



## 5-羟色胺能神经元在桔小实蝇幼虫神经系统中的分布

何丽云, 王帆, 林涛\*

(上饶师范学院生命科学院, 江西上饶 334001)

**摘要:** 桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 是一种对农业造成严重威胁的害虫, 尤其是其幼虫阶段对作物的取食危害最为显著, 导致农作物产量下降。5-羟色胺 (5-HT) 作为一种重要的神经递质, 调节了昆虫的取食等多种行为。因此, 探究桔小实蝇幼虫脑内 5-羟色胺能神经网络的功能, 能够为明确其具体行为调节机制及开发针对该靶标的行为调节剂提供基础。本研究采用突触蛋白和 5-羟色胺抗体进行桔小实蝇 3 龄幼虫神经系统的免疫组织化学染色, 并利用激光共聚焦显微镜观察获取幼虫神经系统的结构特征及 5-羟色胺能神经元的分布模式。结果表明, 桔小实蝇幼虫的中枢神经系统主要由脑和胸腹神经节构成, 且两者相互融合, 整体神经系统呈左右对称排列。研究发现, 脑内各神经髓发育不完全, 颞神经节和胸神经节均包含 3 个神经原节, 而腹神经节包含 8 个, 且各神经原节间的分界清晰。3 龄幼虫脑内共含 86 个 5-羟色胺能神经元, 其中中央脑含 20 个, 颞神经节含 22 个, 胸腹神经节含 44 个。中央脑的 20 个细胞体可进一步划分为 4 个细胞体簇, 每簇含 1~3 个细胞体。此外, 在脑内发现 6 条神经连合连接两侧脑半球。颞神经节内的 SE2 和 SE3 细胞体簇投射出神经突起形成神经连合。5-羟色胺能神经元呈对称排列在胸腹神经节两侧, 并向外投射神经突起形成神经连合。本研究揭示了桔小实蝇幼虫神经系统中 5-羟色胺能神经元的分布特征, 为理解该生物胺对其行为调控提供了解剖学结构基础, 并为理解该生物胺能神经元在双翅目昆虫中的发育及组装方式提供参考。

**关键词:** 桔小实蝇; 幼虫; 神经系统; 5-羟色胺能神经元; 分布特征

中图分类号: Q965

文献标识码: A

### The distribution of serotonergic neurons in the nervous system of *Bactrocera dorsalis* Larvae

基金项目: 江西省教育厅科学技术项目 (GJJ201720, GJJ201716)

作者简介: 何丽云, 女, 硕士研究生, 主要研究方向为昆虫学, E-mail: 312185@sru.edu.cn

通讯作者 Author for correspondence: 林涛, 男, 博士, 讲师, 研究方向为昆虫神经行为学, E-mail: lintao@sru.edu.cn

收稿日期 Received: 2024-09-26; 修回日期 Revision received: 2024-10-13; 接受日期 Accepted: 2024-10-14

HE Li-Yun, WANG Fan, LIN Tao\* (College of Life Science, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, Jiangxi Province, China)

**Abstract:** The oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*) is a serious agricultural pest, particularly during its larval stage, when it poses significant threats to crops and leads to reduced agricultural yields. Serotonin (5-HT), an important neurotransmitter, regulates various behaviors in insects, including feeding. Therefore, investigating the serotonergic neural network in the brains of *B. dorsalis* larvae is crucial for clarifying the specific mechanisms underlying behavioral regulation and for developing behavioral modulators targeting this pathway. In this study, we performed immunohistochemical staining of the nervous system of third-instar *B. dorsalis* larvae using synapsin and serotonin antibodies, followed by analysis of the structural features and distribution patterns of serotonergic neurons using laser confocal microscopy. Our results indicated that the central nervous system of *B. dorsalis* larvae primarily consists of the brain and thoraco-abdominal ganglia, which were interconnected and exhibit a bilateral symmetrical arrangement. We found that the neuropils in the brain were underdeveloped, with the gnathal ganglion and thoracic ganglia each containing 3 neuromeres, while the abdominal ganglion comprises eight, with distinct boundaries between each neuromere. A total of 86 serotonergic neurons were identified in the brain of third-instar larvae, including 20 in the central brain, 22 in the gnathal ganglion, and 44 in the thoraco-abdominal ganglia. The 20 cell bodies in the central brain can be further classified into four clusters, each containing 1 to 3 cell bodies. Additionally, six commissures connecting the two brain hemispheres were observed. The SE2 and SE3 cell body clusters in the gnathal ganglion project neurites to form commissures. The serotonergic neurons were symmetrically arranged on both sides of the thoraco-abdominal ganglia, extending neurites outward to form additional commissures. This research reveals the distribution characteristics of serotonergic neurons in the nervous system of *B. dorsalis* larvae, providing an anatomical foundation for understanding how this biogenic amine regulates behavior. It also offers insights into the development and assembly of serotonergic neurons in dipteran insects.

**Key words:** *Bactrocera dorsalis*; larvae; nervous system; serotonergic neurons; distribution characteristics

桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 是全球农业中最具破坏性的重要害虫之一。其雌成虫将卵产在果实表皮下，幼虫孵化后会钻入果实内部取食果肉，导致果实出现凹陷、腐烂，甚至早

期脱落（项前等，2022）。这一行为不仅损害了果实的外观，使其失去了商品价值，还为病原体的入侵创造了条件，加速了果实腐烂的进程。此外，受害果实常常无法被发现，直到幼虫发育成熟并离开果实后才显现出明显症状，给果农带来了防治的难题。桔小实蝇的寄主范围广泛，使得该害虫在各种作物中具备了极高的适应性，这种特性加剧了它在不同农业生态系统中的传播与蔓延（高扬等，2021）。目前主要以化学防治、生物防治并结合对果实套袋处理的策略来保护果实免受桔小实蝇的危害（刘欢等，2023），其中化学防治是最为常见的方法，但这种方式对幼虫的防治效果不甚理想，因此，有必要继续开展针对桔小实蝇幼虫阶段的防治措施研究。通过对幼虫的行为模式及其神经调控机制的深入研究可为发掘潜在的行为调节剂奠定基础。

5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，简称 5-HT），也被称为血清素（Serotonin），是一种重要的单胺类神经递质，广泛存在于昆虫的中枢神经系统和外周组织中，对昆虫的行为调控、知觉感受和生物节律等多个方面产生影响（齐易香等，2014；Vleugels *et al.*, 2015）。如 5-HT 对果蝇的学习和记忆形成至关重要，影响昆虫的行为选择和适应能力（Sitaraman *et al.*, 2008）。研究表明 5-HT 通过生物钟神经元上的 5-HT<sub>1B</sub> 受体调控黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 对光的节律反应（Yuan *et al.*, 2005）。在调节昆虫取食行为方面，5-HT 同样发挥重要的功能（熊佳新等，2019；Yao & Scott, 2022），增加 5-HT 的水平通常会抑制昆虫的取食量（Dacks *et al.*, 2003）。位于食道裂孔下区域的 5-羟色胺能神经元（5-HT immunoreactive neuron, 5-HT<sub>i</sub>）参与调节了果蝇幼虫取食的运动模式（Schoofs *et al.*, 2018）。根据 5-HT 对昆虫取食量调节的机理，研究人员发现了潜在的应用于减肥的药物分子 metitepine，它可以拮抗 5 种已知果蝇的 5-HT 受体，进而抑制取食行为（Gasque *et al.*, 2013）。

目前，5-HT 对桔小实蝇的调控机制研究主要集中在交配行为，肠道菌群调控和解毒代谢方面。如外源注射 5-HT 会延长桔小实蝇的交配率和交配潜伏期，显著影响其交配行为（Chen *et al.*, 2022；Xu *et al.*, 2024）。5-HT 可通过调节双氧化酶（Duox）的基因表达影响桔小实蝇肠道微生物群的稳态（Zeng *et al.*, 2022）。最近研究表明桔小实蝇体内的 5-HT 参与了由芳香胺-N-乙酰基转移酶（arylalkylamine N-acetyltransferase 1, AANAT1）调节的肠解毒代谢过程，这可能有利于该虫能够利用多种果蔬作为寄主进而提高环境适应能力（Zeng *et al.*, 2024）。但 5-羟色胺针对危害严重的桔小实蝇幼虫有何具体的调控功能尚不清楚。研究发现，缺乏 5-HT<sub>i</sub> 的果蝇幼虫对不同浓度的糖和盐表现出不同的味觉偏好（Huser *et al.*, 2012）。此外，5-HT 通过 5-HT<sub>2A</sub> 受体参与调控了幼虫的嗅觉学习和记忆（Huser *et al.*, 2017）。

5-HTi 在神经系统中的分布模式为理解昆虫神经系统的功能提供了重要线索。果蝇幼虫的中枢神经系统共包含大约 84~96 个细胞体，其中在脑内共有 SP1、SP2、IP 和 LP1 等 4 个细胞体簇，每个细胞体簇包含了 1~4 个细胞体，并且大部分的 5-HTi 主要是双侧对称的中间神经元（Vallés & White, 1988; Huser *et al.*, 2012），这些详细的细胞体位置及投射区域为定位不同昆虫幼虫脑内 5-HTi 提供了准确的位置参考。此外，在螫蝇 *Stomoxys calcitrans* 的 3 龄幼虫的神经系统中发现了 80~90 个双边对称的 5-HTi 细胞体（Liu & Li, 2011），而丽蝇 *Calliphora erythrocephala* 和麻蝇 *Sarcophaga bullata* 的数量略多，共包含 96~98 个细胞体（Nässel & Cantera, 1985）。在上述 4 种双翅目幼虫中，5-HTi 的数量在胸腹神经节内相对一致，其中胸神经节内包含 3 个细胞体簇（T1~T3），腹神经节包含 8 个细胞体簇（A1~A8），除 T1 包含 3 个细胞体，A8 包含 1 个细胞体外，其他簇均包含 2 个细胞体，每侧共包含 22 个细胞体。这些细胞体都分布在胸腹神经节的腹侧，均投射出神经突起穿过中线进入对侧区域，形成双侧投射的规则，表现出非常高的保守性。而在脑内，5-HTi 的细胞体数量则不同，其中果蝇包含约 25 个细胞体，丽蝇和螫蝇包含 27~28 个。目前桔小实蝇幼虫神经系统中 5-HTi 是否呈现出类似的数量和分布规律还不知晓。Teng *et al.* (2024) 利用 CRISPR/Cas9 系统成功地在桔小实蝇色氨酸羟化酶（5-HT 合成限速酶）BdorTRH 基因中插入了 V5 标签（42 bp），并使用 V5 单克隆抗体标记了不同发育阶段中 TRH 的分布区域，这为进一步探索 5-HTi 在脑内分布提供了重要的参考。

本研究拟采用突触蛋白抗体和 5-HT 抗体对桔小实蝇的幼虫脑进行免疫组织化学染色，并通过共聚焦显微镜来获取幼虫神经系统的结构和 5-HTi 在幼虫神经系统的分布特征。首先参照果蝇幼虫脑结构的划分方法，对桔小实蝇的脑结构特征进行分析，并利用三维重建软件构建幼虫的神经系统。随后，对幼虫神经系统中的 5-HTi 的数量，分布及投射区域进行分析，对标记清晰的神经元突起进行追踪。这一研究将提供桔小实蝇幼虫神经系统的结构和 5-HTi 的分布特征，有助于更好地理解行为调控的神经机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

参照林涛等（2016）的方法饲养桔小实蝇成虫。待雌成虫交配成功后，将人工采卵器内壁涂抹橙汁，放入成虫饲养笼中（30 cm × 30 cm × 30 cm）供其产卵。收集卵并置于人工饲料中饲养。本研究以 3 龄幼虫作为试验对象，其中 3 龄幼虫个头较大，体色偏黄，常折叠身体跳跃离开人工饲料。收集幼虫并放于离心管内，将离心管放于冰中使幼虫冻晕防止其跳跃

逃脱。

## 1.2 中枢神经系统的解剖

在体视解剖镜下，取 3 龄幼虫用清水冲洗干净，并在 Ringer's 液（in mM: 130 NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 36 sucrose, 5 HEPES, pH7.3）中解剖出幼虫的神经系统。将解剖后的样品立即置于装有 1 mL 4% 的多聚甲醛固定液的离心管中。解剖过程中，离心管始终置于冰中，每个离心管内装 5~6 个样品。待解剖实验结束后，将所有样品置于 4°C 冰箱中固定过夜。

## 1.3 免疫组织化学染色

将固定后的组织从冰箱中取出，用移液枪将固定液移除，并用加有 1% Triton X-100 的磷酸缓冲液（PBST）在摇床中漂洗 4 次，每次 20 min。漂洗后将样品放于 1 mL 的 5% 正常山羊血清封闭液（Normal goat serum, NGS）（康维世纪，CW0130S）室温孵育 3 h 或 4°C 过夜。封闭后，加入一抗溶液 [1 : 100 anti-synapsin（DSHB, 3C11）；1 : 1 000 anti-5-HT（ImmunoStar, 20080）；各 500 μL]，4°C 下孵育 3 d。一抗孵育后，利用 PBST 漂洗样品 6 次，每次 20 min。随后加入二抗溶液 [1 : 500 Cy5 偶联的羊抗鼠（ThermoFisher, A10524）；1 : 500 Cy3 偶联的羊抗兔（ThermoFisher, A10520）；各 500 μL] 在 4°C 下孵育 2 d。孵育结束后，同样利用 PBST 溶液漂洗 6 次，每次 20 min。分别用 50%、70%、90%、95% 和 100% 酒精进行脱水，每浓度脱水 10 min。脱水后，用水杨酸甲酯室温透明 3 h，最后将透明的组织放入自制铝片上，摆正组织并盖上盖玻片，注意防止产生气泡。

研究中用于标记神经髓的是一种特异性结合神经突触前膜上蛋白的鼠源的单克隆抗体，它是由谷胱甘肽与果蝇突触蛋白融合注射至鼠体类产生（Klagges *et al.*, 1996）。该抗体已广泛的应用于多种昆虫和其他无脊椎动物的脑神经髓的染色（林涛等，2022）。5-HT 抗体是一种由 5-HT 偶联牛血清蛋白注入兔体内获得的兔源单克隆抗体。该抗体亦被广泛应用于昆虫脑内 5-羟色胺能神经元的定位中，其特异性已在蚜虫和蜚螂等昆虫中得到验证（Kollmann *et al.*, 2011; Immonen *et al.*, 2017）。上述两种抗体都已成功的应用于桔小实蝇成虫脑神经髓和 5-羟色胺能神经元的标记中（Lin *et al.*, 2018; 林涛等，2019）。

## 1.4 激光共聚焦显微观察

染色后的样品采用激光共聚焦显微镜（LSM 780, META Zeiss, 德国）进行观察，并对组织进行逐层扫描获得图像栈。扫描采用的是 Plan-Neofluar 10×/0.3 and 20×/0.51 物镜。扫描过程中分布采用 633 nm 和 543 nm 的激光线激发 Cy5 和 Cy3 荧光染料。图像的扫描间隔为 0.8~1 μm，分辨率为 1 024 × 1 024。

## 1.5 图像处理及三维重建

桔小实蝇幼虫神经系统图像分割和 3D 重建采用 Amira 5.3.2 软件进行。简述如下, 首先将激光共聚焦获得的图像栈导入软件中, 利用“label field”模块对图像中幼虫神经系统和细胞体进行手动标记, 并利用“surfaceGen”模块将标记后的图片叠加产生神经髓的 3D 模型。利用“Skeleton tree”模块对标记清晰的部分 5-HTi 进行了追踪和重建。利用软件的拍照功能获得 3D 模型和 5-HTi 细胞体及神经突起的分布图。将获得的图像导入 Adobe Illustrstor CS6 进行文本编辑。对脑神经髓和 5-HTi 细胞体的识别及命名分别参照由 Huser *et al.* (2012) 和 Hartenstein *et al.* (2017) 提供的果蝇 *Drosophila melanogaster* 命名法。昆虫的方位基于虫体的体轴进行划分 (Ito *et al.*, 2014)。

## 2 结果与分析

### 2.1 桔小实蝇幼虫神经系统的结构特征

桔小实蝇 3 龄幼虫的中枢神经系统包括脑和胸腹神经节, 由细胞体层 (Cell body rind, CBR) 和内部的神经髓 (Neuropil) 构成 (图 1-A~C)。脑和胸腹神经节融合, 中间为食道裂孔 (图 1-B)。两侧的脑半球尚未完全融合, 呈左右对称排列 (图 1-A)。根据脑结构命名法, 将位于食道裂孔腹侧的后脑及颧神经节统称为食道裂孔下区域 (Subesophageal zone, SEZ; 图 1-A~C)。参照果蝇脑神经髓的识别方法, 本研究对桔小实蝇幼虫的脑结构进行了识别和划分。位于幼虫脑两侧的视叶是最容易识别的神经髓, 它主要通过视神经连合与前脑相连, 其体积较小尚未发育完全, 难以区分其中的亚结构 (图 1-B、H、J~L)。其次位于脑部最前端的球形触角叶 (Antennal lobe, AL) 结构亦可被清晰识别, 其内部尚未形成可识别的球状神经纤维球 (Glomerulus) (图 1-F、J)。根据触角叶结构可以确定位于触角叶后部的侧副叶 (Lateral accessory lobe, LAL) 结构。突触蛋白的免疫染色结果显示, 突触结构丰富的区域可被清晰的标记出, 但缺乏突触结构的区域则在脑内形成暗区 (Ito *et al.*, 2014)。在桔小实蝇幼虫脑内最易识别的是两个贯穿前脑的孔洞, 它们分别是触角叶神经束 (Antennal lobe tract, ALT) 和蕈形体柄 (Pedunculus, PED) 形成的孔洞, 判断依据来源于与桔小实蝇成虫脑结构 (Lin *et al.*, 2018) 的比较及 Pcreanu & Hartenstein (2006) 提供的果蝇幼虫脑结构信息。根据这两个孔洞结构, 可以识别出位于上位中间脑的蕈形体冠 (Calyx, CA), 上位神经髓区 (Superior neuropils, SNP) 和腹外侧神经髓区 (Ventrolateral neuropils, VLNP) (图 1-G~I)。其中 SNP 可进一步划分为背部外侧区域的上位外侧前脑 (Superior lateral protocerebrum, SLP), 背部中间前脑 (Superior intermediate protocerebrum, SIP) 和上位内

侧前脑 (Superior medial protocerebrum, SMP) (图 1-J)。VLNP 可被划分为腹外侧前脑 (Ventrolateral protocerebrum, VLP) 和后外侧前脑 (Posteriorlateral protocerebrum, PLP) (图 1-H-I)。此外, 对于中间脑内其他神经髓区及触角叶后侧等区域难以识别出其中的具体神经髓结构, 统称为下位前脑 (Inferior protocerebrum, IP) 和腹内侧脑 (Ventromedial cerebrum, VMC)。

桔小实蝇的胸腹神经节融合成一个整体, 左右两侧相互对称, 并未完全融合。根据神经束在胸腹神经节上形成的暗区可将其划分为颚神经节 (Gnathal ganglia, GNG), 胸神经节 (Thoracic ganglia, TG) 和腹神经节 (Abdominal ganglia, AG) (图 1-D、E)。以后垂直神经束 (Posterior vertical bundle, pVB) 在颚神经节内形成的孔洞为标记, 可将 GNG 进一步划分为上颚神经节 (Mandibular neuromere, MN), 下颚神经节 (Maxillary neuromere, MX) 和下唇神经节 (Labial neuromere, LB) (图 1-D)。类似胸神经节同样可以再划分为前胸神经节 (Prothoracic neuromere, T1), 中胸神经节 (Mesothoracic neuromere, T2) 和后胸神经节 (Metathoracic neuromere, T3) (图 1-E)。由腹神经节内横向神经轴突束围绕神经髓形成的边界, 可将腹神经节划分为 A1~A8 等 8 节 (图 1-E)。

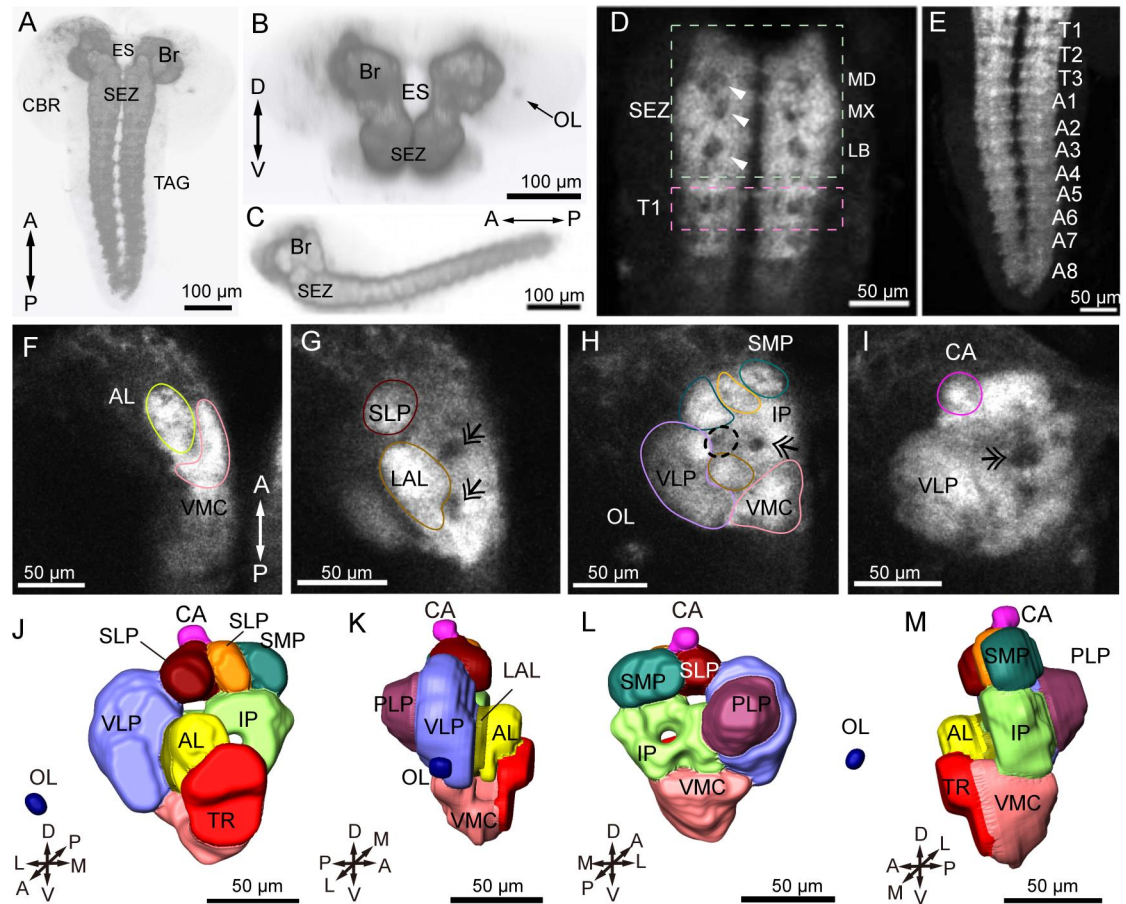


图 1 桔小实蝇 3 龄幼虫神经系统共聚焦图及脑的三维重建结构图

Fig. 1 Confocal image of the nervous system of the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Bactrocera dorsalis* and the 3D reconstructed structure of the brain

注：A-C, 幼虫中枢神经系统共聚焦叠加图像的投影视图, A 为腹面观, B 为前面观, C 为侧面观。D, 共聚焦图像展示食道裂孔下区和前胸神经节, 图中箭头表示未被突触抗体染色标记的区域, 为神经纤维穿过区域。SEZ 包含下颚, 上颚和唇神经节。E, 共聚焦图展示胸腹神经节。F-I, 幼虫脑系列共聚焦图片展示不同的神经髓结构。双箭头表示由触角叶投射神经元构成的神经束在脑内穿过形成的暗区。黑色虚线圆圈标记的是蕈形体柄穿过大脑形成的暗区。J-M, 幼虫单侧脑半球的三维重建图, J 为前面观, K 为外侧面观, L 为后面观, M 为内侧面观。CBR, 细胞体层; ES, 食道裂孔; SEZ, 食道裂孔下区; Br, 脑; TAG, 胸腹神经节; OL, 视叶; MD, 上颚神经节; MX, 下颚神经节; LB, 唇神经节; T1, 前胸神经节; T2, 中胸神经节; T3, 后胸神经节; A1~A8, 1~8 腹神经节; AL, 触角叶; VMC, 腹内侧脑; SLP, 上位外侧前脑; LAL, 侧副叶; VLP, 腹外侧前脑; SMP, 上位内侧前脑; IP, 下位前脑; CA, 蕈形体冠; PLP, 后外侧前脑; TR, 后脑; A, 前向; P, 后向; L, 外侧面; M, 内侧面; D, 背向; V, 腹面。Note: A-C, Projection views of the confocal stacked images of the larval central nervous system, with A showing the ventral view, B the anterior view, and C the lateral view. D, The confocal image displays the subesophageal zone and prothoracic neuromere, with arrows indicating areas that were not labeled by synaptic antibody staining, representing regions through which nerve fibers pass. The SEZ includes the mandibular, maxillary, and labial neuromeres. E, The confocal image shows the thoracic-abdominal neuromere. F-I, A series of confocal images of the larval brain exhibiting various neuropil structures. Double arrows indicate dark regions formed by nerve bundles composed of antennal lobe projection neurons passing through the brain. The black dashed circle marks the dark region created by the pedunculus of the mushroom body traversing the brain. J~M, Three-dimensional reconstructions of the unilateral brain hemisphere of the larva, with J showing the anterior view, K the lateral view, L the posterior view, and M the medial view. CBR, Cell body rind; ES, Esophageal; SEZ, Subesophageal zone; Br, Brain; TAG, Thoracic-abdominal ganglion; OL, Optic lobe; MD, Maxillary neuromere; MX, Mandibular neuromere; LB, Labial neuromere; T1, Prothoracic neuromere; T2, Mesothoracic neuromere; T3, Metathoracic neuromere; A1~A8, 1st-8th abdominal neuromeres; AL, Antennal lobe; VMC, Ventromedial cerebrum; SLP, Superior lateral protocerebrum; LAL, Lateral accessory lobe; VLP, Ventrolateral protocerebrum; SMP, Superior medial protocerebrum; IP, Inferior protocerebrum; CA, Calyx; PLP, Posterolateral protocerebrum; TR, Tritocerebrum; A, Anterior; P, Posterior; L, Lateral; M, Medial; D, Dorsal; V, Ventral.

## 2.2 桔小实蝇幼虫神经系统中 5-羟色胺能神经元的分布

根据 5-HT 抗体的免疫染色结果可知, 桔小实蝇幼虫的神经系统中共有 86 个 5-HTi 细胞体, 其中 20 个位于两侧脑半球内, 22 个位于颚神经节中, 44 个位于胸腹神经节内, 这些神经元单独或成簇分布。参照 Huser *et al.* (2012) 和 Vallés & White (1988) 对果蝇脑内 5-HTi 的命名方法, 本研究将桔小实蝇脑内 5-HTi 划分为 SP1、SP2、IP 和 LP1 等 4 个细胞体簇。SP1 位于前脑背侧, 包含 1 个细胞体, 该细胞体的位置会出现变化, 如在右侧脑半球内, 细



胞体则更靠腹侧，位于 CA 的腹侧，而左半球位于 CA 的背侧（图 2-D、L）。SP2 细胞体簇包含 4 个细胞体，位于脑最后侧，SP1 细胞体腹后侧区域，未能识别出其神经突起。LP1 细胞体簇包含 2 个细胞体，位于脑外侧，视叶后外侧区域（图 2-C、L），其轴突支配着同侧脑半球的 VLP（图 2-A、B）。IP 细胞体簇包含 2~3 个细胞体，位于 AL 的背外侧区域，其中体积较大的细胞体 IP1-2 的神经突起同样呈现出双侧投射模式，经脑中线投射至对侧脑半球 AL 和 LAL 区域（图 2-B、M、N）。除上述细胞体外，在脑内 OL、AL、TR、LAL、VLP 和 SNP 等区域可发现 5-HTi 神经纤维的分布（图 2-A、B、D），但 CA 处未见 5-HTi 神经突起。此外，在脑内发现 6 束 5-HTi 神经连合（Commissure）跨过脑中线连接两侧脑半球。其中连合 1 连接两侧 SIP 区域，其细胞体为 SP1；连合 2 连接两侧触角叶，其细胞体来自脑半球两侧的 IP；连合 3 连接两侧 VLP 和 IP 区域；连合 4 连接两侧 LAL 结构；连合 5 连接两侧脑半球的后脑区域；连合 6 连接两侧脑半球的腹内侧 VMC 区域（图 2-D、E、M、N）。

桔小实蝇颚神经节 22 个细胞体可划分为 SE-M、SE1、SE2、SE3 和 SE4 等细胞体簇。SE1 包含 2 个细胞体，位于 GNG 的前背部两侧，免疫染色未能标记出其神经突起（图 2-F、I）。SE2 包含 3~5 个细胞体，位于 SE1 的后侧，这些细胞体穿过中线形成神经连合，支配着 MN。此外，两侧细胞体均产生神经突起分支投射至后脑及食道裂孔两侧，并在这两个区域内有许多精细的分支（图 2-F、I、M、N）。SE3 包含 3 个细胞体，它们位于 SE2 细胞体簇后内侧区域。同样细胞体神经突起穿过中线形成神经连合，并在 GNG 外侧投射出细小的分支，向 MX 外侧延伸并围绕着该神经原节（图 2-F、I、M、N）。SE4 位于 SE2 和 SE3 之间，各包含 1 个细胞体，分布在 GNG 的外侧，未识别出细胞体的神经突起（图 2-F、I、L）。SE-M 免疫染色较弱，分布在 GNG 的内侧区、SE1 和 SE2 之间，未发现其神经突起（图 2-L）。此外，在 MN，MX 和 LB 神经节的外侧区域中分布着丰富的 5-HTi 神经突起（图 2-F）。

胸神经节包含 3 个细胞体簇，分别是 T1，T2 和 T3，它们都位于神经节的腹侧区域（图 2-F、G、I）。T1 包含 3 个细胞体，与 SE3 类似，细胞体的神经突起穿过中线形成连合；神经突起在两侧分别形成 2 个分支，一个投向神经节外侧，围绕胸神经节，另一分支向前投射支配中间的神经节（图 2-F、M、N）。T2 和 T3 以及腹神经节的 A1~A7 细胞体簇均包含 2 个细胞体，分别位于胸神经节的外侧区域，类似的它们都跨过中线形成神经连合连接两侧神经髓（图 2-H~K）。此外，它们在神经节外侧具有分支向神经节外侧投射并围绕神经节，并且神经节内有细小的神经纤维的分布。位于腹神经节末端的 A8 仅包含 1 个细胞体，它们

并未形成神经连合，但在神经节内有 5-HTi 神经纤维（图 2-H、K）。胸腹神经节内 5-HTi 细胞体均分布在神经节的分界处，这可作为划分不同神经节的参考。

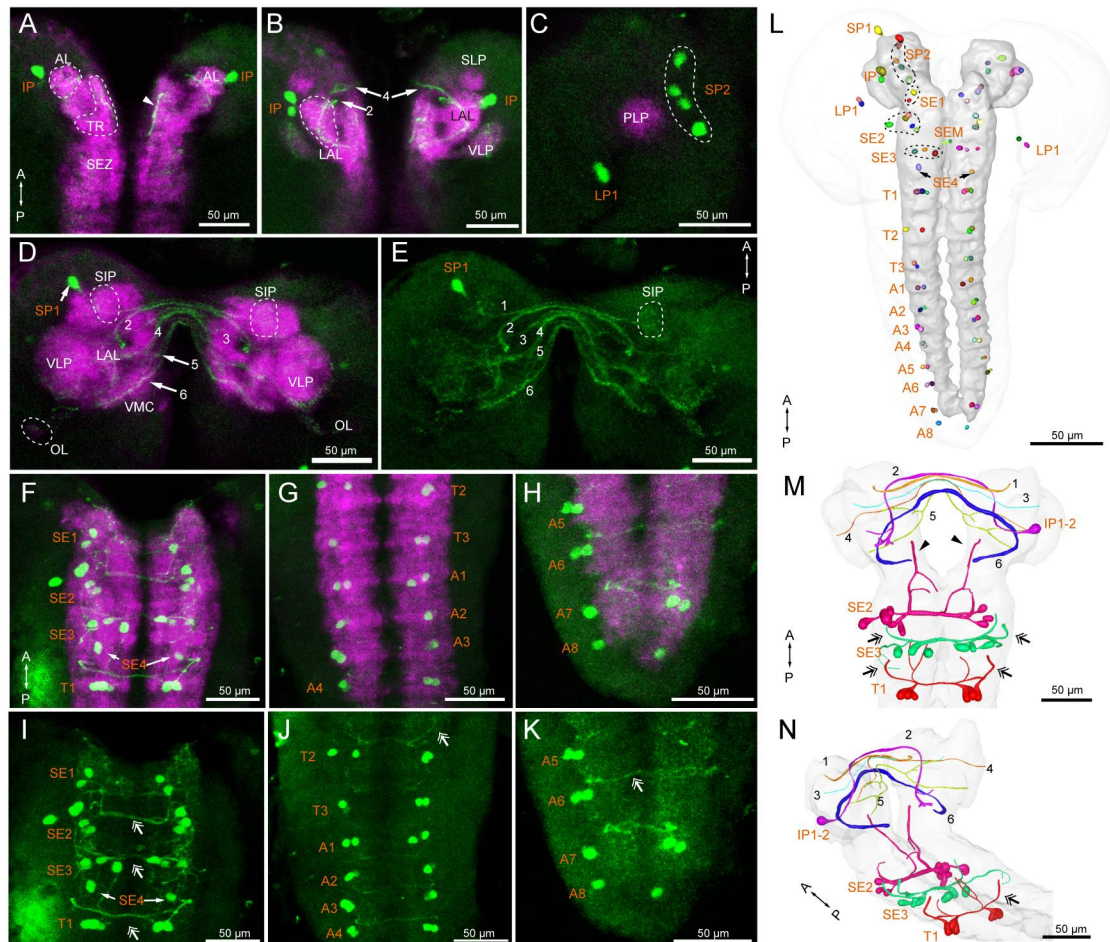


图 2 5-羟色胺能神经元在幼虫神经系统中的分布

Fig. 2 Distribution of serotonergic neurons in the nervous system of larvae.

注：A~C，系列共聚焦图像显示桔小实蝇 3 龄幼虫神经系统内 5-羟色胺免疫阳性神经元（绿色）和脑神经髓（洋红色）。D，幼虫脑共聚焦图像叠加图的投影视图展示脑内的神经连合。E，共聚焦图像显示幼虫脑内呈 5-羟色胺免疫阳性的神经连合。F~H，共聚焦合并图像的投影视图展示 5-羟色胺能神经元（绿色）在幼虫胸腹神经节（洋红色）的分布。I~K，共聚焦图像投影视图展示 5-羟色胺能神经元的分布及神经纤维的投射模式。双箭头表示由两侧细胞体形成的神经连合。L，包含不同 5-羟色胺能神经元细胞体的幼虫脑三维重建图。M~N，幼虫脑内神经连合及由 SE2，SE3 和 T1 神经元投射模式的三维重建结果的投影视图，M 为腹面观，N 为矢状面观。图中黄色字母代表细胞体的名称，神经髓结构的名称及方位指示与图 1 相同。Note: A~C, A series of confocal images showing 5-HT-immunoreactive neurons (green) and brain neuropil (magenta) in the nervous system of third-instar larvae of *Bactrocera dorsalis*. D, A projection view of the merged confocal stack image of the larval brain, displaying neuronal commissures within the brain. E, Confocal image showing 5-HT-immunoreactive neuronal commissures in the larval brain. F~H, Projection views of merged confocal images showing the distribution of serotonergic neurons (green) in the thoracic-abdominal ganglia (magenta) of the larvae. I~K, Projection views of merged confocal images showing the distribution and projection patterns of serotonergic neurons. Double arrows indicate neuronal commissures formed by two cell bodies. L, 3D reconstruction of the larval brain showing the distribution of different serotonergic neuron cell bodies. M~N, Projection views of 3D reconstruction results of neuronal projection patterns in the larval brain, with M being the ventral view, N being the sagittal view. Yellow letters represent cell body names, and neuropil structures and orientations are the same as in Figure 1.

larvae. I-K, Projection views of confocal images showing the distribution and projection patterns of serotonergic neurons and their nerve fibers. Double arrows indicated neuronal commissures formed by cell bodies from both sides. L, A three-dimensional reconstruction of the larval brain, showing cell bodies of different serotonergic neurons. M-N, Projection views of the three-dimensional reconstruction of the neuronal commissures and the projection patterns of SE2, SE3, and T1 neurons in the larval brain, with M showing the ventral view and N showing the sagittal view. Yellow letters in the figure represented the names of the cell bodies, and the names of the neuropil structures and directional indicators are consistent with those in Fig. 1.

### 3 讨论与结论

本研究基于 2 种抗体的免疫染色分别分析了幼虫中枢神经系统的结构特征,并提供了详细的 5-HTi 在中枢神经系统的分布图谱。突触蛋白抗体可清晰标记出桔小实蝇幼虫的神经髓,这些神经髓左右双侧对称,脑和胸腹神经节完全融合。与成虫脑神经髓的结构相比,幼虫脑的神经髓结构未发育完全,部分神经髓的边界尚不完全清晰。可识别的神经髓包括视叶,触角叶,侧副叶,蕈形体冠及上位神经髓区等。其中视叶,触角叶和侧副叶的内部细微结构难以区分,触角叶内的纤维球结构尚未形成。研究表明,果蝇触角叶内纤维球结构是在蛹初期形成的 (Jhaveri & Rodrigues, 2002),视叶完整结构是在幼虫化蛹后 40 h 形成 (Néricc & Desplan, 2016),这也预示着幼虫主要处理基础的感觉信息(如嗅觉和触觉)。桔小实蝇幼虫的胸腹神经节与其他双翅目蝇类相似,均有 3 个胸神经节和 8 个腹神经节组成,表现出高度保守的神经节排列规则,表明其神经系统在进化过程中保持了相对一致的功能分区。

在桔小实蝇幼虫的大脑中共发现约 86 个成免疫阳性的 5-HTi 细胞体,这一总体数量与以前研究结果相当,如在果蝇幼虫中发现 84 个,螻蛄幼虫包含 80~90 个,但在丽蝇的幼虫神经系统内发现的该神经元数量更多,为 96~98 个 (Nässel & Cantera, 1985; Liu & Li, 2011)。不同蝇类胸腹神经节内 5-HTi 细胞体数量非常保守,都包含 11 个细胞体簇共 22 个细胞体,并且每个细胞体簇包含的细胞体数量一致。这些刻板的分布模式预示着它们在蝇类幼虫中可能发挥着相同的功能。蝇类的幼虫大都为无足、口器退化的蝇蛆,拥有类似的运动模式。研究表明,5-HT 在昆虫运动过程中起重要作用,动物运动系统的一个组成部分是中心模式发生器 (Central pattern generators, CPGs),它是产生有节奏运动模式的基础 (Marder & Bucher, 2001; Harris-Warrick, 2011),它受神经元释放的生物胺,如 5-HT 的调控而发挥作用。此外在果蝇中发现,幼虫的运动受一系列胸腹神经节内中间神经元集合控制,其中 5-HTi 就是其中重要的一类中间神经元 (Huser *et al.*, 2012)。因此,推测这种保守的 5-HTi 是控制幼虫完成不同运动功能的必要神经网络。

桔小实蝇脑（包括 GNG）具有 42 个 5-HTi 细胞体，这与果蝇脑中的细胞体数量相当，但比螫蝇、丽蝇和麻蝇发现的略少（Nässel & Cantera, 1985; Liu & Li, 2011）。其中桔小实蝇颞神经节包含 22 个，与丽蝇和麻蝇的数量相同，略高于果蝇中发现的数量。研究表明，5-HTi 参与调控了果蝇的味觉偏好和基于 CPG 的取食运动过程（Huser *et al.*, 2012; Schoofs *et al.*, 2018; Tierney, 2020），推测不同数量的 5-HTi 可能与适应不同的取食环境有关。

桔小实蝇幼虫脑内视叶，触角叶，侧副叶，颞神经节，下位前脑，腹内侧脑，腹内侧和上位神经髓等区域含有丰富的 5-HTi 神经纤维，但蘑菇体缺乏免疫反应纤维。这些分布模式与果蝇类似，不同的是果蝇的蕈形体柄内发现少量 5-HT 免疫阳性的神经纤维（Huser *et al.*, 2012），但通过突触蛋白抗体免疫染色并不能标记出桔小实蝇幼虫脑内蕈形体的柄，也未发现有 5-HTi 的分布。本研究共追踪了 6 束跨脑中线的神经连合，连接两侧脑半球不同的区域，这与丽蝇相同，每个神经连合投射的区域相似（Nässel & Cantera, 1985）。类似在棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 和果蝇幼虫中同样发现 6 束神经连合（Tang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022）。

在桔小实蝇幼虫脑内，利用 5-HT 抗体标记的细胞体数量要高于 Teng 等（2024）利用基因编辑系统标记 TRH 的结果。TRH 免疫阳性神经元（TRH-IR）细胞体主要位于中央脑内，约含 14 个细胞体，被分为 SP1、SP2 和 LP1 等 3 个细胞体簇，而本研究共发现 4 个细胞体簇 20 个细胞体。此外，SP1、SP2 和 LP1 包含的 TRH-IR 细胞体与 5-HTi 细胞体在脑内的分布位置非常相似，推测它们可能存在共定位的现象。在果蝇中色氨酸羟化酶 DTRHn 的表达仅限于 5-HTi 神经元内，它们在脑内的分布完全重叠（Neckameyer *et al.*, 2007）。在颞神经节和胸腹神经节内，缺乏或只存在少量染色较弱的 TRH-IR 细胞体，这与本研究利用 5-HT 标记的 5-HTi 数量不同，推测可能和研究所采用的方法不同有关。有趣的是 TRH-IR 神经元的神经突起可被清晰标记，这为研究 5-HTi 的投射通路和支配区域提供了宝贵的机会，未来可通过设计桔小实蝇特异性的 TRH 单克隆抗体来标记 5-HTi，进而明确全脑 5-HT 的神经网络。

桔小实蝇的神经系统的结构特征及 5-HTi 分布模式与其他双翅目蝇类幼虫非常相似，特别是胸腹神经节内拥有相同的细胞体数量和相似的投射模式，这预示着 5-HT 在蝇类幼虫中发挥着类似的功能，具有相对较高的保守性。目前本研究仅从神经解剖学角度分析了该生物胺能神经元的分布，对其具体的功能尚不清楚，但本研究结果可为利用电生理和药理学方法在目标区域探索幼虫摄食偏好和可塑性等行为的神经机制提供结构基础。

**致谢：**感谢瑞典隆德大学生物系 Stanley Heinze 副教授和河南农业大学孙龙龙博士在神

神经元重建方面提供的帮助!

## 参考文献 (References)

- Chen W, Chen Y, Xiao Z, *et al.* The modulatory effects of biogenic amines on male mating performance in *Bactrocera dorsalis* [J]. *Frontiers in Physiology*, 2022, 13: 1000547.
- Dacks AM, Nickel T, Mitchell BK. An examination of serotonin and feeding in the flesh fly *Neobellieria bullata* (Sarcophagidae: Diptera) [J]. *Journal of Insect Behavior*, 2003, 16: 1-21.
- Gao Y, Li HJ, Lu YY, *et al.* Behavioral response of *Bactrocera dorsalis* female adults to the host volatile,  $\beta$ -caryophyllene [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2021, 43 (1): 253-259. [高扬, 李慧静, 陆永跃, 等. 桔小实蝇雌成虫对寄主挥发物 $\beta$ -石竹烯的行为反应 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (1): 253-259]
- Gasque G, Conway S, Huang J, *et al.* Small molecule drug screening in *Drosophila* identifies the 5HT2A receptor as a feeding modulation target [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3 (1): srep02120.
- Harris-Warrick RM. Neuromodulation and flexibility in central pattern generator networks [J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2011, 21 (5): 685-692.
- Hartenstein V, Omoto JJ, Ngo KT, *et al.* Structure and development of the subesophageal zone of the *Drosophila* brain. I. Segmental architecture, compartmentalization, and lineage anatomy [J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2018, 526 (1): 6-32.
- Huser A, Eschment M, Güllü N, *et al.* Anatomy and behavioral function of serotonin receptors in *Drosophila melanogaster* larvae [J]. *PLoS ONE*, 2017, 12 (8): e0181865.
- Huser A, Rohwedder A, Apostolopoulou AA, *et al.* The serotonergic central nervous system of the *Drosophila* larva: Anatomy and behavioral function [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (10): e47518.
- Immonen EV, Dacke M, Heinze S, *et al.* Anatomical organization of the brain of a diurnal and a nocturnal dung beetle [J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2017, 525 (8): 1879-1908.
- Ito K, Shinomiya K, Ito M, *et al.* A systematic nomenclature for the insect brain [J]. *Neuron*, 2014, 81 (4): 755-765.
- Jhaveri D, Rodrigues V. Sensory neurons of the Atonal lineage pioneer the formation of glomeruli within the adult *Drosophila* olfactory lobe [J]. *Development*, 2002, 129: 1251-1260.
- Klagges BRE, Heimbeck G, Godenschwege TA, *et al.* Invertebrate synapsins: A single gene codes for several isoforms in *Drosophila* [J]. *Journal of Neuroscience*, 1996, 16 (10): 3154-3165.
- Kollmann M, Minoli S, Bonhomme J, *et al.* Revisiting the anatomy of the central nervous system of a hemimetabolous model insect species: the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* [J]. *Cell and Tissue Research*, 2011, 343: 343-355.
- Lin T, Chen T, He YR, *et al.* A solid injection technique suitable for cuticular hydrocarbon analysis of *Bactrocera dorsalis* (Diptera:

- Tephritidae [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59 (3): 278-291. [林涛, 陈婷, 何余容, 等. 一种可用于桔小实蝇表皮碳氢化合物分析的固体进样技术 [J]. 昆虫学报, 2016, 59 (3): 278-291]
- Lin T, He LY, Wang F, *et al.* Review of the construction of insect brain neuropil atlases [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2021, 58 (1): 14-26. [林涛, 何丽云, 王帆, 等. 昆虫脑神经髓结构图谱构建方法综述 [J]. 应用昆虫学报, 2021, 58 (1): 14-26]
- Lin T, Li C, Liu J, *et al.* Glomerular organization in the antennal lobe of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* [J]. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2018, 12: 71.
- Lin T, Liu JL, Zeng XN. Structural characteristics of optic lobe and distribution of 5-HT immunoreactive neurons in the oriental fruit fly [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (3): 443-450. [林涛, 刘家莉, 曾鑫年. 桔小实蝇视叶结构特征及 5-羟色胺能神经元的分布 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41 (3): 443-450]
- Liu H, Wang YM, Hou JH, *et al.* Progress in research on the biological effects of methyl eugenol on *Bactrocera dorsalis* (Hendel) and its function in biocontrol [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2023, 60 (2): 475-485. [刘欢, 王怡铭, 候佳辉, 等. 甲基丁香酚对桔小实蝇的生物学效应及其在防控应用中的研究进展 [J]. 应用昆虫学报, 2023, 60 (2): 475-485]
- Liu SS, Li AY, Witt CM, *et al.* Immunohistological localization of serotonin in the CNS and feeding system of the stable fly *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae) [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2011, 77 (4): 199-219.
- Marder E, Bucher D. Central pattern generators and the control of rhythmic movements [J]. *Current Biology*, 2001, 11 (23): R986-R996.
- Nässel DR, Cantera R. Mapping of serotonin-immunoreactive neurons in the larval nervous system of the flies *Calliphora erythrocephala* and *Sarcophaga bullata*: A comparison with ventral ganglia in adult animals [J]. *Cell and Tissue Research*, 1985, 239: 423-434.
- Neckameyer WS, Coleman CM, Eadie S, *et al.* Compartmentalization of neuronal and peripheral serotonin synthesis in *Drosophila melanogaster* [J]. *Genes, Brain and Behavior*, 2007, 6 (8): 756-769.
- Néric N, Desplan C. From the eye to the brain: development of the *Drosophila* visual system [J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2016, 116: 247-271.
- Pereanu W, Hartenstein V. Neural lineages of the *Drosophila* brain: a three-dimensional digital atlas of the pattern of lineage location and projection at the late larval stage [J]. *Journal of Neuroscience*, 2006, 26 (20): 5534-5553.
- Qi YX, Wu SF, Huang J, *et al.* Advances in 5-hydroxytryptamine and its receptors in insects [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (7): 844-859. [齐易香, 吴顺凡, 黄佳, 等. 昆虫 5-羟色胺及其受体的研究进展 [J]. 昆虫学报, 2014, 57 (7): 844-859]
- Schoofs A, Hückesfeld S, Pankratz MJ. Serotonergic network in the subesophageal zone modulates the motor pattern for food intake in *Drosophila* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2018, 106: 36-46.
- Sitaraman D, Zars M, LaFerriere H, *et al.* Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105 (14): 5579-5584.
- Tang QB, Song WW, Chang YJ, *et al.* Distribution of serotonin-immunoreactive neurons in the brain and gnathal ganglion of caterpillar

- Helicoverpa armigera* [J]. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2019, 13: 56.
- Teng F, Guo F, Feng J, *et al.* Distribution analysis of TRH in *Bactrocera dorsalis* using a CRISPR/Cas9-mediated reporter knock-in strain [J]. *Insect Molecular Biology*, 2024, 33 (3): 283-292.
- Tierney AJ. Feeding, hunger, satiety and serotonin in invertebrates [J]. *Proceedings of the Royal Society B*, 2020, 287 (1932): 20201386.
- Vallés AM, White K. Serotonin-containing neurons in *Drosophila melanogaster*: Development and distribution [J]. *Journal of Comparative Neurology*, 1988, 268 (3): 414-428.
- Vleugels R, Verlinden H, Vanden Broeck J. Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects [J]. *Neurotransmitter*, 2015, 2: e314.
- Xiang Q, Yang WP, Yu JX, *et al.* Oviposition preference of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* on pomegranate [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2022, 44 (5): 1308-1318. [项前, 杨卫平, 于金鑫, 等. 桔小实蝇对石榴的产卵偏好性研究 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (5): 1308-1318]
- Xiong JX, Ji BZ, Liu SW, *et al.* The role of 5-HT in feeding, reproduction and polyphenism of the insects [J] *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2019, 31 (1): 9-17. [熊佳新, 嵇保中, 刘曙雯, 等. 五羟色胺对昆虫取食、生殖和非遗传多型的调控 [J]. 生命科学, 2019, 31 (1): 9-17]
- Xu L, Jiang HB, Yu JL, *et al.* Plasticity of the olfactory behaviors in *Bactrocera dorsalis* under various physiological states and environmental conditions [J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2024, 63: 101196.
- Yao Z, Scott K. Serotonergic neurons translate taste detection into internal nutrient regulation [J]. *Neuron*, 2022, 110 (6): 1036-1050.
- Yuan Q, Lin F, Zheng X, *et al.* Serotonin modulates circadian entrainment in *Drosophila* [J]. *Neuron*, 2005, 47 (1): 115-127.
- Zeng T, Su H, Liu Y, *et al.* Serotonin modulates insect gut bacterial community homeostasis [J]. *BMC Biology*, 2022, 20 (1): 105.
- Zeng T, Teng F, Wei H, *et al.* AANAT1 regulates insect midgut detoxification through the ROS/CncC pathway [J]. *Communications Biology*, 2024, 7 (1): 808.
- Zhang JJ, Sun LL, Wang YN, *et al.* Serotonergic neurons in the brain and gnathal ganglion of larval *Spodoptera frugiperda* [J]. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2022, 16: 844171.