

昆虫脑神经髓结构图谱构建方法综述*

林 涛^{1**} 何丽云¹ 王 帆¹ 刘家莉² 曾鑫年²

(1. 上饶师范学院生命科学学院, 上饶 334001; 2. 华南农业大学农学院, 广州 510642)

摘 要 脑控制和调节所有动物的行为, 昆虫也不例外, 构建脑神经髓结构图谱有利于阐明其对行为调控的神经机制。目前, 除一些模式昆虫的脑图谱被构建外, 大多数昆虫仅针对少数易识别的神经髓(如视叶、触角叶和蕈形体等)进行了三维重建, 而对脑内大部分区域还未描述, 这与其结构的复杂性有关。随着共聚焦显微成像和计算机三维重建技术的发展, 人们有机会获取全脑的结构信息, 并构建出三维可视化的图谱, 这为研究全脑神经髓的功能提供了重要平台。特别是果蝇全脑神经髓的系统命名法的建立, 极大的推动了昆虫脑神经髓结构的研究进展。本文对昆虫脑的结构组成、免疫染色方法、标准脑构建及脑神经髓命名等方面进行综述, 提出在构建脑神经髓图谱过程中需要注意的问题及解决办法, 这将为推动国内昆虫脑神经髓图谱的构建提供参考。

关键词 昆虫; 脑神经髓; 图谱; 三维模型; 免疫染色

Review of the construction of insect brain neuropil atlases

LIN Tao^{1**} HE Li-Yun¹ WANG Fan¹ LIU Jia-Li² ZENG Xin-Nian²

(1. College of Life Science, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, China;

2. College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract The construction of brain atlases can help reveal the neural mechanisms responsible for the regulation of behavior in animals, including insects. Published brain atlases of a few model insect species currently serve as general references, but there are currently no comprehensive atlases for many other species. With the exception of a small number of easily recognized neuropils (such as the optic lobe, antennal lobe and mushroom body), many brain regions remain uncharacterized due to their structural complexity. With the development of confocal microscopy and three-dimensional reconstruction technology, more detailed information on the whole brain can be obtained and construction of three-dimensional visualization maps, an important platform for the study of brain function, has become possible. The establishment of a systematic nomenclature for the whole brain of *Drosophila melanogaster* has greatly accelerated the construction of atlases of insect brain neuropils. This paper reviews recent information on the structural composition of the insect brain and the technology used to construct brain atlases, proposes solutions to several key problems that must be addressed during this process, and provides a reference for promoting the construction of brain atlases of Chinese insects.

Key words insect; brain neuropil; atlas; 3D model; immunohistochemistry

昆虫需要认识和学习寄主信息, 包括气味、颜色和形状等特征, 并根据价值作出抉择与反应(郭爱克, 2019)。这种对寄主认知能力的强弱决定了其是否能够成功觅食、繁衍后代。脑在这

一过程中起着关键作用, 它接受外界信息的刺激, 对信息进行编码、存储和提取, 最终形成行为指令来指导昆虫作出反应。神经行为学(Neuroethology)研究表明以昆虫行为为根基,

*资助项目 Supported projects: 上饶师范学院博士启动经费(K6000334); 上饶师范学院自然科学基金资助项目(201812); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ201720)

**通讯作者 Corresponding author, E-mail: hnlintao@stu.scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-07-21; 接受日期 Accepted: 2020-08-19

解读脑对刺激物的认知神经基础,同时将脑作为探测器,可发现用于调控昆虫行为的活性物质,对促进开发和设计更加有效和环保的行为调节剂具有重要的意义(Riffell *et al.*, 2009; Reisenman *et al.*, 2016)。而要明确昆虫行为调控的神经机制,必然要探究昆虫脑处理信息的神经基础及规律。经过多年的研究,神经科学揭示了动物认知行为都是由神经细胞的功能决定的,不同的认知行为由脑内不同的神经环路负责,是各脑区协同工作的结果(Giurfa, 2013)。因而,在全脑尺度上绘制神经回路,揭示各脑区之间的功能和结构联系,是全面理解脑工作原理的基础。脑结构图谱是研究神经回路的重要工具,是进行结构和功能分析的平台。

构建昆虫脑结构三维图谱,并提供一组坐标作为参考,能够使研究人员准确找到特定的神经髓结构,促进了结构与功能研究相结合,也极大的推动了不同实验室脑图谱数据的有效交流和交换(Ito, 2010; Rybak, 2012)。将多个样本中所获得的神经元汇聚到同一个脑图谱中(Brandt *et al.*, 2005; Chiang *et al.*, 2011),有助于研究神经元突触联系及功能(Kurylas *et al.*, 2008)。此外,神经元的长度、数量、投射区域以及分支直径等数据均可直接获得,有利于预测潜在的神经元反馈连接、局部信息处理回路和感觉信息的映射,最终构建更加准确的神经回路。另外,脑三维图谱提供的体积和形状信息可以进一步明确昆虫各发育阶段神经髓的产生及组装,可以比较不同生理状态下脑神经髓结构的变化程度等(de Vries *et al.*, 2017; Sheehan *et al.*, 2019)。

昆虫脑结构图谱的研究始于Nicholas James Strausfeld,他通过高尔基浸渍和神经髓免疫染色,对家蝇*Musca domestica*大脑结构进行了系统的研究和命名(Strausfeld, 1976),这项开创性的工作成为昆虫脑图谱研究的代表。随着成像技术和计算机三维重建方法的发展,多种昆虫全脑三维图谱被建立,包括果蝇*Drosophila melanogaster*(Rein *et al.*, 2002),意大利蜜蜂*Apis mellifera*(Brandt *et al.*, 2005),沙漠蝗*Schistocerca gregaria*(Kurylas *et al.*, 2008),赤拟

谷盗*Tribolium castaneum*(Dreyer *et al.*, 2010),蜚蠊*Leucophaea maderae*(Wei *et al.*, 2010),烟草天蛾*Manduca sexta*(el Jundi *et al.*, 2009)等,部分昆虫还构建出了标准脑图谱(Standard brain atlas)。本文对昆虫脑神经髓三维图谱构建方法进行综述,首先介绍了昆虫脑结构组成,分析了构建昆虫脑三维模型的方法,最后阐述了昆虫脑结构的命名方式,以期为推动国内昆虫脑图谱构建研究提供参考。

1 昆虫脑结构组成

根据昆虫脑结构组织形式,可被分成两种类型:一种是脑神经节(Cerebral ganglia, CRG)与颞神经节(Gnathal ganglia, GNG)融合,在中间形成食道裂孔;另一种是脑神经节与颞神经节分离,两侧通过围咽神经索连接(Ito *et al.*, 2014)。前者主要包括果蝇、意大利蜜蜂、烟草天蛾和绿盲蝽*Apolygus lucorum*等昆虫(Rein *et al.*, 2002; Brandt *et al.*, 2005; el Jundi *et al.*, 2009; Kvello *et al.*, 2009; Heinze and Reppert, 2012; 陈秋燕等, 2016; Xie *et al.*, 2016),而沙漠蝗、蜚蠊和蜣螂*Scarabaeus lamarcki*等属于后者(Kurylas *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2010; Immonen *et al.*, 2017)。昆虫脑由神经髓(Neuropil)及外层的细胞体(Cell body rind)构成。神经髓由轴突、树突、神经末梢、突触及相关的胶质细胞构成。它可被分成突触丰富型神经髓(通常直接称为神经髓)和纤维束神经髓(亦直接称为纤维束, Fiber bundle)。其中,富含突触的神经髓由形成突触的神经突起构成,而纤维束指的是缺乏突触联系的神经纤维(Ito *et al.*, 2014)。在昆虫脑内,最易被识别的是一些被纤维束分开、界限清晰的神经髓结构,它们形成相对独立的区域,如视叶(Optic lobe, OL)、蕈形体(Mushroom body, MB)、中央复合体(Central complex, CX)和触角叶(Antennal lobe, AL)等。除此之外,在脑的背侧、外侧和腹后侧区域还包含着一些连接紧密,边界模糊的神经髓(Immonen *et al.*, 2017),它们占据着中央脑的大部分区域,如在金小蜂*Nasonia vitripennis*内

占 44.94%，在烟青虫 *Helicoverpa assulta* 内占 55.05% (陈秋燕等, 2016; Groothuis *et al.*, 2019)。Ito 等 (2014) 借助脑内纤维束的分布和特殊抗体标记结果, 利用分级方式 (Hierarchical manner) 对果蝇全脑神经髓进行了结构划分。首先是 1 级总分类阶元 (Supercategories), 共包含上位神经髓区 (Superior neuropils, SNP)、下位神经髓区 (Inferior neuropils, INP)、腹外侧神经髓区 (Ventrolateral neuropils, VLNP)、腹内侧神经髓区 (Ventromedial neuropils, VMNP)、围咽神经髓区 (Periesophageal neuropils, PENP)、视叶、触角叶、侧角 (Lateral horn, LH)、蕈形体、中央复合体、侧副叶复合体 (Lateral complex, LX) 和颞神经节等 12 个大型神经髓区块 (Large neuropil blocks) (图 1, 桔黄色字体指定结构), 各大型神经髓区块内包含 47 个 2 级神经髓 (Neuropils) 结构 (图 1, 黄色字体指定结构)。此外, 部分神经髓被进一步划分成 3 级神经髓亚区 (Subregions) (图 1, 蓝色字体指定结构) (Ito *et al.*, 2014)。

不同昆虫脑神经髓图谱构建研究结果表明, 构成昆虫脑的 1 级大型神经髓区块相同, 但组成各区块的神经髓种类存在细微差异, 如在沙漠蝗、绿盲蝽和帝王蝶 *Danaus plexippus* 等昆虫的腹外侧神经髓区 VLNP 包含特殊的后视结界 (Posterior optic tubercle, POTU) 结构 (Ito *et al.*, 2014), 但不存在于果蝇、蜚蠊、灰黑心结蚁 *Cardiocondyla obscurior* 和桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 中 (Ito *et al.*, 2014; Bressan *et al.*, 2015; Immonen *et al.*, 2017; 林涛和曾鑫年, 未发表数据); 同一神经髓在不同种类昆虫的脑中所占比例存在明显差异, 如昼行性的蜂鸟天蛾 *Macroglossum stellatarum* 的视觉中枢——视叶和蕈形体副冠 (Accessory calyx, ACA) 的体积显著高于夜行性的象天蛾 *Deilephila elpenor* 对应的结构, 而嗅觉中枢——触角叶、蕈形体冠 (Calyx, CA) 和侧角的体积均显著低于后者; 行为研究结果表明昼行性的蜂鸟天蛾主要依赖视觉信号完成觅食行为, 而夜行性的象天蛾主要依赖嗅觉 (Stöckl *et al.*, 2016), 这说明神经髓

体积的大小反映了不同感觉在昆虫觅食行为中的重要性, 为阐明昆虫寄主选择机理提供了重要线索。此外, 同种昆虫同一神经髓包含的亚区体积和形状在性别间存在明显差异, 典型的例子是鳞翅目昆虫触角叶神经纤维球 (Glomeruli) 结构, 如蛾类雄虫触角叶具有体积扩大的纤维球复合体 (Macroglomerular complex, MGC), 但雌虫不存在该结构 (Zhao *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2019), 神经生理学研究表明 MGC 主要处理雌虫释放的性信息素 (赵新成等, 2015)。曾鑫年团队亦在桔小实蝇的触角叶内发现体积增大的纤维球结构, 这将为进一步发现与嗅觉行为相关的挥发物提供了重要线索 (Lin *et al.*, 2018)。

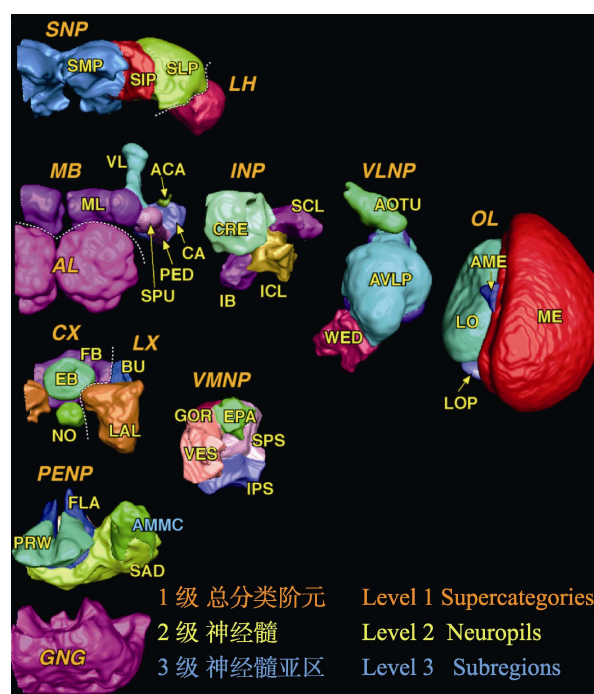


图 1 分级方式所定义的果蝇脑神经髓结构
(改自 Ito *et al.*, 2014)

Fig. 1 The neuropils of *Drosophila melanogaster* defined by the hierarchical manner
(Adapted from Ito *et al.*, 2014)

英文字母为神经髓名称的缩写, 详见 Ito 等 (2014)。桔黄色字体指 1 级总分类阶元, 黄色为 2 级神经髓, 蓝色为 3 级神经髓亚区。

The English letters in the figure are abbreviations for the name of the neuropils, for details, please see the Ito *et al.*, (2014). The orange font refers to the first level of supercategories, yellow for level 2 neuropil, and blue for level 3 neuropil subregion.

2 昆虫脑神经髓免疫染色

目前,昆虫脑神经髓结构信息主要通过突触蛋白抗体的免疫染色标记,并结合激光共聚焦显微镜的逐层扫描获取,后期再利用三维重建软件进行 3D 模型构建(Rein *et al.*, 2002; Brandt *et al.*, 2005; Kurylas *et al.*, 2008; Ito *et al.*, 2014)。昆虫的脑远小于脊椎动物的脑,整脑染色成功仍然是一项具有挑战性的工作。整脑组织作为染色材料,其厚度远大于传统的切片,抗体渗透进入中央区域的程度有限,容易出现脑部外强内弱的染色现象(Ott, 2008),因此根据不同昆虫种类,需要探索不同的染色条件。对昆虫脑的免疫组织染色通常包括五个步骤,分别是固定、渗透、抗体孵育、脱水及透明和装片。其中对小型昆虫,例如果蝇,渗透步骤通常省略。

2.1 脑组织固定及渗透处理

脑组织固定是整个免疫染色的关键步骤,在解剖结束后应立即进行固定,以避免蛋白酶降解而使得抗原表位遮盖或消失,影响染色效果。最为普遍的固定剂是 4% 的多聚甲醛(PFA),通常在室温固定 2-3 h,或置于 4 °C 冰箱内过夜(表 1)。在大型昆虫的脑染色过程中,固定后的脑组织经常出现抗体渗透性降低的现象(Nässel, 1996)。为了避免这一现象的发生,通常会在固定液中添加氯化锌,且 PFA 的浓度从 4% 降至 1% (Heinze and Homberg, 2008; Ott, 2008; Ott and Rogers, 2010)(表 1),其中锌离子通过凝聚细胞质上的蛋白以促进抗体在组织中的渗透性。除多聚甲醛外,甲醇作为一种非交联性的蛋白质凝固剂也常被加入固定液中,如蝗虫的胸神经节和烟草天蛾的大脑染色中,用甲醇/甲醛作为固定液,它除了作为固定剂外,还能消除细胞膜脂类,有助于提高组织的通透性(Ott and Elphick, 2003; el Jundi *et al.*, 2009; Huetteroth *et al.*, 2010)。对于大型昆虫来说,促进抗体在脑组织中的渗透是提高染色质量的重要步骤。例如用胶原酶溶解脑组织的细胞间质胶原蛋白来提高渗透性(Kurylas *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2010)

(表 1)。也有研究通过梯度乙醇或甲醇脱水、再复水的方式来增加通透性,如意大利蜜蜂(Brandt *et al.*, 2005),烟芽叶蛾 *Heliothis virescens* 的大脑(Kvello *et al.*, 2009),和蜻蜓 *Libellula luctuosa* 的胸神经节(Gonzalez-Bellido and Wardill, 2012)的免疫染色。其中在意大利蜜蜂和烟芽叶蛾大脑染色过程中,在梯度乙醇脱水后,会利用二甲苯进行短时间处理,溶解组织表面的脂质(Brandt *et al.*, 2005; Kvello *et al.*, 2009),再进行复水处理;而在蜻蜓胸神经节染色时,则在脱水、复水后进行胶原酶处理来进一步增加脑组织的渗透性。Ott (2008) 在研究沙漠蝗脑结构时,系统的比较了乙醇的脱水、复水和锌-甲醛固定液结合有机溶剂处理 2 种方法的染色效果,结果表明利用锌-甲醛固定液结合有机溶剂处理后的脑组织渗透性更佳,不会出现外强内弱的现象,并且不会造成脑组织扭曲,利于后期的建模。这种方法随后也被应用于帝王蝶(Heinze and Reppert, 2012)和羌螂(Immonen *et al.*, 2017)的大脑免疫染色。作者在对桔小实蝇脑组织染色时也观察到类似的结果,利用锌-甲醛固定液结合有机溶剂处理后 5-羟色胺抗体更容易进入脑部中央区域,实现免疫标记(林涛等, 2019)。对于小型昆虫,如果蝇,其脑组织整体较小,抗体容易渗透进入脑组织内部区域,因此通常不需要进行渗透或仅在抗体孵育过程中添加曲拉通 X-100 进行处理来提高组织渗透性(表 1)。

2.2 脑组织的抗体孵育

固定及渗透后需对脑进行抗体的孵育以实现免疫标记,其中孵育时间是决定染色质量的另一个重要的因素。为了防止抗体孵育过程中组织降解,所有长时间的孵育步骤需在 4 °C 条件下进行。目前常用于脑神经髓标记的抗体是 DSHB 公司生产的 anti-Bruchilot(nc82)和 anti-synapsin(3C11)(Cachero *et al.*, 2010),它们主要特征是能够将高密度突触区域进行标记,但不能标记无突触的神经纤维结构。小型昆虫的脑只需短时间孵育即可实现标记,如果蝇,一抗和二抗的孵育时间基本为 1-2 d (Chiang *et al.*, 2011),赤拟

表 1 已构建脑结构图谱的昆虫种类及其染色和构建方法

Table 1 Insect species and their staining and construction methods

目 Order	种类 Species	虫态、性别 或品级 Stage, gender or caste	固定液及方法 Fixative solution and method	渗透 Permeabilization	抗体类型 Antibody description	一抗稀释比 及孵育时长 Primary antibody dilution ratio and incubation time			全脑神经 髓命名 Neuropils nomenclature	三维重建 软件 Reconstruct ion software	标准脑 构建方法 Standardization protocols	参考文献 References
膜翅目 Hymenoptera	金小蜂 <i>Nasonia vitripennis</i>	成虫 Adult (♀)	4% FA; RT 2.5 h	胶原酶室温孵育 1 h Collagenase digestion 1 h in RT	Anti- bruchpilot	1 : 250 过夜 Overnight	否 No	FIJI	ISA	Groothuis <i>et al.</i> , 2019		
	灰黑心结蚁 <i>Cardiocondyla obscurior</i>	成虫、工蚁 Adult, worker	4% PFA; 4 °C 过夜 Overnight	否 No	Anti- synapsin	1 : 10 过夜 Overnight	是 Yes	FIJI	否 No	Bressan <i>et al.</i> , 2015		
	意大利蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>	成虫、工蜂 Adult, worker	4% PFA, 2 h	1. 梯度酒精脱水, 二甲 苯处理 5 min, 再复水; 2. 胶原酶 36 °C 孵育 30 min。1. Alcohol dehydration, treat with xylene 5 min and rehydration; 2. Collagenase digestion 30 min in 36 °C	Anti- synapsin	1 : 30 60 h	否 No	Amira	ISA	Brandt <i>et al.</i> , 2005		
半翅目 Hemiptera	绿盲蝽 <i>Apolygus lucorum</i>	成虫 Adult (♂ & ♀)	4% PFA; 4 °C 过夜 Overnight	否 No	Anti- synapsin	1 : 100 5 d	否 No	Amira 5.3	否 No	Xie <i>et al.</i> , 2019		
直翅目 Orthoptera	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	成虫 Adult	ZnFA; 4 °C 12 h	DMSO/MT (80 : 20), 2 h in RT; 甲醇处理 1 h, 再梯度甲醇复水 MT 1 h, and rehydration with MT	Anti- synapsin	1 : 30 5-6 d	CRG	Amira 5.6	否 No	von Hadeln <i>et al.</i> , 2018		
		成虫 Adult (♂)	4% FA; RT 过夜 Overnight	否 No	Anti- synapsin	1 : 50 4-6 d	否 No	Amira 4.1.2	ISA	el Jundi <i>et al.</i> , 2010		

续表 1 (Table 1 continued)

目 Order	种类 Species	虫态、性别 或品级 Stage, gender or caste	固定液及方法 Fixative solution and method	渗透 Permeabilization	抗体类型 Antibody description	一抗稀释比 及孵育时长 Primary antibody dilution ratio and incubation time	全脑神经 髓命名 Neuropils nomenclature	三维重建 软件 Reconstruct ion software	标准脑 构建方法 Standardization protocols	参考文献 References
直翅目 Orthoptera	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	成虫 Adult (♂ & ♀)	4% FA; 4 °C 过夜 Overnight	胶原酶室温孵育 1 h Collagenase digestion 1 h in RT	Anti-synapsin	1 : 50 6 d	否 No	Amira 3.1	ISA & VIB	Kurylas <i>et al.</i> , 2008
	蜚蠊 <i>Scarabaeus lamarki</i> , <i>S. satyrus</i>	成虫 Adult	ZnFA; 20 °C 2 h, 4 °C 20 h	DMSO/MT (80 : 20), 55 min in RT	Anti-synapsin	1 : 50 5 d	是 Yes	ImageJ & Amira 5.3.3	否 No	Immonen <i>et al.</i> , 2017
	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	成虫 Adult	4% FA; RT 1-2 h	否 No	Anti-synapsin	1 : 100 2-3 d	否 No	Amira 4.1 & 5.2.1	VIB	Dreyer <i>et al.</i> , 2010
	烟青虫 <i>Helicoverpa assulta</i>	成虫 Adult (♂)	4% PFA; 4 °C 过夜 Overnight	否 No	Anti-synapsin	1 : 100 5 d	否 No	Amira 4.1	否 No	陈秋燕等, 2016
鳞翅目 Lepidoptera	茶尺蠖 <i>Ectropis obliqua</i>	幼虫 Larva	4% PFA, RT 2 h or 4 °C 过夜 Overnight	否 No	Anti-synapsin	1 : 100 5 d	否 No	Amira 5.3	否 No	谢桂英等, 2016
	天蛾 <i>Deilephila elpenor</i>	成虫 Adult	ZnFA; 4 °C 12 h	DMSO/MT (80 : 20) 85 min	Anti-synapsin	1 : 25 5 d	否 No	Amira 5.5.3	否 No	Stöckl <i>et al.</i> , 2016
	澳洲柏公蛾 <i>Agrotis infusa</i>	成虫 Adult (♂ & ♀)	ZnFA; 4 °C 20 h	DMSO/MT (80 : 20), 70 min; 梯度甲醇复水 Rehydration with MT	Anti-synapsin	1 : 25 6 d	否 No	Amira 5.3.3	ISA	Adden <i>et al.</i> , 2020
	袖蝶 <i>Heliconius erato</i> ; <i>H. hecale</i>	成虫 Adult (♂ & ♀)	ZnFA; RT 16-20 h	DMSO/MT (80 : 20) 2 h; 梯度甲醇复水 Rehydration with MT	Anti-synapsin	1 : 30 3.5 d	否 No	Amira 5.5	否 No	Montgomery <i>et al.</i> , 2016
	蝶 <i>Godyrys zavaleta</i>	成虫 Adult	ZnFA; RT 16-20 h	DMSO/MT (80 : 20) 2 h; 梯度甲醇复水 Rehydration with MT	Anti-synapsin	1 : 30 3.5 d	否 No	Amira 5.5	否 No	Montgomery and Ott, 2015

续表 1 (Table 1 continued)

目 Order	种类 Species	虫态、性别 或品级 Stage, gender or caste	固定液及方法 Fixative solution and method	渗透 Permeabilization	抗体类型 Antibody description	一抗稀释比 及孵育时长 Primary antibody dilution ratio and incubation time	全脑神经 髓命名 Neuropils nomenclature	三维重建 软件 Reconstruct ion software	标准脑 构建方法 Standardization protocols	参考文献 References
鳞翅目 Lepidoptera	棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	幼虫 Larva	4% PFA; RT 2 h	否 No	Anti- synapsin	1 : 100 5 d	否 No	Amira 4.1	否 No	汤清波等, 2014
	帝王蝶 <i>Danaus plexippus</i>	成虫 Adult	4% PFA, RT 2 h or ZnFA, RT 20 h	胶原酶室温孵育 1h 或 DMSO/MT (80 : 20) 处理 90 min。 Collagenase digestion 60 min or DMSO/MT (80 : 20) 90 min	Anti- synapsin	1 : 50 5 d	否 No	FIJI or Amira 5.2	否 No	Heinze and Reppert, 2012
	烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	幼虫、蛹、 成虫 Larva, pupa, adult	37% FA : MT : PBS (1 : 1 : 8), 4 °C 过夜 Overnight	否 No	Anti- synapsin	1 : 50 4-6 d	否 No	Amira 4.1	否 No	Huetteroth <i>et al.</i> , 2010
	烟芽叶蛾 <i>Heliothis virescens</i>	成虫 Adult (♂ & ♀)	37% FA : MT : PBS (1 : 1 : 8), 4 °C 过夜 Overnight	否 No	Anti- synapsin	1 : 100 5-6 d	否 No	Amira 4.1	VIB	el Jundi <i>et al.</i> , 2009
		成虫 Adult (♀)	4% PFA; 4 °C 过夜 Overnight	1. 梯度酒精脱水, 二甲 苯处理 5 min, 再复水; 2. 胶原酶 36 °C 孵育 30 min 1. Alcohol dehydration, treat with xylene 5 min and rehydration; 2. Collagenase digestion 30 min in 36 °C	Anti- synapsin	1 : 10 2 d	否 No	Amira 4.1	ISA	Kvello <i>et al.</i> , 2009

续表 1 (Table 1 continued)

目 Order	种类 Species	虫态、性别 或品级 Stage, gender or caste	固定液及方法 Fixative solution and method	渗透 Permeabilization	抗体类型 Antibody description	一抗稀释比 及孵育时长 Primary antibody dilution ratio and incubation time	全脑神经 髓命名 Neuropils nomenclature	三维重建 软件 Reconstruct ion software	标准脑 构建方法 Standardization protocols	参考文献 References
蜚蠊目 Blattaria	蜚蠊 <i>Leucophaea maderae</i>	成虫 Adult (♂)	4% PFA; 4 °C 过夜 Overnight	胶原酶室温孵育 1 h Collagenase digestion 1 h in RT	Anti- synapsin	1 : 50 5 d	否 No	Amira 3.1 & 4.1	ISA & VIB	Wei <i>et al.</i> , 2010
		成虫 Adult (♂ & ♀)	2% PFA, 4 °C 过夜 Overnight	否 No	Anti- bruchpilot	—	否 No	Amira	VIB	Rein <i>et al.</i> , 2002
		成虫 Adult (♂ & ♀)	4% FA; 4 °C 2 h	否 No	Anti- synapsin	1 : 1 000	是 Yes	Amira	否 No	Ito <i>et al.</i> , 2014
双翅目 Diptera	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	成虫 Adult (♂ & ♀)	4% PFA; 微波 处理 3 次, 每次 90 s. Microwave 3 times, 90 s/time	否 No	Anti- discs large	1 : 50 2 d	否 No	Amira 4.1.2	FlyCircuit	Chiang <i>et al.</i> , 2011
		成虫 Adult (♂)	2% PFA, 4 °C 过夜 Overnight	否 No	Anti- bruchpilot	1 : 50 过夜 overnight	否 No	BrainAligner	BrainAligner	Peng <i>et al.</i> , 2011

—表示文中未提及。PFA: 多聚甲醛; FA: 甲醛; PBS: 磷酸缓冲液; MT: 甲醇; RT: 室温; ZnFA: 锌-甲醛固定剂 DMSO: 二甲亚砜; CRG: 脑神经节。固定液常用磷酸缓冲液配制, pH 在 7.4-7.6 之间。

—indicates that it is not mentioned in the article; PFA: Paraformaldehyde; FA: Formaldehyde; PBS: Phosphate-buffered saline; MT: Methanol; RT: Room temperature; ZnFA: Zinc-formaldehyde fixative; DMSO: dimethyl sulfoxide; CRG: Cerebral ganglia; Fixative solution is usually prepared with PBS, and the pH is between 7.4-7.6.

谷盗为 2-3 d (Dreyer *et al.*, 2010)。对于大型昆虫的脑组织,为了确保抗体能够到达大脑的中央区域,一般一抗的孵育时间会增加到 6 d,二抗的孵育时间增加到 4 d (Brandt *et al.*, 2005; Kurylas *et al.*, 2008; el Jundi *et al.*, 2009; Heinze and Reppert, 2012)。此外,在一抗孵育之前,还会增加预孵育(封闭)步骤(通常与正常山羊血清孵育)来避免抗体与脑组织中非特异性抗原表位结合。在每一次孵育步骤之后,脑组织需要利用缓冲液冲洗,以确保多余的抗体能够从大脑的中央区域被移除,同理对大型脑组织的洗涤次数和时间会大大的延长。

2.3 脑组织脱水透明及装片

由于脑内蛋白质、脂质和水之间的折射率差异会导致光散射,降低成像的质量,因此在利用激光共聚焦显微镜观察时需要将脑组织进行脱水及透明处理。水杨酸甲酯是最理想的透明剂,它对光的折射率与组织中的蛋白质接近。在水杨酸甲酯透明处理之前需要对脑组织进行梯度酒精脱水。大型脑染色时,多次的脱水处理会让脑组织严重变形和扭曲 (Bucher *et al.*, 2000; Ott, 2008),因此在脱水过程中可以用硫二甘醇 2,2-thiodiethanol 代替乙醇进行脱水 (Gonzalez-Bellido and Wardill, 2012)。在沙漠蝗脑染色过程中,则首先使用梯度甘油进行脱水,再用无水乙醇处理,最后用水杨酸甲酯进行透明 (Ott, 2008)。在实验过程中,脑组织脱水是一个可逆的过程,脱水和透明后的脑组织应该避免接触任何水分,否则会导致复水而影响观察。脱水透明后的脑组织需要固定于载玻片中用于观察,而装片所用的包埋剂折射率应与盖玻片的相近,这样可以确保光路从样品到物镜时不会出现折射。此外,理想的包埋剂应该适合于长期保存样品。目前常用的包埋剂是中性树胶。由于昆虫脑组织具有一定的厚度,直接装片会导致脑组织被盖玻片挤压而出现变形或扭曲。为了解决这一问题通常利用带孔的铝片代替普通的载玻片,铝片的厚度与普通玻璃载玻片相仿,孔的直径可随脑组织的大小而改变 (陈秋燕等, 2016; 林涛等, 2019)。

装片时,首先将孔的一侧用涂有中性树胶的盖玻片封住,待盖玻片牢固后,在孔的另一侧滴入适量的中性树胶,将脑组织放入小孔中,摆正位置后封上盖玻片。制好的样品应保存在黑暗环境中,以避免荧光的猝灭。

3 共聚焦显微镜成像

脑神经髓结构图谱的构建来源于共聚焦显微图像,高分辨率的图像数据有利于图谱的构建,所以理想的条件下是分辨率越高,图谱的精度也越高。然而共聚焦显微镜的分辨率是有限的,它取决于所用物镜的数值孔径 (Numerical aperture, NA) 和光的波长 (λ)。在宽视野显微镜中,分辨率只受发射波长影响,而在共聚焦显微镜中,激发波长和发射波长均会影响分辨率,其中激发波长在较大针孔下影响更明显。此外,高分辨率下,显微镜的物距更短,这意味着视野更小。综上所述,共聚焦成像的最佳设置需要平衡物距和分辨率,特别是在处理大型脑样品时,更加注意选择合适的观察条件。

4 脑三维模型构建

在获得昆虫脑共聚焦图像后,需对各神经髓区进行图像分割,再重叠构建出 3D 模型,因此分割效果的好坏直接决定了三维模型构建的优劣。目前,图像的分割已发展出多种方法,并被广泛应用于昆虫种类识别和计数等研究中 (王江宁和纪力强, 2011), 如于新文和沈佐锐 (2001) 提出基于灰度值直方图分割法对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 成虫图像进行分割等。昆虫脑神经髓的图像分割主要基于神经髓的边界、区域和边缘等形状特征作为依据,并在这些特征中进行阈值分割。由于每个神经髓的边界并非都清晰,这就需要依赖图像的灰度值、重复样本的比较和神经纤维的分布来确定最终的边界 (Ito *et al.*, 2014)。此外也会利用特殊神经元,如生物胺能神经元,分布模式来辅助神经髓区划分 (Heinze and Reppert, 2012)。目前,用于昆虫脑神经髓图像分割的软件主要有商业的 Amira、

NeuroLucida、Imaris、MatLab 和开源的 FIJI 等, 它们可以对共聚焦图像进行手动、半自动或自动分割, 其中 Amira 是最常用的重建软件 (表 1)。重建时, 主要利用该软件 “label field” 模块对每一张共聚焦图像上的神经髓进行手动分割, 每个神经髓标以相同颜色, 重复同样的步骤直至将所有脑神经髓描绘出来 (陈秋燕等, 2016)。通常可以利用该模块内的 “brush” 和 “masking” 工具进行辅助判断神经髓的边界和范围 (Zhao *et al.*, 2016; 林涛等, 2019)。随后, 利用 “remove islands” 工具去除神经髓内存在的微小未被标记的点, 再使用 “smooth label” 工具对所标记的神经髓区域进行平滑处理。完成脑区神经髓的图像分割后, 则利用 “surfaceGen” 模块进行重叠生成 3D 模型。

5 昆虫标准脑的构建

昆虫标准脑图谱是通过对齐同种昆虫不同个体脑三维模型而获得的虚拟平均脑, 综合了多个样本的特征。它既可以由分割后的图像栈获得, 也可直接通过对齐原始的图像栈而生成。当前共有 4 种方法用于构建昆虫标准图谱, 分别是虚拟昆虫脑法 (Virtual insect brain, VIB)、迭代平均法 (Iterative shape averaging, ISA)、FlyCircuit 和 BrainAligner 等 (表 1)。这 4 种方法虽然在运算方法和处理速度上各不同, 但基本的标准化程序是相同的。首先选择一个脑作为参考模板 (Template brain), 然后将其他个体的脑通过刚性/仿射变换 (Rigid/affine transformation) 汇聚在参考脑模板中, 最后通过非刚性变换 (Non-rigid transformation) 进行对齐。VIB 法以图像分割后的 3D 模型构建标准脑, 将每个 3D 模型在大小、方向和位置上进行刚性变换使得所有个体的脑模型汇聚到参考模板中形成一个 “概率图 (Probability map)” (Rein *et al.*, 2002), 最后通过对该概率图进行阈值分割得到标准化三维脑图谱。这一方法最先用于果蝇标准脑图谱构建, 随后也被应用于沙漠蝗、烟草天蛾、赤拟谷盗和蜚蠊等昆虫标准脑的构建 (表 1)。ISA 法是

由 CMTK (Computational morphometry toolkit) 发展而来, 直接以原始图像来构建标准脑。首先基于强度算法量化体素间相似性来对原始图像进行仿射变换, 随后进行多次的非刚性变换 (迭代平均) 来提高标准化的质量。该方法用平均后的图像栈作为参考模板, 提高了变换质量。该方法已被应用于金小蜂、意大利蜜蜂、烟芽叶蛾等昆虫脑结构图谱的构建 (表 1)。FlyCircuit 和 BrainAligner 主要用于果蝇, 其中 FlyCircuit 利用分割后的图像构建标准脑而 BrainAligner 直接利用原始图像。虽然 4 种方法具有类似的标准化程序, 但各具优缺点, Kurylas 等 (2008) 及 Wei 等 (2010) 分别比较了 VIB 和 ISA 2 种方法的优缺点, 结果表明, VIB 法构建的标准脑不适于神经元的标定, 却适合于神经髓的体积比较。ISA 法适合于将神经元标定于标准脑内, 但非常耗时, 不适于标定来自多个脑的神经元数据。Peng 等 (2011) 认为 BrainAligner 法计算量小, 耗时长, 是未来标准脑构建的理想方法。

6 昆虫脑神经髓的命名

昆虫的脑由多个脑神经髓区构成, 对神经髓的命名便于神经回路描述, 神经元投射区域确定。已有的命名主要依据其在脑内的相对位置或形状特征进行, 但这存在缺点, 如相似的脑区在不同昆虫种类中, 或不同的研究中出现多个名称, 而同一名称或术语有可能指的是不同的结构 (Ito *et al.*, 2014)。此外, 对昆虫脑的研究多集中在一些易识别的区域, 如触角叶, 视叶, 蕈形体和中央复合体等, 而对一些界限模糊的脑区缺乏描述, 尚未命名。鸟类大脑的研究也面临着类似的问题, 它们通过建立了统一命名规则成功的解决上述问题 (Jarvis *et al.*, 2005)。同样为了解决昆虫脑神经髓命名混乱的问题, 2007 年成立了国际昆虫脑结构命名工作组 (Insect Name Working Group), 他们以模式动物果蝇的大脑作为框架确定了脑内各神经髓的名称, 建立了一套有效的脑神经髓识别方法 (Ito *et al.*, 2014)。虽然昆虫种类不同, 但他们的脑区存在着对应关

系,因此,这一命名系统不仅适用于果蝇脑区的命名,亦可作为其他昆虫或节肢动物命名的参考,推动了昆虫脑结构图谱研究。目前该命名系统已被应用于沙漠蝗、烟青虫、蛱蝶、灰黑心结蚁、棉铃虫、烟芽叶蛾等昆虫中(陈秋燕等,2016; Bressan *et al.*, 2015; Immonen *et al.*, 2017; von Hadeln *et al.*, 2018)(表1)。

7 小结与展望

脑是控制昆虫行为的中枢,构建脑神经髓三维图谱有利于研究控制行为的神经环路、突触连接可塑性和神经调质对神经网络的调控等。经过近20年的发展,多种昆虫的脑结构三维图谱得以建立,并形成了系统的研究方法,包括脑的免疫染色、共聚焦显微镜成像和计算机三维重建等。然而获取理想的脑结构图谱仍存在多种影响因素,如在免疫染色中,固定、脱水和透明等步骤常造成脑组织缩水或扭曲,改变了脑神经髓的原始体积和形状。近年有学者应用转基因技术使红色荧光蛋白与果蝇的突触前膜蛋白融合实现神经髓区域标记,结果表明活体(*in vivo*)成像获得的触角叶体积显著高于体外(*in vitro*)获得的数据(Grabe *et al.*, 2015)。目前,脑神经髓图像分割主要依赖手动分割来完成,非常耗时,且存在主观性,如何构建出逼真的三维模型仍需要进一步的探索。目前,已有4种方法构建昆虫脑标准图谱,但各有利弊,还需要继续开发更加快捷、准确的三维建模技术。此外,不同实验室构建的脑图谱应具备充分的兼容性,这有利于团队之间的交流与互换,促进昆虫脑功能的研究。目前国外已尝试建立脑图谱数据库(<https://insectbraindb.org>),研究者可登录获取不同昆虫的脑图谱模型,亦可将自己的研究结果上传至数据库内,这将极大的推动脑图谱研究。随着基因编辑技术的发展使昆虫脑神经髓活体观察成为可能,同时结合计算机人工智能图像分割,相信未来脑神经髓图谱的构建将更加准确和快速。

致谢:感谢美国亚利桑那州立大学雷宏博士帮助修改英文摘要和提出修改意见!

参考文献 (References)

- Adden A, Wibbrand S, Pfeiffer K, Warrant E, Heinze S, 2020. The brain of a nocturnal migratory insect, the Australian Bogong moth. *Journal of Comparative Neurology*, 528(11): 1942–1963.
- 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 applications. *Journal of Comparative Neurology*, 492(1): 1–19.
- Bressan J, Benz M, Oettler J, Heinze J, Hartenstein V, Sprecher SG, 2015. A map of brain neuropils and fiber systems in the ant *Cardiocondyla obscurior*. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8: 166.
- Bucher D, Scholz M, Stetter M, Obermayer K, Pflüger HJ, 2000. Correction methods for three-dimensional reconstructions from confocal images: I. Tissue shrinking and axial scaling. *Journal of Neuroscience Methods*, 100(1/2): 135–143.
- Cachero S, Ostrovsky AD, Jai YY, Dickson BJ, Jefferis GS, 2010. Sexual dimorphism in the fly brain. *Current Biology*, 20(18): 1589–1601.
- Chen QY, Wu X, Tang QB, Xie GY, Zhao XC, 2016. Anatomical organization and three-dimensional reconstruction of the brain in adult *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 59(1): 33–46. [陈秋燕, 吴晓, 汤清波, 谢桂英, 赵新成, 2016. 烟青虫成虫脑结构解剖和三维模型构建. 昆虫学报, 59(1): 33–46.]
- Chiang AS, Lin CY, Chuang CC, Chang HM, Hsieh CH, Yeh CW, Shih CT, Wu JJ, Wang GT, Chen YC, Wu CC, Chen GY, Ching YT, Lee PC, Lin CY, Lin HH, Wu CC, Hsu HW, Huang YA, Chen JY, Chiang HJ, Lu CF, Ni RF, Yeh CY, Hwang JK, 2011. Three-dimensional reconstruction of brain-wide wiring networks in *Drosophila* at single-cell resolution. *Current Biology*, 21(1): 1–11.
- de Vries L, Pfeiffer K, Trebels B, Adden AK, Green K, Warrant E, Heinze S, 2017. Comparison of navigation-related brain regions in migratory versus non-migratory noctuid moths. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11: 158.
- Dreyer D, Vitt H, Dippel S, Goetz B, el Jundi B, Kollmann M, Schachtner J, 2010. 3D standard brain of the red flour beetle *Tribolium castaneum*: A tool to study metamorphic development and adult plasticity. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 4: 3.
- el Jundi B, Heinze S, Lenschow C, Kurylas A, Rohlfing T, Homberg U, 2010. The locust standard brain: A 3D standard of the central complex as a platform for neural network analysis. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 3: 21.
- el Jundi B, Huetteroth W, Kurylas AE, Schachtner J, 2009. Anisometric brain dimorphism revisited: implementation of a volumetric 3D

- standard brain in *Manduca sexta*. *Journal of Comparative Neurology*, 517(2): 210–225.
- Giurfa M, 2013. Cognition with few neurons: Higher-order learning in insects. *Trends in Neurosciences*, 36(5): 285–294.
- Gonzalez-Bellido PT, Wardill TJ, 2012. Labeling and confocal imaging of neurons in thick invertebrate tissue samples. *Cold Spring Harbor Protocols*, doi:10.1101/pdb.prot069625.
- Grabe V, Strutz A, Baschwitz A, Hansson BS, Sachse S, 2015. Digital in vivo 3D atlas of the antennal lobe of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Neurology*, 523(3): 530–544.
- Groothuis J, Pfeiffer K, el Jundi B, Smid HM, 2019. The jewel wasp standard brain: Average shape atlas and morphology of the female *Nasonia vitripennis* brain. *Arthropod Structure & Development*, 51: 41–51.
- Guo AK, 2019. A cross-species review of cognitive neural circuits to illuminate the way to brain-inspired intelligence. *Scientia Sinica Vitae*, 49(10): 1354–1374. [郭爱克, 2019. 探索自然智慧本质, 照亮人类脑智能之路-果蝇学习记忆与抉择的神经环路机制研究. 中国科学: 生命科学, 49(10): 1354–1374.]
- Heinze S, Homberg U, 2008. Neuroarchitecture of the central complex of the desert locust: Intrinsic and columnar neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 511(4): 454–478.
- Heinze S, Reppert SM, 2012. Anatomical basis of sun compass navigation I: The general layout of the monarch butterfly brain. *Journal of Comparative Neurology*, 520(8): 1599–1628.
- Huetteroth W, el Jundi B, el Jundi S, Schachtner J, 2010. 3D-reconstructions and virtual 4D-visualization to study metamorphic brain development in the sphinx moth *Manduca sexta*. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 4: 7.
- Immonen EV, Dacke M, Heinze S, el Jundi B, 2017. Anatomical organization of the brain of a diurnal and a nocturnal dung beetle. *Journal of Comparative Neurology*, 525(8): 1879–1908.
- Ito K, 2010. Technical and organizational considerations for the long-term maintenance and development of the digital brain atlases and web-based databases. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 4: 26.
- Ito K, Shinomiya K, Ito M, Armstrong JD, Boyan G, Hartenstein V, Harzsch S, Heisenberg M, Homberg U, Jenett A, Keshishian H, Restifo LL, Rössler W, Simpson JH, Strausfeld NJ, Strauss R, Vosshall L, Insect Name Working Group, 2014. A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron*, 81(4): 755–765.
- Jarvis ED, Güntürkün O, Bruce L, Csillag A, Karten H, Kuenzel W, Medina L, Paxinos G, Perkel DJ, Shimizu T, Striedter G, Wild JM, Ball GF, Dugars-Ford J, Durand SE, Hough GE, Husband S, Kubikova L, Lee DW, Mello CV, Powers A, Siang C, Smulders TV, Wada K, White SA, Yamamoto K, Yu J, Reiner A, Butler AB, 2005. Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2): 151–159.
- Kurylas AE, Rohlfing T, Krofczik S, Jenett A, Homberg U, 2008. Standardized atlas of the brain of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Cell and Tissue Research*, 333(1): 125.
- Kvellido P, Løfaldli BB, Rybak J, Menzel R, Mustaparta H, 2009. Digital, three-dimensional average shaped atlas of the *Heliothis virescens* brain with integrated gustatory and olfactory neurons. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 3: 14.
- Lin T, Li CF, Liu JL, Smith BH, Lei H, Zeng XN, 2018. Glomerular organization in the antennal lobe of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis*. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12: 71.
- Lin T, Liu JL, Zeng XN, 2019. Structural characteristics of optic lobe and distribution of 5-HT immunoreactive neurons in the oriental fruit fly. *Journal of Environmental Entomology*, 41(3): 443–450. [林涛, 刘家莉, 曾鑫年, 2019. 桔小实蝇视叶结构特征及 5-羟色胺能神经元的分布. 环境昆虫学报, 41(3): 443–450.]
- Montgomery SH, Merrill RM, Ott SR, 2016. Brain composition in *Heliconius* butterflies, posteclosion growth and experience-dependent neuropil plasticity. *Journal of Comparative Neurology*, 524(9): 1747–1769.
- Montgomery SH, Ott SR, 2015. Brain composition in *Godyris zavaleta*, a diurnal butterfly, reflects an increased reliance on olfactory information. *Journal of Comparative Neurology*, 523(6): 869–891.
- Nässel DR, 1996. Advances in the immunocytochemical localization of neuroactive substances in the insect nervous system. *Journal of Neuroscience Methods*, 69(1): 3–23.
- Ott SR, 2008. Confocal microscopy in large insect brains: Zinc-formaldehyde fixation improves synapsin immunostaining and preservation of morphology in whole-mounts. *Journal of Neuroscience Methods*, 172(2): 220–230.
- Ott SR, Elphick MR, 2003. New techniques for whole-mount NADPH-diaphorase histochemistry demonstrated in insect ganglia. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51(4): 523–532.
- Ott SR, Rogers SM, 2010. Gregarious desert locusts have substantially larger brains with altered proportions compared with the solitary phase. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1697): 3087–3096.
- Peng H, Chung P, Long F, Qu L, Jenett A, Seeds AM, Myers EW, Simpson JH, 2011. BrainAligner: 3D registration atlases of *Drosophila* brains. *Nature Methods*, 8(6): 493–498.

- Rein K, Zöckler M, Mader MT, Grübel C, Heisenberg M, 2002. The *Drosophila* standard brain. *Current Biology*, 12(3): 227–231.
- Reisenman CE, Lei H, Guerenstein PG, 2016. Neuroethology of olfactory-guided behavior and its potential application in the control of harmful insects. *Frontiers in Physiology*, 7: 271.
- Riffell JA, Lei H, Hildebrand JG, 2009. Neural correlates of behavior in the moth *Manduca sexta* in response to complex odors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(46): 19219–19226.
- Rybák J, 2012. The digital honey bee brain atlas//Galizia CG, Eisenhardt D, Giurfa M (eds.). Honeybee Neurobiology and Behavior: A tribute to Randolph Menzel. Dordrecht: Springer. 125–140.
- Sheehan ZB, Kamhi JF, Seid MA, Narendra A, 2019. Differential investment in brain regions for a diurnal and nocturnal lifestyle in Australian *Myrmecia* ants. *Journal of Comparative Neurology*, 527(7): 1261–1277.
- Stöckl A, Heinze S, Charalabidis A, el Jundi B, Warrant E, Kelber A, 2016. Differential investment in visual and olfactory brain areas reflects behavioural choices in hawk moths. *Scientific Reports*, 6: 26041.
- Strausfeld NJ, 1976. The atlas: Sections through the Brain//Strausfeld NJ (ed.). Atlas of an Insect Brain. Springer-Verlag. 57–115.
- Tang QB, Zhan H, Berg BG, Yan FM, Zhao XC, 2014. Three dimensional reconstructions of the brain and the suboesophageal ganglion of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 57(5): 538–546. [汤清波, 詹欢, 闫凤鸣, 赵新成, 2014. 棉铃虫幼虫脑和咽下神经节的三维结构构建. 昆虫学报, 57(5): 538–546.]
- von Hadeln J, Althaus V, Häger L, Homberg U, 2018. Anatomical organization of the cerebrum of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Cell and Tissue Research*, 374(1): 39–62.
- Wang JN, Ji LQ, 2011. Methods of insect image segmentation and their application. *Acta Entomologica Sinica*, 54(2): 211–217. [王江宁, 纪力强, 2011. 昆虫图像分割方法及其应用. 昆虫学报, 54(2): 211–217.]
- Wei H, el Jundi B, Homberg U, Stengl M, 2010. Implementation of pigment-dispersing factor-immunoreactive neurons in a standardized atlas of the brain of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Journal of Comparative Neurology*, 518(20): 4113–4133.
- Xie GY, Chen JH, Tang QB, Yin J, Zhao XC, 2016. Anatomical structure of the brain of larval *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae). *Acta Entomologica Sinica*, 59(8): 831–838. [谢桂英, 陈俊华, 汤清波, 尹健, 赵新成, 2016. 茶尺蠖幼虫脑的解剖结构. 昆虫学报, 59(8): 831–838.]
- Xie GY, Ma BW, Liu XL, Chang YJ, Chen WB, Li GP, Feng HQ, Zhang YJ, Berg BG, Zhao XC, 2019. Brain organization of *Apolygus lucorum*: A hemipteran species with prominent antennal lobes. *Frontiers in Neuroanatomy*, 13: 70.
- Xie GY, Zhao XC, Ma BW, Guo P, Li GP, Feng HQ, Wu GL, 2016. Central projection of antennal sensory neurons in the central nervous system of the mirid bug *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). *PLoS ONE*, 11(8): e0160161.
- Yan XZ, Wang ZY, Xie JX, Deng CP, Sun XJ, Hao C, 2019. Glomerular organization of the antennal lobes of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *Frontiers in Neuroanatomy*, 13: 4.
- Yu XW, Shen ZR, 2001. Segmentation technology for digital image of insects. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 17(3): 137–141. [于新文, 沈佐锐, 2001. 昆虫数字图像的分割技术研究. 农业工程学报, 17(3): 137–141.]
- Zhao XC, Chen QY, Guo P, Xie GY, Tang QB, Guo XR, Berg BG, 2016. Glomerular identification in the antennal lobe of the male moth *Helicoverpa armigera*. *Journal of Comparative Neurology*, 524(15): 2993–3013.
- Zhao XC, Zhai Q, Wang G, 2015. The structure of the antennal lobe in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 58(2): 190–209. [赵新成, 翟卿, 王桂荣, 2015. 昆虫触角叶的结构. 昆虫学报, 58(2): 190–209.]