

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katja ŠPORAR

BARVNI VID KORUZNE VEŠČE (*Ostrinia nubilalis*)

MAGISTRSKO DELO
(Magistrski študij – 2. stopnja)

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katja ŠPORAR

BARVNI VID KORUZNE VEŠČE (*Ostrinia nubilalis*)

MAGISTRSKO DELO
(Magistrski študij – 2. stopnja)

COLOR VISION OF EUROPEAN CORN BORER (*Ostrinia nubilalis*)

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

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. 2. 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. Rudi VEROVNIK
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: 9. 4. 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Katja Šporar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 591.1(043.2)=153.6
- KG koruzna veščica/barvni vid/ERG/fotoreceptorji/sestavljene oči/oceli
- AV ŠPORAR, Katja, diplomirani biolog (UN)
- SA BELUŠIČ, Gregor
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Strukturna in funkcionalna biologija
- LI 2015
- IN BARVNI VID KORUZNE VEŠČICE (*Ostrinia nubilalis*)
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
- OP IX, 65 str., 31 sl., 73 vir.
- IJ sl
- JI sl/en

AI Z magistrskim delom smo opredelili barvni vid treh vrst koruznih vešč, *Ostrinia nubilalis*, *Ostrinia furnacalis* in *Ostrinia scapularis*. Opravili smo elektrofiziološko karakterizacijo fotoreceptorjev v mrežnici sestavljenih oči in ocelov. S svetlobno in elektronsko presewno mikroskopijo smo identificirali substrat za vid koruzne veščice. Med vrstami nismo opazili statistično pomembnih razlik. Ugotovili smo, da je omatidij sestavljen iz 9 do 12 fotoreceptorjev ter iz bazalne celice. Zaprti rabdom poteka do kristalnih stožcev, torej imajo sestavljene oči značilnosti superpozicijskega in apozicijskega tipa. Elektrofiziološke raziskave so pokazale, da imajo sestavljene oči prevladujoči tip fotoreceptorjev z vrhom občutljivosti v zelenem delu spektra, sekundarni vrh občutljivosti mrežnice v UV delu spektra pa ima spremenljivo amplitudo. Oceli kažejo dva jasno ločena vrhova občutljivosti v UV in zelenem delu spektra. Vsaj oceli imajo dikromatski barvni vid. Na podlagi dobljenih rezultatov smo izdelali svetlobno past.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Du2
- DC UDK 591.1(043.2)=153.6
- CX european corn borer/color vision/ERG/photoreceptors/compound eyes/ocelli
- AU ŠPORAR, Katja
- AA BELUŠIČ, Gregor
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology, Structural and functional biology
- PY 2015
- TI COLOR VISION OF EUROPEAN CORN BORER (*Ostrinia nubilalis*)
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
- NO IX, 65 p., 31 fig., 73 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB We have investigated vision of three different corn borers, *Ostrinia nubilalis*, *Ostrinia furnacalis* and *Ostrinia scapularis*. We performed electrophysiological characterization of photoreceptors in the retina of the compound eyes and ocelli. By light and electron microscopy, we identified a substrate for moth's vision. Among the species we did not find any statistically significant differences. We have found that the ommatidium consists of 9 to 12 photoreceptor cells and of one basal cell. Closed rhabdom extends to crystalline cones, therefore compound eyes of the European corn borer have characteristics of both superposition and apposition eye. Electrophysiological studies have shown that the compound eyes have a dominant type of photoreceptors with a peak sensitivity in the green part of the spectrum and a secondary peak in the UV part of the spectrum has a variable amplitude. Ocelli shows two clearly separated peaks of sensitivity in the UV and green part of the spectrum. At least ocelli have dichromatic color vision. Based on the results, efficient light trap was designed and constructed.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
	KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VII
	KAZALO SLIK	VIII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1	UVOD	1
1.1	NAMEN DELA	1
2	PREGLED OBJAV	2
2.1	OPIS ŽIVALI	2
2.1.1	Življenjski krog	2
2.1.2	Gostiteljske rastline	3
2.1.3	Koruzna vešča kot škodljivec	3
2.1.4	Poškodbe rastlin	4
2.1.5	Azijski koruzni vešči <i>Ostrinia furnacalis</i> in <i>Ostrinia scapularis</i>	5
2.2	ZGRADBA OČESA	6
2.2.1	Zgodovina	6
2.2.2	Sestavljeno oko	6
2.2.3	Odprti in zaprti rabdom	7
2.2.4	Apozicijsko in superpozicijsko oko	8
2.2.5	Nastanek slike	9
2.2.6	Ločljivost	10
2.2.7	Vid nevretenčarjev pri šibki svetlobi	11
2.2.8	Adaptacija	12
2.2.9	Spektralna občutljivost	14
2.2.10	Barvni vid žuželk	14
2.2.10.1	Rodopsin	14
2.2.10.2	Kromofora	15
2.2.10.3	Opsin	15
2.2.10.4	Spektralna občutljivost	15
2.3	FOTOTRANSDUKCIJA	16
2.3.1	Biokemijski mehanizem	16
2.3.2	Kvantni sunki	17
3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	POSKUSNE ŽIVALI	18
3.2	MIKROSKOPIJA	18
3.2.1	Svetlobna mikroskopija	18
3.2.1.1	Priprava preparatov	18
3.2.1.2	Priprava rezin za svetlobno mikroskopijo	19

3.2.1.3	Svetlobno mikroskopiranje	19
3.2.2	Elektronska mikroskopija	19
3.2.2.1	Priprava preparatov	19
3.2.2.2	Priprava rezin za elektronsko mikroskopijo	20
3.2.2.3	Presevna elektronska mikroskopija	20
3.3	ELEKTROFIZIOLOGIJA	20
3.3.1	Preparacija živali	20
3.3.2	Merilne elektrode	21
3.3.3	Postavitev poskusa	21
3.3.3.1	<i>Ostrinia nubilalis</i>	21
3.3.3.2	<i>Ostrinia furnacalis</i> in <i>Ostrinia scapularis</i>	22
3.3.4	Eksperimentalni protokoli	23
3.3.4.1	Občutljivost na intenziteto svetlobe	23
3.3.4.2	Spektralna občutljivost očesa	23
3.3.4.3	Svetlobna adaptacija	24
3.3.4.4	Zaznavanje polarizirane svetlobe	24
3.4	SPEKTROFOTOMETRIJA	24
3.5	REFLEKSIJA OČESA	25
3.6	OBDELAVA REZULTATOV	25
4	REZULTATI	26
4.1	ZUNANJA MORFOLOGIJA VIDNEGA SISTEMA	26
4.2	SVETLOBNA MIKROSKOPIJA	26
4.3	ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA	28
4.4	REFLEKSIJA OČESA	33
4.5	ELEKTROFIZIOLOŠKE MERITVE IZ SESTAVLJENIH OČI	34
4.5.1	Elektroretinografske raziskave	34
4.5.1.1	Spektralna občutljivost	34
4.5.1.2	Selektivna adaptacija	38
4.5.1.3	Intenzitetna krivulja	39
4.5.2	Znotrajcelične meritve	40
4.5.3	Mikrospektrofotometrija absorbance zaščitnih pigmentov	43
4.6	ELEKTROFIZIOLOŠKE MERITVE OCELOV	43
4.6.1	Spektralna občutljivost	43
4.6.2	Selektivna adaptacija	44
5	RAZPRAVA	46
5.1	MREŽNICA KORUZNE VEŠČE IMA ZNAČILNOSTI SUPERPOZICIJSKEGA IN APOZICIJSKEGA OČESA	46
5.1.1	Zunanja morfologija	46
5.1.2	Tapetum in refleksija očesa	47
5.1.3	Dioptrični aparat in fotoreceptorske celice	48
5.2	ELEKTROFIZIOLOGIJA	50

5.2.1	Elektrofiziološke meritve iz mrežnice	50
5.2.2	Pigmentne granule in adaptacija	52
5.2.3	Spektralna občutljivost ocelov	53
5.3	APLIKACIJA REZULTATOV	54
6	SKLEPI	56
7	POVZETEK	58
8	VIRI	59
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Sl. 1: Evropska koruzna vešča (<i>Ostrinia nubilalis</i>).	2
Sl. 2: Gosenica koruzne vešče v stebelu koruze.	5
Sl. 3: Skica prečnega prereza apozicijskega očesa s tremi omatidiji.	7
Sl. 4: Shematski prikaz glavnih optičnih tipov sestavljenih oči členonožcev.	9
Sl. 5: Refrakcijsko superpozicijsko oko.	10
Sl. 6: Temno in svetlo adaptirano superpozicijsko oko.	13
Sl. 7: Zunanji izgled vidnega sistema koruzne vešče.	26
Sl. 8: Prečni prerez svetlo adaptiranega sestavljenega očesa <i>O. scapulalis</i> .	27
Sl. 9: Prečni prerez svetlo adaptiranega sestavljenega očesa <i>O. nubilalis</i> .	27
Sl. 10: Presevna elektronska mikrografija dioptričnega aparata omatidija.	29
Sl. 11: Presevna elektronska mikrografija prečnih prerezov distalnih rabdomov.	30
Sl. 12: Presevna elektronska mikrografija prečnega prereza mrežnice <i>O. furnacalis</i> .	31
Sl. 13: Presevna elektronska mikrografija prečnega prereza mrežnice <i>O. scapulalis</i> .	32
Sl. 14: Elektronska presevna mikrografija prečnega prereza mrežnice <i>O. nubilalis</i> .	32
Sl. 15: Refleksija iz sestavljenega očesa samca <i>Ostrinia scapulalis</i> .	33
Sl. 16: Horizontalni profil intenzitete refleksije.	34
Sl. 17: Povprečna spektralna občutljivost mrežnice sestavljenih oči <i>O. nubilalis</i> .	35
Sl. 18: Povprečne spektralne občutljivosti mrežnice vseh treh vrst.	37
Sl. 19: Spektralna občutljivost očesa <i>O. nubilalis</i> z adaptacijsko svetlobo.	38
Sl. 20: Spektralna občutljivost očesa <i>O. nubilalis</i> z adaptacijsko svetlobo.	39
Sl. 21: Intenzitetne krivulje.	40
Sl. 22: Receptorski potenciali <i>O. nubilalis</i> .	41
Sl. 23: Povprečne spektralne občutljivosti fotoreceptorskih celic v mrežnici.	42
Sl. 24: Meritev absorbanca zaščitnih pigmentov.	43
Sl. 25: Spektralna občutljivost ocelov koruzne vešče.	44
Sl. 26: Spektralna občutljivost ocela samca <i>O. nubilalis</i> in adaptacija.	45
Sl. 27: Selektivna adaptacija in absorbanca zaščitnih pigmentov.	53
Sl. 28: Spektralna občutljivost očesa <i>Phalaenoides tristifica</i> .	53
Sl. 29: vetlobna past z UV LED sijalko.	55
Sl. 30: Spektralne lastnosti svetil.	55
Sl. 31: Ulov koruzne vešče s svetlobno vabo.	56

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BC	bazalna celica
C	kornea
CC	kristalni stožec
CN	tuberkuli
CZ	bistri pas
ERG	elektroretinogram
PC	pigmentna celica
RCP	pigmentne granule fotoreceptorskih celic
Rh	rabdom
tr	traheola
n	Hillov koeficient
I_{50}	jakost dražljaja, ki izzove polovico maksimalnega odgovora
λ	valovna dolžina
V_{\max}	maksimalna amplituda odgovora
$\Delta\phi$	interomatidijski kot
$\Delta\rho$	vpadni kot

1 UVOD

1.1 NAMEN DELA

Z magistrskim delom smo želeli opredeliti barvni vid koruzne vešče. Opravili smo elektrofiziološko karakterizacijo fotoreceptorjev v mrežnici sestavljenih oči in ocelov. S histološkimi raziskavami smo raziskali strukturne lastnosti mrežnice kot potencialnega substrata za barvni vid. Na podlagi dobljenih rezultatov smo za podjetje Efos informacijske rešitve, d.o.o (blagovna znamka Trapview), izdelali načrt za svetlobno past.

Koruzna vešča je nočni metulj, katerega antene so sorazmerno gladke in torej niso specializirane za zaznavo nizkih koncentracij feromonov. Populacijo je možno spremljati z lovom s svetlobnimi pastmi. Dosedanje izkušnje kažejo, da so za njihovo lovljenje učinkovite svetlobne pasti z živosrebrno svetilko (HBO), ne pa tudi pasti z belo LED sijalko. Zato predpostavljamo, da je za vid koruzne vešče ključna UV komponenta svetlobe, ki je močno zastopana v emisiji HBO, vendar pa popolnoma odsotna v spektru večine razpoložljivih belih LED sijalk.

Ker gre za nočnega metulja, ima verjetno minimiziran barvni vid. Najverjetneje je vsaj dikromat, z naborom receptorjev za UV in vidno svetlobo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OPIS ŽIVALI

Koruzna vešča *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Crambidae) najverjetneje izvira iz Evrope, kjer je razširjena, pojavlja pa se tudi v Ameriki, Aziji, severni Afriki ter na Bližnjem vzhodu. V Sloveniji je prisotna že dolgo časa, v zadnjem obdobju pa povzroča pomembno gospodarsko škodo, predvsem na koruzi (*Zea mays*) in hmelju (*Humulus lupulus*). Gre za polifagno vrsto, saj jo lahko vse pogosteje srečamo tudi na okrasnih rastlinah ter pri pridelavi zelenjave (Rak Cizej in sod., 2010).

Samci koruzne vešče so veliki do 25 mm, samice pa so večje in merijo 25-35 mm ter so svetlejših barv. Prednja krila so svetlorumene do svetlorjave pepelaste barve s prečno vijugasto črto ter z dvema linijama ob zunanjem robu krila. Srednje polje krila je lahko temnejše in barva lahko zelo variira. Zadnja krila so pri obeh spolih enaka in so sivkasta z rumeno črto po sredini. Zadek samca je podolgovat, ožji, daljši ter bolj koničast kot zadek samice.



Slika 1: Koruzna vešča *Ostrinia nubilalis*. Levo je prikazana samica, desno pa samec. Vir slike: <http://britishlepidoptera.weebly.com/028-ostrinia-nubilalis-european-corn-borer.html>

2.1.1 Življenjski krog

Po parjenju, ki poteka v večernem času, samica odloži jajčeca na gostiteljski rastlini. Jajčeca odlagajo na spodnjo stran lista v skupine po 15 do 20 jajčec v obliko nepravilnega grozda. Jajčeca so ovalna, sploščena in kremasto bele barve, navadno z mavričnim videzom, nekaj dni pred izleganjem pa se obarvajo temneje. Skupki jajčec se prekrivajo kot skodle na strehi ali ribje luske in zalega je prekrita s svetlečo voščeno snovjo, ki služi kot zaščita. Ena samica lahko odloži 100-600 jajčec, odvisno od temperature in vlage, saj gre za vlagoljubno in toploljubno vrsto. Po 3-12 dneh se izležejo mlade gosenice, ki sprva

zajedajo povrhnjico na mlajših listih, kasneje pa se zavrtajo v stebela ali plodove. Sveže izvaljene gosenice so velike okoli 1,5 mm ter so belkasto rožnate barve. V svojem razvoju se 5-6 krat levijo in s tem dosežejo velikost do 30 mm in debelino do 5 mm ter postanejo umazano sive do nekoliko rjavkaste barve. Glava je rjave do črne barve in na vsakem segmentu so po 4 temnejše okrogle pege, iz katerih izraščajo dlake. Kjer sta prisotni dve generaciji, se prva generacija gosenic zabubi konec julija, druga pa prezimi. V območjih z eno generacijo, pa prezimijo vse gosenice. Stadij bube traja okoli 2 tedna, odvisno od temperatur. Bube so temnorjave barve in bube samcev merijo 13-14 mm v dolžino ter 2 do 2,5 mm v širino, bube samic pa 16-17 mm v dolžino ter 3,5 do 4 mm v širino. Na koncu abdomna imajo 5 do 8 ščetin, ki služijo pritrditvi bube na svoj kokon. Po izleganju iz bube, metulji živijo 3 do 10 dni.

Odrasla gosenica ponavadi prezimi v izvrtini na spodnjem delu stebela, na Primorskem ter Krškem polju, kjer sta prisotni dve popolni generaciji, pa prezimi v samem storžu in v storževem vretenu ter se zabubi od konca aprila do konca maja. Prvi metulji izletijo sredi maja in sicer v Vipavski dolini, sledi izleganje na Krškem polju, Prekmurju ter na Štajerskem, kjer se izlegajo na koncu maja. V hladnejših območjih pa se metulji začnejo izlegati junija.

Na večjem območju Slovenije ima koruzna vešča le eno generacijo z maksimumom od sredine do konca julija, v Vipavski dolini ter na Krškem polju pa ima dve generaciji in tam je maksimum prve generacije sredi junija, druge pa v začetku avgusta. V toplejših območjih jih lahko spremljamo tudi še septembra.

2.1.2 Gostiteljske rastline

Koruzna vešča zajeda številne zelnate rastline z dovolj debelimi stebli, da v njih vstopi gosenica. Do sedaj so jo zabeležili na več kot 250 vrstah (na enokaličnicah in na dvokaličnicah). Ponavadi zajedajo zelenjavo, če je prisotna preden je na voljo koruza, ali pa kasneje v sezoni, ko nastopi senescenca koruz in le-te tako postanejo neprivlačne za ovipozicijo. Od gojenih rastlin pri nas poleg koruze in hmelja zajeda še papriko, peso, fižol, krompir, paradižnik, zeleno, proso, sojo ter ajdo, med divje rastočimi rastlinami pa pogosto napada divji pelin (Gomboc, 1999). Razširjena je po vsej Sloveniji do montanskega pasu, do koder še uspešno pridelujejo koruzo (Gomboc 1999).

2.1.3 Koruzna vešča kot škodljivec

Zadnjih nekaj let število izbruhov narašča, kar je najverjetneje posledica relativno visokih temperatur ter neizvajanja fitosanitarnih-higienskih ukrepov (Dolinar in sod., 2002; Rak Cizej in sod., 2009; Rak Cizej in sod., 2008). Odlok o zatiranju koruzne vešče na področju

SR Slovenije (Ur. l. SRS, št. 20/1978) je prenehal veljati s spremembo Zakona o zdravstvenem varstvu rastlin v letu 1995 (Rak Cizej in sod., 2010).

V Žalcu, na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, že preko 30 let spremljajo populacijo koruznih vešč s svetlobno vabo, ki se je izkazala za bolj zanesljivo metodo spremljanja metuljev koruzne vešče od vab na osnovi feromonov (Gomboc in sod., 1999; Pelozuelo in Frerot, 2007).

2.1.4 Poškodbe rastlin

Pri nas škodo hmelja povzroča predvsem druga generacija gosenic koruznih vešč, toda zadnjih nekaj let škodo povzročajo tudi gosenice prve generacije, ki na hmelju povzročijo nepopravljive posledice. Gosenice prve generacije povzročijo izvrtine v stebelu rastline in s tem onemogočijo pretok vode in hranil. Posledica je zavrta rast in razvoj hmelja. Gosenice druge generacije povzročijo poškodbe na glavnih poganjkih, poleg pa še na stranskih poganjkih ter na storžkih hmelja. Hmelj, napaden s koruzno veščo, zaostane v rasti, postane smrekaste oblike, ima slabše oblikovane stranske poganjke in nekateri deli rastlin se lahko posušijo (Rak Cizej in ost., 2012).

Raziskava, ki jo je leta 2009 in 2010 izvedel Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, je pokazala, da je indeks napadenosti koruze v širši okolici Žalca od 20 do 85 %. Na posamezni rastlini so našli tudi do osem gosenic. Škodo na koruzi povzroča predvsem druga generacija, kjer se gosenice zavrtajo v koruzno steblo ter v koruzne storže. Posledica so manj odporne rastline ter manjši in manj kakovosten pridelek. Prihaja do lomljenja napadenih stebel koruze, poleg tega pa se na napadene rastline koruze naselijo fuzarioze, ki izločajo sekundarne metabolite gliv fuzarioz, mikotoksine (Munkvold in sod., 1997).



Slika 2: Gosenica koruzne vešče v steblu koruze. Vir slike: <http://www.insectimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=2340>

2.1.5 Azijski koruzni vešči *Ostrinia furnacalis* in *Ostrinia scapularis*

O. furnacalis (Gunée, 1854) je vešča iz istega rodu kot evropska koruzna vešča in je znana pod imenom azijska koruzna vešča. Prisotna je vse od Kitajske do Avstralije in je škodljivec več kmetijskih pridelkov, predvsem koruze. Gre za najhujšega škodljivca koruze na Japonskem in Kitajskem oziroma v celotni zahodni pacifiški regiji Azije. Najdemo jo tudi na Javi, Filipinih, Borneu, Novi Gvineji, Salomonovih otokih in v Mikroneziji. Azijska koruzna vešča na Filipinih povzroča od 20 do 80 % izgube pridelka koruze ter na Tajvanu kar do 95 % (Nafus in sod., 1991).

O. furnacalis lahko najdemo skupaj z ostalimi vrstami rodu *Ostrinia*, npr. z *O. orientalis*, *O. zealis*, *O. zaguliaevi* in z *O. scapularis*. Zaradi izredne morfološke podobnosti je posamezne vrste med seboj težko ločiti (Kageyama in sod, 1998). *O. nubilalis* naj bi se razvila iz *O. scapularis* (Walker, 1859), ki je tudi njena najožja sorodnica, toda le-ta se ne hrani na koruzi temveč je njena gostiteljska rastlina navadni pelin (*Artemisia vulgaris* L). Morfološko se ti dve vrsti med seboj ne razlikujeta in sta si genetsko podobni ter imata lahko plodne potomce (Thomas in sod. 2003; Malausa in sod. 2005; Calcagno in sod. 2007). Obe vrsti se lahko razvijeta na koruzi ali na pelinu in do leta 2007 sta spadali pod isto vrsto (Calcagno in sod., 2010). *O. nubilalis*, *O. furnacalis* in *O. scapularis* so si med seboj morfološko izredno podobne in se razlikujejo predvsem glede na sestavo feromonov ki jih izločajo samice, da privabijo samce iste vrste (Takanashi in sod., 2010).

2.2 ZGRADBA OČESA

2.2.1 Zgodovina

Evolucija je v več kot treh in pol milijardah let oblikovala veliko raznolikost življenja na Zemlji, toda fosilne najdbe kažejo, da vid izvira iz obdobja zgodnjega kambrija, okoli 530 milijonov let nazaj. Na meji med predkambrijem in kambrijem je prišlo do kambrijske eksplozije. V manj kot petih milijonih let se je razvila bogata favna makroskopskih živali in veliko jih je imelo velike oči (Land in Nilsson, 2002).

V zgodnjem kambriju je živel na Zemlji veliko trilobitov in drugih členonožcev, ki so najverjetneje že imeli sestavljene oči. Pri fosilih trilobitov lahko opazimo fasete sestavljenega očesa, medtem ko lahko pri ostalih kambrijskih fosilih vidimo le temne odtise z neohranjeno podrobno strukturo. Zaradi velikega števila vrst z očmi ter velikosti njihovih oči lahko sklepamo, da ni bil vid nič manj pomemben, kot je danes (Land in Nilsson, 2002).

Strunarji so se pojavili že v času kambrijske eksplozije, toda le-ti niso imeli pravih oči. Strunarji s pravimi očmi so se pojavili okoli 30 milijonov let pozneje. Zgodnji ordovicjski konodont je imel oči, ki so mu omogočile boljši vid, kot so ga imele ostale živali tistega časa. *Clydagnathus* je imel nenavadno velike kamričaste oči, najverjetneje podobne današnjim vretenčarskim očem. Večina tipov oči, ki jih poznamo danes, izvira iz kambrija, razvoj izpopolnjenih oči pa sovpada z naraščanjem velikosti živali, hitrosti premikanja in z razvojem oklepa, torej z razvojem predacije.

Poznamo okoli 30 različnih živalskih debel, a le tretjina vsebuje vrste s pravimi očmi, druga tretjina nima pravih oči, temveč ima majhne na svetlobo občutljive organe, zadnja tretjina pa ne zaznava svetlobe (Land in Nilsson, 2002).

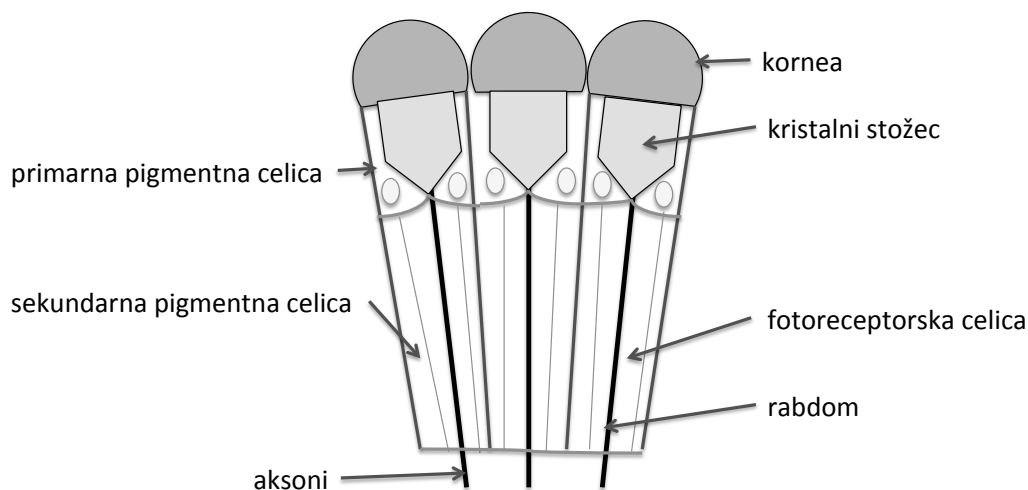
Poznamo dva tipa oči, kamričasto oko, ki ga najdemo pri vretenčarjih, pajkovcih in in mehkužcih, ter sestavljeno oko, ki ga najdemo kot poglavitni organ vida pri členonožcih. Veliko žuželk ima sestavljene oči, ki služijo kot organ za tvorbo slik, ter ocele, ki so majhna očesca z zelo omejeno sposobnostjo tvorbe slike (Katz in Minke, 2009).

2.2.2 Sestavljeno oko

Sestavljene oči so sestavljene iz ponavljajočih se dobro organiziranih enot, t.i. očesc oz. omatidijev. Ti so prisotni pri večini odraslih krilatih žuželk in ličink hemimetabolnih žuželk, vendar so močno reducirani ali manjkajo pri nekrilatih parazitskih skupinah kot so Phthiraptera in Siphonaptera. Število omatidijev pri žuželkah variira od le nekaj pri primitivnih Archaeogatha in Thysanura do več sto ali več tisoč pri dvokrilcih (Katz in Minke, 2009). Sestavljeno oko kačjih pastirjev je sestavljeno iz okoli 30 000, oko

Drosophila pa iz okoli 800 omatidijev. Mravlja *Ponera punctatissima* pa ima le en omatidij na vsaki strani glave (Land in Chittka, 2013).

Vsak omatidij je sestavljen iz dioptričnega aparata, ki zbira svetlobo, ter iz svetločutnega dela, ki pretvarja svetlobo v spremembo napetosti na membrani. Dioptrični aparat sestoji iz prosojne hitinske kutikule, ki tvori kornealno lečo, ter iz kristalnega stožca. Kornealna leča je sestavljena iz več slojev in pri nekaterih taksonomskih skupinah je zunanji sloj pokrit s kornealnimi izrastki, t. i. tuberkuli (Bernhard in Miller, 1962; Bernhard in sod., 1970; Gemne, 1971). Kornealne leče ponavadi ležijo tesno skupaj in imajo obliko šesterokotnih faset. Vsako kornealno lečo tvorita dve epidermalni celici, kornejski celici, ki se pozneje umakneta ob rob omatidija in tvorita primarni pigmentni celici. Pod korneo se nahajajo štiri celice, t.i. Semperjeve celice, ki pri večini žuželk tvorijo sekundarno lečo, kristalni stožec. To je trdna, prozorna, znotrajcelična struktura, ki jo obdajajo primarne in sekundarne pigmentne celice (Land in Chittka, 2013). Oba tipa pigmentnih celic vsebujeta omokromne granule zaščitnih pigmentov, ki se uporabljajo za adaptacijo na različne jakosti svetlobe (Autrum, 1981). Fotoreceptorske celice so visoko polarizirane epitelne celice s specializiranimi območji: somo z jedrom, endoplazemskim retikulumom, mitohondriji in ostalimi organeli, aksoni ter svetločutno rabdomero, ki sestoji iz nekaj 10.000 mikrovilov, kjer poteka fototransdukcija (Katz in Minke, 2009). Rabdomere so sestavljene iz velikega števila mikrovilov, ki v svojih membranah vsebujejo vidne pigmente. Rabdomere v enem omatidiju skupaj tvorijo rabdom (Land in Chittka, 2013).



Slika 3: Skica prečnega prereza apozicijskega očesa s tremi omatidiji. Avtor slike: Katja Šporar.

2.2.3 Odprti in zaprti rabdom

Poznamo dva tipa rabdomov: zaprti rabdom, v katerem so vse rabdomere zlite v centru omatidija, ter odprti rabdom, v katerem so rabdomere enega omatidija med seboj ločene.

Vsak omatidij je povezan z aksoni v optičnih ganglijih (Katz in Minke, 2009). Pri odprtem tipu so ponavljajoči se elementi urejeni v specifičnem geometrijskem vzorcu in prostoru ter zagotavljajo vizualno povezanost med sosednjimi omatidiji. Zato so koti med individualnimi rabdomerami v enem omatidiju identični kotom med sosednjimi omatidiji. Kot rezultat, vsaka od sedmih rabdomer v enem omatidiju prikazuje isto vidno polje kot rabdomera v sosednjem omatidiju. Poleg tega, aksoni celic R1-6 izhajajo iz retine in so relativno kratki ter se končajo v prvem optičnem gangliju, imenovanem lamina, tik pod bazalno membrano, ki mrežnico obdaja s proksimalne strani (Hardie, 2001). Aksoni centralnih rabdomer (R7 in R8) pa potekajo skozi lamino in tvorijo sinapse z nevroni drugega optičnega ganglija, imenovanega medula (Katz in Minke, 2009). Kot primer odprte rabdomske strukture vzemimo *Drosophilo*, pri kateri je sedem rabdomer vsakega omatidija med seboj ločenih in tako vsaka rabdomera deluje kot samostojni optični vodnik. Vsaka receptorska celica znotraj enega omatidija ima svoje vidno polje, ki pa si ga deli s posameznimi celicami sosednjih omatidijev (Land in Chittka, 2013). Čebele, hrošči in mnogi komarji pa imajo zaprti rabdom, kjer so rabdomere znotraj enega omatidija zlite skupaj, in si torej delijo isto vidno polje.

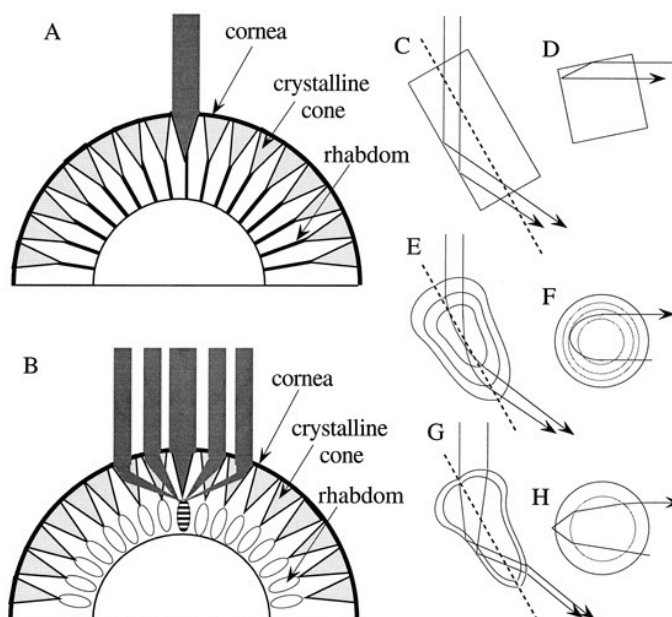
Celice R1-6 predstavljajo največjo skupino fotoreceptorjev v mrežnici in so vpletene v nastanek slike ter zaznavanje gibanja (Belušič, 2011). Izražajo en sam opsin, imenovan Rh1, ki skupaj s kromoforo, 11-*cis* 3-hidroksi retinalom, tvori rodopsin, ki ima absorpcijski vrh v modrem delu spektra in se po absorpciji fotona izomerizira v metarodopsin z absorpcijskim vrhom v rdečem delu spektra. Centralni celici R7 in R8 sta vpleteni v barvni vid, saj vsebujeta opsine z vrhovi absorpcije v UV, modrem in zelenem območju, ter v zaznavanje polarizirane svetlobe, saj tvorita optični vodnik s pravokotno prekržanimi mikrovili (Katz in Minke, 2009).

Pri nekaterih vrstah žuželk traheole obdajajo omatidije in pri vrstah reda Lepidoptera, tesno zložene traheje tvorijo zrcalast sloj v ozadju očesa. Ta sloj, ki odbija svetlobo nazaj v oko, se imenuje tapetum. Traheole, ki tvorijo tapetum, so sploščene in povečane ter tvorijo izmenjujoče se sloje hitina, tekočine in zraka z različnimi lomnimi količniki, zaradi česar na meji med mediji prihaja do odboja svetlobe. Traheole so ojačane z rebrastimi spiralami, ki tvorijo nekakšen stolp, kjer je vsak sloj debel eno četrtno valovne dolžine vidne svetlobe (npr. četrina 500 nm). Na takšni strukturi prihaja do interference, kar ima za posledico visok, valovno specifičen odboj svetlobe (Land in Chittka, 2013).

2.2.4 Apozicijsko in superpozicijsko oko

Na zunaj se apozicijsko in superpozicijsko oko ne razlikujeta, saj sta oba tipa konveksni strukturi s fasetami podobnih velikosti (Land in Nilsson, 2002). Toda notranji strukturi se močno razlikujeta. Mrežnica superpozicijskih oči je enotna struktura in ni razdeljena na samostojne enote kot pri apozicijskem očesu ter leži globoko v očesu. Med mrežnico in optičnimi strukturami pod roženico se nahaja t.i. bistri pas, ki je prosojen in prevaja

svetlobo v vse smeri. Rabdomi so večinoma širši ter krajši kot rabdomi apozicijskih oči. Rabdomski del omatidija zadene svetlobo, ki vstopa skozi veliko površino skupin sosednjih faset, kar pomnoži svetlobni tok v posameznem rabdomu in s tem tudi svetlobno občutljivost. Apozicijski tip pa ima slabšo svetlobno občutljivost, saj v posamezen rabdom vstopa svetloba skozi eno samo faseto; omatidiji so med seboj optično ločeni in svetloba med njimi ne prehaja.



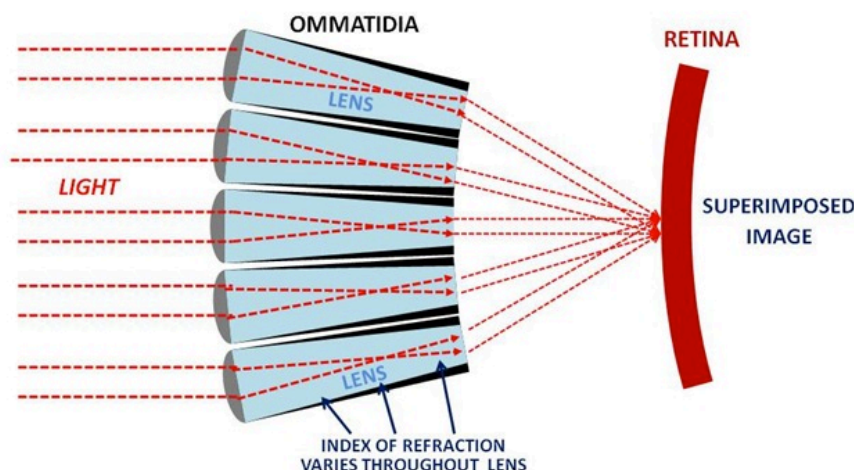
Slika 4: Shematski prikaz glavnih optičnih tipov sestavljenih oči členonožcev. A, apozicijsko oko, omatidiji so optično izolirani. B, superpozicijsko oko, kjer lahko vidimo zbiranje svetlobe iz večih faset na posameznem rabdomu. C-H, pot svetlobe skozi kristalni stožec, gledano od strani in od zgoraj (pikčasta črta predstavlja os omatidija). C, D, refleksijska superpozicija (dekapodni raki). E, F, refrakcijska superpozicija. G, H, parabolična superpozicija. Prekopirano od Edward Gatlen, 1998.

2.2.5 Nastanek slike

Nastanek slike je odvisen od optičnih lastnosti kornealne leče in kristalnega stožca. Do uklona svetlobe pride na prehodu med mediji z različnimi lomnimi količniki. Pri večini apozicijskih oči je kornealna leča najpomembnejša ali celo edina struktura za uklon svetlobe (Land in Chittka, 2013). Pri apozicijskih očeh je vsak omatidij ločen od sosednjih omatidijev z zaščitnimi pigmenti, zato vsak omatidij deluje neodvisno. Vsaka leča proizvede majhno obrnjeno sliko objekta v svojem vidnem polju, ki se fokusira na vrhu rabdoma. Rabdomi učinkujejo kot svetlobni vodniki, skozi katere se podrobnosti slike izgubijo, in vse fotoreptorske celice v enem rabdomu si delijo isto vidno polje. Svetloba, ki doseže rabdom v vsakem omatidiju ima skupno jakost, ki se razlikuje med omatidiji, odvisno od odbite svetlobe od objektov v vidnem polju. Tako rabdomi skupno posredujejo pokončno mozaično sliko, ki nastane iz vseh omatidijev. (Land in Chittka, 2013).

Pri muhah z nevravno superpozicijskimi očmi svetloba vstopi skozi šest sosednjih omatidijev, zato signal na nivoju laminarnih nevronov, na katere konvergirajo fotoreceptorji s skupnim vidnim poljem, efektivno nastane iz šestkrat več fotonov kot jih vstopa skozi posamezno faseto. Posledično imajo muhe višjo občutljivost na nizko jakost svetlobe kot žuželke z zaprtim rabdomom (Land in Chittka, 2013).

Superpozicijske oči na nivoju rabdomov tvorijo eno samo pokončno sliko. To nastane zaradi večstopenjskega uklona svetlobe na vstopu v kornealno lečo, in na prehodu skozi kristalni stožec. Dioptrični aparati superpozicijskih oči vsebujejo gradiente lomnih količnikov od osi do roba leče in kristalnega stožca. Ta gradient povzroči, da se žarki progresivno vse bolj uklanjajo lateralno v smeri od optične osi dioptričnega aparata. Kristalni stožec vsebuje proksimalno in distalno središče gradienta lomnega količnika in učinkuje kot teleskop z dvema lečama, ki sprejema vzporedno potekajoče svetlobne žarke, jih fokusira ter nato oddaja kot preusmerjen vzporedni žarek. Končni rezultat je, da se vzporedna svetloba, ki potuje preko veliko elementov, združi v bistrem pasu in potuje v isti rabdom (Land in Chittka, 2013).



Slika 5: Refrakcijsko superpozicijsko oko. Gradienti lomnih količnikov povzročijo progresivni uklon svetlobe na poti skozi dioptrični aparat. Svetloba iz večih omatidijev se fokusira na majhen del retine. Prekopirano od: <http://watchingtheworldwakeup.blogspot.com/2009/11/amazing-housefly-part-2-coolest-eye.html>.

2.2.6 Ločljivost

Ločljivost je podana kot minimalni kot, ki ga objemata dve točki, da ju optični sistem zanesljivo loči od ene same točke. Ločljivost določa stopnjo natančnosti, s katero oko tvori sliko zunanjega sveta. Pri sestavljenih očeh je ločljivost določena z interomatidijskim kotom ($\Delta\varphi$) in z vpadnim kotom, iz katerega omatidij sprejme svetlobo ($\Delta\rho$), če velja, da $\Delta\varphi \geq \Delta\rho$. Pri dnevnih vrstah se kota ujemata. Interomatidijski kot je kot med optičnimi

osmi sosednjih omatidijev. Pri apozicijskih očeh, kjer vsak rabdom deluje kot svoja enota, je natančnost slike tem večja, čim je interomatidijski kot manjši. Interomatidijski kot najpogosteje meri med 1° in 3° , vendar lahko znaša nad 5° pri nekaterih hroščih ali pa vsega 0.24° na določenih predelih očesa kačjega pastirja (Land, 1997). Pri adaptaciji na temo se vpadni kot lahko poveča, zato da rabdom sprejme več svetlobe, posledično pa se ločljivost zmanjša.

Edini način, na katerega se lahko izboljša ločljivost sestavljenih oči je, da se zmanjša interomatidijski kot. Pri tem mora zaradi ohranjanja svetlobne občutljivosti (nizkega F števila) neizogibno priti do povečanja premera faset (D) in posledično do povečanja dimenzij očesa. Zato se to lahko dogodi le na določenih predelih očesa, saj bi drugače oko postalo preveliko. Takšne predele imenujemo akutne cone, območja s povečano ločljivostjo. Akutne cone so razvite zlasti pri predatorskih vrstah, npr. pri kačjih pastirjih ali roparskih muhah. Visoke ločljivosti pri sestavljenih očeh ni moč doseči na celotni površini očesa, saj bi lahko nastala le na račun prevelikih in preštevilnih faset. Ker se velikost očesa povečuje s kvadratom ločljivosti, bi imelo sestavljeno oko z ločljivostjo 1 kotne minute premer 12 metrov (Land in Chittka, 2013).

2.2.7 Vid nevretenčarjev pri šibki svetlobi

Nevretenčarji so osvojili nekatere najbolj temačne habitate na Zemlji, od pustih, večno temnih oceanskih globin, do zaraščenih podrasti tropskih gozdov ponoči. To jim uspeva z najbolj občutljivimi očmi v živalskem kraljestvu. Velike kamričaste oči globokomorskega velelignja *Architeuthis* premera slabega pol metra so najverjetneje najbolj občutljive od vseh. Občutljivost, povezana z mehanizmi nevronske sumacije oz. konvergence na višjih nivojih v optičnih lobulih, je omogočila, da v temotnih pogojih živeči nevretenčarji zaznavajo svet enako uspešno kot njihovi dnevno aktivni sorodniki. Med letom lahko v mraku prepoznavajo barve in premagujejo rahlo osvetljene ovire. Lahko se tudi orientirajo na podlagi naučenih razpoznavnih znakov okolice, ozvezdja ali pa na podlagi vzorca polarizirane svetlobe, ki jo tvorita luna ali Mlečna cesta. Nočni nevretenčarji so torej razvili oči, s katerimi lahko pridobijo dovolj podatkov, da preživijo v temačnem svetu in se uspešno razmnožujejo (Warrant in Nilsson, 2006).

Veliko nočnih in globokomorskih živali ima refrakcijsko superpozicijsko oko, s katerim pridobijo visoko svetlobno občutljivost.

Sončna svetloba, ki je glavni izvor svetlobe na Zemlji, čez dan osvetljuje neposredno, ponoči pa posredno, kot odsev od Lune in tako sta si spektra sončne svetlobe in mesečine podobna. Toda intenziteta mesečine je približno milijonkrat manjša in razsvetljenost Zemlje na noč brez mesečine je še 100 krat šibkejša (Lythgoe, 1979).

Največji izziv, s katerim se sreča žival v šibki svetlobi, da še lahko zadovoljivo loči objekte med seboj, je sprejem zadostne količine fotonov (Laughlin, 1990). Vid v šibki svetlobi je namreč nezanesljiv zaradi t.i. "vidnega šuma", ki slabša kakovost vidnih signalov. Čim manj fotonov absorbira fotoreceptor v danem času, tem večji je šum v primerjavi s signalom. In obratno, čim več fotonov absorbira v enakem času, tem večji je signal v primerjavi s šumom in s tem so višje prostorska, časovna in barvna ločljivost vida. Verodostojnost optičnega signala je torej lahko izboljšana z očmi, ki so visoko občutljive na svetlobo.

Značilnost oči, prilagojenih na temo, so velike zenice in veliki fotoreceptorji. Veliko nevretenčarjev s kamričastimi očmi ima zelo velike oči in zenice. Posteriorno mediane oči nočnega pajka *Deinopis subrufus* imajo leče, katere premer je lahko 1,4 mm in veljajo za največje leče kopenskih členonožcev (Blest in Land, 1977). Globokomorski velelignji imajo brez dvoma največje in najbolj občutljive oči v živalskem kraljestvu. Premer očesa velelignja *Architeuthis dux*, ujetega konec devetnajstega stoletja na Irskem, naj bi meril 37 cm (Land, 1981). V tako velikem očesu je lahko zenica širša od 10 cm.

Široke zenice lahko najdemo tudi pri nevretenčarjih s sestavljenimi očmi, vendar ne pri členonožcih z apozicijskimi očmi. Pri apozicijskih očeh je vsak omatidij ločen od sosednjih omatidijev s slojem zaščitnih pigmentov, ki absorbirajo svetlobo in tako rabdom doseže svetlobo, ki pride le iz kornealne leče enega omatidija. Pri večini apozicijskih oči je kornealna leča majhna, le nekaj deset mikrometrov velika. Posledično majhne zenice apozicijskih oči praviloma omejujejo življenje žuželk in rakov na svetle habitate (Warrant, 2008).

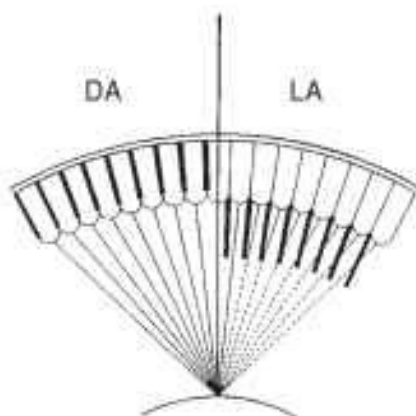
Nasprotno pa velja, da imajo visoko občutljivost superpozicijske oči, ki so značilne za nočne žuželke in globokomorske rake. Bistri pas ter posebno oblikovani kristalni stožci omogočajo, da se svetlobo iz več omatidijev fokusira na en sam fotoreceptor. Te optične modifikacije omogočajo, da svetlobo za en sam fotoreceptor zbira kar do 2000 kornealnih leč, kar predstavlja prav tolikokrat veliko večjo zenico od zenice iz ene same fasete pri apozicijskem očesu (Warrant, 2008).

2.2.8 Adaptacija

Razlika v jakosti svetlobe na sončen dan ter na noč brez Lune znaša nekaj 10 magnitud. Na površini Zemlje idealna bela površina na sončen dan odbija 4×10^{20} fotonov $\text{m}^{-2} \text{sr}^{-1} \text{s}^{-1}$, v noči brez Lune okoli 10^{10} fotonov $\text{m}^{-2} \text{sr}^{-1} \text{s}^{-1}$ ter 10^{14} fotonov $\text{m}^{-2} \text{sr}^{-1} \text{s}^{-1}$ v noči obsijani z Luno. Odgovor tipičnih fotoreceptorskih celic pa se popolnoma nasiči s povečanjem jakosti svetlobe za okoli 4 magnitudo nad pragom zaznave (Land in Chittka, 2013).

Večina superpozicijskih oči je visoko občutljivih, zato morajo podnevi zaščititi svoj vidni pigment z adaptacijskimi mehanizmi, ki lahko zmanjšajo svetlobo slike za nekaj

velikostnih razredov. Nekateri členonožci v temi razširijo svoje rabdome in/ali skrajšajo fokalne dolžine (Leggett in Stavenga, 1981; Williams, 1982, 1983; Nilsson 1989), pri žuželkah z refrakcijskimi superpozicijskimi očmi pa pride do migracije zaščitnih pigmentov tako v primarnih kot v sekundarnih pigmentnih celicah, s čimer ponoči razširijo receptivno polje fotoreceptorjev, podnevi pa ga zožijo in s tem zmanjšajo količino svetlobe, ki doseže mrežnico. V temi so granule nagnetene med kristalnimi stožci, ko pa nastopi svetloba, pride do migracije granul navznoter, s čimer zasedejo večino bistrega pasu (Warrant, 2008).



Slika 6: Temno in svetlo adaptirano superpozicijsko oko. Najpogostejši način adaptacije na temo je migracija temnih pigmentnih granul v notranjost očesa, v bistri pas. Vir: Warrant E., Nilsson D-E. 2006.

Adaptacija v mrežnici poteka na dveh nivojih:

- 1) uravnava se količina svetlobe, ki doseže receptorje

Količina svetlobe, ki doseže rabdome, je uravnana s potovanjem pigmentnih zrn v zaščitnih celicah, včasih tudi v povezavi z anatomskimi spremembami v omatidiju. Potovanje pigmentnih zrn najlepše vidimo pri superpozicijskih očeh. Pri temno adaptiranih očeh pigmentne granule potujejo proti distalnemu delu mrežnice v distalne dele pigmentnih celic. Zato lahko svetloba v bistrem pasu potuje med omatidiji. Pri visokih jakostih svetlobe se pigmentne granule premaknejo proksimalno in svetloba potuje do rabdoma le po ozkem pasu preko bistrega pasu in apertura omatidija postane zelo majhna. Oko v tem primeru lahko deluje kot apozicijsko oko, saj v skrajno svetlo adaptiranem očesu omatidiji delujejo kot samostojne enote. (Land in Chittka, 2013).

- 2) Spremeni se lahko občutljivost fotoreceptorjev.

Pri apozicijskih očeh lahko sledimo strukturnim spremembam fotoreceptorskih celic. Fotoreceptorji vsebujejo zrnca zaščitnih pigmentov, ki uravnavajo količino svetlobe, ki jo absorbira rodopsin, in tako delujejo kot pupila. V svetlo adaptiranih

celicah so pigmentne granule blizu nastavkov mikrovilov in tako absorbirajo energijo modulusov, ki potujejo zunaj rabdoma. V temno adaptiranih celicah se ta zrnca lateralno umaknejo stran od rabdoma. Poleg tega se v endoplazemskem retikulumu razvijejo veliki vezikli, ki okoli rabdoma tvorijo prazen prostor, t.i. palisade, in ga ločijo od zrnca zaščitnega pigmenta (Land in Chittka, 2013).

Spremembe nastajajo tudi na sinapsah med receptorskimi celicami in internevroni v lamini, kar vpliva na signal, ki vstopa v centralni živčni sistem. Tam poteka adaptacija v smislu sprememb povezav v živčni mreži.

2.2.9 Spektralna občutljivost

Najvišja občutljivost žuželčjih fotoreceptorskih celic (λ_{\max}) se nahaja v območju med 300 nm in 640 nm λ_{\max} in je odvisna od zaporedja aminokislin opsinske beljakovine. Specifične aminokislinske zamenjave, ki vplivajo na kromoforo, povzročijo spektralno uglaševanje. Ostali faktorji, ki vplivajo na spektralno uglaševanje in obliko občutljivostne krivulje, so kromofor (retinal ali 3-hidroksi retinal), zaščitni pigmenti, tapetum, vzajemno senčenje med različnimi tipi fotoreceptorskih celic, ki sestavljajo rabdome ter mehanizmi geometrijske in valovne optike, ki vplivajo na spekter svetlobe, ki doseže opsinsko molekulo.

Fotoreceptorji predniških pterigotnih žuželk so bili najverjetneje del prvotnega trikromatskega sistema, občutljivi na UV, modro in zeleno svetlobo. Ta nabor je ohranjen pri velikem številu sedanjih žuželk (Land in Chittka, 2013).

2.2.10 Barvni vid žuželk

2.2.10.1 Rodopsin

Vidni pigment, rodopsin, je sestavljen iz neproteinskega dela, svetlobno občutljive kromofore, in beljakovine opsina. Opsini spadajo v družino z G-proteinom sklopljenih receptorjev in vsebujejo 7 transmembranskih (TM) domen. Kromofora se nahaja med dvema vijačnima TM domenama. Tu specifične aminokislinske skupine vplivajo na elektrone v dvojnih vezeh kromofore in povzročijo premik občutljivosti kromofore, ki je sama po sebi občutljiva na UV svetlobo (300 – 400 nm), na daljše valovne dolžine. Zaporedje aminokislin v opsinski molekuli in kromofora vplivata na absorpcijski maksimum (λ_{\max}) vidnega pigmenta. Absorbanca rodopsina in spektralna občutljivost fotoreceptorske celice, ki ga vsebuje, se načeloma ujemata, vendar na spektralno občutljivost vplivajo senčenje in drugi, prej navedeni mehanizmi (Briscoe in Chittka, 2001).

2.2.10.2 Kromofora

Znotraj rodopsina je pri vretenčarjih vezan kromofor 11-*cis* retinal, pri dvokrilcih in nekaterih drugih žuželkah pa kromofor 11-*cis*-3-*hidroksi* retinal. Kromofor absorbira foton in sprva pride do spremembe rodopsina v metarodopsin, nazadnje pa do depolarizacije mikrovilarne membrane (Land in Chittka, 2013).

Absorpcijski spekter dolgovalovnih ($\lambda_{\max} > \sim 420$ nm) vidnih pigmentov ima dva vrha, večji α vrh v dolgovalovnem in manjši ($\sim 25\%$ amplitude α vrha) β vrh v UV dela spektra, ki nastane zaradi *cis* dela kromofore. Ko se λ_{\max} premika proti modremu delu spektra, β vrh postopoma izgine pod večji α vrh (Briscoe in Chittka, 2001). Večina žuželk uporablja enega ali maksimalno dva tipa kromofor, 11-*cis* retinal (A1) ali (3R) in (3S)-enantiomere 11-*cis* 3-*hidroksiretinala* (A3) (Seki in Vogt, 1998). Z eno ali dvema kromoforoma ter z različnimi kombinacijami opsinov, lahko žuželke tvorijo do šest spektralnih razredov fotoreceptorjev in več razredov omatidijev, ki jih tvorijo različne kombinacije fotoreceptorskih celic, občutljivih na različne valovne dolžine (Kitamoto in sod., 1998). Seki in Vogt sta leta 1998 predlagala, da imajo žuželke različne kromofore zaradi biosintetskih prekurzorjev A1 in A3. To sta karoten in ksantofil, pridobljena iz rastlin. Ksantofili (prekurzorji A3) nastanejo iz karotena (prekurzor za A1) ob prisotnosti molekularnega kisika.

2.2.10.3 Opsin

Pri vseh živalih je vid odvisen od družine proteinov, t. i. opsinov, ki vsi izvirajo iz skupnega prednika. Opsini spadajo v družino z G-proteinom sklopljenih receptorjev (GPCR) in vsi imajo podobno strukturo s sedmimi transmembranskimi domenami. Od drugih GPCR se razlikujejo na podlagi lizinskega ostanka, ki je vezavno mesto za retinal (Terakita, 2005).

2.2.10.4 Spektralna občutljivost

Spektralno občutljivost fotoreceptorskih celic določa tudi prostorska ureditev vidnih in zaščitnih pigmentov, kromofor ter fotoreceptorskih celic v očesu žuželk. Vidni pigmenti ter zaščitni pigmenti lahko z vzajemnim delovanjem določijo spektralno občutljivost fotoreceptorske celice (Briscoe in Chittka, 2001).

Večina do sedaj raziskanih žuželk ima zeleno občutljive fotoreceptorje z maksimalno občutljivostjo pri ~ 530 nm. Pri večini vrst so našli tudi UV občutljive receptorje, $\lambda_{\max} = \sim 350$ nm (Briscoe in Chittka, 2001). Rdeči receptorji, $\lambda_{\max} = \sim 565$ nm naj bi se razvili večkrat neodvisno pri kačjih pastirjih, kožekrilcih, metuljih in hroščih (Gleadall in sod.,

1989; Seki in Vogt, 1998). Devonski predniki žuželk so najverjetneje imeli UV, modre in zelene receptorje. Večina vrst iz reda metuljev imajo UV, modre in zelene receptorje, prisotni so lahko tudi rdeči receptorji (Arikawa in Stavenga, 1997). Ti so se verjetno razvili neodvisno vsaj štirikrat (Briscoe in Chittka, 2001).

Barvni receptorji v mrežnici večine žuželk niso enakomerno razporejeni. Vzorec vidnih pigmentov preko oči velikokrat sovпада z vidno ekologijo. Vzemimo za primer metulja *Lycaena heteronea* and *Lycaena rubidus*. Obe vrsti imata 4 tipe fotoreceptorjev, $\lambda_{\max} = 360, 437, 500$ in 568 nm, toda njihova razporeditev v retini se razlikuje. *L. heteronea* ima modra krila in na ventralni strani očesa prevladujejo modri receptorji. Pri *L. rubidus* krila odbijajo UV in rdečo svetlobo in pri tej vrsti na ventralni strani ni modrih receptorjev (Bernard in Remington, 1991).

Žuželčji fotoreceptorji posredujejo podatke v optične lobule po več vzporednih poteh: elementarnim detektorjem gibanja, središčem za barvni vid in središčem za polarizacijski vid. Osnovna struktura optičnih lobulov višjih rakov in žuželk je izredno podobna in je bila najverjetneje prisotna pri skupnem predniku (Osorio in Bacon, 1994). Vidna informacija poteka od receptorjev do treh zaporednih ganglijev, lamina, medula in lobula. Od 8 ali 9 fotoreceptorjev v omatidiju, jih 6 ali 7 konča v lamini (kratka vidna vlakna), 1-3 potekajo do lobule (dolga vidna vlakna) (Osorio in sod., 1995). Pri muhah (Hardie, 1986; Kaiser in Liske, 1974), kobilicah (Osorio, 1986) in čebelah (Lehrer, 1998), kratka vidna vlakna z dolgo valovno občutljivostjo (na zeleno) pripomorejo k zaznavanju gibanja. Pri muhah je barvni vid posredovan v celoti z dolgimi vidnimi vlakni z občutljivostjo na UV, modro in zeleno svetlobo (Fukushi, 1994; Troje, 1993), torej sta pot za barvni vid in pot za zaznavanje gibanja med seboj ločeni celo na receptorskem nivoju. Pri drugih žuželkah, npr. pri čebelah, dolgo valovni receptorji služijo tako barvnemu vidu kot zaznavanju gibanja. Tu dolga in kratka vidna vlakna prispevajo k barvnemu vidu (Briscoe in Chittka, 2001).

2.3 FOTOTRANSDUKCIJA

2.3.1 Biokemijski mehanizem

Fototransdukcija je proces, pri katerem absorpcija fotona povzroči električni odziv na membrani fotoreceptorske celice. Sedem transmembranskih regij vidnega pigmenta prehaja preko membrane mikrovilov, ki tvorijo rabdomero. Na rabdomeri *Drosophila* se na 40 000 mikrovilih nahaja med 500 in 2000 molekul rodopsina.

Kromofor 11-*cis* retinal se po absorpciji fotona ustrezne valovne dolžine spremeni v all-*trans* retinal, ki sproži konformacijsko spremembo rodopsina (R) v metarodopsin (M), ta pa aktivira heterotrimerni G-protein. Metarodopsin lahko aktivira 5-10 molekul G-proteinov, dokler ga ne inaktivira arestin (Land in Chittka, 2013).

Žuželčji metarodopsin je občutljiv na svetlobo, njegova absorbanca pa se razlikuje od absorbance rodopsina, iz katerega je nastal. Rodopsini z $\lambda_{max} < 500$ nm tvorijo metarodopsine z $\lambda_{max} > 500$ nm, rodopsini z $\lambda_{max} > 500$ (vključno s poglavitnim, zeleno občutljivim žuželčjim rodopsinom) pa metarodopsine z $\lambda_{max} < 500$ nm (Stavenga, 1993).

Aktiviran metarodopsin povzroči disociacijo podenote α iz G-proteina, ki se odcepi od $\beta\gamma$ dimera in se veže na fosfoinozimid-specifično fosfolipazo C (PLC β). Pri nevretenčarjih efektorski encim PLC β cepi membranski fosfolipid fosfatidil inositol 4,5-bifosfat (PIP $_2$) na topni inositol 1,4,5-trifosfat (InsP $_3$) in membransko vezani diacilglicerol (DAG) (Berridge, 1993). Temu sledi odprtje ionskih kanalov TRP ("transient receptor potential") in TRPL ("transient receptor potential-like") (Hardie, 2001). Trenutne raziskave kažejo, da sta izpraznjenje membrane mikrovila, in posledično povišana napetost v membrani najpomembnejša dejavnika, ki vodita k odprtju kationskih kanalov (Hardie in Franze, 2012).

Ca $^{2+}$, ki vstopi v mikrovile skozi kanale TRP in TRPL, ima dva nasprotna si učinka na električni odgovor. Sprva hitro senzibilizira ostale kanale v mikrovilu, ki se posledično odprejo in s tem ojačajo odgovor. Zaradi večjega pritoka Ca $^{2+}$ pride do inaktivacije kanalov v mikrovilu in do refraktarne periode, ki traja okoli 100 ms. Pri absorpciji enega fotona se končen učinek teh dveh procesov kaže kot t.i. kvantni sunek. Kvantni sunek je hitra električna depolarizacija velika 1-2 mV, s tokom okoli 10 pA in trajanjem okoli 30 ms. Odgovor na večje število fotonov se sešteje preko receptorja in sproži odgovor velik do 70 mV (Song in sod., 2012).

2.3.2 Kvantni sunki

Odgovor fotoreceptorjev na en sam foton nastane v mikrovilarnih fotoreceptorjih z odprtjem kanalov, v paličicah in čepkih vretenčarjev pa z zaprtjem kanalov. V paličicah vretenčarjev je v temi odprtih približno 10 000 kanalov in za zadosten odgovor (1pA) je potrebno zaprtje več sto kanalov. Pri nevretenčarjih pa so kanali med mirovanjem zaprti in odprtje le enega kanala lahko zadostuje za zadosten odgovor. Povprečen kvantni sunek velikosti 10pA pri *Drosophili melanogaster* predstavlja sočasno aktivacijo 15 kanalov (Henderson in sod. 2000.), ki se najverjetneje nahajajo na istem mikrovilu. Paličice vretenčarjev dosežejo saturacijo pri okoli 500 fotonih na sekundo (500 fotonov s $^{-1}$), mušji fotoreceptorji pa se odzivajo tudi na najbolj svetle pogoje, kar je ekvivalentno 10 6 fotonov na sekundo na fotoreceptor (10 6 fotonov s $^{-1}$ fotoreceptor $^{-1}$) (Hardie, 2001). Število aktiviranih kanalov, ki sodelujejo pri nastanku kvantnega sunka, je vrstno specifično, od nekaj 10 pri *Drosophili* in do nekaj tisoč pri ventralnih fotoreceptorjih *Limulus* (Katz in Minke, 2009). Amplituda kvantnih sunkov je dinamično uravnavana, s svetlobno adaptacijo progresivno pada. Fotoreceptorska membrana kvantne sunke elektrotonično integrira v receptorski potencial.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POSKUSNE ŽIVALI

Naše poskusne živali so bili odrasli osebki koruznih vešč. Podatke smo izmerili iz 13 osebkov vrste *Ostrinia nubilalis* (8 samic in 5 samcev), 4 osebkov vrste *Ostrinia furnacalis* (2 samici, 2 samca) in iz 4 osebkov vrste *Ostrinia scapularis* (2 samici, 2 samca). Osem živali *O. nubilalis* smo dobili iz laboratorijske kulture dr. Magde Rak Cizej na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu. Štiri živali *O. nubilalis* so bile ujete z lovilno mrežo v Sinji Gorici na koruznem polju. Živali smo imeli v posodi z rastlinami, katere smo vsak dan poškropili z vodo. Osebkve vrste *O. furnacalis* in *O. scapularis* smo dobili iz laboratorijske kulture prof. Yukia Ishikawe iz Univerze v Tokiu.

3.2 MIKROSKOPIJA

Vidni sistem treh vrst koruznih vešč smo preučili z uporabo svetlobne in elektronske preseвне mikroskopije.

3.2.1 Svetlobna mikroskopija

3.2.1.1 Priprava preparatov

Samico evropske koruzne vešče (*O. nubilalis*) smo sprva dekapitali, nato pa z britvico ter s škarjami izrezali očesi. Ker smo oči izolirali pri dnevni svetlobi, je žival svetlo adaptirana.

Izolirane oči smo nato fiksirali z raztopino 3,5 % glutaldehida, 4 % formaldehida v 0,1 M Na-kakodilatnem pufu, s pH umerjenim na 7,2. Po 1,5 h je sledilo spiranje: 6 x 10' z 0,1 M Na-kakodilatnem pufrom ter 3 x 10' z destilirano vodo. Sledila je dehidracija v naraščajoči alkoholni vrsti: 10' v 50 % etanolu, 10' v 70 % etanolu (naše preparate smo čez noč pustili v 70 % etanolu ter nadaljevali z dehidracijo čez en teden), 10' v 80 %, 10' v 90% etanolu ter 10' v 100 % etanolu. Dehidracijo smo nadaljevali z naraščajočo vrsto alkohola in propilenoksida: 15' v EtOH:propilenoksid 3:1, 15' v EtOH:propilenoksid 1:1, EtOH:propilenoksid 1:3 ter 2 x 15' v propilenoksidu. Sledilo je vklapljanje v umetno epoksi smolo Spurr: 1 h v raztopini propilenoksid:Spurr 3:1, 1 h v propilenoksid:Spurr 1:1, v propilenoksid:Spurr 1:3 pa smo preparate pustili čez noč. Naslednjo jutro smo preparate dali v čisti Spurr. Po 24 urah smo vzorčke oči položili v plastične modelčke. Modelčke s preparati smo zalili s smolo Spurr, pri čemer smo pazili, da v modelčkih niso bili prisotni mehurčki. Ko so bili modelčki do polovice napolnjeni s smolo, smo očesa ustrezno orientirali ter nato dolili s smolo, da je bila gladina smole izbočena. Modelčke smo položili v sušilnik, kjer je polimerizacija potekala 12 ur pri temperaturi 60 °C.

Mešanico smole Spurr smo pripravili po sledečem postopku: 13 g NSA (nonenil sukcinil anhidrid), 5 g ERL (vinil ciklohesen dioksid), 3 g DER (diglicidilni eter polipropilenskega glikola). Ko smo te tri komponente dobro premešali, smo dodali 0,2 g DMAE (dimetil aminoetanol).

3.2.1.2 Priprava rezin za svetlobno mikroskopijo

Vzorci z našimi vzorci smo z britvico oblikovali v obliko prirezane piramide, odstranili smo odvečen del smole ter pripravili ustrezno površino za rezanje, ki je imela obliko trapeza. Blokec smo nato prestavili v vpenjalo mikrotoma Leica. S steklenim nožem smo narezali rezine debele 1 μm in jih prestavili na objektna stekla, premazana s polilizinom. Oko je bilo rezano vzdolžno, torej prečno na optično os omatidijev.

Pol tanke rezine smo pobarvali z barvilom Azur II. Objektna stekla z našimi rezinami smo za okoli pol minute prekrili z barvilom in jih položili na vročo termoploščo. Po približno treh minutah smo objektna stekla sprali z destilirano vodo in jih zopet dali na termoploščo. Ko so bili preparati suhi, smo na njih kapnili prosojno umetno smolo ter pokrili s krovnimi stekli.

3.2.1.3 Svetlobno mikroskopiranje

Na Katedri za botaniko Oddelka za biologijo smo posneli slike na mikroskopu Axiscope 2 MOT (Carl Zeiss, Jena, Nemčija). Uporabili smo kamero Axovision 4,8 (Carl Zeiss Vision, Halbermoos, Nemčija). Slike smo zajeli s programom AxioCam MRc (Carl Zeiss Vision, Halbermoos, Nemčija).

3.2.2 Elektronska mikroskopija

3.2.2.1 Priprava preparatov

Vsi postopki preseвне elektronske mikroskopije, od priprave živali, fiksacije, dehidracije, vklapljanja, polimerizacije rezanja ultra tankih rezin ter mikroskopije, so potekali na japonski univerzi Sokendai, pod mentorstvom dr. Kentara Arikawe. S presevnim elektronskim mikroskopom smo pogledali oči *O. nubilalis* (N=2; 1 samec, 1 samica), *O. furnacalis* (N=4; 2 samca, 2 samici) in *O. scapularis* (N=4; 2 samca, 2 samici). Ker smo oči izolirali pri dnevni svetlobi, so bile živali svetlo adaptirane.

Priprava preparatov za elektronsko mikroskopijo je potekala podobno kot za svetlobno mikroskopijo. Izolirane oči smo 2 h fiksirali v 2,5 % paraformaldehidu in 2 % glutaraldehidu v 0,1 M Na-kakodilatnem puftru, s pH umerjenim na 7,2. Po spiranju $3 \times 10'$ z 0,1 M Na-kakodilatnem pufrom je sledilo tretiranje preparatov v 2 % OsO_4 in 0,1 M Na-kakodilatnem puftru. Preparate smo sprali z vodo ($2 \times 5'$ in $2 \times 10'$) in nato dehidrirali v

acetonski vrsti (po 15' v 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % in dvakrat v 100 % acetonu). Ko so bili preparati v 95 % acetonu, smo pripravili smolo Epon. Preparate smo nato za 2 x 15' dali v propilenoksid ter nato v mešanico Epona in propilenoksida 1:1, kjer smo jih ponoči pustili na stresalniku. Naslednji dan smo preparate dali za 2 h v smolo Epon. Po 2 h smo modelčke s preparati zalili s smolo Epon. Ko so bili modelčki do polovice napolnjeni s smolo, smo očesa ustrezno orientirali ter nato dolili s smolo, da je bila gladina smole izbočena. Modelčke smo položili v sušilnik, kjer je polimerizacija potekala 24 ur pri temperaturi 60 °C.

Mešanico smole Epon smo pripravili po sledečem postopku: 10 ml EPON, 8 ml DDSA, 6,5 ml MNA. Po 30 minutah mešanja smo dodali 0,8 ml DMP in mešali še 20 minut.

3.2.2.2 Priprava rezin za elektronsko mikroskopijo

Pod stereomikroskopom smo določili najboljšo orientacijo preparata ter iz preparata odstranili odvečno smolo. Z uporabo diamantnega noža (Histo, Diatome, Švica) smo narezali rezine debeline 1 μm . Na vsakih 10 μm smo vzeli rezine za svetlobno mikroskopijo. Na področju rabdoma smo z diamantnim nožem (Ultra 35, Diatome, Švica) naredili ultra tanke rezine, debeline 50 nm. Rezine smo kontrastirali s 4 % uranil acetatom, ki smo ga sprali z deionizirano vodo in z 0,1 N NaOH. Suhe rezine smo nato za 3-5 minut prestavili na kapljico 0,4 % svinčevega citrata in jih dobro sprali z deionizirano vodo.

3.2.2.3 Presevna elektronska mikroskopija

Preparate smo opazovali na presevnem elektronskem mikroskopu H7650, Hitachi, Tokio. Za zajem podatkov smo uporabili kamero Hitachi in računalniški program iTEM.

3.3 ELEKTROFIZIOLOGIJA

3.3.1 Preparacija živali

Živali smo skupaj s posodo postavili na led in jih tako ohladili, s čimer smo zmanjšali njihovo premikanje. Preparacijo smo opravili pod lupo. Za lažjo preparacijo smo živalim najprej s škarjicami odrezali krila in noge. S spodnjo stranjo navzdol smo žival postavili v nastavek, ki smo ga naredili iz konice za pipete. Žival smo na nastavek pritrdili z mešanico čebeljega voska in kolofonije, s čimer smo prekrili celoten del toraksa ter glavine regije, z izjemo oči ter ocelov. Živali je bilo potrebno dobro pritrditi, da se med poskusom ne bi začele premikati. Živali smo nato na bazi antene napravili zarezo ter vanjo potisnili referenčno elektrodo, Ag/AgCl žico (premer 0,05 mm), drugo anteno pa smo odrezali ali pritrdili ob telo. Za snemanje znotrajceličnih signalov smo v izpostavljeno oko vrezali majhno luknjo v obliki trikotnika, kamor smo kanili majhno količino mineralnega olja, ki

je preprečila izsušitev očesa. Nastavek s tako pripravljeno živaljo smo postavili na goniometer, ki je omogočal premikanje preparata v treh planarnih oseh, x, y in z, ter dveh rotacijskih oseh, nagib naprej in nazaj ter okoli navpičnice. Z goniometrom smo torej lahko postavili oko v optično os fotostimulatorja. Mikromanipulator je bil nameščen na goniometer, kar je omogočalo premikanje živali v oseh tudi med tem, ko smo bili z elektrodo v celici. Žival, goniometer ter mikromanipulator so bili postavljeni v Faradayevo kletko.

3.3.2 Merilne elektrode

Za izdelavo elektrod smo uporabili steklene kapilare iz borosilikatnega stekla z zunanjim premerom 1,5 mm, notranjim premerom 0,7 mm ter s filamentom premera 10 μm . Merilne elektrode smo naredili na aparatu za vlečenje elektrod P-97 (Sutter, Novato, ZDA).

3.3.3 Postavitev poskusa

3.3.3.1 *Ostrinia nubilalis*

Vir svetlobe je predstavljala 150 W ksenonova žarnica XBO (Osram, Nemčija). Svetloba je potekala skozi monokromator (B&M, Nemčija), s katerim smo nastavili svetlobo poljubne valovne dolžine ter pasovno širino 10 nm. Monokromatsko svetlobo smo z zbiralno lečo usmerili skozi reflektivne kvarčne sive filtre (Melles Griot, Didam, Nizozemska) ter skozi motoriziran kvarčni sivi klin (optična gostota 0-4, Thorlabs, ZDA). Sledila je kvarčna objektivna leča, s katero smo svetlobo fokusirali na oko živali. Obliko žarka smo nadzorovali z aperturno in poljsko zaslonko, ki sta se nahajali pred objektivno lečo.

Dodatno 150 W ksenonovo žarnico XBO, monokromator (77250-M, Newport Oriel, Irvine, ZDA), nevtralne filtre in leče iz kvarčnega stekla smo uporabili pri selektivni adaptaciji očesa. S kvarčnimi polprepustnimi zrcali (Melles Griot, Didam, Nizozemska) smo adaptacijsko svetlobo usmerili koaksialno z glavnim dražilnim žarkom.

Za merjenje elektroretinogramov smo uporabili elektrode z upornostjo nekaj k Ω . Elektrode smo napolnili s fiziološko raztopino za žuželke (v mM: NaCl 130, KCl 2, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 10, MgCl₂ 5, pH=7) ter jih postavili v nosilec mikromanipulatorja z Ag/AgCl žico. Z mikromanipulatorjem smo z elektrodo predrli korneo na sredini očesa in namestili konico elektrode tik pod njeno površino. Referenčna elektroda, Ag/AgCl žica, je bila vstavljena v bazo antene. Z goniometrom smo poiskali mesto osvetlitve očesa, kjer je bil signal največji.

Za merjenje ERG iz ocelov smo z mikromanipulatorjem vodili elektrodo skozi kutikulo tik ob ocelu ali pa smo predrli ocel na njegovi bazi. Konico elektrode smo namestili pod korneo ocela. Referenčna elektroda, Ag/AgCl žica, je bila vstavljena v bazo antene. Z goniometrom smo nastavili smer osvetlitve ocela, tako da je bil signal največji.

Znotrajcelične meritve so bile opravljene na sestavljenem očesu evropske koruzne vešče. Za merjenje znotrajceličnih meritev smo uporabili elektrode z upornostjo 50-100 M Ω . Elektrode smo napolnili s 3M KCl in jih postavili v nosilec mikromanipulatorja z Ag/AgCl žico. Referenčna elektroda, Ag/AgCl žica, je bila vstavljena v bazo antene. Iz očesa smo izrezali delček kornee v obliki trikotnika, ter na to mesto kanili malo mineralnega olja, ki je preprečeval izsušitev očesa. Skozi izrezano korneo v očesu (s tem smo preprečili lomljenje elektrode na trdni kornei), smo merilno elektrodo z mikromanipulatorjem vodili preko bistrega pasu (pribl. 230 μm od površine kornee) do mrežnice. Pozicijo elektrode v fotoreceptorski celici smo zaznali s padcem napetosti, prisotnostjo kvantnih sunkov ter z nastankom receptorskih potencialov ob osvetljevanju očesa. Z goniometrom smo poiskali mesto osvetlitve očesa, kjer je bil signal fotoreceptorske celice največji.

Signale smo ojačali z ojačevalcem SEC-10LX (NPI, Tamm, Nemčija). Za digitalizacijo signalov smo uporabili laboratorijski vmesnik Micro 1401 (CED, Cambridge, Vel. Britanija). Signale smo zabeležili s programom WinWCP (John Dempster, Univerza v Strathclydu, Vel. Britanija).

3.3.3.2 *Ostrinia furnacalis* in *Ostrinia scapularis*

Vir monokromatske svetlobe je predstavljala 500 W ksenonova žarnica skupaj z 22 ozkopasovnimi interferenčnimi filtri od 300 do 700 nm. Jakost svetlobnega pulza smo uravnavali z nevtralnimi filtri in optičnim klinom razpona 4 logaritemskih enot. Svetlobo smo fokusirali na konec optičnega vlakna, ki je vodil svetlobo v faradayevo kletko. Drugi konec optičnega vlakna je bil povezan s kardanskim perimetrom, in je predstavljal točkoven vir svetlobe ($1,6^\circ$ v premeru). Kvantni tok vsakega monokromatskega dražljaja je bil umerjen z radiometrom (model 470D; Sanso, Tokio, Japonska). Maksimalni kvantni tok vsakega monokromatskega dražljaja ($5,0 \cdot 10^{11}$ fotonov $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) je bil nastavljen z dodatnim optičnim klinom.

Z elektrodo smo predrli korneo na sredini očesa in namestili konico elektrode tik pod njeno površino. Referenčna elektroda, Ag/AgCl žica, je bila vstavljena v bazo antene. S premikanjem optičnega vlakna smo poiskali mesto osvetlitve očesa, kjer je bil ERG signal največji.

ERG signale smo ojačali z ojačevalcem (MEZ- 7200; Nihon-kohden, Tokio, Japonska) in filtrirali z osciloskopom (VC- 11; Nihon-kohden). Signale smo zabeležili s programom WinWCP (John Dempster, Univerza v Strathclydu, Vel. Britanija).

3.3.4 Eksperimentalni protokoli

3.3.4.1 Občutljivost na intenziteto svetlobe

3.3.4.1.1 *Ostrinia nubilalis*

Za določitev intenzitetne krivulje, smo na monokromatorju nastavili valovno dolžino na tisto, pri kateri je bil odgovor mrežnice ali fotoreceptorja največji: 530 nm pri meritvah iz sestavljenega očesa ter 360 nm pri meritvah iz ocela. Z avtomatiziranim sivim klinom smo spreminjali intenziteto dražljaja, v korakih po 0,5 log, in sicer od atenuirane (- 4 logaritemske enote) do polne svetlobe (0 logaritmskih enot). Posneli smo torej devet meritev. Pulz je pri vsaki intenziteti svetlobe trajal 1 s, premor med pulzi je trajal 5 s.

Izmerili smo amplitude odgovora od mirovnega membranskega potenciala do srednje vrednosti. Vrednostim smo nato računalniško prilagodili parametre Hillove krivulje (n = Hillov koeficient, opisuje naklon krivulje, V_{\max} = maksimalna amplituda odgovora ter I_{50} = jakost dražljaja, ki izzove polovico maksimalnega odgovora). Matić in Laughlin (1981) sta uporabljeno funkcijo, ki opisuje odnos med velikostjo odgovora in logaritmom jakosti svetlobe, formulirala v obliki:

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

3.3.4.1.2 *Ostrinia scapularis* in *O. furnacalis*

Amplitude odgovorov superpozicijskega očesa, na različne intenzitete svetlobe, smo izmerili pri valovni dolžini 560 nm. Z avtomatiziranim sivim klinom smo spreminjali intenziteto dražljaja, v korakih po 0,25 log, in sicer od atenuirane svetlobe (- 5 logaritmskih enot) do polne svetlobe (0 logaritmskih enot). Posneli smo 20 meritev. Pulz je pri vsaki intenziteti svetlobe trajal 1 s, premor med pulzi je trajal 8 s.

3.3.4.2 Spektralna občutljivost očesa

3.3.4.2.1 *Ostrinia nubilalis*

Pri merjenju spektralne občutljivosti, smo uporabili 5 nm korake, od valovne dolžine 260 nm do 760 nm. Količina fotonov oziroma fotonski tok je bil pri vseh valovnih dolžinah enak, kar smo zagotovili z uporabo motoriziranega sivega klina. Dražljaji so bili dolgi 200 ms, premor med njimi je trajal 2 s.

3.3.4.2.2 *Ostrinia scapularis* in *furnacalis*

Pri merjenju spektralne občutljivosti, smo uporabili korake velike 20 nm, od valovne dolžine 300 nm do 740 nm. Količina fotonov oziroma fotonski tok je bil pri vseh valovnih dolžinah enak, kar smo zagotovili z uporabo motoriziranega sivega klina. Dražljaji so bili dolgi 200 ms, premor med njimi je trajal 5 s.

3.3.4.3 Svetlobna adaptacija

3.3.4.3.1 *Ostrinia nubilalis*

Glavni dražilni žarek smo nastavljali po enakem protokolu, kot pri meritvi spektralne občutljivosti očesa. Dražljaji so bili dolgi 200 ms, premor med njimi je trajal 2-5 s. Med merjenjem spektralne občutljivosti smo z drugo 150 W ksenonsko lučjo, neprekinjeno svetili s svetlobo različnih valovnih dolžin, od 380 nm do 620 nm, v korakih po 20 nm. Tako smo posneli spektre z adaptacijo na svetlobo različnih valovnih dolžin.

3.3.4.3.2 *Ostrinia scapularis* in *furnacalis*

Glavni dražilni žarek smo nastavljali po enakem protokolu, kot pri meritvi spektralne občutljivosti očesa. Dražljaji so bili dolgi 200 ms, premor med njimi je trajal 2-5 s. Med merjenjem spektralne občutljivosti smo z ročno LED svetilko ter zelenim ozkopasovnim filtrom (535 nm, 20 nm širine; Asahi spectra, Tokio, Japonska) neprekinjeno svetili v oko. Tako smo posneli spekter z adaptacijo na zeleno svetlobo.

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).

3.3.4.4 Zaznavanje polarizirane svetlobe

Polarizacijsko občutljivost smo ugotavljali pri isti valovni dolžini kot za intenzitetno krivuljo. Linearni polarizacijski filter OUV2500 (Knight optical, Velika Britanija) smo vrteli okoli osi s korakom 11,25°. Pri celicah, ki so bile občutljive na smer polarizacije svetlobe smo polarizacijsko občutljivost merili pri različnih valovnih dolžinah.

3.4 SPEKTROFOTOMETRIJA

Spektrofotometrijske meritve smo izvedli na Univerzi v Groningenu, na Fakulteti za matematiko in naravoslovje, pod mentorstvom prof. dr. Doekeleja G. Stavenga.

Absorbanco pigmentnih granul smo izmerili iz nepobarvanih pol tankih rezin z mikrospektrofotometrom, ki sestoji iz ksenonove žarnice, mikroskopa Leitz Ortholux, kvarčnega optičnega vlakna ter iz spektrometra (SD2000, Avantes, Eerbeek, Nizozemska). Signale smo zabeležili s programom AvaSoft 7.6.1 USB2. Absorbanco primarnih pigmentnih granul smo izmerili na področju okoli kristalnih stožcev, absorbanco sekundarnih pigmentnih granul pa na področju bistrega pasu.

Absorbanco primarnih pigmentnih granul smo izmeri 75 krat, absorbanco sekundarnih pigmentnih granul pa 151 krat.

3.5 REFLEKSIJA OČESA

Živali smo pripravili na podoben način kot za elektrofiziološke meritve. Žival v nosilcu smo postavili pod objektiv epifluorescentnega mikroskopa, narejenega iz delov Linos Photonics. Mikroskop je bil sestavljen glede na mikroskop, ki ga je opisal Stavenga (2002) in so ga uporabili Belušič in sod. (2013). Skozi objektiv (Leitz L32, NA 0,6) smo svetili z belo svetlobo (ročna bela LED svetilka, Cree warm white). Geometrijo svetlobnega žarka smo nastavili z aperturno in poljsko zaslonko na tak način, da smo oblikovali svetlobni žarek širine 2-3 faset. Svetlobo, ki se je odbila iz tapetuma, smo slikali z barvno kamero (Olympus, DP72). Slike refleksije očesa smo posneli iz temno adaptiranih oči.

3.6 OBDELAVA REZULTATOV

Signale smo zabeležili s programom WinWCP (John Dempster, Univerza v Strathclydu, Vel. Britanija). Izmerili smo amplitude odgovorov in podatke prenesli v Microsoft Excel (Microsoft, ZDA), kjer smo izračunali relativno občutljivost. Podatke smo nato prenesli v GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, ZDA). Prikaz znotrajceličnega posnetka pri različnih intenzitetah svetlobe smo obdelali s programom CorelDraw (Corel Corporation, Ottawa, Canada).

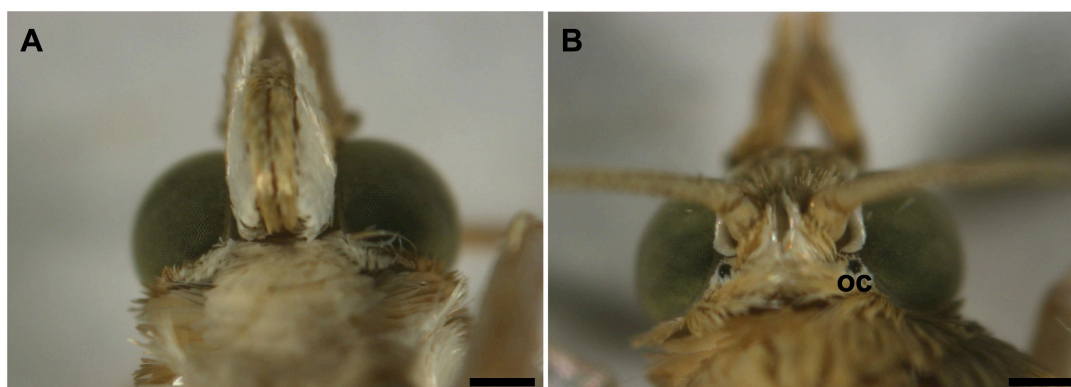
Receptorskim potencialom pri različnih intenzitetah svetlobe smo s programom GraphPad Prism 6.0 prilagodili parametre Hilllove krivulje: V_{\max} (maksimalen odgovor), I_{50} (polovična vrednost) ter n (naklon krivulje). Večji kot je naklon krivulje, manjše je območje delovanja očesa ali receptorja ter večja je polovična vrednost, manjša je občutljivost očesa ali fotoreceptorja.

Razlike med ERG amplitudami *O. nubilalis*, *O. furnacalis* in *O. scapularis* smo analizirali s Studentovim t-testom v programu GraphPad QuickCalcs.

4 REZULTATI

4.1 ZUNANJA MORFOLOGIJA VIDNEGA SISTEMA

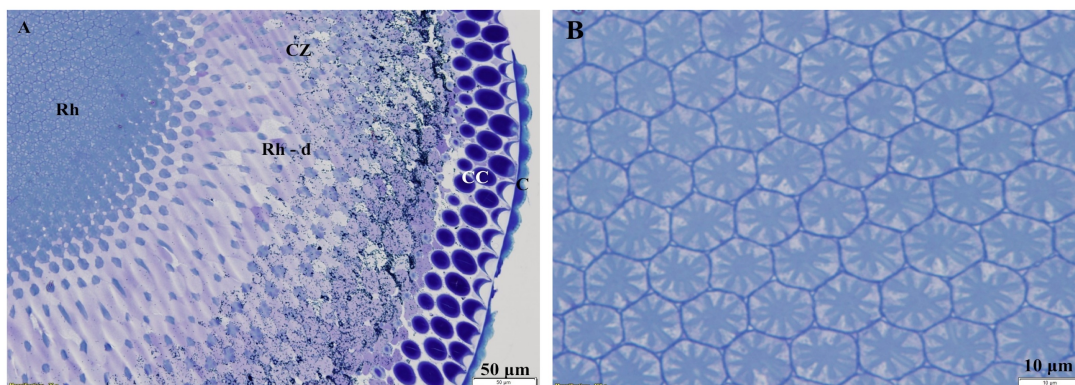
Koruzna vešča ima par sestavljenih oči ter par ocelov. Sestavljeno oko koruzne vešče je izbočeno, okrogle oblike, zeleno-rjave barve in v premeru meri okoli 1 mm. Sestavljeno je iz približno 2000 enako velikih faset, premer posamezne fasete meri $\sim 20 \mu\text{m}$. Ocela se nahajata na dorzalni strani glave med sestavljenima očesoma ter za antenama.



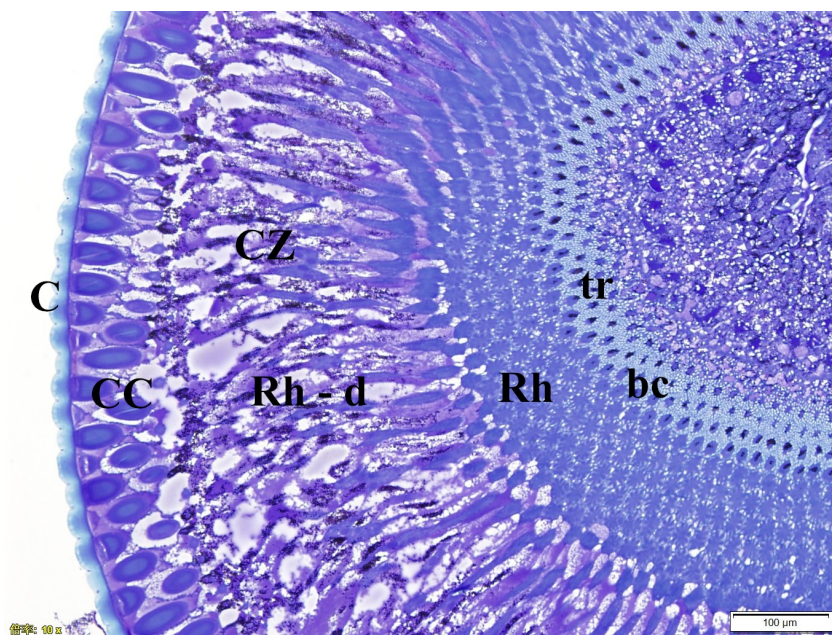
Slika 7: Zunanji izgled vidnega sistema koruzne vešče. A – Ventralni, B – dorzalni pogled na glavo azijske koruzne vešče, *Ostrinia scapularis*. Vidne so sestavljene oči in dorzalno par ocelov. Merilce: 0,5 mm.

4.2 SVETLOBNA MIKROSKOPIJA

1 μm debele rezine fiksiranih in v smolo Spurr (*O. nubilalis*) ali Epon (*O. scapularis* in *O. furnacalis*) vklopljenih oči, smo pobarvali z barvilom Azur II. Sestavljeno oko koruzne vešče je sestavljeno distalno iz dioptričnega aparata, ki ga tvorijo kornealne leče ter kristalni stožci, bistrega pasu, ter proksimalno iz svetločutnega, fotoreceptivnega dela omatidija, ki ga tvorijo rabdomi. Bistri pas je obsežen in meri okoli 200 μm . Interomatidijski kot $\Delta\phi$ meri $2,3^\circ$. Interomatidijski kot smo grafično ovrednotili iz svetlobne mikroskopske slike prečnega prereza mrežnice. Rezine za svetlobno mikroskopijo so bile narejene na svetlo adaptiranih živalih, zato je pod kristalnimi stožci veliko število pigmentnih granul. Prečni prerezi v ravni rabdoma kažejo na zapleteno strukturo, ki bi jo utegnilo tvoriti veliko število (9-12) fotoreceptorskih celic na omatidij. Med svetlobnimi rezinami vrst *O. nubilalis*, *O. furnacalis* in *O. scapularis* nismo opazili razlik.



Slika 8: Prečni prerez svetlo adaptiranega sestavljenega očesa *O. scapularis*. 1µm debele, obarvane rezine z barvilom Azur II, vklopljene v smolo Epon. A - Prečni prerez, polovica očesa. Distalno vidimo dioptrični aparat, ki ga tvorita kornea (*cornea*, C), kristalni stožec (*crystalline cone*, CC). V sredi rezine je obsežen bistri pas (*clear zone*, CZ), ki vsebuje tudi drobne distalne rabdome (*rhabdom – distal*, Rh – d). Proksimalno je svetločutni del omatidijev, rhabdom (*rhabdom*, R). B – Prečni prerez proksimalnih rabdomov kaže kompleksno obliko cveta.



Slika 9: Prečni prerez svetlo adaptiranega sestavljenega očesa *O. nubilalis*. 1µm debele, obarvane rezine z barvilom Azur II, vklopljene v smolo Spurr. Distalno vidimo dioptrični aparat, ki ga tvorita kornea (*cornea*, C) in kristalni stožec (*crystalline cone*, CC). Primarne pigmentne celice s pigmentnimi zrnji obdajajo kristalne stožce. V bistrem pasu (*clear zone*, CZ), ki vsebuje tudi drobne distalne rabdome (*rhabdom – distal*, Rh – d), vidimo sekundarne pigmentne celice s svojimi pigmentnimi zrnji. Proksimalno pod rabdomi (*rhabdom*, Rh), ki jih zaključujejo pigmentirane bazalne celice (*basal cell*, bc), vidimo traheole (*tracheole*, tr), ki tvorijo *tapetum lucidum*.

4.3 ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Preparati oči *O. nubilalis*, ki so bili vklopljeni v epoksi smolo Spurr, so bili slabo fiksirani ter slabo polimerizirani, zaradi nezadostnega mešanja smole ob vklapljanju. Kljub temu lahko na podlagi vidnih dezmosomov med fotoreceptorskimi celicami (Slika 14) ugotovimo, da je ultrastruktura mrežnice *O. nubilalis* zelo podobna ultrastrukturi *O. furnacalis* in *O. scapularis*.

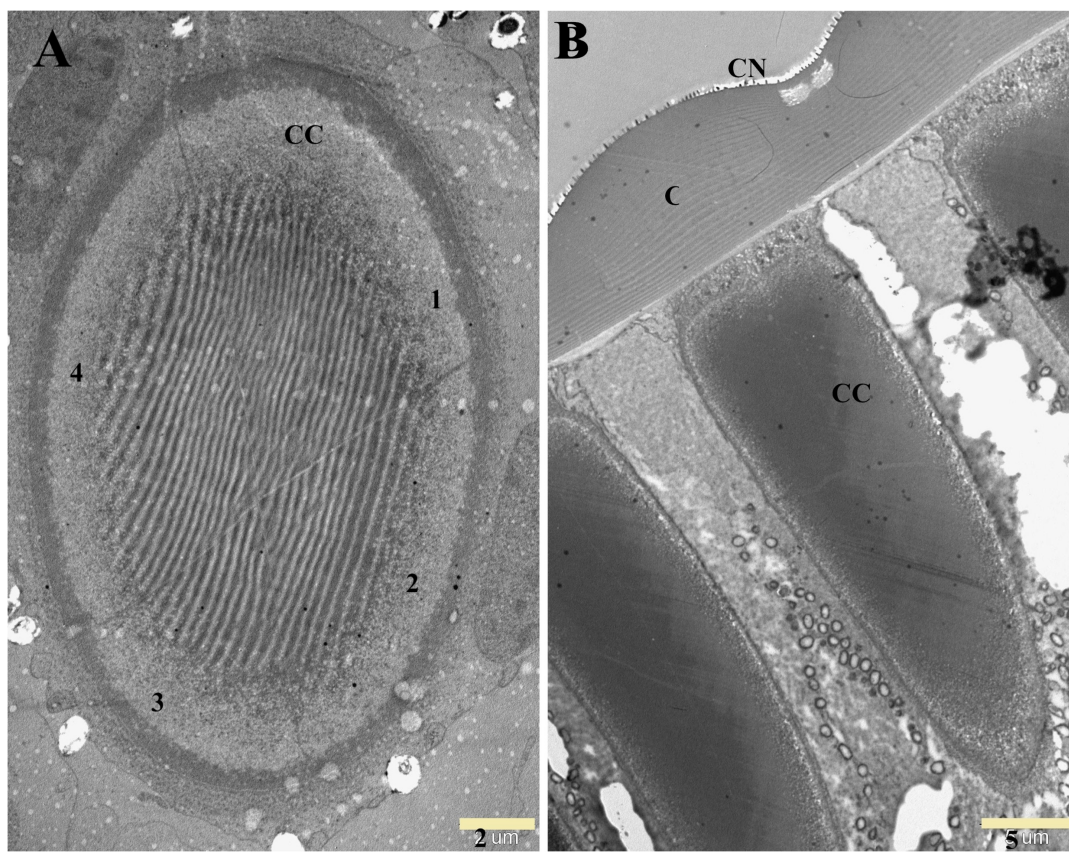
Kornealna leča vseh treh vrst koruznih vešč je planokonveksne oblike in zunanji sloj je pokrit z izrastki epikutikule, t. i. tuberkuli (*corneal nipples*) (slika 10B). Kornea je debela okoli 8 μm . Kristalni stožec ima obliko topovskega izstrelka in je sestavljen iz štirih celic (slika 10B). Ultra tanke rezine kristalnih stožcev so pokazale gradient v gostoti kristalnega stožca, značilen za superpozicijske oči (slika 10A).

Na elektronskih mikrografijah je jasno razvidno, da so temni vključki v bistrem pasu (Slika 8A) dejansko distalni deli rabdoma. Rabdom je tako v direktnem stiku s kristalnimi stožci. Distalni rabdom (slika 11) je manjšega premera od širšega proksimalnega rabdoma (slika 12B). Premer distalnega rabdoma je okoli 2 do 3 μm , proksimalnega rabdoma pa okoli 8 μm . Proksimalni rabdom obdajajo traheole, ki tvorijo tapetum. Retinula celice v distalnem rabdomu vsebujejo pigmentne granule, v proksimalnem delu očesa pa jih ne zasledimo. Tako v distalnem kot v proksimalnem delu rabdoma, fuzionirani rabdom tvori 9 do 12 retinula celic. Distalni rabdom je bolj ali manj cilindrične oblike, med tem ko ima proksimalni rabdom v prečnem prerezu obliko cveta z 10-12 venčnimi listi (slika 12B).

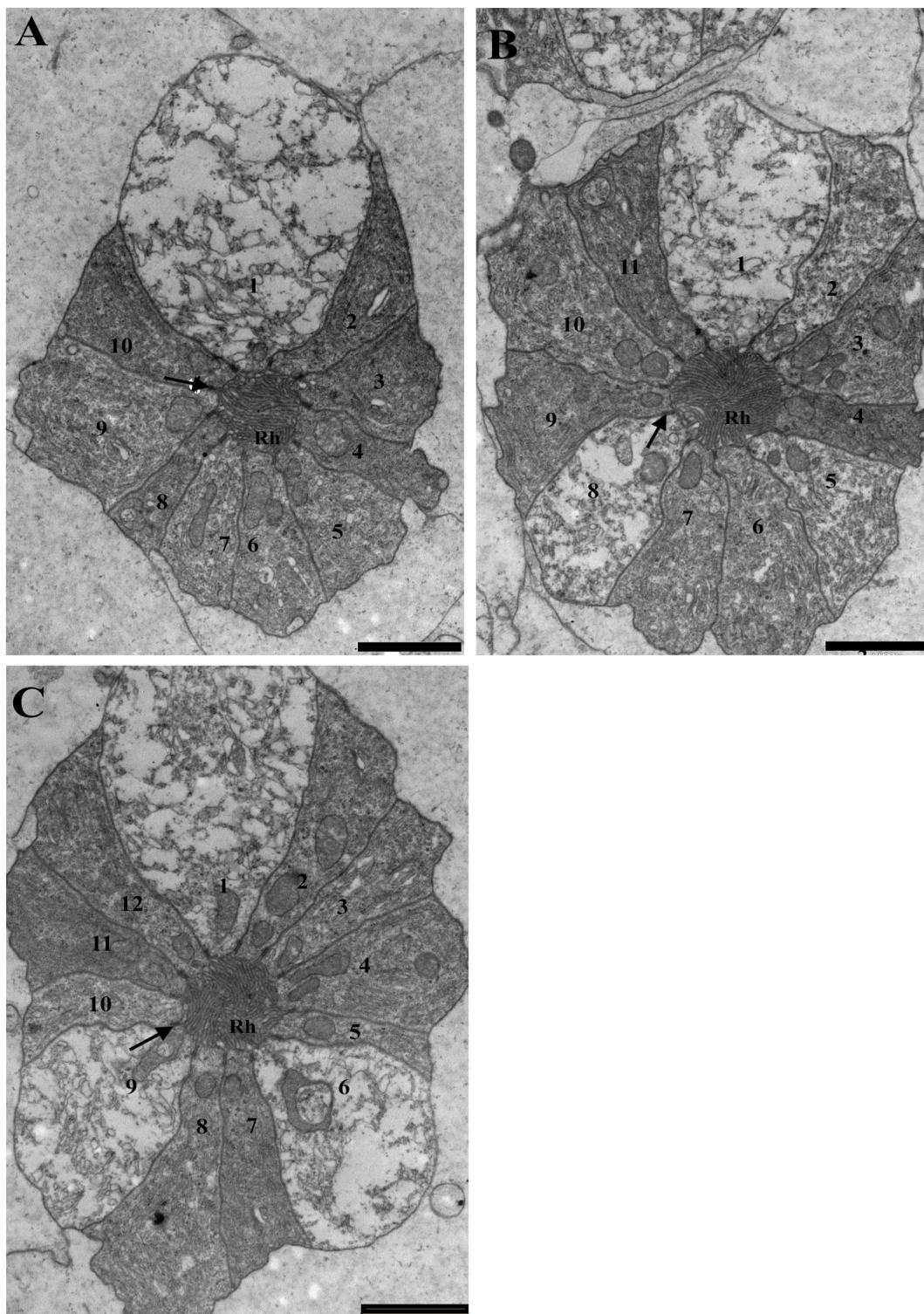
Pigmentne granule se nahajajo v primarnih in v sekundarnih pigmentnih celicah. V fotoreceptorskih celicah se pigmentne granule nahajajo samo na distalnem delu omatidija. Povprečni premer pigmentnih granul fotoreceptorskih celic je $0,54 \pm 0,07$ (N=13), povprečni premer sekundarnih pigmentnih granul je $0,36 \pm 0,09$ (N=13). Povprečni premer pigmentnih granul fotoreceptorskih celic je statistično značilno večji od povprečnega premera sekundarnih pigmentnih granul ($p < 0,001$).

Bazalna celica vsebuje pigmentne granule velike 0,2 - 0,4 μm . Bazalne celice se nahajajo v bližini bazalne lamine in k proksimalnemu rabdomu prispevajo svoje rabdomere.

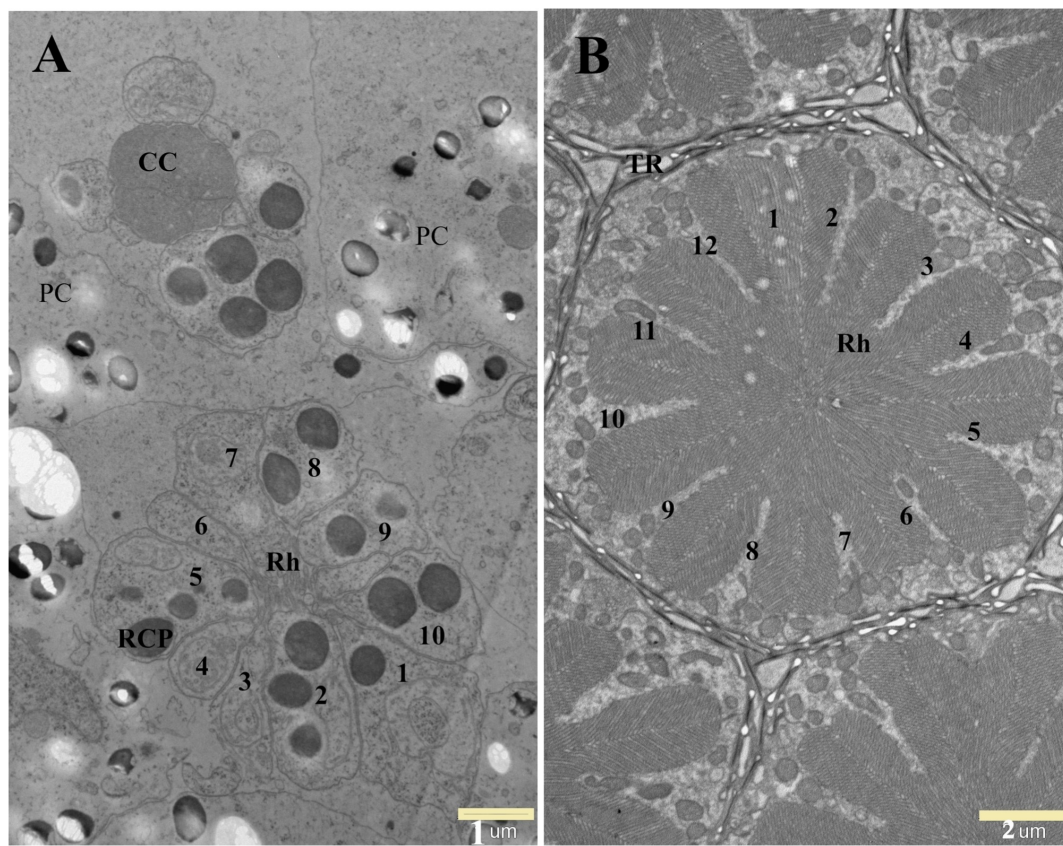
Aksoni retinalnih celic potekajo skozi bazalno lamino in so obdani z velikim številom traheol (slika 13).



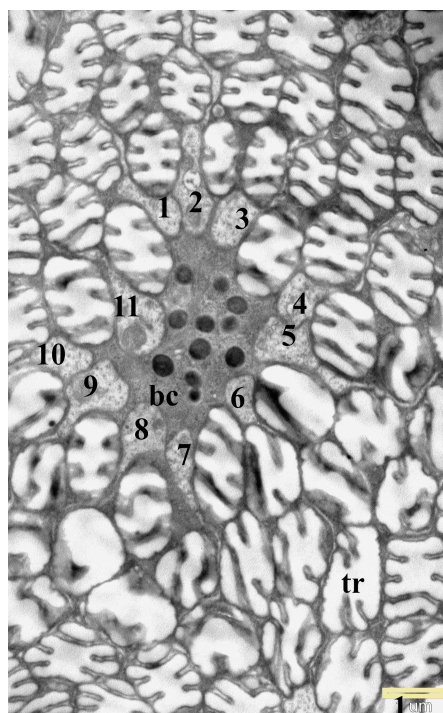
Slika 10: Presevna elektronska mikrofografija dioptričnega aparata omatidija svetlo adaptirane azijske koruzne vešče, *Ostrinia furnacalis* (A) in evropske koruzne vešče, *O. nubilalis* (B). A – Prečni prerez kristalnega stožca (*crystalline cone*, CC), ki ga tvorijo štiri celice (oštevilčene z 1-4). Merilce: 2 μm . B – Vzdolžni prerez kornee (*cornea*, C) in kristalnih stožcev (CC). Gradient gostote je viden tako v kristalnem stožcu (A), kot tudi v kornei (B). Kristalni stožci imajo obliko topovskega izstrelka. Na kornei opazimo tuberkule (CN). Merilce: 5 μm .



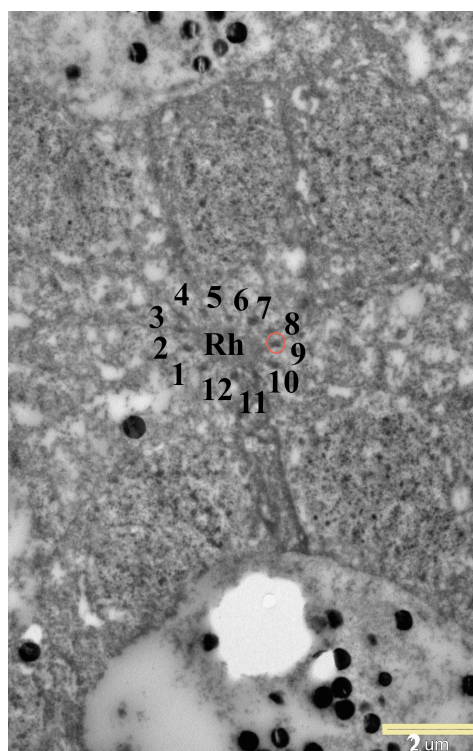
Slika 11: Presečna elektronska mikrografija prečnih prereзов distalnih rabdomov svetlo adaptirane azijske koruzne vešče, *Ostrinia scapularis*. Rabdom (*rhabdom*, Rh) tvori različno število fotoreceptorskih celic (oštevilčene z 1-12). Na sliki vidimo rabdom, ki ga tvori 10 fotoreceptorskih celic (A), 11 celic (B) ter 12 fotoreceptorskih celic (C). Ob rabdomu vidimo dezmosome (*označeni s puščico*). Merilce: 2 μ m.



Slika 12: Presevna elektronska mikrografija prečnega prereza mrežnice *O. furnacalis*. A – Prehod med kristalnimi stožci (*crystalline cone*, CC) in distalnim rabdomom (*rhabdom*, Rh). Na rahlo poševni rezini je videti, da se distalni rabdom začne tik pod konico kristalnih stožcev. K rabdomu na sliki prispeva 10 fotoreceptorskih celic (oštevilčene z 1-10). Pigmentne granule fotoreceptorskih celic (*retinal cell pigment*, RCP) so večja od pigmentnih zrn obdajajočih pigmentnih celic (*pigment cell*, PC). B – Proksimalni rabdom, ki ga tvorijo 12 fotoreceptorskih celic (oštevilčene z 1-12) ima značilno obliko cveta.



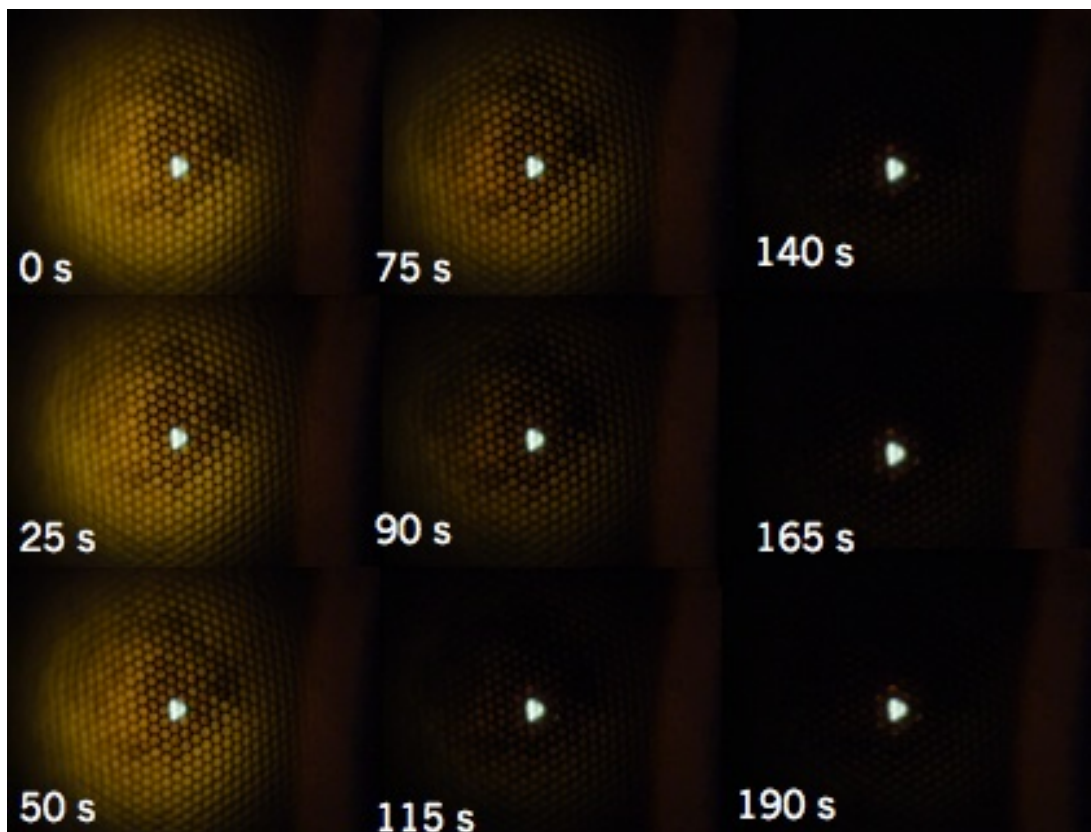
Slika 13: Presevna elektronska mikrografija prečnega prereza proksimalnega dela mrežnice *O. scapularis*. Veliko število traheol (*tracheoles*, tr) tvori tapetum in obdaja bazalno celico (*basal cell*, bc) ter 11 aksonov fotoreceptorjev (oštevilčeni z 1-11). Bazalna celica vsebuje pigmentne granule. Merilce: 1 μm .



Slika 14: Elektronska presevna mikrografija prečnega prereza distalnega dela mrežnice *O. nubilalis*. Zaradi slabe fiksacije preparata smo točno število fotoreceptorskih celic (1-12) določili na podlagi dezmosomov (označen z rdečim krogom).

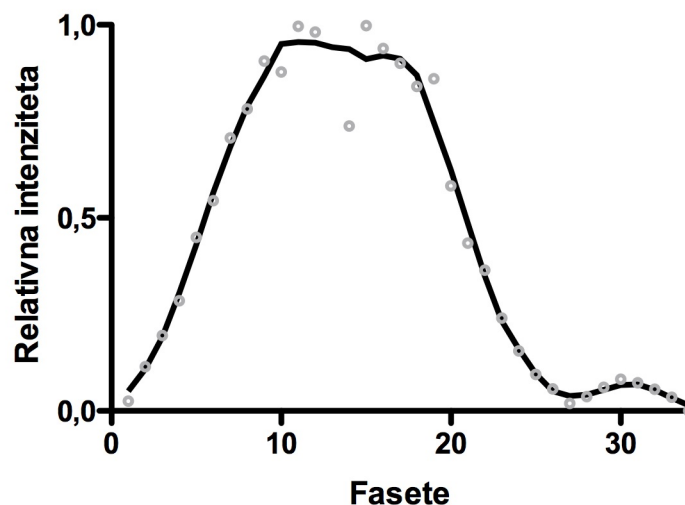
4.4 REFLEKSIJA OČESA

Oko temno adaptirane *O.furnacalis* smo skozi objektiv mikroskopa osvetlili z ozkim žarkom bele svetlobe z majhno aperturo in posneli časovni potek refleksije. Osvetlitev treh faset je povzročila nastanek odboja iz velikega števila neosvetljenih faset. S tem smo potrdili, da imajo oči koruzne vešče superpozicijsko optiko. Ugotovili smo, da se je oko popolnoma svetlo adaptiralo v času dobrih dveh minut.



Slika 15: Refleksija ali “Eyeshine” iz sestavljenega očesa samca *Ostrinia scapularis*, tekom 190 s osvetljevanja očesa z ozkim žarkom bele svetlobe. Žarek svetlobe vstopa v oko skozi 3 fasete (bela pika na sredini slik). Epiiluminacija temno adaptiranega očesa povzroči odboj svetlobe iz omatidijev, ki gledajo v svetlobni žarek. Oko koruzne vešče je superpozicijsko oko, saj žarek svetlobe, ki pade le na 3 fasete, povzroči refleksijo vseh omatidijev, ki so v aperturi pupile. Nekoliko temneje obrobene fasete okoli vstopnega žarka so bile osvetljene od strani ob preparaciji.

Iz intenzitetnega profila slike refleksije temno adaptiranega očesa (Slika 16) smo izračunali, da superpozicijsko vstopno pupilo tvori maksimalno 175 faset.



Slika 16: Horizontalni profil intenzitete refleksije (slika 15, 0 s) . Prikazana je normalizirana intenziteta posameznih faset, ki si sledijo preko eyeshina. Superpozicijsko vstopno pupilo tvori maksimalno 175 faset.

4.5 ELEKTROFIZIOLOŠKE MERITVE IZ SESTAVLJENIH OČI

4.5.1 Elektoretinografske raziskave

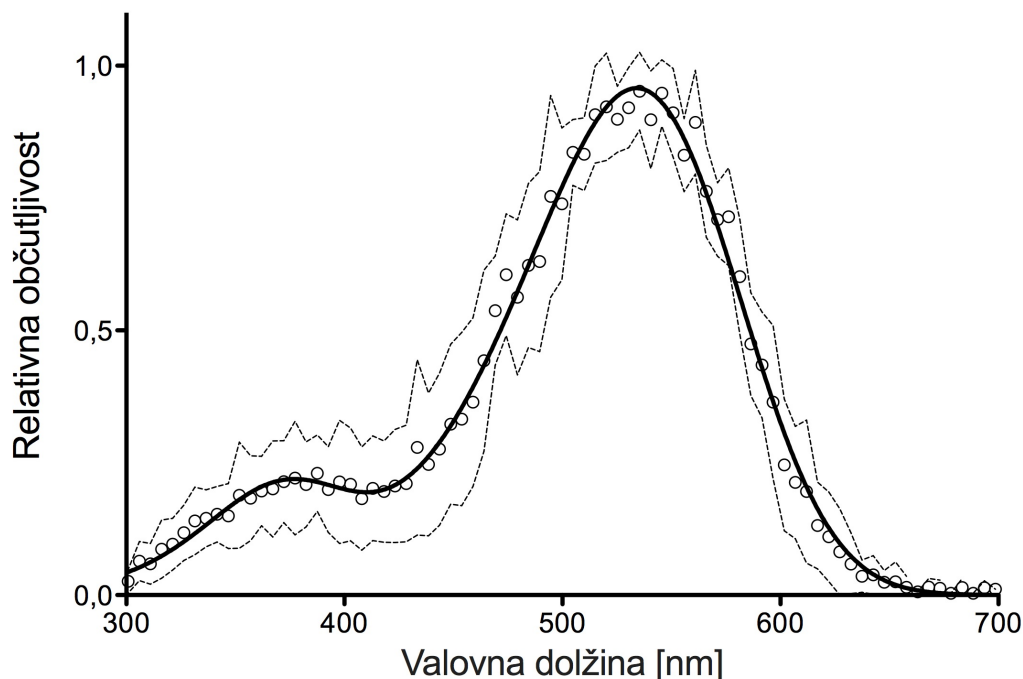
4.5.1.1 Spektralna občutljivost

4.5.1.1.1 *Ostrinia nubilalis*

Oko smo osvetljevali z izokvantnimi dražljaji svetlobe različnih valovnih dolžin, med 300 do 700 nm, s 5 nm koraki. Poskus smo napravili na sedmih živalih evropske koruzne vešče (4 samice, 3 samci). Amplitude ERG smo z uporabo reverzne Hillove transformacije preračunali v relativno občutljivost.

Svetlobni bliski so povzročili ERG majhnih amplitud, maksimalno 4 mV kornejsko negativne napetosti. Spektralna občutljivost, izmerjena z elektoretinogramom, je imela primarni vrh α v zelenem delu spektra pri ~ 540 nm in sekundarni vrh β v ultravijoličnem delu spektra pri ~ 360 nm. Podatkom spektralne občutljivosti smo prilagodili rodopsinski nomogram (Stavenga in sod., 1993).

Povprečna spektralna občutljivost superpozicijskih oči sedmih živali, izmerjena z elektoretinogramom, je imela največjo amplitudo odgovora, t.i. primarni vrh α , v zelenem delu spektra pri $534,0 \pm 0,57$ nm ter manjšo amplitudo, t.i. sekundarni vrh β , pri $367,2 \pm 2,78$ nm (N=7). Relativna amplituda vrha β , izračunana kot delež vrha alfa, $\beta/\alpha=0,13$. Podatki ustrezajo modelu absorbance enega zeleno občutljivega opsina z nekoliko zmanjšanim beta vrhom.



Slika 17: Povprečna spektralna občutljivost mrežnice sestavljenih oči *O. nubilalis*, izmerjena z elektoretinogramom (N=7; 4 samice, 3 samci). Največja amplituda odgovora je v zelenem delu spektra pri $534 \pm 0,57$ nm, manjši sekundarni vrh β je pri $367 \pm 2,78$ nm. Nomogram je prirejen po Stavenga in sod., 1993. Podatke smo združili za oba spola, saj nismo opazili razlik. Krožci prikazujejo srednje vrednosti, črtkani črti prikazujeta standardno napako sredine, krepka črta prikazuje nomogram.

4.5.1.1.2 *Ostrinia furnacalis* in *Ostrinia scapularis*

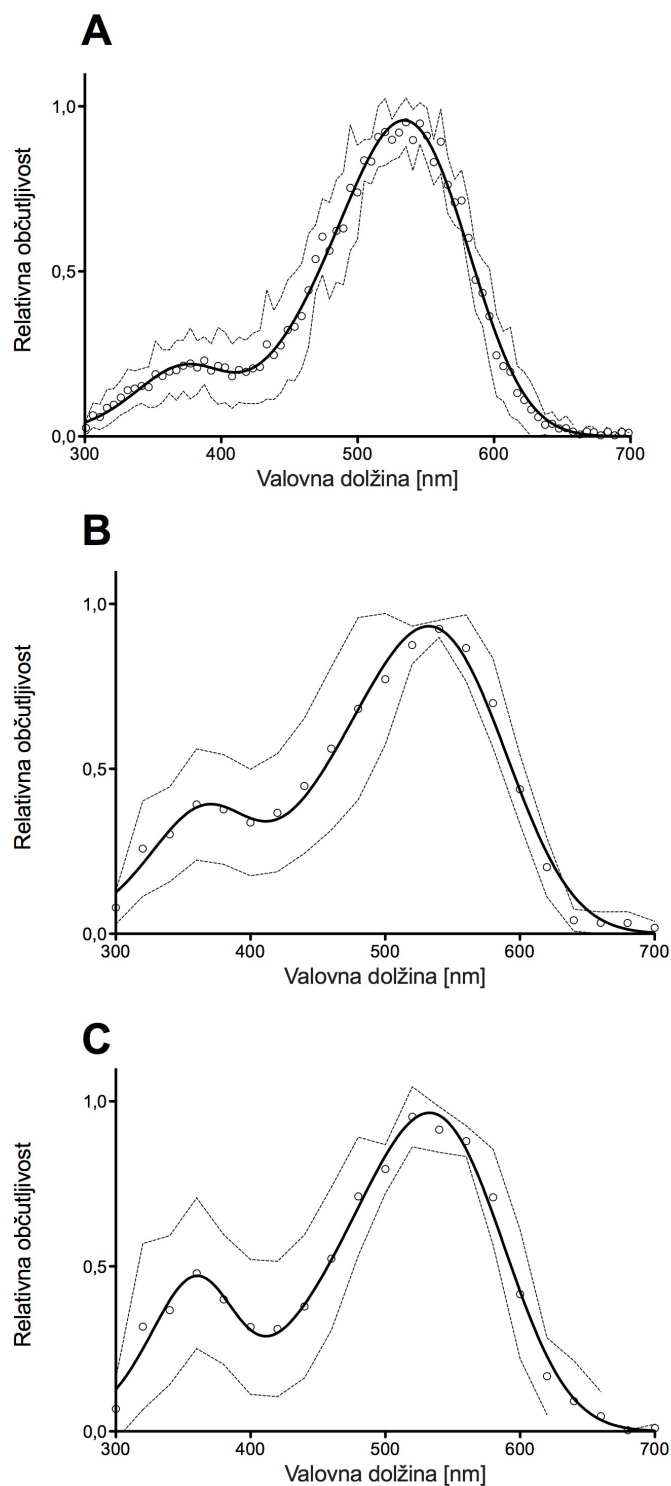
Oko smo osvetljevali z monokromatsko svetlobo različnih valovnih dolžin, med 300 do 700 nm, z 20 nm koraki. Poskus smo napravili na štirih živalih *O. furnacalis* (2 samici, 2 samca) in štirih živalih *O. scapularis* (2 samici, 2 samca). Amplitude ERG smo z uporabo reverzne Hillove transformacije preračunali na spektralno občutljivost. Svetlobni bliski so povzročili ERG odgovore z amplitudo ~ 20 mV kornejske negativne napetosti.

Povprečna spektralna občutljivost superpozicijskih oči štirih živali *O. furnacalis*, izmerjena z elektoretinogramom, je imela največjo amplitudo odgovora, t.i. primarni vrh α , v zelenem delu spektra pri $532,7 \pm 2,78$ nm ter manjšo amplitudo, t.i. sekundarni vrh β , pri $355,6 \pm 5,29$ nm (N=4); razmerje $\beta/\alpha=0,16$.

Povprečna spektralna občutljivost superpozicijskih oči štirih živali *O. scapularis*, izmerjena z elektoretinogramom, je imela največjo amplitudo odgovora, t.i. primarni vrh α , v zelenem delu spektra pri $532,3 \pm 2,82$ nm ter manjšo amplitudo, t.i. sekundarni vrh β , pri $358,5 \pm 7,85$ nm (N=4); razmerje $\beta/\alpha=0,38$.

Mrežnica azijskih koruznih vešč je, tako kot evropska koruzna vešča, najbolj občutljiva na zeleno svetlobo.

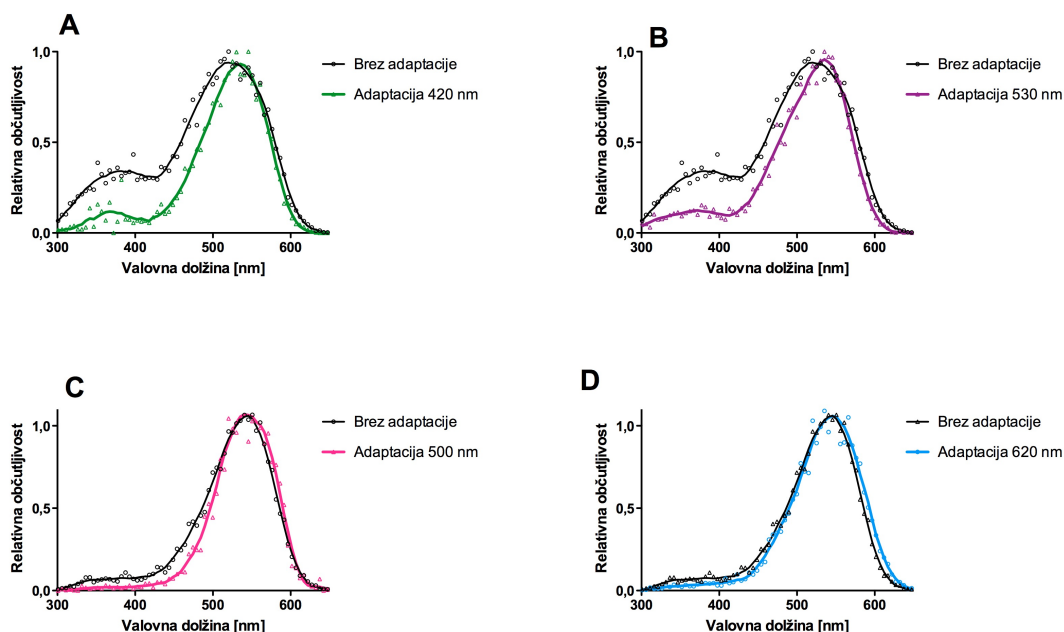
Valovna dolžina vrhov v zelenem delu spektra se med vrstami *O. nubilalis*, *O. furnacalis* in *O. scapulalis* ne razlikuje. Valovna dolžina vrha v UV delu spektra pri *O. nubilalis* pa se statistično značilno razlikuje od vrha v UV delu spektra tako pri *O. furnacalis* ($p = 0,0013$) kot pri *O. scapulalis* ($p = 0,0028$).



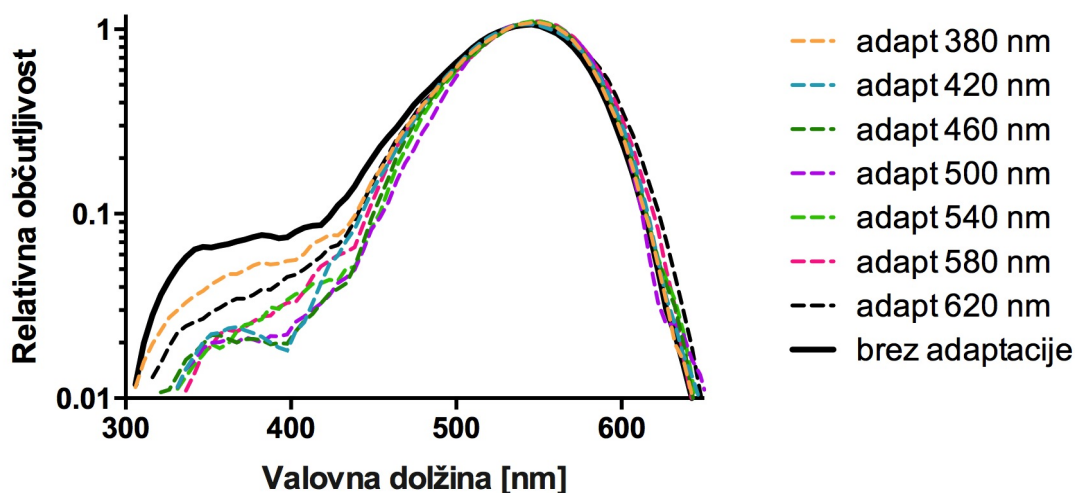
Slika 18: Povprečne spektralne občutljivosti mrežnice *O. nubilalis* (A), *O. furnacalis* (B) in *O. scapularis* (C) izmerjene z elektoretinogramom. Vse tri vrste imajo najvišji vrh občutljivosti v zelenem delu spektra ter manjši vrh v UV delu spektra. A – N=7 (4 samice, 3 samci). B – N=4 (2 samici, 2 samca). C – N=4 (2 samici, 2 samca). Podatke smo združili za oba spola, saj nismo opazili razlik. Krožci prikazujejo srednje vrednosti, črtkani črti prikazujeta standardno napako sredine, krepka črta prikazuje nomogram.

4.5.1.2 Selektivna adaptacija

Oko smo selektivno adaptirali s konstantno monokromatsko svetlobo različnih valovnih dolžin (od 380 nm do 620 nm, v korakih po 20 nm). Intenziteto adaptacijske svetlobe smo nastavili na toliko, da se je odgovor očesa na serijo monokromatskih bliskov zmanjšal približno za polovico. Hkrati smo merili spektralno občutljivost s serijo monokromatskih bliskov med 300 in 700 nm v 5 nm korakih. V primeru različnih tipov fotoreceptorskih celic, bi monokromatska adaptacijska svetloba selektivno zmanjšala odziv tistih fotoreceptorskih celic, ki so najbolj občutljive v delu spektra adaptacijskega dražljaja. Izmerili smo amplitude ERG ter jih preračunali v spektralno občutljivost. Selektivna adaptacija je vselej povzročila znižanje odziva pri valovnih dolžinah med 300 in 540 nm (slika 19). Odziv ERG se je zmanjšal v kratkovalovnem delu spektra < 530 nm, ne glede na valovno dolžino adaptacijske svetlobe.



Slika 19: Spektralna občutljivost očesa *O. nubilalis* z adaptacijsko svetlobo različnih valovnih dolžin. A, B, adaptacijski dražljaj valovne dolžine 420 nm (A) in 530 nm (B); odgovor izmerjen z ERG pri samcu. C in D, adaptacijski dražljaj valovne dolžine 500 nm (C) in 620 nm (D); odgovor izmerjen z ERG pri samici. Adaptacijski dražljaj tako pri samici kot pri samcu povzroči zmanjšanje odgovora ERG pri valovnih dolžinah med 300 in 540 nm.



Slika 20: Spektralna občutljivost očesa z adaptacijsko svetlobo različnih valovnih dolžin, izmerjena z elektroretinogramom pri samici *O. nubilalis*. Občutljivost je vselej normalizirana na odgovor pri 530 nm in prikazana na logaritemski skali. Črte povezujejo diskretne vrednosti občutljivosti, izmerjene na 5 nm natančno. Pri vsaki valovni dolžini adaptacijske svetlobe pride do zmanjšanja odgovora ERG samo pri valovnih dolžinah 300 do 540 nm, medtem ko ostaja pri valovnih dolžinah >540 nm amplituda odgovora nespremenjena.

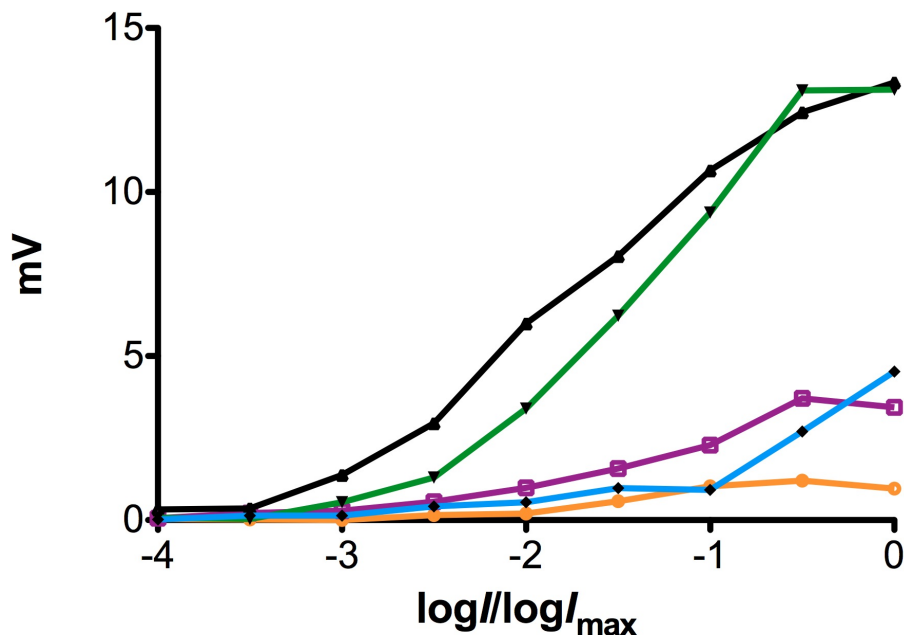
4.5.1.3 Intenzitetna krivulja

Meritve intenzitetne krivulje so bile potrebne za izračun spektralne občutljivosti. Oko koruzne vešče smo osvetljevali s svetlobnimi dražljaji različnih svetlobnih intenzitet, od -4 do 0 log enot (polna svetloba) v korakih po 0,5 log. Za merjenje intenzitetne krivulje smo uporabili valovno dolžino 540 nm.

Amplitudam odgovora od izoelektrične točke do srednje vrednosti smo računalniško prilagodili parametre Hillove krivulje (n = Hillov koeficient, opisuje naklon krivulje, V_{\max} = maksimalna amplitude odgovora ter I_{50} = jakost dražljaja, ki izzove polovico maksimalnega odgovora). Krivuljo smo povzeli po formulaciji Matića in Laughlina (1981):

$$V/V_{\max} = I^n / (I^n + I_{50}^n) \quad \dots (2)$$

Minimalni odgovor ERG smo zaznali pri različnih svetlobnih intenzitetah, od -3,5 log do -2 log. Nismo zabeležili razlik med spoli, torej so samci in samice enako občutljivi na svetlobo. Amplituda odgovora se razlikuje najverjetneje zaradi zamika preparata iz optimalne osi ekscitacijskega žarka.

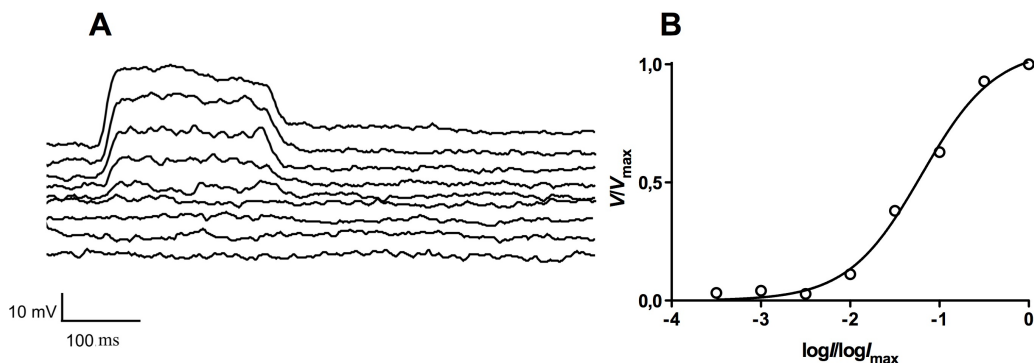


Slika 21: Intenzitetne krivulje (N=5; 3 samice, 2 samca) prikazujejo odvisnost amplitude odgovora ERG od jakosti svetlobnega pulza valovne dolžine 540 nm.

4.5.2 Znotrajcelične meritve

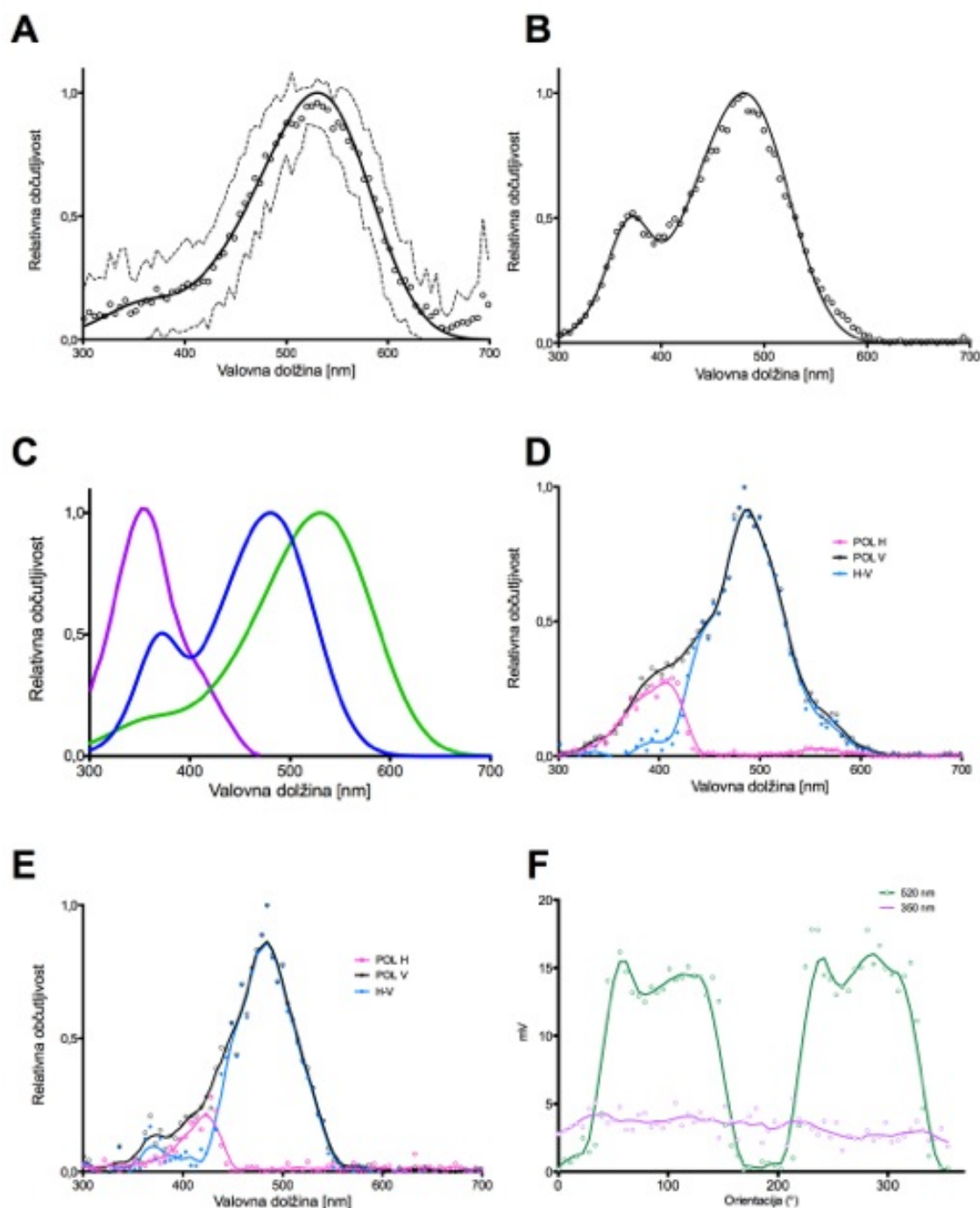
Izmerili smo signale iz 23 fotoreceptorskih celic iz sedmih osebkov vrste *O. nubilalis* (4 samice, 3 samci). Pozicijo elektrode v fotoreceptorski celici smo zaznali s padcem napetosti, prisotnostjo kvantnih sunkov ter z nastankom receptorskih potencialov ob osvetljevanju očesa. Ko smo elektrodo vstavili v fotoreceptorsko celico, je mirovni membranski potencial znašal med -30 in -50 mV. Maksimalni depolarizacijski odgovor fotoreceptorjev smo dobili z osvetljevanjem z belo svetlobo žarka ničtega reda iz monokromatorja.

Fotoreceptorski odgovor na različne jakosti svetlobe (krivulja V -log I) smo izmerili s 300 ms svetlobnimi dražljaji valovne dolžine 540 nm pri jakostih svetlobe od 0 do 4 logaritmskih enot. Pri svetlobnih bliskih šibke jakosti (3,5 logaritmskih enot pod maksimalno jakostjo svetlobnih dražljajev) smo lahko opazili naključne serije kvantnih sunkov. S povečevanjem jakosti svetlobe se kvantni sunki zlijejo v gladek receptorski potencial. Tipični receptorski potencial lahko razdelimo na tri faze: hitra depolarizacija, plato in repolarizacija. Višina depolarizacije variira, odvisno od jakosti svetlobnih žarkov ter od tega ali je bil svetlobni žarek dobro fokusiran na tarčni fotoreceptor ali ne. Iz amplitude receptorskega potenciala, ki smo jo grafično prikazali kot funkcijo jakosti svetlobe in prilegli Hillovo krivuljo, smo dobili Hillov naklon, $n = 1.018 \pm 0.565$ (N=7).



Slika 22: Receptorski potenciali *O. nubilalis*. Fotoreceptorsko celico smo osvetljevali s svetlobnimi dražljaji različnih svetlobnih intenzitet, od -4 do 0 log enot (polna svetloba) v korakih po 0,5 log. A, odgovor fotoreceptorske celice na dražljaje valovne dolžine 540 nm. Jakost dražljaja narašča od spodaj navzgor. B, odvisnost normalizirane amplitude receptorskega potenciala od relativne jakosti svetlobe. Krožci prikazujejo amplitudo platoja signala (A), krivulja predstavlja Hillovo krivuljo z optimalnimi parametri.

Spektralno občutljivost fotoreceptorjev smo izmerili s serijo 300 ms dolgih monokromatskih bliskov, valovnih dolžin med 300 in 700 nm v 5 nm korakih. Amplitude receptorskih potencialov smo z reverzno Hillovo transformacijo preračunali v občutljivosti. Spektralno občutljivost smo nato opisali z modelom absorbance opsina (Stavenga in sod., 1993). Zaradi sipanja podatkov smo uporabili parametre nomograma, ki smo jih izračunali z ERG. Parametri se zelo dobro ujemajo ($R^2=0,82$) Večina fotoreceptorjev je imela vrh občutljivosti v zelenem delu spektra.

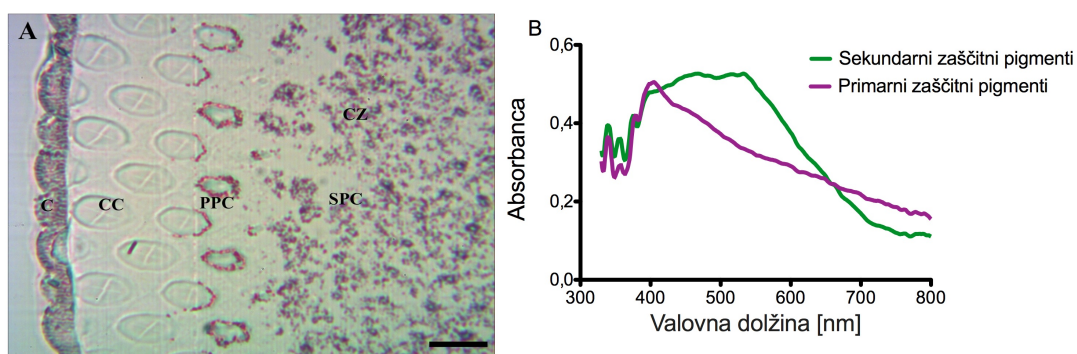


Slika 23: Povprečne spektralne občutljivosti fotoreceptorskih razredov v mrežnici (N=23 celic (7 živali, 4 samice, 3 samci)). A – Povprečna spektralna občutljivost fotoreceptorskih celic v mrežnici, z vrhom občutljivosti v zelenem delu spektra, pri 530 nm. N= 20 celic. B – Povprečna spektralna občutljivost fotoreceptorskih celic v mrežnici, z vrhom občutljivosti v modrem delu spektra, pri 480 nm. N=2 celici. Podatki so združeni za oba spola. Nomogrami so prirejani po Stavengi in sod., 1993. Krožci prikazujejo srednje vrednosti, črtkani črti prikazujeta standardno napako sredine. C – Koruzne vešče imajo v mrežnici sestavljenih oči tri tipe fotoreceptorskih celic, z vrhovi občutljivosti v UV, modrem in zelenem delu spektra. Prevladujejo fotoreceptorji z vrhom občutljivosti v zelenem delu spektra. Posneti smo uspeli samo eno celico, ki je imela vrh občutljivosti v UV delu spektra, pri 360 nm. D in E – Spektralne občutljivosti dveh receptivnih enot, sestavljenih iz para celic, z vrhom občutljivosti v modrem delu spektra ter manjšim vrhom v

UV delu spektra. Celica z vrhom v modrem delu spektra je bila izjemno občutljiva na smer polarizacije svetlobe, celica z vrhom v UV pa sploh ne. Izmerili smo spektralno občutljivost s polarizatorjem v horizontalni poziciji (POL H) in v vertikalni poziciji (POL V). Spektralno občutljivost s polarizatorjem v vertikalni poziciji smo odšteli od spektralne občutljivosti celice s polarizatorjem v horizontalni poziciji (H-V). S tem smo dokazali, da smo snemali spektralno občutljivost iz dveh fotoreceptorskih celic, z vrhovoma občutljivosti v UV in modrem delu spektra. F – Primer celice z vrhom občutljivosti v modrem delu spektra, ki je bila izjemno občutljiva na smer polarizacije svetlobe. Občutljivost na polarizirano svetlobo smo posneli pri 350 nm ter pri 520 nm. Z rotacijo polarizacijskega filtra pri valovni dolžini 530 nm, se je občutljivost zmanjšala za kar 250 krat, pri 350 nm pa ni prišlo do sprememb v občutljivosti.

4.5.3 Mikrospektrofotometrija absorbance zaščitnih pigmentov

Absorbance pigmentnih granul smo izmerili iz nepobarvanih, 1 μm debelih, pol tankih rezin, z mikrospektrofotometrom. Absorbance primarnih pigmentnih granul smo izmerili na področju okoli kristalnih stožcev, absorbance sekundarnih pigmentnih granul pa na področju bistrega pasu. Pigmentne celice vsebujejo granule s temno rjavim pigmentom, ki deluje kot ščit med posameznimi omatidiji in uravnava svetlobni tok na rabdomere. Sekundarni zaščitni pigmenti kažejo največjo absorbance pri valovnih dolžinah 300 do 560 nm. Primarni in sekundarni zaščitni pigmenti imajo največji učinek v tem valovnem pasu.



Slika 24: Meritev absorbance zaščitnih pigmentov na prečnih rezinah svetlo adaptiranega superpozicijskega očesa koruzne vešče, *Ostrinia nubilalis*. A – Primarne pigmentne celice (PPC) obdajajo kristalne stožce (CC), desno od njih vidimo temnejše sekundarne pigmentne celice (SPC). 1 μm debele, neobarvane rezine, vključene v epoksi smolo Spurr. Merilce: 20 μm . B – Absorbance primarnih in sekundarnih pigmentnih granul, izmerjena z mikrospektrofotometrom iz rezin v A.

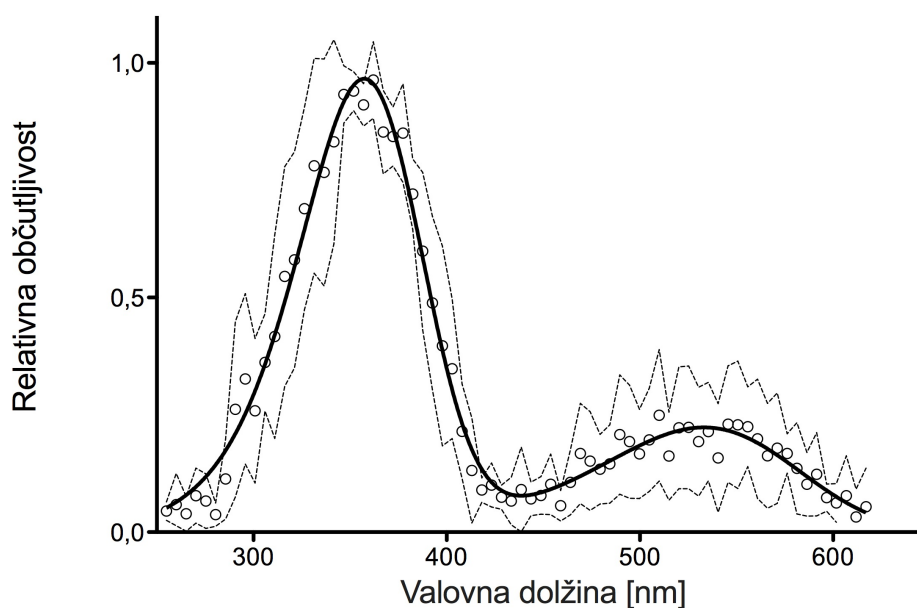
4.6 ELEKTROFIZIOLOŠKE MERITVE OCELOV

4.6.1 Spektralna občutljivost

Ocel smo osvetljevali z izokvantnimi dražljaji svetlobe različnih valovnih dolžin, med 300 do 700 nm, s 5 nm koraki. Poskus smo napravili na petih osebkih (3 samice, 2 samca).

Najprej smo izmerili intenzitetne krivulje, ki so potrebne za izračun spektralne občutljivosti. Ocel *O. nubilalis* smo osvetljevali s svetlobnimi dražljaji valovne dolžine 360 nm različnih svetlobnih intenzitet, od -4 do 0 log enot (polna svetloba) v korakih po 0,5 log. Amplitudam odgovora od izoelektrične točke do srednje vrednosti platoja smo računalniško prilagodili parametre Hillove krivulje. Amplitude ERG smo z uporabo

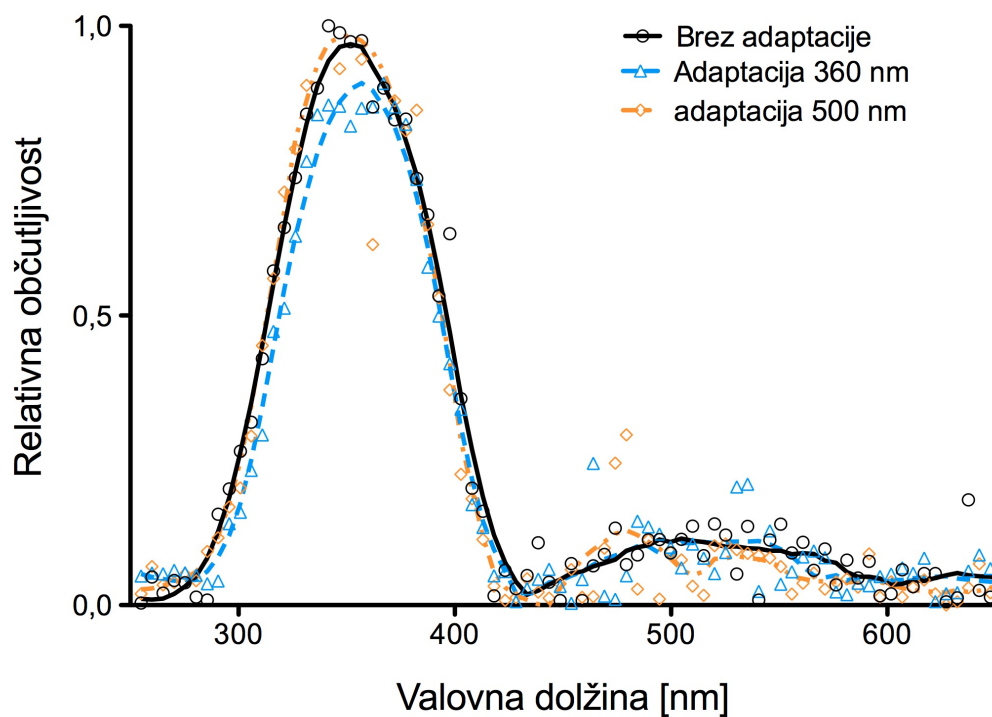
reverzne Hillove transformacije preračunali na spektralno občutljivost. Povprečna spektralna občutljivost, izmerjena z elektoretinogramom, je imela primarni vrh pri $357 \pm 0,77$ nm in sekundarni vrh v UV delu spektra pri $533 \pm 4,06$ nm (slika 25). Podatkom spektralne občutljivosti smo prilagodili model absorpcije dveh opsinov (nomogram prirejen po Stavenga in sod., 1993).



Slika 25: Spektralna občutljivost ocelov koruzne vešče, izmerjena z elektoretinogramom. Krožci prikazujejo srednje vrednosti, črtkani črti standardni napaki sredine, krepka črta nomogram (N=4, 3 samice, 2 samca). Vrhova občutljivosti sta v UV delu spektra pri $357,0 \pm 0,77$ nm in v zelenem delu spektra pri $533 \pm 4,06$ nm. Podatke smo združili za oba spola, saj nismo opazili razlik. Nomogram je prirejen po Stavengi in sod., 1993. Podatki se ujemajo z modelom absorpcije dveh opsinov.

4.6.2 Selektivna adaptacija

Ocel smo selektivno adaptirali s konstantno monokromatsko svetlobo valovnih dolžin 360 nm in 500 nm. Hkrati smo merili spektralno občutljivost s serijo monokromatskih bliskov med 300 in 700 nm v 5 nm korakih. Bliski so bili dolgi 200 ms. V primeru prisotnosti različnih tipov receptorskih celic, bi monokromatska adaptacijska svetloba selektivno zmanjšala odziv tistih receptorskih celic, ki so najbolj občutljive na svetlobo valovne dolžine adaptacijskega dražljaja. Izmerili smo amplitude ERG ter jih preračunali v spektralno občutljivost. Adaptacija z valovno dolžino 360 nm je povzročila manjši odgovor ERG v UV delu spektra (slika 26).



Slika 26: Spektralna občutljivost ocela samca *O. nubilalis* brez ter z adaptacijskim dražljajem dveh različnih valovnih dolžin (360 nm, 500 nm), izmerjena z elektroretinogramom.

5 RAZPRAVA

5.1 MREŽNICA KORUZNE VEŠČE IMA ZNAČILNOSTI SUPERPOZICIJSKEGA IN APOZICIJSKEGA OČESA

Žuželke, ki so aktivne v mraku in zori, se soočajo s hitrimi in obsežnimi spremembami v jakosti svetlobe. Zaradi tega so izpostavljene nasprotujočim selekcijskim pritiskom na njihov vidni sistem, ki na eni strani vodijo k povečanju optične občutljivosti očesa, na drugi strani pa k ohranitvi prostorske in časovne ločljivosti vida (Frederiksen in Warrant, 2008). Žuželke, ki živijo v razmerah z malo svetlobe, imajo večinoma superpozicijske oči. Koruzna vešča je aktivna zvečer, zato ima oči prilagojene na vid v šibki svetlobi. Anatomska raziskava je pokazala, da imajo koruzne vešče superpozicijski tip očesa. Superpozicijska optika poveča občutljivost oči, toda s tem lahko pride do zmanjšane prostorske ločljivosti, saj več faset prispeva k superpozicijski pupili. Posledično lahko pride do pomnožitve optičnih napak posameznih faset, zato je lahko interomatidijski kot manjši od vpadnega kota rabdoma ($\Delta\rho \gg \Delta\phi$) (Belušič, 2013). Efektivna apertura rabdoma ni več vpadni kot ene fasete, temveč je vpadni kot nekaj desetih ali nekaj stotih faset. To poveča intenziteto zbrane svetlobe za 1-3 magnitude in omogoči žuželkam kot so vešče in nekateri hrošči, letenje in parjenje pozno v večer (Land, 1997).

5.1.1 Zunanja morfologija

Oko koruzne vešče je sferične oblike in je sestavljeno iz okoli 2000 faset.

Kornealne leče so pokrite s t. i. tuberkuli, ki najverjetneje ne vplivajo na vid, temveč je njihova glavna naloga zmanjšati reflektanco oči in s tem predacijo (Stavenga in sod., 2006). Poleg tega tuberkuli delujejo kot hidrofobni premaz, zato kapljice vode zdrsiyo iz očesa (Yang, 2014). Dolgo časa so menili, da so tuberkuli značilnost nočnih metuljev in da je njihova funkcija povečanje občutljivosti. Pravzaprav ima večina dnevnih metuljev reducirane tuberkule (Hesperiidae, Lycaenidae in Pieridae) ali pa le-te manjkajo (Papilionidae) (Yack in sod., 2007). Zanimivo, večina dnevnih vrst družine Nymphalidae ima zelo dobro razvite tuberkule. Na podlagi njihove prisotnosti torej ne moremo zagotovo trditi da gre za nočno žival ali ločiti nočnega od dnevnega metulja (Yack in sod., 2007).

Kotna ločljivost sestavljenih oči je določena z interomatidijskimi koti, pa tudi z optično kvaliteto dioptričnega aparata in s premerom rabdov. Manjši kot je interomatidijski kot, večja je razdalja pri kateri lahko žival prepozna objekte, npr. plen, predatorje ali listje. Pri žuželkah so interomatidijski koti veliki od več deset stopinj pri skupini Apterygota do le 0.24° pri nekaterih kačjih pastirjih, ki imajo zato največjo kotno ločljivost. Kaže, da boljše ločljivosti ni mogoče doseči v sestavljenih očeh realističnih velikosti. Žuželke z različnimi življenjskimi slogi imajo neenakomeren vzorec interomatidijskih kotov, s t. i. akutnimi

conami, kjer se število omatidijev v danem kotu poveča, s čimer se zmanjša interomatidijski kot (Land, 1997). Koruzna vešča nima akutnih con in njen interomatidijski kot meri $2,3^\circ$, kar je relativno malo za nočne metulje. Lahko je aktivna v pogojih z več svetlobe, torej v mraku, in ne le ponoči. Interomatidijski koti nekaterih drugih vešč merijo npr. 3° pri *Ephestia kuehniella*, $3,82^\circ$ pri samcih in $4,13^\circ$ pri samicah *Acentria ephemerella* ter $2,80^\circ$ pri samcih in $3,20^\circ$ pri samicah *Operophtera brumata*. Pri majhnih očeh vešče *Ectoedemia argyropeza* se občutljivost očesa ne more povečati na račun bistrega pasu, temveč se poveča s povečanjem faset in s tem s povečanjem interomatidijskega kota na 8° , s čimer lahko v posamezno faseto vstopi več svetlobe (Honkanen in Meyer-Rochow, 2009). Večja svetlobna občutljivost omogoča boljšo zaznavo šibkega kontrasta. Oko z večjo svetlobno občutljivostjo lahko razloči več odtenkov sivine (Horridge, 1977).

5.1.2 Tapetum in refleksija očesa

Prisotnost dobro oblikovanega tapetuma je tipična za superpozicijsko oko. V superpozicijskih očeh tapetum nastane z delitvijo trahej v mrežo mnogih manjših traheol na ravni bazalne lamine (prečni tapetum) ter tako, da traheole obdajo omatidij vzdolž rabdoma (vzdolžni tapetum). Oko koruzne vešče ima tipičen tapetum, značilen za superpozicijske oči. Veliko manj obsežen tapetum lahko najdemo tudi v nekaterih apozicijskih očeh, npr. pri kačjih pastirjih, kjer imajo traheole v tapetumu vlogo pri dihanju in zmanjševanju mase očesa z velikim premerom in visoko ločljivostjo (Yack in sod., 2007).

Refleksija iz temno adaptiranega očesa nastane, ko se svetloba odbije od sloja tapetuma. Svetloba, ki vstopi v oko in se ne absorbira tekom prvega prehoda skozi sloj rbdomov, dobi novo priložnost absorpcije, preden zapusti oko. Prisotnost tapetuma poveča občutljivost z učinkovito podvojitvijo dolžine rbdomov in neabsorbirana svetloba, ki zapusti oko, tvori refleksijo očesa. Aperturo faset, ki so vključene v sijaj, imenujemo tudi superpozicijska apertura in je enaka aperturi faset, ki so zbrale svetlobo v en sam rbdom v mrežnici. Premer refleksije iz očesa je torej enak pupili superpozicijskega očesa in njegova velikost je pokazatelj občutljivosti očesa (Yack in sod., 2007). Superpozicijska apertura koruzne vešče obsega od 1 do 175 faset ter omogoča visoko občutljivost in velik dinamični razpon vida v različnih svetlobnih pogojih.

Obseg vzdolžnega tapetuma, ki ločuje rbdome med seboj, v superpozicijskih očeh je dober pokazatelj kvalitete in fokalne pozicije slike očesa. Rbdome, ki so obdani s traheolami do njihovih distalnih koncev, najdemo pri dnevnih superpozicijskih očeh nekaterih vrst reda Lepidoptera in te živali imajo ostre slike, ki se tvorijo na koncu rabdoma (Warrant in sod., 1999). V očesu koruzne vešče traheole ne segajo do distalnega dela rabdoma. Kvaliteta slike je slabša kot pri dnevnih superpozicijskih očeh, saj prihaja do sipanja svetlobe pod ravnino fokusa. Če traheole ne bi bile prisotne, bi se močno zmanjšala

prostorska ločljivost zaradi odboja poševnih žarkov (Yack in sod., 2007). Prečni tapetum poveča občutljivost, vzdolžni tapetum pa izboljša ločljivost očesa (Rochow, 2008).

Pri svetlobni adaptaciji ni prišlo do zmanjšanja premera refleksije iz očesa, temveč je prišlo le do manj močnega sijaja. Sijaj je največji v centru refleksije in se zmanjšuje stran od centra. Če bi v očesu koruzne vešče prišlo do longitudinalnih migracij pigmentnih granul (migracije v proksimalen del očesa), potem bi se morala refleksija očesa in s tem superpozicijska apertura zmanjšati. Oko koruzne vešče torej ne uravnava količine svetlobe, ki pade na rabdom, z longitudinalno migracijo sekundarnih pigmentnih granul.

5.1.3 Dioptrični aparat in fotoreceptorske celice

Kristalni stožci in fotoreceptorske celice v vseh treh vrstah koruzne vešče imajo nekatere morfološke značilnosti, ki so značilne za tipične superpozicije oči. Kristalni stožci imajo obliko topovskega izstrelka in imajo velik gradient lomnega količnika, ki je potreben za teleskopsko optiko superpozicijskega očesa (Caveney in McIntyre, 1981). Prav tako je prisoten bistri pas med rabdomi in dioptričnim aparatom, ki je ravno tako potreben za superpozicijsko optiko. Tretja značilnost superpozicijskih oči, ki jo najdemo pri koruzni vešči, je širok rabdom, ki lahko sprejme veliko količino svetlobe. Dnevni metulji imajo običajno zelo ozke in veliko manj občutljive rabdome, ki pogosto merijo le 1-2 μm . Ker so ti premeri podobni valovnim dolžinam svetlobe (približno 0,5 μm), rabdom deluje kot svetlobni vodnik, ki širi svetlobo v obliki valovanja (valovna optika) (Warrant in McIntyre, 1993). 8 μm širok rabdom koruzne vešče pa služi kot svetlobni vodnik, ki širi svetlobo v obliki žarkov (geometrijska optika). Četrta značilnost je rabdom v obliki rože, ki so ga do sedaj našli samo v superpozicijskih očeh. Točen pomen te oblike do sedaj še ni znan (Yack in sod., 2007). Dobro razvit distalni rabdom v očeh koruzne vešče sega skozi bistri pas, vse do dioptričnega aparata. Distalni rabdom je posebnost nekaterih superpozicijskih oči (Fischer, 2012). Oči koruzne vešče imajo torej lastnosti tako superpozicijskih kot apozicijskih oči, zato jih lahko uvrstimo v vmesni tip (Fischer, 2012).

Pri metuljih je dnevni način življenja dovolil povečanje obsega distalnega rabdoma, ki ima malo vpliva na procese temne adaptacije superpozicijskih oči. S povečanjem velikosti oči (večji polmer očesa, manjši interomatidijski kot, daljši omatidiji) se potreba po distalnem rabdomu zmanjša zaradi večjih proksimalnih rabdomov in večjega števila faset, ki sodelujejo pri superpozicijskih procesih (Fischer, 2012). Distalni rabdomi slabo absorbirajo diagonalno potekajoče žarke v bistrem pasu, lahko pa pri popolnoma svetlo adaptiranemu očesu delujejo kot svetlobni vodniki od dioptričnega aparata do priksimalnega rabdoma in tako oko deluje kot pravo apozicijsko oko. Navzkrižno svetlobo lahko torej absorbirajo distalni rabdomi omatidijev, ki niso v osi padajoče svetlobe ter torej niso rabdomi centralnega omatidija. Manjši premer distalnega rabdoma poveča ločljivost očesa.

Distalne rabdome lahko najdemo tudi v sestavljenih očeh s polmerom $> 250 \mu\text{m}$, kjer pa ne dosežejo takšnih razsežnosti kot pri majhnih veščah. Pri vrsti *Ephestia kuehniella* premer distalnega rabdoma meri manj kot $1 \mu\text{m}$ in menijo, da naj ne bi oviral superpozicijske optike (Kunze, 1979).

Večina žuželk vsebuje osem ali devet retinula celic, toda določene vrste družine Pyralidae imajo 9-13 retinula celic (Fischer in Horstmann, 1970; Stone in Koopowitz 1976), vrste družine Geometridae imajo 15 retinula celic (Meyer-Rochow in Lau 2008), pri vrstah družine Noctuidae najdemo 14-16 retinula celic (Horridge in sod. 1977). Dnevni metulji imajo večinoma 9 retinula celic (Ribi 1978). Pri metuljih so dokazali, da je deveta retinula celica analogna mušjemu fotoreceptorju R7 ter da se je razvila s podvojitvijo R7 iz prvotnega vzorca osmih retinalnih celic (Friedrich in sod. 2011). Pri nekaterih vrstah družine Pyralidae je znano, da število retinula celic znotraj enega očesa variira (Fischer in Horstmann, 1970). Poleg tega znotraj enega očesa variira tudi število celic, ki tvorijo kristalni stožec. Pri vseh treh vrstah koruznih vešč smo našli 9-12 retinula celic ter bazalno celico, ki je vsebovala pigmentne granule ter prispevala svoj del rabdomere v skupen zaprti rabdom. Fischer (2012) navaja, da je bazalna celica prisotna tudi pri izredno majhnih vrstah vešč, čeprav ne prispeva nobene rabdomere. Bazalna retinula celica je prva celica, ki se razvije pri razvoju omatidija in se zato imenuje tudi t. i. ustanoviteljska celica (Tomlinson in Ready 1987).

Omatidij vseh treh vrst koruzne vešče je sestavljen iz kristalnega stožca, ki sestoji iz štirih celic, dveh primarnih in šestih sekundarnih pigmentnih celic ter iz 9 – 12 retinula celic; rabdom je zaprtega tipa. Horridge (1977) je raziskoval oko vešče *P. tristifica*, kjer ima omatidij 14 fotoreceptorskih celic. Točnega razloga za večje število fotoreceptorskih celic ni znal pojasniti. Menil je, da se fotoreceptorske celice med seboj razlikujejo v občutljivosti ali pa obstaja nek drug način, ki je vgrajen v optičnem lobulu in zagotovi večjo vidno diskriminacijo. Domnevamo, da je pri koruzni vešči zgradba omatidija, ki ga tvori naključno število fotoreceptorskih celic, povezana s pridobitvijo polarizacijskega detektorja. Barvni vid žuželk temelji na strogo določenem vzorcu povezav med fotoreceptorji in nevroni; aksoni celic R1-6 izhajajo iz retine, se povezujejo z elementarnimi detektorji gibanja v lamini in so vpleteni v nastanek slike ter zaznavanje gibanja (Belušič, 2011). Aksoni centralnih rabdomer (R7 in R8) pa potekajo skozi lamino, tvorijo sinapse z nevroni drugega optičnega ganglija, imenovanega medula in so vpleteni v barvni vid in v zaznavanje polarizirane svetlobe (Katz in Minke, 2009). Nekatere žuželke imajo na dorzalnem delu očesa t.i. dorzalni obroč. To je regija očesa, ki je specializirana za zaznavo smeri polarizacije svetlobe (Land in Nilsson, 2002). Količina absorbirane svetlobe je večja, manjši je kot med e-vektorjem polarizirane svetlobe in osi dipola pigmentne molekule. Molekula pigmenta torej absorbira največ oziroma najmanj fotonov, če je e-vektor vzporedno oziroma pravokotno z njeno osjo dipola. Kadar osi dipolov pigmentnih molekul v celici potekajo vzporedno z dolžino mikrovilov in so mikrovili v rabdomeri orientirani vzporedno, potem je takšna celica selektivno vzdražna glede na ravnino

polarizacije svetlobe. Koruzne vešče nimajo dorzalnega obroča, temveč se polarizacijsko občutljive celice pojavljajo naključno v mrežnici sestavljenega očesa. Pridobitev polarizacijsko občutljivih celic v mrežnici sestavljenega očesa je verjetno vodila v smer pomnožitve rabdoma in števila fotoreceptorskih celic v omatidiju.

5.2 ELEKTROFIZIOLOGIJA

5.2.1 Elektrofiziološke meritve iz mrežnice

Do sedaj še nimamo trdnih dokazov, kdaj in kako pogosto so se razvile lastnosti, ki tvorijo predpogoj za barvni vid, npr. prisotnost dveh različnih opsinskih pigmentov v dveh različnih fotoreceptorjih in z njimi povezane nevronske povezave. Jasno je, da se je barvni vid razvil večkrat neodvisno. Dosedanji dokazi kažejo, da lahko opsine žuželk razdelimo v tri razrede. Ti razredi ustrezajo opsinom vidnih pigmentov, ki absorbirajo v ultravijoličnem (UV), modrem (B) in v dolgo-valovnem delu vidnega spektra (LW). Npr., čebele imajo po en opsin iz vsakega razreda izraženega ločeno v UV, modrih in zelenih receptorjih. Ta osnovni vzorec pa je pogosto močno spremenjen ravno pri metuljih, verjetno zaradi njihovega načina življenja, ki je odvisen od sposobnosti barvne diskriminacije. Oči metuljev imajo lahko tudi po več kot šest razredov fotoreceptorjev. To deloma temelji na številnih podvojitvah opsinov. Opsini B so se neodvisno podvojili v družinah Pieridae in Lycaenidae, podvajanje opsinov LW je bilo ugotovljeno pri metuljih družine Papilionidae in Riodinidae, in podvojitve opsinov UV pri rodu *Heliconius* iz družine Nymphalidae (Wakakuwa, 2005).

Meritve ERG in znotrajcelične meritve vseh treh vrst koruzne vešče se ujemajo z modelom absorpcije zelenega opsina z vrhoma absorpcije pri $\lambda_{\max\alpha}=534$ nm in $\lambda_{\max\beta}=367$ nm (nomogram prirejen po Stavenga in sod., 1993). Rezultati so bili pri samcih in samicah enaki. Pri vrstah iz reda Lepidoptera večinoma najdemo vsaj dva ali tri pigmente. Spektralna občutljivost koruzne vešče je podobna spektralni občutljivosti *Nyctemera amica* (Erebidae) in *Phalaenoides tristifica* (Agaristidae). Pri vrsti *P. tristifica* so s selektivno adaptacijo uspeli dokazati prisotnost UV pigmenta z vrhom pri okoli 370 nm (Horridge, 1977) (slika 28).

Jakost svetlobe se preko dneva močno spreminja in zato imajo akromatski signali večjo informacijsko vrednost kot kromatski signali (Warrant in Nilsson, 2006). Veliko nevretenčarjev uporablja divergentne povezave posameznih razredov fotoreceptorjev za prevajanje informacij v podsisteme vida: akromatski sistem za detekcijo kontrastov in gibanja, polarizacijski vid, fototakso in za prikrievanje in vsa ta vedenja so lahko barvno slepa (Warrant in Nilsson, 2006). Kot primer čebele, pri katerih zaznavanje gibanja temelji na receptorskih signalih iz zeleno občutljivih fotoreceptorjev, polarizacijski vid temelji na UV receptorjih, fototaksa pa temelji na vsoti signalov iz vseh receptorskih tipov (Warrant in Nilsson, 2006). Meja uporabnosti barvnega vida je določena z minimalno jakostjo

svetlobe in občutljivostjo oči, torej s številom razpoložljivih fotonov, ki jih vidni sistem zazna v temotnih pogojih. V večerni svetlobi je zaradi nizke jakosti svetlobe razmerje signal:šum zelo neugodno, kar omejuje barvno razločevanje. Razmerje se izboljša, tako da skupine fotoreceptorjev konvergirajo na skupen nevron. Receptorski signali za verodostojen signal konvergirajo skupaj in niso primerjani med seboj. Nočne in globokomorske živali rabijo dovolj občutljive oči, kar dosežejo s konvergenco fotoreceptorjev na skupen nevron, s čimer pride do barvne slepote. Večina vretenčarjev uporablja barvno slep sistem paličic za vid v šibki svetlobi in nočni vretenčarji imajo manj čepkov in večje število paličic, kot posledica adaptacije na njihov življenjski stil. Nevretenčarji pa imajo le en morfološki tip receptorjev za gledanje tako v svetli kot šibki svetlobi in nočne živali imajo manjše število fotoreceptorskih tipov. Poleg tega lahko v šibki svetlobi združijo signale iz različnih tipov receptorjev ali pa le uporabijo akromatski signal, ki ga posreduje najbolj občutljiv tip receptorjev (Warrant in Nilsson, 2006).

Glede na spektralno občutljivost imajo koruzne vešče v mrežnici tri tipe fotoreceptorskih celic, z vrhovi občutljivosti v UV, modrem in zelenem delu spektra. Prisotnost treh različnih tipov fotoreceptorskih celic pa še ne pomeni, da imajo razvit trikromatski barvni vid. Celice, občutljive v modrem delu spektra, so bile izjemno občutljive na smer polarizacije svetlobe, z maksimumom občutljivosti v dorzo-ventralni osi očesa. Predvidevamo, da so te celice vpletene v polarizacijski vid, v zaznavanje vzorca polarizirane svetlobe na nebu ter s tem položaja v prostoru ter navigacije. Celice s tako visoko polarizacijsko občutljivostjo niso primerne za zaznavo barv, saj bi pri njih že majhne spremembe kota polarizacije svetlobe proizvedle velike spremembe odziva in s tem lažne barvne kontraste. Koruzne vešče imajo torej najverjetneje dikromatski barvni vid, osnovan na osnovi fotoreceptorjev občutljivih na UV in zeleno svetlobo.

Že dva različna tipa fotoreceptorskih celic pa lahko služita za barvni vid, sprožata različne vedenjske vzorce, kot so fototaksa, iskanje partnerja ali ovopozicija. Zaznavanje gibanja je večinoma barvno slepo. Pri čebelah so takšna vedenja posredovana le z inputom receptorjev občutljivih na zeleno svetlobo. Potrebni so vedenjski eksperimenti, da dokažemo ali so odgovori fotoreceptorskih celic vključeni v sistem barvnega vida (Land in Chittka, 2013).

Primerjali smo povprečne spektralne občutljivosti vseh treh vrst koruznih vešč in pri glavnem vrhu občutljivosti (na zeleno svetlobo) nismo opazili razlik. Ko pa smo primerjali manjši vrh β (v UV delu spektra) *O. nubilalis* z *O. furnacalis* in *O. scapulalis* pa smo opazili statistično pomembne razlike. Razlog za razlike je veliko sipanje podatkov v UV delu spektra ter posledično slabo prileganje rodopsinskega nomograma (Stavenga, 1993). Predvidevamo, da je vzrok razlik v β vrhu slabo nadzorovana svetlobna adaptacija, ki učinkuje na UV vrh. Meritve na živalih *O. furnacalis* in *O. scapulalis* smo izvajali v večernem času in so bile bolj temno adaptirane kot živali *O. nubilalis*, pri katerih smo meritve izvajali podnevi. Predvidevamo, da bi se β vrh pri živalih *O. nubilalis* povišal, če

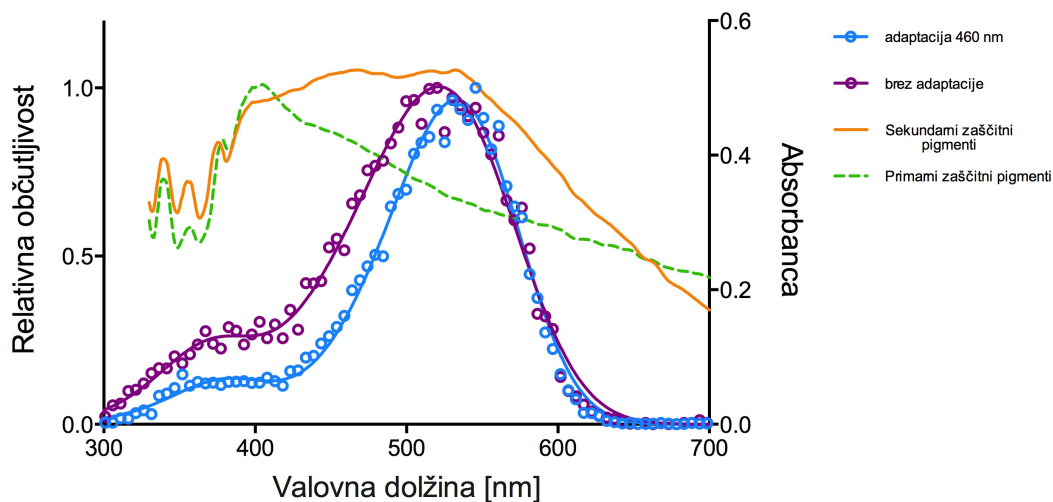
bi bile živali popolnoma temno adaptirane.

5.2.2 Pigmentne granule in adaptacija

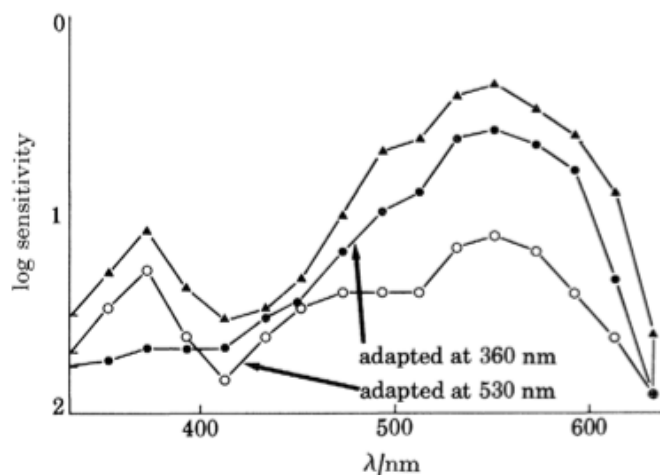
Zaščitni pigmenti v očeh nevretenčarjev uravnavajo tok svetlobe do fotoreceptorske membrane. Pigmenti so lahko znotraj fotoreceptorskih celic, v specializiranih zaščitnih pigmentnih celicah, v sloju glia celic okoli omatidijev in v epidermalnih celicah okoli oči. V pigmentiranih celicah glija in epidermalnih celicah pigmentne granule služijo optični izolaciji in določajo kotno občutljivost in ostrino vida. Migracije zaščitnih pigmentov lahko zožijo ali razširijo pupilo ter razkrijejo ali zakrijejo tapetum (Warrant in Nilsson, 2006).

Pri selektivni adaptaciji smo oko selektivno adaptirali s konstantno monokromatsko svetlobo različnih valovnih dolžin. V primeru različnih tipov fotoreceptorskih celic, bi monokromatska adaptacijska svetloba selektivno zmanjšala odziv tistih fotoreceptorskih celic, ki so najbolj občutljive v delu spektra adaptacijskega dražljaja. Selektivna adaptacija je povzročila znižanje odziva pri valovnih dolžinah med 300 in 540 nm pri vseh valovnih dolžinah adaptacijske svetlobe. Razlog za znižanje odziva v UV delu spektra je absorpcija svetlobe s pigmentnimi granulami primarnih in sekundarnih pigmentnih celicah, v zelenem delu spektra pa je razlog manjšega odziva ERG absorpcija svetlobe s pigmentnimi granulami sekundarnih pigmentnih celic, katerih granule absorbirajo svetlobo valovnih dolžin do 540 nm (Slika 27).

Selektivna adaptacija z monokromatsko svetlobo ni izzvala selektivne supresije občutljivosti mrežnice in s tem ni razkrila različnih tipov fotoreceptorjev. Dopuščamo možnost zelenih in UV receptorjev, ki jih zaradi delovanja primarnih in sekundarnih pigmentov nismo uspeli prikazati. Kot primer uspešne selektivne adaptacije vzemimo *Phalaenoides tristifica*, pri kateri je spektralna občutljivost očesa enaka kot pri koruzni vešči. Adaptacijska svetloba pa je selektivno zmanjšala odziv tistih fotoreceptorskih celic, ki so najbolj občutljive v tem delu spektra adaptacijskega dražljaja (slika 28) (Horridge in sod, 1977).



Slika 27: Povezava med učinkom selektivne adaptacije (leva ordinata, adaptacija s svetlobo valovne dolžine 460 nm) in absorbanco primarnih in sekundarnih zaščitnih pigmentov (desna ordinata). Pri adaptaciji se zmanjša odziv na dražljaj med 300 in 540 nm, kar sovпада z maksimumom absorbanco pigmentnih granul.



Slika 28: Spektralna občutljivost očesa *Phalaenoides tristifica* z adaptacijsko svetlobo valovnih dolžin 360 in 530 nm. Spektralna občutljivost se spremeni pri adaptaciji z dolgo- in kratkovalovno svetlobo, kar kaže na prisotnost zelenega in UV pigmenta. Vir slike: Horridge in sod., 1977.

5.2.3 Spektralna občutljivost ocelov

Oceli večine žuželk vsebujejo dva ali tri vidne pigmente; enega z vrhom občutljivosti v UV delu svetlobnega spektra in dodatne pigmente z maksimalno občutljivostjo na modro ali zeleno svetlobo (Berry in sod., 2010). Oceli metuljev koruzne vešče imajo primarni vrh občutljivosti v UV delu spektra (~360 nm) ter sekundarni vrh v zelenem delu spektra (~540 nm). Podatkom spektralne občutljivosti smo prilagodili model absorpcije dveh opsinov (nomogram prirejen po Stavenga in sod., 1993). Oceli *O. nubilalis* vsebujejo dva

vidna pigmenta, UV- in zeleno-občutljivi opsin in imajo potencial za dikromatski barvni vid.

Wilson (1978) je predlagal, da je občutljivost v UV delu spektra zelo koristna za vidni sistem žuželk, ki sodeluje pri določanju položaja telesa, saj je kontrast med nebom in zemljo še posebej močan v UV delu spektra. Poznamo vrste, ki v svojih ocelih nimajo kratkovalovnih vidnih pigmentov, npr. nočni ščurki *Periplaneta americana* ali *Blaberus craniifer*. Pri njih so našli le en vidni pigment z vrhom občutljivosti pri 500 nm (Goldsmith in Ruck, 1958). Ščurki niso dobri letalci, zato so morda visoko kontrastne razlike med nebom in zemljo v UV območju za njih manj pomembne in njihovih oceli imajo najverjetneje neko drugo funkcijo (Berry, 2010).

5.3 Aplikacija rezultatov

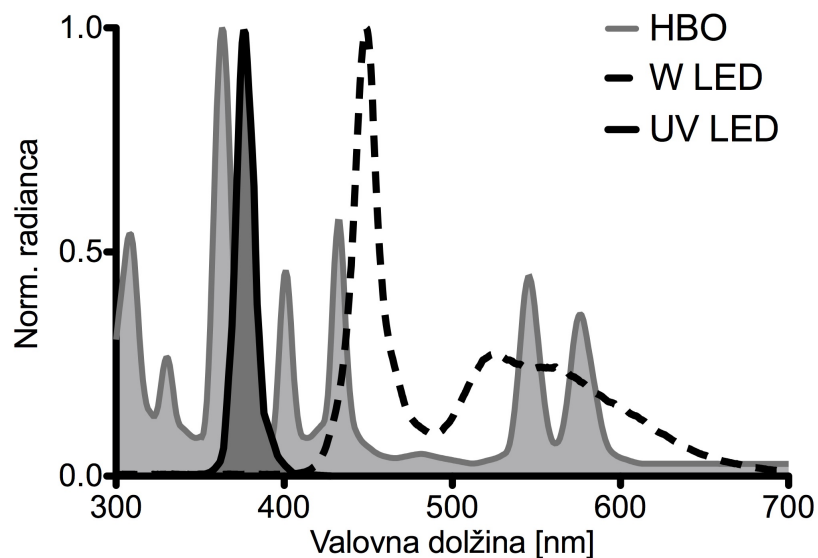
Pojavljane in razvoj populacij škodljivih žuželk lahko spremljamo z različnimi pastmi, kar služi določanju potrebe zatiranja škodljivcev in njihove časovne opredelitve. Pri dosedanjih feromonskih in drugih privabilnih vabah so potrebni redni terenski vizuelni pregledi, zato je vse bolj aktualno daljinsko zaznavanje škodljivih organizmov.

Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) v Žalcu že več kot 30 let spremljajo dinamiko pojavljanja metuljev koruznih vešč in svetlobna vaba se je izkazala za najbolj uspešno metodo spremljanja. V svetlobnih pasteh uporabljajo visokotlačne živosrebrne HBO sijalke, ki imajo izrazite emisijske vrhove v vidnem in UV delu svetlobnega spektra. Slabost HBO sijalk je, da se lahko napajajo le iz 220V omrežja, zato so neuporabne na večini kmetijskih zemljišč. S podjetjem Efos iz Razdrtega poskušajo izdelati svetlobno vabo, ki bi lahko delovala na akumulatorski pogon, brez omrežne napeljave. Gre za delta past s sončno celico, ki napaja baterijo in tako je past na terenu neodvisna. V pasti so lepljive plošče in sistem šestih kamer, ki posnamejo posamezne odseke lepljive plošče. Slike se preko GPRS protokola prenesejo v centralni strežnik, kjer se obdelajo in jih lahko vidimo v spletni ali mobilni aplikaciji Trapview. Za podatke o ulovljenih žuželkah ni treba iti na teren, saj lahko s slik odčitamo podatke o ulovljenih žuželkah (Rodič in sod., 2013).

HBO so se odločili nadomestiti z belo LED sijalko, ki pa je bila popolnoma neučinkovita, saj ni privabila nobenih žuželk. Za pomoč so se obrnili na Katedro za fiziologijo, antropologijo in etologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Na osnovi naših meritev smo jim svetovali, naj za izdelavo svetlobne pasti uporabijo UV LED sijalko (slika 30).

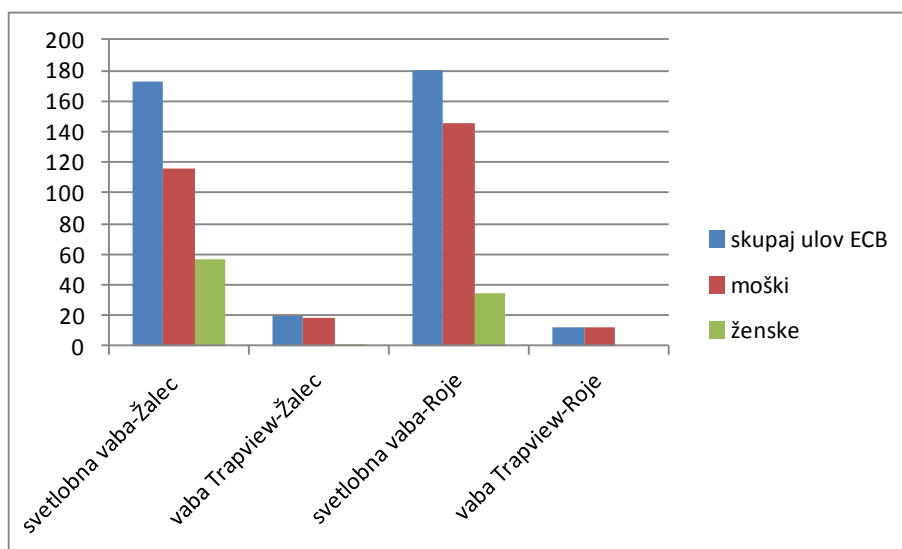


Slika 29: Na podlagi naših rezultatov spektralne občutljivost mrežnice in fotoreceptorjev koruzne vešče so Štefančič Matej in sod. iz EFOS d.o.o. izdelali ustrezno svetlobno past z UV LED sijalko, ki uspešno lovi metulje koruzne vešče v času njihovega izletavanja v hmelju ali koruzi. Avtor slike: Matej Štefančič.



Slika 30: Spektralne lastnosti svetil, uporabljenih pri spremljanju koruzne vešče, izražene kot odvisnost normalizirane radianca od valovne dolžine. Svetlosiva krivulja prikazuje spekter visokotlačne živosrebrne sijalke (HBO). Izraziti emisijski vrhovi se pojavljajo vzdolž vidnega in UV dela svetlobnega spektra. Črtkana krivulja prikazuje spekter bele LED (W LED). Bela LED emitira svetlobo nad 420 nm in ne v UV delu spektra. Črna krivulja prikazuje spekter UV LED (UV LED). Ta svetilka ima maksimum v UV delu spektra pri 375 nm in njena pasovna širina znaša okoli 20 nm.

Izvor podatkov: HBO, Zeiss microscopy campus; W LED in UV LED, Roithner Lasertechnik. Avtor slike: Belušič, 2014.



Slika 31: Ulov koruzne vešče s svetlobno vabo z živosrebrno sijalko (HBO) v primerjavi z ulovom na vabo Trapview z UV LED sijalkami v letu 2014. Vir podatkov: IHPS-Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije.

Ulov koruzne vešče je mnogo manjši, saj predstavlja od 7,0 do 10,3 % ulova na klasično svetlobno vabo (Rak Cizej in sod., 2014). Ker pa je električna moč LED vabe 300 krat manjša od moči HBO sijalke, razlika med njunima učinkovitostma pa je 10 do 14 kratna, je torej izkoristek LED vabe 23 do 33 krat višji od izkoristka HBO sijalke.

6 SKLEPI

Vidni sistem koruzne vešče je sestavljen iz sestavljenih oči in ocelov. Oči odlikuje superpozicijska optika z dobro razvitim tapetumom in z aperturo max. ~175 faset, ki se pri svetlo adaptiranih očeh popolnoma zatemni. Omatidiji v bistrem pasu vsebujejo dobro razvit distalni rabdom premera 1-2 mm, ki v svetlo adaptiranem očesu najverjetneje omogoča zmerno oster vid z apozicijsko optiko, omejen s sorazmerno majhnim interomatidijskim kotom 2,3°. Zunajcelična meritev spektralne občutljivosti z ERG in selektivno adaptacijo je razkrila vrh občutljivosti v zelenem delu spektra in dodaten vrh v kratkovalovnem delu. Vrh v kratkovalovnem delu je odvisen od učinkovitosti, ne pa od valovne dolžine adaptacijskega dražljaja. Znotrajcelične meritve so pokazale, da ima prevladujoči tip fotoreceptorjev vrh občutljivosti v zelenem delu spektra, sekundarni vrh občutljivosti mrežnice pa v UV delu spektra. Najverjetneje dikromatski vid in nočni način življenja sta verjetno vplivala na strukturo omatidijev, ki jih sestavlja naključno število 9-12 fotoreceptorskih celic. Vid koruzne vešče je znotraj rodu *Ostrinia* visoko ohranjen, saj med evropsko in dvema vrstama azijske vešče (*O. scapulalis*, *O. furnacalis*) nismo zaznali fizioloških in anatomskih razlik. Spektralna občutljivost ocelov kaže dva izrazita vrhova v UV in zelenem delu spektra pri 357 nm in 534 nm. Sklepamo, da imajo oceli dikromatski

vid, ki vešči omogoča detekcijo z zaznavo horizonta. Koruzne vešče je moč uloviti s svetlobnimi pastmi. Pri tem je živosrebrna sijalka učinkovita, bela LED sijalka pa ne. Ugotovili smo, da bela LED sijalka ne oddaja UV svetlobe. Ker gre za dikromatski sistem iz UV in zeleno občutljivih receptorjev, smo za privabljanje vešče uporabili UV LED sijalke z vrhom pri 370 nm. S takšnimi sijalkami smo bili pri lovu koruzne vešče uspešni.

7 POVZETEK

Raziskali smo vid treh vrst koruznih vešč, evropske vrste *Ostrinia nubilalis* ter dveh azijskih vrst *O. furnacalis* in *O. scapularis*. Koruzne vešče povzročajo veliko gospodarsko škodo v Evropi ali v Aziji in so pomembni škodljivci predvsem koroze in hmelja. Koruzna vešča je aktivna zvečer, zato ima oči prilagojene na vid v šibki svetlobi.

Sestavljene oči koruznih vešč smo preučili pod svetlobnim in presevnim elektronskim mikroskopom. Kristalni stožci in fotoreceptorske celice v vseh treh vrstah koruznih vešč imajo morfološke značilnosti, ki so značilne za tipične superpozicije oči. Ker pa je dioptrični aparat v kontaktu z distalnim delom rabdoma, kar je lastnost apozicijskih oči, lahko oči koruzne vešče uvrstimo v vmesni tip med superpozicijske in apozicijske oči. Proksimalni rabdome ima obliko cveta, kar so do sedaj opazili samo v superpozicijskih očeh.

Spektralne občutljivosti superpozicijskih oči in ocelov smo izmerili z elektrofiziološkimi metodami s ciljem, da bi izdelali ustrezno svetlobno past. Senzorične lastnosti v njihovem vidnem sistemu smo izmerili in prikazali kot zunajcelični elektroretinogram (ERG), za podrobnejšo sliko pa smo opravili tudi znotrajcelične meritve iz fotoreceptorskih celic. *O. nubilalis*, *O. furnacalis* in *O. scapularis* so najbolj občutljive na zeleno svetlobo, s primarnim vrhom v zelenem in sekundarnim vrhom v ultravijoličnem delu spektra. Elektrofiziološke meritve smo izvajali na temno adaptiranih živalih in podatke smo združili za samce in samice. Selektivna adaptacija z monokromatsko svetlobo ni izzvala selektivne supresije občutljivosti mrežnice, temveč je prišlo do zmanjšanja odgovora ERG. Razlog za zmanjšanje odgovora ERG je v primarnih in sekundarnih pigmentnih celicah. Pigmentne celice vsebujejo granule s temno rjavim pigmentom, ki deluje kot ščit med posameznimi omatidiji in ureja svetlobni tok na rabdome. Izmerili smo absorbanco primarnih in sekundarnih pigmentnih celic in območje njihove absorbance sovpada z območjem valovnih dolžin, kjer je prišlo do manjšega odgovora ERG. Meritve so bile narejene na očesu svetlo adaptirane živali.

Spektralna občutljivost temno adaptiranih ocelov, izmerjena z ERG, kaže najvišjo občutljivost v UV delu spektra in manjši sekundarni vrh občutljivosti na zeleno svetlobo. Domnevamo, da oceli *O. nubilalis* vsebujejo dva vidna pigmenta, vsakega v drugem tipu receptorskih celic in imajo tako potencial za dikromatski barvni vid.

8 VIRI

- Arikawa K., Stavenga D. 1997. Random array of colour filters in the eyes of butterflies. *The Journal of Experimental Biology*, 200: 2501–2506
- Autrum H. 1981. Light and dark adaptation in invertebrates. *Handbook of sensory physiology*, Vol VII/6c. Berlin, Springer: 91 str.
- Belušič G. 2011. ERG in *Drosophila*. V: *Electroretinograms*. Belušič G. (ur.). Rijeka, InTech Europe: 221–238
- Belušič G., Pirih P., Stavenga D. G. 2013. A cute and highly contrast-sensitive superposition eye – the diurnal owlfly *Libelloides macaronius*. *The Journal of Experimental Biology*, 216: 2081–2088.
- Berry R. P., Weislo . T., Warrant E. J. 2010. Ocellar adaptations for dim light vision in a nocturnal bee. *The Journal of Experimental Biology*, 214: 1283–1293
- Bernard G. D., Remington C. L. 1991. Color vision in *Lycaena* butterflies: spectral tuning of receptor arrays in relation to behavioral ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 2783–2787
- Bernhard C. G., Miller W. H. 1962. A corneal nipple pattern in insect compound eyes. *Acta Physiologica Scandinavica*, 56: 385–386
- Bernhard G. D., Gemne G., Sällström J. 1970. Comparative ultrastructure of corneal surface topography in insects with aspects on phylogenesis and function. *The Journal of Comparative Physiology*, 67: 1–25
- Blest A. D., Land M. F. 1977. The physiological optics of *Dinopis subrufus*, a fish lens in a spider. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 196: 197–222
- Calcagno V., Thomas Y., Bourguet D. 2007. Sympatric host races of the European corn borer: adaptation to host plants and hybrid performance. *Journal of Evolutionary Biology*, 20: 1720–1729

- Calcagno V., Bonhomme V., Thomas Y., Singer M. C., Bourguet D. 2010. Divergence in behaviour between the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, and its sibling species *Ostrinia scapularis*: adaptation to human harvesting? Proceedings of the Royal Society of London B, 277: 1694–2703
- Dolinar M., Ferant N., Žolnir M., Simončič A., Knapič V. 2002. Bolezni, škodljivci in pleveli v hmeljskih nasadih. Prosenka (=koruzna vešča) (*Ostrinia nubilalis*). Priročnik za hmeljarje. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije: 70–71
- Fischer A., Horstmann G. 1970. Der Feinbau des Auges der Mehlmotte, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae). Z Zellforsch 116: 275–304
- Fischer S. 2012. Structural and functional changes of insect eyes in cases of miniaturization. Doktorska disertacija. Nemčija, Science Jacobs University Bremen, School of Engineering and Science: 202 str.
- 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
- Friedrich M., Wood E. J., Wu M. 2011. Developmental evolution of the insect retina: insights from standardized numbering of homologous photoreceptors. Journal of Experimental Zoology, Molecular and Developmental Evolution, 316: 484–499
- Gemne G. 1971. Ontogenesis of corneal surface ultrastructure in nocturnal Lepidoptera. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 262: 343–363
- Gleadall I. G., Hariyama T, Tsukahara Y. 1989. The visual pigment chromophores in the retina of insect compound eyes, with special reference to the Coleoptera. Journal of Insect Physiology, 35: 787–795
- Goldsmith T. H., Ruck P. R. 1958. The spectral sensitivities of the dorsal ocelli of cockroaches and honeybees: an electrophysiological study. The Journal of General Physiology, 41: 1171–1185
- Gomboc S., Carlevaris B., Vrhovnik D., Milevoj L., Celar F. 1999. Bionomija koruzne vešče (*Ostrinia nubilalis*) v Sloveniji. Zbornik predavanj in referatov s 4. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. Portorož: 459–467

- Hardie R. C. 1986. The photoreceptor array of the dipteran retina. *Trends in Neurosciences*, 9: 419–423
- Hardie R. C. 2001. Visual transduction in *Drosophila*. *Nature*, 413:186–193.
- Hardie R. C., Franze Kristian. 2012. Photomechanical Responses in *Drosophila* Photoreceptors. *Science* 338: 260–263
- Henderson, S. R., Reuss, H., Hardie, R. C. 2000. Single photon responses in *Drosophila* photoreceptors and their regulation by Ca^{2+} . *The Journal of Physiology*, 524: 179–194.
- Honkanen A. in Meyer-Rochow V. B. 2009. The eye of the parthenogenetic and minute moth *Ectoedemia argyropeza* (Lepidoptera: Nepticulidae). *European Journal of Entomology*, 106: 619–629
- Horridge G. A., McLean M., Stange G., Lillywhite P. G. 1977. A diurnal moth superposition eye with high resolution *Phalaenoides tristifica* (Agaristidae). *Proceedings of the Royal Society of London*, 196: 233–250
- Kageyama D., Hoshizaki S., Ishikawa Y. 1998. Female-biased sex ratio in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*: evidence for the occurrence of feminizing bacteria in an insect. *Heredity*, 81: 311–316
- Kaiser W., Liske E. 1974. Optomotor reactions of stationary flying bees during stimulation with spectral light. *Journal of Comparative Physiology*, 89: 391–408
- Katz B., Minke B. 2009. *Drosophila* photoreceptors and signaling mechanisms. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 3, 2: 18 str.
- Kitamoto J., Sakamoto K., Ozaki K., Mishina Y., Arikawa K. 1998. Two visual pigments in a single photoreceptor cell: identification and histological localization of three mRNAs encoding visual pigment opsins in the retina of the butterfly *Papilio xuthus*. *The Journal of Experimental Biology*, 201: 1255–1261
- Land M. F. 1997. Visual acuity in insects. *The Annual Review of Entomology*, 42: 147–77
- Land M. F. 1981. Optics and vision in invertebrates. V: *Handbook of Sensory Physiology*. H. Autrum. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 7: 471–592

- Land M. F., Nillson D. E. 2002. Animal eyes. New York, Oxford University Press: 221 str.
- 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
- Laughlin S. B. 1990. Invertebrate vision at low luminances. In night vision, eds. Hess R. F., Sharpe L.T., Nordby K. Cambridge: Cambridge University Press: 223–250
- Leggett L. M. W., Stavenga D. G. 1981. Diurnal changes in angular sensitivity of crab photoreceptors. *Journal of Comparative Physiology*, 144: 99–109
- Lehrer M. 1998. Looking all around: honeybees use different cues in different eye regions. *The Journal of Experimental Biology*, 201: 3275–3292
- Lythgoe J. N. 1979. The ecology of vision. Oxford, Clarendon Press: 244 str.
- Malausa T., Bethenod M. T., Bontemps A., Bourguet D., Cornuet J. M., Ponsard S. 2005. Assortative mating in sympatric host-races of the European corn borer. *Science* 308: 258–260
- Matić T., Laughlin S. B. 1981. Changes in the Intensity-Response Function of an Insect's Photoreceptors Due to Light Adaptation. *Journal of Comparative Physiology*, 145: 169–177
- Meyer-Rochow V. B., Lau T. F. S. 2008. Sexual dimorphism in the compound eye of the moth *Operophtera brumata* (Lepidoptera, Geometridae). *Invertebrate Biology*, 127: 201–216
- Munkvold G. P., Hellmich R. L., Showers W. B. 1997. Reduced Fusarium Ear Rot and Symptomless Infection in Kernels of Maize Genetically Engineered for European Corn Borer Resistance. *Phytopathology*, 87: 1071–1077
- Nafus D. M., Schreiner I. H. 1991. Review of the biology and control of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lep: Pyralidae). *Tropical Pest Management*, 37(1): 41–56
- Osorio D. 1986. Ultraviolet sensitivity and spectral opponency in the locust. *The Journal of Experimental Biology*, 122: 193–208

- Osorio D., Bacon J. P. 1994. A good eye for arthropod evolution. *BioEssays*, 16: 419–424
- Osorio D., Averof M., Bacon J. P. 1995. Arthropod evolution: great brains, beautiful bodies. *Trends in Ecology & Evolution*, 10: 449–454
- Pelozuelo L., Frerot B. 2007. Monitoring of European corn borer with pheromone-based traps: Review of trapping system basics and remaining problems. *Journal of economic entomology*, 100: 1797–1807
- Rak Cizej M., Leskošek G., Radišek S. 2008. Koruzna (prosenca) vešča vse pogostejša škodljivka naših hmeljišč. *Hmeljar (Žalec)*, 70: 90–92
- Rak Cizej M., Leskošek G., Radišek S. 2009. Koruzna vešča v slovenskih hmeljiščih. Zbornik seminarja. Žalec: Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije: 107–113
- Rak Cizej M., Kárpáti Z., Leskošek G., Radišek S. 2010. Določitev rase koruzne vešče (*Ostrinia nubilalis* Hübner) v Savinjski dolini; preliminaren poskus spremljanja moških metuljev s feromonsko vabo. *Hmeljarski bilten* 17: 65–73
- Rak Cizej M., Radišek S., Leskošek G. 2012. Koruzne vešča, znana škodljivka hmelja. *Hmeljar*, 74: 23–25
- Rak Cizej M., Šporar K., Štefančič M., Štefančič ;, Belušič G. 2014. Preizkus LED svetlobne vabe pri spremljanju pojava koruzne vešče (*Ostrinia nubilalis* HÜBNER). *Hmeljarski bilten* 21: 14–26
- Ribi W. A. 1978. Ultrastructure and migration of screening pigments in the retina of *Pieris rapae* L. (Lepidoptera, Pieridae). *Cell and Tissue Research*, 191: 57–73
- Rodič K., Bajec D., Štefančič M., Štefančič M., Čebokli P. 2013. Daljinsko zaznavanje s feromonsko vabo na primeru koruzne vešče (*Ostrinia nubilalis* [Hübner]). V: Zbornik predavanj in referatov 11. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, Bled, 5. in 6. marec 2013. Trdan S., Maček J. (ur.). Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 168–171
- Seki T., Vogt K. 1998. Evolutionary aspects of the diversity of visual pigment chromophores in the class Insecta. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 119: 53–64

- Song Z., Postma M., Bilings S. A., Coca D., Hardie R., Juusola M. 2012. Stochastic, Adaptive Sampling of Information by Microvilli in Fly Photoreceptors. *Current Biology*, 22: 1371–1380
- Stavenga D. G., Smits R. P., Hoenders B. J. 1993. Simple exponential functions describing the absorbance bands of visual pigment spectra. *Vision Research*, 33: 1011–1017
- Stavenga D. G. 2002. Reflections on colourful ommatidia of butterfly eyes. *The Journal of Experimental Biology*, 205: 1077–1085
- Stavenga D. G., Foletti S., Palasantzas G., Arikawa K. 2006. Light on the moth-eye corneal nipple array of butterflies. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 273: 661–667
- Stone G. C., Koopowitz H. 1976. The ultrastructural organization of the visual system of the Wax Moth, *Galleria mellonella*: The optic tract. *Cell and Tissue Research*, 174: 533–545
- Takanashi T., Nakano R., Surlykke A., Tatsuta H., Tabata J., Ishikawa Y., Skals N. 2010. Variation in Courtship Ultrasounds of Three *Ostrinia* Moths with Different Sex Pheromones. *PLoS ONE*, 5: e13144
- Terakita A. 2005. The opsins. *Genome Biology*, 6: 213
- Thomas Y., Bethenod M. T., Pelozuelo L., Frérot B., Bourguet, D. 2003. Genetic isolation between two sympatric host-plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner. I. Sex pheromone, moth emergence timing. *Evolution* 57: 261–273
- Tomlinson A., Ready D. F. 1987. Cell fate in the *Drosophila* ommatidium. *Developmental Biology*, 123: 264–275
- Troje N. 1993. Spectral categories in the learning behaviour of blowflies. *Zeitschrift für Naturforschung*, 48c: 96–104
- Wakakuwa M., Kurasawa M., Giurfa M., Arikawa K. 2005. Spectral heterogeneity of honeybee ommatidia. *Naturwissenschaften*, 92: 464–467

- Warrant E. J., McIntyre P. D. 1993. Arthropod eye design and the physical limits to spatial resolving power. *Progress in Neurobiology*, 40: 413–461
- Warrant E. J., Bartsch K., Günther C. 1999. Physiological optics in the hummingbird hawkmoth: a compound eye without ommatidia. *The Journal of Experimental Biology*, 202: 497–511
- Warrant E. J., Nilsson D. E. 2006. *Invertebrate vision*. New York, Oxford University Press: 570 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
- Williams D. S. 1982. Ommatidial structure in relation to turnover of photoreceptor membrane in the locust. *Cell and Tissue Research*, 225: 595–617
- Yack J. E., Johnson S. E., Brown S. G., Warrant E. J. 2007. The eyes of *Macrosoma* sp. (Lepidoptera: Hedyloidea): A nocturnal butterfly with superposition optics. Elsevier. *Arthropod Structure & Development* 36: 11–22
- Yang C. Y., Tsai Y. L., Sung C. K., Yu P., Kuo H. C. 2014. Superhydrophobic, antiadhesive, and antireflective surfaces mediated by hybrid biomimetic salvinia leaf with moth-eye structures. *Applied Physics Express* 7, 8: 87001–87001

Šporar K. Barvni vid koruzne veščice (*Ostrinia nubilalis*).

Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

ZAHVALA

ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. Gregorju Belušiču za odlično mentorstvo, vse dragocene izkušnje, prijaznost in pomoč. Iskrena hvala za vse nepozabne dni tako doma kot v tujini.

Hvala dr. Magdi Rak Cizej iz Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu za živali evropske koruzne vešče in prof. Yukiui Ishikawa iz Univerze v Tokiu za azijske koruzne vešče.

Najlepša hvala prof. dr. Kentaru Arikawa, iz Univerze Sokendai na Japonskem za pomoč pri pripravi preparatov za elektronsko mikroskopijo ter pri samem mikroskopiranju. Obljubim, da se bo smola Epon vedno zelo dolgo mešala. Hvala tudi za razkritje kje imajo najboljše suši in za vse ostale japonske specialitete.

Hvala prof. dr. Doekeli Stavenga za spektrofotometrijske meritve in asist. dr. Primožu Pirihi za podatke o refleksiji iz sestavljenega očesa.

Zahvaljujem se tudi Katedri za zoologijo za možnost nastanka mojih pol tankih rezin ter hvala Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo za njihovo ovekovečenje.

Hvala recenzentu prof. dr. Marku Kreftu za pregled magistrskega dela. Zahvaljujem se celotni Katedri za fiziologijo, antropologijo in etologijo za prijetno vzdušje. Hvala Niki, Marku in Jerneji za pomoč in družbo pri elektrofizioloških meritvah.

Hvala vsem, ki ste celotno izkušnjo naredili še toliko bolj zabavno!