

SZÍNEK HARMÓNIAJA: A BOGLÁRKALEPKÉK SZERKEZETI KÉK SZÍNÉNEK FAJFELISMERÉSI SZEREPE – I. RÉSZ

Kertész Krisztián, Piszter Gábor, Vértessy Zofia, Biró László Péter
MTA TTK Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet¹

Bálint Zsolt
Magyar Természettudományi Múzeum²

Az MTA TTK MFA Nanoszerkezetek Osztályán pásztázó és transzmissziós elektronmikroszkópos módszerekkel, valamint optikai reflexiós spektrometriával tanulmányoztuk kilenc boglárkalepké faj szárnyainak kék színét adó pikkelyek nanoszerkezetét és optikai tulajdonságait, valamint ezek kapcsolatát a lepkék rajzási idejével. A lepképikkelyek fotonikus nanoszerkezeti jellemzőit egy saját fejlesztésű számítógépes program segítségével jellemeztük a pásztázó és transzmissziós elektronmikroszkóppal készült felvételeken, míg a színt a szárnyakon mért fényvisszaverési spektrumok alapján határoztuk meg. Az így nyert szerkezeti és spektrális információk alapján mesterséges neurális hálózat segítségével kimutattuk a lepkék színének és pikkelyeik fotonikus nanoszerkezetének fajspecifikusságát. Ezek alapján megállapítottuk, hogy mind a spektrális, mind pedig a szerkezeti adatok alapján 90%-ot meghaladó pontossággal végezhető el a lepké fajok azonosítása. A reflexiós spektrumokat további elemzésnek is alávetettük: közös színínger-diagramban ábrázoltuk a megvizsgált egyedek színínger-koordinátáit úgy, hogy számításba vettük a tanulmányozott boglárkalepkék szemének négyféle színérzékelő receptorát. Az így adódó háromdimenziós színíngertérben fajokként sokkal jobban elkülönülnek az egyedek színínger-koordinátái, mint a három emberi színérzékelő receptor érzékenységi görbéit felhasználó, korábban alkalmazott kétdimenziós színíngertérben. Megvizsgáltuk továbbá a lepké fajokra jellemző színek és a lepkék rajzási idejének korrelációját, amiből több mint 100 példány fényvisszaverését mértük roncsolásmentesen. Kimutattuk, hogy a hasonlósági színű fajok életükben időben elkülönülnek, így eredményesen kiküszöbölik a szín helytelen azonosításából eredő tévesztéseket, egyben lehetővé téve a sikeresebb párválasztást.

A Boglárka-rokonúak (Polyommata) nemzetsége fontos részét alkotja az északi félgömb nappali lepkefaunájának, mivel nyílt füves területeken igen nagy egyedszámban képviselik magukat. A boglárkakat kutató entomológusok az egyes fajokat rendszerint a szárnyuk fonákján látható bonyolult mintázatokat összehasonlítva határozzák meg [1], ami magas szintű szaktudást és sok éves gyakorlatot kíván. Ezzel szemben igen valószínűtlen, hogy a lepkék agya elégséges adatfeldolgozási kapacitással rendelkezik ahhoz,

hogy repülés közben képes legyen fajtársai azonosítására a fonák összetett rajzolata alapján.

A nemzetséget képviselő lepké fajok hímjei többnyire a kék különböző árnyalataiban pompázó szárnyakkal rendelkeznek. A csillogó kék szín összetett nanoszerkezetektől származik, amelyek szelektíven kölcsönhatásba lépnek a rájuk eső fehér fény különböző hullámhossz-tartományaival, aminek következtében bizonyos hullámok behatolnak a szerkezetbe, míg más hullámhosszak teljesen visszaverődnek [2, 3]. Az ilyen típusú nanostruktúrákat fotonikus kristály típusú szerkezeteknek nevezzük [4]. A lepkék esetében ezek bonyolult, önszerveződő folyamatok során jönnek létre az egyedfejlődés utolsó (bábállapot) szakaszában. A lepkeszárnyakat borító pikkelyekben található bonyolult és jellegzetes nanoarchitektúrák kifejlesztése valószínűleg fontos előnyökkel szolgálhatott az evolúciós versenyben. Korábban kimutatták, hogy a boglárkalepkéknél a szárnyak kék színe fontos szerepet játszik az egyedek szexuális kommunikációjában, megvalósítva a szín alapján történő fajazonosítást. A hímek szárnyszínének fontosságát tovább hangsúlyozzák az egymást követő generációkon át ható változások [5].

A fotonikus kristály (tökéletesen rendezett vagy kvázirendezett) típusú anyagok olyan nanokompozitok, amelyekben a két áttetsző összetevő dielektromos állandója váltakozik a fény hullámhosszával összemerhető periodicitással, ami a látható tartományban néhány 100 nanométert jelent. A fotonikus kristályra eső fény kölcsönhatásba lép ezzel a periodikus nanoszerkezettel, aminek következtében bizonyos hullámhossz-tartományok nem tudnak terjedni a szerkezetben, arról teljes egészében visszaverődnek. Ezt a visszaverődési hullámhossz-tartományt nevezzük fotonikus tiltott sávnak [4]. Ennek kialakulási módja a félvezető fizikából jól ismert tiltott sáv (vegyérték- és vezetési sáv között) analógja.

A lepkék pikkelyeiben található fotonikus kristályszerkezet az esetek többségében kitinből és levegőből áll: ezek periodikus váltakozása alakítja ki a szelektív fényvisszaveréshez szükséges törésmutató-különbséget [2]. A visszavert fény hullámhossza a fotonikus kristályszerkezet tulajdonságaitól függ. Amennyiben a törésmutató-különbséget állandónak tételezzük fel (jelen esetben kitin/levegő kompozit), a fotonikus tiltott sáv spektrális helyzetét a kristályszerkezet jellemző méretei és szimmetriatulajdonságai határozzák meg, hasonlóan a félvezetőkben található „elektronikus” tiltott sávhoz [4]. A gyakorlatban ez úgy jelentke-

¹ www.nanotechnology.hu

² www.nhmus.hu

zik, hogy a karakterisztikus visszaverési spektrum előállításához olyan jellegzetes nanoszerkezetre van szükség, amelynek tulajdonságai jól meghatározottak. A lepkéknél ez nemzedékről nemzedékre öröklődő fajspecifikus nanoszerkezetet jelent.

A lepkék szárnyait többnyire élénk színekkel rendelkező pikkelyek borítják. Átlagos méretük $100 \times 50 \times 1 \mu\text{m}^3$. Széles körű kutatások folytak és folynak a lepkeszárnyak színének eredetével kapcsolatban. A kémiai (festék/pigment) szín eredete mindig valamiféle festékanyag, jelen cikkünkben ilyen színekkel nem foglalkozunk. A fizikai vagy szerkezeti színekkel [6] fotonikus szerkezet állítja elő, amit többnyire a pikkelyek felszínét tagoló hosszanti gerincek, keresztbordák, rácsok és ablakocskák, továbbá a pikkelytestet kitöltő rétegek vagy szivacsos anyag együttesen alkotják. Az általunk vizsgált lepkefajok szárnyainak kék színárnyalatai fizikai (szerkezeti) színek [2].

A boglárkalepkék élőhelyét és biológiai tulajdonságait tekintetbe véve rendkívüli fontossággal bírhatnak az élénk szerkezeti színek. Egyszerű, ugyanakkor feltűnő (nagy távolságból is észlelhető) vizuális jelzésként jelentősen leegyszerűsíthetik a fajtársak, illetve a potenciális versenytársak természetes körülmények közötti helyes azonosítását. E jelzésnek olyannyira egyértelműnek kell lennie, hogy a lepke repülés közben is képes legyen felismerni, még abban az optikailag rendkívül bonyolult közegben is, ami az élőhelyet jellemzi (a boglárkák rendszerint alacsonyan szállnak a füves, virágos mezők felett). Ez a távolra ható optikai jelzés valószínűsíthetően csak az udvarlás nyitó akkordját jelenti, amit ezután a közelre ható, a szaglószerkezethez kapcsolódó kémiai jelzés kibocsátása követ. A hím nőtényhez való közeledését és udvarlását a párosodás követi, hogy megtörténjen a genetikai állományok továbbörökítése.

Korábbi kutatásaink során arra a feltételezésre jutottunk, hogy a sikeres párválasztást elősegítő jelzés optikai eredetű, és valóban a szerkezeti színekhez köthető. A lepkék természetes élőhelyén történő megfigyelések is igazolják, hogy a hímek szárnyának felülete fontos szerepet játszik a sikeres udvarlás elkezdésében. A lepke vizuális jelzésekkel kommunikál a fajtársaival, ezért színének fajspecifikusnak kell lennie. E hipotézisünket a Magyar Természettudományi Múzeum Állattára által rendelkezésünkre bocsátott lepkepéldányok esetében igazoltuk is. Olyan módszert fejlesztettünk ki, amellyel a boglárkalepkék rendszertani (taxonómiai) összehasonlítása elvégezhető: pusztán a szárnyak színe alapján elkülöníthetők az egymással közeli rokonságban levő fajok.

Jelen munkában megvizsgáljuk 9 boglárkalepkefaj színének spektrális és szárnypikkelyeinek szerkezeti tulajdonságait, majd megmutatjuk, hogy a kék ivari jelzőszín árnyalata összehangolt a lepkék jól behatárolt repülési idejével, vagyis azzal az időtartammal, amíg az adott lepkefaj az élőhelyén kifejllett (imágó) formában megtalálható [7]. Ezért feltételezhető, hogy a spektrálisan különböző, fajspecifikus nanoszerkezetek reflexiójából eredő színárnyalatok felhasználhatók a

lepkék egymás közötti, hosszútávú szexuális kommunikációjához. E feltételezés igazolásához megmértük több mint 100 lepke szárnyának fényvisszaverési spektrumát, és az így kapott adatsorok faj szerinti osztályozásához mesterséges neurális hálózat elvű szoftvert használtunk fel [8]. Az általunk kiválasztott és megvizsgált 9 lepkefaj minden példánya azonos élőhelyről származott, így azonos környezeti viszonyok között éltek. Továbbá maguk a fajok levezethetőek egy nem túl távoli feltételezett közös őstől, tehát közeli rokonok. Mivel az élőhelyek drasztikus különbségéből fakadó és az esetleges távoli rokonságból adódó szélsőséges változókat kiküszöböltük, ezek tudatában már valóban érdemes volt megvizsgálni, hogy milyen mértékben lehetséges a hímek kék színét előállító fotonikus nanoszerkezet fajok szerinti osztályozása a mesterséges neurális hálózatos megközelítésben. Vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy a boglárkákra olyannyira jellemző szivacszerű (*pepper-pot structure*) fotonikus nanoszerkezet [7] fajoként különböző tulajdonságokkal rendelkezik. Ezt a szerkezet által visszaverett fény szabad szemmel történő megfigyelése (a színes 1. ábra a hátsó belső borítón) is jól mutatja. A 9 faj vizsgálatával olyan tudásra tehetünk szert, amely segít feltérképezni a fotonikus nanoszerkezet és az általa reflektált szín közötti kapcsolatot.

A vizsgált lepkék

A Boglárka-rokonúak (Polyommata) nemzetsége (tribusza) Közép-Európa gazdag nappali lepkefaunájának körülbelül egy tizedét adja. Vizsgálataink során a nemzetségnek a Budai-hegységben található Normafa környezetében élő 9 fajt tanulmányoztuk. A vizsgált lepkék a Magyar Természettudományi Múzeum Állattárból származnak, a példányokat 1930 és 2010 között gyűjtötték. A kiválasztott fajok jól megalapozott monofiliát alkotnak (egyetlen közös őstől származnak) a nemzetségen belül: közül megegyező ivarszervi felépítéssel, illatpikkely-szerkezettel, fonákmin-tázattal és nagyon hasonló életmóddal rendelkeznek. Molekuláris vizsgálatok alapján kijelenthető, hogy a monofilián belül a fenti fajok 7 monofiletikus csoportot (génuszt) alkotnak, amelyeket az 1. táblázatban zárójelben tüntettünk fel.

A fent bemutatott hasonlóságokon túl a vizsgált hímek mindegyike kék szárnyfelszínnel rendelkezik, fajoként különböző árnyalatban, míg a nőtények szárnyai barnák (ez alól kivételt képez a csipkés boglárka nőténye, amit nem vontunk be a vizsgálatokba). Ennek okán hasonló párkeresési stratégiát alkalmaznak a hímek: az élőhelyük teljes egészét bejárják a nőtények után kutatva, ellentétben a közeli rokon *Plebejus* fajokkal, amelyek területüket őrzik, ami egy sokkal helyhez kötöttebb viselkedésmód.

A vizsgált lepkék mindegyikét hasonló félszáraz irtásrét, száraz és erdős sztyepprét jellegű élőhelyeken (például Normafa) gyűjtötték. A spektrális és szerkezeti méréseinkben minden fajból legalább 10

1. táblázat

A megvizsgált fajok nevei és darabszáma

magyar név	tudományos (latin) név	db
csíkos boglárka	<i>Polyommatus (Agrodiaetus) damon</i>	10
aprószemes boglárka	<i>Polyommatus (Cyaniris) semiargus</i>	10
égszínkék boglárka	<i>Polyommatus (Lysandra) bellargus</i>	20
ezüstkék boglárka	<i>Polyommatus (Lysandra) coridon</i>	10
csipkés boglárka	<i>Polyommatus (Meleageria) daphnis</i>	10
amandusz boglárka	<i>Polyommatus (Neolysandra) amandus</i>	10
mezei boglárka	<i>Polyommatus (Plebicula) dorylas</i>	20
ikarusz boglárka	<i>Polyommatus (Polyommatus) icarus</i>	10
terzitész boglárka	<i>Polyommatus (Polyommatus) iberistes</i>	10

példányt vizsgáltunk. Az egyes fajokra jellemző repülési időszakok feltérképezéséhez (repülési hisztogram) 285 lepke adatait használtuk, amely példányokat Normafa 20 kilométeres körzetében gyűjtötték, ami kizárja a geológiai és makroklimatikus különbözőségekből fakadó változásokat.

Vizsgálati módszerek

A fizikai színt előállító fotonikus kristályszerkezetet pásztázó (SEM) és transzmissziós (TEM) elektronmikroszkóppal vizsgáltuk a korábban bevált minta-előkészítési eljárás alkalmazásával. Mind a SEM (LEO 1540 XB készülék), mind a TEM (TECNAI 10 készülék) felvételek esetében a lepkék jobb hátulsó szárnyát használtuk. A SEM vizsgálatokhoz mindig ugyanazt, a szárny főerei által körülzárt darabot vágtuk ki és szén-szalaggal rögzítettük a mintatartóhoz. Az ideális elektromos vezetési tulajdonságok eléréséhez a szárnyakból készült mintákra vékony aranyréteget porlasztottunk. A SEM képek elkészítése során mindenkor 50 000-szeres nagyítást használtunk, lehetővé téve a felvételek későbbi pontos összehasonlítását. A keresztmetszeti TEM felvételek elkészítéséhez a szárnyakból ultramikrotom használatával 70 nm vastagságú metszeteket készítettünk és azokat rézrácsra rögzítettük.

A szárnyak spektrális tulajdonságának vizsgálatához Avantes 2048-2 moduláris spektrofotométert használtunk. Tekintve a vizsgált sérülékeny szárnyminták nagy számát, szükséges volt egy könnyen megismételhető, gyors és roncsolásmentes mérési mód kifejlesztésére. E célból készítettük el a „spektrodeszkát”, amely a szárnyfelületre merőleges reflexiómérést tesz lehetővé az említett kívánalmak teljesítésével [8]. A spektrodeszka használatakor minden lepke jobb elülső szárnyán, a főerek között (a „sejtben”) mértük a reflexiós spektrumokat. A megvilágítás deuterium-halogén fényforrással történt, a detektálást a szárnyra merőleges optikai szál végezte. Ez vezette a

spektrométerhez a visszavert fényt. A mérésekben fehér diffúziós standardhoz (Avantes WS-2) viszonyítva vizsgáltuk a boglárkalepkék színét; ez tette lehetővé a spektrumok összehasonlítását. A mért görbék, várakozásainknak megfelelően, a kék tartományban rendelkeznek legnagyobb intenzitású csúccsal. Az összehasonlítás megkönnyítése érdekében minden egyes spektrumot a kék csúcs maximumához normaltunk, továbbá az egyedi spektrumokat fajonként is átlagoltuk. Korábbi munkánkban [8] megmutattuk, hogy az egy fajba tartozó egyedek színe gyakorlatilag megegyezik egymással. Emiatt végezhető el a fajonkénti átlagolás. A módszer segítségével azt a fajspecifikus reflexiós spektrumot kapjuk, ami jellemzi az általunk vizsgált lepkefajt.

A SEM és TEM felvételek feltárják a boglárkák szárnyán található pikkelyek fotonikus nanoszerkezetét. A struktúra egy többrétegű, lyukacsos, szivacszerű kitin-levegő nanokompozit (1. ábra). A felvételeken látható nanoszerkezetek látszólag nagyon hasonlóak, mégis elegendő különbség fedezhető fel köztük, így kissé eltérően befolyásolják a róluk visszavert fény hullámhossz szerinti intenzitáseloszlását.

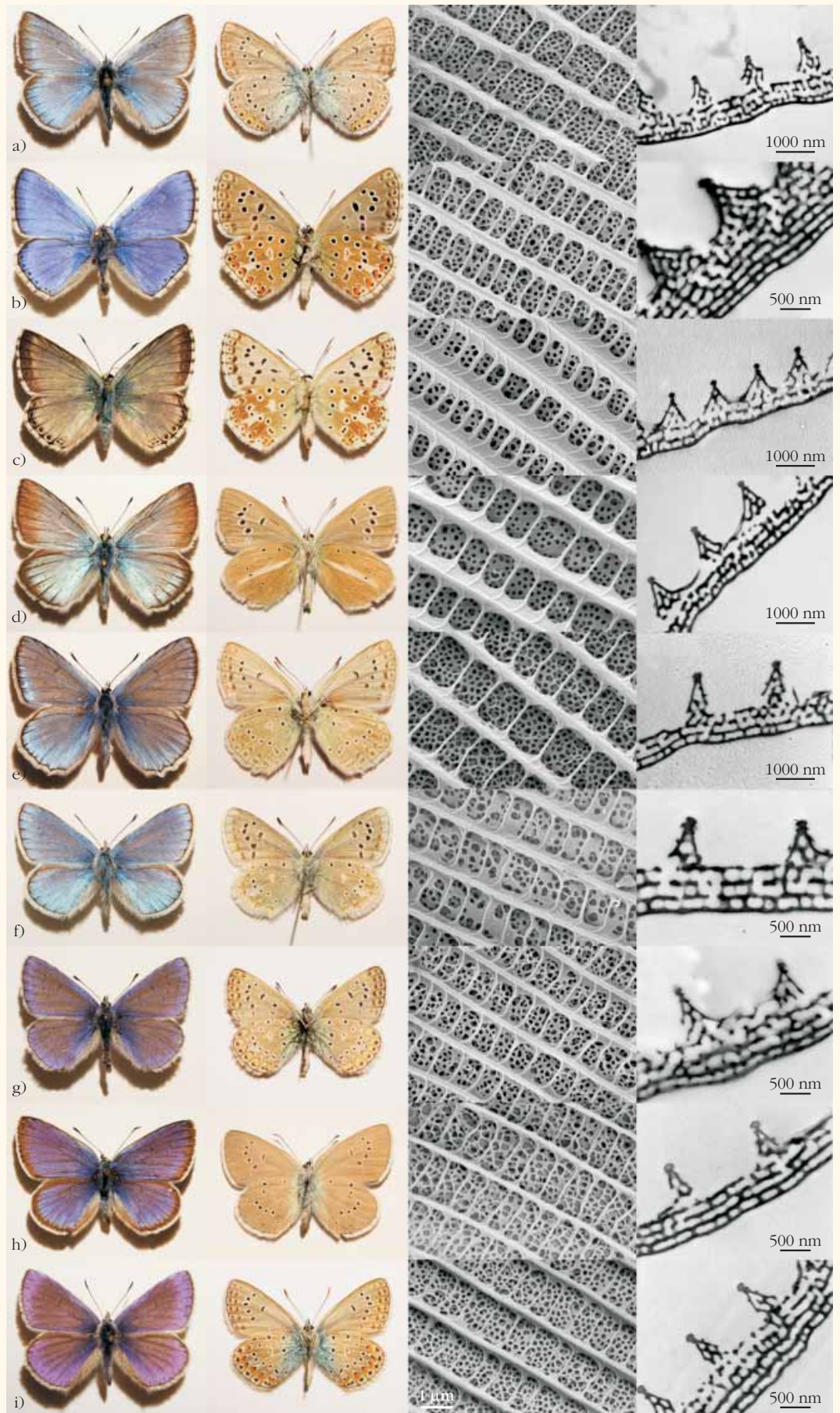
Ahhoz, hogy a SEM és TEM felvételekből kinyerjük a fotonikus nanoszerkezet jellemző paramétereit, felhasználtuk az osztályunkon korábban kifejlesztett BioPhot Analyzer szoftvert. Segítségével kijelölhetők a pikkelyszerkezet általunk érdekesnek vélt tartományai, amelyek szerkezeti paramétereit a program automatikusan kiszámítja és tárolja.

A reflexiós spektrumok és a fotonikus nanoszerkezet mért paramétereit mesterséges neurális hálózat (MNH) elvű szoftverrel értékeltük ki [9]. A mesterséges neurális hálózatok olyan bioinspirált számítási rendszerek, amelyeket a biológiai neurális hálózatok mintájára készítettek. A természetes neurális hálózatokhoz hasonlóan nagy mértékben párhuzamos felépítéssel és tanulási képességgel rendelkeznek, amelyek különféle, nem vagy nehezen algoritmizálható feladatok megoldására használhatók fel.

Egy mesterséges neurális hálózat azonos helyi dolgozást végző művelési elemek, úgynevezett „virtuális neuronok” bonyolultan összekapcsolt rendszerből áll. A neuron működése során a bemenetere kapcsolt értékek súlyozott átlagát összeszorozza a benne található nemlineáris függvényel (esetünkben tangens hiperbolikus), és az így kapott értéket küldi a kimenetre. A neuronokat rétegekbe szervezhetjük, ahol egy rétegbe hasonló típusú neuronok tartoznak. Vizsgálatainkban három réteg neuront (bemeneti – rejtett – kimeneti) használtunk, amelyek elemszámát az adott feladathoz igazítottuk. A spektrális és szerkezeti vizsgálatoknál a bemenetek számát a problémára jellemző paraméterek száma határozta meg, míg a kimeneti neuronok mindkét esetben a vizsgált 9 lepkefaj számával egyeztek meg. A rejtett réteg neuronjainak száma a két neurális hálózat optimalizációja közben került meghatározásra. A hálózat használata betanítással kezdődik, a bemeneti adatok felével, így lesz alkalmas újabb egyedek fájának meghatározására.

Irodalom

1. Gozmány L.: *Fauna hungariae 75, Lepidoptera – Lepkék*. Akadémiai kiadó, Budapest, 1965.
2. Biró L. P., Vigneron J. P.: Photonic nanoarchitectures in butterflies and beetles: valuable sources for bioinspiration. *Laser Photonics Rev.* 5 (2011) 27–51. (doi:10.1002/lpor.200900018)
3. Márk G. I., Bálint Zs., Kertész K., Vértesy Z., Biró L. P.: A biológiai eredetű fotonikus kristályok csodái. *Fizikai Szemle* 57/4 (2007) 116–121.
4. Joannopoulos J. D., Meade R., Winn D. J. N.: *Photonic Crystals: Molding the Flow of Light*. Princeton University Press, Princeton NJ USA, 1995.
5. Bálint Zs., Biró L. P.: A lepkék színeváltozása. *Természet Világa* 135/7 (2004) 311–313.
6. Rajkovits Zs.: Szerkezeti színek az élővilágban. *Fizikai Szemle* 57/4 (2007) 121–126.
7. Bálint Zs., Kertész K., Piszter G., Vértesy Z., Biró L. P.: The well-tuned blues: the role of structural colours as optical signals in species recognition of a local butterfly fauna (Lepidoptera: Lycaenidae: Polyommatainae). *J. R. Soc. Interface* 9 (2012) 1745–1756. és a kiegészítő anyagok a <http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/9/73/1745/suppl/DC1> oldalon
8. Piszter G., Kertész K., Vértesy Z., Bálint Zs., Biró L. P.: Color based discrimination of chitin–air nanocomposites in butterfly scales and their role in conspecific recognition. *Anal. Methods* 3 (2010) 78–83. (doi:10.1039/c0ay00410c)
9. Horváth G. (szerk.): *Neurális hálózatok és műszaki alkalmazásai*. Műegyetemi Kiadó, Budapest, 1998.



1. ábra. 1. és 2. oszlop: a megvizsgált 9 faj múzeumi példányainak optikai képe. 1. oszlop: felülnézet (felszín). 2. oszlop: alulnézet (fonák). 3. és 4. oszlop: elektronmikroszkópos felvételek. 3. oszlop: pásztázó elektronmikroszkópia. 4. oszlop: transzmissziós elektronmikroszkópia. (a) Amandusz boglárka (*Polyommatus amandus*), (b) égszínkék boglárka (*Polyommatus bellargus*), (c) ezüstkék boglárka (*Polyommatus coridon*), (d) csíkos boglárka (*Polyommatus damon*), (e) csipkés boglárka (*Polyommatus dapfnis*), (f) mezei boglárka (*Polyommatus dorylas*), (g) ikarusz boglárka (*Polyommatus icarus*), (h) aprószemes boglárka (*Polyommatus semiargus*), (i) terzitész boglárka (*Polyommatus thersites*).

Kertész Krisztián és munkatársai 231–234. oldalakon található *Színek harmóniája...* című írásához.