

## Einleitung

Die untersuchten Wanderheuschreckenarten *Locusta migratoria* (europäische Wanderheuschrecke) und *Schistocerca gregaria* (Wüstenheuschrecke) graben bei der Eiablage ca. 7-8 cm lange Röhren in das Erdreich und dehnen ihr Abdomen dabei um das 2- bis 3-fache aus. Dabei spielt für die Eiablage die Qualität und chemische Zusammensetzung des Bodens eine wichtige Rolle. Erst wenn das Heuschreckenweibchen ausreichend gute Bedingungen im Boden gefunden hat, legt es seine Eier ab. Ist dies nicht der Fall, wird das Abdomen wieder aus dem Erdboden gezogen und eine neue Stelle für die Eiablage gesucht (E. Tousson, R. Hustert, 2000). Bei der Bewertung der Bodenqualität spielen Chemorezeptoren eine wichtige Rolle, welche auf den Genitalsegmenten und Ovipositor des Abdomens liegen. Dort befinden sich kurze Geschmackshaare, an deren Fuß sich Saugporen befinden. Diese Sensillen sind der Ort der Chemorezeption. Die neuronale Integration von Informationen dieser Chemorezeptoren, die für das Erkennen verschiedener chemischer Bodenfaktoren zuständig ist, ist an Insekten bisher nur wenig untersucht worden. In einer früheren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Kontakt von verschiedenen Chemikalien zu diesen Chemorezeptoren auch zu einer unterschiedlichen Antwortintegration auf der Ebene von Interneuronen führen kann (E. Tousson, R. Hustert, 2001). Dieses dreiwöchige Praktikum hatte das Ziel, dieses Antwortverhalten für verschiedene Chemikalien zu studieren.

## Ergebnis

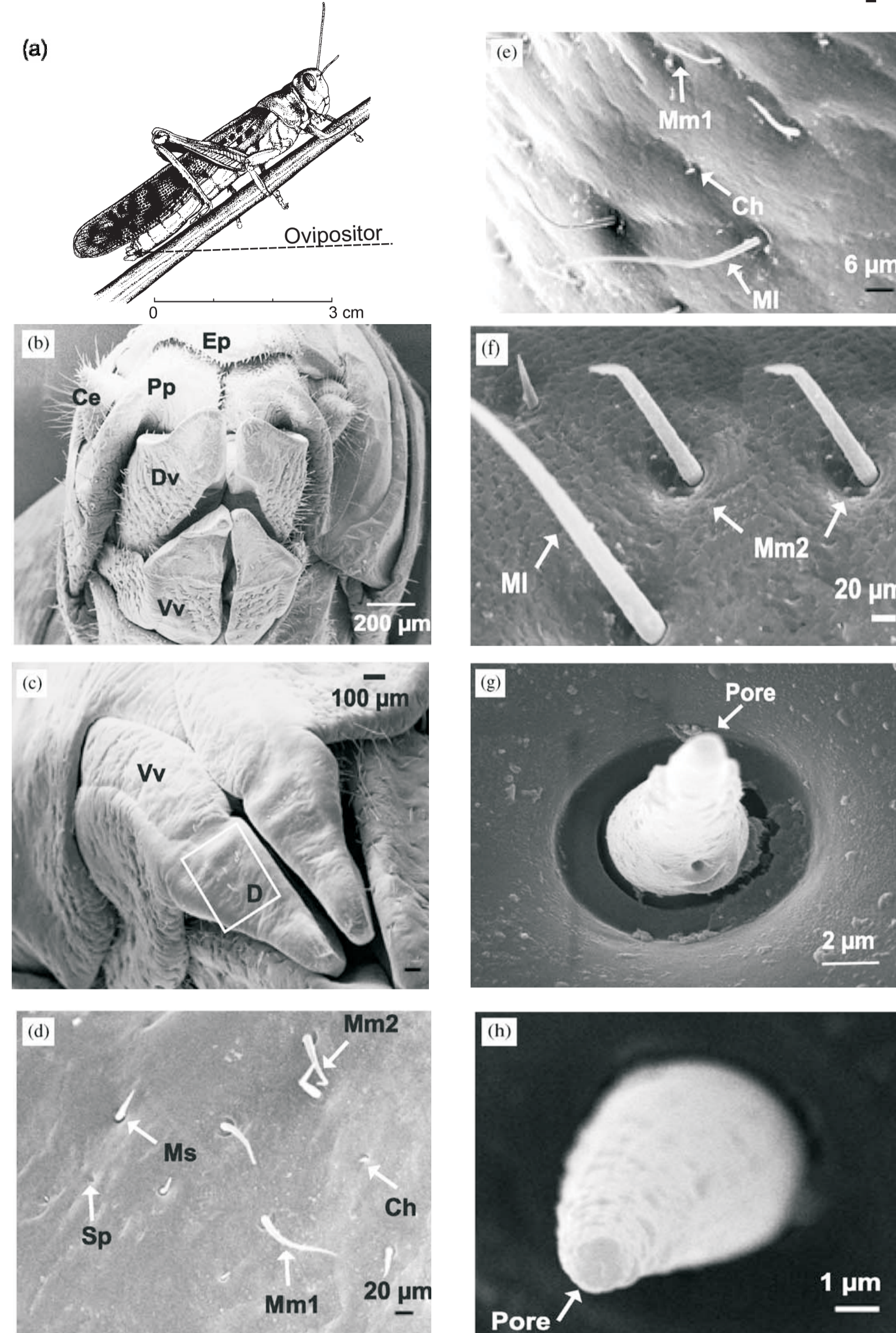
Auf Grund technischer Schwierigkeiten der Ableitung wurde nur die Ansaugtechnik, wie unter Methodenpunkt (B) beschrieben, verwendet. Die anderen möglichen Techniken wurden angewandt, führten aber nicht zu verwertbaren Ergebnissen. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Messungen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Antwortrate der jeweils fünf Messwiederholungen in Abhängigkeit von der Chemikalienkonzentration. Das Diagramm zeigt den Verlauf der Mittelwerte über die verschiedenen Messungen. Der Vergleich der Messwerte mit jenen der Kontrollgruppe zeigt keinen deutlichen Trend. Die Spikezahl der Kontrollmessungen lag nicht in jedem Fall unter den durchschnittlichen Werten der Experimentalmessungen. Ein Effekt der Chemikalien konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die zuvor aufgestellten Hypothesen konnten nicht angenommen werden. Eine entsprechende Erhöhung der Spikezahl in den drei untersuchten Intervallen konnte nicht nachgewiesen werden. Es deutete sich sogar ein leicht gegenläufiger Trend an, jedoch auch unterhalb des Signifikanzniveaus.

## Diskussion und Fehlerbetrachtung:

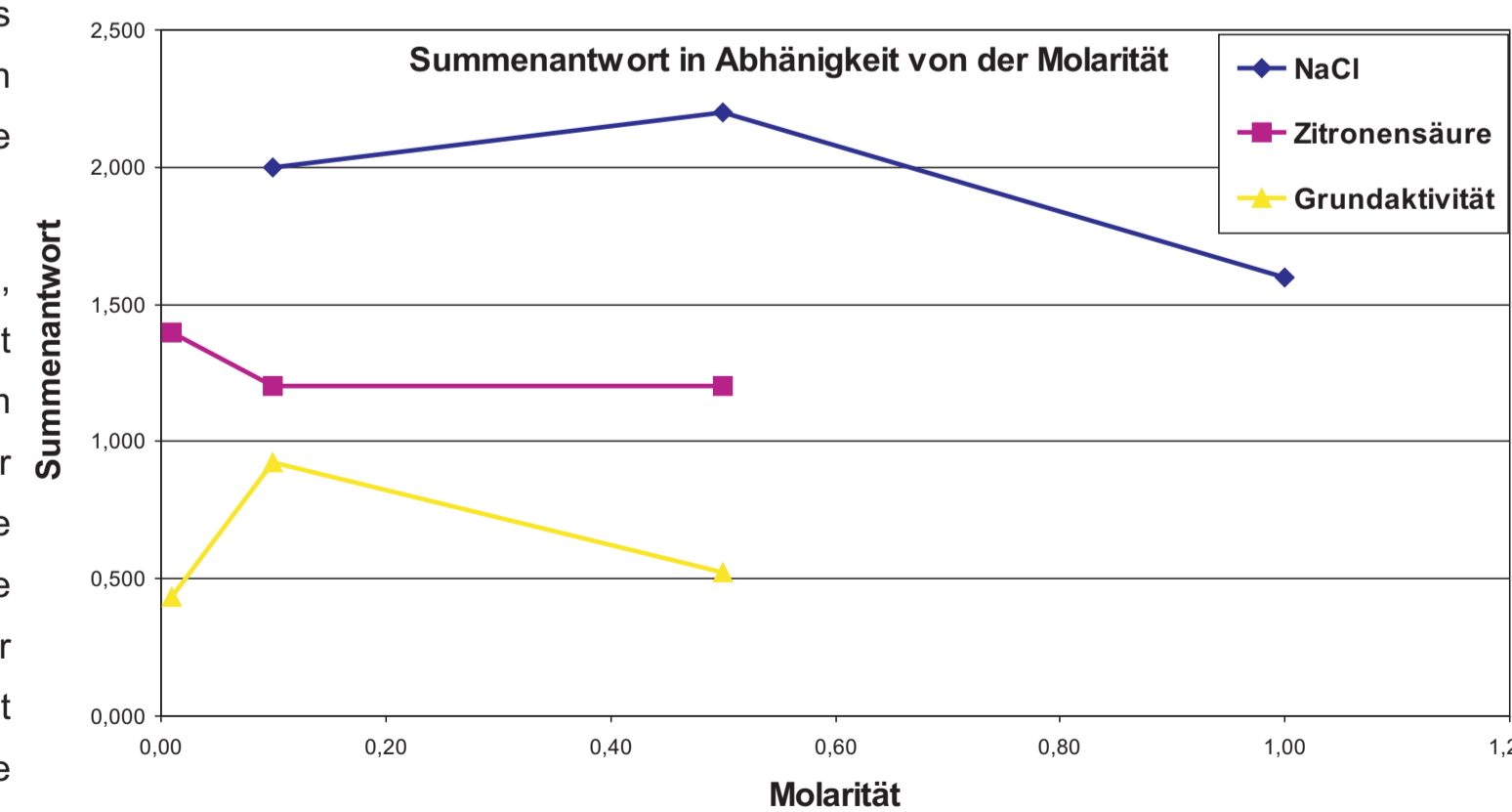
Bei den vorgestellten Versuchen und Messungen mussten viele technische Probleme gelöst werden. Zuerst sind hier die anatomischen Schwierigkeiten zu nennen. Bei der Freipräparation des Terminalganglions musste darauf geachtet werden, dass nicht bereits während der Präparation periphere Nerven beschädigt werden oder das Ganglion austrocknet. Auch das Ansaugen des abgetrennten Konnektivstumpfes konnte zu Schwierigkeiten führen, wenn kleine Luftblasen oder Gewebe die Elektrode verstopften. Beide Fälle waren teilweise nur schlecht auszuschließen und konnten auch teilweise erst im Verlauf einer Messung auftreten. Ein solcher Fall konnte sich drastisch auf die Qualität der Ableitung auswirken, was, wie später erläutert wird, zu einer erschwerten Auswertung der Daten führen konnte. Während aller Messungen musste auch mit einem starkem Grundrauschen umgegangen werden, welches unter Umständen sogar durch den Versuchsleiter selbst erhöht wurde, wenn dieser nicht ausreichend geerdet war. Teilweise, jedoch in sehr geringem Maße, spielten auch Impedanzeffekte durch zu starkes Verteilen des Signals auf Messinstrumente eine Rolle. Bei der Auswertung der Messdaten am Computer summierten sich diese Fehler stark auf. So musste bei fast allen Versuchen das Schwellenniveau (die Amplitude, bei der ein Spike als Summenpotential gewertet wird) durch den Versuchsleiter bestimmt werden, da das Grundrauschen während der Versuche schon allein durch Bewegungen des Versuchsleiters stark schwanken konnte. Dies konnte natürlich auch dazu führen, dass eigentliche Summenantworten überdeckt wurden, oder aber auch Grundrauschen mit in die Auswertung einfließen konnte. Da auf dem Computer Tonspuren verwendet wurden und der Zeitpunkt des Chemikalienkontaktes mit den Sensillen per Hand markiert wurde, konnten bei der Auswertung auch zeitliche Ungenauigkeiten auftreten. Ein standardisiertes Verfahren zur Synchronisation der Aufnahme und der Chemikaliengabe würde hier zu größerer Genauigkeit der Messdaten führen.

Da für alle Messungen die Summenantworten gemessen wurden, ist auch hier nicht auszuschließen, dass willkürliche und fremde neuronale Reize in die Messungen mit eingingen. Durch möglichst standardisierte Versuchswiederholungen wurde versucht, diesem Effekt entgegenzuwirken. Bei größerem zeitlichem Umfang der Versuche könnte diesem Verfahren noch mehr Rechnung getragen werden. Der Vergleich der Messdaten mit den Kontrollwerten der Messungen mit Wasser hat gezeigt, dass die Chemikalien eventuell zu einem Anstieg der abgeleiteten Antwort geführt hat, die Messergebnisse überschreiten jedoch auch hier nicht die Grenze des Signifikanzniveaus. Auch die Auswertung der Messergebnisse hat zu einem sehr ernüchternden Ergebnis geführt. Ein Vergleich der t-Werte zeigt jedoch, dass ein Ansatz zu einem gegenläufigen Trend vorhanden ist. Es wäre sicher interessant, einige Messungen mit geringeren Unterschieden in der Konzentration durchzuführen. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob Maximalantworten existieren, nach deren Überschreitung die Antwortrate wieder fällt. Die genaue Funktionsweise und Art dieser Chemorezeptoren, insbesondere im Bereich der Ovipositor, ist bisher nicht genau untersucht worden. Wie funktioniert der Stimulationsmechanismus der Terminalporen der Geschmackshaare auf dem Ovipositor? Da hier in fast allen Bereichen der Entstehung neuronaler Signale noch viele ungeklärte Fragen existieren, ergibt sich viel Raum für alternative Erklärungsansätze für das beobachtete Antwortverhalten.

# Afferente Chemorezeption des Heuschreckenovipositors



Oben: Bild (a) zeigt die Skizze eine *Schistocerca gregaria*. (b) Ansicht von posterior auf das letzte Abdominalsegment. Zu erkennen sind die dorsalen (Dv) und ventralen (Vv) Ovipositorvalven und deren benachbarte Skleriten, sowie das Paraproct (Pp), die Cerci (Ce) und das Epiproct (Ep). (c) Ventrale Sicht auf zwei angrenzende Valven, welche durch die mittlere Furche getrennt werden. (d-f) Die Kutikula mit verschiedenen sensorischen Sensillen. Mechanorezeptoren mit der Form von borstigen Sensillen [lang (M1), mittel (Mm1), mittel mit etwas gebogener Spitze (Mm2) und sensorischen Poren (SP)] und Chemorezeptoren mit an der Basis konischen Sensillen (Ch). (g,h) Stark vergrößerte einzelne Sensille mit einer Pore von ca. 1,19 µm Durchmesser (aus Tousson, 2004).



Oben: Dieses Diagramm zeigt die Summenantwort in Abhängigkeit von der Molarität der verwendeten Chemikalienlösungen und die aufgenommene Grundaktivität für die ersten 100 Millisekunden nach Chemikalienkontakt. Anmerkung: Das Diagramm täuscht über die Tatsache hinweg, dass trotz der scheinbar groß dargestellten Abstände zwischen Messungen zur Kontrollmessung kein signifikanter Effekt aufgetreten ist!

## Material und Methoden

Für das Praktikum wurden ausschließlich weibliche Heuschrecken der Art *Locusta migratoria* und *Schistocerca gregaria* verwendet. Die Tiere stammten zum Teil aus der eigenen Zucht des Instituts für Zoologie und Anthropologie der Georg-August-Universität Göttingen und aus der Zucht einer privaten Zoohandlung. Die Tiere wurden bei einem 12h-hell/dunkel-Zyklus gehalten und mit frischem Weizengras gefüttert. Für die Experimente wurden die Tiere bei einer Temperatur von 2 - 4°C in einer Plastikröhre in einem Eisbad anästhesiert.

## Vorbereitung einer Saugelektrode::

Auf die Spitze der Saugelektrode wurde ein sich fein verjüngendes Kunststoffröhrchen gesetzt. Die Spitze des Röhrchens wurde so mit einem Skalpell zugeschnitten, dass der Öffnungsdurchmesser der Struktur entsprach, die untersucht werden sollte. Anschließend wurde die Saugelektrode gefüllt. Bei intrazellulären Ableitungen wurde für die Füllung eine Locusten-Ringerlösung verwendet. Für den extrazellulären Kontakt zu den Chemorezeptoren wurde mit einer entsprechenden Chemikalienlösung befüllt.

## Präparation der Heuschrecke:

Das Abdomen der anästhesierten Heuschrecke wurde am dritten Segment durchtrennt und anschließend auf einer Wachsplatte mit Insektennadeln fixiert. Das vorletzte Abdominalsegment wurde auf der ventralen Seite durch zwei laterale Schnitte entlang der Pleuralfalte geöffnet. Das Terminalganglion wurde freipräpariert und die peripheren Nerven sowie die Konnektive abgetrennt. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass hauptsächlich Antworten abgeleitet wurden, die durch die efferenten Nerven der Chemorezeptoren erzeugt wurden.

Es wurden drei verschiedene Ableitetechniken angewandt:

## A: Ableitung der Sensillen auf der Oberfläche des Ovipositors:

Um die direkte Erregbarkeit der Chemorezeptoren am Fuße der Sensillen auf der Oberfläche der Ovipositorvalven extrazellulär abzuleiten, wurde das Tier mit der ventralen Seite nach oben auf einem Knetbett befestigt. Nach Anbringen einer indifferenten Elektrode im Abdomen des Tiere wurde unter dem Binokular ein kleiner Ring aus Wachs um ein Areal auf der Oberfläche der ventralen Seite einer der Valven gelegt. Dieses Areal sollte möglichst so klein sein, dass nur ein oder wenige Sensillen eingeschlossen wurden. Hierfür wurde ein feiner LötKolben verwendet. Es musste vor allem auf ausreichende Fixierung des Abdomens geachtet werden, da am lebenden Abdomen präpariert wurde und Pumpbewegungen die Ableitung behindern konnten. Eine Saugelektrode wurde mit einer gewählten Chemikalienlösung befüllt und mit Hilfe eines Mikromanipulators in die Nähe des Wachsporus gefahren. Die Ableitung wurde über den Meniskus oder einen Tropfen am Ende der Saugelektrode hergestellt, welcher in den Wachsporus gelassen wurde.

## B: Extrazelluläres Ableiten mit Hilfe einer Saugelektrode:

Die vorbereitete Saugelektrode (s.o.) wurde mit Ringerlösung gefüllt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Öffnung des Kunststoffröhrchens in der Verjüngung etwa dem Durchmesser des Konnektivs entsprach, da sich sonst das Ansaugen des Konnektivs schwierig gestalten konnte. Anschließend wurde die Saugelektrode an den abgetrennten und von Fett gesäuberten Stumpf des abgetrennten Konnektivs des Terminalganglions heran bewegt. Durch leichtes Ansaugen des Konnektivstumpfes wurde die Ableitung hergestellt.

## C: Intrazelluläre Ableitung:

Eine mit 2 molarem Kaliumchlorid befüllte Mikroelektrode wurde verwendet, um, wie bereits oben beschrieben, eine intrazelluläre Ableitung der im Terminalganglion liegenden Neuronen zu erhalten. Diese Technik wurde jedoch aus zeitlichen Gründen nicht weiter eingesetzt.

## Aufnahme und Auswertung:

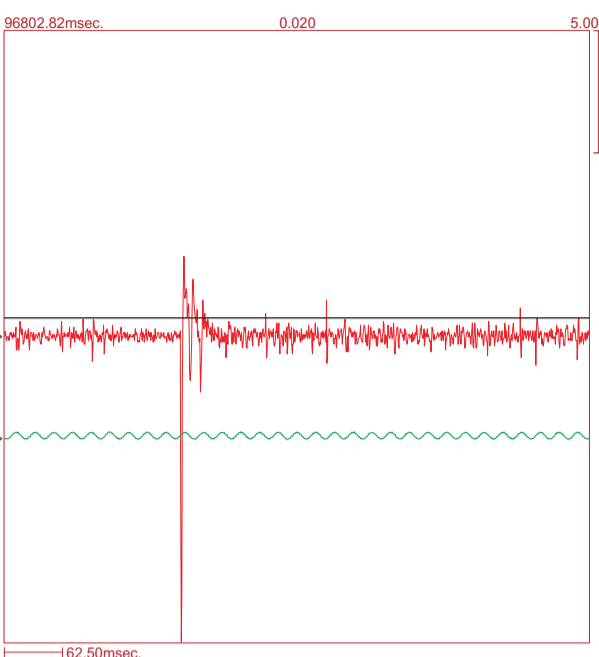
Alle Ableitungen wurden hundertfach verstärkt und gefiltert. Die Einstellung des Hochpassfilters wurde auf 200 Hz gehalten, die des Tiefpassfilters auf 2 kHz. Für die Aufnahme und Auswertung der Daten am PC wurde die Software „Datapac 2K2“ der Firma Runttech verwendet. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden sowohl die ersten 100 ms nach Kontakt einer Chemikalie verwendet, als auch Intervalle von 1.000 ms und 10.000 ms nach diesem Ereignis. Getestet wurde eine Salzlösung des Salzes Natriumchlorid in den Konzentrationen 0,1 und 0,5 und 1,0 mol/l, sowie eine Zitronensäurelösung in den Konzentrationen 0,01 und 0,1 und 0,5 mol/l. Jede Konzentration wurde in fünf aufeinander folgenden Durchgängen wiederholt gemessen. Zusätzlich wurde zwischen den einzelnen Messungen die Grundaktivität ohne Chemikalienkontakt gemessen. Für diese Kontrollmessung wurde Wasser verwendet. Es wurde angenommen, dass ein Rezeptorkontakt mit einer Chemikalie zu einer erhöhten Spikezahl in der Ableitung führen würde und dies als ein Anzeichen für erhöhte Rezeptoraktivität zu werten ist. Weiterhin wurde angenommen, dass mit steigender Chemikalienkonzentration in der Lösung auch die Antwortrate (Spikezahl) der Chemorezeptoren steigen würde. Um festzustellen, ob ein solcher Trend signifikant über die Messgruppen vorlag, wurde ein t-Test verwendet. Es wurde ein kritisches Signifikanzniveau von 0,05 gewählt.

## Zusammenfassung der Messdaten

Stoff/Konzentration	Peaks/Zeit 100ms	Kontrolle Peaks/Zeit	t	t-kontr	Peaks/Zeit 1000ms	Kontrolle Peaks/Zeit	t	t-kontr	Peaks/Zeit 10000 ms	Kontrolle Peaks/Zeit	t	t-kontr	
Salzwasser Molariät	0,10	2,000	0,676	1,093	8,400	6,758	0,766	0,766	73,000	67,583	0,437	0,437	
	0,50	2,200	0,676	2,273	7,000	6,758	-0,733	0,217	54,000	67,583	-1,877	-1,318	
	1,00	1,600	0,676	-0,954	1,438	6,000	6,758	-0,696	-0,493	74,800	67,583	2,860	0,707
Zitronensäure	0,01	1,400	0,676	0,704	12,400	6,758	1,227	1,227	103,000	67,583	1,882	1,882	
	0,10	1,200	0,676	-0,202	9,229	7,200	6,758	-1,131	0,174	69,800	67,583	-1,970	0,192
	0,50	1,200	0,676	0,000	5,059	6,600	6,758	-0,236	1,600	58,400	67,583	-0,856	-0,598

Die Tabelle zeigt die Zusammenfassung der Messdaten. Dabei sind jeweils die Mittelwerte in Peaks pro Zeit dargestellt. T steht für den Wert der Chemikalien-Messungen, t-kontr für die Werte der Kontrollmessungen.

Poster: G. Hildebrand, WS 06/07, Afferente Chemorezeption des Heuschreckenovipositors, Arbeitsgruppe Sensomotorik, Institut für Zoologie und Anthropologie der Georg-August-Universität Göttingen, Angefertigt im Rahmen des Praktikums: Bewegungsteuerung und Neurobiologie von Insekten-Verhalten, Abgabe am 15.03.2007, Praktikumsbetreuung: R. Hustert



Aufnahme der Antwort auf 0,1 molare Kochsalzlösung. Deutlich zu erkennen sind die Initialspikes, welche in den ersten Sekunden nach Reizauslösung auftraten. Diese entstehen durch schnelles Reagieren von Mechanorezeptoren auf Flüssigkeitskontakt. Die folgenden Spikes zeigen die Antwort auf die zugegebene Salzlösung. Die schwarze horizontale Linie zeigt die Amplitudenschwelle für die Zuordnung der Spikes zu den Messdaten. Unterhalb der Schwelle wurden Spikes als Rauschen interpretiert.

## Literatur

Karen J. Thompson, S. P. Sivanesan, H. R. Campbell, K. J. Sanders (1999), Efferent Neurons and Specialization of Abdominal Segments in Grasshoppers. *The Journal of Comparative neurology* 415: 65-79

Huster R., Tousson E., (2000) Central projections from contact chemoreceptors of the locust ovipositor and adjacent cuticle. *Cell Tissue Res.* 302: 284-294

Tousson E., Huster R., (2001) Gustatory Afferents from the Locust Ovipositor: Integration at the Interneuron Level

Tousson E, (2004) Neuroanatomical and electrophysiological studies of identified contact chemoreceptors