

东亚飞蝗脑的形态学观察及三维重建*

连国云^{1**} 李德智² 陈义昆¹ 娄延霞² 刘志刚^{1***}

(1. 深圳大学医学院 深圳 518060; 2. 中国农业科学院植物保护研究所农业部生物防治重点开放实验室 北京 100081)

摘要 本文主要研究东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) 脑部的形态结构及其三维重建模型。采用石蜡包埋切片, 在光镜下观察了东亚飞蝗脑部的形态结构, 其由前脑、中脑和后脑 3 部分组成。为了获得整只蝗虫的连续、完整的图像数据集, 采用冰冻切片技术将冰冻包埋剂 (OCT) 包埋的飞蝗成虫做连续切片。然后利用图像处理方法对飞蝗脑部的连续切片进行配准、分割, 再用三维重建软件 Image-Pro Plus (IPP) 对分割后的脑部二维图像序列进行三维重建, 构建出的飞蝗脑部三维结构模型可以任意旋转, 能从不同角度观察。其结果为蝗虫生理和防蝗治蝗提供科学依据。

关键词 东亚飞蝗, 脑部, 形态结构, 三维重建

Morphological observation and 3D reconstruction of the brain of *Locusta migratoria manilensis*

LIAN Guo-Yun^{1**} LI De-Zhi² CHEN Yi-Kun¹ LOU Yan-Xia² LIU Zhi-Gang^{1***}

(1. School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 2. Key Laboratory for Biological Control of Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract The morphological structure of the brain of *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) was observed and a 3D digital model of the brain developed. The brain was dissected and observed under light microscopy. The brain was found to consist of a protocerebrum, deutocerebrum and tritocerebrum. In order to obtain a 2D sectional image dataset of the locust, male adults were embedded in frozen embedding medium (OCT) and sliced into sections, and a 2D image of each section was stored in a dataset. After registering and segmenting the brain regions in the serial section images using image processing methods, Image-Pro Plus (IPP) was used to reconstruct a 3D model of the brain which can be freely rotated and observed from any angle. This model provides a basis for scientific research on grasshopper physiology and locust control.

Key words *Locusta migratoria manilensis*, brain, morphological structure, 3D reconstruction

昆虫的大脑是中枢神经系统的主要部分, 其主要生理功能是主宰昆虫的生命活动、感觉和行为运动等。因此, 对昆虫脑部结构的研究在昆虫学方面有着非常重要的意义, 而且也成为探索害虫生物防治的重要途径。在昆虫脑部结构的研究中, 三维可视化技术能大大促进脑部复杂性结构的分析。国内外许多研究者都开展了对昆虫脑部结构的三维可视化研究, 如果蝇 *Drosophila melanogaster* (Rein *et al.*, 2002) 和蜜蜂 *Apis*

mellifera (Brandt *et al.*, 2005) 三维标准脑的建立, 此外, 也有研究者只针对某个昆虫重构其脑部结构, 这些昆虫包括蟑螂 *Diploptera punctata* (Chiang *et al.*, 2001) 和 *Leucophaea maderae* (Reischig and Stengl, 2002), 飞蛾 *Lobesia botrana* (Masante-Roca *et al.*, 2005), 蜜蜂 (Galizia *et al.*, 1999), 果蝇 (Iyengar *et al.*, 2006; Jefferis *et al.*, 2007) 以及寄生蜂 *Cotesia glomerata* 和 *C. rubecula* (Smid *et al.*, 2003) 等。国内对昆虫脑部结构的三维重建报道

* 资助项目: 国家 863 计划 (2006AA10Z236); 深圳市科技计划项目。

** E-mail: lgyun2005@gmail.com

*** 通讯作者, E-mail: lzg@szu.edu.cn

收稿日期: 2011-12-30, 接受日期: 2012-05-28

较少,更多的是研究昆虫脑部的形态结构,如对拟黑多刺蚁 *Polyrhachis vicina* (贺丽清等,2006)、中华蜜蜂 *Apis cerana* (李兆英和奚耕思,2007)、蟋蟀 (李娜等,2008) 和光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* (王建礼等,2009) 等昆虫的脑的形态结构作了初步的研究。

蝗虫作为世界性的重要害虫,给农业生产和人民生活带来了严重的威胁。我国自古就是一个受蝗灾危害严重的国家,蝗灾大面积、频繁的暴发给我国农业生产和国民经济造成严重的危害。本文对东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) 脑部结构进行了形态学观察并利用计算机技术重建出了脑部的三维模型以期对东亚飞蝗的脑部结构和功能有更深入的了解,同时,该研究在动物演化及蝗虫的生物防治方面也有着非常重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料准备

将东亚飞蝗卵块放入灭菌的蛭石中,于温度 28 ~ 30℃、相对湿度 50% ~ 70%、光照 2 000 lx 条件下孵化。在 30 cm × 30 cm × 40 cm 养虫笼中以新鲜小麦苗饲喂。待其羽化为成虫后,选择体长 2.5 ~ 2.6 cm 之间的雄成虫作为实验标本。

1.2 石蜡切片的制作与观察

将雄成虫用 PBS 洗净后以 Bouin 液固定 24 h,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡 (Sigma 公司) 浸透和包埋,作厚度为 5 μm 的连续切片。蜡带展于已包被 Poly-L-lysine (Sigma 公司) 的载玻片上,60℃ 烤干。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后作 HE 染色,光学显微镜 (Olympus BX51) 连续观察其内部结构并拍照 (Olympus DP 70)。

1.3 冰冻切片图像数据采集

将成虫体装入 7 mL 离心管中,注入 OCT 包埋剂后,于液氮中速冻,制成圆柱形样本。实验中采用 LeiCa CM3050S 冰冻切片机对样本以 25 μm 为步进连续切片,在切片的同时,用固定的数码相机对每一切片进行拍摄,采集切片的图像数据,建立原始图像数据集。

1.4 脑部的三维重建

选择事先准备好的冰冻切片图像集,结合蝗虫的脑部形态结构及相邻两截面图像间的连续性

和完整性,利用人机交互的处理方法对蝗虫的连续切片图像进行配准。在配准的基础上,采用图像分割中的阈值分割及人机交互将脑部区域进行分割,得到分割后的脑部图像数据集。最后应用三维图像分析软件 Image-Pro Plus (IPP, Media Cybernetics, USA) 对分割好的脑部图像进行基于表面的三维重建。在重建的过程中,根据软件对标尺的校正,以图片实际像素和切片的层距进行计算,将 X, Y, Z 坐标轴的比例设置为 1:1:6,得到东亚飞蝗脑部的三维模型。

2 结果与分析

2.1 东亚飞蝗的脑部形态结构

东亚飞蝗的脑由紧密相连的前、中、后脑 3 部分组成,位于咽的背面,又称为咽上神经节,且前、中、后脑均由左、右两个脑叶组成 (图 1)。前脑 (protocerebrum) 的左右两侧有突出的视叶 (optic lobe),直接与复眼相连,因此前脑是视觉的中心。左右对称分布的 2 个蕈体 (mushroom body) 是前脑最重要的联络中心,其大小与蝗虫行为的复杂性密切相关。前脑的视叶形成 3 个神经联系中心,由外向内依次是视叶神经片 (lamina ganglionaris)、视外髓 (medulla externa) 和视内髓 (medulla interna)。中脑 (deutocerebrum) 包括两个膨大的触角叶 (antennal lobes),是蝗虫嗅觉的神经中心。后脑 (tritocerebrum) 较小。

2.2 东亚飞蝗脑部三维重建可视化结果

基于分割出的东亚飞蝗脑部连续冰冻切片图像,利用 IPP 软件进行表面重建,获得东亚飞蝗脑部结构的整体三维表面模型 (图 2:A)。重建的三维脑部模型可清楚地显示,东亚飞蝗的脑部是由紧密相连的前脑 (protocerebrum, PC)、中脑 (deutocerebrum, DC) 及后脑 (tritocerebrum, TC) 3 部分组成,且前、中、后脑均由左、右两个脑叶组成。前脑的左右两侧有突出的两个视叶 (optic lobe, OL)。重建出的三维脑部模型结果与基于光学显微镜观察到的内部结构在组成部分及相互关系上是一致的,这表明我们重建出的三维脑部模型形象、逼真。同时,IPP 软件提供了较好的人机交互处理窗口,能将重建出的三维模型执行任意的旋转 (图 2:B ~ D),从而可从不同的角度观察脑部的形态结构以及整个脑中各个组成部分的位置

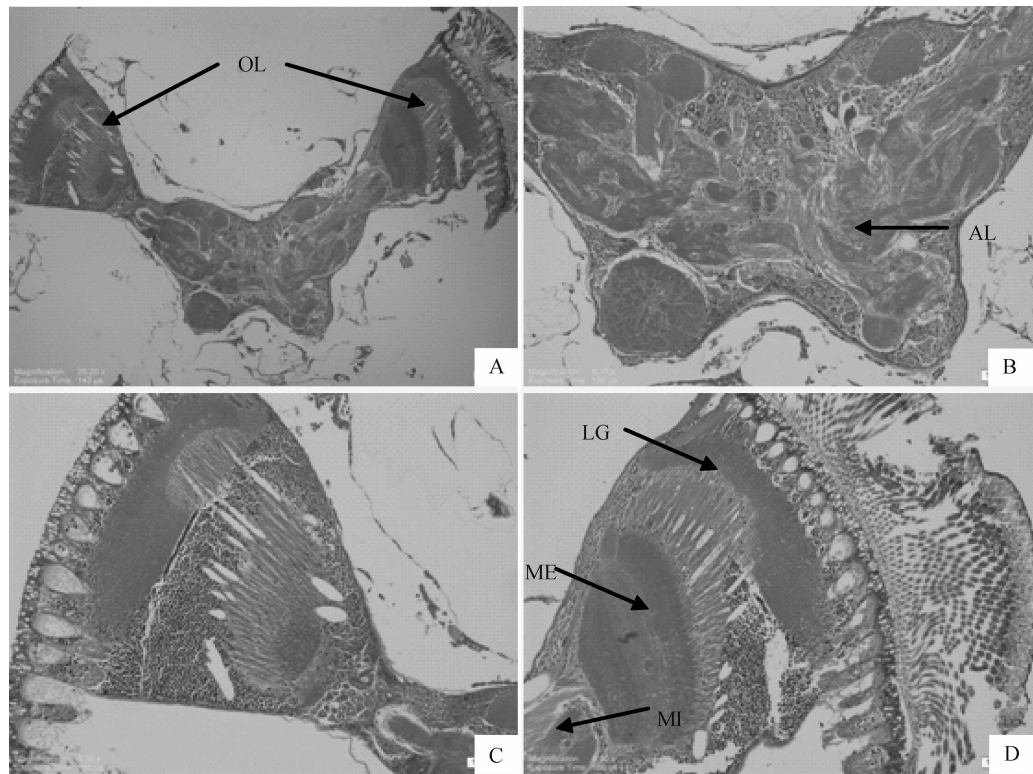


图 1 东亚飞蝗脑部组织结构图

Fig. 1 Organization structure of the brain of *Locusta migratoria manilensis*

A. 纵切图 longitudinal section image; B. 脑局部放大图 partial enlarged view of the brain;
C. 左视叶放大图 enlarged view of left optic lobe; D. 右视叶放大图 enlarged view of right optic lobe.
OL: 视叶 optic lobe; AL: 触角叶 antennal lobes; LG: 视叶神经片 lamina ganglionaris;
ME: 视外髓 medulla externa; MI: 视内髓 medulla interna.

和连接关系。

3 讨论

东来飞蝗是对我国农业生产造成严重危害的重要害虫,其暴发所引起的蝗灾经常与水灾、旱灾相伴发生,成为严重威胁我国农业生产的三大自然灾害之一。仅 2002 年,我国东亚飞蝗年发生面积就超过 200 万 hm^2 (冯晓东,2007)。因此,如何有效控制东亚飞蝗所导致的蝗灾是一个关系我国经济建设和广大人民生活水平的大问题。

有关东亚飞蝗的研究,国内外有许多报道,其研究目标一直是寻找有效的防蝗治蝗措施。早在 20 世纪五六十年代,刘玉素和庐宝廉 (1955, 1959),刘玉素等 (1960) 研究并阐述了东亚飞蝗消化系统、生殖系统以及循环系统和排泄器官的解剖和组织构造,陆近仁和虞佩玉 (1957, 1964) 研究并阐述了东亚飞蝗头部、胸部的骨骼肌肉系统构

造。此后,关于飞蝗组织结构方面的研究主要集中在超微结构方面 (李春选和马恩波,2003)。随着显微技术、可视化及三维重建技术的发展,研究者逐渐开展了关于昆虫数字化虚拟和三维模型重建的研究,如东亚飞蝗三维表面模型的重建 (王军等,2012)、内部消化道三维模型构建 (李德智等, 2011) 及生殖系统三维模型构建 (李德智等, 2012)。

本文主要进行了两个方面的研究,第一,以石蜡切片为基础,观察了东亚飞蝗脑部的组织形态结构;第二,为了获得东亚飞蝗完整、连续的切片图像集,我们以冰冻切片为基础,利用三维重建软件构建了东亚飞蝗脑部的三维表面模型。无论从二维平面还是三维立体空间,本文的研究都有助于人们清楚地了解东亚飞蝗的脑部结构,即东亚飞蝗的脑是由紧密相连的前脑、中脑、后脑 3 部分组成,且前、中、后脑均由左右两个脑叶组成,前脑

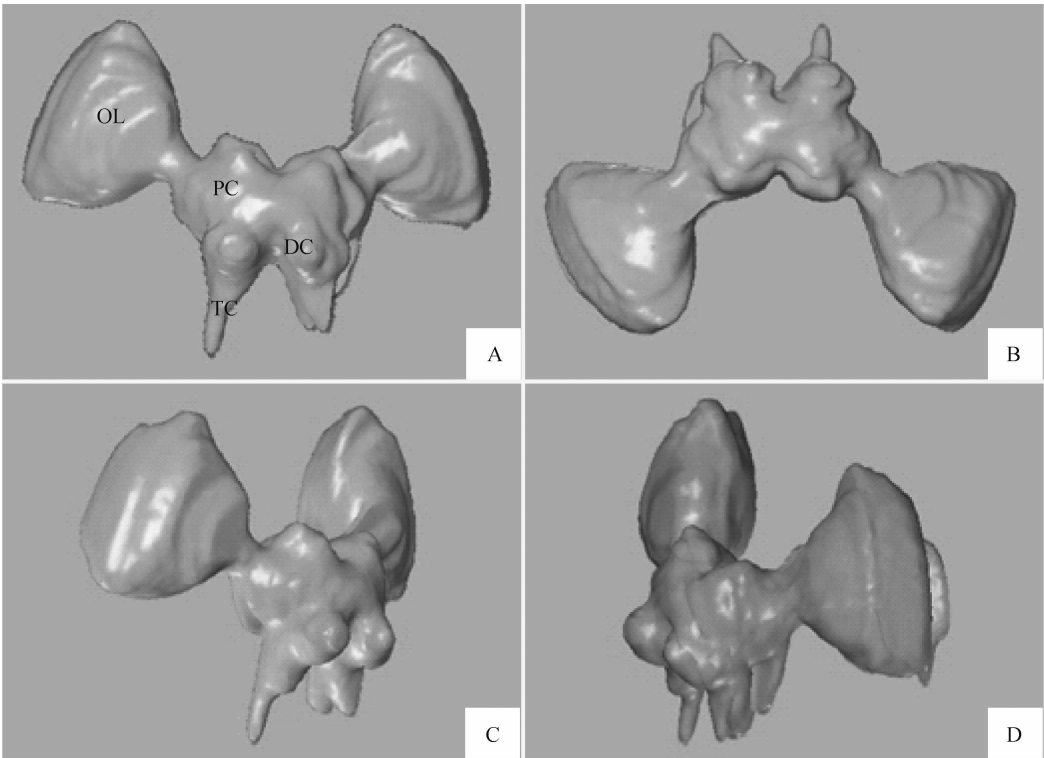


图 2 东亚飞蝗脑部三维重构模型效果图

Fig. 2 3D reconstruction model figures of the brain of *Locusta migratoria manilensis*

A. 正面观 frontal view; B. 倒立观 inverted view; C. 左侧面观 left-lateral view; D. 右侧面观 right-lateral view.

OL: 视叶 optic lobe; PC: 前脑 protocerebrum; DC: 中脑 deutocerebrum; TC: 后脑 tritocerebrum.

的左右两侧有突出的视叶。此外,本研究所构建的东亚飞蝗脑部三维可视化模型可大大地提高对蝗虫脑部结构和功能的了解,为其未来脑部功能的研究提供了支持,同时,也为数字化模拟农药与蝗虫脑部相互作用模型的建立提供了基础和依据。东亚飞蝗作为一种重要的模式昆虫,其三维可视化模型的研究还可为昆虫学教育提供教学素材,也为今后蝗虫的深入研究建立了良好的技术平台。

参考文献 (References)

Brandt R, Rohlfing T, Rybak J, Krofczik S, Maye A, Westerhoff M, Hege HC, Menzel R, 2005. Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its application. *J. Comp. Neurol.*, 492(1):1 – 19.

Chiang AS, Liu YC, Chiu SL, Hu SH, Huang CY, Hsieh CH, 2001. Three-dimensional mapping of brain neuropils in the cockroach, *Diploptera punctata*. *J. Comp. Neurol.*, 440(1):1 – 11.

Galizia CG, Mellwrath SL, Menzel R, 1999. A digital three-

dimensional atlas of the honeybee antennal lobe based on optical sections acquired by confocal microscopy. *Cell Tissue Res.*, 295(3):383 – 394.

Iyengar BG, Chou CJ, Sharma A, Atwood HL, 2006. Modular neuropile organization in the *Drosophila* larval brain facilitates identification and mapping of central neurons. *J. Comp. Neurol.*, 499(4):583 – 602.

Jefferis GSXE, Potter CJ, Chan AM, Marin EC, Rohlfing T, Maurer CR Jr, Luo L, 2007. Comprehensive maps of *Drosophila* higher olfactory centers: spatially segregated fruit and pheromone representation. *Cell*, 128(6):1187 – 1203.

Masante-Roca I, Gadenne C, Anton S, 2005. Three-dimensional antennal lobe atlas of male and female moths, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) and glomerular representation of plant volatiles in females. *J. Exp. Biol.*, 208(6):1147 – 1159.

Rein K, Zockler M, Mader MT, Grubel C, Heisenberg M, 2002. The *Drosophila* standard brain. *Curr. Biol.*, 12(3):227 – 231.

Reischig T, Stengl M, 2002. Optic lobe commissures in a three-dimensional brain model of the cockroach *Leucophaea*

- maderae*: a search for the circadian coupling pathways. *J. Comp. Neurol.*, 443(4):388–400.
- Smid HM, Bleeker MAK, Loon JJA van, Vet LEM, 2003. Three-dimensional organization of the glomeruli in the antennal lobe of the parasitoid wasps *Cotesia glomerata* and *C. rubecula*. *Cell Tissue Res.*, 312(2):237–248.
- 冯晓东, 2007. 近年我国东亚飞蝗发生特点及原因分析. 中国植保导刊, 27(10):34–35.
- 贺丽清, 金卓明, 奚耕思, 2006. 拟黑多刺蚁脑部结构的观察. 陕西师范大学学报(自然科学版), 34(1):88–90.
- 李春选, 马恩波, 2003. 飞蝗研究进展. 昆虫知识, 40(1):24–30.
- 李德智, 刘志刚, 孟瑞霞, 涂雄兵, 牙森. 沙力, 张泽华, 2011. 东亚飞蝗消化道的三维重建方法研究. 应用昆虫学报, 48(4):884–890.
- 李德智, 娄延霞, 陈义昆, 连国云, 刘志刚, 张泽华, 2012. 东亚飞蝗雄性生殖系统组织结构观察及三维可视化数字模型. 应用昆虫学报, 49(1):248–254.
- 李娜, 李华, 那杰, 2008. 蟋蟀脑的解剖结构与生理机能. 昆虫知识, 45(2):327–329.
- 李兆英, 奚耕思, 2007. 中华蜜蜂草形体的发育. 动物学杂志, 42(2):46–51.
- 刘玉素, 李宝珍, 庐宝廉, 1960. 东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* Meyen 循环系统和排泄器官的解剖和组织构造. 昆虫学报, 10(2):129–135.
- 刘玉素, 庐宝廉, 1955. 亚洲飞蝗 *Locusta migratoria menilensis* Meyen 消化系统的解剖和组织构造. 昆虫学报, 5(3):245–260.
- 刘玉素, 庐宝廉, 1959. 东亚飞蝗 (*Locusta migratoria manilensis* Meyen) 生殖系统的解剖和组织构造. 昆虫学报, 9(1):1–11.
- 陆近仁, 虞佩玉, 1957. 东亚飞蝗的骨骼肌肉系统 I. 头部. 昆虫学报, 7(1):1–19.
- 陆近仁, 虞佩玉, 1964. 东亚飞蝗的骨骼肌肉系统 II. 胸部. 昆虫学报, 13(4):510–535.
- 王建礼, 张鑫, 郇发道, 2009. 光肩星天牛的脑部结构. 四川动物, 28(1):82–84.
- 王军, 李阿蒙, 刘晓利, 刘志刚, 2012. 基于光投影数字化传感系统的飞蝗表面三维结构. 应用昆虫学报, 49(1):255–258.