

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marko ILIĆ

**FUNKCIONALNE IN ANATOMSKE ZNAČILNOSTI  
MREŽNICE PALMOVEGA RILČKARJA**  
*(Rhynchophorus ferrugineus)*

MAGISTRSKO DELO  
(Magistrski študij – 2. stopnja)

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marko ILIĆ

**FUNKCIONALNE IN ANATOMSKE ZNAČILNOSTI MREŽNICE  
PALMOVEGA RILČKARJA (*Rhynchophorus ferrugineus*)**

MAGISTRSKO DELO  
(Magistrski študij – 2. stopnja)

**FUNCTIONAL AND ANATOMICAL PROPERTIES OF THE RED  
PALM WEEVIL'S (*Rhynchophorus ferrugineus*) RETINA**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek Univerzitetnega študija II. Bolonjske stopnje Strukturna in funkcionalna biologija. Opravljeno je bilo na Katedri za fiziologijo, antropologijo in etologijo Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje oziroma Senat oddelka je dne 21. 02. 2014 odobrila naslov magistrske naloge. Za mentorja magistrskega dela je bil imenovan doc. dr. Gregor Belušič, za recenzenta pa prof. dr. Marko Kreft.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Primož ZIDAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentor: doc. dr. Gregor BELUŠIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzent: prof. dr. Marko KREFT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 12. 9. 2014

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Marko Ilić

---

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2

DK 591.1:577.354.2(043.2)=163.6

KG palmov rilčkar/barvni vid/ERG/fotoreceptorji/sestavljene oči

AV ILIĆ, Marko, diplomirani biolog (UN)

SA BELUŠIČ, Gregor

KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2014

IN FUNKCIONALNE IN ANATOMSKE ZNAČILNOSTI MREŽNICE  
PALMOVEGA RILČKARJA (*Rhynchophorus ferrugineus*)

TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)

OP IX, 46 str., 2 preg., 25 sl., 32 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Namen dela je bil raziskati anatomske in funkcionalne lastnosti sestavljenih oči palmovega rilčkarja (*Rhynchophorus ferrugineus*, Olivier 1970), parazitske vrste na palmah. Poznavanje vida bo olajšalo izdelavo pasti. Pridobljeni podatki prispevajo k skopemu poznavanju vida pri hroščih (Coleoptera). Vid smo raziskali z makroskopsko fotografijo, svetlobno in elektronsko mikrografijo, ter z zunaj in znotrajceličnimi meritvami v mrežnici. Z anatomske metodami smo ugotovili, da ima rilčkar apozicijske oči, in opredelili sestavo omatidija ter razporeditev rbdomer. Rbdomer je odprtega tipa, z intraomatidiskimi prostori med perifernimi (R1-R6) in centralnima receptorjema (R7, R8). Centralni celici skupaj tvorita rbdomero vzdolž celotne dolžine omatidija. Iz elektrofizioloških meritev sklepamo na prisotnost štirih fotoreceptorskih razredov, ki predstavljajo substrat za barvni vid (ozkopasovne celice,  $\lambda_{\max} = 370, 525$  in  $565$  nm) ter akromatski kanal za zaznavo kontrastov (širokopasovne celice  $\lambda_{\max} = 525$  nm). Predpostavljamo obstoj vsaj dveh tipov omatidijev s kombinacijama R7 in R8:  $370$  nm in  $565$  nm (za prepoznavo horizonta) ter  $525$  nm in  $565$  nm (za prepoznavo istovrstnih osebkov). Signali fotoreceptorjev so šumni (kvantni sunki  $\sim 3$  mV), dinamično območje je ozko (Hillov koeficient  $n=1,0-1,2$ ), hitrost vida pa je nizka (fuzijska frekvenca  $50$  Hz). V nadaljevanju želimo raziskati barvni vid z vedenjskimi poskusi ter ugotoviti, ali ima rilčkar razvito nevrnalno superpozicijo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC 591.1:577.354.2(043.2)=163.6

CX red palm weevil/color vision/ERG/photoreceptors/compound eyes

AU ILIĆ, Marko

AA BELUŠIČ, Gregor

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology

PY 2014

TI FUNCTIONAL AND ANATOMICAL PROPERTIES OF THE RED PALM WEEVIL'S (*Rhynchophorus ferrugineus*) RETINA

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO IX, 46 p., 2 tbl., 25 fig., 32 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The purpose of the present work was to investigate the anatomical and functional properties of compound eyes of the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier 1970), parasitic species on the palm trees. Knowledge of the vision will facilitate the production of traps. The data obtained contribute to the scarce knowledge of the vision in beetles (Coleoptera). Vision was investigated by means of macroscopic photography, light and electron micrography and the extracellular and intracellular measurements in the retina. With anatomical methods, we found that the weevil has apposition eyes and determined the composition of ommatidium and distribution of rhabdomeres. The open rhabdom has large intraommatidial cavities among peripheral (R1-6) and central (R7, 8) receptors. The central cells contribute to the central rhabdomere along the entire ommatidial length. The electrophysiological data indicate the presence of four photoreceptor classes, which represent a putative substrate for colour vision (narrowband cells,  $\lambda_{\max} = 370, 525$  and  $565$  nm) and achromatic channel for contrast detection (broadband cell  $\lambda_{\max} = 525$  nm). We assume the existence of at least two types of ommatidia with different combinations of R7 and R8: 370 nm and 565 nm (to identify the horizon) and 525 nm and 565 nm (for the identification of conspecifics). Photoreceptor signals are noisy (quantum bumps  $\sim 3$  mV), the dynamic range is narrow (Hill coefficient  $n = 1,0 - 1,2$ ), the speed of vision is low (fusion frequency 50 Hz). In the future we propose to investigate colour vision with behavioural experiments and to determine whether the weevil developed neural superposition.

## KAZALO VSEBINE

	<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)</b>	III
	<b>KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)</b>	IV
	<b>KAZALO VSEBINE</b>	V
	<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	VII
	<b>KAZALO SLIK</b>	VIII
	<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	IX
<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
1.1	NAMEN DELA	1
1.2	DELOVNA HIPOTEZA	1
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1	OPIS ŽIVALI	2
<b>2.1.1</b>	<b>Življenjski krog:</b>	<b>2</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Škoda ter simptomi okužbe</b>	<b>3</b>
2.2	ZGRADBA OČESA	3
<b>2.2.1</b>	<b>Sestavljeno oko in omatidiji</b>	<b>3</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Apozicijsko, superpozicijsko in nevravno superpozicijsko oko</b>	<b>5</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Ločljivost</b>	<b>7</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Regionalizacija oči</b>	<b>7</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Delovanje fotoreceptorjev</b>	<b>8</b>
2.2.5.1	Rodopsinska molekula	8
2.2.5.2	Fototransdukcija	10
2.2.5.3	Receptorski potencial	11
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>13</b>
3.1	ŽIVALI	13
3.2	MAKROSKOPSE FOTOGRAFIJE	13
3.3	MIKROSKOPIJA	13
<b>3.3.1</b>	<b>Priprava preparatov za mikroskopijo</b>	<b>13</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Svetloba mikroskopija</b>	<b>14</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Elektronska mikroskopija</b>	<b>14</b>
3.4	ELEKTROFIZIOLOGIJA	14
<b>3.4.1</b>	<b>Preparacija ter manipulacija s preparatom</b>	<b>14</b>
3.5	TESTNI PROTOKOLI	15
<b>3.5.1</b>	<b>Spektralna občutljivost</b>	<b>15</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Intenzitetna krivulja</b>	<b>15</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Zaznavanje polarizirane svetlobe</b>	<b>15</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Ugotavljanje kotne frekvence</b>	<b>16</b>
3.6	ZAJEM PODATKOV	16
3.7	SPEKTROFOTOMETRIJA	16
<b>3.7.1</b>	<b>Transmitanca</b>	<b>16</b>

<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>17</b>
4.1	ANATOMSKE ZNAČILNOSTI VIDNEGA SISTEMA	17
<b>4.1.1</b>	<b>Makroskopske fotografije oči</b>	<b>17</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Svetlobno mikroskopski prerezi oči</b>	<b>17</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Ultrastruktura mrežnice</b>	<b>20</b>
4.2	FUNKCIONALNE LASTNOSTI SESTAVLJENIH OČI	21
<b>4.2.1</b>	<b>Elektroretinografska preiskava spektralne občutljivosti</b>	<b>21</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Elektroretinografija s selektivno adaptacijo</b>	<b>22</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Znotrajcelični signali iz fotoreceptorskih celic</b>	<b>23</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Receptorski potenciali posameznih razredov fotoreceptorskih celic</b>	<b>25</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Spektralna občutljivost</b>	<b>27</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Spektrofotometrija</b>	<b>32</b>
4.2.6.1	Transmitanca kornee	32
4.2.6.2	Reflektanca kutikule	33
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b>	<b>35</b>
5.1	ANATOMSKE ZNAČILNOSTI	35
<b>5.1.1</b>	<b>Zgradba očesa</b>	<b>35</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Zgradba omatidija</b>	<b>35</b>
5.2	SPEKTRALNE LASTNOSTI RECEPTORSKIH CELIC	37
5.3	HITROST FOTORECEPTORSKIH CELIC	37
5.4	FILTRske LASTNOSTI DIOPTRIČNEGA APARATA	38
5.5	UGLAŠENOST VIDNEGA SISTEMA S BARVO TELESA	39
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>41</b>
7.1	PREDLOGI ZA NADALJNJE RAZISKAVE	42
<b>8</b>	<b>VIRI</b>	<b>43</b>
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Prikaz povprečnih vrednosti in standardnih odklonov za mirovne membranske potenciale (MMP), najvišje vrednosti odgovorov posameznih celic, naklonov Hillovih krivulj ter število celic v posameznem fotoreceptorskem razredu.	27
Pregl. 2: Povprečne vrednosti in standardni odkloni valovnih dolžin pri katerih so bile celice posameznih razredov maksimalno občutljive ter število celic v posameznem fotoreceptorskem razredu.	30



## KAZALO SLIK

Sl. 1: Palmov rilčkar.	2
Sl. 2: Zdradba sestavljenega očesa.	4
Sl. 3: Primerjava med apozicijskim ter superpozicijskim očesom.	6
Sl. 4: Kotna ločljivost pri sestavljenem in kamričastem očesu.	7
Sl. 5: Značilni absorpcijski pasovi opsina.	9
Sl. 6: Graf absorpcijskih spektrov rodopsinskim molekul Rh1 – Rh6 pri <i>Drosophili</i> .	10
Sl. 7: Potek fototransdukcijske kaskade.	11
Sl. 8: Receptorski potencial in elektrotonično seštevanje.	12
Sl. 9: Lateralni ter ventralni pogled na glavo palmovega rilčkarja.	17
Sl. 10: Vzdolžni prerez sestavljenega očesa.	18
Sl. 11: Prečni prerez sestavljenega očesa.	19
Sl. 12: Prečni prerez osrednjega dela fotoreptornega dela omatidijev.	20
Sl. 13: Elektronska presečna mikrofografija prečnega prereza osrednjega dela fotoreptorskega dela omatidija.	21
Sl. 14: Amplituda reprezentativnega elektoretinograma ob draženju z izokvantnimi dražljaji med 300 nm in 700 nm.	22
Sl. 15: Spektralna občutljivost, merjena z elektoretinogramom, pri različih valovnih dolžinah adaptacijskega dražljaja.	23
Sl. 16: Primer kvantnega sunka.	24
Sl. 17: Frekvenčna analiza signala.	25
Sl. 18: Receptorski potenciali pri različnih intenzitetah svetlobe za posamezne fotoreceptorske razrede.	26
Sl. 19: Povprečne spektralne občutljivosti posameznih fotoreptorskih razredov.	28
Sl. 20: Povprečne spektralne občutljivosti posameznih fotoreptorskih razredov (na istem grafu).	29
Sl. 21: Združeni podatki vseh posameznih meritev ter prilagojeni nomogrami vrhov $\alpha$ .	30
Sl. 22: Histogram vrhov občutljivosti posameznih celic.	31
Sl. 23: Kontrolni poskus.	32
Sl. 24: Transmitanca kornee pri valovnih dolžinah od 300 nm do 700 nm.	33
Sl. 25: Reflekanca površine palmovega rilčkarja.	34

## Okrajšave in simboli

ERG	elektroretinogram
MMP	mirovni membranski potencial
RP	receptorski potencial
UV	kratkovalovni receptorski razred/receptorska celica
NG	ozko zeleni receptorski razred/receptorska celica
BBG	širokopasovni zeleni receptorski razred/receptorska celica
LW	dolgovalovni receptorski razred/receptorska celica
KV	kratkovalovni del spektra
SV	srednjevalovi del spektra
DV	dolgovalovni del spektra
Rh	rodopsin
SA	svetlo adaptirana celica/svetla adaptacija
TA	temno adaptirana celica/temna adaptacija
EPSP	ekscitatorni postsinaptični potencial
$f_C$	kotna frekvenca
$f_F$	fuzijska frekvenca
$\lambda$	valovna dolžina
$V_{max}$	makismalna depolarizacija
$\Delta\phi$	intermatidijski kot
$\Delta\rho$	vpadni kot

## 1 UVOD

### 1.1 NAMEN DELA

Z magistrskim delom smo želeli spoznati anatomske in funkcionalne lastnosti sestavljenih oči palmovega rilčkarja. S pridobljenimi podatki smo poskušali ugotoviti, na kakšen način palmov rilčkar z vidom zaznava okolje, ali uporablja barvni vid, v katerih pogojih je njegov vid funkcionalen ter na kakšen način je vid uglašen s ključnimi motivi v okolju.

### 1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Hrošči imajo razvite sestavljene oči z apozicijsko in superpozicijsko optiko. Oči rilčkarja so temno rjave in brez globoke psevdopupile. Palmov rilčkar je dejaven zlasti podnevi. Zato predpostavljamo, da ima apozicijski tip očesa.

Na podlagi skromnega znanja o vidu pri hroščih predpostavljamo, da ima palmov rilčkar nabor fotoreceptorjev, primeren za barvo gledanje. Najverjetneje ima vsaj dikromatski vid.

Glede na specifično obarvano zunanost kutikule pri obeh spolih predpostavljamo, da bodo v mrežnici palmovega rilčkarja prisotne fotoreceptorske celice z vrhom občutljivosti pri dolgovalovni svetlobi ( $\lambda > 540$  nm).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OPIS ŽIVALI

Palmov rilčkar (*Rhynchophorus ferrugineus*, Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) je škodljivec, ki povzroča škodo na 23 različnih vrstah palm (Kumar, 2012) (Slika 1). Sprva je bil odkrit pri zajedanju kokosovih palm (*Cocos nucifera*) na jugu Azije, od koder se je kasneje razširil vse do plantaž dateljnovne palme (*Phoenix dactylifera*) v Afriki in Evropi (Žuželka uničuje naše palme, 2012). Prvo opaženje v Evropi je bilo leta 1994 v Španiji (Ferry in Gomez, 2002). Leta 2009 je dosegel tudi Ameriko, opažen je bil na Curacau (Roda in sod., 2011). Največjo ekonomsko škodo povzroča na kokosovih, dateljniovih ter oljnih palmah. Vnos palmovega rilčkarja na novo območje je najpogosteje bil rezultat transporta okuženega rastlinskega materiala (Abuagla in sod., 2011). Leta 2006 so palmovega rilčkarja zabeležili v 15 % držav s kokosovimi palmami ter v 50 % držav, v katerih gojijo dateljnovne palme (Faleiro, 2006). Zdravljenje palm je mogoče, še posebej v zgodnjih stopnjah okužbe, sicer palma odmre (Faleiro, 2006).



Slika 1: Palmov rilčkar. Na fotografiji je samec, saj ima na vrhu rilčka opazne ščetine. (Vir slike: *Rhynchophorus ...*, 2013)

Palmov rilčkar spada v družino pravih rilčkarjev (Curculionidae) znotraj redu hroščev (Coleoptera). Je približno 3 cm velika žival rdečkasto rjave barve. Pripisujejo mu dobre letalske sposobnosti, saj lahko naenkrat preletijo več kot kilometer daleč (Žuželka uničuje naše palme, 2012). Pri navigaciji na daljše razdalje se najverjetneje zanaša predvsem na kemotaktične okoljske signale, saj imajo osebki obeh spolov dobro razvite antene. Pomen kemotakse se kaže tudi skozi učinek feromonskih pasti, ki osebke privlačijo na nekajkilometerske razdalje (Soroker, osebna komunikacija).

#### 2.1.1 Življenjski krog

Samica odloži jajčeca v luknjice, ki jih je naredila z mandibulami ter poglobila z rilčkom (Ince in sod., 2011). Število odloženih jajčec je med 58 ter 531, po 1 do 6 dneh pa se iz njih izležejo ličinke (Faleiro, 2006). Te se prehranjujejo z rastlinskim materialom ter potujejo globlje v drevo (Ince in sod., 2011). Za seboj puščajo iztrebke, ki imajo tipičen fermentiran vonj. Po številnih levitvah (3-9) se ličinke spremenijo v bube, ki merijo približno 80 mm v dolžino ter 35 mm v premeru. Odrasli osebki se izležejo po približno 11 do 45 dneh. Najkrajši razvojni krog je bil zabeležen na Filipinih, trajal je 45 dni, najdaljši pa je bil zabeležen v Španiji, kjer je razvoj trajal 139 dni. Odlaganje jajčec poteka skozi celo leto z manjšimi razlikami v pogostosti med sezonami. Tako so na posamezni palmi lahko organizmi iz večih generacij. Ocenjeno število populacij v enem letu v Egiptu je 21 (Salama in sod., 2002).

### 2.1.2 Škoda ter simptomi okužbe

Palmov rilčkar napada predvsem palme, ki so mlajše od 20 let. Samice odlagajo jajčeca v razne poškodbe, razpoke ter odprtine v deblu. Abraham in sod. (1998) opisujejo šest različnih simptomov okužbe palm s palmovim rilčkarjem:

- a) tunelčki znotraj debla,
- b) zvok prehranjevanja ličink,
- c) prisotnost ter mezenje rjave tekočine iz tunelčkov,
- d) prisotnost prebavljenega rastlinskega materiala s tipičnim fermentiranim vonjem,
- e) olevek in poginuli odrasli osebki ob dnu drevesa ter
- f) prelomljeno deblo.

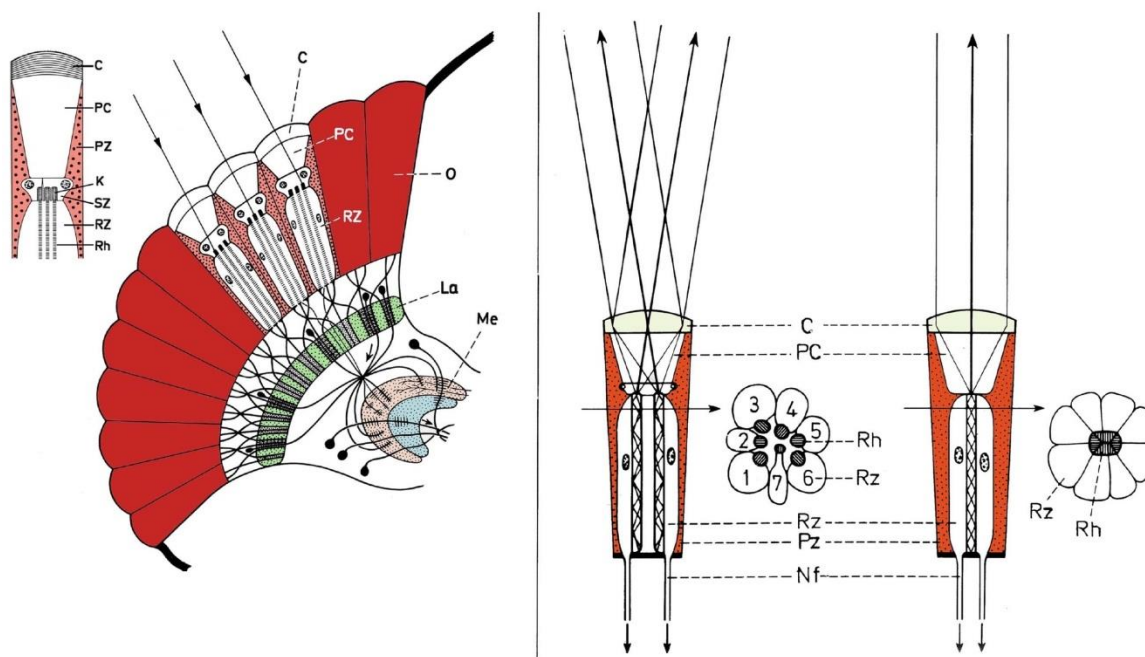
V državah, kjer je palmov rilčkar prisoten, so v uporabi različni pristopi za zatiranje ter omejevanje škode. Najpogostejše so pasti (feromonske, s hrano in kombinirane), biološka kontrola (nematodi, entomopatogene glive) ter uporaba sterilnih samcev (Faleiro, 2006). Preventivni ukrepi, kot sta karantena transportiranega rastlinskega materiala in pravilno uničenje že okuženih dreves, lahko pripomorejo k zmanjšanju razširjanja palmovega rilčkarja ter njegovemu uspevanju (Faleiro, 2006). Pri ugotavljanju najučinkovitejše barve pasti sta Abuagla in Al-Deeb (2011) ugotovila, da so bile črne pasti učinkovitejše kot rdeče, bele in rumene.

Palmov rilčkar se pri svoji orientaciji zanaša tudi na vidno informacijo, zato je pomembno raziskati lastnosti vidnega sistema, kako dobro lahko vidi ter kateri dražljaji v okolju bi lahko bili zanj pomembni.

## 2.2 ZGRADBA OČESA

### 2.2.1 Sestavljeno oko in omatidiji

Večina odraslih krilatih žuželk in larv hemimetabolnih žuželk ima sestavljene ali fasetne oči (Land in Chittka, 2013). Tako oko je sestavljeno iz množice omatidijev oziroma očesc (Slika 2). Omatidije sestavljajo dioptrični aparat, nabor fotoreceptorjev ter pigmentne ali glia celice. Dioptrični aparat služi zbiranju svetlobe in zagotavlja smerno selektivnost očesca. Fotoreceptorji svetlobo zaznavajo in svetlobne dražljaje pretvarjajo v električne dražljaje (Land in Chittka, 2013).



Slika 2: Zgradba sestavljenega očesa. *Levo*: Zgradba sestavljenega očesa z nevrnalno superpozicijo. Informacije o svetlobi, ki vstopa v tri različne omatidije se na nevralnem nivoju združi. *Desno*: Zgradba omatidijev z odprtim (leva shema omatidija) in zaprtim (desna shema omatidija) rabdomom. Oznake: C – kornijska leča, PC – kristalni stožec, RZ – retinalna celica, PZ – pigmentna celica, K – vrh rabdomere, SZ – Semperjeva celica, Rh – rabdomera, Nf – akson retinalne celice, La – lamina in Me – medula optičnega ganglija. Slika prirejena po Kirschfeld in Franceschini (1986: 2 in 3).

Dioptrični aparat sestavljata leča in kristalni stožec. Leča ki nastane iz korneagenih celic, svetlobo lomi in jo projicira na vrh svetločutnega dela omatidija (Land in Nillson, 2002; Mishra in Meyer-Rochow, 2006), kristalni stožec, ki nastane iz Semperjevih celic, pa vodi svetlobo do svetločutnega dela omatidija, ki je najpogosteje sestavljen iz 8 fotoreceptorskih celic, pri nekaterih vrstah pa iz 7 ali 9 (Land in Chittka, 2013). Njihova naloga je zaznavanje svetlobe in imajo tri predele, ki se med seboj morfološko ločijo: rabdomero, telo celice in akson (Belušič, 2011). Rabdomera je gost skupek tankih mikrovilov, ki so postavljeni pravokotno glede na optično os omatidija in imajo v membrani vključene svetločutne molekule. Vse rabdomere v enem omatidiju sestavljajo rabdom (Land in Chittka, 2013). Zaradi razlike v lomnih količnikih med rabdomom, ki je pretežno sestavljen iz lipidov, ter vodno raztopino okoli rabdoma, se svetloba, ki vstopa v rabdom pod kotom, ki je manjši od približno  $12^\circ$ , vanj ujame in ga ne zapusti več (Land in Chittka, 2013). V rabdomu prihaja do popolnega odboja na meji med mikrovili in okolico, zato

velja, da je rabdom svetlobni vodnik. Na bazi mikrovilov, v telesu celice, so submikrovilarne cisterne, v katerih poteka sinteza gradnikov mikrovilov in reciklaža snovi, ki v mikrovilih sodelujejo pri signalizaciji (Hardie in Raghu, 2001). Telesce fotoreceptorja vsebuje še številne mitohondrije in celično jedro. Aksonski izrastek na proksimalnem delu celice prenaša informacijo o svetlobi v optične ganglije (Land in Chittka, 2013). V omatidiju so prisotne tudi pigmentne celice, ki so gosto napolnjene z zrnci pigmentov. Ta zrnca absorbirajo svetlobo ter s tem omejujejo njen vstop v omatidij iz smeri, ki niso v optični osi omatidija oziroma niso del vidnega polja očesca (Land in Chittka, 2013). Primarne pigmentne celice so ob kristalnem stožcu in uravnavajo prehajanje svetlobe iz dioptričnega aparata v rabdom (Mishra in Meyer-Rochow, 2006). Sekundarne pigmentne celice pa so vzdolž svetločutnih celic ter s svojimi pigmentnimi granulami sosednje omatidije med seboj optično izolirajo, tako da svetloba iz enega omatidija ne prehaja v drugega (Mishra in Meyer-Rochow, 2006). Poleg tega sekundarne pigmentne celice sodelujejo pri energijskem in snovnem metabolizmu fotoreceptorskih celic, strukturni podpora elementom omatidija in posredno sodelujejo pri signalizaciji, tako da uravnavajo sestavo zunajceličnega prostora v omatidiju (Mishra in Meyer-Rochow, 2006). Pigmentne granule so pri mnogih vrstah prisotne tudi v fotoreceptorskih celicah (Mishra in Meyer-Rochow, 2006). Če so nameščene blizu rabdoma, lahko absorbirajo energijo tistih valovnih modusov, ki segajo izven svetlobnega vodnika, rabdoma. Z lateralnim premikanjem pigmentnih granul fotoreceptorska celica tako uravnava senčenje rabdoma in se adaptira na različne intenzitete svetlobe (Land in Chittka, 2013).

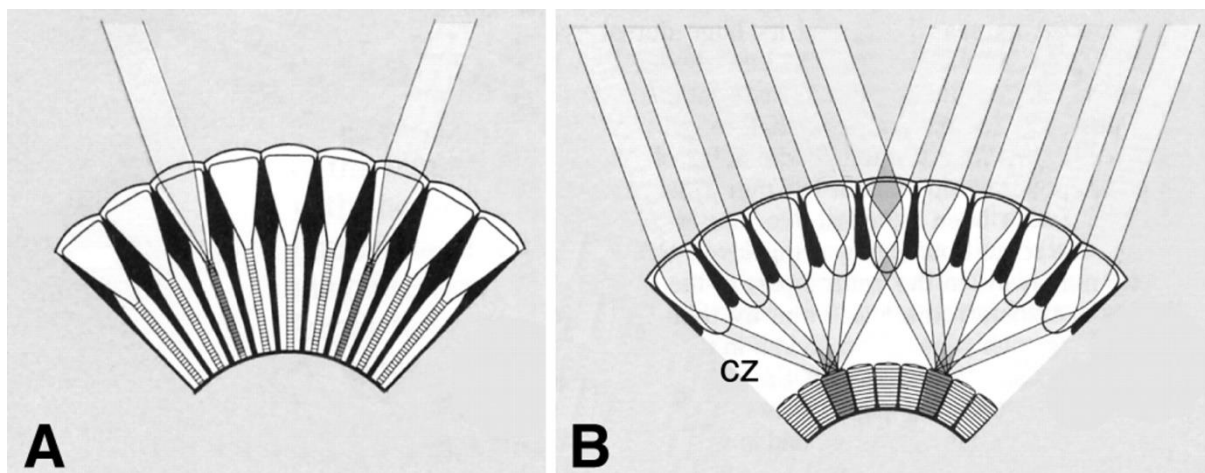
Vsak omatidij posreduje informacijo o majhnem prostorskem kotu oziroma o delu vidnega polja, kar lahko primerjamo z enim pikslom na digitalni fotografiji. Svetloba ob prehodu skozi lečo ohrani prostorsko informacijo, saj je projicirana slika v enakih razmerjih kot slika, ki jo očesce opazuje. Pri prehodu v rabdom, ki je svetlobni vodnik, pa se ta informacija izgubi zaradi mnogih notranjih odbojev (Land in Nilsson, 2002).

Optimizaciji na specifične svetlobne razmere je sledila osnovna arhitektura sestavljenega očesa. Razvili so se trije tipi oči in sicer apozicijsko oko, superpozicijsko oko in nevravno superpozicijsko oko.

### **2.2.2 Apozicijsko, superpozicijsko in nevravno superpozicijsko oko**

Pri apozicijskem očesu (Slika 3, A), kakršnega ima tudi palmov rilčkar sta dioptrični in svetločutni aparat neposredno v stiku in vsak omatidij tako sprejema le svetlobo, ki prihaja skozi lečo nad njim. Takšno oko je primerno za živali, ki se na vidno zaznavo zanašajo v svetlem okolju (Land in Chittka, 2013), kjer je količina svetlobe zadostna. V okoljih z manj svetlobe je uporaba ene leče za zbiranje svetlobe pogosto premalo. Živali, ki so aktivne predvsem v somraku ali ponoči imajo superpozicijsko ali nevravno superpozicijsko oko (Land in Chittka, 2013). V superpozicijskem očesu (Slika 3, B) se svetloba, ki prihaja iz iste smeri (paralelni žarki) preko več 10, 100 ali nekaj tisoč leč zbere v en omatidij

(Land in Nilsson, 2002; Warrant, 2008). Posebnost takih oči je, da imajo med dioptričnim in svetločutnim aparatom brezbarvno želatinozno snov, angleško imenovano *clear zone*, ki je analogna vretenčarski steklovini. Očesu daje obliko in ob enem omogoča prosto prehajanje svetlobe skozi. Povečana razdalja med lečo in rabdomom ter odsotnost pigmentnih celic v omenjeni plasti dovoljuje vstop svetlobe v omatidij iz različnih leč. Tak pristop močno poveča občutljivost očesa, ne da bi za to žrtvovali ločljivost, saj vsak omatidij sprejema svetlobo iz različnih polj kornijskih leč, polja pa se med seboj prekrivajo. Posamezna leča projicira svetlobo iz različnih smeri v različne omatidije (primer srednje leče na sliki 3, B). Živali s superpozicijskimi očmi lahko aktivno uravnavajo velikost polja iz katerega svetloba prihaja, tako, da med omatidiji v *clear zone* premaknejo pigmentne granule, ki omejujejo pot svetlobi iz leč, ki so dalj stran od optične osi omatidija. V primerih, ko pigmentne granule segajo popolnoma do leče je superpozicijsko oko v osnovi enako kot apozicijsko, saj svetlobo v posamezen omatidij projicira le ena leča (Land in Nilsson, 2002).



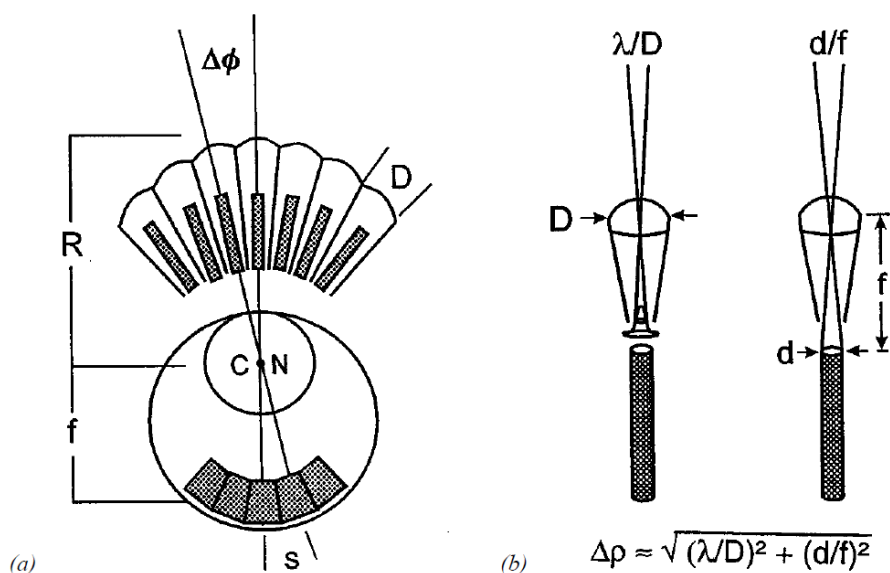
Slika 3: Primerjava med apozicijskim (A) ter superpozicijskim (B) očesom. Svetlobo v posamezen omatidij pri apozicijskem očesu zbira le ena leča. Pri superpozicijskem očesu pa več leč projicira svetlobo skozi *clear zone* (CZ) na posamezen omatidij. Posamezna leča pri superpozicijskem očesu lahko projicira svetlobo različnim omatidijem (srednja leča pri B). Prirejeno po Warrant (2008: 1738).

Med omenjenima tipoma oči je nevravno superpozicijsko oko, ki ima dioptrični in svetločutni del očesa enak apozicijskemu očesu. Nevralna superpozicija je mogoča le v primeru, da so rabdomere posameznih fotoreptornih celic znotraj omatidija ločene, imajo odprt rabdom. Pri nevralni superpoziciji se informacija iz sedmih fotoreptorskih celica, ki so nameščene v sosednjih omatidijih in so usmerjene proti istemu delu vidnega polja zbira skupaj v prvem optičnem gangliju (Slika 2, levo) (Land in Nilsson, 2002). Razlika s superpozicijskim očesom je v tem, da se tukaj skupaj zbira informacija in ne svetloba iz istega dela vidnega polja. S takim pristopom je signal približno sedemkrat ojačan brez strukturnih sprememb dioptričnega ali svetločutnega aparata ter brez zmanjševanja ločljivosti vida (Land in Nilsson, 2002).



### 2.2.3 Ločljivost

Ločljivost očesa je odvisna od interomatidijskega in vpadnega kota omatidija (Land in Chittka, 2013). Kot, ki ga oklepata optični osi sosednjih omatidijev, je interomatidijski kot ( $\Delta\phi$ ) in navadno meri od  $1^\circ$  do  $3^\circ$ , pri mnogih hroščih tudi več kot  $5^\circ$  (Land in Chittka, 2013). Manjši interomatidijski kot pomeni višjo ločljivost, saj vsak omatidij vzorči manjši del vidnega polja. Vpadni kot omatidija ( $\Delta\rho$ ) pa je odvisen od zgradbe dioptričnega aparata in premera rabdoma. Razmerje med širino rabdoma in razdaljo od leče zadovoljivo opiše vpadni kot omatidija (Slika 4, desno). Premer omatidija določa tudi najmanjšo prostorsko kotno ločljivost, ki jo žival lahko zazna. Razmerje med valovno dolžino in premerom leče predstavlja najmanjši kot, pri katerem žival še razloči točko v vidnem polju. Interomatidijski ter vpadni kot sta pri apozicijskih očeh po navadi enaka, saj takšno stanje zagotavlja optimalno vzorčenje (Land in Nilsson, 2002).



Slika 4: Kotna ločljivost pri sestavljenem (a, zgoraj) in kamričastem (a, spodaj) očesu. Kotna ločljivost ( $\Delta\rho$ ) je teoretično omejena s kotom med sosednjimi receptorji, premerom rabdomere ter goriščno razdaljo leče (b, enačba). Oznake:  $\Delta\theta$  - kot med sosednjimi receptorji,  $D$  - premer fasete,  $d$  - premer rabdomere,  $\lambda$  - valovna dolžina svetlobe,  $R$  - polmer sestavljenega očesa,  $f$  - goriščna razdalja,  $s$  - razdalja med sosednjimi receptorji. Prirejeno po Land (1997: 150).

### 2.2.4 Regionalizacija oči

Potrebe po dobri prostorski ločljivosti v vidnem polju so med organizmi zelo različne. Kot prilagoditve na specifično okolje so se razvile tako imenovane akutne cone, kjer sta ločljivost in svetlobna občutljivost očesa povečani predvsem na račun povečanih premerov omatidijev, manjše ukrivljenosti očesa ter posledično manjših interomatidijskih kotih (Land in Chittka, 2013). Najpogosteje so takšne prilagoditve potrebne za uspešno plenjenje

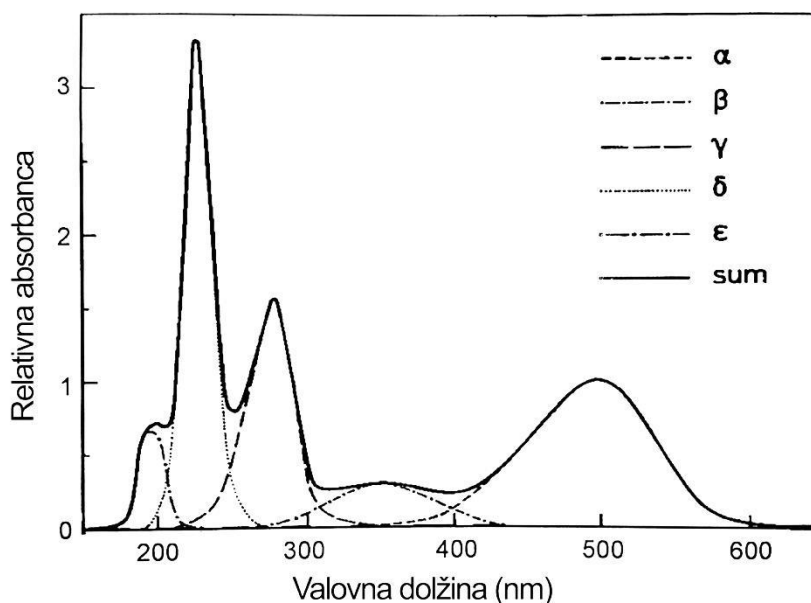
in iskanje partnerjev med letenjem, kot to počnejo npr. kačji pastirji. Akutna cona pri bogomoljkah (Mantodea) je na frontalnih delih oči, kjer je ukrivljenost oči majhna in premer omatidijev velik. Vodni drsalci (*Gerris* sp.) imajo akutno zono v obliki vodoravnega pasu na očeh, saj je vodna gladina kot okolje planarno. Pomembna prilagoditev nekaterih žuželk, na primer kobilic (*Locusta*), čebel (*Apis*) in mravelj (*Cataglyphis*), je regija očesa, ki je specializirana za zaznavo smeri polarizacije svetlobe (Land in Nilsson, 2002). Ta regija je na dorzalnem delu oči, zato nosi ime dorzalni obroč. Anatomske posebnosti omatidijev v dorzalnem obroču so, da so rabdomere nekaterih svetločutnih celic povečane, mikrovili v njih pa orientirani v eni ravnini, brez spiralnega sukanja vzdolž longitudinalne osi omatidija (Land in Chittka, 2013). Zaradi takšne postavitve rabdomere te celice absorbirajo zlasti tiste fotone, katerih e-vektor je usmerjen vzporedno z longitudinalno osjo mikrovilov. Zato so te celice selektivno vzdražne glede na ravnino polarizacije svetlobe. Zaznavanje polarizacijskega vzorca neba služi pri orientaciji, saj je iz polarizacijskega vzorca neba mogoče določiti pozicijo sonca tudi v primeru, ko je sonce za oblaki in žival vidi le del jasnega neba (Land in Nilsson, 2002). Polarizacijski vid ni nujno omejen samo na dorzalni obroč. Ventralna regija mrežnice letečih žuželk je lahko prilagojena na zaznavanje horizontalno polarizirane svetlobe, odbite z vodnih teles (Wernet in sod., 2012). Stomatopodi in sipe, ki imajo celotno mrežnico občutljivo na polarizirano svetlobo, pa uporabljajo polarizirane motive kot znotrajvrstni komunikacijski signal (Land in Nilsson, 2002).

## 2.2.5 Delovanje fotoreceptorjev

### 2.2.5.1 Rodopsinska molekula

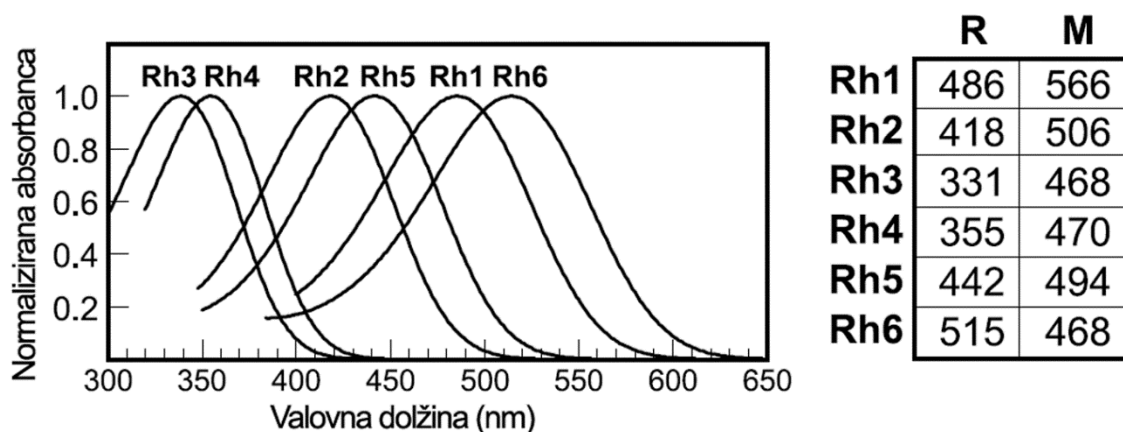
Pri spremembi svetlobnega dražljaja v nevralno informacijo je ključnega pomena fotopigmentna molekula rodopsin, ki se nahaja v membrani mikrovilov (Hill in sod., 2008). Sestavljena je iz beljakovinskega dela, imenovanega opsin in nebeljakovinske kromofore. Opsini so približno 40 kDa velike molekule in imajo 7 transmembranskih regij, ki prečkajo mikrovilno membrano (Briscoe in Chittka, 2001). Večina žuželk izraža tri vrste opsinov in sicer takšne, ki imajo vrh absorbcije pri kratkovalovnem, modrem ter dolgovalovnem delu spektra (Jackowska, 2007). Kromofora, ki jo uporablja večina žuželk je 11-cis 3-hidroksi retinal (Briscoe in Chittka, 2001; Hill in sod., 2008). Kromofora je preko shiffove baze kovalentno vezana na aminokislino lizin v opsinu (Meglič, 2009). Rodopsinske molekule imajo različne absorpcijske spektre, ki so odvisni predvsem od aminokislinskega zaporedja v opsinskem delu rodopsina (Land in Chittka, 2013). Interakcije aminokislin opsinskih molekul premaknejo vrhove spektralnih občutljivosti kromofor (navadno zelo ozki, med 377 in 400 nm valovne dolžine) na različne valovne dolžine med 330 in 650 nm (Briscoe in Chittka, 2001). Spekter vsakega rodopsina ima več vrhov, ki so označeni s prvimi črkami grške abecede (Slika 5). Vrh  $\alpha$  je pri najvišji valovni dolžini, nato mu v enakem vrstnem redu sledijo ostali s krajšanjem valovne dolžine.

Vrhova  $\alpha$  in  $\beta$  sta odvisna predvsem od interakcije kromofore z opsinsko molekulo, ostali vrhovi pa so odvisni od aminokislinskega zaporedja opsinske molekule (Salcedo in sod., 1999). Pri *Drosophili* je opisanih 6 rodopsinskih molekul, ki so jih označili kot Rh1 – Rh6 (Salcedo in sod., 1999) (Slika 6).



Slika 5: Značilni absorpcijski pasovi opsina z maksimalno absorbanco v vidnem delu spektra pri 500 nm (vrh  $\alpha$ ). Za fiziološko občutljivost fotoreceptorja sta pomembna vrhova  $\alpha$  in  $\beta$ . Prirejeno po Stavenga in sod. (2000: 530).

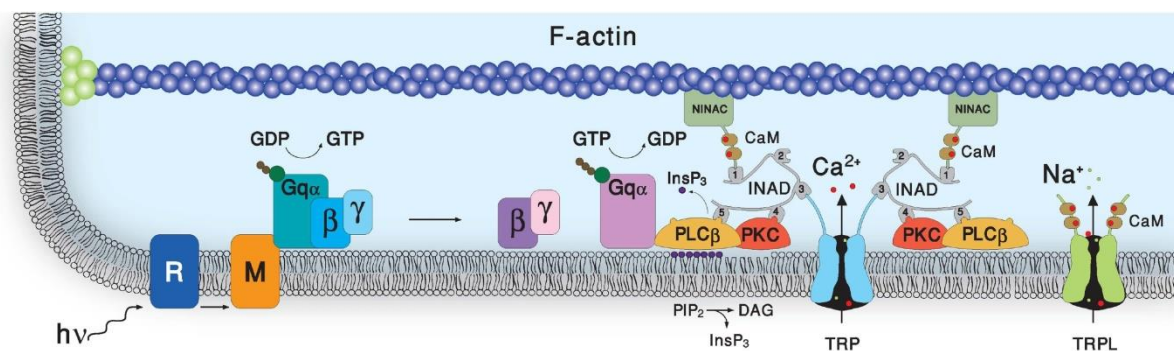
Glavni dogodek pri zaznavanju svetlobe je sprejem fotona z rodopsinsko molekulo (Jackowska, 2007). Energija fotona povzroči konformacijsko spremembo kromofore iz 11-cis v all-trans konformacijo, kar posledično aktivira rodopsinsko molekulo (Land in Chittka, 2013). Ob aktivaciji iz rodopsina, preko nekaj termolabilnih molekul, nastane termostabilen metarodopsin (Katz in Minke, 2009). Reakcija pretvorbe rodopsina v metarodopsin je pri žuželkah fotoreverzibilna, za razliko od vretenčarskih metarodopsinskih molekul, ki se reciklirajo v epiteljskih celicah (Land in Chittka, 2013). Absorpcijski spektri metarodopsinskih molekul so drugačni od absorpcijskih spektrov rodopsinskih molekul. Metarodopsini imajo največjo absorbanco navadno pri daljših valovnih dolžinah kot rodopsinske molekule iz katerih so nastale (batokromni premik absorbance) (Stavenga in sod., 2000). Rodopsini, katerih najvišja absorbanca je pri  $>500$  nm imajo hipsokromno zamaknjene vrhove absorbanc metarodopsina, torej je vrh absorbance metarodopsina kratkovalovno zamaknjen (Stavenga in sod., 2000).



Slika 6: Graf absorpcijskih spektrov rodopsinskih molekul Rh1 – Rh6 pri *Drosophili* ter preglednica vrhov absorpcijskih spektrov rodopsinskih in njihovih metarodopsinskih molekul. Prirejeno po Salcedo in sod. (1999: 10722).

#### 2.2.5.2 Fototransdukcija

Molekulski mehanizem žuželčje fototransdukcije poznamo podrobno le preko raziskav na modelnem organizmu, vinski mušici. Verjetno so osnovni mehanizmi pri palmovem rilčkarju zelo podobni z nekaj razlikami v podrobnostih. Ko rodopsinska molekula absorbira foton, se preko konformacijskih sprememb na njenem C-terminusu aktivira z  $G_q$ -proteinom povezana kaskadna reakcija. Gvanozindifosfat (GTP) na G-proteinu se nadomesti z gvanozintrifosfatom (GTP), kar aktivira G-protein (Katz in Minke, 2009). Ta razpade na  $\alpha$  in  $\beta\gamma$  podenoti. Podenota  $\alpha$  aktivira fosfolipazo C, ki nadalje razcepi molekulo fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat ( $PIP_2$ ) na vodotopen inozitoltrifosfat ( $IP_3$ ) in diacilglicerol (DAG), ki je maščobotopen in ostane v membrani. Razpad  $PIP_2$  privede do zmanjšanja površine mikrovila in povišanja mehanske tenzije v membrani (Hardie in Franze, 2012). Takšna sprememba membranskega okolja in nastanek DAG (Delgado in sod., 2014) vplivata na ionske kanalčke, ki se odprejo in s  $Ca^{2+}$  ter  $Na^+$  tokom spremenijo membranski električni potencial receptorske celice, kar povzroči nastanek receptorskega potenciala. Za inaktivacijo metarodopsina je zadolžena molekula arestin 2. Vezava arestina na metarodopsin traja vse, dokler se metarodopsinska molekula z absorpcijo dolgovalovnega fotona ne pretvori nazaj v rodopsin. Metarodopsin v času od nastanka do inaktivacije z arestinom aktivira približno 5 – 10 G-proteinov (Land in Chittka, 2013).

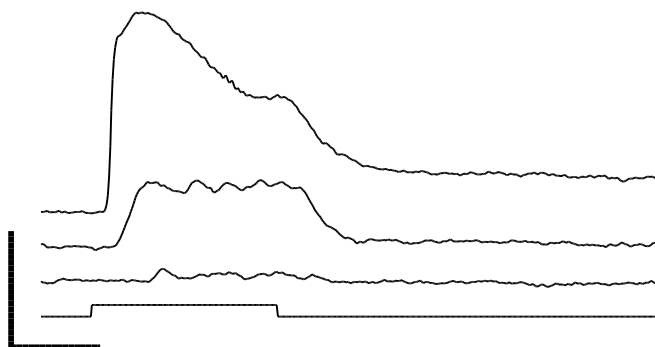


Slika 7: Potek fototransdukcijske kaskade. Ob sprejemu fotona se na C-terminalu rodopsinske molekule (M) aktivira z  $G_q$ -proteinom povezana kaskadna reakcija. Gvanozindifosfat (GTP) na G-proteinu se nadomesti z gvanozintrifosfatom (GDP), kar aktivira G-protein. Ta razpade na podenoti  $\alpha$  in  $\beta\gamma$ . Podenota  $\alpha$  aktivira fosfolipazo C, ki nadalje razcepi molekulo fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat (PIP<sub>2</sub>) na vodotopen inozitoltrifosfat (IP<sub>3</sub>) in diacilglicerol (DAG), ki je maščobotopen in ostane v membrani. DAG posredno vpliva na odpiranje  $Ca^{2+}$  ter  $Na^+$  ionskih kanalčkov, kar privede do nastanka receptorskega potenciala. (Slika povzeta po Katz in Minke, 2009: 5)

Vse molekule, ki so potrebne za fototransdukcijo so v lumnu mikrovilov ali pa na membrani mikrovilov (Hill in sod., 2008).

### 2.2.5.3 Receptorski potencial

Absorbcija enega fotona povzroči odpiranje večjega števila ionskih kanalčkov. Skoznje steče unitarni tok, imenovan kvantni sunek. Za nastanek enega kvantnega sunka je pri *Drosophili* potrebno odprtje nekaj deset kanalčkov, pri *Limulusu* pa nekaj tisoč (Nasi in Del Pilar Gomez, 2000). Pri jakosti svetlobe, kjer je v kratkem času (nekaj ms) sprejet več kot en foton na fotoreceptorsko celico, se kvantni sunki med seboj elektrotonično seštevajo. Tako nastane receptorski potencial (Slika 8). Pri nizkih svetlobnih jakostih potencial fluktuirar zaradi stohastične narave časovnega vzorca absorpcije fotonov, pri višjih jakostih pa se zaradi progresivnega zmanjšanja posameznih kvantnih sunkov potencial umiri, zgladi. Z drugimi besedami, razmerje signal/šum narašča s svetlobno jakostjo.



Slika 8: Receptorski potencial in elektrotonično seštevanje. Od spodaj navzgor: dražljaj, signal pri  $\log I/I_{\max} = -4, -2,5, 0$  log. Z višanjem intenzitete dražljaja razmerje signal/šum narašča in signal je bolj gladek. Merilce: 100 ms in 10 mV.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 ŽIVALI

Odrasle osebkke palmovih rilčkarjev smo dobili iz laboratorijske kulture prof. Didierja Rochata na inštitutu INRA, Versailles, Francija. V seštevku smo prejeli 60 živali, od katerih smo jih uporabili 45, poginilo jih je 9 in 6 smo jih odstranili. Spolna sestava je bila 30 samcev in 30 samic. Živali smo imeli v ločenih posodah, ločeno po spolih ter jih hranili z jabolki in škropili z vodo vsak drugi dan.

#### 3.2 MAKROSKOPSKE FOTOGRAFIJE

Najprej smo želeli spoznati zunanje karakteristike očesa in glave. Makroskopske fotografije živali, glav ter oči smo posneli s kamero DinoLite ter računalniškim programom DinoCapture.

#### 3.3 MIKROSKOPIJA

Za ugotavljanje celičnega ustroja in ultrastrukturnih posebnosti vidnega sistema palmovega rilčkarja smo uporabili svetlobno in elektronsko presevno mikroskopijo.

##### 3.3.1 Priprava preparatov za mikroskopijo

Mrežnice rilčkarja smo pripravili za svetlobno in elektronsko presevno mikroskopijo. Uporabili smo 4 oči, en par oči za svetlobno in drugi par oči za elektronsko mikroskopijo. Najprej smo osebkoma odstranili glavi in izrezali oči ter jih pri ventralnih in dorzalnih koncih prirezali, kar je pripomoglo pri zmanjševanju vpliva površinske napetosti na preparate. Preparate smo 3 ure namakali v raztopini 3,5 % glutaldehida in 4 % aldehida v 0,1 M Na-kakodilatnem pufri, umerjenemu na pH 7,2. Nato smo jih 6 krat sprali v 0,1 M Na-kakodilatnem pufri, vsako spiranje je trajalo 15 minut. Preparata za elektronsko mikroskopijo smo za 90 minut tretirali v 0,1 M OsO<sub>4</sub> v 0,1 M Na-kakodilatnem pufri in spirali dvakrat po 10 minut v enakem pufri. Vsi preparati, torej za svetlobno in elektronsko mikroskopijo, so bili nadalje sprani v destilirani vodi (3 x 10 minut), nato dehidrirani v alkoholni vrsti (po 10 minut v 50 %, 70 %, 80 %, 90 % in 100 % EtOH) in naraščajoči vrsti alkohola in propilenoksida (po 15 minut pri EtOH:propilenoksid 3:1, EtOH:propilenoksid 1:1, EtOH:propilenoksid 1:3, propilenoksid ter ponovno propilenoksid). Sledilo je vklapljanje v Spurr 1 uro v mešanici propilenoksid:Spurr z razmerjem 3:1, 1 uro pri razmerju 1:1 ter čez noč pri razmerju 1:3. Naslednji dan so preparati bili premeščeni v čisti Spurr ter po 24 urah ponovno v čisti Spurr. Polimerizacija je potekala 16 ur pri temperaturi 60 °C.

### 3.3.2 Svetloba mikroskopija

Rezine za svetlobno mikroskopijo so bile narejene na mikrotomu Leica s steklenimi noži ter položene na objektna stekelca premazana s polilizinom. Debeline rezov so bile 1,5  $\mu\text{m}$ . Eno oko je bilo narezano vzdolž optične osi omatidijev, drugo prečno. Rezine so bile za ~15 sekund dodatno kontrastirane z barvilom Azur II.

Fotografije so bile narejene na Axioscope 2 MOT mikroskopu (Carl Zeiss, Jena, Nemčija) z Axiovision 4.8 kamero (Carl Zeiss Vision, Halbergmoos, Nemčija) ter uporabo AxioCam MRc programa (Carl Zeiss Vision, Halbergmoos, Nemčija).

### 3.3.3 Elektronska mikroskopija

Presevno elektronsko mikroskopske analize smo izvedli na Medicinski univerzi v Gradcu s pomočjo dr. Gerda Leitingerja. Preparata, kontrastirana z  $\text{OsO}_4$ , sta bila narezana na Leica Ultracut mikrotomu. Ultratanke rezine, debeline 70 nm, so bile dodatno kontrastirane z reagentom Pt-blue (Ibilabs, ZDA) in svinčevim citratom.

Preparate smo opazovali na presevnem elektronskem mikroskopu FEI Tecnai20 (FEI, ZDA) pri 120 kV ter slikali z Gatan Ultrascan 1000 kamero s spodnjo namestitvijo z uporabo Digital Micrograph programom (Gatan, ZDA).

## 3.4 ELEKTROFIZIOLOGIJA

### 3.4.1 Preparacija ter manipulacija s preparatom

Znotrajcelične meritve in meritve elektoretinogramov (ERG) smo izvajali na izoliranih glavah palmovih rilčkarjev. Glavo smo upognili popolnoma naprej, tako da se je rilček dotikal ventralne strani toraksa. V takem položaju je bilo mogoče s skalpelom odrezati glavo z rezom pri vratu od dorzalne proti ventralni strani. Izkazalo se je, da so taki preparati dolgoživi ter primerni za meritve še približno 3 do 5 ur po dekapitaciji. Nato smo dorzalni del desnega očesa ter majhen del glavine kapsule dorzalno nad očesom odstranili ter v luknjo dali mineralno olje, da se preprat ne bi izsušil. Glavo smo položili na nastavek za goniometer na levi bok ter jo imobilizirali z mešanico čebeljega voska in kolofonije 3:1. Goniometer s preparatom je omogočal pozicioniranje preparata v 5 oseh in sicer treh planarnih (x, y, z) ter dveh rotacijskih (okoli navpičnice ter nagib naprej in nazaj), ki so omogočale postavitev očesa v poljubno lego glede na svetlobo. Na goniometru je bil nameščen tudi mikromanipulator (Sensapex, Oulu, Finska), ki se je premikal skupaj s preparatom. Merilne elektrode smo naredili na vlačilcu pipet P-97 (Sutter, Novato, ZDA) ter jih napolnili s 3M KCl. Upornosti elektrod za znotrajcelične meritve so bile 45-110



M $\Omega$ . Referenčna elektroda je bila Ag/AgCl žica, vstavljena v mehko tkivo v vratni odprtini.

Svetlobni vir je bila 150 W obločna XBO žarnica, katere svetlobo smo vodili skozi monokromator (B&M, Nemčija) ki je omogočil nastavitev poljubne valovne dolžine stimulacijske svetlobe. Vhodna in izhodna reža monokromatorja sta bili nastavljeni tako, da smo dobili dražljaj s pasovno širino 10 nm. Jakost svetlobe smo prilagajali z refleksijskimi kvarčnimi sivimi filtri ter motoriziranim kvarčnim sivim klinom. Geometrijo dražilnega žarka smo nadzorovali z aperturno in poljsko zaslonko pred objektivno lečo. Ves objektiv je bil nameščen na linearno pomičnem nastavku, s katerim smo žarek fokusirali na površini očesa.

Pri selektivni adaptaciji smo za produkcijo adaptacijskih dražljajev uporabljali dodatno 150 W XBO žarnico skupaj z monokromatorjem (77250-M, Newport Oriel, Irvine, ZDA), nevtralnimi filtri in kvarčnim lečjem. Adaptacijska svetloba je bila projicirana na oko koaksialno s testnim dražljajem, kar smo dosegli z uporabo nastavljivih polprepustnih zrcal.

Kalibracijo dražljajev smo izvedli z uporabo valovno nevtralne termopile (Oriel, ZDA).

Z merilno elektrodo smo prodirali v mrežnico skozi luknjo v desnem očesu iz ventralne proti dorzalni strani očesa, od proksimalne k distalni strani mrežnice. Padec napetosti in prisotnost receptorskih potencialov ob osvetljevanju očesa sta pomenila uspešen prodor elektrode v fotoreceptorsko celico.

### 3.5 TESTNI PROTOKOLI

#### 3.5.1 Spektralna občutljivost

Za ugotavljanje spektralne občutljivosti fotoreceptorskih celic smo uporabili 200 ms dražljaje z valovnimi dolžinami med 260 in 760 nm s 5 nm korakom. Svetlobna jakost je bila prilagojena z motoriziranim sivim klinom, tako da so imeli testni dražljaji vseh valovnih dolžin enak fotonski tok (takoimenovani izokvantni dražljaji).

#### 3.5.2 Intenzitetna krivulja

Pri valovni dolžini, kjer je bil odgovor najvišji, smo izmerili intenzitetno krivuljo z uporabo svetlobnega dražljaja pri različnih intenzitetah. Intenzitete testnega dražljaja od - 4 do 0 logaritamskih enot, z 0,5 log korakom smo producirali z uporabo avtomatiziranega sivega klina.

#### 3.5.3 Zaznavanje polarizirane svetlobe

Polarizacijsko občutljivost smo ugotavljali pri isti valovni dolžini kot za intenzitetno krivuljo, z rotacijo linearne polarizacijskega filtra OUV2500 (Knight optical, Velika Britanija) s korakom  $11,25^\circ$ . Svetlobo smo atenuirali, tako da je bil odgovor celice približno 70 % maksimalnega odgovora pri intenzitetni krivulji.

### 3.5.4 Ugotavljanje kotne frekvence

Hitrost fotoreceptorjev smo ovrednotili z uporabo kratkih svetlobnih bliskov (8 ms) pri isti valovni dolžini, kot za intenzitetno krivuljo. Predvajali smo jih temno (3 min teme) oziroma svetlo (3 min polne svetlobe) adaptiranim fotoreceptorjem. Tako smo posneli impulzne odgovore, ki smo jih normalizirali in frekvenčno analizirali z lastnim programom v okolju Matlab (MathWorks, ZDA).

## 3.6 ZAJEM PODATKOV

ERG signale smo najprej ojačali z AI 401 SmartProbe diferencialnim ojačevalcem in ojačevalcem CyberAmp 320 (Molecular Devices, Sunnyvale, ZDA). Znotrajcelične signale smo ojačali z ojačevalnikom SEC-10LX (NPI, Nemčija). Signale smo digitalizirali z Micro 1401 laboratorijskim vmesnikom (CED, Cambridge, Vel. Britanija) in zabeležili s programom WinWCP (John Dempster, Univerza v Strathclydu, Vel. Britanija).

## 3.7 SPEKTROFOTOMETRIJA

### 3.7.1 Transmitanca

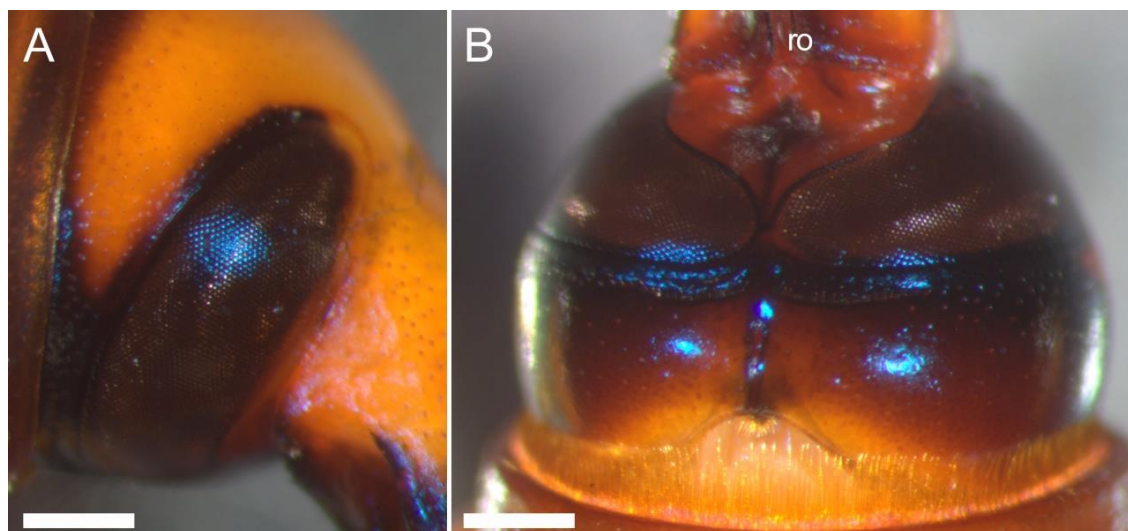
Za ugotavljanje transmitance kornee smo uporabili 150 W XBO obločnico kot svetlobni vir in spektrofotometer USB2000 (Ocean Optics, ZDA). Korneo izoliranega očesa smo očistili tako, da smo odstranili mehko tkivo mrežnice. Tako očiščeno korneo smo namestili čez košček aluminijaste folije z majhno luknjico. Skozi luknjico in korneo smo svetili in izmerili transmitanco glede na transmitanco same luknjice.

## 4 REZULTATI

### 4.1 ANATOMSKE ZNAČILNOSTI VIDNEGA SISTEMA

#### 4.1.1 Makroskopske fotografije oči

Vidni sistem palmovega rilčkarja predstavlja par sestavljenih oči. Žival nima ocelov. Oči so sorazmerno majhne in brez povečave slabo opazne. Zato smo jih najprej slikali pod lupo s tehniko prekrizanih polarizatorjev. Sestavljene oči so nameščene na bazi rilčka, na ventralni strani se levo in desno oko stikata, na dorzalni strani je med njima približno 1 mm presledka. Oči so podolgovate in ozke, saj v anteroposteriorni osi merijo ~ 0,7 mm, v dorzoventralni osi pa ~ 2 mm. Vsako oko sestavlja približno 3000 faset, vsaka faseta meri v premeru 30  $\mu\text{m}$ . Vidno polje, ki ga pokrivata obe očesi, ocenjujemo na ~ 340° x 60°. Oči niso izbočene. Slika 9 prikazuje morfologijo glave in lokacijo oči.

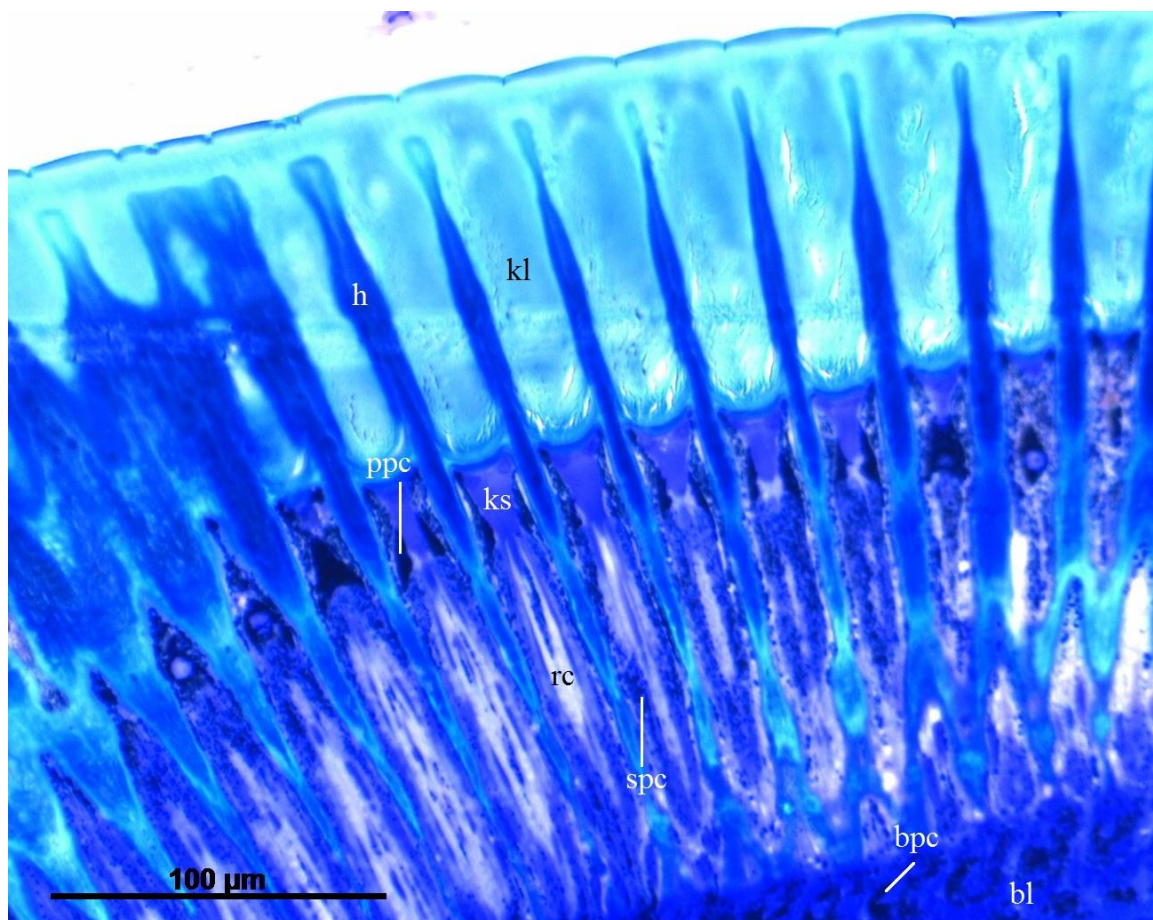


Slika 9: Lateralni (A) ter ventralni (B) pogled na glavo. Očesi se na ventralni strani stikata. Ocelov ni. Oči so rjave barve zaradi zaščitnega pigmenta. ro, rostrum (rilček). Merilce: 500  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.2 Svetlobno mikroskopski prerezi oči

Fiksirane oči, vklopljene v smolo, smo narezali na 1,5 mikronske rezine, jih obarvali in pregledali s svetlobnim mikroskopom. Na vzdolžnih prerezih smo ugotovili, da debelina sestavljenega očesa meri ~240  $\mu\text{m}$ , od katerih pripada ~115  $\mu\text{m}$  dioptričnemu aparatu ter ~125  $\mu\text{m}$  fotoreceptornemu delu omatidija. Interomatidijski kot meri 1,34°. Dioptrični aparat tvorijo kornijske leče in kristalni stožci. Distalne površine omatidijev so zelo malo ukrivljene, zato svetlobo fokusirajo podaljšane kornijske leče, ki imajo obliko topovskega izstrelka (Slika 10). Pod kornijskimi lečami so nameščeni kristalni stožci, ki v dolžino merijo ~25  $\mu\text{m}$ . Omatidije optično izolirajo pigmentne celice ter hitinizirane ovojnice, ki

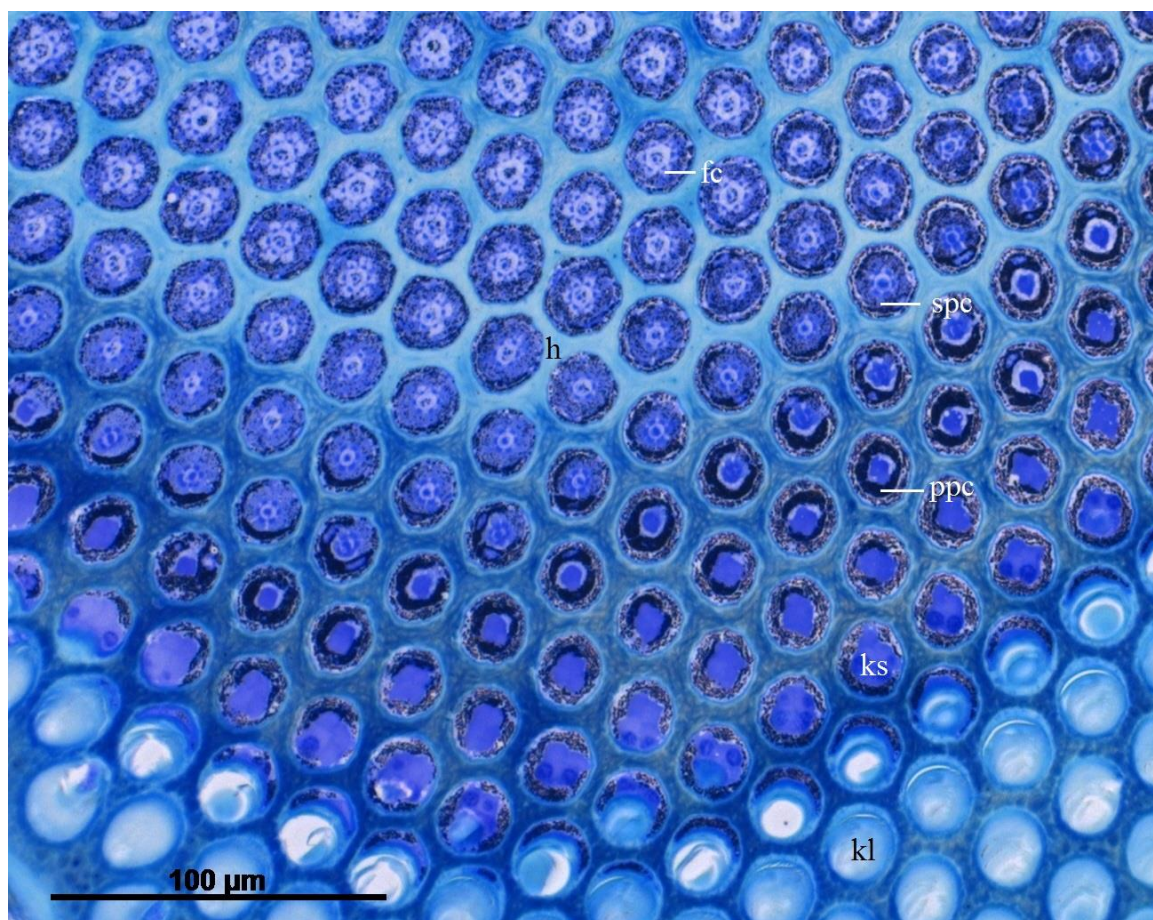
obdajajo fotoreceptivni del omatidijev. Omatidiji v premeru merijo 30  $\mu\text{m}$  distalno oziroma 20  $\mu\text{m}$  proksimalno. Neposredno pod omatidiji je plast pigmentnih celic.



Slika 10: Vzdolžni prerez sestavljenega očesa, obarvan z barvilom Azur II. Dioptrični aparat sestavlja kornijska leča (kl) in kristalini stožec (ks). Omatidiji so optično izolirani s primarnimi (ppc) in sekundarnimi pigmentnimi celicami (spc). Oznake: rc - retinalne celice, h - hitinske ovojnice omatidijev, bl - bazalna lamina, bpc - bazalne pigmentne celice. Debelina preparata: 1,5  $\mu\text{m}$ . Avtor slike: Marko Ilić

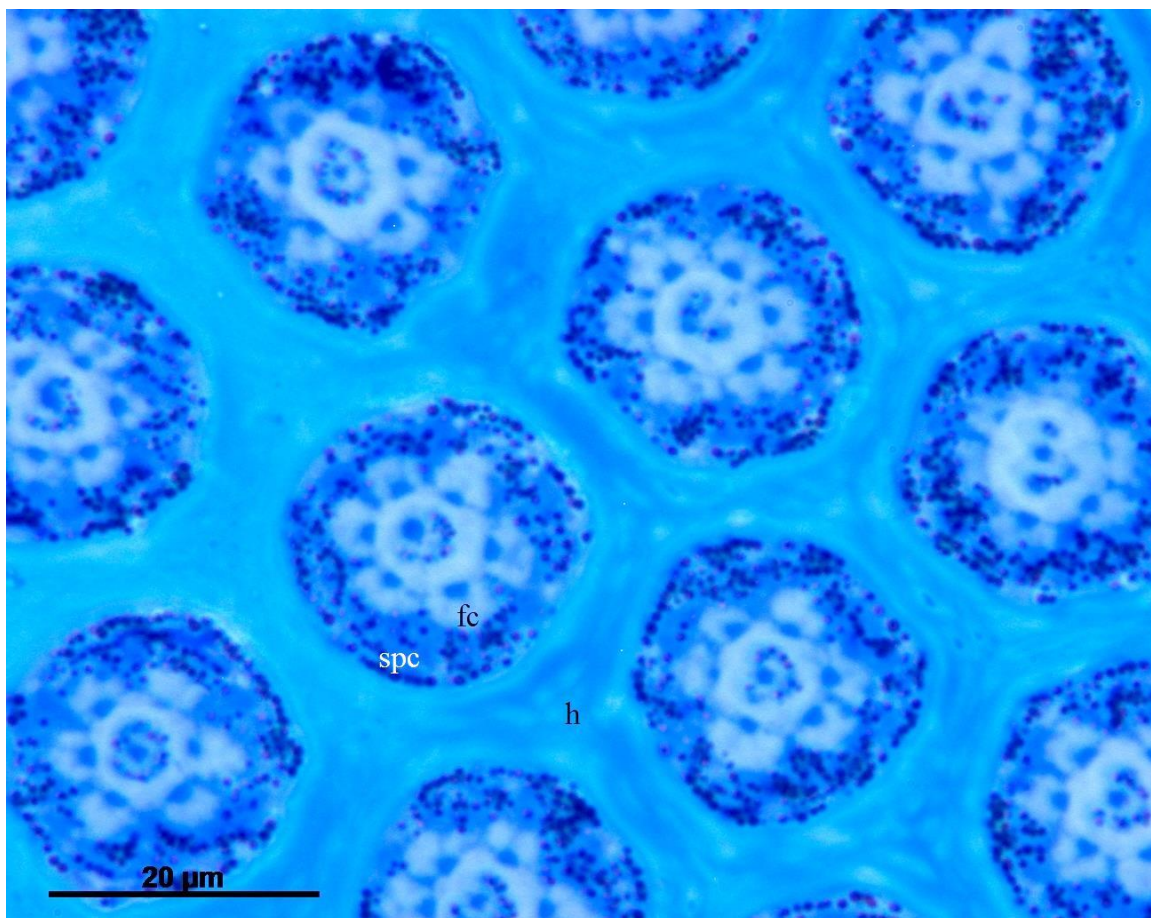
Na prečnem prerezu očesa (Slika 11) smo ugotovili, da omatidij vsebuje sedem rabdomer, od tega šest razporejenih po obodu omatidija, kjer s svojimi somami fotoreceptivne celice tvorijo krog, v sredini omatidija pa je sedma rabdomera. Posamezne omatidije obdaja debela plast hitina.





Slika 11: Prečni prerez sestavljenega očesa. Prerez prikazuje omatidije pri različnih globinah, saj je bil narejen na ukrivljenem delu očesa. Na zgornjem robu je proksimalni del mrežnice, na spodnjem pa distalni. Od distalne k proksimalni strani vidimo kornijsko lečo (kl), kristalinski stožec (ks) z dobro vidnimi jedri, sledijo močno pigmentirane primarne (ppc) in manj pigmentirane sekundarne pigmentne celice (spc) ter fotoreceptorske celice (fc). Rabdomere so distalno, tik pod kristalnim stožcem, sklenjene, proksimalno pa med seboj razmaknjene. Med omatidiji je vidna debela hitinska ovojnica (h). Preparat je bil obarvan z barvilom Azur II. Debelina preparata: 1,5  $\mu\text{m}$ . Avtor slike: Marko Ilić

Pri večji povečavi je mogoče opaziti pigmentna zrnca v sekundarnih pigmentnih celicah, dobro vidnih sedem rabdomer, nepigmentirana telesca šestih obodnih fotoreptorskih celic, ter pigment znotraj osrednjih celic, ki obdajata osrednjo, sedmo rabdomero (Slika 12).

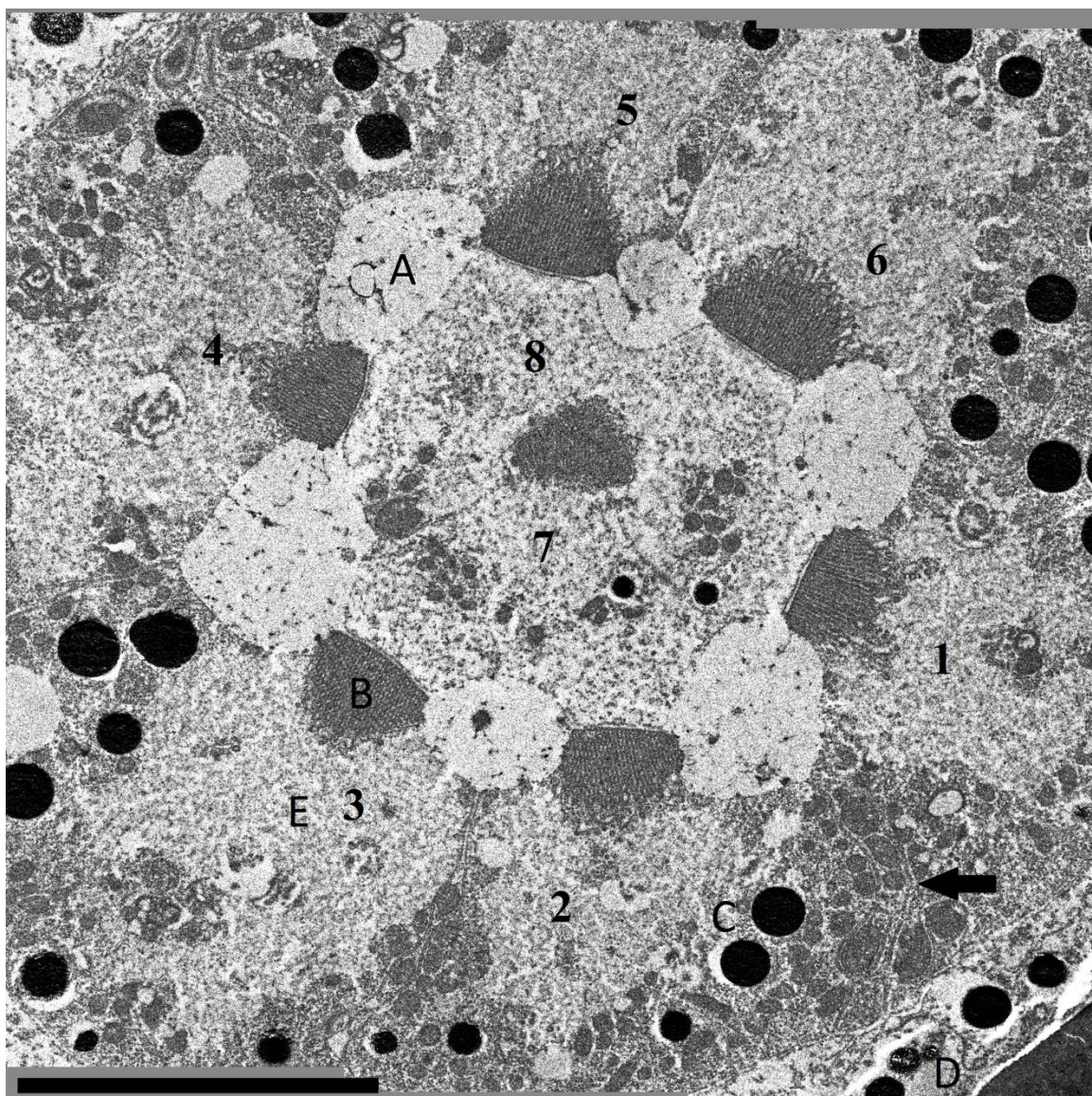


Slika 12 Prečni prerez osrednjega dela fotoreceptornega dela omatidijev. Sekundarne pigmentne celice (spc) so polne temno obarvanih pigmentnih granul. Šest fotoreceptorskih celic (fc) je razporejenih po obodu, dve sta nameščeni v sredini omatidija. Posamezne rabdomere so vidne kot modro obarvane pike na proksimalnem delu obodnih celic ter v centru omatidija. Omotidije obdaja debela plast hitina (h). Preparat je bil obarvan z barvilom Azur II. Debelina preparata: 1,5  $\mu\text{m}$ . Avtor slike: Marko Ilić

### 4.1.3 Ultrastruktura mrežnice

Mrežnico smo preučili še s slikanjem prečnega prereza omatidija s presevnim elektronskim mikroskopom. Ugotovili smo, da mikrovile v osrednjo rabdomero po celotni dolžini omatidija prispevata obe osrednji fotoreceptorski celici. Rabdomere obodnih šestih fotoreceptorskih celic obdajajo sorazmerno veliki prostori medceličnine (Slika 13). Neposredno za rabdomerami se v celicah nahaja obsežen prostor brez jasno vidnih organelov, najbrž gre za preplet submikrovilnih cistern. Temne pigmentne granule so vidne tako v sekundarnih pigmentnih kakor v fotoreceptorskih celicah. Slednje v premeru merijo  $\sim 5 \mu\text{m}$ . V mrežnici najdemo obilo mitohondrijev, ki so nameščeni na obodu fotoreceptorskih celic in v sekundarnih pigmentnih celicah (Slika 13, puščica).



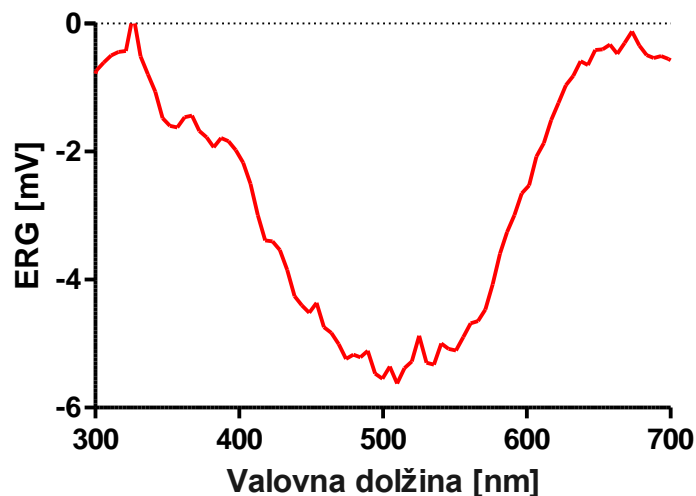


Slika 13: Elektronska presečna mikrofotografija prečnega prereza osrednjega dela fotoreceptorskega dela omatidija. Velik del prereza zavzemajo obsežni intraomatidiski prostori (A) z medceličnino in nakazanim matriksom. Fotoreceptorske celice (1-8) imajo dobro vidne mikrovilarne rabdomere (B) in some (E). Pigmentne granule (C) so v sekundarnih pigmentnih celicah (D) na obodu omatidija ter v fotoreceptorskih celicah. Puščica kaže z mitohondriji bogato območje v svetločutnih in sekundarnih pigmentnih celicah. Preparat je bil kontrastiran z reagentom Pt-blue in svinčevim citratom. Debelina preparata: 70  $\mu\text{m}$ . Merilce: 5  $\mu\text{m}$ . Avtor slike: Marko Ilić

## 4.2 FUNKCIONALNE LASTNOSTI SESTAVLJENIH OČI

### 4.2.1 Elektoretinografska preiskava spektralne občutljivosti

Elektoretinogram, izzvan z izokvantnimi dražljaji med 300 in 700 nm v 5 nm korakih, je imel izrazit maksimum amplitude v zelenem delu spektra pri 510 nm, zelo nizko amplitudo v območju pod 350 nm, in dodaten vrh med 350 in 400 nm (Slika 14).

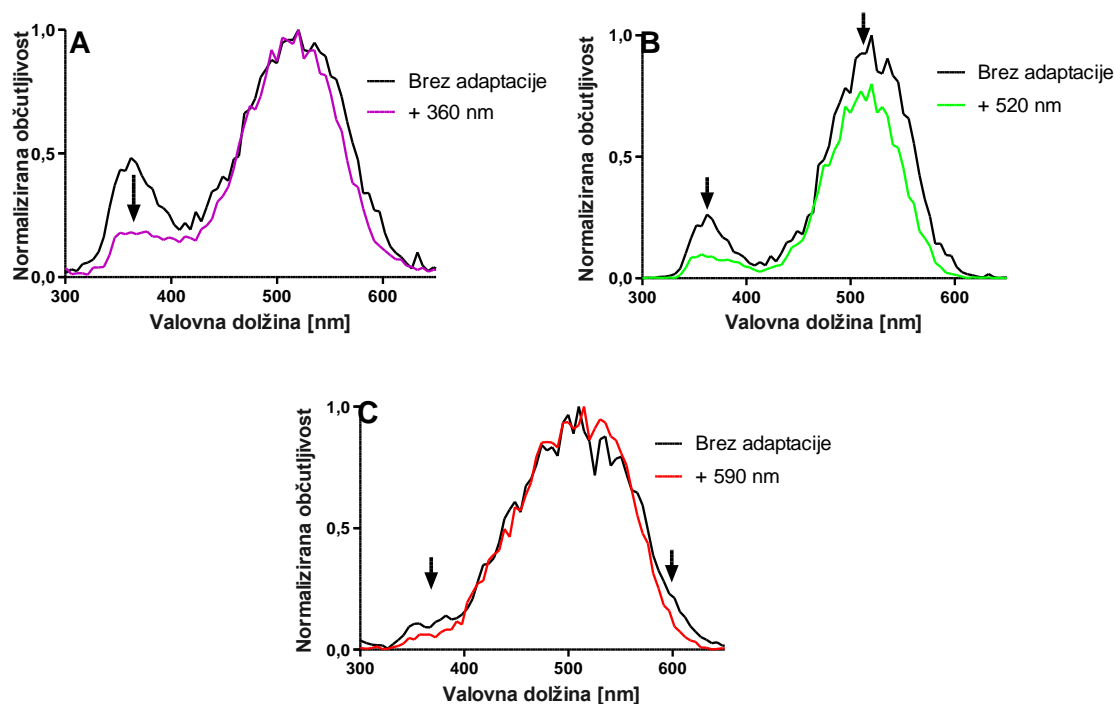


Slika 14: Amplituda reprezentativnega elektroretinograma ob draženju z izokvantnimi dražljaji med 300 nm in 700 nm. Maksimalna hiperpolarizacija meri -5,6 mV pri ~510 nm valovne dolžine. Opazen je zmanjšan odziv pri valovnih dolžinah <350 nm.

#### 4.2.2 Elektroretinografija s selektivno adaptacijo

V nadaljevanju smo z ERG izmerili spektralno občutljivost oči, adaptiranih na monokromatsko svetlobo različnih valovnih dolžin. Predpostavili smo, da bo monokromatska adaptacijska svetloba selektivno zmanjšala odziv tistih posameznih razredov fotoreceptorskih celic, ki najmočneje zaznavajo adaptacijski dražljaj. Če k ERG prispevajo različni razredi fotoreceptorjev, se značilno spremeni oblika odvisnosti amplitude ERG od valovne dolžine testnega dražljaja. V preliminarnem preizkusu smo preverili učinek adaptacije med 360 in 600 nm v korakih po 20 nm. Ugotovili smo, da najmočnejši učinek izzove adaptacija s 360, 520 in 600 nm. Intenziteta adaptacijske svetlobe je bila vsakokrat prilagojena občutljivosti oči, saj bi lahko premočna adaptacijska svetloba premočno zmanjšala signal ERG po celotnem spektru. Adaptacijska svetloba z valovno dolžino 360 nm zmanjša odziv v UV delu spektra, pri 520 nm je adaptacija s svetlobo znižala odziv v celotnem razponu valovnih dolžin med 300 in 700 nm, ter svetloba pri 590 nm je nekoliko znižala odziv pri valovnih dolžinah med 550 nm ter 650 nm (Slika 15).

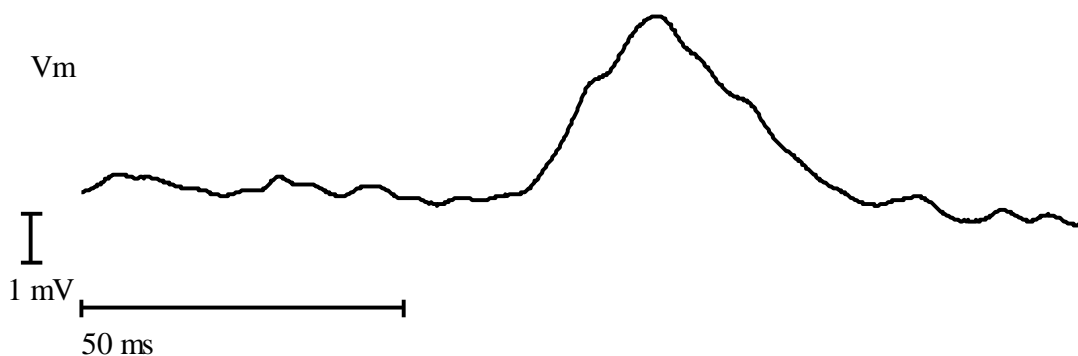




Slika 15: Spektralna občutljivost, merjena z elektroretinogramom, pri različnih valovnih dolžinah adaptacijskega dražljaja. A, adaptacijska svetloba 360 nm zmanjša amplitudo ERG v UV delu spektra. B, adaptacija pri 520 nm zmanjša amplitudo po celotnem spektru. C, adaptacija pri 590 nm nekoliko zmanjša amplitudo v dolgovalovnem, pa tudi v kratkovalovnem delu spektra. Po spremembi oblike grafov lahko sklepamo o spektralnem razredu celic, ki prispevajo k ERG odgovoru, in ki smo jih s selektivno adaptacijo izločili iz ERG. Največji vpliv (puščice) je opazen pri adaptaciji z zeleno svetlobo (520 nm).

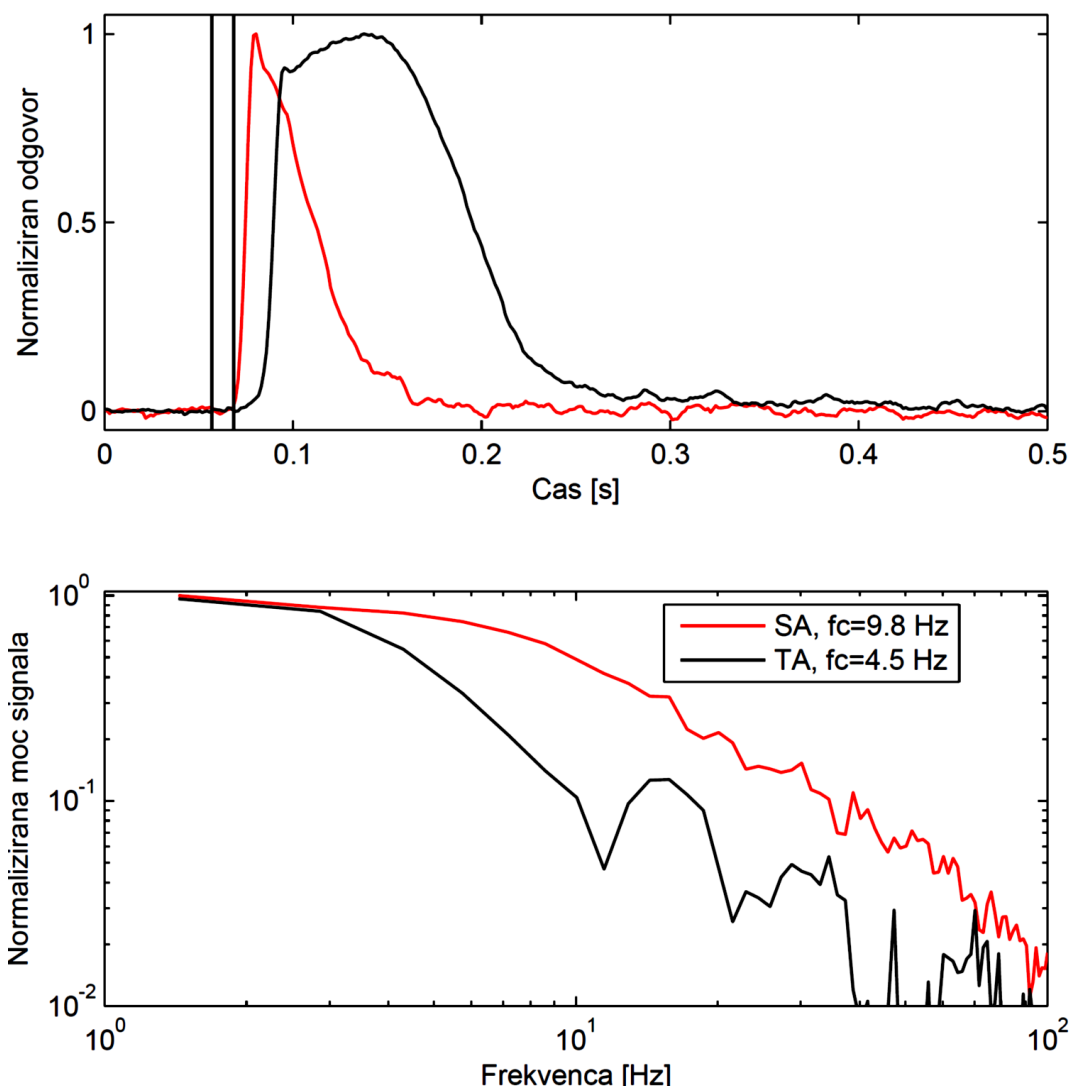
#### 4.2.3 Znotrajcelični signali iz fotoreptorskih celic

V rezultate smo vključili 43 celic izmed 65. Nekakovostne meritve smo zavrgli na osnovi naslednjih razlogov: nezadosten mirovni membranski potencial (MMP), puščanje celice in nestabilen MMP, nemirnost preparata zaradi mišične aktivnosti. Mirovni membranski potenciali zadovoljivih celic so bili  $-40 \text{ mV} \pm 15 \text{ mV}$  (povprečje  $\pm$  SD). Nekatere celice so imele dobro vidne kvantne sunke, ki so dosegali velikosti do 5 mV. Kvantne sunke definira njihovo naključno pojavljanje, značilna amplituda (nekaj mV) ter časovni potek s hitro depolarizacijo in nekoliko počasnejšo repolarizacijo, ki spominja na EPSP (Slika 16).



Slika 16: Primer kvantnega sunka.  $V_{\max} = 3,8 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{depolarizacije}} = 21,6 \text{ ms}$ ,  $t_{\text{repolarizacije}} = 35,4 \text{ ms}$ .

Nadalje smo izmerili hitrost impulznih odzivov pri svetlo (SA) in temno (TA) adaptiranih pogojih. Po 2 minutnem trajanju teme ali polne svetlobe smo izmerili odziv na kratek (8 ms) svetlobni dražljaj. Integracijski čas oziroma latenca, čas do maksimalnega odgovora in čas repolarizacije so pri svetlo adaptiranih pogojih krajši. Latenca je pri SA celicah znašala 8,2 ms, pri TA celicah pa 15 ms; čas depolarizacije je pri SA znašala 24,5 ms, pri TA pa 39,5 ms. Čas od 50 % depolarizacije do 50% repolarizacije je pri SA znašal 37,7 ms, pri TA pa 108 ms. Frekvenčna analiza impulznega signala kaže, da je kotna frekvenca receptorjev  $f_{C, SA} = 9,8 \text{ Hz}$ ,  $f_{C, TA} = 4,5 \text{ Hz}$  (Slika 17).



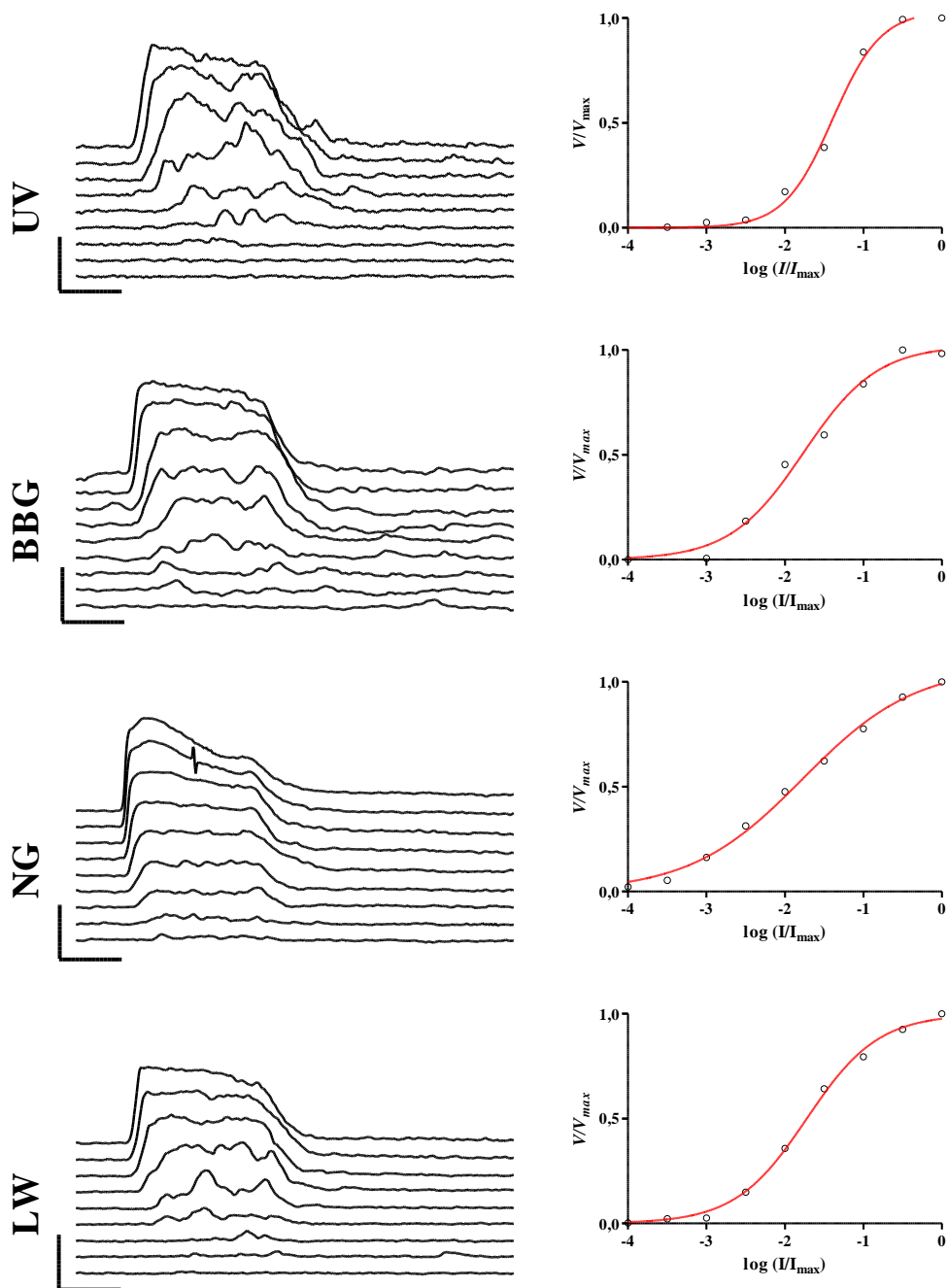
Slika 17: Frekvenčna analiza signala. Odgovora iste fotoreceptorske celice pri svetlo adaptiranih (SA, rdeča) in temno adaptiranih (TA, črna) pogojih. Spodnji graf prikazuje spekter različnih frekvenc ter njihovih normaliziranih moči v posameznih signalih (SA in TA).

#### 4.2.4 Receptorski potenciali posameznih razredov fotoreceptorskih celic

Vsako celico smo osvetlili z 9 graduiranimi intenzitetami svetlobe (-4 log do 0 log, korak po 0,5 log enote) pri valovni dolžini, kjer je bila celica najbolj vzdražna. Tako smo posneli serijo receptorskih potencialov. Slika 18 prikazuje signale iz posameznih reprezentativnih celic iz vsakega fotoreceptorskega razreda. Pri nizkih intenzitetah svetlobe lahko opazimo grobe odgovore fotoreceptorjev, ki nastanejo z elektrotoničnim seštevanjem posameznih kvantnih sunkov. Sicer se receptorski potenciali posameznih razredov ne razlikujejo med seboj. Receptorskim potencialom smo izmerili amplitudo od MMP do srednje vrednosti

platoja. Diskretnim izmerjenim vrednostim smo računalniško prilagodili parametre Hillove krivulje naklon ( $n$ ), maksimalno depolarizacijo ( $V_{\max}$ ) ter srednjo vrednost ( $I_{50}$ ):

$$V/V_{\max} = I^n / (I^n + I_{50}^n) \quad \dots(1)$$



Slika 18: Receptorski potenciali pri intenzitetah svetlobe v razponu 4 log enot s korakom 0,5 log enote. V levem stolpcu so signali reprezentativnih receptorskih celic za kratkovalovne (UV), širokopasovne zelene (BBG), ozkopasovne zelene (NG) in dolgovalovne (LW) receptorske razrede, pridobljeni z dražljaji z valovno dolžino 360 nm, 520 nm, 520 nm in 580 nm (od zgoraj navzdol). Intenziteta svetlobe narašča od

spodnjih meritev proti zgornjim za vsak graf posebej. Desni stolpec prikazuje odvisnost normalizirane amplitude receptorskega potenciala od relativne jakosti svetlobe. Rdeče krivulje predstavljajo Hillove krivulje s prilagojenimi parametri empiričnim podatkom. Najvišje vrednosti so bile 17,3 mV, 16,2 mV, 16,9 mV in 12,9 mV za UV, BBG, NG in LW fotoreceptorsko celico, našete v enakih zaporedjih. Navpične črte merilc predstavljajo 10 mV, vodoravne 100 ms.

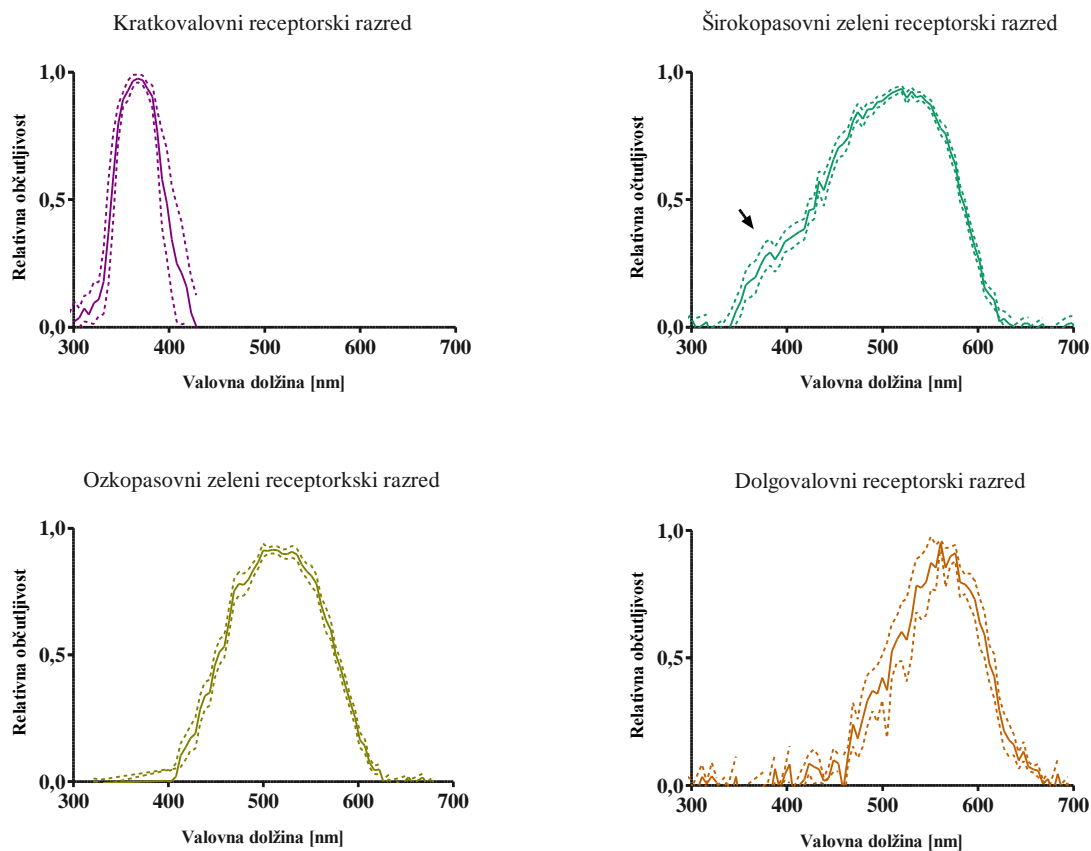
Primerjava mirovnih membranskih potencialov (MMP) in največjih intenzitet odgovorov ( $V_{\max}$ ) med različnimi fotoreceptorskimi razredi ni pokazala razlik. Povprečne vrednosti ter standardni odkloni so prikazani v Preglednici 1.

Preglednica 1: Prikaz povprečnih vrednosti in standardnih odklonov za mirovne membranske potenciale (MMP), najvišje vrednosti odgovorov posameznih celic, naklonov Hillovih krivulj ter število celic v posameznem fotoreceptorskem razredu.

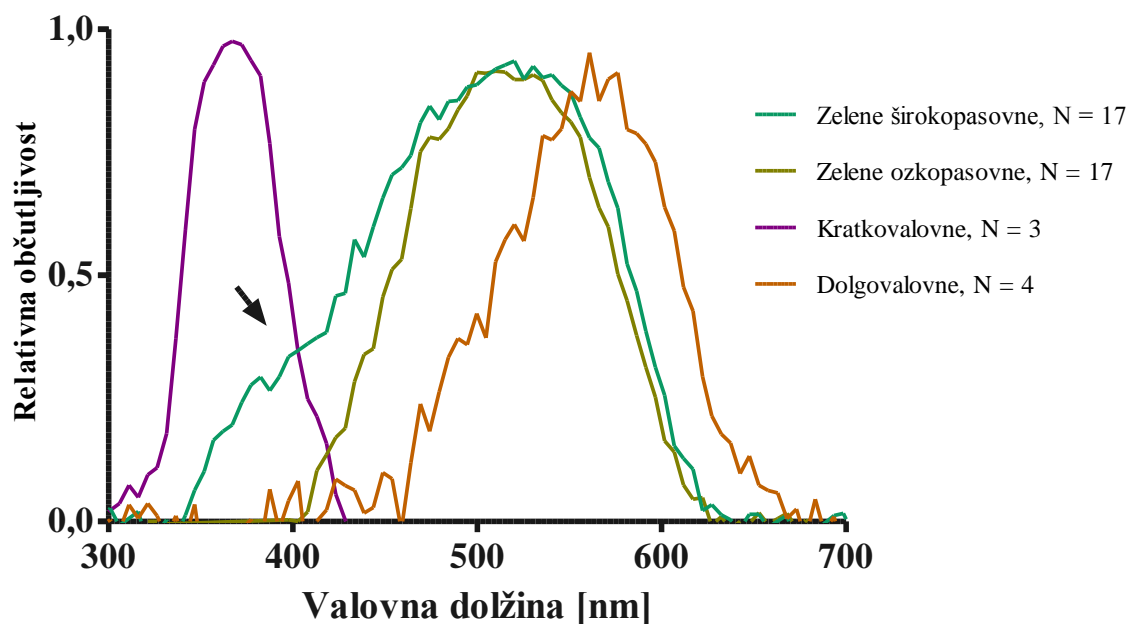
Fotoreceptorski razred	MMP [mV]	$V_{\max}$ [mV]	Naklon Hillove krivulje, $n$	Število celic
Kratkovalovne (UV)	- 26,99 ± 4,66	16,15 ± 6,53	1,21 ± 0,14	3
Zelene širokopasovne (BBG)	- 40,00 ± 15,95	13,86 ± 8,91	1,04 ± 0,45	19
Zelene ozkopasovne (NG)	- 35,82 ± 14,11	12,81 ± 7,63	1,13 ± 0,38	18
Dolgovalovne (LW)	- 44,59 ± 7,51	10,98 ± 1,75	1,14 ± 0,28	3

#### 4.2.5 Spektralna občutljivost

Posamezne celice smo osvetljevali s serijo 200 ms izokvantnih bliskov med 300 nm in 700 nm s 5 nm korakom. Iz amplitud receptorskih potencialov smo z reverzno Hillovo transformacijo izračunali spektralno občutljivost vsake celice. Spektralne občutljivosti se med različnimi fotoreceptorskimi razredi razlikujejo v oblikah in vrhovih (valovne dolžine maksimalne vzdražnosti) krivulj (Sliki 19 in 20). Kratkovalovni receptorski razred ima vrh vzdražnosti pri približno 370 nm, zelena receptorska razreda pri pribl. 520 nm in dolgovalovni receptorski razred pri pribl. 565 nm.

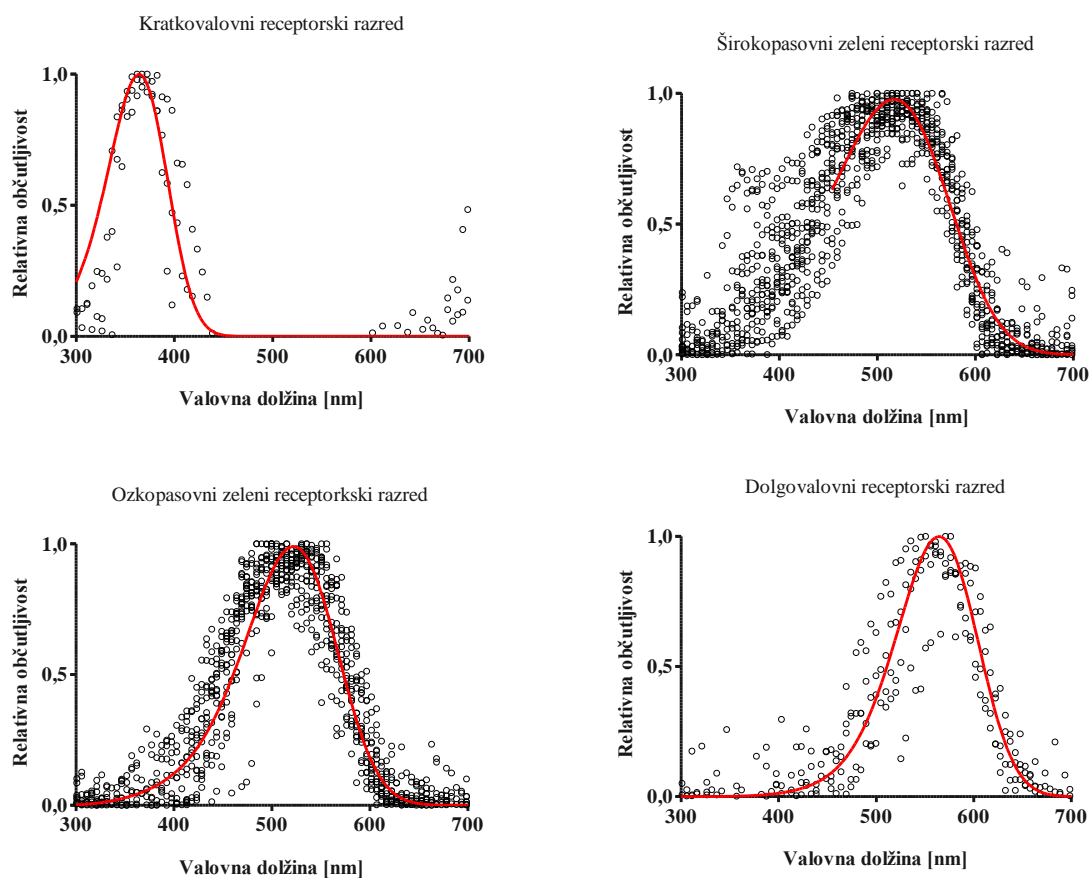


Slika 19: Povprečne spektralne občutljivosti posameznih fotoreceptorskih razredov. Prekinjene črte prikazujejo standardno napako. Vrhovi posameznih krivulj so pri približno 365 nm za UV, 525 nm za BBG, 520 nm za NG ter 565 nm za LW. Puščica prikazuje vrh  $\beta$  spektra pri BBG fotoreceptorskem razredu.



Slika 20: Povprečne spektralne občutljivosti posameznih fotoreceptorskih razredov. Na grafu so skupaj zbrane vse krivulje iz slike 19. Vrhovi krivulj predstavljajo vrhove  $\alpha$ . Puščica označuje vrh  $\beta$  pri zelenih širokopasovnih fotoreceptorjih (BBG). Zeleni krivulji sovpadata v območju med 520 nm ter 630 nm.

Spektralni občutljivosti vsake celice smo prilagodili parametre nomograma, ki opisuje normalizirano absorbanco rodopsina z vrhom  $\alpha$  in  $\beta$  ter prostima parametroma  $\lambda_{\max}(\alpha, \beta)$  (maksimum občutljivosti pri vrhovih  $\alpha$  in  $\beta$ ) (Slika 21). Vsi poteki spektralnih občutljivosti imajo jasno razločne vrhove  $\alpha$ , pri širokospektralnih zelenih je opazen tudi  $\beta$  vrh. Krivulji za širokopasovne in ozkopasovne zelene receptorje sovpadata v območju med 520 nm in 630 nm valovne dolžine. Pri kratkovalovnem receptorskem razredu nomogram od dejanskih podatkov pri valovnih dolžinah pod 350 nm odstopa, saj smo tu zaradi filtrirnih lastnosti kornee pri prilagajanju upoštevali le podatke  $>350$  nm. Podatkom širokopasovnega receptorskega razreda smo prilagajali nomogram le pri valovnih dolžinah  $>450$  nm, saj nismo našli ustreznega modela, ki bi zadovoljivo uspel opisati  $\beta$  vrh.



Slika 21: Združeni podatki vseh posameznih meritev (črni krogi) ter prilagojeni nomogrami vrhov  $\alpha$  s prostim parametrom  $\lambda_{\max}$  (rdeča črta). Pri kratkovalovnem receptorskem razredu smo prilagajali nomogram le podatkom nad 350 nm. Pri širokopasovnem zelenem receptorskem razredu smo prilagajali podatkom le nad 450 nm, saj nismo uspeli najti primerne modela, ki bi zadovoljivo opisal  $\beta$  vrh.

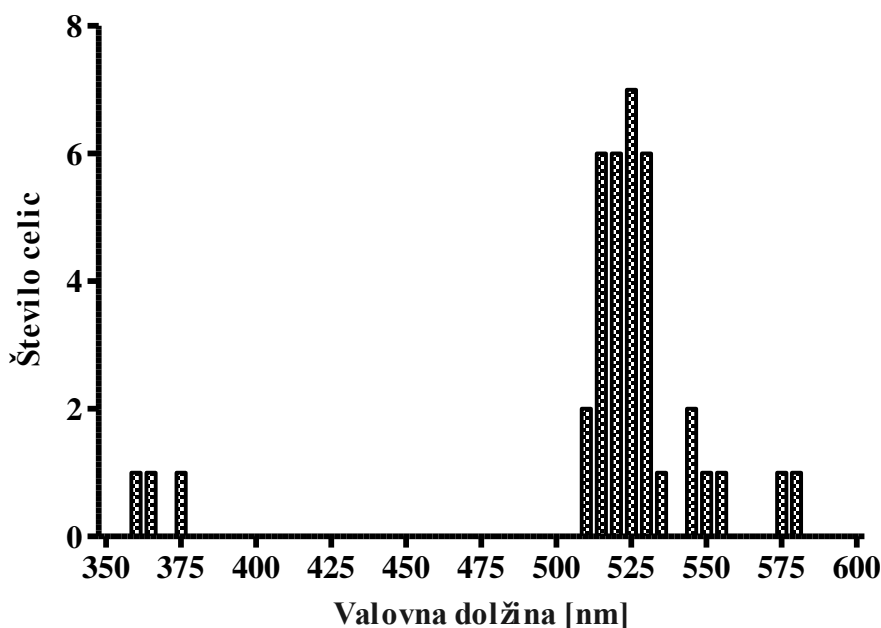
Preglednica 2 prikazuje povprečne vrednosti in standardne odklone posameznih vrhov spektralnih občutljivosti fotoreceptorskih razredov.

Preglednica 2: Povprečne vrednosti in standardni odkloni valovnih dolžin pri katerih so bile celice posameznih razredov maksimalno občutljive ter število celic v posameznem fotoreceptorskem razredu.

Fotoreceptorski razred	UV	BBG	NG	LW
<b>Povprečje <math>\pm</math> SD</b>	366,0 $\pm$ 6,3	523,9 $\pm$ 7,6	520,8 $\pm$ 8,7	564,4 $\pm$ 12,3
<b>n</b>	3	17	19	4

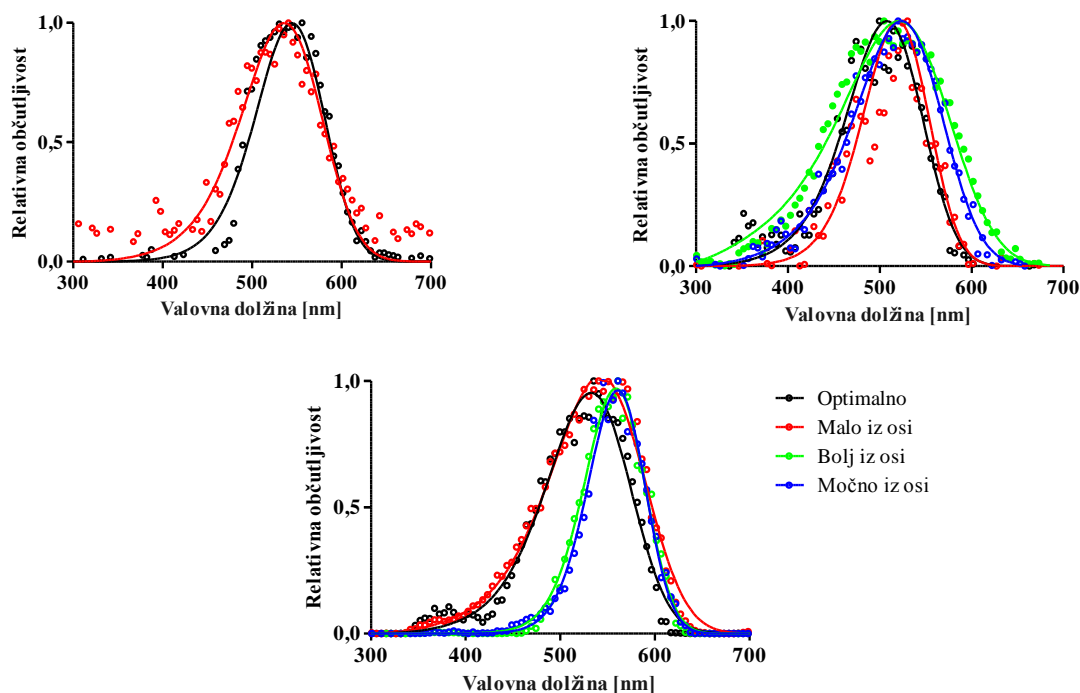
Tako izračunane maksimume občutljivosti smo združili v razrede s 5 nm širino in izdelali graf frekvenčne distribucije fotoreceptorskih celic glede na njihov valovni maksimum. Histogram na sliki 22 prikazuje tri jasno ločene skupine fotoreceptorskih celic.





Slika 22: Histogram vrhov občutljivosti posameznih celic. Podatki se združujejo v tri skupine, ki delno sovpadajo s poprečnimi vrednostmi za posamezne fotoreceptorske razrede: 370 nm za UV, 520 nm za BBG in NG ter 565 nm za LW. Širina posameznega razreda je 5 nm.

Zaradi tehnike poskusa (projekcija reže monokromatorja z 10 nm pasovno širino na korneo) prihaja pri meritvi spektralne občutljivosti do določenega sipanja podatkov, saj neidealno orientirani fotoreceptorji prejemajo dražljaje z roba ekscitacijskega žarka, katerega valovna dolžina lahko odstopa od odčitka z monokromatorja. Te napake lahko zamaknejo vrh občutljivosti za nekaj nm, kar smo preverili v kontrolnem poskusu. S horizontalno rotacijo preparata smo dosegli zamik ekscitacijske svetlobe iz optične osi celice. Poskus smo izvedli na treh fotoreceptorjih. Izmerili smo spektralno občutljivost in ovrednotili vrh tako, da smo podatkom prilagodili rodopsinski nomogram. Model (Stavenga in sod., 1993) smo priredili tako, da smo izraz potencirali s prostim parametrom »g«, ki je imel izhodiščno vrednost 1. Najvišja vrednost odklona  $\lambda_{max}$ , ki smo jo uspeli pridobiti, je bila 28 nm (Slika 23). Oblika spektralnih občutljivosti, izmerjenih z zamaknjenim žarkom, je močno odstopala od izvirnega nomograma, saj je parameter g dosegal vrednosti  $1 < g < 2$ .



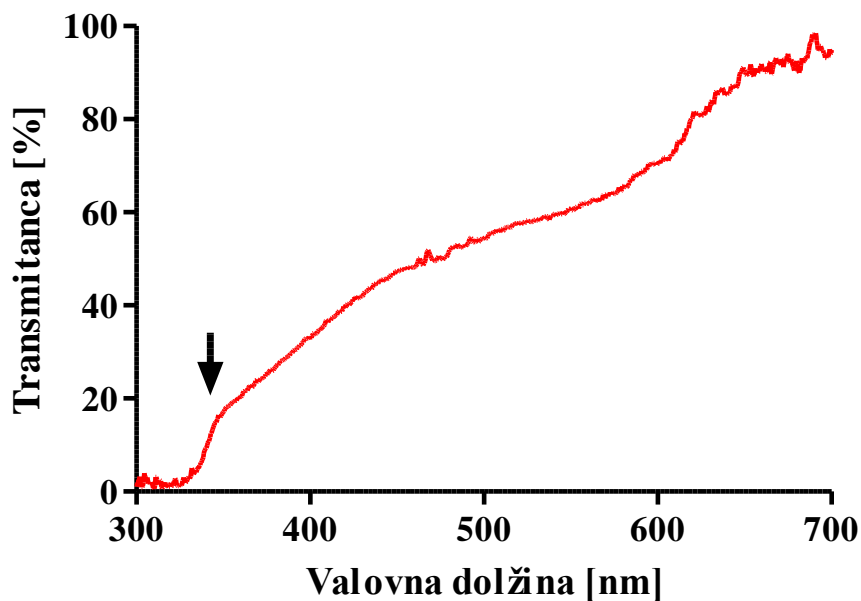
Slika 23: Kontrolni poskus. Pri treh celicah smo z zamikom preparata iz optimalne osi ekscitacijskega žarka poskušali premakniti vrhove spektralnih občutljivosti glede na optimalno meritev. Največji odklon je znašal 28 nm (spodnji graf, Močno iz osi). Empiričnim podatkom smo prilagodili prirejen rodopsinski nomogram (polne črte).

#### 4.2.6 Spektrofotometrija

Z uporabo spektrofotometra smo izmerili transmittanco kornee in reflektanco kutikule živali.

##### 4.2.6.1 Transmittanca kornee

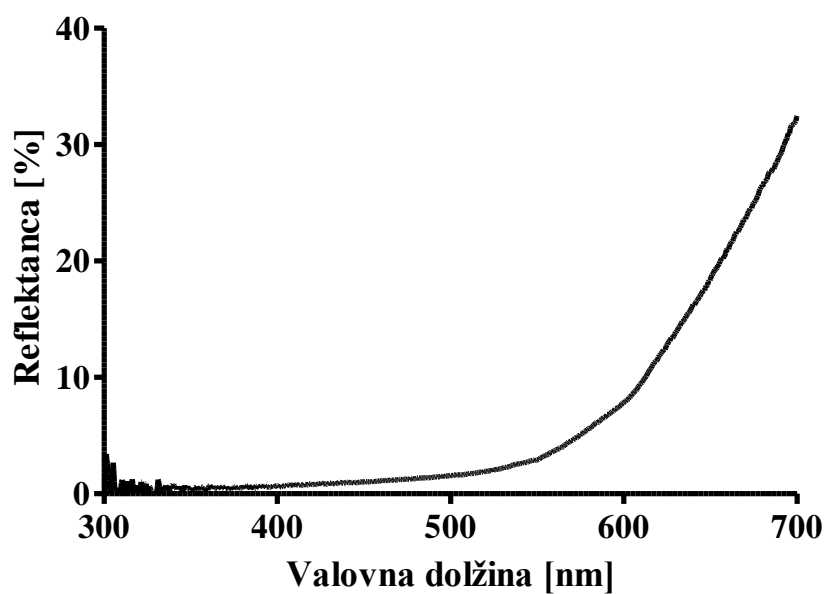
Spektralne občutljivosti, izmerjene z ERG ter občutljivosti UV in BBG celic kažejo izrazit strm padec pri valovnih dolžinah <350 nm. Domnevali smo, da bi takšen padec lahko povzročila nizka transmittanca dioptričnega aparata. Zato smo s spektrofotometrom izmerili transmittanco izolirane in očiščene kornee. Rezultati kažejo zmanjšano prepustnost za svetlobo pri valovnih dolžinah <340 nm. V območju valovnih dolžin >350 nm transmittanca monotonno narašča (Slika 24). Takšno naraščanje je posledica prisotnosti rjavih zaščitnih pigmentov, ki jih nismo uspeli odstraniti iz hitinizirane mrežnice.



Slika 24: Transmitanca kornee pri valovnih dolžinah od 300 nm do 700 nm. Propusnost svetlobi, ki imajo nižjo valovno dolžino od 340 je zmanjšana, od 350 nm naprej pa je naraščanje monotono. N = 2.

#### 4.2.6.2 Reflektanca kutikule

Reflektanco kutikule smo izmerili kot reflektanco vzorca glede na MgO standard na rjasto rdečem odseku kutikule in rezultate prikazali na sliki 25. Pri valovnih dolžinah <550 nm se reflektanca kutikule strmo poveča.



Slika 25: Reflektanca površine palmovega rilčkarja. Pri valovnih dolžinah nad 550 nm se reflektanca strmo poveča.

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 ANATOMSKE ZNAČILNOSTI

#### 5.1.1 Zgradba očesa

Približno 6000 omatidijev v očeh palmovega rilčkarja služi zajemu informacije predvsem iz frontolateralnega dela vidnega polja v vodoravni dimenziji ter skoraj celotnega vidnega polja v navpični dimenziji, saj se očesi na ventralni strani stikata, na dorzalni strani pa sta ločeni z le neka milimetri glavine kapsule. Informacije v vidnem polju med letom se razlikujejo saj se relativna hitrost premikanja okolja z oddaljevanjem od anteriorno-posteriorne osi povečuje, zato so za smer leta pomembne tiste informacije ki se nahajajo naravnost pred živaljo, informacijo o hitrosti pa prispevajo omatidiji, ki so nameščeni bolj lateralno. Živali, ki so dobri letalci, imajo v mrežnici razvite akutne cone: veliko omatidijev v anteriornem delu očesa usmerjenih v smer leta in v tem delu tudi majhne interomatidijske kote. Pri palmovem rilčkarju takšnih akutnih con ni. Interomatidijski koti na enem delu očesa palmovega rilčkarja znašajo  $1,34^\circ$  (grafično pridobljen podatek iz makroskopske slike vzdolžnega prereza mrežnice), kar je v primerjavi z letečimi plenilci veliko. Interomatidijski koti v akutnih conah pri kačjih pastirjih rodu *Anax*, ki so izredno dobri letalci, znašajo  $\sim 0,25^\circ$  (Land in Nilsson, 2002).

Zunanje površine kornijskih leč so sploščene in sovpadajo s splošno ukrivljenostjo glavine kapsule. Oči niso izbočene, saj bi v nasprotnem primeru omejevale mobilnost glave znotraj ovratnika. Pri prehranjevanju je ta prosta gibljivost glave zelo pomembna, saj je rilčkarjev dolg kljunec nepremično pritrjen na glavo. Rilčkarji kljunec poleg prehranjevanja uporabljajo tudi za odlaganje jajčec med priliste palm (Ince in sod., 2011), ki so relativno trdno zgrajeni. Strukturna integriteta glave je zaradi dolgega rilčka, ki predstavlja vzvod in tako poveča natezne ter kompresijske sile na bazi rilčka, zelo pomembna. V ta namen so oči palmovega rilčkarja strukturno ojačane, za kar so zaslužni predvsem hitinski ovoji med omatidiji, ki segajo od baze fotoreceptorskih celic skoraj do vrha kornijskih leč.

#### 5.1.2 Zgradba omatidija

Planarna zunanja površina kornijske leče zaradi svoje ploščatosti slabo uklanja svetlobo. Zbiranje svetlobe opravlja celotna kornijska leča, ki je podolgovata ter ima obliko topovskega izstrelka. Podobno lečo najdemo pri družini hroščev Lampyridae (Land in Chittka, 2013), ki imajo superpozicijske oči. Domnevamo, da bi bila lahko tudi pri rilčkarju tako elongirana kornijska leča primeren strukturni zasutek za nadaljnji evolucijski razvoj superpozicijske optike v primeru prehoda na nočni način življenja. Dolžina svetločutnega dela omatidija je približno 120  $\mu\text{m}$ . Kratka dolžina rabdomer, odsotnost tapetuma in prisotnost velike količine pigmentnih granul so značilne lastnosti

organizmov s sestavljenimi očesi, ki živijo v svetlem okolju. Dolžina rabdomer je pomembna za količino absorbirane svetlobe, ki je pri sestavljenih očeh v grobem podana z enačbo  $kL/(2,3 + kL)$  (Land in Chittka, 2013) kjer je L dolžina rabdomere in k absorpcijski koeficient, ki je navadno  $0,01 \mu\text{m}^{-1}$ . Posamezni omatidiji v očesu rilčkarja bi tako lahko absorbirali do 65 % bele svetlobe, ki vstopa v njihove rabdomere. Pigmenti, ki smo jih opazili v primarnih pigmentnih celicah, omejujejo količino svetlobe, ki vstopa v rabdom in učinkovito omejujejo vpadni kot omatidija. Velika količina pigmentnih granul se nahaja tudi v sekundarnih pigmentnih celicah ter v samih fotoreceptorskih celicah. Prisotnost pigmentnih granul znotraj fotoreceptorskih celic omogoča adaptacijo na močno svetlobo. Omenjene granule se ob svetlobi z retinomotornimi proteini lateralno premikajo bližje rabdomeram ter tako absorbirajo svetlobo, ki potuje zunaj rabdoma. Pri apozicijskih očeh imajo omatidiji že v osnovi omejeno vidno polje, kar pomeni, da moč svetlobe, ki vstopa skozi lečo, ni tako visoka, da je adaptacijski mehanizmi ne bi bili zmožni zadostno zasenčiti.

Svetlobna občutljivost apozicijskega očesa je lahko učinkovito pomnožena, če več fotoreceptorjev konvergira na posamezen nevron višjega reda, torej z nevrnalno superpozicijo. To seveda vodi v ekvivalentno zniževanje kotne ločljivosti. Zato se je pri višjih dvokrilcih pojavil odprti tip rabdoma, pri katerem rabdomera vzorči del vidnega polja omatidija, različne rabdomere v nekaj sosednjih omatidijih, ki konvergirajo na isti interneuron, pa vzorčijo isti prostorski kot. Pri takšnem očesu morajo biti rabdomere optično ločene; pojavi se intraomatidiski prostor, tip rabdoma pa imenujemo odprti rabdom. Rabdom palmovega rilčkarja je posebnost, saj je zaradi prisotnosti intraomatidiskih prostorov po strukturi odprtega tipa, in ker so posamezne rabdomere med seboj ločene, predstavlja vsaka rabdomera svoj optični vodnik. Seveda dopuščamo možnost, da so interomatidiski prostori, ki so razvidni iz elektronske mikrofografije (Slika 13), artefakti, ki so nastali zaradi krčenja mehkega tkiva pri fiksaciji. Podobno razporeditev rabdomer perifernih fotoreceptorjev so opisali pri hroščih vrste *Neotriplax lewisi*, vendar ti ne vsebujejo intraomatidiskega prostora (Mishra in Meyer-Rochow, 2006). Za razliko od *N. lewisi*, kjer sta R7 in R8 postavljeni distalno-proksimalno ena nad drugo, potekata centralni rabdomeri pri palmovem rilčkarju po celotni dolžini rabdoma skupaj in vzporedno. Rabdomere vseh osmih celic v omatidiju se na vrhu rabdoma, tik pod kristalnim stožcem, stikajo. Podobno stanje je prisotno pri višjih dvokrilcih, ki imajo nevrnalno superpozicijsko oko, kjer vsaka rabdomera v posameznem omatidiju zre v definiran prostorski kot vidnega polja. Palmov rilčkar je potencialni kandidat za nevrnalno superpozicijsko oko. To predpostavko bi lahko podprli s primerjavo interomatidiskih kotov ter vpadnih kotov posameznih fotoreceptorjev. V primeru, ko bi bili  $\Delta\phi > \Delta\rho$ , bi lahko s precejšnjo gotovostjo govorili o nevrnalni superpoziciji. Združevanje informacije iz različnih celic je možno dokazati z meritvami iz LMC nevronov, v katerih izmerimo šestkrat večjo aktivnost ob enakem svetlobnem dražljaju mrežnice kot v posameznih svetločutnih celicah (Dubs in sod., 1981).

## 5.2 SPEKTRALNE LASTNOSTI RECEPTORSKIH CELIC

Meritve elektroretinograma (ERG) sovpadajo s splošno shemo vida pri hroščih. Fotoreceptorji R1-6 so pri večini najbolj vzdražni v zelenem delu spektra (Mishra in Meyer-Rochow, 2006). Omenjene fotoreceptorske celice so v mrežnici palmovega rilčkarja tudi najštevilčnejše, kar potrjujeta vrh ERG v zelenem delu spektra ter izrazito zmanjšanje odziva pri ERG s svetlobno adaptacijo pri zeleni svetlobi (520 nm). Nabor fotoreceptorjev v predniških vrstah žuželk naj bi vseboval tri razrede fotoreceptorjev z vrhovi v UV (KV, kratkovalovnem), modrem (SV, srednjevalovnem) in zelenem (DV, dolgovalovnem) delu spektra (Briscoe in Chittka, 2001). Pri riževem mokažu (*Tribolium castaneum*) so opisali domnevno izgubo SV opsina (Jackowska, 2007), ki ima tako v vsakem omatidiju po šest zeleno občutljivih perifernih fotoreceptorskih celic (akromatski kanal) ter dve centralni fotoreceptorski celici za barvni vid. Ena izmed njiju ima vrh v UV delu spektra. Mesto v omatidiju, kjer je prej bila modra fotoreceptorska celica, naj bi z duplikacijo zelenega opsina zasedla DV fotoreceptorska celica (Jackowska, 2007). Predvidevali smo, da bomo na podobno situacijo naleteli tudi pri palmovem rilčkarju, in sicer, da je prišlo do izgube razreda modrih fotoreceptorskih celic, ki so jih nadomestile zelene fotoreceptorske celice. Nastanek novega razreda fotoreceptorskih celic ni nujno posledica pridobitve nove opsinske molekule. Pri *Papilio xuthus* (Arikava in sod., 1999) je opisan zamik vrha spektralne občutljivosti posameznega fotoreceptorskega razreda na račun barvnega filtriranja z zaščitnimi pigmenti. Pigmentna zrnca specifično absorbirajo svetlobo v nižjih valovnih dolžinah in s tem do fotoreceptorske celice spuščajo le svetlobo višjih valovnih dolžin. V takem primeru se vrh občutljivosti premakne proti daljšim valovnim dolžinam, spektralna občutljivost pa močno odstopa od teoretične absorbance vidnega pigmenta. Odstopanje bi se zgodilo tudi pri DV fotoreceptorskem razredu pri palmovem rilčkarju, kjer bi se spekter zelenih fotoreceptorskih celic zaradi zaščitnih pigmentov zamaknil v desno. Toda to možnost zavrne visoko ujemanje med našimi podatki spektralnih občutljivosti DV receptorjev s teoretičnim modelom za opsinske molekule (Stavenga in sod., 1993). Tako sklepamo, da je dolgovalovni fotoreceptorski razred nastal z nastankom novega opsina.

## 5.3 HITROST FOTORECEPTORSKIH CELIC

Kljub izrednim sposobnostim palmovega rilčkarja pri letenju na dolge razdalje je njegov vid relativno počasen. O tej počasnosti je mogoče sklepati na podlagi naših rezultatov. Hitrost vidnih zaznav ima visoko energijsko ceno (Niven in Laughlin, 2008). Pri *Calliphori* mrežnica porablja do 10% bazalnega metabolizma (Laughlin, 1998), zato je preskrbljena s kisikom s pomočjo traheol, ki segajo v vsak omatidij. Na mikroskopskih prerezi mrežnice rilčkarja traheol ni zaslediti, torej lahko predpostavljamo, da njegovi fotoreceptorji niso energijsko zahtevni in tako tudi ne hitri. O hitrosti lahko sklepamo na

podlagi fuzijske frekvence ( $f_F$ , meritve potekajo med zaključkom magistrskega dela) ter kotne frekvence ( $f_C$ ) pri frekvenčni analizi znotrajceličnega signala, ki sta pri palmovem rilčkarju  $f_F = 50$  Hz ter  $f_C = 9$  Hz pri svetlo adaptiranem očesu oz.  $f_C = 4,5$  Hz pri temno adaptiranem očesu. Potrebno je omeniti, da je bila meritev fuzijske frekvence narejena pri sobni temperaturi ( $\sim 22$  °C), kar pa je hladneje od optimalne delovne temperature okolja za palmovega rilčkarja (30-35 °C, Rochat, osebna komunikacija). Toda tudi če predpostavimo, da je temperaturni kvocient fotorepcije  $Q_{10} = 2$ , je ekstrapolirana  $f_{C, 30\text{ °C}} = 100$  Hz relativno nizka. Pri muhi (*Calliphora*) je pri sobni temperaturi  $f_F = 300$  Hz ter  $f_C = 73$  Hz pri svetlo adaptiranem očesu (Burton, 2001). Frederiksen in Warrant (2008) sta primerjala kotne frekvence pri somračnem metulju *Caligo memnon*, ki je imel  $f_C = 33$  Hz pri svetlo ter  $f_C = 16$  Hz pri temno adaptiranem očesu ter dnevno aktivnem metulju *Morpho peleides*, ki je imel  $f_C = 42$  Hz pri svetlo ter  $f_C = 23$  Hz pri temno adaptiranem očesu (Frederiksen in Warrant, 2008). Tudi hitrost vidne zaznave somračno aktivnega *C. memnon* je superiorna izredno počasni hitrosti vidne zaznave palmovega rilčkarja.

Poleg vsega naštetega so receptorski potenciali pri nizkih intenzitetah svetlobe grobi zaradi seštevanja velikih kvantnih sunkov. Veliki kvantni sunki pomenijo dolg integracijski čas, zato tudi nizko hitrost zaznave, omogočajo pa vid pri nizkih intenzitetah svetlobe oziroma pri nizki svetlobni občutljivosti fotoreceptorjev. Palmov rilčkar je dnevno aktivna vrsta z očmi z nizkim svetlobnim izkoristkom. Njegov vidni sistem je prilagojen za gledanje pri visokih intenzitetah svetlobe.

#### 5.4 FILTRske LASTNOSTI DIOPTRIČNEGA APARATA

Pri fizioloških meritvah barvne občutljivosti smo opazili, da so fotoreceptorji neobčutljivi na svetlobo  $\lambda < 350$  nm. Predpostavili smo, da do tega pride zaradi filtrskih lastnosti dioptričnega aparata. Filtrirno delovanje je razvidno predvsem kot zmanjšana odziva UV ter zelenih širokopasovnih fotoreceptorjev pod 350 nm. Vrhovi UV fotoreceptorskega razreda so zaradi delovanja kornee podobno kot pri senčenju s pigmenti zamaknjeni proti nekoliko višjim valovnim dolžinam. Ugotovili smo, da je filtriranje posledica transmittance dioptričnega aparata. Dioptrični aparat rilčkarja je nenavaden, saj njegova kornea deluje kot selektivni filter, ki prepušča le svetlobo valovnih dolžin nad 350 nm. Potek grafa na sliki 24 je verjetno popačen med valovnimi dolžinami 350 nm in 600 nm, na račun kontaminacije z zaščitnimi pigmenti, ki so ostali na kornei med čiščenjem. Pri dobro očiščeni konrei bi pričakovali nagel porast transmittance pri 350 nm, ki bi nato stagnirala na isti vrednosti pri višjih valovnih dolžinah. Predvidevamo, da so filtrirne lastnosti kornee posledica njene zgradbe ter nimajo drugih funkcionalnih namenov. Verjetno so posledica izjemne debeline kornee, ki je okrepljena zato, da zagotavlja strukturno trdnost pri dejavnostih z rilčkom. Podobne filtrske lastnosti so zasledili kolegi iz Univerze Sokendai na Japonskem, ki so v ERG študiji barvnega vida škodljivcev pri nekaterih hroščih opazili padec občutljivosti pod 350 nm (Arikawa, osebna komunikacija).



## 5.5 UGLAŠENOST VIDNEGA SISTEMA Z BARVO TELESA

V sestavljenih očeh so številčno najbolj zastopane periferne fotoreceptorske celice (R1-6), ki predstavljajo akromatski sistem vidne zaznave (Land in Chittka, 2013). Ti fotoreceptorji imajo navadno široko spektralno občutljivost, kar izboljša njihovo svetlobno občutljivost, obenem pa izgubijo možnost natančnega določanja barve. Zaradi barvne nespecifičnosti so neprimerni za barvni vid. Zelene širokopasovne fotoreceptorske celice smo na podlagi njihove številčnosti in široke spektralne občutljivosti uvrstili med periferne fotoreceptorje za akromatski vid. Rezultati magistrske naloge vsebujejo manj širokopasovnih zeleno občutljivih celic, kot smo jih pri poskusih dejansko srečali. Mnogih nismo natančneje preučili, saj smo jih z željo po odkritju redkejših fotoreceptorskih razredov, po grobi karakterizaciji preskočili. Ostali trije razredi fotoreceptorskih celic so zaradi svoje ozke barvne specifičnosti in nizkega deleža zastopanosti bili proglašeni za R7 in R8 centralne celice, ki služijo barvnemu vidu (Jackowska, 2007; Briscoe in Chittka, 2001). Zgradba omatidija ter postavitev fotoreceptorskih celic omogočajo barvni vid v primeru, ko imata dve celici z različnimi spektralnimi občutljivostmi enak vidni kot (Jackowska, 2007). Barvna prepoznava opazovanega motiva je možna že z enim omatidijem. Zato je smiselno pričakovati pojav barvno občutljivih fotoreceptorskih celic v parih, ki omogočajo prepoznavo za žival pomembnih okoljskih motivov. Za palmovega rilčkarja pomembna motiva sta verjetno diskriminacija med nebom in tlemi ter prepoznavo istovrstnih osebkov. Predvidevamo prisotnost omatidijev s kombinacijo kratkovalovnega ter ozko zelenega fotoreceptorsega razreda v R7 in R8 celicah, saj je takšna kombinacija spektralnih občutljivosti primerna za razlikovanje med z UV bogatim nebom ter z vegetacijo poraslimi tlemi, ki reflektira zelo malo UV svetlobe. Dodaten argument za morebiten obstoj takšnih omatidijev je odsotnost ocelov, ki navadno služijo zaznavi z UV bogatega neba. Pri zaznavi istovrstnih osebkov pa mislimo, da je kombinacija srednjevalovnega ter dolgovalovnega fotoreceptorskega razreda v centralnih receptorjih omatidijev primerna za zaznavanje specifične rjavkasto-rdeče obarvanosti palmovih rilčkarjev. Poleg tega lahko pri spektralnih občutljivostih ozko zelenih ter dolgovalovnih receptorskih razredih opazimo izrazito odsotnost  $\beta$  vrhov, kar si je mogoče razlagati z vzajemnimi filtrskimi lastnostmi takšnih fotoreceptorskih celic v omatidijih (Briscoe in Chittka, 2001). V primeru, ko je ena izmed centralnih celic kratkovalovna, bo omenjena celica absorbirala dobršen del kratkovalovnega dela spektra. Tako bodo oblike spektralnih občutljivosti ožje, kar izboljša njihovo barvno zaznavo.

## 6 SKLEPI

Palmov rilčkar ima par sestavljenih oči z velikim zornim kotom in nizko kotno ločljivostjo. Apozicijska optika in izrazito temna pigmentiranost kažeta na prilagojenost na visoke intenzitete svetlobe oziroma dnevni vid. Fotoreceptorji imajo nizko hitrost zaznave in majhno dinamično delovno območje. Debela kornea slabo prepušča UV svetlobo, saj je transmitanca pod 350 nm zelo nizka. Akromatski vid posredujejo širokopasovni fotoreceptorji z vrhom v zelenem delu spektra. Barvni vid temelji na treh razredih fotoreceptorjev z vrhovi v UV, zelenem in rumenem delu spektra. Barvni vid je najverjetneje uglašen z barvo kutikule, omogoča pa tudi prepoznavo obzorja. Sklepamo, da zaradi nizke občutljivost in hitrosti vid ni pretirano zanesljiv med hitrim letenjem na dolge razdalje. Široko vidno polje in potencialno dober barvni vid pa rilčkarju omogočata prepoznavo ključnih motivov pri počasni lokomociji.

## 7 POVZETEK

Izvajanje raziskav na palmovem rilčkarju občutno prispeva k razumevanju vida pri hroščih, ki je glede na druge skupine žuželk izredno slabo raziskan. Z namenom ugotovitve anatomske in funkcionalne značilnosti mrežnice smo naredili makroskopske fotografije očesa, svetlobne mikrofotografije, elektronske presečne mikrofotografije ter zunajcelične in znotrajcelične meritve iz fotoreceptorskih celic mrežnice. Zaradi lažje interpretacije fizioloških rezultatov smo naredili spektrofotometrične meritve transmitance kornee. Vlogo barvnega vida pri znotrajvrstni komunikaciji smo preverili še tako, da smo izmerili reflektanco kutikule rilčkarja.

Ugotovili smo, da je oko palmovega rilčkarja apozicijsko ter izredno trdno zgrajeno. Fotoreceptorske celice v posameznih omatidijih so razporejene v 6 perifernih celic (R1-6), ki s svojimi somami tvorijo cilindar znotraj katerega sta centralni fotoreceptorski celici (R7 in R8). Skupno celice tvorijo 7 rabdomer, saj k centralni rabdomeri po celotni dolžini omatidija prispevata svoje mikrovile obe centralni celici. Rabdom je odprtega tipa, ne izključujemo pa možnosti, da so interomatidijski prostori nastali kot artefakt pri fiksaciji vzorcev.

Na osnovi elektrofizioloških meritev v mrežnici (ERG, znotrajcelične meritve) sklepamo, da ima palmov rilčkar 4 različne razrede fotoreceptorskih celic, ki imajo vrhove spektralnih občutljivosti pri približno 370 nm (UV), 525 nm (ozkopasovne NG in širokopasovne zelene BBG) ter 565 nm (LW). Glede na različno številčno zastopanost spektralnih občutljivosti posameznih fotoreceptorskih razredov predvidevamo, da so periferne fotoreceptorske celice v omatidijih tipa BBG, saj smo jih pri meritvah srečali največ. Ostali trije fotoreceptorski razredi pa se v različnih kombinacijah R7 in R8 centralnih fotoreceptorskih celicah v omatidijih stohastično pojavljajo v mrežnici. Periferne celice služijo akromatskemu vidu, centralne pa predstavljajo substrat za barvni vid. Pri prepoznavi za palmovega rilčkarja pomembnih motivov v okolju (obzorje in osebki iste vrste) so centralni receptorji verjetno v kombinacijah UV in NG (prepoznavna obzorja) ter NG in LW (prepoznavna osebki iste vrste). Barvni vid je verjetno specifično uglašen na barvo kutikule osebki iste vrste, omogoča pa tudi prepoznavo obzorja.

Frekvenčna analiza svetlo in temno adaptiranih fotoreceptorjev kaže na sorazmerno počasnost vida pri palmovem rilčkarju (predvidena fuzijska frekvenca pri 30 °C je 100 Hz). Sklepamo, da vid palmovega rilčkarja med hitrim letenjem na dolge razdalje ni pretirano zanesljiv. Široko vidno polje in potencialno dober barvni vid pa rilčkarju omogočata prepoznavo ključnih motivov pri počasni lokomociji.

Za celovito poznavanje vidne zaznave pri palmovem rilčkarju so potrebne nadaljnje raziskave, kot so na primer vedenjski poskusi ter barvno učenje.

## 7.1 PREDLOGI ZA NADALJNJE RAZISKAVE

V nadaljevanju bi bilo dobro pri palmovem rilčkarju vid še bolj podrobno raziskati, kar bi pozitivno prispevalo k poznavanju same vrste škodljivca na palmah ter bi mnogo doprineslo k znanemu o evoluciji vida pri hroščih na splošno. Z *in situ* hibridizacijo nameravamo ugotoviti razporeditev fotoreceptorskih celic posameznih fotoreceptorskih razredov v mrežnici ter ugotoviti ali kombinacije fotoreceptorskih celic v posameznih omatidijih, ki smo jih predvideli, res obstajajo. Z vedenjskimi poskusi v Y ali T labirintu bi poskušali ugotoviti, ali ima palmov rilčkar resnično učinkovit barvni vid in mogoče ugotoviti, kateri odtenki rdeče barve so vedenjski prožilci. Za ugotovitev delovnega območja fotoreceptorjev ter morebitnih morfoloških sprememb v strukturi omatidijev med dnevom in nočjo bi bilo dobro narediti mikroskopske rezine svetlo in temno adaptiranih oči. Izdelava topografskih kart z interomatidijskimi koti ter vpadnimi koti fotoreceptorskih celic bi prikazala akutne cone na očeh palmovega rilčkarja. Študija anatomije optičnih lobusov bi omogočila ugotoviti, ali ima palmov rilčkar nevralni substrat za nevravno superpozicijo.

Z vsemi naštetimi dodatnimi raziskavami bi lažje razumeli umestitev palmovega rilčkarja v okolje, v katerem se najpogosteje nahaja, tako v ekološkem, kot v etološkem smislu. Posledično bi bilo pridobljene podatke možno uporabiti za izdelavo učinkovitejših pasti.

## 8 VIRI

- Abraham V. A., Mahmood Al-Shuaibi, Faleiro J. R., Abozuhairah R. A., Vidyasagar P. S. P. V. 1998. An integrated approach for the management of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv., a key pest of date palm In Middle East. Sultan Qaboos University Journal for Scientific Research, Agricultural Science, 3: 77–84
- Abuagla A. M., Al-Deeb M. A. 2011. Effect of bait quantity and trap color on the trapping efficacy of the pheromone trap for the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. Journal of Insect Science, 12: 1-6
- Arikawa K., Scholten D. G., Kinoshita M., Stavenga D.G. 1999. Tuning of Photoreceptor Spectral Sensitivities by Red and Yellow Pigments in the Butterfly *Papilio xuthus*. Zoological Science, 16: 17-24
- Belušič G. 2011. ERG in *Drosophila*. V: Electroretinograms. Belušič G. (ur.). Rijeka, InTech Europe: 221-238
- Briscoe A. D., Chittka L. 2001. The evolution of color vision in insects. Annual Review of Entomology, 46: 471-510
- Delgado R., Munöz Y., Peña-Cortés H., Giavalisco P., Bacigalupo J. 2014. Diacylglycerol Activates the Light-Dependent Channel TRP in the Photosensitive Microvilli of *Drosophila melanogaster* Photoreceptors. The Journal of Neuroscience, 34, 19: 6679–6686
- Dubs A., Laughlin S. B., Srinivasan M. V. 1981. Single photon signals in fly photoreceptors and first order interneurons at behavioral threshold. Journal of Physiology, 317: 317-334
- Faleiro J.R. 2006. A review of the issues and management of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Rhynchophoridae) in coconut and date palm during the last one hundred years. International Journal of Tropical Insect Science, 26, 3: 135–154
- Ferry M., Gómez S. 2002. The Red Palm Weevil in the Mediterranean Area. Austin, The International Palm Society:  
<http://www.palms.org/palmsjournal/2002/redweevil.htm> (30. 7. 2014)
- Frederiksen R., Warrant E. J. 2008. Visual sensitivity in the crepuscular owl butterfly *Caligo memnon* and the diurnal blue morpho *Morpho peleides*: a clue to explain the evolution of nocturnal apposition eyes?. The Journal of Experimental Biology, 211: 844-851

- Hardie R. C., Franze K. 2012. Photomechanical Responses in *Drosophila* Photoreceptors. *Science*, 338: 260-263
- Hardie R. C., Raghu P. 2001. Visual transduction in *Drosophila*. *Nature*, 413: 186-193
- Hill R.W., Wyse G. A., Anderson M. 2008 *Animal Physiology*. 2<sup>nd</sup> ed. Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.: 762 str.
- Ince S., Porcelli F., Al-Jboory I. 2011. Egg laying and egg laying behavior of Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) 1790 (Coleoptera: Curculionidae). *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2, 11: 1368-1374
- Jackowska M., Bao R., Liu Z., McDonald E. C., Cook T. A., Friedrich M. 2007. Genomic and gene regulatory signatures of cryptozoic adaptation: Loss of blue sensitive photoreceptors through expansion of long wavelength-opsin expression in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Frontiers in Zoology*, 4: 24 str.
- Katz B., Minke B. 2009. *Drosophila* photoreceptors and signaling mechanisms. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 3, 2: 18 str.
- Kirschfeld, K., Franceschini, N. 1968. Optical characteristics of ommatidia in the complex eye of *Musca*. *Kybernetik*, 5: 47–52
- Kumar J. P. 2012. Building an Ommatidium One Cell at a Time. *Developmental Dynamics*, 241, 1: 136–149
- Land M. F. 1997. Visual acuity in insects. *Annual Review of Entomology*, 42: 147-177
- Land M. F., Chittka L. 2013. *Vision. V: The Insects. Structure and function*. Simpson S. J., Douglas A. E. (eds.). 5th ed. Cambridge, Cambridge University Press: 708-737
- Land M. F., Nilsson D. E. 2002. *Animal Eyes*. New York, Oxford University Press: 221 str.
- Meglič A. 2009. Povezave med procesoma fototransdukcije in aktivacije mitohondrijev pri dvokrilcih (Insecta: Diptera). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 122 str.
- Mishra M., Meyer-Rochow V. B. 2006. Fine structure of the compound eye of the fungus beetle *Neotriplax lewisi* (Coleoptera, Cucujiformia, Erotylidae). *Invertebrate Biology*, 125, 3: 265–278
- Nasi E., Del Pilar Gomez M. 2000. Phototransduction Mechanisms in Microvillar and Ciliary Photoreceptors of Invertebrates. V: *Molecular mechanisms in visual transduction*. Stavenga D. G., De Grip W.J., Pugh E.N. (eds.). North Holland, Elsevier Science B.V.: 389-448

Roda A., Kairo M., Damian T., Franken F., Heidweiller K., Johanns C., Mankin R. 2011. Red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*), an invasive pest recently found in the Caribbean that threatens the region. The Authors Journal compilation, 41: 116-121

*Rhynchophorus ferrugineus*. Red Palm Weevil. 2013. United Kingdom, Russell IPM Ltd.  
<http://m.russellipm-agriculture.com/insects/rhynchophorus-ferrugineus> (30. 7. 2014)

Salama H. S., Hamdy M. K., El-Din M. M. 2002. The thermal constant for timing the emergence of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliv.) (Curculionidae: Coleoptera). Anzeiger für Schädlingskunde, 75: 26–29

Salcedo E., Huber A., Henrich S., Chadwell L. V., Chou W., Paulsen R., Britt S. G. 1999. Blue- and Green-Absorbing Visual Pigments of *Drosophila*: Ectopic Expression and Physiological Characterization of the R8 Photoreceptor Cell-Specific Rh5 and Rh6 Rhodopsins. The Journal of Neuroscience, 19, 24: 10716–10726

Stavenga D.G., Smits R.P., Hoenders B.J. 1993. Simple Exponential Functions Describing the Absorbance Bands of Visual Pigment Spectra. Vision Research, 33, 8: 1011-1017

Stavenga D.G., Oberwinkler J., Postma M. 2000. Modeling primary visual process in insect photoreceptors. V: Molecular mechanisms in visual transduction. Stavenga D. G., De Grip W.J., Pugh E.N. (eds.). North Holland, Elsevier Science B.V.: 527-574

Žuželka uničuje naše palme. Prizadevanje EU za zaustavitev palmovega rilčkarja. 2012. Belgija. Urad za publikacije Evropske unije: 32 str.

Warrant E. J. 2008. Seeing in the dark: vision and visual behaviour in nocturnal bees and wasps. The Journal of Experimental Biology, 211: 1737-1746

## ZAHVALA

Rad bi se zahvalil svojemu mentorju Gregorju Belušiču za ves trud, ki ga je vložil v magistrsko delo in za vso pomoč pri kakršnikoli vprašanjih in zagatah. Z njegovo pomočjo je bilo izdelovanje magistrskega dela ne le lažje temveč tudi zabavno. Moja zahvala gre tudi sošolkama Katji Šporar in Niki Volk, ki sta mi pogosto priskočili na pomoč pri laboratorijskem delu. Prav tako bi se zahvalil tudi Jerneji Rudolf za vse nasvete pri pisanju magistrske naloge. Nenazadnje bi se rad zahvalil Evi Kocjan, za vso spodbudo, podporo in potrpljenje ki mi jih je nudila pri nastajanju magistrskega dela.

Raziskave so bile financirane s strani Evropske unije v okviru 7. Evropskega okvirnega programa v sklopu projekta Palm protect.

Hvala vsem!