v vodi raztopljene kemijske snovi (amino kisline, organske kisline, nukleotide in steroide) s čutilom za voh, z čutilom za okus in s splošnim kemijskim čutom. Voh omogoča učenje vonjav in razlikovanje kemičnih dražljajev, okušalni dražljaji pa pri ribah sprožijo refleksne odzive (Valentinčič s sod., 1994; Valentinčič in Caprio, 1994; Valentinčič s sod., 2000a). Raziskovali smo vohalno razlikovanje binarnih zmesi aminokislin pri cebricah (*Danio rerio*). Raziskave vohalnega razlikovanja aminokislin so pokazale, da cebrice in somiči razlikujejo aminokisline (Valentinčič s sod., 2005), največ raziskav vohalnega razlikovanja so opravili na kanalskem in ameriškem somiču (Valentinčič in Caprio, 1994; Valentinčič s sod.; 1994, Valentinčič s sod., 2000a). Cebrice so akvarijske ribe iz družine krapovcev, ki so, zaradi enostavnega razmnoževanja, številčnih potomcev in hitre rasti, modelna žival v genetiki in razvojni nevrobiologiji (Key in Devine, 2003). V zadnjem času so pridobile pomen tudi kot model v raziskavah razvoja in funkcij voha vretenčarjev, saj so mnoge lastnosti vohalnega sistema cebric podobne lastnostim vohalnih sistemov ostalih vretenčarjev, ob tem pa imajo za desetkrat manjše število vohalnih receptorjev (Barth, 1996) in vohalni bulbus z manjšim številom glumerulov kot kopni vretenčarji (Baier in Korsching, 1994; Friedrich in Korsching, 1997). Mladice cebric se na vohalne dražljaje odzivajo že en dan po izleganju (Lindsay in Vogt, 2004). Vedenjski odziv odraslih cebric na aminokislino L-alanin so opisali že leta 1990. Cebrice so se na draženje odzvale s pospešenim plavanjem, iskanjem hrane po dnu akvarija, hlastanjem po vodni površini in zadrževanjem v delu akvarija, kamor so vbrizgali dražljaj (Steele s sod., 1990). Vohalni dražljaji v naravnem okolju so ponavadi zmesi mnogih vohalnih dražljajev. Ljudje zaznajo binarno zmes vonjav kot bolj učinkovito komponento zmesi (Laing in Willcox, 1983). Prepoznavanje komponent v zmesi postane nemogoče, ko število komponent večje kot 4 (Laing in Glemarec, 1992; Livermore in Laing, 1996). Somiči, spočetka zaznajo binarne in ternarne zmesi aminokislin kot najbolj učinkovito snov v zmesi. Pri sesalcih so učinkovitost sestavin zmesi določili s poskusi, pri ribah lahko učinkovitost sestavin napovemo s pomočjo večje amplitude EOG (Valentinčič s sod., 2000b). Binarno zmes enako učinkovitih aminokislin zaznajo ribe bodisi, kot eno od komponent zmesi, s časom se bolj učinkovita komponenta zmesi spreminja (Valentinčič,

2005). Pričakovali smo, da tudi cebrice zaznavajo binarno zmes kot njeno bolj učinkovito komponento, da so sposobne razlikovati binarno zmes od posameznih aminokislin – komponent zmesi. S pomočjo razlikovalnega treninga se razlikovanje med vonjavami pri ribah izboljša.

Voh omogoča pogojevanje rib na določene kemične dražljaje, ki izvirajo iz hrane. Med pogojevanjem se ribe naučijo, da določeni vonjavi sledi nagrada - hrana. Pogojni dražljaji, ki napovedujejo hrano, sprožijo intenzivnejše in daljše iskanje hrane kot nepogojni dražljaji (Valentinčič s sod., 1994; Valentinčič in Caprio, 1994). Predpostavili smo, da se cebrice na dražljaje, ki jih zaznajo kot enake pogojnemu dražljaju, odzovejo s enako količino plavanja kot na pogojni dražljaj, medtem ko se na dražljaje, ki jih zaznajo kot drugačne od pogojnega dražljaja odzovejo z manjšim plavanjem (Valentinčič s sod., 2000a). Na podlagi razlike v številu obratov telesa cebrice smo ugotavljali ali razlikujejo pogojni dražljaj od testnih dražljajev.



Slika 1: CEBRICA

PREGLED OBJAV

KEMIČNI DRAŽLJAJI IN KEMORECEPCIJA

Kemični dražljaji v vodnem okolju so majhne, v vodi topne organske molekule, kot so aminokisliline, nukleotidi, organske kisline in steroidi (Carr, 1988). V vodi raztopljene kemične snovi se s tokovi neenakomerno razširjajo v obliki vrtincev (eddies), ki vsebujejo visoke koncentracije kemičnih dražljajev (Valentinčič, 2004). Ribe zaznavajo kemijske dražljaje z vohom in okusom (Hara, 1992). Z okusom zaznavajo ribe majhno število kemijskih dražljajev. Vzburjenje, ki ga sproži okušalni dražljaj, se prenese v nižje možganske centre v hrbtenjači in sproži preproste reflekse, kot so obračanje, grizenje/hlastanje in požiranje hrane (Valentinčič, 2004). Okus sodeluje pri odkrivanju, izbiri, zaužitju hrane in pri obrambi pred strupenimi snovmi (Marui in Caprio, 1992). Nasprotno pa vohalni sistem omogoča zaznavo velikega števila kemičnih snovi. Aksoni vohalnih receptorskih nevronov vodijo v vohalni bulbus, ki skupaj s telencefalonom omogoča razlikovanje in učenje kemičnih dražljajev (Valentinčič, 2004; Valentinčič s sod., 1994).

Pri ribah sproži zaznava vonjave prehranjevalno vedenje, alarmne odzive, prepoznavanje predatorjev in socialno komunikacijo (Hara, 1992). Večino sestavljenih vedenj, kot je prehranjevalno vedenje, sestavljajo tri zaporedne faze: orientacijski odziv, apetitno vedenje in konzumacija. Pri krapovcih in somičih tudi okušalni dražljaji sprožijo in vzdržujejo prehranjevalno vzburjenje (Valentinčič, 2004; Valentinčič in Caprio, 1994). Prehranjevalno vedenje šarenk (*Oncorhynchus mykiss*, Salmonidae) sprožijo le vohalni in vidni dražljaji (Valentinčič in Caprio, 1997; Valentinčič s sod., 1999). Ribe, ki z vohom ali okusom iščejo hrano, to najdejo s pomočjo klinokineze (Fraenkel in Gunn, 1940; Valentinčič, 2004). Eddiji ribam ne posredujejo informacije o oddaljenosti in smeri hrane, pač pa samo idejo o njeni prisotnosti. Zato ribe intenzivno plavajo in se bodisi tropotaktično, bodisi zaradi ovir, obračajo, vir dražljaja večinoma zadenejo slučajno zaradi plavanja v različnih smereh po akvariju. Potrebni je veliko obratov, da riba najde izvor

dražljaja. Relativno dolgo osrednje vzburjeno stanje omogoča, da riba nadaljuje z iskanjem hrane dokler ne naleti na naslednji dražeči vrtinček, ki morda vsebuje izvor dražljaja (Valentinčič, 2004; 2005).

Na količino prehranjevalnega vedenja poleg pričakovanja nagrade vpliva tudi inhibicija zaradi strahu. Ključni dražljaji, ki prožijo strah in beg (npr. vibracije pri ameriških somičih in svetla podlaga pri kanalskih somičih), inhibirajo prehranjevalno vedenje (Valentinčič in Caprio, 1994; Valentinčič s sod., 2000a). Neboječe vrste rib, kot so zlate ribice, cebrice in šarenke, se začnejo odzivati na prehranjevalne dražljaje že 1-3 dni po prenosu v akvarij, medtem ko somiči, ki so zelo boječe vrste rib, potrebujejo več kot mesec dni aklimatizacije, preden se začnejo redno hraniti (Valentinčič in Caprio, 1994; Valentinčič, 2005). Poleg tega se lačne ribe hitreje in intenzivneje odzovejo na vohalne dražljaje kot site ribe (Atema s sod., 1980).

Prehranjevalni dražljaji rib so aminokislinae. Ribe zaznavajo aminokislinae s čutilom za voh in s čutilom za okus, vendar so raziskave pri ameriških somičih pokazale, da jim le voh omogoča učenje in razlikovanje med aminokislinae (Valentinčič s sod., 1994, 2000a; Valentinčič in Caprio, 1994). Voh omogoča pogojevanje rib na določene kemijske dražljaje, ki izvirajo iz hrane. Med pogojevanjem se ribe naučijo, da sledi znani vonjavi hrana. Pogojni dražljaji, ki napovedujejo hrano, sprožijo intenzivnejše in daljše iskanje hrane kot nepogojni dražljaji (Valentinčič s sod.; 1994, Valentinčič in Caprio, 1994). To omogoča ribi, da ne izgublja energije po nepotrebem in se zaradi manjšega odziva na nepogojne dražljaje manj časa izpostavlja predatorjem (Valentinčič, 2004).

ZGRADBA VOHALNEGA SISTEMA PRI CEBRICAH

Vohalni sistem cebric je podoben vohalnim sistemom ostalih vretenčarjev (Byrd in Brunjes, 1995). Sestavljajo ga periferni vohalni organ z vohalnim epitelom, vohalni bulbos in sprednji možgani.

Zgradba perifernega vohalnega organa cebric

Vohalne rozete kostnic ležijo v nosni votlini. Pokriva jih kožna guba z dvema parnima nosnicama, skozi katere teče voda (Byrd in Brunjes, 1995; Hansen in Zeiske, 1998). Vohalna rozeta je zgrajena iz osrednje osi in hrustančnih lamel, ki so pritrjene nanjo (Byrd in Brunjes, 1995; Hansen in Zeiske, 1998). Pri cebricah in somičih je čutilni epitel na notranji polovici lamel, epitel s kinocilijami pa pokriva zunanjo polovico lamel (Byrd in Brunjes, 1995; Baier s sod., 1994; Hansen in Zeiske, 1998). Čutilni epitel sestavljajo vohalne čutnice, oporne celice in bazalne celice (Byrd in Brunjes, 1995; Hansen in Zeiske, 1998). Vohalne čutilne celice so bipolarni nevroni. Njihovo telo leži v vohalnem epitelu, aksoni pa se v vezivu pod bazalno lamino epitela združijo v snope, ki tvorijo zunaj rozete vohalni živec. Vohalni živec vodi v vohalni bulbus (Byrd in Brunjes, 1995; Hansen in Zeiske, 1998). Dendriti vohalnih celic dosegajo površino epitela in se razširijo v gumb z dolgimi cilijami ali s kratkimi mikrovili (Byrd in Brunjes, 1995; Hansen in Zeiske, 1998). Posebne vohalne celice - kriptne celice imajo v notranjost ugreznjene cilije in mikrovile (Hansen in Zeiske; 1998). Njihov akson potuje skupaj z aksoni ostalih čutilnih celic proti vohalnemu bulbusu (Hansen in Zeiske, 1998). Med vohalnimi čutilnimi celicami so oporne celice s širokimi apikalnimi izrastki (Byrd in Brunjes, 1995; Hansen in Zeiske, 1998). Bazalne celice so kroglaste, brez daljših izrastkov in ležijo ob bazalni lamini (Byrd in Brunjes, 1995; Hansen in Zeiske, 1998). Nečutilni epitel sestavljajo stebričaste kinociliarne celice in mukozne čašaste celice (Byrd in Brunjes, 1995; Hansen in Zeiske, 1998).

Zgradba vohalnega bulbusa cebric

Vohalni bulbus cebric je parna struktura tik ob telencefalonu in je z vohalnim živcem povezan z vohalnimi rozetami (Byrd in Brunjes, 1995). Zgrajen je iz štirih plasti: plast vohalnega živca, glumerularna plast, plast mitralnih celic in plast granularnih celic (Byrd in Brunjes, 1995). Najbolj zunanjo plast bulbusa tvorijo aksoni vohalnih čutilnih celic med njimi pa so tudi glia celice (Byrd in Brunjes, 1995). Pod njo je glomerularna plast, v kateri so sinapse med končiči aksonov vohalnih čutilnih celic in dendriti mitralnih celic (Byrd in Brunjes, 1995). Sinaptične povezave so urejene v kroglaste pleteže - glomerule, ki so

funkcionalne enote bulbusa. Med njimi so glia in periglomerularne živčne celice. Glumeruli pri cebricah niso tako izraziti, kot pri sesalcih, najverjetneje zaradi manjšega števila glia in periglumerularnih celic (Baier in Korsching, 1994; Byrd in Brunjes, 1995). V bulbusu cebrice so našli približno 80 dobro vidnih glomerulov, ki so jih razdelili v pet skupin: dorzalni, ventralni, lateralni, medialni in anteriorni (Baier in Korsching, 1994). Pokazalo se je, da je splošen vzorec glomerulov zelo stereotipen. Položaj dobro vidnih glomerulov je pri različnih živalih podoben in ni odvisen od starosti, spola ali izvora živali (Baier in Korsching, 1994). Pod glomerularno plastjo je plast mitralnih celic, ki vsebuje celice različnih morfologij (Byrd in Brunjes, 1995). V njej so telesa ovratničastih - mitralnih celic in pri ribah tudi strehastih - ruffed celic (Fuller in Byrd, 2005). To so sekundarni nevroni, ki prenašajo vzburjenje iz bulbusa v višje možganske centre (Satou, 1992). Aksoni mitralnih celic izstopajo iz vohalnega bulbusa na ventralni strani v dveh snopih v medialnem in lateralnem vohalnem traktu (Byrd in Brunjes, 1995). Najgloblja plast bulbusa je zrnata plast. Dendriti zrnatih celic tvorijo inhibitorne sinaptične povezave z mitralnimi celicami (Byrd in Brunjes, 1995).

VOHALNI RECEPTORJI

Vohalne receptorje kodira velika genska družina, ki vsebuje pri ribah približno 100 genov za vohalne receptorske beljakovine (Nagai s sod., 1993; Barth, 1996). Receptorji vohalnih celic spadajo v naddružino receptorjev s sedmimi transmembranskimi domenami, na njih se navezujejo G-proteini (Nagai s sod., 1993). Velika raznolikost transmembranskih domen omogoča vezavo različnih ligandov (Nagai s sod., 1993). Posamezen vohalni receptor lahko veže več različnih vohalnih dražljajev (Nagai s sod., 1993; Malnic s sod, 1999; Fuss in Korsching, 2001). Posamezen receptor lahko veže različne snovi, posamezna kemijska snov pa se lahko z različnimi vezavnimi mesti veže na različne receptorje, saj različni vohalni receptorji prepoznajo različne podenote vonjavne molekule (Malnic s sod, 1999). Različni vohalni dražljaji so kodirani z različnimi edinstvenimi kombinacijami aktiviranih vohalnih celic, posamezen vohalni receptor je lahko komponenta edinstvene receptorske kode za več različnih vonjav (Malnic s sod, 1999). Tudi razlike v koncentraciji in majhne razlike v zgradbi molekule povzročijo razliko v kombinaciji aktiviranih

receptorjev in s tem v kombinaciji aktiviranih vohalnih receptorskih celic (Malnic s sod, 1999). Posamezna vonjava predstavlja kombinatno receptorsko kodo, ki omogoča razlikovanje velikega števila zelo raznolikih vonjav in hkrati razlikovanje med zelo podobnimi vonjavami (Malnic s sod, 1999). Vezavne lastnosti vohalnih receptorjev naj bi se odražale tudi v glumerularni plasti v vohalnem bulbusu, kjer različne vonjave tudi povzročijo različne vzorce aktivnosti (Friedrich in Korsching, 1997). Velika specifičnost nekombinatornih vzorcev glumerularne aktivnosti pri odzivu na feromone nakazuje obstoj posebnih vohalnih receptorjev, ki omogočajo zaznavo enkratnih in v naravi redkih molekul, kot so feromoni (Friedrich in Korsching, 1998).

Ekspresija genov za vohalne receptorje v vohalnih čutilnih celicah

Vsak vohalni receptorski nevron izrazi enega do nekaj receptorskih genov (Nagai s sod., 1993; Malnic s sod, 1999; Korsching, 2001). Pri cebricah nekateri vohalni receptorski nevroni izrazijo nekaj receptorskih genov, ki ponavadi pripadajo isti poddružini, medtem ko ostali izrazijo en receptorski gen (Sato s sod., 2007). Vohalni receptorski nevroni, ki izrazijo določen gen za receptorsko beljakovino, so razpršeni po celotnem vohalnem epitelu somiča (Nagai s sod., 1993). V vohalni rozeti cebric so vohalni receptorski nevroni, ki konvergirajo v isti glumerul v enakomernimi presledkih naključno razporejeni po celotnem vohalnem epitelu (Baier s sod., 1994). Pri sesalcih vsi aksoni receptorskih celic z istim receptorjem konvergirajo v iste glumerule (Mombaerts s sod., 1996). Podobno pri cebricah aksoni receptorskih nevronov, ki izrazijo gene receptorjev iz iste poddružine konvergirajo v prostorsko določen skupek glumerulov, čeprav je potrebno odnos en receptor - en glumerul še dokazati (Sato s sod., 2007). Odzivnost posameznega glomerula je na ta način povezana z lastnostmi receptorske molekule, ki jo izrazijo vohalne čutilne celice (Friedrich in Korsching, 1997; Korsching 2001). Razen tega pri sesalcih aksoni celic, ki izrazijo homologne gene za receptorske molekule, segajo v blizu skupaj ležeče različne glomerule (Tsuboi s sod. 1999). Majhna razlika v receptorju se prevede v majhno razliko v položaju ustreznega glomerula (Korsching, 2001). Zato kemično podobne snovi izzovejo podobne glumerularne vzorce aktivnosti (Korsching, 2001).

Vohalna transdukcija

Vohalni receptorji vežejo vohalne dražljaje, se ob tem aktivirajo in preko G-proteina sprožijo vohalno transdukcijsko kaskado. Vohalna transdukcija signala poteka preko IP₃ ali cAMP. Aminokislina pri cebricah sprožijo drugačno transdukcijo pot kot žolčne soli (Ma in Michel, 1998; Michel, 1999). Draženje z aminokislinami vpliva na sintezo IP₃ (Ma in Michel, 1998), draženje z žolčnimi solmi pa na sintezo cAMP (Michel, 1999). Ionskih tokovi v vohalnih čutilnih celicah cebric imajo podobne elektrofiziološke lastnosti kot pri ostalih vretenčarjih (Corotto s sod., 1996).

Občutljivost in specifičnost vohalnih receptorjev

Ribe lahko zaznavajo zelo nizke koncentracije kemičnih snovi v okolju (Caprio, 1978; Caprio in Byrd, 1984; Michel in Lubomudrov, 1995). Rezultati merjenja EOG odziva na vohalnem organu cebric so pokazali, da draženje z žolčnimi solmi povzroči večji odziv kot draženje z aminokislinami (Michel in Lubomudrov, 1995). Vzdražnostni prag zaznave aminokislin določen z merjenjem EOG je pri cebricah (Michel in Lubomudrov, 1995) med 10⁻⁷ in 10⁻⁹ M, podobno kot pri ameriškem somiču in drugih ribah (Caprio, 1978; Hara, 1992). Po učinkovitosti si sledijo nevtralne aminokislina > bazične aminokislina > kisle aminokislina > iminokislina (Michel in Lubomudrov, 1995). Amplituda EOG odziva na aminokislina eksponencialno narašča z logaritemskim povečanjem koncentracije dražljaja od vzdražnostnega praga do koncentracije 10⁻² M (Caprio, 1978). Značilen širok in dinamičen razpon odziva vohalnega organa na aminokislina, ki obsega 6-7 logaritemskih enot, je lahko posledica vezave aminokislin na več različnih receptorjev z različnimi vezavnimi afinitetami (Hara, 1992) oziroma posledica rekrutiranja vohalnih čutilnih celic z različnimi vzdražnostnimi pragi za isto testno snov.

Elektrofiziološke raziskave so dokazale obstoj relativno neodvisnih L- α aminokislinskih receptorskih mest ali različnih tipov receptorjev za kisle, bazične in nevtralne aminokislina s kratko stransko verigo in nevtralne aminokislina z dolgo stransko verigo (Caprio in Byrd, 1984; Kang in Caprio, 1991; Laberge in Hara, 2004). Razen tega obstajajo znotraj vsake

od skupin nevtralnih aminokislin vsaj še štiri različna receptorska mesta s prekrivajočimi specifičnostmi (Caprio in Byrd, 1984; Kang in Caprio, 1991) in pri somičih več kot eno receptorsko mesto za posamezne kisle in bazične aminokislino, medtem ko pri postrvih rezultati kažejo na prisotnost enega receptorskega mesta za bazične aminokislino (Kang in Caprio, 1991; Laberge in Hara, 2004). Nedavne elektrofiziološke raziskave na ameriških somičih so potrdile obstoj specifičnih vohalnih receptorskih nevronov za nevtralne aminokislino z dolgimi, nevtralne aminokislino s kratkimi stranskimi verigami, kisle in bazične aminokislino (Nikonov in Caprio, 2007). Razen tega se večina vohalnih receptorskih nevronov, ki se odzivajo samo na nevtralne aminokislino z dolgo stransko verigo odziva predvsem na aminokislino z dolgo linearno stransko verigo ali na tiste z razvejano stransko verigo, s povečanjem koncentracije pa se začnejo odzivati na obe skupini. Rezultati kažejo tudi na obstoj specifičnih nevronov za posamezne nevtralne aminokislino s kratkimi stranskimi verigami in za posamezne bazične aminokislino (Nikonov in Caprio, 2007).

Raziskave vohalnega razlikovanja aminokislin pri ameriških in kanalskih somičih so pokazale, da ti razlikujejo večino aminokislin (Valentinčič in Caprio, 1994; Valentinčič s sod., 1994; 2000a). Somiči bolje razlikujejo med aminokislinskimi z različnimi lastnostmi, se pravi med bazičnimi, kislimi, nevtralnimi z dolgimi stranskimi verigami in nevtralnimi aminokislinskimi s kratkimi stranskimi verigami. Vedenjske raziskave so potrdile obstoj relativno neodvisnih L- α aminokislinskih receptorskih mest za imino kislino (L-prolin), bazične aminokislino (L-arginin, L-lizin), nevtralne aminokislino z razvejano stransko verigo (L-izoleucin, L-valin), nevtralne aminokislino dolgo in ravno stransko verigo (L-norleucin, L-norvalin, L-metionin), nevtralne aminokislino z dolgo in razvejano stransko verigo (L-leucin) in nevtralne aminokislino s kratko stransko verigo (L-alanin, L-serin, L-glicin) (Valentinčič s sod., 2000a). V nekaterih primerih verjetno obstajajo različna, a delno prekrivajoča receptorska mesta znotraj posameznega razreda aminokislin, kot na primer za nevtralne aminokislino s kratko stransko verigo, čeprav v nekaterih primerih somiči ne razlikujejo aminokislino L-alanin od L-serina in L-glicina (Valentinčič s sod., 2000a). Ameriški somiči ne razlikujejo L-izoleucina in L-valina, dveh aminokislin z nepolarno razvejano stransko verigo. (Valentinčič s sod., 2000a). Podobno kot somiči,

razlikujejo aminokislino tudi cebrice, ki prav tako ne razlikujejo L-izolevcina od L-valina in tudi L-tirozina od L-fenilalanina (Valentinčič s sod., 2005).

KODIRANJE VOHALNIH DRAŽLJAJEV V GLUMERULARNI PLASTI VOHALNEGA BULBUSA

Draženje vohalnega epitela cebric z različnimi kemičnimi snovmi aktivira različne dele vohalnega bulbusa, torej so podregije vohalnega bulbusa funkcionalno specializirane (Friedrich in Korsching, 1997, 1998). Takšna prostorska razporeditev vzorcev aktivnosti se pri cebricah vzpostavi že med začetkom razvoja vohalnega bulbusa, ko glumeruli še niso izoblikovani in se ohrani med rastjo in razvojem nevronske mreže vse do odrasle živali (Li s sod., 2005). Aminokislino aktivirajo glomerule na ventro-lateralnem delu bulbusa, žolčne soli glomerule na medialnem delu, nukleotidi glomerule na lateralno-posteriornem delu in feromoni na ventralno-posteriornem delu bulbusa cebric (Friedrich in Korsching, 1997, 1998). Rezultati optičnega slikanja na cebricah se kljub nekaterim razlikam v splošnem ujemajo z rezultati elektrofizioloških raziskav na somičih in postrvih, ki so prav tako pokazali, da različne kemijske snovi aktivirajo funkcionalno specializirane regije v vohalnem bulbusu (Nikonov in Caprio, 2001; Laberge in Hara, 2004).

Navadne vonjave (aminokislino, žolčne soli, nukleotidi) izzovejo prekrivajoče, a specifične, vzorce aktivnosti, ki vključujejo številne glumerule (Friedrich in Korsching, 1997, 1998; Fuss in Korsching, 2001). Tako so sestavljeni kombinirani vzorci aktivnosti dovolj različni, da omogočajo razlikovanje zelo podobnimi molekulami (Friedrich in Korsching, 1997, 1998, Fuss in Korsching, 2001). Feromoni, ki so enkratne snovi, različne od običajnih metabolnih produktov, aktivirajo posamezne glomerule in niso predstavljeni kombinatorno (Friedrich in Korsching, 1998; Korsching, 2001). Kapaciteta kodiranja je pri feromonih omejena s številom glumerulov, teoretično pa ne potrebuje nadaljnega procesiranja (Friedrich in Korsching, 1998). Splošne značilnosti vzorcev glumerularne aktivnosti, ki jih izzove isti dražljaj, so med posamezniki približno enake (Friedrich in Korsching, 1997, 1998).

Aminokislina so naravne vonjave, ki sprožijo aktivnost v ventro-lateralnem delu vohalnega bulbosa (Friedrich in Korsching, 1997, 1998; Fuss in Korsching, 2001). Za aktivacijo glomerulov na delu bulbosa, ki se odziva na aminokislina, so potrebne karboksilna skupina, α -amino skupina in L-konformacija molekule (Friedrich in Korsching, 1997; Fuss in Korsching, 2001). Vsaka aminokislina izzove edinstven vzorec glomerularne aktivnosti (Friedrich in Korsching, 1997). Aminokislina z daljšo stransko verigo aktivirajo večje število glomerulov. Učinkovite so tudi aminokislina, ki jih v naravi ne najdemo (Fuss in Korsching, 2001; Lipschitz in Michel, 1999). Na vzorec aktivnosti glomerulov vpliva tudi koncentracija raztopine aminokislin, saj je pri višjih koncentracijah aktivirajo tudi receptorji z nižjo afiniteto, kar pomeni več aktivnih glomerulov (Friedrich in Korsching, 1997; Fuss in Korsching, 2001). Posamezne glomerule aktivira več različnih aminokislin, zato ti sodelujejo v različnih vzorcih aktivnosti (Friedrich in Korsching, 1997; Fuss in Korsching, 2001). Vzorci glomerularne aktivnosti, ki jih povzročijo strukturno podobne aminokislina, so si bolj podobni kot vzorci, ki jih povzročijo strukturno različne aminokislina (Friedrich in Korsching, 1997). Tako naj bi aminokislinski dražljaji spadali vsaj v štiri skupine s skupnimi molekularnimi značilnostmi, ki se kažejo v glomerularnih vzorcih aktivnosti (Friedrich in Korsching, 1997). Te skupine so nevtralne aminokislina s kratkimi verigami, bazične aminokislina, nevtralne aminokislina z dolgimi nepolarnimi verigami in kisle aminokislina (Friedrich in Korsching, 1997). Glede na rezultate navzkrižne adaptacije vohalnega organa ameriških somičev so razvrstili aminokislina v praktično enake skupine (Caprio in Byrd 1984). Tako naj bi vzorci aktivnosti med drugim odražali tudi vezavne lastnosti vohalnih receptorjev (Friedrich in Korsching, 1997). To predstavlja kemotopični nivo kodiranja vonjav (Friedrich in Korsching, 1997). Podobni kemotopični vzorci podobnih molekul omogočajo lateralno inhibicijo, saj so ti glomeruli blizu skupaj (Friedrich in Korsching, 1997, 1998).

DOGODKI V VOHALNEM BULBUSU

Tako kot vohalni receptorski nevroni se tudi mitralne celice odzivajo na več vohalnih dražljajev (Friedrich in Laurent, 2001, 2004; Friedrich s sod., 2004). Tudi na nivoju mitralnih celic je informacija o dražljaju predstavljena kombinatorno - z vzorci aktivnosti

skupin nevronov (Friedrich in Lauent, 2004). Medtem ko je za vohalne receptorske nevrone značilna stereotipna fazično tonična modulacija intenzitete odziva na dražljaje, ki se med draženjem ne spreminja, izzovejo vohalni dražljaji v mitralnih celicah časovno strukturirano aktivnost (Friedrich in Lauent, 2001, 2004; Friedrich s sod., 2004). Mitralne celice cebric se na draženje odzivajo s kompleksnimi časovno odvisnimi vzorci aktivnosti, ki so značilni za posamezne vonjave in so pogosto sestavljeni iz zaporednih faz ekscitacije in inhibicije mitralnih celic (Friedrich in Lauent, 2001, 2004; Friedrich s sod., 2004). Pri raziskavi elektrofizioloških odzivov mitralnih celic ameriških somičev niso zaznali spreminjanja aktivnosti v času draženja s posamezno aminokislino (Nikonov in Caprio, 2004). Vzorec aktivnosti mitralnih celic cebric se med draženjem spreminja več sto milisekund od začetka draženja (Friedrich in Lauent, 2001, 2004; Friedrich s sod., 2004). Razen tega izzovejo vohalni dražljaji lokalne oscilacije napetosti, ki se v obliki valovanja širijo preko vohalnega bulbosa (Friedrich in Lauent, 2001, 2004; Friedrich s sod., 2004). Ker hitrost in smer valovanja nista odvisna od dražljaja, samo valovanje ne vsebuje informacije o vohalnem dražljaju. Možno je, da zagotavlja valovaje periodično uro za sinhronizacijo mitralnih celic (Friedrich in Lauent, 2004). Od vohalnega dražljaja je odvisno, katere mitralne celice se sinhronizirajo in katere ne (Friedrich in Lauent, 2001, 2004; Friedrich s sod., 2004). Vzorci sinhroniziranih aktivnosti, ki jih izzovejo strukturno podobne aminokislino, si s časom postanejo podobni, a različni od ostalih skupin (Friedrich in Lauent, 2001, 2004). Skupine aminokislin, ki so jih določili na ta način, so podobne kot tiste, ki so jih določili glede na rezultate navzkrižne adaptacije vohalnega organa ameriških somičev in v raziskavah glumerularne aktivnosti v vohalnem bulbosu cebric (Caprio in Byrd 1984, Friedrich in Korsching, 1997). Razlike med vzorci nesinhroniziranih akcijskih potencialov in skupnimi vzorci vseh akcijskih potencialov, ki jih izzovejo strukturno podobne aminokislino, se povečajo in vzorci postanejo bolj specifični, zato verjetno prenašajo informacijo o identiteti aminokislino (Friedrich in Lauent, 2001, 2004). Pomembna redistribucija aktivnosti preko populacije mitralnih celic. Na ta način začetno podobni vzorci aktivnosti, ki sledijo odzivu vohalnih receptorskih nevronov, postanejo zaradi lateralne inhibicije bolj specifični (Friedrich in Lauent, 2001, Friedrich s sod., 2004).

ZAZNAVANJE ZMESI AMINOKISLIN

Vohalni dražljaji v naravnem okolju so ponavadi zmesi vohalnih dražljajev. Mnoge raziskave so poročale, da ob odzivu na zmesi pride do supresije oziroma pojačanja, zaradi česar naj bi bil odziv na zmesi nenapovedljiv tudi, če so odzivi na posamezne komponente poznani (citirano po Kang in Caprio, 1997). Elektrofiziološke raziskave na ameriških somičih so pokazale, da je odziv na zmesi predvidljiv ob upoštevanju relativne neodvisnosti receptorskih mest za posamezne komponente zmesi (Caprio s sod., 1989; Kang in Caprio, 1991). Zmesi aminokislin, ki se vežejo na relativno neodvisna receptorska mesta, povzročijo večji elektrofiziološki odziv kot posamezne komponente zmesi (Caprio s sod., 1989; Kang in Caprio, 1991). Različne komponente zmesi lahko sočasno aktivirajo več različnih receptorskih mest (Caprio s sod., 1989; Kang in Caprio, 1991). Kadar se komponente zmesi vežejo na iste tipe receptorskih mest, je elektrofiziološki odziv na zmes manjši od seštevka odzivov na komponente zmesi (Caprio s sod., 1989; Kang in Caprio, 1991). Verjetna razlaga opažene supresije je, da se komponente zmesi z različnimi afinitetami kompetativno vežejo na iste receptorje (Caprio s sod., 1989; Kang in Caprio, 1991). Rezultati glumerularnih vzorcev aktivnosti v vohalnem bulbusu cebric so pokazali, da so v perifernem vohalnem sistemu odzivi na preproste binarne in kompleksne zmesi vonjav predvidljivi glede na odzive na posamezne komponente zmesi in so interakcije med komponentami zmesi redke ali zanemarljive (Tabor s sod., 2004). Posamezni elementi vzorca glumerularne aktivnosti, ki jih izzove zmes aminokislin, so aktivni tudi v odzivu na vsaj eno od komponent zmesi (Tabor s sod., 2004). Podobno je tudi večina elektrofizioloških odzivov posameznih receptorskih nevronov ameriških somičev na binarno zmes aminokislin podobna odzivu na vsaj eno komponento zmesi, čeprav so v nekaterih primerih opazili prisotnost interakcij med komponentami zmesi (Kang in Caprio, 1997). Tudi odziv posamezne mitralne celice na binarno zmes aminokislin je pri cebricah in somičih podoben odzivu na vsaj eno komponento zmesi, a so pri obeh opazili določene interakcije med komponentami zmesi (Kang in Caprio, 1991; Tabor s sod., 2004). Medtem ko je vzorec aktivnosti mitralnih celic cebric pri odzivu na binarne zmesi aminokislin podoben odzivoma obeh komponent zmesi in tako še vsebuje informacije o posameznih komponentah, pa vzorec aktivnosti mitralnih celic pri odzivu na kompleksne zmesi vsebuje

nove značilnosti (Tabor s sod., 2004). V predstavitev zmesi se tako informacije o komponentah zmesi zmanjšujejo z večanjem števila komponent v zmesi (Tabor s sod., 2004).

Vedenjske raziskave na ljudeh in somičih so pokazale, da ti v preprostih zmesih zaznavajo posamezne komponente zmesi in je zaznava odvisna od učinkovitosti komponent v zmesi (Laing in Willcox, 1983; Valentinčič s sod., 2000b). Ljudje binarno zmes vonjav zaznajo kot njeno učinkovitejšo komponento (Laing in Willcox, 1983), prepoznavanje posameznih komponent v zmesi pa postane nemogoče, ko število komponent preseže 3-4 (Laing in Glemarec, 1992; Livermore in Laing, 1996). Somiči prav tako prvotno zaznavajo binarne in ternarne zmesi aminokislin kot najučinkovitejšo (večja amplituda EOG) komponento in je od nje ne razlikujejo (Valentinčič s sod., 2000b; Valentinčič, 2005). Od zmesi pa razlikujejo manj dražeče komponente binarnih in ternarnih zmesi in ostale aminokislino. Razlikovanje med vonjavami pri ribah se lahko izboljša s pomočjo razlikovalnega treninga (Valentinčič s sod., 2000a). Z razlikovalnim treningom ribe v zmesi zaznajo razlike, ki jih povzročajo manj učinkovite komponente zmesi in začnejo razlikovati zmes od najbolj učinkovite sestavine zmesi. Binarno zmes enako učinkovitih aminokislin somiči zaznajo enkrat kot eno, drugič kot drugo komponento (Valentinčič s sod., 2000b). Ljudje v binarni zmesi, v kateri sta obe sestavini enako učinkoviti, zaznajo obe sestavini (Laing in Willcox, 1983). Po drugi strani pa zmesi, sestavljene iz več kot petih (ljudje; Laing in Livermore, 1992,) oziroma šestih (somiči) zaznavajo kot nove kvalitete (Valentinčič s sod. 2000; Valentinčič, 2005). V njih ločeno ne zaznavajo bolj učinkovite komponente zmesi. Razlikujejo pa lahko zmes 7 aminokislin od zmesi 6 enakih aminokislin. Razlike med zmesjo iz 12 aminokislin in zmesjo iz 11 aminokislin pa so premajhne za uspešno razlikovanje (Valentinčič s sod 2004; Valentinčič, 2005).

MATERIAL IN METODE DELA

POSKUSNE ŽIVALI

Poskuse smo izvajali na cebricah (*Danio rerio*), ki smo jih vzgojili v akvariju Oddelka za biologijo Univerze v Ljubljani ali pa smo jih kupili v akvaristični trgovini v Ljubljana. Pred poskusi so bile cebrice v 30 litrskih akvarijih, zaraščenih z javanskim mahom (*Vesicularia dubyana*), hranili smo jih s hrano v lističih ter z zmrznjenimi ličinkami komarjev. Med poskusi so bile cebrice v 10 litrskih akvarijih. Pred začetkom poskusov smo akvarije očistili, na dno nanegli približno 1 cm peska in jih napolnili z deklorirano vodo. Nato smo v vsak akvarij prenesli naključno izbrano ribo. Zaradi stiropornih plošč med akvariji se cebrice v ločenih akvariji niso videle med seboj. Poskuse smo izvajali v zaprtem 2000 litrskem krožnem sistemu, ki ga sestavljajo zbirni rezervoarji (~1400 litrov vode), filter (~500 litrov) in petindvajset akvarijev (27x18x20cm). Temperatura vode je bila med 21° in 26°C. Akvariji so bili dnevno osvetljeni 16 ur. Cebrice v poskusih smo hranili z narezanimi rdečimi ličinkami komarjev proizvajalca Birds Paradise izključno med pogojevanjem.

DRAŽLJAJI

V poskusih smo uporabljali aminokislino L-alanin (L-Ala), L-prolin (L-Pro) L-izoleucin (L-Ile), L-leucin (L-Leu) proizvajalca Fluka Chemie (Buchs, Švica), L-arginin hidroklorid (L-Arg HCl), L-serin (L-Ser), L-valin (L-Val), L-norvalin (L-nVal), L-histidin (L-His), L-cistein (L-Cys) proizvajalca Sigma Chemical Co. (St. Louis, ZDA) in L-lizin hidroklorid (L-Lys HCl) proizvajalca BDH Chemicals (Poole, Velika Britanija). Ker so hidrokloridi bazičnih aminokislin boljše topni v vodi kot bazične aminokislino in ker se pri višjih koncentracijah raztopin pH hidrokloridov ne spreminja, smo namesto čistih bazičnih aminokislin uporabljali njihove hidrokloride.

Aminokisliline smo stehali na elektronski tehtnici (Železniki, Slovenija) v 10 ml polistirenskih posodicah za enkratno uporabo (VWR International; Bridgeport, ZDA). Raztopine aminokislin smo tik pred poskusom pripravili v 50 ml akvarijske vode. Koncentracije v treh binarnih zmesih L-Ala in L-Arg so bile določene glede na fiziološko (amplituda EOG) učinkovitost komponent zmesi (Michel in Lubomudrov, 1995):

učinkovitejša komponenta zmesi L-Ala - **pogojna zmes**:

koncentracija L-Ala 2×10^{-2} M

koncentracija L-Arg 10^{-3} M

učinkovitejša komponenta zmesi L-Arg

koncentracija L-Ala 10^{-4} M

koncentracija L-Arg 3×10^{-2} M

komponenti zmesi enako učinkoviti

koncentracija L-Ala 10^{-4} M

koncentracija L-Arg 10^{-3} M

Koncentracije testnih aminokislin so bile 3×10^{-3} M. V zmesi L-Ala in L-Pro sta bili koncentraciji obeh 10^{-1} M. V okušalnih testih smo uporabili aminokisliline L-Ala, L-Arg, L-Pro, L-Ser, L-Val, L-Leu, L-Ile in L-Cys v koncentraciji 10^{-1} M.

Raztopine aminokislin smo injicirali v akvarije s pomočjo hidravličnega sistema brizgalk pripetih na 4-5 m dolge plastične cevke. V gumijaste nastavke na koncu cevk smo namestili Pasteurjeve pipete in jih napolnili s podtlakom, ki smo ga ustvarili v injekcijski brizgi na koncu povezovalnih cevk. Konice pipet smo namestili v dovodne cevke, skozi katere je na sredino vodne površine vsakega akvarija dotekala voda iz filtra. Ker smo v razmeroma velik dotok vode dodali samo 1 ml raztopine aminokisliline, riba ni mogla opaziti mehanske spremembe dotoka v akvarij.

Razširjanje dražljaja po akvariju smo opazovali z vbrizganjem mleka v akvarije. Ker cebrice plavajo zelo hitro in so videle mlečno suspenzijo, so zaplavale vanjo v manj kot 5 sekundah. Vidni mlečni oblak je dosegel dno akvarija v približno 5 sekundah in stranice akvarija v manj kot 30 sekundah. Podane koncentracije veljajo za koncentracijo raztopine pred vbrizganjem v akvarij. Raziskave so pokazale (Valentinčič in Caprio, 1994b), da je 10-30 sekund po vbrizganju koncentracija vbrizgane raztopine v 80 litrskih akvarijih v

središču vrtinčka (eddy) 300-3000 krat nižja kot koncentracija te raztopine pred vbrizganjem v akvarij. Ker smo naše poskuse na cebricah opravljali v manjših 10 litrskih akvarijih s pretočno vodo namesto zračenja, smo izmerili razporeditev dražljajev in njihove koncentracije v naših poskusnih pogojih. Na različnih globinah in razdaljah od mesta vbrizganja dražljaja smo z ogljikovo redox elektrodo merili koncentracije dopamina. V akvarij smo vbrizgali 1 ml 3×10^{-2} M dopamina. Približno 4 sekunde po vbrizganju je bila koncentracija dopamina na dnu akvarija pod mestom dotoka dražljaja 60 do 1500 krat nižja od vbrizgane. Vrtinček je ponavadi prešel elektrodo v manj kot ~5 sekundah. Deset centimetrov proti koncem akvarija je bila koncentracija dopamina 400 do 1500 krat nižja od vbrizgane. Vrtinčki so dosegli obe strani akvarija ~6 sekund po vbrizganju. Končni faktor redčenja po dodatku raztopine aminokislina v akvarij je bil 10000x. Voda se je v akvarijih zamenjala v približno treh urah, s pretokom vode skozi filter pa je koncentracija aminokislina upadla na koncentracijo ozadja, ki je za različne aminokislina med 10^{-9} do 10^{-7} M (Michel in Lubomudrov, 1995).

Steklovino, ki smo jo potrebovali pri pripravi in vbrizgavanju raztopin aminokislin, smo pred uporabo spirali 5x po 2 minuti z vročo vodo in 5x po 2 minuti z vodo iz akvarijskega sistema. Čistost steklovine smo potrdili tako, da po vbrizganju akvarijske vode ribe niso povečale aktivnosti. Da bi preprečili nalaganje vodnega kamna in razvoj bakterij na stenah pipet, smo vsakih nekaj poskusov steklovino oprali z detergentom Kemex (Kemika; Zagreb, Hrvaška).

POTEK POSKUSOV

Poskuse smo opravili na petnajstih cebricah. Cebrice smo pogojili na zmes L-Ala in L-Arg tako, da smo jih 90 sekund po vbrizganju pogojne zmesi v akvarij nagradili s hrano. Da ne bi cebric navadili na stalno hranilno mesto, smo mesto dajanja nagrade med poskusi menjali. Vse poskuse, razen pogojevanja, smo posneli z digitalno kamero DM-MV1E (Canon, Japonska). Med snemanjem je bila kamera oddaljena najmanj 2,5 m od testnega akvarija, med snemanjem z roke pa manj kot 0,5 m od testnega akvarija. Aktivnost cebric smo beležili s štetjem obratov večjih od 90 stopinj. Posamezno ponovitev dražljaja smo

vedno izvedli na vseh ribah in smo šele nato nadaljevali z naslednjim dražljajem. Med zaporednimi pogojevanji je preteklo >30 minut med zaporednimi testi pa >50 minut. Pogojevanja smo ponavljali dokler se ribe niso redno odzivale na pogojno zmes. Vsakih deset pogojevanj smo v akvarij vbrizgali raztopino primerjalne aminokislina, ki ji ni sledila nagrada. V ta namen smo uporabili 3×10^{-3} L-Pro. S testiranjem smo pričeli po 30 pogojevanjih.

Dvakrat smo testirali razlikovanje pogojne binarne zmesi aminokislin od desetih raztopin posameznih aminokislin. Testne aminokislina so bile L-Ala, L-Arg, L-Ser, L-Val, L-nVal, L-Lys, L-Leu, L-Pro, L-His, in L-Ile. Ker je bil odziv na aminokislina L-Ser in L-Ala višji od ostalih testiranih aminokislin, smo ju v drugi seriji dovajali med dvema pogojnima dražljajema. S tem smo ribam omogočili, da so zaporedoma primerjale pogojni in nepogojni dražljaj. Ker cebrice tudi v drugi seriji niso razlikovale L-Ala in pogojne zmesi smo nadaljevali z razlikovalnim treningom. Skupno smo 17 krat dražili z L-Ala med dvema pogojnima dražljajema. Nato smo testirali še razlikovanje pogojne zmesi od dveh binarnih zmesi z istima komponentama kot v pogojni zmesi. V eni testni zmesi smo kot učinkovitejšo komponento zmesi določili L-Arg, ki je v pogojni zmesi manj učinkovita komponenta. V drugi testni zmesi sta bili obe komponenti enako učinkoviti glede na EOG. Na koncu smo še tretjič testirali razlikovanje aminokislin od pogojne binarne zmesi.

Da bi preverili okušalne odzive na pogojno zmes (vbrizgana koncentracija: 2×10^{-2} M L-Ala in 10^{-3} M L-Arg), na zmes M L-Ala in L-Pro (vbrizgani koncentraciji: 10^{-1} M) in odziv na L-Arg (vbrizgana koncentracija 10^{-1} M) smo večkrat posneli odzive 7 največjih cebric od blizu. Posnetke smo s pomočjo programa Windows movie maker pregledali po posameznih slikah. Poiskali in prešteli smo primere, ko je cebrica šavsnila vodo (odprta usta). Pri odzivih na L-Arg smo opazili, da so cebrice v večji meri in intenzivneje kot običajno pobirale alge na dnu. Da bi preverili ali se cebrice na draženje z L-Arg odzovejo tudi z večjim številom obratov med plavanjem, smo odzive na pogojni dražljaj primerjali z odzivi na L-Arg. Testirali smo še odzive na draženje z L-Arg 60, 30 in 20 minut po draženju z zmesjo L-Ala in L-Pro in 20 minut po draženju z raztopino L-Ala in raztopino L-Pro. Vbrizganje naslednjega dražljaja 20 do 30 minut po vbrizganju prejšnjega dražljaja bi povzročilo nastanek zmesi obeh dražljajev v akvariju. V nadaljevanju smo posneli od blizu

odzive po vbrizganju šestih 10^{-1} M aminokislin: L-Ala, L-Cys, L-Ser, L-Val, L-Leu in L-Ile. Draženje poteka s kontaktnimi koncentracijami aminokislin, ki so 60-1500 krat nižje kot vbrizgane koncentracije.

Pri štetju primerov, ko je imela cebrica po draženju z 10^{-1} M aminokislinami odprta usta, so bili rezultati nezanesljivi. Odprta usta cebric smo ujeli večinoma med grizenjem po tleh, po stenah akvarija in po površini vode. Ker so cebrice majhne in izredno hitre ribe je bilo število primerov, ko smo ujeli cebrico z odprtimi usti zelo odvisno od hitrosti plavanja in položaja ribe v akvariju. Pri grizenju po tleh se usta cebrice dostikrat niso videla in smo zato našteali manj primerov odprtih ust. Prav tako nismo mogli zanesljivo prešteti primerov odprtih ust med hitrim plavanjem po akvariju. Največ odprtih ust smo našteali kadar je cebrica plavala pred sprednjo steno akvarija ali pa je grizla po površini. Zaradi nezanesljivosti rezultatov nismo vključili med rezultate in diskusijo.

OVREDNOTENJE IN PRIKAZ REZULTATOV

Vedenjski odziv rib na vohalne dražljaje smo ocenili s štetjem obratov večjih od 90 stopinj v času 90 sekund po vbrizganju dražljaja. Rezultate smo predstavili z mediano in interkvartilnim razponom števila obratov. Če smo testno aminokislino dovajali med dvema pogojnima dražljajema smo odziv nanjo primerjali z vsakim od sosednjih pogojnih dražljajev. Pri razlikovalnem treningu smo odziv na testni in pogojni dražljaj primerjali tudi za vsako ribo posebej. Izračunali smo mediano in interkvartilni razpon obratov za vse testne in pogojne dražljaje med razlikovalnim treningom pri isti ribi. Statistično razliko med številom obratov na pogojno in testno zmes smo ovrednotili z Wicoxonovim testom predznačenih rangov, ki je neparametričen dvosmeren statistični test. Za risanje histogramov smo uporabili program SigmaPlot.

Med poskusi so tri cebrice skočile iz akvarijev, ribo številka 13 smo zamenjali na začetku in ribo številka 8 na koncu prve serije testiranja. Zamenjano ribo smo upoštevali v rezultatih, saj ni bistveno vplivala na razliko v mediani (razlika ± 1 obrat). Ribo številka 9 smo izgubili na začetku tretje serije testiranja, delo smo nadaljevali s 14 cebricami.

REZULTATI

POGOJEVANJE

Testi spontane aktivnosti, ko v akvarij nismo vbrizgali dražljajev, kažejo na veliko aktivnost neizkušeni cebric (sl. 2). Razlika med medianami števila obratov med spontano aktivnostjo in medianami po draženju s pogojno zmesjo je velika od prvega testa dalje. V prvih desetih pogojevanjih so bile mediane pogojnih odzivov med 54 in 70 obratov, mediane spontanega plavanja in odziva na vodno kontrolo pa med 25 in 39. Interkvartilni razponi pogojnega odziva, spontane aktivnosti in kontrolne aktivnosti so se pogosto prekrivali. Število obratov med spontano aktivnostjo in draženjem s pogojno zmesjo se je med posameznimi cebricami precej razlikovalo. Odziv posamezne ribe na pogojni dražljaj je bil v prvih desetih ponovitvah večinoma bolj ali manj večji od kontrolne aktivnosti, vendar je nihalo iz ene ponovitve v drugo in bil v nekaterih primerih celo nižji od kontrole. V naslednjih ponovitvah pogojnega dražljaja se je mediana pogojnega odziva povečala na 59 do 70 obratov medtem, ko se je mediana kontrole ustalila med 26 in 30 obrati. Interkvartilni razponi pogojnega odziva in kontrole se niso prekrivali. Pri nekaterih cebricah se je odziv na pogojni dražljaj med pogojevanjem nekoliko povečal, pri večini cebric pa se je ustalil pri vrednostih, ki so bile vsaj 1,5 krat večje od kontrolne aktivnosti. Pri nekaterih cebricah je bila razlika med kontrolno aktivnostjo in odzivi na pogojni dražljaj visoka že od prvih primerjavah. Po deseti in dvajseti ponovitvi pogojnega dražljaja smo v akvarij vbrizgali raztopino primerjalne aminokislino - 3×10^{-3} L-Pro, ki ji ni sledila nagrada. Cebrice so že po desetih pogojevanjih bolj odzivale na pogojno zmes kot na nepogojeno aminokislino, saj je bila mediana števila obratov med odzivom na nepogojeno aminokislino približno dvakrat manjša kot med odzivom na pogojni dražljaj. Ta razlika je bila značilna.

TESTIRANJE RAZLIKOVANJA AMINOKISLIN IN ZMESI AMINOKISLIN OD POGOJNE ZMESI

V prvi seriji testiranja razlikovanja desetih aminokislin od pogojne zmesi so bili vsi testni odzivi, razen odziva na L-Ala, značilno manjši od odziva na pogojni dražljaj. Pri osmih od deset testiranih aminokislin so bili zgornji kvartili aktivnosti nižji od mediane pogojnega dražljaja. Odziv na aminokislino L-Ser je bil večji od odziva na ostale aminokislino, vendar značilno manjši od odziva na pogojno zmes. Odziv na aminokislino L-Ala (učinkovitejša komponenta pogojne zmesi) se statistično ni razlikoval od odziva na pogojno zmes. V drugi seriji testov so cebrice na vse aminokislino razen L-Ala plavale značilno manj kot na pogojni dražljaj. Odziv na L-Ser ni bistveno odstopal od ostalih testiranih aminokislin (sl. 3). Tretjo serijo testov smo izvedli po koncu razlikovalnega treninga in po testiranju razlikovanja dveh binarnih zmesi sestavljenih iz istih komponent kot pogojna zmes v drugačnih razmerjih (sl. 4). Tudi v tretji seriji so cebrice razlikovale vse testirane aminokislino razen L-Ala od pogojne zmesi. Cebrice so od pogojne zmesi razlikovale tudi zmes L-Ala in L-Arg, v kateri je bil L-Arg učinkovitejša komponenta (sl. 5). Po draženju z zmesjo L-Ala in L-Arg v kateri sta bili komponenti zmesi enako učinkoviti, so cebrice plavale značilno manj kot po draženju s pogojno zmesjo (sl. 5).

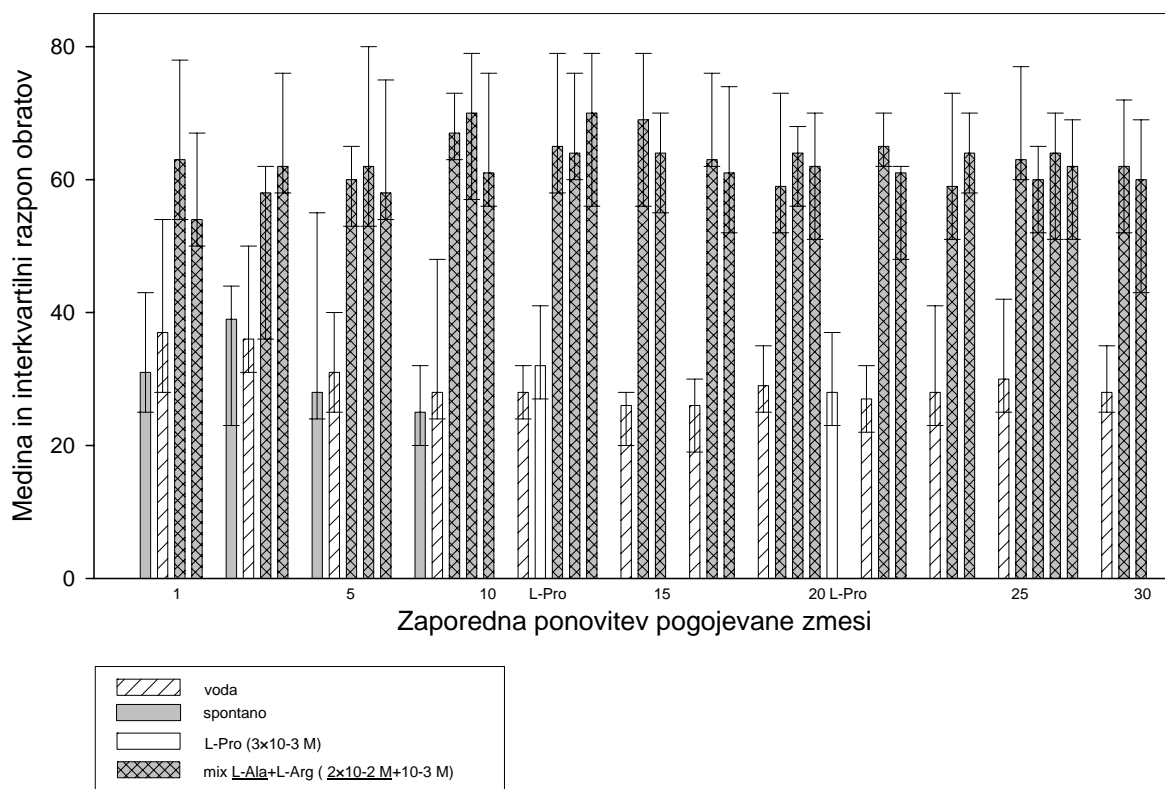
RAZLIKOVALNI TRENING

Pri razlikovalnem treningu smo poskušali ribe naučiti, da bi razlikovale pogojno zmes L-Ala (bolj dražeča komponenta) in L-Arg od samega L-Ala. L-Ala smo testirali med dvema pogojnima dražljajema. Mediane odzivov na L-Ala so bile manjše od median pogojnih odzivov, interkvartilni razponi so bili veliki (sl. 6). Rezultati dveh tretjini testov so bili statistično značilni, ena tretjina pa ne. Prvih sedem primerjav se odzivi na pogojno zmes in L-Ala niso statistično razlikovali. Po sedmih primerjavah so začele cebrice razlikovati pogojno zmes od L-Ala. Od sedme primerjave naprej so se odzivi na pogojni dražljaj in odzivi na L-Ala razlikovali statistično 18 krat, 8 krat pa ne.

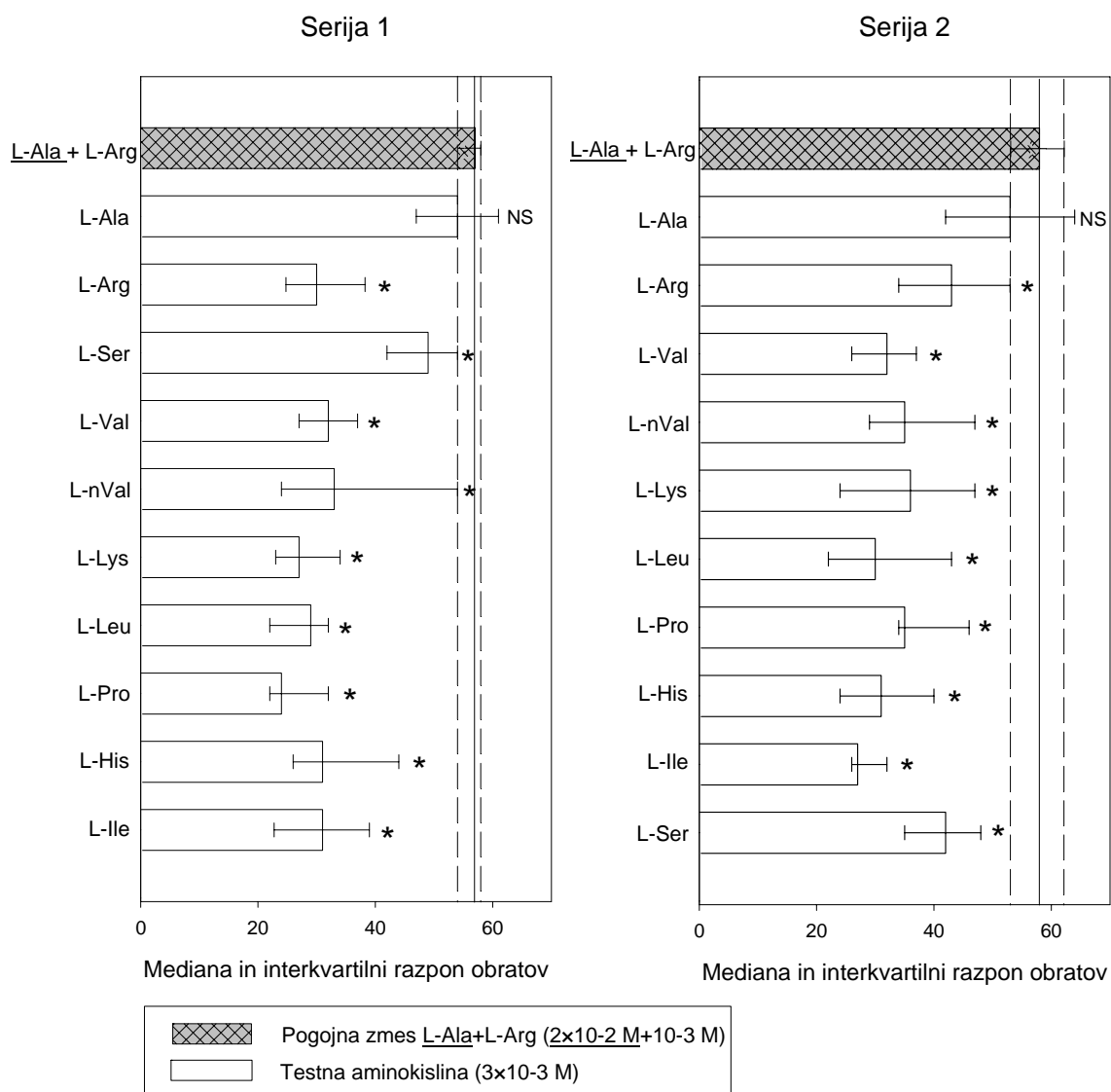
Odziv na L-Ala smo primerjali s pogojnim odzivom tudi za vsako posamezno ribo. Trinajst cebric je značilno razlikovalo pogojno zmes in L-Ala, dve cebrici pa bolj dražljive amino kisline nista razlikovali od pogojne zmesi (sl. 7).

ODZIVI NA OKUŠALNE DRAŽLJAJE

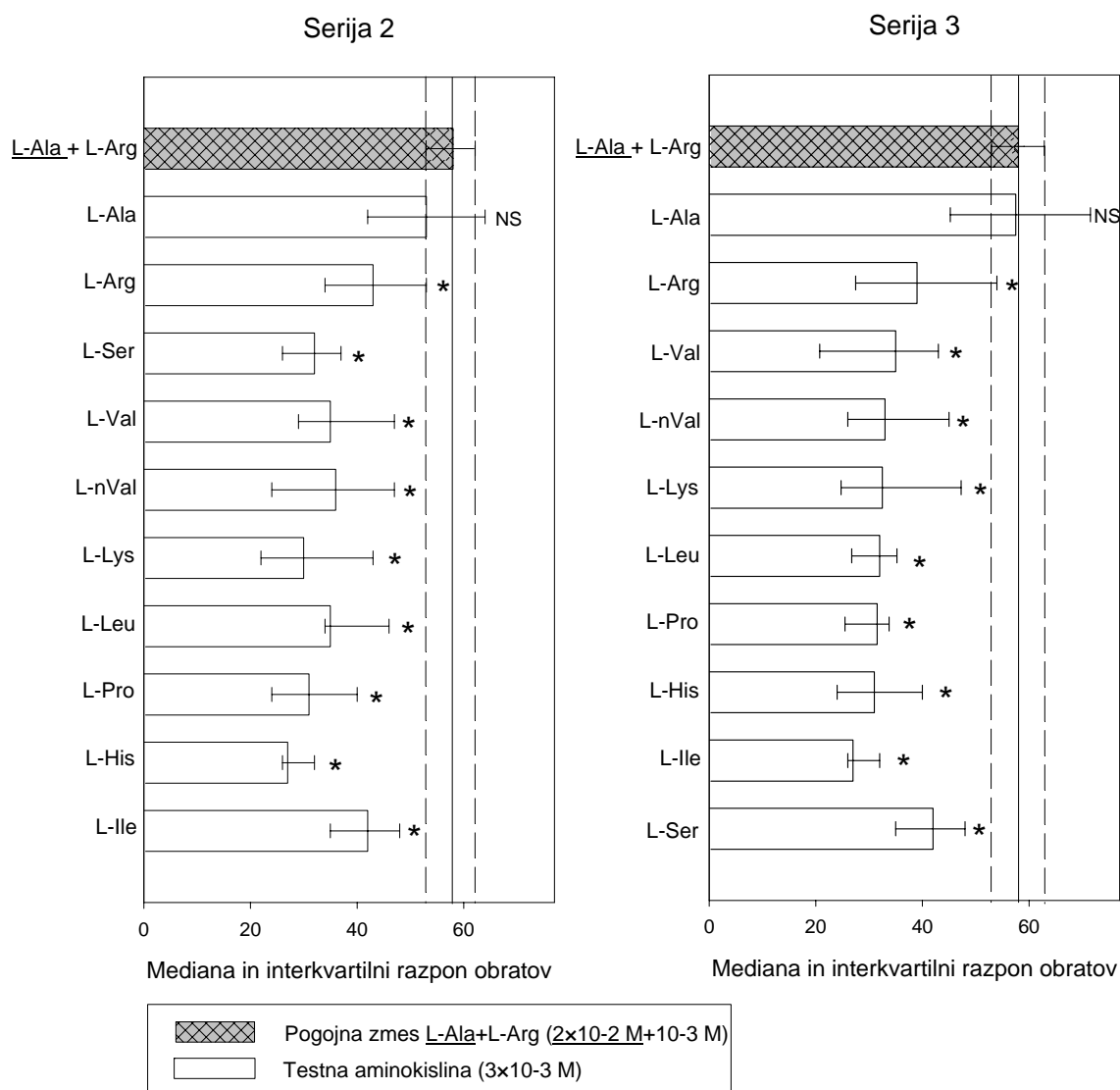
Odzive na draženje z $<5 \times 10^{-3}$ M L-Arg (vbrizgana koncentracija 10^{-1} M) smo testirali s štejem obratov 60 minut po draženju z zmesjo L-Ala in L-Arg in 60 minut, 30 minut in 20 minut po vbrizganju zmesi L-Ala in L-Pro (oba $<5 \times 10^{-3}$ M) in 20 minut po draženju dveh 5×10^{-3} M aminokislin (L-Ala in L-Pro). Odziv na zmes L-Ala in L-Arg je bil vsaj 1,5 krat večji, kot odziv na L-Arg (sl. 8). Po draženju z L-Arg, ki je sledilo 20 in 30 minut po draženju z zmesjo L-Ala in L-Pro in 20 minut po draženju z L-Pro so cebrice intenzivno grizle pesek na dnu akvarija. Intenzivneje so cebrice grizle pesek na dnu tudi pri draženju z raztopino 5×10^{-3} M L-Pro.



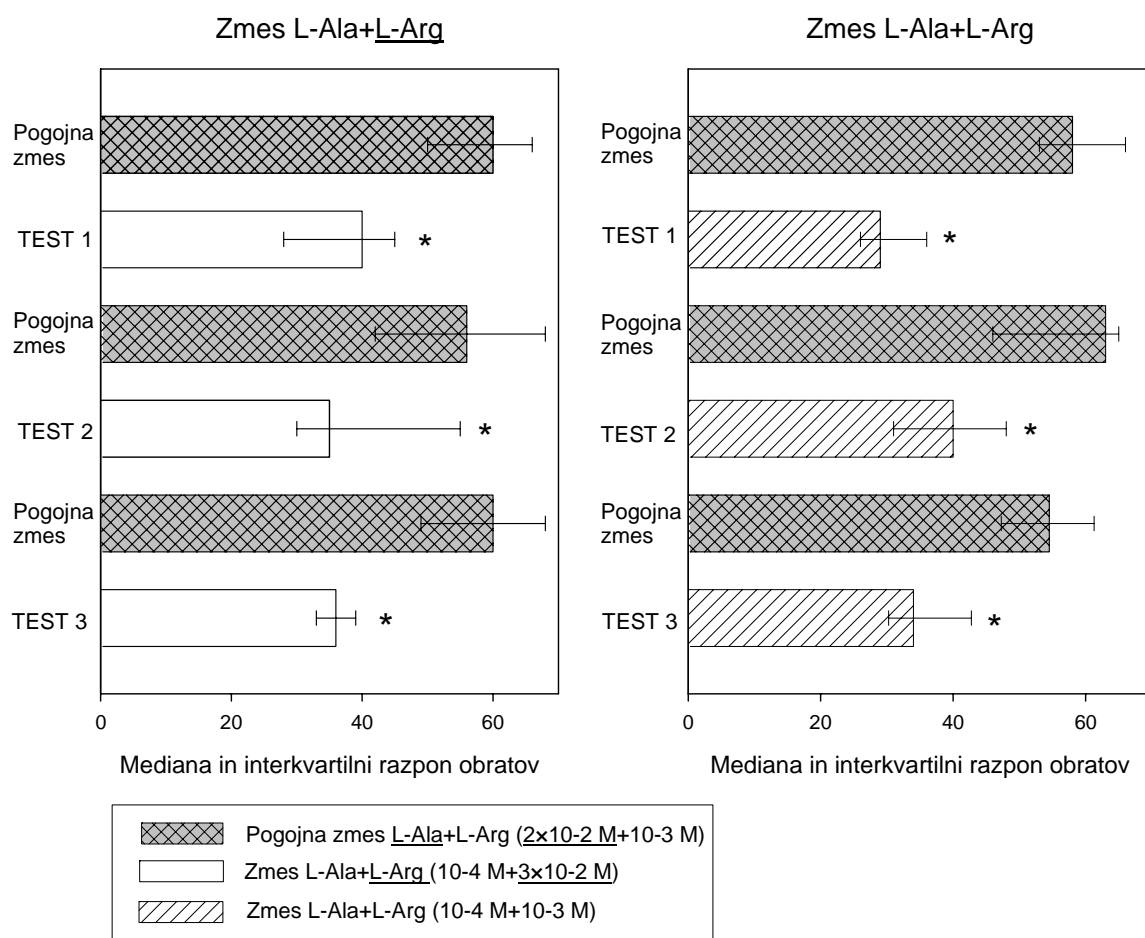
Slika 2: POGOJEVANJE: Vedenjski odzivi cebric (N=15) med pogojevanjem na zmes 2×10^{-2} M L-Ala+ 10^{-3} M L-Arg. Podane so vbrizgane koncentracije. Učinkovitejša sestavina zmesi je podčrtana. Odzivi na dražljaje so prikazani kot mediana in interkvartilni razpon obratov v posameznem testu.



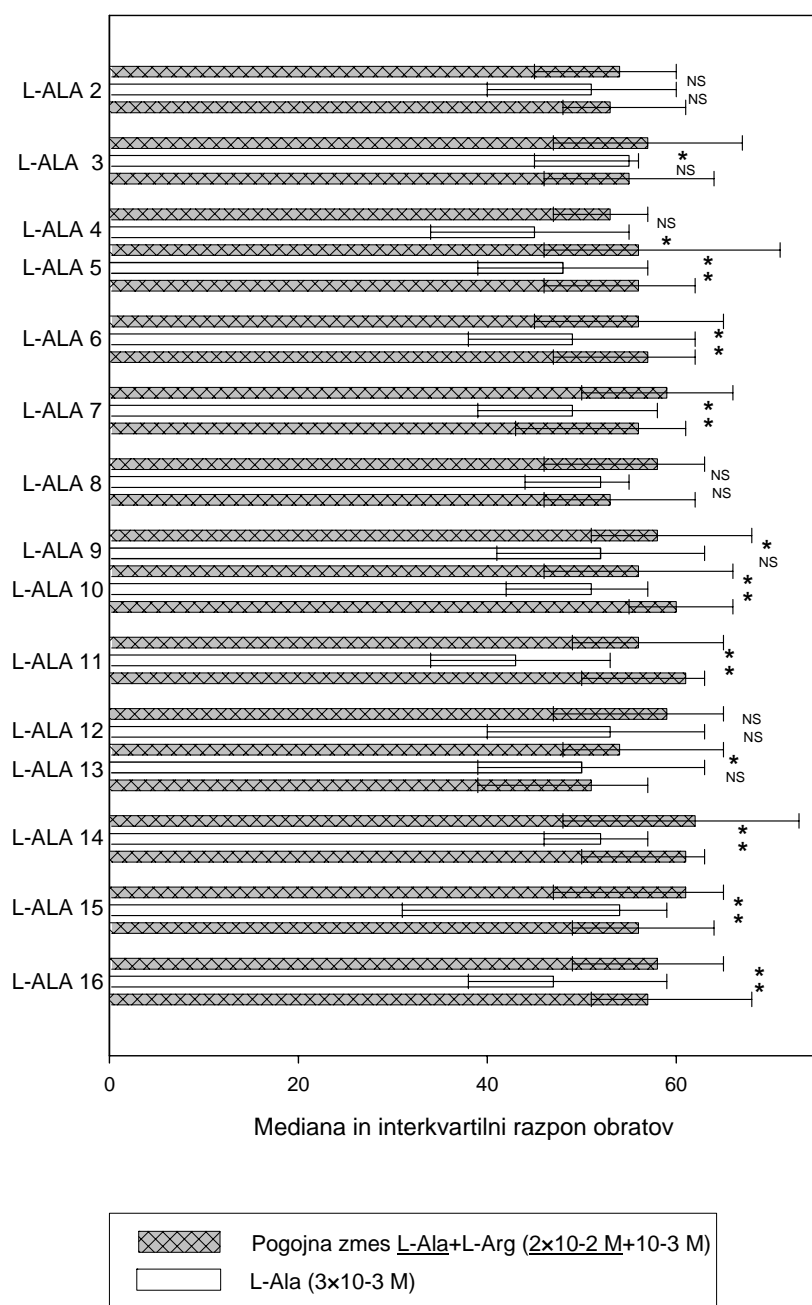
Slika 3: PRVA IN DRUGA SERIJA TESTERANJA RAZLIKOVANJA POGOJNE ZMESI OD DESETIH AMINOKISLIN: Vedenjski odzivi cebric (N=15) pogojenih na zmes L-Ala+L-Arg, na raztopine testnih aminokislin. Podane so vbrizgane koncentracije. Odziv na pogojni dražljaj (siv črtkan stolpec) je mediana (polna navpična črta) in minimum in maksimum median (črtkani navpični črti) vseh pogojnih odzivov v posamezni seriji. Odzivi na testni dražljaj so prikazani kot mediana in interkvartilni razpon obratov v posameznem testu. Razlike med odzivi na pogojni in testni dražljaj smo ocenili z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov. * označuje značilno razliko pri $p < 0,05$, NS pomeni, da razlika ni statistično značilna.



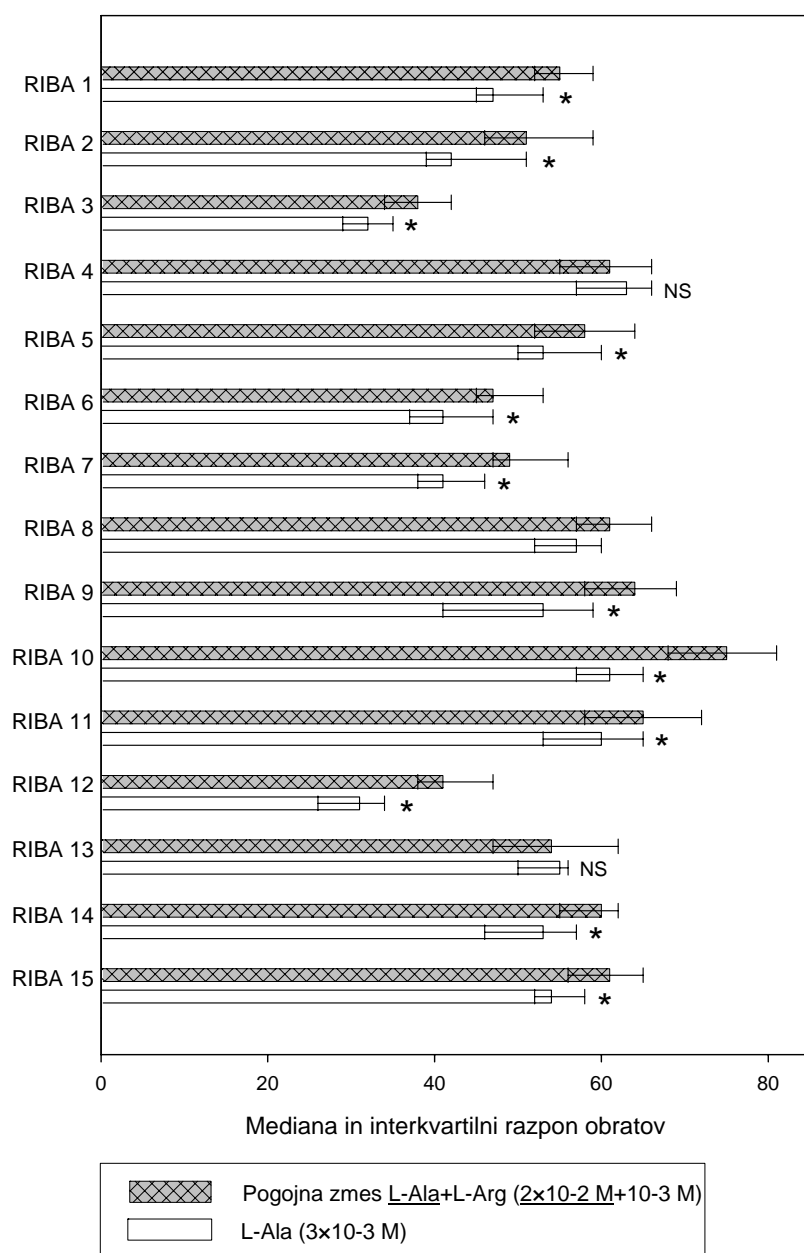
Slika 4: DRUGA IN TRETJA SERIJA TESTERANJA RAZLIKOVANJA POGOJNE ZMESI OD DESETIH AMINOKISLIN: Vedenjski odzivi cebric (N=15 v seriji 2 in N=14 v seriji 3) pogojenih na zmes L-Ala+L-Arg, na raztopine testnih aminokislin. Podane so vbrizgane koncentracije. Statistika in oznake kot pri sliki 3.



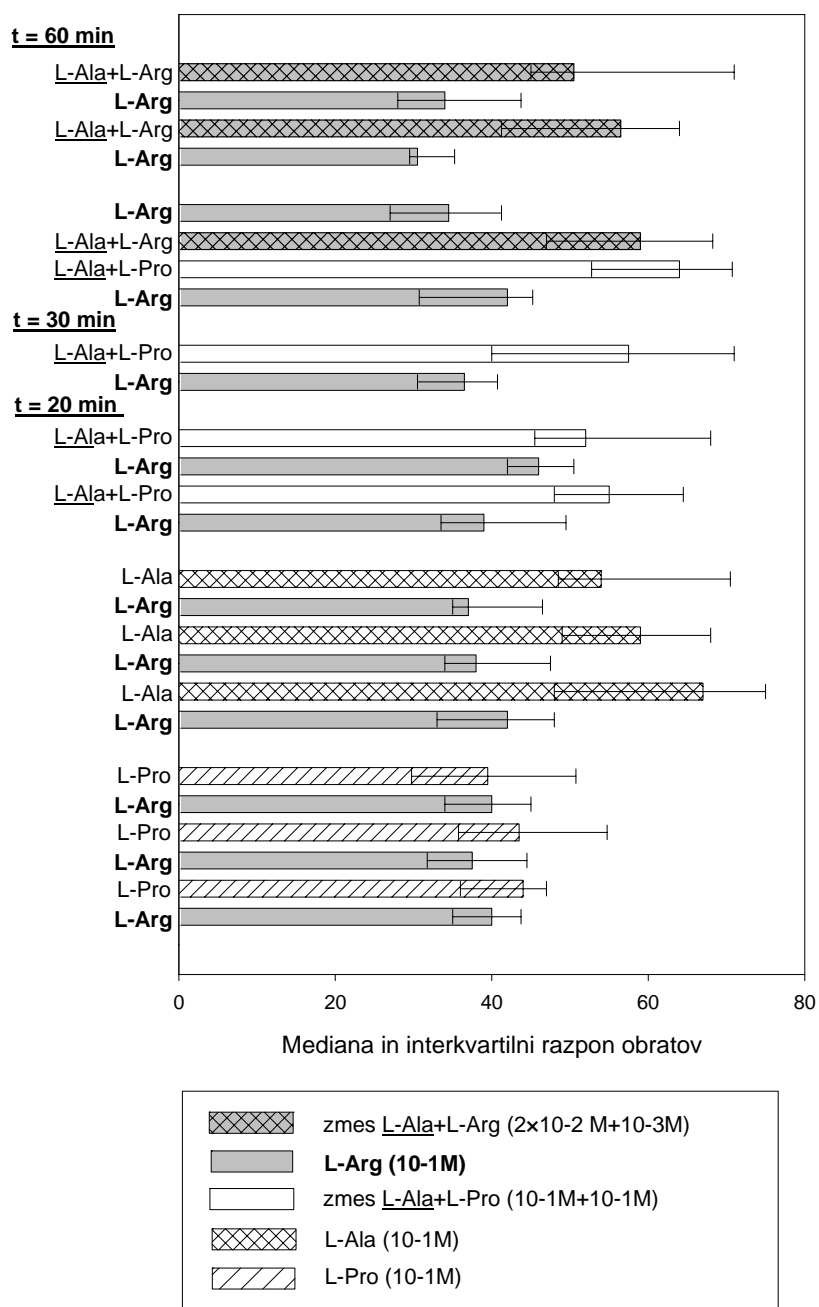
Slika 5: TESTERANJA RAZLIKOVANJA POGOJNE ZMESI OD DVEH BINARNIH ZMESI: Vedenjski odzivi cebric (N=15) pogojenih na zmes L-Ala+L-Arg, na raztopine dveh zmesi L-Ala in L-Arg (L-Ala+L-Arg in L-Ala+L-Arg). Podane so vbrizgane koncentracije. Učinkovitejša komponenta zmesi je podčrtana. Odzivi na dražljaje so prikazani kot mediana in interkvartilni razpon obratov v posameznem testu. Razlike med odzivi na pogojni in testni dražljaj smo ocenili z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov. * označuje značilno razliko pri $p < 0,05$, NS pomeni, da razlika ni statistično značilni.



Slika 6: RAZLIKOVALNI TRENING : Vedenjski odzivi cebric (N=15) pogojenih na zmes L-Ala+L-Arg, na raztopino L-Ala. Podane so vbrizgane koncentracije. Statistika kot pri sliki 5.



Slika 7: RAZLIKOVALNI TRENING POSAMEZNE RIBE: Vedenjski odzivi posameznih cebric (N=15) pogojenih na zmes L-Ala+L-Arg, na raztopino L-Ala. Podane so vbrizgane koncentracije. Odzivi na testni dražljaj so prikazani kot mediana in interkvartilni razpon obratov posamezne cebrice v vseh testih. Razlike med odzivi na pogojni in testni dražljaj smo ocenili z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov. * označuje značilno razliko pri $p < 0,05$, NS pomeni, da razlika ni statistično značilna.



Slika 8: OKUŠALNI TESTI: Vedenjski odzivi cebric (N=14) pogojenih na zmes L-Ala+L-Arg na raztopine 10^{-1} M L-Arg, v primerjavi z odzivi na pogojno zmes, zmes 10^{-1} M L-Ala+ 10^{-1} M L-Pro, 10^{-1} M L-Ala in 10^{-1} M L-Pro. Podane so vbrizgane koncentracije. Naveden je čas med draženjem z L-Arg in drugim dražljajem (60, 30 ali 20 minut). Odzivi na dražljaje so prikazani kot mediana in interkvartilni razpon obratov v posameznem testu.

RAZPRAVA

Raziskave voha in okusa pri ameriških somičih so pokazale, da le voh omogoča učenje in razlikovanje med aminokislinami (Valentinčič s sod., 1994; Valentinčič in Caprio, 1994; Valentinčič s sod., 2000a). Anozmični somiči se na aminokislino odzovejo z iskanjem hrane in refleksnimi gibi, ne morejo pa razlikovati med aminokislinami (Valentinčič s sod., 1994). Na podlagi tega smo sklepali, da je razlikovanje zmesi aminokislin pri cebricah vohalno. Ribe se lahko s pogojevanjem naučijo, da določeni vonjavi sledi nagrada - hrana. Ko ribe zavohajo pogojni dražljaj, povečajo svojo aktivnost, saj pričakujejo nagrado (Valentinčič s sod., 1994, Valentinčič in Caprio, 1994). Za razliko od somičev, na katerih so naredili največ raziskav vohalnega razlikovanja aminokislin, so cebrice aktivne ribe in neprestano plavajo, ko zavohajo aminokislino začnejo plavati hitreje. Po 30 pogojevanjih smo cebrice uspešno pogojili na binarno zmes aminokislin in dosegli, da so redno odzivale na pogojno zmes z dolgotrajno povečano aktivnostjo. Na pogojni dražljaj so cebrice plavale več kot 1,5 krat več kot na nepogojni primerjalni dražljaj 3×10^{-3} M L-Pro (sl. 2).

Pogosto so v naravnem okolju vohalni dražljaji zmesi večih snovi. Hipotetično je zaznavanje zmesi lahko analitično ali sintetično. Analitično zaznavanje vključuje sposobnost zaznavanja komponent v zmesi, sintetično zaznavanje zmesi pa predvideva zaznavanje zmesi kot nove kvalitete (Rescorla s sod., 1985; Westbrook in Charnock, 1996). Raziskave na ljudeh kažejo na to, da so preproste zmesi kodirane analitično, saj zaznajo ljudje binarno zmes vonjav kot bolj učinkovito komponento zmesi (Laing in Willcox, 1983). Specialist, ki se v industriji dišav poklicno ukvarjajo s prepoznavanjem vonjav, niso sposobni zaznati več kot treh ali štirih sestavin v zmesi (Livermore in Laing, 1996). Ljudje smo sposobni zaznavati posamezne sestavine v zmesih, ki imajo malo sestavin, bolj sestavljene vonjave pa zaznavamo kot novo kvaliteto (Laing in Livermore, 1992; Livermore in Laing, 1996). Tudi pri somičih je zaznavanje binarnih zmesi odvisno od relativne učinkovitosti sestavin v zmesi, saj ti prvotno zaznajo zmes aminokislin kot enako bolj dražeči sestavini v njej (Valentinčič s sod., 2000b). Poskusi kažejo, da tudi cebrice zaznavajo binarne zmesi aminokislin na enak način kot somiči. Cebrice od pogojne zmesi niso razlikovale L-Ala, ki je bolj dražeča komponenta pogojne zmesi (sl. 3,4).

Raziskava aktivnosti glomerulov v vohalnem bulbusu cebric je pokazala, da aminokislina z različno kemijsko zgradbo povzročajo bolj različne vzorce glomerularne aktivnosti kot aminokislina s podobno kemijsko zgradbo (Friedrich in Korsching, 1997). L-Ala in L-Ser spadata med nevtralne aminokislina s kratko stransko verigo (Caprio in Byrd, 1984; Kang in Caprio, 1991; Friedrich in Korsching, 1997; Valentinčič s sod., 2000a ; Laberge in Hara, 2004; Nikonov in Caprio, 2007). L-Ala vzbudi v vohalnem bulbusu podoben vzorec vzburjenja kot L-Ser (Friedrich in Korsching, 1997). Skladno s tem je bil odziv na L-Ser v prvi ponovitvi precej višji od odziva na ostale aminokislina (sl. 3). Razlika med številom obratov po draženju z L-Ser in pogojno zmesjo je sicer bila statistično značilna, vendar pa je bila mediana odziva na L-Ser le za 5 obratov nižja od mediane odziva na L-Ala. Majhna razlika v številu obratov kaže na to, da so cebrice zaznale L-Ser kot enak ali zelo podoben L-Ala. Že v naslednji ponovitvi je bil odziv na pogojno zmes, podobno kot pri ostalih testiranih aminokislinah, več kot 1,5 krat večji od odziva na L-Ser (sl. 3,4). Majhne razlike v vzorcih glomerularne aktivnosti so že v drugi primerjavi omogočale povsem uspešno razlikovanje L-Ala (pogojne zmesi) in L-Ser, ki se je ohranilo tudi v tretji seriji.

Medtem ko so se ribe na pogojno zmes in L-Ala odzvale enako, so manj dražečo sestavino zmesi L-Arg brez težav razlikovale od pogojne zmesi (sl. 5). Zmes iz enakih sestavin kot v pogojni zmesi v kateri je bila bolj dražeča sestavina zmesi L-Arg cebrice niso zaznale enako pogojni zmesi. Oboje ponovno potrjuje hipotezo, da ribe zaznajo zmes aminokislin kot enako bolj dražeči sestavini v njej (Valentinčič s sod. 2000a). Raziskave na kanalskih in ameriških somičih, ki so pokazale, da ti zmes enako učinkovitih aminokislin zaznajo enkrat kot eno in drugič kot drugo komponento zmesi (Valentinčič s sod. 2000a), smo enako pričakovali za cebrice. V naših poskusih so cebrice zmes L-Ala in L-Arg, v kateri sta bili koncentraciji pripravljene tako, da naj bi bili aminokislina enako učinkoviti, vedno razlikovale od pogojne zmesi (sl. 5). Verjetno je bila koncentracija L-Arg višja od enako učinkovite koncentracije za L-Ala.

S pomočjo razlikovalnega treninga ribe izboljšajo razlikovanje med vonjavami. Razlikovalno učenje omogoči ribam, da začnejo razlikovati dražljaje, ki jih prvotno niso razlikovale, prav tako lahko izboljšajo zaznavo manj učinkovitih sestavin zmesi

(Valentinčič s sod. 2000a; Valentinčič s sod. 2000b). Ker cebrice niso razlikovale L-Ala od pogojne zmesi smo zanj izvedli razlikovalni trening. Pri zaznavanju binarne zmesi aminokislin, ribe v zmesi najprej zaznajo učinkovitejšo komponento zmesi, nato pa se med razlikovalnim učenjem postopno zavejo razlike, ki jo povzroča prisotnost manj učinkovite komponente v zmesi (Valentinčič s sod. 2000a). Naši rezultati so pokazali, da so po sedmih primerjavah večina cebric najverjetneje začele razlikovati pogojno zmes od L-Ala, saj so se odzivi na pogojni zmes in odzivi na L-Ala 18 krat statistično razlikovali, 8 krat pa ne (sl. 6). Mediane odzivov na L-Ala so bile manjše od median odzivov na pogojno zmes, interkvartilni razponi odzivov so bili vedno veliki. To in pa dejstvo, da so bile razlike v nekaterih testih statistično neznačilne, je verjetno posledica različnih odzivov posameznih cebric. Čeprav je večina cebric statistično razlikovala pogojno zmes od L-Ala, je tudi po razlikovalnem treningu ostalo razlikovanje pogojne zmesi od L-Ala je pri posameznih cebricah nezanesljivo (sl. 7).

Ker je vedenjski odziv cebric pojav, ki se dogaja po načelu vse ali nič, se aktivnost cebric ni povečala zaradi višje vbrizgane koncentracije dražljaja ne poveča bistveno. Nadpražni dražljaj, tak pa je bil v obeh primerih, pri manjši in pri višji koncentraciji aminokislin, pač sproži vse vedenje. Število obratov po draženju s pogojno zmesjo je bilo vsaj 1,5 krat večje od števila obratov po vbrizganju 10^{-1} M L-Arg in prav tako od števila obratov po vbrizganju 3×10^{-1} M L-Arg. Sklepali smo, da je bilo intenzivno grizenje peska posledica vpliva zmesi aminokislin na okušalne receptorje. Okušalni dražljaji sprožijo pri somičih, krapovcih in zobatih krapovcih refleksno šavsanje po hrani ali tudi pesku na dnu akvarija. Tudi L-Pro je okušalni dražljaj, ki sproža šavsanje pri cebricah in somičih.

Cebrice smo uspešno pogojili na zmes dveh aminokislin, v kateri je bila ena sestavina učinkovitejša od druge. Na nepogojne dražljaje so se cebrice običajno odzvale z več kot 1,5 krat manjšim plavanjem - številom obratov kot na pogojno zmes. Spočetka so cebrice od pogojne zmesi razlikovale vse testirane aminokisliline razen bolj učinkovite sestavine zmesi-L-Ala. Cebrice so od pogojne binarne zmesi razlikovale tudi binarno zmes istih aminokislin v kateri je bila učinkovitejša komponenta L-Arg. Večina cebric (13) je po razlikovalnem treningu razlikovala pogojno zmes od bolj učinkovite sestavine zmesi, dve cebrici tudi po razlikovalnem treningu nista razlikovali bolj učinkovite komponente zmesi

od pogojne zmesi. Cebrice so torej tako kot somiči v binarni zmesi najprej zaznale učinkovitejšo komponento zmesi, razlikovalno učenje pa jim je omogočilo, da so postopno zaznale razliko v zaznavi, ki jo povzroča prisotnost manj učinkovite komponente v zmesi.

VIRI

- ATEMA J., Holland K., Ikehara W. 1980. Olfactory responses of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) to prey odors: chemical search image. *Journal of Chemical Ecology*, 6: 457-465
- BAIER H., Korsching S. 1994. Olfactory glomeruli in the zebrafish form an invariant pattern and are identifiable across animals. *The Journal of Neuroscience*, 14(1): 219-230
- BAIER H., Rotter S., Korsching S. 1997. Connectional topography in the zebrafish olfactory system: random positions but regular spacing of sensory neurons projecting to an individual glomerulus *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24): 11646-11650
- BARTH A.L., Justice N.J., Ngai J. 1996. Asynchronous onset of odorant receptor expression in the developing zebrafish olfactory system. *Neuron*, 16: 23-34
- BYRD C.A., Brunjes P.C., 1995. Organization of the olfactory system in adult zebrafish: histological, immunohistochemical, and quantitative analysis. *The Journal of Comparative Neurology*, 358(2): 247-259
- BYRD, C. A., Brunjes, P. C. 1998. Addition of new cells to the olfactory bulb of adult zebrafish. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855: 274-276
- CAPRIO J., 1978. Olfaction and taste in the channel catfish: an electrophysiological study of the responses to amino acids and derivatives. *Journal of Comparative Physiology*, 123: 357-371
- CAPRIO, J., Byrd R.P., 1984. Electrophysiological evidence for acidic, basic, and neutral amino acid olfactory receptor sites in the catfish. *J.Gen.Physiol.*, 84: 403-422
- CARR W. E. S. 1988. The molecular nature of chemical stimuli in the aquatic environment. V: Sensory biology of aquatic animals. NY: Springer-Verlag, 3-27
- COROTTO F.S., Piper D.R., Chen N., Michel W.C. 1996. Voltage- and Ca²⁺- gated currents in zebrafish olfactory receptor neurons. *The Journal of experimental biology*, 204: 1115-1126
- FRAENKEL G.S., Gunn D.L. 1994. *The orientation of animals*. Oxford University Press, London
- FRIEDRICH R. W. 2006. Mechanisms of odor discrimination: neurophysiological and behavioral approaches. *Trends in Neurosciences*, 29(1): 40-42
- FRIEDRICH R. W., Korsching S. 1997. Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualised by optical imaging. *Neuron*, 18: 737-752

- FRIEDRICH R. W., Korsching S. 1998. Chemotopic, combinatorial, and noncombinatorial odorant representations in the olfactory bulb revealed using a voltage-sensitive axon tracer. *The Journal of Neuroscience*, 18(23): 9977-9988
- FRIEDRICH R. W., Laurent G. 2001. Dynamics of olfactory bulb input and output activity during odor stimulation in zebrafish. *Science*, 291: 889-894
- FRIEDRICH R. W., Laurent G. 2004. Dynamics of olfactory bulb input and output activity during odor stimulation in zebrafish. *J.Neurophys.*, 91: 2658-2669
- FRIEDRICH R. W., Habermann C. J., Laurent G. 2004. Multiplexing using synchrony in the zebrafish olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 7: 862-871
- FULLER C.L., Byrd C.A. 2005. Ruffed cells identified in the adult zebrafish olfactory bulb. *Neuroscience Letters*, 379: 190-194
- FUSS S.H., Korsching S. 2001. Odorant feature detection: activity mapping of structure response relationships in the zebrafish olfactory bulb, *The Journal of Neuroscience*, 21(21): 8396-8407
- HANSEN, A. & Zeiske, E. 1998. The peripheral olfactory organ of the zebrafish, *Danio rerio*: an ultrastructural study. *Chemical Senses*, 23: 39-48.
- HARA T.J. 1992 Overview and introduction. V: Fish chemoreception. Hara T.J. (Ur.). London, Chapman & Hall: 1-12
- KANG J., Caprio J. 1991. Electro-olfactogram and multiunit olfactory receptor responses to complex mixtures of amino acids in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J.Gen.Physiol.*, 98: 699-721
- KEY B., Devine C.A. 2003. Zebrafish as an experimental model: strategies for developmental and molecular neurobiology studies. *Methods in Cell Science*, 25: 1-6
- KORSCHING, S. 2001. Odor maps in the brain: spatial aspects of odor representation in sensory surface and olfactory bulb. *Cell. Mol.Life Sci.*, 58: 520-53
- LABERGE, F. & Hara, T. J. 2001. Neurobiology of fish olfaction: a review. *Brain Research Reviews*, 36: 46-59
- LABERGE F., Hara T. J. 2004. Electrophysiological demonstration of independent olfactory receptor types and associated neuronal responses in the trout olfactory bulb. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology*, 137: 397-408
- LAING D.G, Willcox M.E. 1983. Perception of components in binary odour mixtures. *Chem. Senses*, 7(3/4): 294-264

- LAING D.G., Livermore B.A. 1991. A perceptual analysis of complex chemical signals in humans. V: Chemical Signals in Vertebrates 6. Doty R. L., Müller-Schwartz D. (ur.), New York: Plenum Press, 587-593
- LAING D.G., Glemarec A, 1992. Selective attention and the perceptual analysis of odor mixtures. *Physiol.Behav.*, 52: 1047-1053
- LI J., Mack J.A., Souren M., Yaksi E., Higashijima S., Mione M., Fetcho J.R., Friedrich R.W. 2005. Early development of functional spatial maps in the zebrafish olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience*, 25(24): 5784-5795
- LINDSAY S.M., Vogt R.G. 2004. Behavioral responses of newly hatched zebrafish (*Danio rerio*) to amino acid chemostimulants. *Chem.Senses*, 29:93-100
- LIPSCHITZ D.L., Michel W.C. 1999. Physiological evidence for the discrimination of L-arginine from structural analogues by the zebrafish olfactory system. *The Journal of Neurophysiology*, 82 (6): 3160-3167
- LIVERMORE A., Laing D.G. 1996. Influence of training and experience on the perception of multicomponent odor mixtures. *Journal of experimental Psychology*, 22: 267-277
- MA L., Michel W.C. 1998. Drugs affecting phospholipase c-mediated signal transduction block the olfactory cyclic nucleotide-gated current of adult zebrafish. *The Journal of Neurophysiology*, 79: 1183-1192
- MALNIC B., Hirono J., Sato T. 1999. Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell*, 96: 713-723
- MARUI T., Caprio J. 1992. Teleost gustation. V: Fish Chemoreception. Hara, T. J. (Ur.). London, Chapman & Hall: 171-198
- MICHEL W. C., 1999. Cyclic nucleotide-gated channel activation is not required for activity-dependent labeling of zebrafish olfactory receptor neurons by amino acids. *Biol.Signals Recept.*, 8:338-347
- MICHEL W. C., Lubomudrov L. M. 1995. Specificity and sensitivity of the olfactory organ of the zebrafish, *Danio rerio*. *J.Comp.Physiol.A*, 177: 191-199
- MOMBAERTS P., Wang F., Dulac C., Chao S.K., Nemes A., Mendelsohn M., Edmondson J., Axel R. 1996. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, 87: 675-686
- MOORE P.A., Gerhardt G.A., Atema J. 1989. High resolution spatio-temporal analysis of aquatic chemical signals using microelectrochemical electrodes. *Chem. Senses*, 14(6): 829-840
- MORI K., Nagao H., Yshihara Y. 1999. The olfactory bulb: coding and processing of odor

- molecule information. *Science*, 286: 711-751
- NAGAI J., Dowling M.M., Buck L., Axel R., Chess A. 1993. The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. *Cell*, 72: 657-666
- NIKONOV A.A., Caprio J. 2001. Electrophysiological evidence for a chemotopy of biologically relevant odors in the olfactory bulb of the channel catfish. *The Journal of Neurophysiology*, 86: 1869-1876
- NIKONOV A.A., Caprio J. 2007. Highly specific olfactory receptor neurons for types of amino acids in the channel catfish. *The Journal of Neurophysiology*, 98: 1909-1918
- SATO Y., Miyasaka N., Yoshihara Y. 2007. Hierarchical regulation of odorant receptor gene choice and subsequent axonal projection of olfactory sensory neurons in zebrafish. *The Journal of Neuroscience*, 27(7): 1606-1615
- SATOU M. 1992. Synaptic organization of the olfactory bulb and its central projection. V: *Fish Chemoreception*. Hara T.J. (ur.). 1st editon London, Chapman and Hall: 40-59
- STEELE C. W., Scarfe A. D., Owens D. W. 1990. Effects of group size on the responsiveness of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton Buchanan), to alanine, a chemical attractant. *Journal of Fish Biology*, 38: 553-564
- TABOR R., Yaksi E., Weislogel J.M., Friedrich R.W. 2004. processing of odor mixtures in the zebrafish olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience*, 24(29): 6611-6620
- TSUBOI A., Yoshihara S., Yamazaki N., Kasai H., Asai-Tsuboi H., Komatsu M., Serizawa S., Ishii T., Matsuda Y., Nagawa F., Sakano H. 1999. Olfactory neurons expressing closely linked and homologous odorant receptor genes tend to project their axons to neighboring glomeruli on the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience*, 19(19): 8409-8418
- VALENTINČIČ T. 2004. Taste and olfactory stimuli and behavior in fishes. V: *The Senses of Fishes: Adaptation of Reception of Natural Stimuli*. Von der Emde G. M. J., Kapoor B. G. (Ur.). New Delhi, Narosa Publishing House: 90-108
- VALENTINČIČ T. 2005. Olfactory discrimination in fishes. V: *Fish Chemosenses* Reutter K., Kapoor B. G. (Eds.). Enfield, NH: Science Publishers Inc.: 66-85
- VALENTINČIČ T., Caprio J. 1994a. Chemical and visual control of feeding and escape behaviors in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Physiol.Behav.*, 55(5): 845-855
- VALENTINČIČ T., Caprio J. 1994b. Consumatory feeding behavior to amino acids in intact and anosmic channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Physiol.Behav.*, 55(5): 857-863
- VALENTINČIČ T., Wegert S., Caprio J. 1994. Learned olfactory discrimination versus innate taste responses to amino acids in channel catfish, *Ictalurus punctatus*.

Physiol.Behav., 55(5): 865-873

VALENTINČIČ T., Caprio J. 1997. Visual and chemical release of feeding behavior in adult rainbow trout. Chem.Senses, 22(4): 375-382

VALENTINČIČ T., Lamb C. F., Caprio J. 1999. Expression of a reflex biting/snapping response to amino acids prior to the first exogenous feeding in salmonid alevins. Physiol&Behav, 67(4): 567-572

VALENTINČIČ T., Metelko D., Ota D., Pirc V., Blejec A. 2000a. Olfactory discrimination of amino acids in brown bullhead catfish. Chem.Senses, 25:21-29

VALENTINČIČ T., Kralj J., Stenovec M., Koce A., Caprio J. 2000b. The behavioral detection of binary mixtures of amino acids and their individual components by catfish. Journal of Experimental Biology, 203:3307-3317

VALENTINČIČ, T., Kralj S., Zgonik V. 2004. Discrimination of amino acid multimixtures in catfish. Chemical senses, 28(6), A89

VALENTINČIČ T., Miklavc P., Dolenshek J., Pliberšek K. 2005. Correlations between olfactory discrimination, olfactory receptor neuron responses and chemotopy of amino acids in fishes. Chem.Senses, 30 (suppl.1): i312-i314

VITEBSKY A., Reyes R., Sanderson M.J., Michel W.C., Whitlock K.E. 2005. Isolation and characterization of the laure olfactory behavioral mutant in the zebrafish *Danio rerio*. Develop. Dynamics, 234: 229-242