

# 黑水虻 *Hermetia illucens* 消化道形态及组织结构的观察

孙秋璇<sup>1,2,3,4</sup>, 李向策<sup>1,2,3,4</sup>, 谭小红<sup>1,2,3,4</sup>, 游翠红<sup>1,2,3,4</sup>, 董焯炜<sup>1,2,3,4</sup>,  
高红燕<sup>1,2,3,4</sup>, 黄燕华<sup>1,2,3,4\*</sup>, 周 萌<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. 仲恺农业工程学院, 健康养殖创新研究院, 广州 510225; 2. 仲恺农业工程学院, 动物科技学院, 广州 510225; 3. 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心, 广州 510225; 4. 广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广州 510225)

**摘要:** 比较不同发育阶段黑水虻 *Hermetia illucens* 消化道的形态学差异, 掌握幼虫消化系统的组织学特征。本文利用体视镜观察黑水虻 5 龄幼虫、预蛹及成虫的消化道形态, 利用光学显微镜和扫描电镜观察幼虫消化道各段(前肠、中肠、后肠)的显微及超微结构。结果表明: 黑水虻幼虫及预蛹的消化道均由前肠(食道和前胃)、中肠及后肠组成, 从幼虫到成虫, 消化道的长度不断缩短。与幼虫和预蛹相比, 成虫消化道形态变化明显, 前胃消失, 出现了嗉囊及胃盲囊, 中肠进一步缩短, 后肠分化为回肠、结肠和直肠。组织学观察结果显示, 幼虫的唾液腺开口于口腔, 由膨大的管状腺体和腺管组成。食道由特化为角质刺突的内膜层及发达的肌层组成, 其末端延伸至前胃。前胃膨大为球状, 包括三层组织结构。根据上皮细胞形态的差异, 中肠可分为四个区段。后肠薄, 肠腔内褶丰富, 肠壁可见数量较多的杆状细菌。马氏管开口于中、后肠交界处, 包括 4 支盲管, 管内壁密布微绒毛。黑水虻消化道形态随发育阶段的变化, 反映了各阶段摄食及消化生理的差异。幼虫消化道各段具有各自典型的组织学特征, 其前、中、后肠可能分别承担了食物接纳与初步消化、消化与吸收以及重吸收功能。本研究结果为进一步了解黑水虻的消化生理特征提供了重要的形态学和组织学依据。

**关键词:** 黑水虻; 消化道; 形态学; 组织学

中图分类号: Q965.8;S433 文献标识码: A

## Observations on morphology and histology of digestive tract in black soldier fly *Hermetia illucens*

基金项目: 广东省教育厅创新团队项目(2020KCXTD019); 省级农业科技创新推广及农业资源与生态环境保护建设项目(2021KJ115)

作者简介: 孙秋璇, 女, 1999 年生, 江苏新沂人, 硕士研究生, 研究方向为功能性饲料原料开发与应用, E-mail: sun990921@163.com

\*共同通讯作者 Author for correspondence: 周萌, 女, 博士, 副教授, 研究方向为水产动物营养与免疫、新型原料及功能性添加剂开发, E-mail: zhoumeng@zhku.edu.cn; 黄燕华, 女, 博士, 教授, E-mail: huangyh111@126.com

收稿日期 Received: 2022-07-12; 接受日期 Accepted: 2022-09-05

SUN Qiu-Xuan<sup>1,2,3,4</sup>, LI Xiang-Ce<sup>1,2,3,4</sup>, TAN Xiao-Hong<sup>1,2,3,4</sup>, YOU Cui-Hong<sup>1,2,3,4</sup>, DONG Ye-Wei<sup>1,2,3,4</sup>, GAO Hong-Yan<sup>1,2,3,4</sup>, HUANG Yan-Hua<sup>1,2,3,4\*</sup>, ZHOU Meng<sup>1,2,3,4\*</sup>(1. Innovative Institute of Animal Healthy breeding, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 2. College of Animal Sciences and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510222, China; 3. Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510222, China; 4. Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, Guangzhou 510222, China)

**Abstract:** The differences of digestive tract morphology among different developmental stages of black soldier fly were compared and the digestive tract histology in larvae was investigated. The digestive tract morphology of the 5<sup>th</sup> instar larvae, pre-pupae and adult was observed by stereoscope, while the microstructure and ultrastructure of the digestive tract (foregut, midgut and hindgut) in larvae were observed by light microscope and scanning electron microscope. The foregut (oesophagus and proventriculus), midgut and hindgut formed the digestive tract of the larvae and pre-pupae, and the length of digestive tract became shorter with larvae growth. Compared with that of larvae and pre-pupae, great changes in digestive tract morphology were observed in adult: the crop and gastric caeca appeared, while the proventriculus disappeared. The midgut length was drastically reduced and the hindgut was differentiated into ileum, colon and rectum. The results of the digestive system histology in larvae showed, the salivary gland was composed of tubular gland and ducts, which opened into the mouth. The oesophagus was composed of keratinized intimal layer and well developed muscle layers, with its end extending downward into the proventriculus. The proventriculus was a multi-layer sack with three layers. The midgut could be divided into four segments according to the morphology of the epithelial cells. The hindgut had thin and folded intestinal wall, on which a large number of rod-shaped bacteria were found. The malpighian tubules with four blind tubes were located in the junction of midgut and hindgut, with clumps of microvilli on the inner wall. The variation of digestive tract morphology with developmental stages could reflect the changes in feeding and digestive physiology. Each segment of the digestive tract in larvae had its specific histological characteristics. The foregut, midgut and hindgut may undertake the functions of food reception and preliminary digestion, digestion and absorption, and reabsorption respectively. This present

study provides important morphological evidence for further understanding the digestive physiology of black soldier fly.

**Key words:** Black soldier fly; digestive tract; morphology; histology

全球餐厨垃圾、畜禽粪污等有机废弃物的持续产生和资源化利用不足,造成了环境污染和资源浪费的双重压力。联合国粮农组织提倡利用昆虫转化有机废弃物,实现废弃物的无害化处理的同时,还可生产优质的昆虫蛋白和脂肪(Riudavets *et al.*, 2020)。黑水虻 *Hermetia illucens* L.属于双翅目水虻科扁角水虻属,广泛分布于热带和温带地区(Wang and Shelomi, 2017)。其幼虫能以多种有机废弃物为食,且繁殖速度快、生物量大、虫体营养丰富(Cifuentes *et al.*, 2020; Hopkins *et al.*, 2021),具有其它昆虫难以比拟的优势,成为全球最具开发潜力的资源性昆虫之一。

近年来的大量研究表明,黑水虻幼虫、预蛹或其生物制品具有良好的饲用价值,可部分甚至完全替代鱼粉、豆粕等传统饲料原料(Mohan *et al.*, 2022),保证动物的生长性能,提高其免疫力与抗病力(许丰孟等, 2020; 余苗等, 2020; Heuel *et al.*, 2021)。

黑水虻幼虫对有机废弃物高效的生物转化能力主要得益于其强大的消化系统(Clissold *et al.*, 2010)。Bonelli 等(2019)根据黑水虻中肠组成细胞的形态功能特征以及管腔 pH,将其划分为三个区域,并评估了各段涉及的消化酶活性,总结了其功能特征。在此基础上, Sun 等(2021)比较了摄食不同有机废弃物黑水虻幼虫的消化道 pH 值、中肠细胞形态及消化酶活性的差异,揭示了黑水虻广泛适应多种食物的消化生理基础。此外,对取食不同有机废弃物黑水虻肠道微生物群落的比较研究发现,肠道菌群的多样性受食物的影响较大,但厚壁菌门始终占据优势地位(Bruno *et al.*, 2019)。以上研究为人们从细胞和分子水平认识黑水虻的消化生理提供了参考资料。然而,作为一种广受关注的研究对象,对黑水虻消化道器官和组织水平的研究仍较少,尤其是其消化道的显微与超微结构缺乏系统报道。

为此,本文对黑水虻主要生长阶段(幼虫、预蛹、成虫)的消化道形态进行了比较研究,并重点对幼虫消化系统各部分的组织结构进行了显微和超微观察,为深入了解黑水虻的消化生理研究提供形态学和组织学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫及其饲养

供试昆虫黑水虻在本实验室内孵化和养殖。黑水虻虫卵由广东省农业科学院动物科学研

究所提供。以含水量 60%的膨化豆粕（粗蛋白 42%，粗脂肪 8%）作为培养基，在环境温度 28°C、相对湿度 60%的条件下孵化并养殖至 3 日龄。随后将 100 条幼虫转移到塑料盒（规格 18.5 cm×12 cm×5.5 cm）中，每盒放置 200 g 养殖基质（豆粕：麦麸=1:1），在其中添加适量无菌水保持养殖基质水分含量为 60%±2%，共 3 个重复。养殖期间环境保持在温度 28±1°C，相对湿度 70%~80%，自然光照，每 3 d 补充适量养殖基质，保证营养供应。分别于养殖过程中，选取生长情况良好的 5 龄幼虫（14 日龄）、预蛹（16 日龄）及成虫（30 日龄）用于消化道形态学和组织学研究。

## 1.2 消化道样品采集与观察

### 1.2.1 消化道分段

结合本课题组前期研究中对黑水虻消化道 pH 的测定结果(Sun *et al.*, 2021)，为进一步明确主要消化部位中肠的功能结构，在本研究中，将中肠划分为分别呈现酸性、强酸性和碱性的前、中、后三部分；此外结合中肠中段形态及细胞组成的差异(Bonelli *et al.*, 2019)，将中段进一步细分为直径较细的 A 段以及直径较粗的 B 段。

### 1.2.2 形态学观察

每盒分别取 10 条 5 龄黑水虻幼虫、预蛹及成虫，用解剖剪沿虫体腹壁中线剪开，暴露体腔，取出整个消化道，去除消化道上黏附的组织，用 PBS 缓冲液冲洗干净，并用滤纸吸干水分；使用游标卡尺（JING, SIDA Rang: 150 mm; Jinhua, China, P.R.）测量体长与消化道长度，使用体视镜（Mshot MZ62; Guangzhou, China, P.R.）观察消化道形态并拍照。

### 1.2.3 石蜡切片制作及观察

取出幼虫的完整消化道，分离出唾液腺，前肠，中肠，后肠，马氏管，分别浸入 4%多聚甲醛固定 24 h。经 75%、85%、90%、95%和 100%乙醇溶液逐级脱水后，用石蜡包埋修整，将蜡块置于手动切片机切出厚 4 μm 的切片；用载玻片捞片并于烘箱 60°C烤干后，使用二甲苯以及梯度乙醇中脱蜡至水，将切片分别放入苏木素和伊红染液中染色。将染好色的切片经 95%、100%乙醇及二甲苯脱水透明后，用中性树胶封片。使用光学显微镜(LeicaDM500; Wetzlar, Germany)对组织切片进行观察。

### 1.2.4 扫描电镜制片及观察

取出幼虫完整的消化道，分别取前肠，中肠，后肠及马氏管组织，修整成大小为 5 mm×5 mm×2 mm 的块状，用 2.5%的戊二醛固定液（PBS 0.1 M, pH=7.4）在 4°C下固定 4 h，然后用 PBS 冲洗 3 次，再置于 1%锇酸-0.1 mol/LPBS 进行后固定 30 min，再用 PBS 冲洗 3 次。为了观察消化道管腔内表面结构，在脱水前先用解剖针剖开管腔，用 PBS 缓冲液将内容物

冲洗掉。分别用 50%、70%、80%、90%、95%、100%的乙醇进行脱水，每个浓度脱水 15 min；脱水结束后，放入乙酸异戊酯 10~20 min，移入临界点干燥仪（Quorum K850; East Sussex, UK.），进行干燥。将组织块用导电胶粘贴在标本台上（观察面朝上），用离子溅射仪（HITACHI MC1000; Tokyo, Japan）进行镀膜（金膜）。放入扫描电子显微镜（HITACHI U8010; Tokyo, Japan）进行观察并采集图像分析。

### 1.3 数据分析

使用 SPSS 19.0 软件(Armonk, NY, USA)对黑水虻 5 龄幼虫、预蛹及成虫的体长、肠道长和中肠长分别进行了单因素 ANOVA 检验，显著性水平为 0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 5 龄幼虫、预蛹及成虫的消化道形态

体视显微镜下可见，黑水虻幼虫的消化道包括前肠、中肠、后肠三部分，总长  $137.44 \pm 13.07$  mm，为体长的  $6.85 \pm 0.18$  倍（图 1-A，表 1）。前肠由食道和前胃组成，食道呈细长管状，前胃膨大为球状，可见食道末端延入前胃，形成套管状结构。中肠始于前胃末端，是一条粗细不均的管道，为消化道中最长的部位，是整个消化道长度的  $0.71 \pm 0.03$  倍（表 1）。后肠以马氏管着生处与中肠为界，粗细均一。马氏管呈细长盲管状，分为 4 支。

预蛹的消化道形态与幼虫相似（图 1-B），但较幼虫阶段其肠道直径变小，长度缩短为  $97.75 \pm 7.65$  mm，是体长的  $5.22 \pm 0.18$  倍。其中，中肠长度为消化道长度的  $0.63 \pm 0.06$  倍（表 1）。

与幼虫和预蛹相比，成虫的消化道形态发生了明显变化，总长变短，长  $14.90 \pm 1.26$  mm，是体长的  $0.96 \pm 0.08$  倍（图 1-C，表 1）。前胃消失，出现了嗦囊，以一细长管开口于食道末端。中肠长度进一步缩短为  $7.78 \pm 1.36$  mm，是整个消化道长度的  $0.52 \pm 0.07$  倍（表 1）；前端出现一对囊状、对称分布的胃盲囊，与食道相接。后肠分化为回肠、结肠和直肠 3 部分，其中回肠和直肠呈短而膨大的囊状。后肠与中肠交界处着生马氏管，依然分为 4 支。

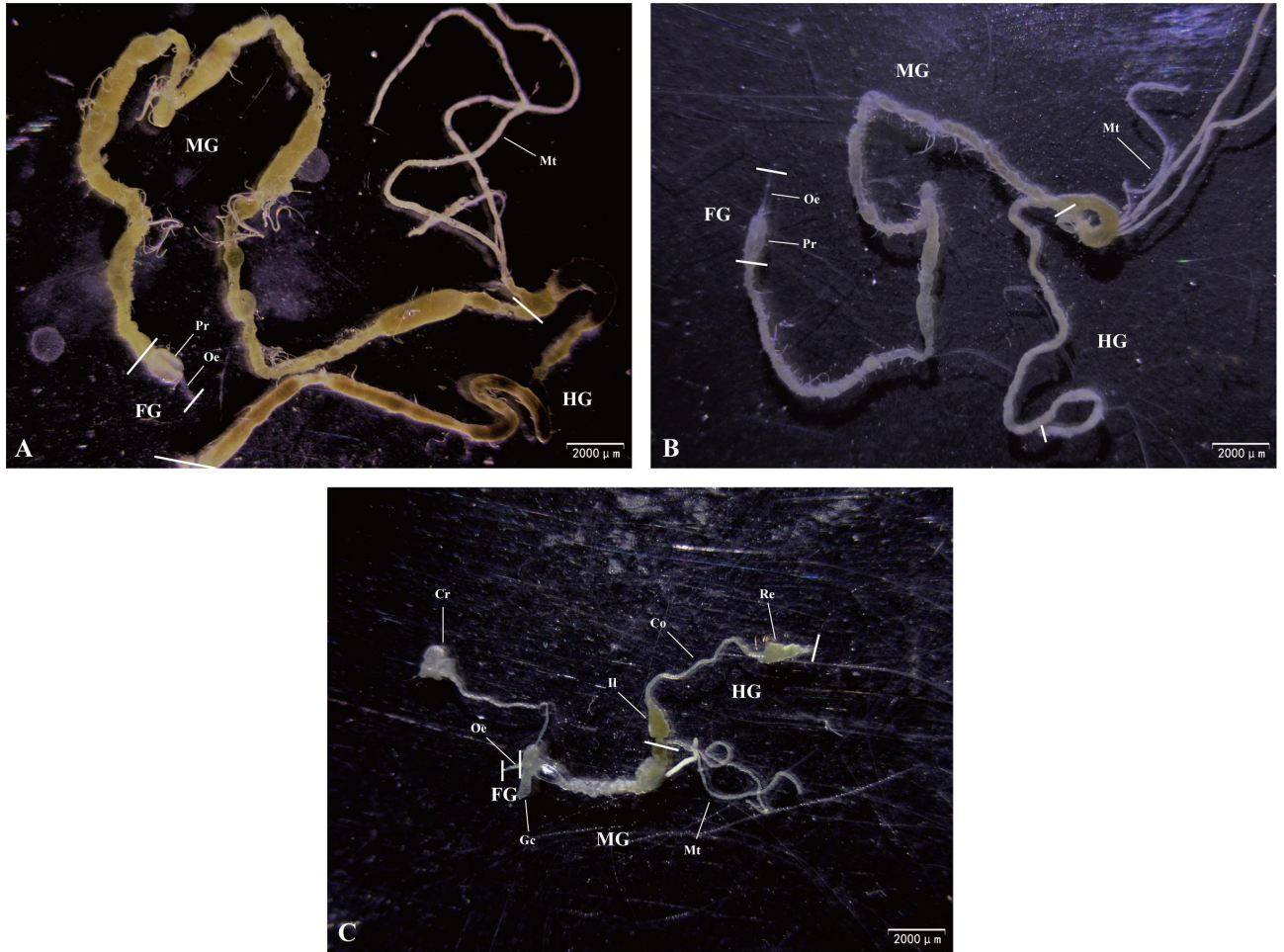


图1 黑水虻5龄幼虫(A)、预蛹(B)及成虫(C)的消化道形态

Fig. 1 Digestive tract morphology of the 5<sup>th</sup> instar larvae (A), pre-pupae (B) and adult (C) of black soldier fly

注: FG, 前肠; MG, 中肠; HG, 后肠; Oe, 食道; Cr, 嗉囊; Pr, 前胃; Mt, 马氏管; Ge, 胃盲囊; II, 回肠; Co, 结肠; Re, 直肠.

Note: FG, Foregut; MG, Midgut; HG, Hindgut; Oe, Oesophagus; Cr, Crop; Pr, Proventriculus; Mt, Malpighian tubule; Ge, Gastric caeca;

II, Ileum; Co, Colon; Re, Rectum.

表1 黑水虻5龄幼虫(A)、预蛹(B)及成虫的体长、肠道长和中肠长(n=8)

Table 1 Body, digestive tract and midgut length of the 5<sup>th</sup> instar larvae, pre-pupae and adult of black soldier fly

(n=8)

发育阶段	体长(mm)	消化道长(mm)	中肠长(mm)	消化道长/体长	中肠长/消化道长
developmental stages	body length	digestive tract length	midgut length	digestive tract length/body length	midgut length/digestive tract length
幼虫 larvae	20.04±1.45 <sup>c</sup>	137.44±13.07 <sup>c</sup>	97.99±12.15 <sup>c</sup>	6.85±0.18	0.71±0.03



预蛹 pre-pupae	18.71±1.19 <sup>b</sup>	97.75±7.65 <sup>b</sup>	61.39±7.15 <sup>b</sup>	5.22±0.18	0.63±0.06
成虫 adult	15.49±0.68 <sup>a</sup>	14.90±1.26 <sup>a</sup>	7.78±1.36 <sup>a</sup>	0.96±0.08	0.52±0.07

注：同一列不同小写字母上标表示该列数据具有显著性差异( $P<0.05$ )。Note: Superscript of different lower case letters in the same column indicated that the data in this column were significant differences ( $P<0.05$ ).

## 2.2 幼虫消化系统的显微与超微结构

### 2.2.1 唾液腺

黑水虻幼虫的唾液腺由两支对称、膨大的管状腺体和腺管组成，两个腺管汇合为一个分泌管与口腔相通（图 2-A）。每个腺体长  $0.85\pm 0.15$  mm，光学显微镜下可观察到腺体细胞较大，细胞核扁圆形，染色深，胞质染色浅，似粘液性腺细胞（图 2-B, C）。对唾液腺的管状腺体进行扫描电镜观察，发现腺壁较厚，似有纵肌环绕，腺壁内表面粗糙，似有微绒毛突起入腺腔（图 2-D）。

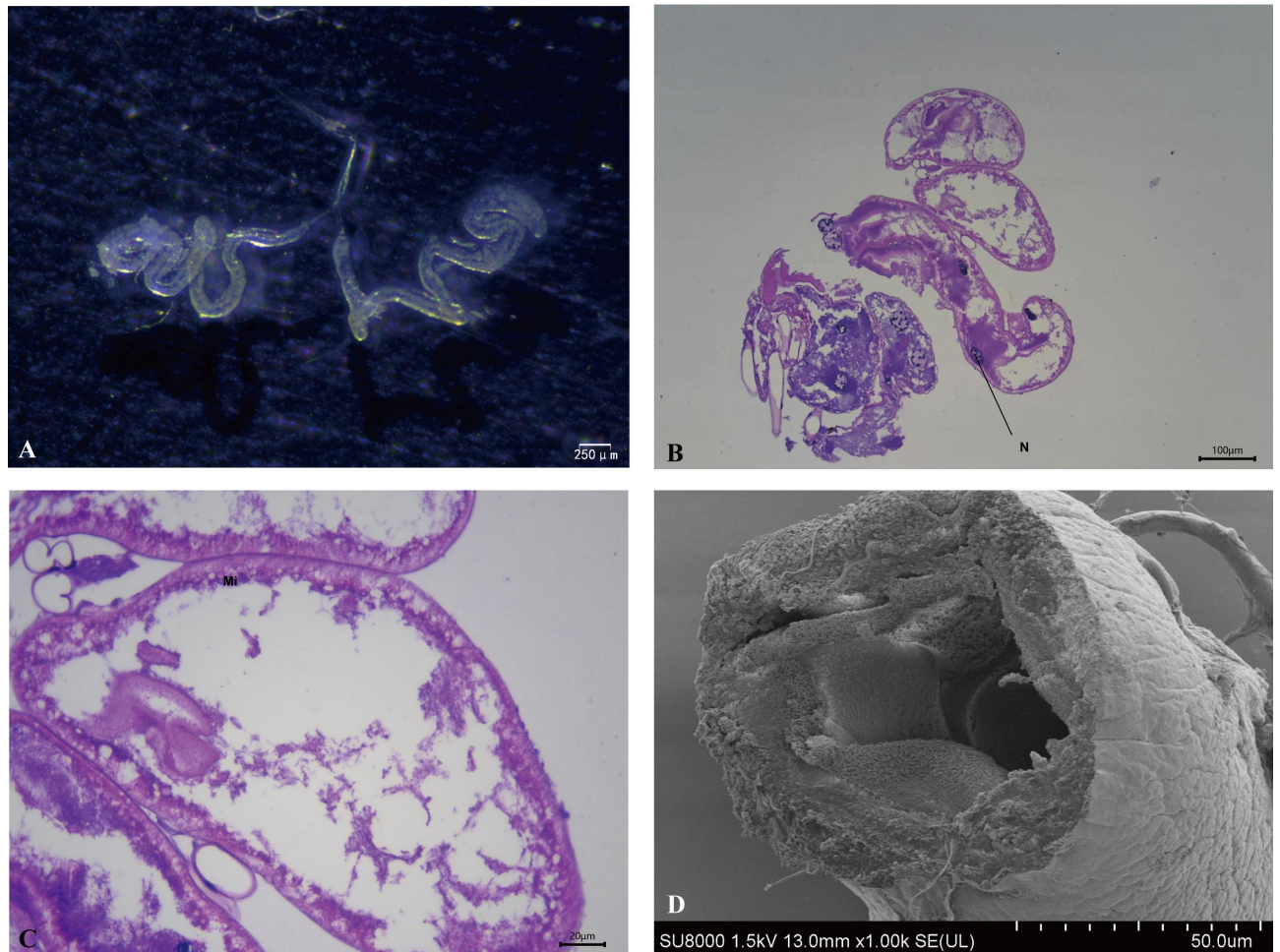


图 2 黑水虻 5 龄幼虫唾液腺的形态与组织结构

Fig. 2 Morphology and histology of the salivary gland in 5<sup>th</sup> instar larvae of black soldier fly

注: A, 唾液腺形态; B, C, 腺体的显微结构(H.E. 100×, 400×); D, 腺体的超微结构(横切, SEM. 1000×); N, 细胞核; Mi, 微绒毛.

Note: A, Morphology of salivary gland; B, C, Microstructure of the gland (H.E. 100×, 400×); D, Ultrastructure of the gland (cross section, SEM. 1000×); N, Nucleus; Mi, Microvilli.

## 2.2.2 前肠

黑水虻幼虫的前肠由食道与前胃组成，食道末端延伸至前胃内（图 3-A）。由内至外，食道组织包括呈刺状突起的角质内膜层、环肌层和纵肌层（图 3-B）。前胃膨大为囊状，由内至外也分为三层：内层为食道的延伸，与食道结构相似；外层由单层扁平上皮细胞构成；中间层为紧贴外层的围食膜，其内容物呈嗜酸性染色。围食膜下端一直延伸至中肠（图 3-A, C）。扫描电镜显示，食道深入前胃部分的内壁可见向管腔突出的胃刺，整齐而密集，平均长度为  $6.36\ \mu\text{m}$ （图 3-D）。

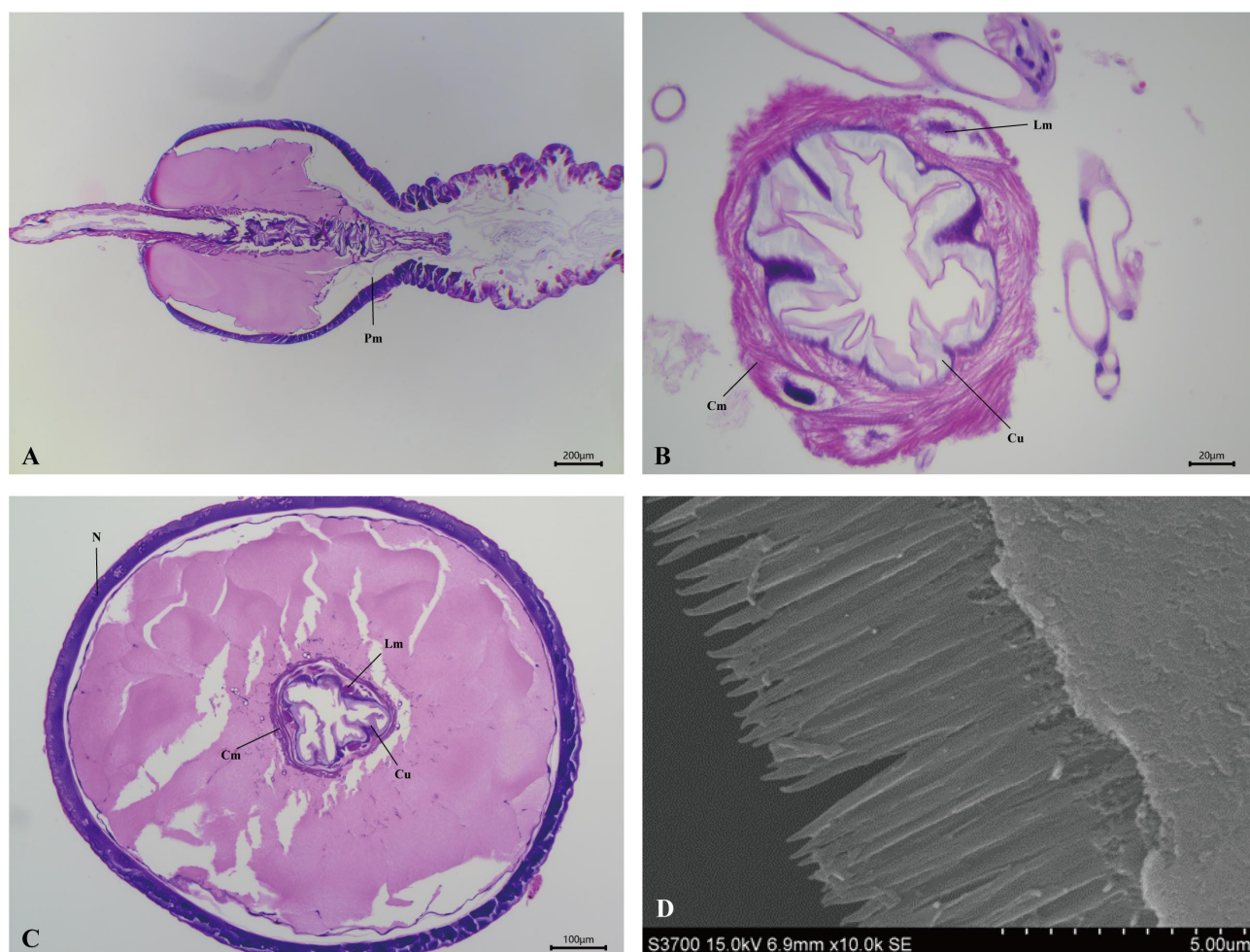


图 3 黑水虻 5 龄幼虫前肠的显微和超微结构

Fig. 3 Microstructure and ultrastructure of the foregut in 5<sup>th</sup> instar larvae of black soldier fly

注: A, 食道和前胃的显微结构(纵切, H.E. 40×); B, 食道的显微结构(横切, H.E. 400×); C, 前胃的显微结构(横切, H.E. 100×); D, 前胃内壁的胃刺(SEM. 10 000×); Cm, 环肌; Lm, 纵肌; Pm, 围食膜; N, 细胞核; Cu, 角质内膜层。Note: A, Microstructure of oesophagus and proventriculus (longitudinal section, H.E. 40×); B, Microstructure of oesophagus (cross section, H.E. 400×); C, Microstructure of proventriculus (cross section, H.E. 100×); D, Gastric spines of the proventriculus wall (SEM. 10 000×); Cm, Circular muscle; Lm, Longitudinal muscle; Pm, Peritrophic matrix; N, Nucleus; Cu, Cuticle.



Microstructure of proventriculus (cross section, H.E. 100×); D, Proventricular acanthae on the inner wall (SEM. 10 000×); Cm, Circular muscle; Lm, Longitudinal muscle; Pm, Peritrophic membrane; N, Nucleus; Cu, Cuticular intima.

### 2.2.3 中肠

幼虫中肠前段由内到外，分为围食膜层、肠壁细胞层、底膜层及肌层（图 4-A）。其中，肠壁细胞主要由柱状上皮细胞、分泌细胞以及再生细胞构成。柱状细胞是肠道上皮的主要组成细胞，其顶端具有微绒毛结构，通过扫描电镜也可观察到肠壁上布满大量的微绒毛（图 4-C, D）。再生细胞随机分布在肠道上皮基底部分，分泌细胞位于肠道基底区（图 4-B）。

根据肠道细胞形态的差异，中肠中段可明显分为 A、B 两段。其中，A 段肠壁较厚（图 5-A），主要由柱状细胞、分泌细胞、再生细胞和杯状的铜细胞构成（图 5-B）；B 段肠壁较薄（图 5-C），主要由单层扁平上皮细胞构成（图 5-D）。扫描电镜显示，中肠中段内壁较光滑，未见微绒毛结构（图 5-E, F）。

中肠后段与前段组织结构类似，肠壁细胞以柱状上皮细胞为主，在基底区可以观察到分泌细胞和再生细胞的分布（图 6-A, B）。扫描电镜结果显示，中肠后段具有发达的微绒毛，间布有大量囊泡（图 6-C, D）。

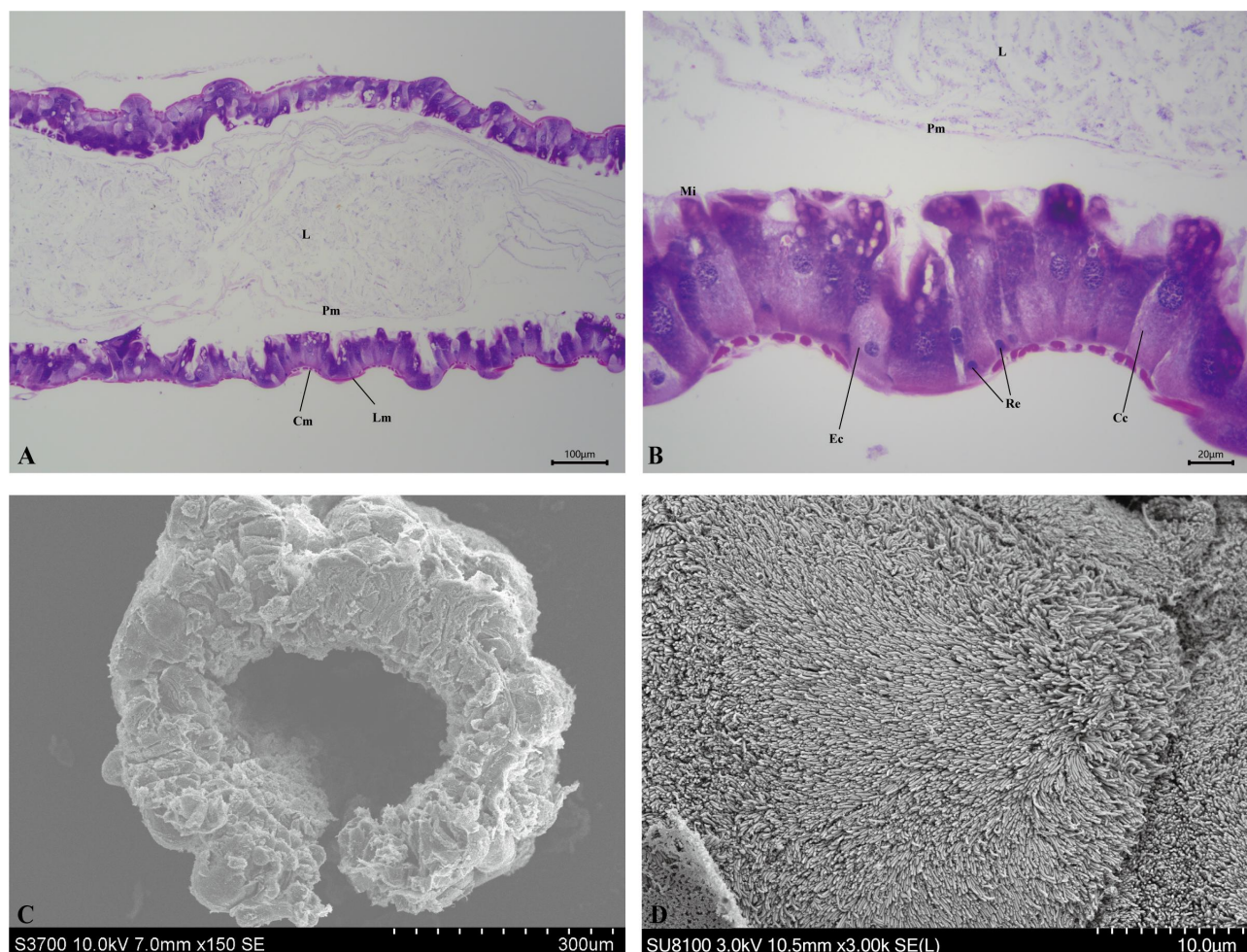


图 4 黑水虻 5 龄幼虫中肠前段显微与超微结构

Fig. 4 Microstructure and ultrastructure of the anterior midgut in 5<sup>th</sup> instar larvae of black soldier fly

注: A, B, 中肠前段显微结构(纵切, H.E. 100×, 400×); C, 中肠前段超微结构(横切, SEM. 150×); D, 中肠前段肠壁内壁(SEM. 3000×); Cm, 环肌; Lm, 纵肌; Rc, 再生细胞; Cc, 柱状细胞; Ec, 分泌细胞; Mi, 微绒毛; Pm, 围食膜; L, 肠腔。Note: A, B, Microstructure of the anterior midgut (longitudinal section, 100×, 400×); C, Ultrastructure of the anterior midgut (cross section, SEM. 150×); D, Inner wall of the anterior midgut wall (SEM. 3 000×); Cm, Circular muscle; Lm, Longitudinal muscle; Rc, Regenerative cells; Cc, Columnar cells; Ec, Endocrine cells; Mi, Microvilli; Pm, Peritrophic membrane; L, Intestinal lumen.

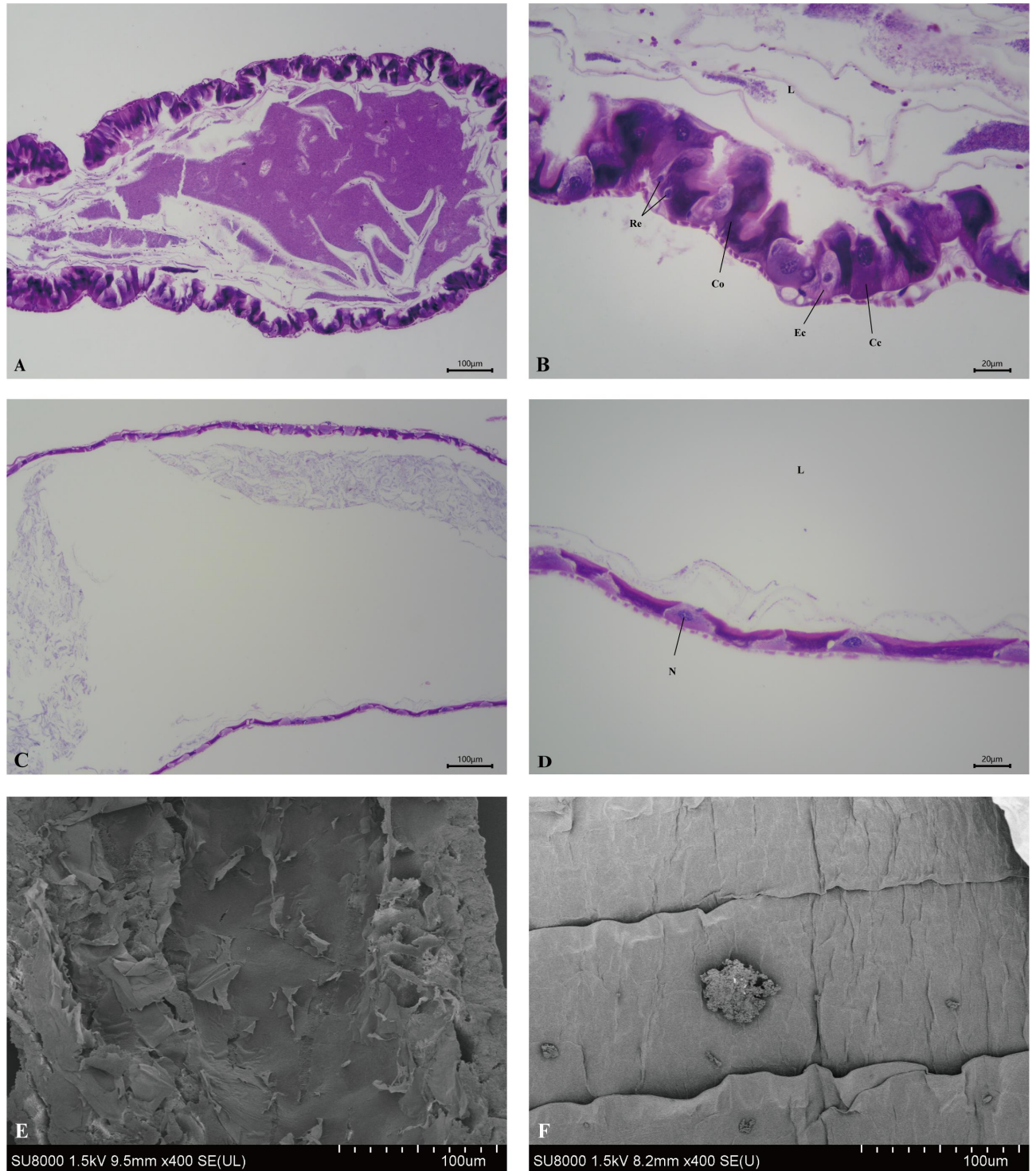


图 5 黑水虻 5 龄幼虫中肠中段的显微结构

Fig. 5 Microstructure of the middle midgut in 5<sup>th</sup> instar larvae of black soldier fly

注: A, B, 中肠中段 A 段显微结构(纵切面, H.E. 100 $\times$ , 400 $\times$ ); C, D, 中肠中段 B 段显微结构(纵切面, H.E. 100 $\times$ , 400 $\times$ ); E, 中肠中段-A 段内壁(SEM. 400 $\times$ ); F, 中肠中段-B 段内壁(SEM. 400 $\times$ ); Re, 再生细胞; Cc, 柱状细胞; Ec, 分泌细胞; Co, 铜细胞; N, 细胞核; L, 肠腔。 Note: A, B, Microstructure of the A segment of middle midgut (longitudinal section, H.E. 100 $\times$ , 400 $\times$ ); C, D, Microstructure of the B segment of middle midgut (longitudinal section, H.E. 100 $\times$ , 400 $\times$ ); E, Inner wall of the A segment of middle



midgut (SEM. 400×); F, Inner wall of the B segment of middle midgut (SEM. 400×); Rc, Regenerative cells; Cc, Columnar cells; Ec, Endocrine cells; Co, Copper cells; N, Nucleus; L, Intestinal lumen.

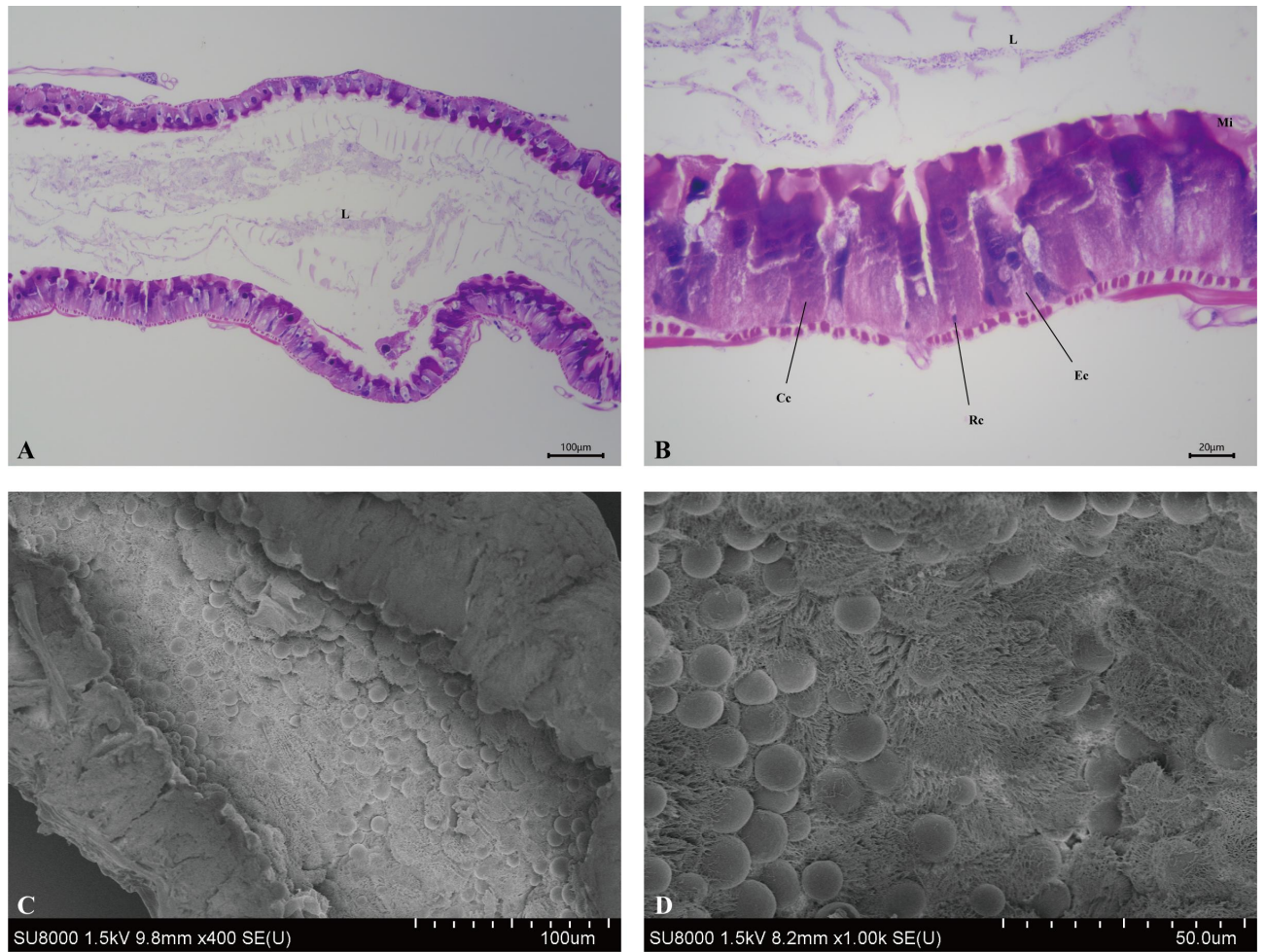


图 6 黑水虻 5 龄幼虫中肠后段显微结构

Fig. 6 Microstructure of the posterior midgut in 5<sup>th</sup> instar larvae of black soldier fly

注: A, B, 中肠后段显微结构(纵切, H.E. 100×, 400×); C, D, 中肠后段内壁(SEM. 400×, 1 000×); Rc, 再生细胞; Cc, 柱状细胞; Ec, 分泌细胞; Mi, 微绒毛; L, 肠腔。Note: A, B, Microstructure of the posterior midgut (longitudinal section, H.E. 100×, 400×); C, D, Inner wall of the posterior midgut (SEM. 400×, 1 000×); Rc, Regenerative cells; Cc, Columnar cells; Ec, Endocrine cells; Mi, Microvilli; L, Intestinal lumen.

#### 2.2.4 后肠

黑水虻幼虫的后肠由内至外分别为内膜层、肠壁细胞层和肌层(图 7-A, B)。内膜层薄, 肠壁细胞单层, 排列稀疏, 细胞核大。肌层不发达, 纵肌在内, 环肌在外。通过扫描电镜, 可观察到肠腔内褶皱丰富(图 7-C), 上附数量较多的杆状细菌(图 7-D)。

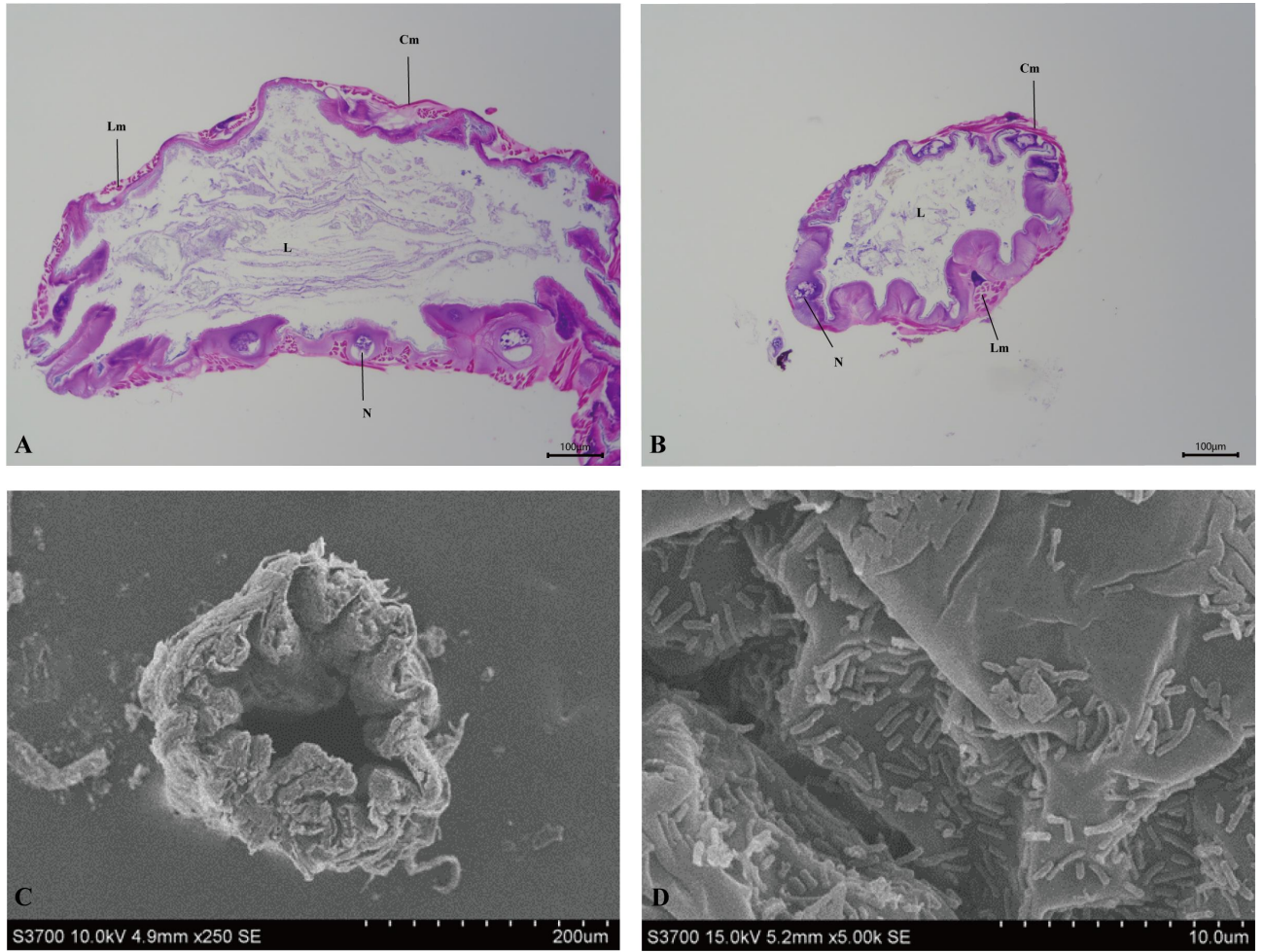


图 7 黑水虻 5 龄幼虫后肠显微和超微结构

Fig. 7 Microstructure and ultrastructure of the hindgut in 5<sup>th</sup> instar larvae of black soldier fly

注: A、B, 后肠显微结构(纵切, 横切, H.E. 100×); C, 后肠超微结构(横切, SEM. 250×); D, 后肠内表面上的杆状细菌(SEM. 5 000×); Cm, 环肌; Lm, 纵肌; N, 细胞核; L, 肠腔。Note: A、B, Microstructure of the hindgut (cross section, H.E. 100×, 400×); C, Ultrastructure of the hindgut (cross section, SEM. 250×); D, Bacteria attached to the hindgut wall (SEM. 5 000×); Cm, Circular muscle; Lm, Longitudinal muscle; N, Nucleus; L, Intestinal lumen.

### 2.2.5 马氏管

马氏管管壁由单层上皮细胞构成, 围绕形成管腔; 细胞排列稀疏, 可见大而清晰的细胞核 (图 8-A), 向管腔面排列有密集的顶端微绒毛 (图 8-B, C), 扫描电镜下可观察到内表面的微绒毛呈豆芽状 (图 8-D)。



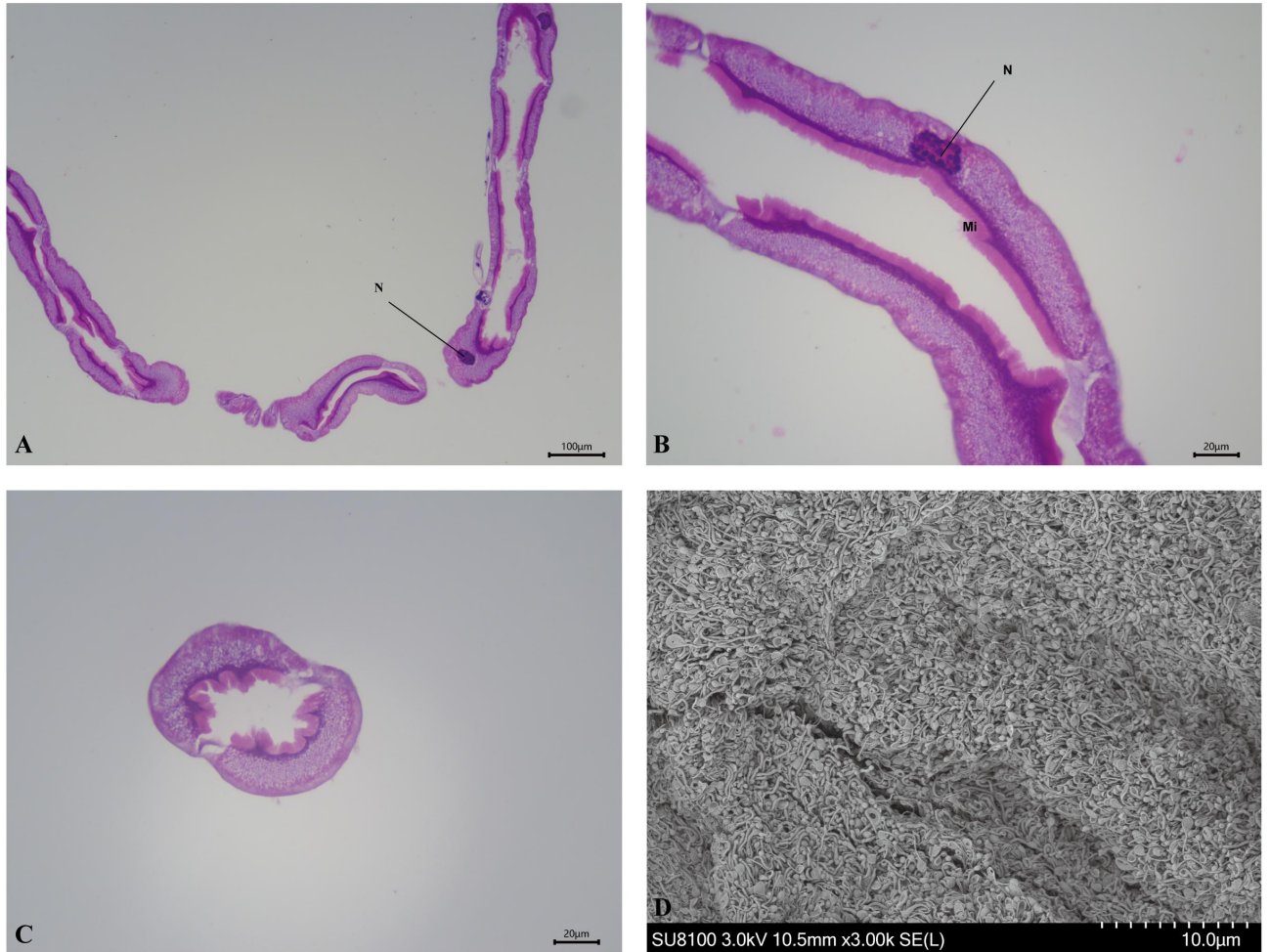


图 8 黑水虻 5 龄幼虫马氏管的显微及超微结构

Fig. 8 Microstructure and ultrastructure of the malpighian tubule in 5<sup>th</sup> instar larvae of black soldier fly

注: A、B, 马氏管显微结构(纵切, H.E. 100×, 400×); C, 马氏管显微结构(横切, H.E. 400×); D, 马氏管内表面的微绒毛(SEM. 3 000×); Mi, 微绒毛; N, 细胞核。Note: A、B, Microstructure of the malpighian tubule (longitudinal section, H.E. 100×, 400×); C, Microstructure of the malpighian tubule (cross section, H.E. 400×); D, Microvilli on the inner wall of malpighian tubule (SEM. 3 000×); Mi, Microvilli; N, Nucleus.

### 3 结论与讨论

#### 3.1 黑水虻不同发育阶段消化道的形态特征

昆虫的消化道根据其发生来源和机能的不同,可分为前肠、中肠和后肠,它们分别承担着食物摄取与临时储存、营养物质的消化与吸收,以及形成和排出食物残渣的功能(Nation, 2002)。对于变态发育的昆虫来说,从幼虫到成虫,其大部分内部器官,包括消化道,在蛹期将进行重塑(Miguel-Aliaga *et al.*, 2018),以适应昆虫在不同发育阶段组织器官生理功能的转换。本研究中,也观察到了在黑水虻在三个发育阶段消化道形态上的显著差异。

类似家蝇 *Musca domestica* 等双翅目幼虫，黑水虻幼虫的前肠也由口、食道和前胃组成。前胃较发达，除储存食物外，还可调节食物进入中肠，兼有过滤的作用(牛长缨等, 1999; Bonelli *et al.*, 2019)。中肠是昆虫最重要的消化器官(Caccia *et al.*, 2019)。黑水虻幼虫中肠长度占据了整个消化道长度的近 2/3，这与蚋、蝇等其它双翅目的消化道特征相符合(Boonsriwong *et al.*, 2007; 寻慧等, 2011)。进入预蛹期（6 龄幼虫）后，黑水虻的口器被角质板覆盖并硬化(Barros *et al.*, 2019)，停止摄食，为化蛹做准备(Tomberlin *et al.*, 2009; 萧鸿发等, 2020)。本研究在黑水虻预蛹的肠道中也未发现食糜，且和幼虫相比，预蛹肠道直径变小，长度变短，但在形态结构上尚未出现明显的变化。

本研究观察到，和幼虫及预蛹相比，黑水虻成虫的消化道形态和结构发生了剧烈变化，包括前胃消失、出现了嗦囊和胃盲囊、中肠长度进一步缩短、后肠分化为回肠、结肠和直肠。可见，黑水虻成虫的消化道具有高度分化的结构及功能分工，可能仍具有较强的消化与吸收能力，这与某些对黑水虻成虫消化生理研究的结果相符。Bruno 等(2019)的研究表明，黑水虻成虫肠道重塑出了具有功能性的上皮结构，糖类的摄入对部分消化酶的表达产生了一定的影响；给予成虫富含蛋白质的牛奶，能够增加雌虫的寿命且增加产卵量(Bertinetti *et al.*, 2019)，并指出可以通过调控成虫饮食以提高其在大规模饲养过程中的性能。李芷瑜等(2018)人也在黑水虻成虫的口器唇瓣上发现了可感受机械压力和味道的锥形和毛形感受器，且具有对味觉进行反馈的功能，表明成虫可能具有一定的食物选择和感受能力。黑水虻成虫的食道后方具有较发达的嗦囊，是双翅目昆虫特有的结构，主要起到暂时储存食物的作用(Boonsriwong *et al.*, 2007)，还能够确保肠道内容物进入主消化道。成虫中肠前端出现了胃盲囊，可能是由于中肠缩短，无法对食物进行充分的消化和吸收，需要通过胃盲囊增大中肠的消化吸收面积，满足机体对于营养物质的吸收需求(王荫长, 2004; 毛蕾, 2015)。推测黑水虻成虫出现的胃盲囊，可能也具有类似功能。成虫的中肠显著缩短，后肠分化为回肠、结肠和直肠，也和已报道的双翅目昆虫成虫类似(Gillott, 2005)；其中一些组织特征可能和适应成虫期羽化、飞翔、交配、授精和产卵等行为有关(陈长琨等, 1996)。以上对黑水虻成虫的消化道形态特征的描述，为进一步了解黑水虻成虫的摄食与消化生理提供了基础数据。

### 3.2 黑水虻幼虫消化道的组织结构

与家蝇幼虫等其它双翅目昆虫相比，黑水虻幼虫的食性更广泛、对营养物质的吸收转化率更高(Miranda *et al.*, 2021)，这主要得益于其强大的消化系统，包括消化道结构和功能的细分、针对营养不均衡的食物调节消化酶的分泌、可高效转化多种有机废弃物的肠道微生物(Clissold *et al.*, 2010; 邓雨英等, 2020; Zhan *et al.*, 2020)。本研究初步查明了黑水虻消化系统

的组织结构，为进一步深入黑水虻消化生理的研究补充了形态学和组织学数据。

唾液腺是昆虫消化系统中的重要分泌腺，其形态和功能在不同昆虫种类中差异较大(任朝都, 2021)。本研究发现，黑水虻幼虫的唾液腺由两支对称、膨大的管状腺体和腺管组成，分布于食管两侧，腺体外覆脂肪体，这和虻、蝇等双翅目昆虫的唾液腺形态类似(王荫长, 2004)。光镜观察结果表明，幼虫的唾液腺细胞更类似于黏液性腺细胞，胞质内未见明显的分泌颗粒，而以半透明的分泌物为主。Kim 等(2011)提取黑水虻幼虫唾液腺和肠道消化酶并分别测定其活性，发现肠道中的消化酶活性远高于唾液腺，表明唾液腺分泌消化酶的能力有限，其分泌物主要为粘性的粘糖蛋白。本研究初步进行了黑水虻唾液腺组织结构的观察，但其细胞内部的超微结构，还需利用透射电镜进行进一步观察，以有助于了解其分泌特性。

黑水虻幼虫前肠由食道与前胃组成。食道有发达的肌肉层和角质的内壁，说明食道可起到研磨、挤压及过滤食物的作用(Zhang *et al.*, 2012)。前胃的结构和家蝇幼虫类似，内层为食道末端陷入形成的套管样结构，管内壁有密集的胃刺；外层是一层强嗜碱性上皮(胡蓉等, 2013)，两者之间是围食膜包裹的圆形囊腔，腔内嗜酸性染色。表明经研磨的食物通过食道末端的胃刺过滤后，进入前胃，并可能经胃内的消化液（酸性）进行初步消化后进入中肠。此外，果蝇的前胃可诱导表达抗菌肽基因(Tzou *et al.*, 2000)，黑水虻前胃是否具有类似的功能还有待进一步的研究。

中肠是消化吸收的主要场所。和其它昆虫类似，黑水虻的中肠具有多样性的肠壁细胞，包括柱状细胞、再生细胞等(Miguel-Aliaga *et al.*, 2018)。果蝇的中肠大致可分为前中肠，中中肠以及后中肠三个部分，但还可以根据细胞形态及功能进一步细分为十多个区域(Buchon *et al.*, 2013)。类似的，黑水虻幼虫的中肠也可大致分为前、中、后三部分，pH 染色分别呈现酸性、强酸性和碱性，每个区域都具有独特的细胞形态和功能特征，其中，承担消化分泌功能的部位主要是中肠前段(Bonelli *et al.*, 2019)。本研究对肠道形态及肠壁细胞的组织学观察结果基本与之相符，即将中肠分为前、中、后三段，但又对中肠中段进行了进一步的细分（A 段和 B 段）。其中，中肠前段肠壁较厚，肠上皮细胞包括柱状上皮细胞、分泌细胞以及再生细胞，微绒毛发达。本实验室前期研究发现，此部位的柱状上皮细胞中含有大量线粒体，内质网以及高尔基体，可能为产生消化酶及进行能量代谢的重要场所(Sun *et al.*, 2021)。中段被分为 A、B 两段的依据是，在 A 段的肠上皮发现了铜细胞；该细胞具有酸化肠道内容物的能力，使得黑水虻此段肠腔 pH 值明显低于其他肠段(McNulty *et al.*, 2001)。在果蝇中肠也观察到类似的现象(Overend *et al.*, 2016)，推测可能是为某些消化生理活动提供独特的环境。而 B 段肠腔较大，肠壁薄，细胞扁平，扫描电镜在此段则未观察到类似于前段的微绒

毛结构。Bonelli 等(2019)在此段检测到了较高的溶菌酶活性,推测此段可能不参与消化过程,而是在杀灭食物中的病原体方面发挥作用。中肠后段的组织结构与前段相似,但有研究发现,此段分泌细胞数量较前段有所减少,表明可能此段消化酶的分泌功能有所减弱(Bonelli *et al.*, 2019)。扫描电镜在此段发现了球状细菌的定植,但其种属和功能尚不清楚。梅承等(2017)从黑水虻幼虫肠道中分离及培养了肠球菌属 *Enterococcus*, 其丰度可能受食物成分和养殖环境的诱导(Liu *et al.*, 2020)。肠球菌属被发现为家蚕肠道中的优势菌群(Whitman *et al.*, 1998),也从海南象白蚁 *Nasutitermes hainanensis* 前肠和中肠被分离到(杨书燕, 2016)。黑水虻幼虫的后肠未分化,肠壁较薄,肠上皮细胞排列稀疏,内膜向肠腔凹陷,形成丰富的褶皱,这是大部分昆虫后肠的组织特征(Novak, 1975)。这样的特征使后肠吸收表面积大大增加,有利于物质的交换及重吸收(程会昌, 2007; Miguel-Aliaga *et al.*, 2018)。本研究还在后肠内壁发现了丰富的杆状细菌,表明后肠也是共生微生物活动的重要场所(Ao *et al.*, 2021)。

马氏管着生于中、后肠交界处,为大多数昆虫的排泄系统,对调节机体水分平衡起到重要作用(Cagan, 2003)。黑水虻幼虫的马氏管有 4 根,管壁由单层上皮细胞组成,每 2~5 个细胞环绕一圈形成管壁(王荫长, 2004)。电镜照片显示,马氏管管腔内壁有大量的微绒毛;类似的结构在大头金蝇 *Chrysomya megacephala* 中能够被观察到(Boonsriwong *et al.*, 2007),大大增加了马氏管管腔内的表面积,从而有利于物质的交换(Zhang *et al.*, 2012)。

综上,本研究对黑水虻不同发育阶段的消化道形态进行了观察比较,并重点对幼虫的消化系统的组织结构进行了研究,初步掌握了各消化器官及消化腺的组织学特征。研究结果为进一步了解黑水虻的消化生理特征提供了重要的形态学依据。然而,由于光学显微镜和扫描电镜的局限性,本研究对消化道各组织细胞的内部结构缺乏进一步的了解。因此,未来还需利用透射电镜,结合组织化学等工具或方法,对黑水虻消化系统的细胞结构及功能作深入的分析,从而深入地了解黑水虻对营养物质的消化、吸收、代谢过程。

## 参考文献 (References)

- Ao Y, Yang C, Wang S, *et al.* Characteristics and nutrient function of intestinal bacterial communities in black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae in livestock manure conversion [J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14 (3): 886-896.
- Barros LM, Gutjahr A, Ferreira-Keppler RL, *et al.* Morphological description of the immature stages of *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Stratiomyidae) [J]. *Microscopy Research and Technique*, 2019, 82 (3): 178-189.
- Bertinetti C, Samayoa AC, Hwang S. Effects of feeding adults of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) on longevity, oviposition, and egg hatchability: Insights into optimizing egg production [J]. *Journal of Insect Science*, 2019, 19 (1).

- Bonelli M, Bruno D, Caccia S, *et al.* Structural and functional characterization of *Hermetia illucens* larval midgut [J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 204.
- Boonsriwong W, Sukontason K, Olson JK, *et al.* Fine structure of the alimentary canal of the larval blow fly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) [J]. *Parasitology Research*, 2007, 100 (3): 561-574.
- Bruno D, Bonelli M, Cadamuro AG, *et al.* The digestive system of the adult *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): Morphological features and functional properties [J]. *Cell and Tissue Research*, 2019, 378 (2): 221-238.
- Bruno D, Bonelli M, De Filippis F, *et al.* The intestinal microbiota of *Hermetia illucens* larvae is affected by diet and shows a diverse composition in the different midgut regions [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85 (2): e01864-18.
- Buchon N, Osman D, David FP, *et al.* Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila* [J]. *Cell Reports*, 2013, 3 (5): 1725-1738.
- Caccia S, Casartelli M, Tettamanti G. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions [J]. *Cell and Tissue Research*, 2019, 377 (3): 505-525.
- Cagan R. The signals that drive kidney development: A view from the fly eye [J]. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2003, 12 (1): 11-17.
- Chen Z, Wang Y, Du Z, *et al.* Palatogenesis of rectum and functional differentiation of rectal papilla cell in adult *agrotis ypsilon* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 1996, 1: 15-20. [陈长琨, 王荫长, 杜中杰, 等. 小地老虎成虫直肠的发生和直肠乳突细胞功能性分化 [J]. 昆虫学报, 1996, 1: 15-20]
- Cheng H. Animal Anatomy, Histology and Embryology [M]. Beijing: China Agriculture University Press, 2007. [程会昌. 动物解剖学与组织胚胎学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2007]
- Cifuentes Y, Glaeser SP, Mvie J, *et al.* The gut and feed residue microbiota changing during the rearing of *Hermetia illucens* larvae [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2020, 113 (9): 1323-1344.
- Clissold FJ, Tedder BJ, Conigrave AD, *et al.* The gastrointestinal tract as a nutrient-balancing organ [J]. *Proceedings of the Royal Society B*, 2010, 277 (1688): 1751-1759.
- Deng Y, Liu X, Qu X, *et al.* Biological characteristics and application in animal production of Black soldier fly [J]. *Hunan Feed*, 2020, 5: 14-16. [邓雨英, 柳序, 曲湘勇, 等. 黑水虻的生物学特征及其在动物生产中的应用研究进展 [J]. 湖南饲料, 2020, 5: 14-16]
- Gillott C. Entomology Third Edition [M]. Berlin: Springer Verlag, 2005: 489-496
- Heuel M, Sandrock C, Leiber F, *et al.* Black soldier fly larvae meal and fat can completely replace soybean cake and oil in diets for laying hens [J]. *Poultry Science*, 2021, 100 (4): 101034.
- Hopkins I, Newman LP, Gill H, *et al.* The influence of food waste rearing substrates on black soldier fly larvae protein composition: A systematic review [J]. *Insects*, 2021, 12 (7): 608.



- Hu R, Zhang S, Wu J, *et al.* Histological research on the third instar larva of *Musca domestica* with paraffin section [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2013, 35 (6): 832-837. [胡蓉, 张姝, 吴建伟, 等. 家蝇3龄幼虫石蜡切片的组织学研究 [J]. 环境昆虫学报, 2013, 35 (6): 832-837]
- Kim W, Bae S, Park K, *et al.* Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2011, 14 (1): 11-14.
- Li Z, Zhou Q, Zhou K, *et al.* Sensilla of adult *Hermetia illucens* observed with scanning electron microscope (II): Labellum, haltere and externalia [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2018, 37 (2): 183-189. [李芷瑜, 周琼, 周凯灵, 等. 黑水虻成虫体表超微感器(II): 口器、平衡棒和外生殖器 [J]. 电子显微学报, 2018, 37 (2): 183-189]
- Liu C, Yao H, Chapman SJ, *et al.* Changes in gut bacterial communities and the incidence of antibiotic resistance genes during degradation of antibiotics by black soldier fly larvae [J]. *Environment International*, 2020, 142: 105834.
- Mao L. Studies on the Digestive Tract Structure of *Haplotropis brunneriana* [D]. Taiyuan: Shanxi Normal University Master Thesis, 2015. [毛蕾. 笨蝗*Haplotropis brunneriana*消化道结构研究 [D]. 太原: 山西师范大学硕士学位论文, 2015]
- McNulty M, Puljung M, Jefford G, *et al.* Evidence that a copper-metallothionein complex is responsible for fluorescence in acid-secreting cells of the *Drosophila* stomach [J]. *Cell and Tissue Research*, 2001, 304 (3): 383-389.
- Mei C, Wang J, Yang H. Preliminary Study on the Diversity of Culturable Bacteria in the Intestinal Tract of *Hermetia illucens* [C]. Hangzhou: The 20<sup>th</sup> National Symposium on Environmental Microbiology, 2017: 247. [梅承, 王晶, 杨红. 黑水虻肠道内可培养细菌多样性的初步研究 [C]. 杭州: 第二十次全国环境微生物学学术研讨会, 2017: 247]
- Miguel-Aliaga I, Jasper H, Lemaitre B. Anatomy and physiology of the digestive tract of *Drosophila melanogaster* [J]. *Genetics*, 2018, 210 (2): 357-396.
- Miranda CD, Crippen TL, Cammack JA, *et al.* Black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae), and house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), larvae reduce livestock manure and possibly associated nutrients: An assessment at two scales [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 282: 116976.
- Mohan K, Rajan DK, Muralisankar T, *et al.* Use of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry: A review of past and future needs [J]. *Aquaculture*, 2022, 553: 738095.
- Nation JL. *Insect Physiology and Biochemistry* [M]. Boca Raton: CRC Press, 2002: 485.
- Niu Z, Lei C, Hu C. Anatomy of the digestive tract of *Musca domestica* larvae and observation of symptoms of cadmium poisoning [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1999, 1: 29-32. [牛长纓, 雷朝亮, 胡萃. 家蝇幼虫消化道的解剖和镉中毒时的症状观察 [J]. 华中农业大学学报. 1999, 1: 29-32]
- Novak VJA. *Insect Hormones* [M]. London: Chapman and Hall, 1975.
- Overend G, Luo Y, Henderson L, *et al.* Molecular mechanism and functional significance of acid generation in the *Drosophila* midgut [J].

*Scientific Reports*, 2016, 6 (1): 27242.

- Ren C. Morphological and Omics Studys of Larval Salivary Glands in *Pteromalus puparum* [D]. Hangzhou: Zhejiang University Master Thesis, 2021. [任朝都. 蝶蛹金小蜂幼虫唾液腺形态及其相关组学分析 [D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2021]
- Riudavets J, Castane C, Agusti N, *et al.* Development and biomass composition of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), and *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) reared on different byproducts of the agri-food industry [J]. *Journal of Insect Science*, 2020, 20 (4): 1-8.
- Sun QX, Li XC, Tan XH, *et al.* Digestive physiological characteristics of black soldier fly larvae reared on five organic wastes [J]. *Journal of Insects as Food and Feed*, 2021, 8 (5): 451-467.
- Tomberlin JK, Adler PH, Myers HM. Development of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in relation to temperature: Table 1 [J]. *Environmental Entomology*, 2009, 38 (3): 930-934.
- Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, *et al.* Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia [J]. *Immunity*, 2000, 13 (5): 737-748.
- Wang Y. Insect Physiology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004. [王荫长. 昆虫生理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004]
- Wang YS, Shelomi M. Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food [J]. *Foods*, 2017, 6 (10): 91.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: The unseen majority [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95 (12): 6578-6583.
- Xiao H, Wang G, Peng K, *et al.* Research progress on biologic characteristics and application of *Hermetia illucens* L [J]. *Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science*, 2020, 45 (2): 27-33. [萧鸿发, 王国霞, 彭凯, 等. 黑水虻生物学特点及其应用研究进展 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2020, 45 (2): 27-33]
- Xu F, Wang G, Huang X, *et al.* Large-scale production of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its application progress in aquaculture feed [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32 (12): 5606-5613. [许丰孟, 王国霞, 黄仙德, 等. 黑水虻规模化生产及其在水产动物饲料中的应用进展 [J]. 动物营养学报, 2020, 32 (12): 5606-5613]
- Xun H, Yang M, Wu H, *et al.* Histology of the alimentary canal in mature larva of *Simulium (Wilhelmia) xingyiense* chen and zhang (Diptera: Simuliidae) [J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2011, 29 (2): 104-106. [寻慧, 杨明, 吴慧, 等. 兴义维蚋成熟幼虫消化道组织学研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29 (2): 104-106]
- Yang S. Diversity Analysis of the Culturable Anaerobic and Facultative Anaerobic Bacteria from Different Intestinal Compartments of *Nasutitermes hainanensis* and Characterization of Two *Lactococcus* Strains [D]. Wuhan: Central China Normal University Master Thesis, 2016. [杨书燕. 海南象白蚁肠道不同部位可培养厌氧及兼性厌氧菌多样性分析与两株乳球菌的鉴定 [D]. 武汉: 华中师范大学硕士学位论文, 2016]
- Yu M, Li Z, Rong T, *et al.* Research progress in the application of *Hermetia illucens* in low-carbon animal husbandry [J]. *Guangdong*

*Agricultural Sciences*, 2020, 47 (12): 122-133. [余苗, 李贞明, 容庭, 等. 黑水虻在低碳畜牧业中的应用研究进展 [J]. 广东农业科学, 2020, 47 (12): 122-133]

Zhan S, Fang G, Cai M, *et al.* Genomic landscape and genetic manipulation of the black soldier fly *Hermetia illucens*, a natural waste recycler [J]. *Cell Research*, 2020, 30 (1): 50-60.

Zhang F, Zhang C, Dai W, *et al.* Morphology and histology of the digestive system of the vector leafhopper *Psammodettix striatus* (L.) (Hemiptera: Cicadellidae) [J]. *Micron*, 2012, 43 (6): 725-738.