

中华蜜蜂蕈形体的发育

李兆英^{①②} 奚耕思^①

(^①陕西师范大学生命科学学院 西安 710062; ^②陕西教育学院生命科学系 西安 710061)

摘要: 中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 的脑由前脑、中脑和后脑三部分构成, 蕈形体位于前脑的背侧, 是其重要的学习及其他复杂行为的整合中心。通过对中华蜜蜂工蜂的幼虫、蛹及成虫的蕈形体形态发育的观察研究, 发现中华蜜蜂的蕈形体包含约 1 000 个成神经细胞, 它们最终形成了蕈形体的所有 Kenyon 细胞。这些成神经细胞来自于在新孵化的幼虫脑中已存在的四丛成神经细胞, 每一丛细胞的数量不多于 45 个。蕈形体柄区的出现约在 3 龄幼虫, 而 α 叶和 β 叶在 5 龄幼虫已可明显辨认。冠区出现较晚, 大约在蛹期的第二天以后。由于社会性昆虫复杂的学习、记忆和认知需求, 其蕈形体的体积和复杂程度都优于其他昆虫。

关键词: 中华蜜蜂; 脑部结构; 蕈形体; 发育

中图分类号: Q954.67 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2007)02-46-06

Development of the Mushroom Bodies in *Apis cerana cerana*

LI Zhao-Ying^{①②} XI Geng-Si^①

(^① College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062;

^② Biology Department, Shaanxi Education College, Xi'an 710061, China)

Abstract: The mushroom bodies are paired neuropils in the insect brain that act as multimodal sensory integration centers and are involved in learning and memory. Our studies by using the Hematoxylin and eosin staining technique, show that the brain of a developing honey bee (*Apis cerana cerana*) contains approximately 1 000 neuroblasts which finally develop to the mushroom body intrinsic neurons (Kenyon cells). These neuroblasts are derived from four clusters neuroblasts that are already present in the newly hatched larva. Each cluster contains no more than 45 cells. Subpopulations of Kenyon cells, distinct in their cytoarchitecture and position, are formed at different but overlapping periods during the development of mushroom bodies, with the final localization of these neurons in place by the mid-pupal stage. This is the first comprehensive study on mushroom body formation during the larval and pupal development of *A. cerana cerana*.

Key words: *Apis cerana cerana*; Brain structure; Mushroom body; Development

昆虫的脑可分为前脑、中脑及后脑三部分。前脑最发达, 构成脑的大部分。蕈形体以左右对称的形式位于脑的前方, 两侧膨大成为两个大型的视叶, 是视觉的神经中心。中脑位于前脑的后方, 由其发出的一对神经分布到触角, 为触觉的神经中心。后脑很不发达, 由之发出神经通至上唇和前肠^[1, 2]。蕈形体位于前脑内, 由许多联络神经元组成。可分为 3 个神经区: 冠

区、柄区和根区。根区又由 α 叶和 β 叶组成^[3]。冠区和 α 叶内的轴突侧支与视神经及触角神经的感觉纤维形成突触, β 叶内的轴突侧支与运

基金项目: 陕西省自然科学研究计划项目(No. 2005C125);
第一作者简介: 李兆英, 女, 博士研究生, 讲师; 研究方向: 昆虫生理及发育生物学; E-mail: lihucheng62@yahoo.com.cn.
收稿日期: 2006-06-13; 修回日期: 2006-11-05

动神经元形成突触^[4]。

蕈形体是昆虫脑中重要的感觉整合中心。多年来,从行为学、生理学、遗传学和解剖学等方面对其功能进行了大量的研究。研究表明,蕈形体在昆虫的嗅觉辨别、求偶调节以及视觉学习的前后概括等方面都扮演着重要的角色^[5],而且还参与进攻行为和控制行走灵活性等机械运动的调节。此外,蕈形体还可能与昆虫的空间定位学习和觅食行为有关^[6]。

关于蕈形体的发育,在果蝇已进行过大量的研究^[7]。研究显示,果蝇(*Drosophila melanogaster*)的蕈形体最初是由4个成神经细胞形成的,这些成神经细胞从胚胎形成早期开始不断分裂,直到蛹期结束^[8]。每一个成神经细胞经过分裂,最终成为成熟蕈形体的一部分。高等的膜翅目动物,蕈形体较大,并由大量的Kenyon细胞组成^[9],这些细胞分布在蕈形体的冠区内部及周围。蕈形体的体积和Kenyon细胞的数量同膜翅目中社会性昆虫行为的复杂性有十分明显的相关性^[10]。

中华蜜蜂是我国的当家蜂种,有着悠久的饲养史。它在维系动植物生态平衡等方面起着极为重要的作用,同时因其具有耐寒、耐热、抗螨、飞行敏捷、嗅觉灵敏、能有效利用当地蜜粉源等特点,在长期的进化过程中与本土大多数植物建立了牢固的“相互适应性”,成为我国养蜂业的重要组成部分。研究中华蜜蜂的生理生化有助于揭示其生命活动的机理,尤其是对其脑部的研究显得更为重要。

1 材料与方法

1.1 材料 中华蜜蜂工蜂的幼虫、蛹和成虫均购自陕西省种蜂场。幼虫的龄期通过测量头壳的宽度来确定^[11]。蛹为封盖后4 d及8 d的个体。成年工蜂为采蜜蜂。

1.2 方法 取工蜂头部,迅速放入新配制的4%多聚甲醛溶液中,4℃固定24 h,梯度酒精脱水;二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片,切片厚度7 μm,切片贴于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,烘干备用。切片脱蜡后复水,H.E染色,Olympus

显微镜观察拍照。

2 结果

2.1 成年工蜂脑部的形态 中华蜜蜂脑部的基本结构由前、中、后脑三部分组成(图版 I:1^[12] 2)。前脑由前脑叶和视叶构成,前脑叶包括蕈形体(mushroom body, MB)和中央体(central body, CB)(图版 I:3 A)。一对蕈形体以左右对称的形式位于脑的上方(图版 I:2),它是由两个杯状的髓质冠(calyx, C)冠的柄部(pedunculus, P)以及向下延伸的复杂根系共同构成(图版 I:4)。成年工蜂的蕈形体中包含有约170 000个密集排列的内源性神经细胞(Kenyon cells)^[13],这些细胞发出的分支占据了蕈形体的大部分髓区。蕈形体通过冠内Kenyon细胞的树突接受多种形式的感觉信息,并通过Kenyon细胞发出的轴突传入柄及柄基部中叶(beta lobe, β叶)和垂直叶(alpha lobe, α叶)^[3]。外源神经元将这些结构与周围不同脑区相连,并在蕈形体内部和外部均有投射。前脑的视叶由视内髓(medulla interna, mi)视外髓(medulla externa, me)及视神经节层(lamina, la)组成,视外髓和视内髓之间具有内神经交叉,在视外髓和视神经节层之间由外神经交叉相联系,视神经节层发出神经纤维与复眼相接(图版 I:2)。脑桥体(protocolocerebral bridge, pb)位于前脑的背面,两蕈状体之间,为一马蹄形的纤维体。中央体位于脑桥体的腹面,卵形(图版 I:2, 3)。脑腹体(lateral protocerebrum, LP)位于前脑的腹侧面,蕈形体根底下,两根神经索由缔结组织隔开。中脑(也叫嗅叶)位于前脑下方,具有两个中脑叶,前面连着前脑,后面连着触角神经束。中脑是由附叶(dorsal lobe, DL)和触角中枢(antennal lobes, al)构成,附叶位于视叶和触角中枢之间(图版 I:3)。后脑在前脑和中脑的背面,左右各成一叶(图版 I:1),发出围咽神经索,与咽下神经节(subesophageal ganglion, SOG)相连。

2.2 工蜂蕈形体的发育 在1龄幼虫(L1)前脑的前端,可以看到几个大型的成神经细胞

(6.7 μm) ,在它的下方常常能看到少量的子代细胞(图版 II 1)。

2 龄幼虫(L2) ,在脑的左右两叶各有两丛成神经细胞 ,它们位于前脑的前端。中间的成神经细胞丛的细胞数量远远少于侧面的成神经细胞丛 ,平均只有约 16 个成神经细胞 ,而侧面含有约 45 个^[14]。H. E 染色显示 ,蕈形体成神经细胞的着色比其他的前脑细胞体更深一些。在这个阶段 ,蕈形体成神经细胞丛包含大型的成神经细胞 ,少量的小细胞可能是神经节母细胞(ganglion mother cells ,GMCs) ,它们有时位于细胞丛的底部(图版 II 2)。

柄区的神经纤维在 3 龄幼虫(L3)开始出现^[14] ,它从每一丛成神经细胞基部发出 ,伸入前脑神经纤维。这些神经纤维的出现使我们更容易判定 Kenyon 细胞的存在。在这个阶段 ,中间的成神经细胞丛体积有所增大 ,每一个细胞丛都含有约 50 个成神经细胞。小型的神经节母细胞和新形成的 Kenyon 细胞分散在细胞丛中 ,大型的前脑成神经细胞的数量逐渐下降(图版 II 3)。

在 4 龄幼虫(L4) ,蕈形体成神经细胞的数量进一步增加。在这个阶段 ,成神经细胞有丝分裂形成的纺锤体清晰可见。大量的神经节母细胞主要分散在成神经细胞丛的边缘 ,在 4 龄幼虫的晚期 ,前脑神经纤维的 β 叶和 α 叶开始形成 ,显示这些新形成的 Kenyon 细胞已经开始发出神经轴突(图版 II 4)。

到了 5 龄幼虫(L5) ,Kenyon 细胞的数量大大增加 ,新形成的细胞很容易辨认 ,它们位于成神经细胞丛的外周。蕈形体柄区的神经纤维网比前期明显增大 , α 叶和 β 叶已可以明显辨认 ,但是冠区依然没有形成(图版 II 5)。

在蛹早期(P4) ,Kenyon 细胞开始呈现不同的形态 ,较早形成的细胞在成神经细胞丛的下部 ,而新形成的细胞位于侧面。老细胞明显小于新细胞 ,H. E 染色较深 ,可以帮助我们区分两种细胞(图版 II 6) 。在蛹期较晚的时候 ,Kenyon 细胞快速增殖 ,每一个成神经细胞丛的细胞数量在这个阶段达到顶峰。蕈形体柄侧面的神经

纤维快速伸长 ,冠区开始出现 ,到第 8 d 左右 ,根区以及视内髓、视外髓的结构已经开始类似于成虫(图版 II 7) ,但是 ,冠区的体积仍然明显小于成虫。在蛹发育末期 ,蕈形体冠区的神经纤维迅速增加 ,已经可以分辨冠区的唇(lip ,li)和领部(collar ,co) ,大约到第 10 d 左右 ,可以区分冠区基部的环状部分(basal ring ,ri)(图版 II : 8)。

3 分析与讨论

3.1 中华蜜蜂蕈形体的构造发育 通过对中华蜜蜂幼虫、蛹和成虫蕈形体发育过程的观察发现 ,中华蜜蜂蕈形体在早期幼虫 ,每一个细胞丛约有 40 多个细胞 ,到末期蛹 ,聚集了约 500 多个细胞 ,与意大利蜜蜂(*A. mellifera*)非常相似^[14]。在第 3 龄、4 龄幼虫之前 ,尽管细胞有丝分裂的活动非常明显 ,但是成神经细胞的数量并没有快速增加 ,这可能是蕈形体成神经细胞的细胞周期不连续的结果。在 5 龄幼虫 ,细胞周期的突然增加 ,导致了成神经细胞及其子代细胞数量的急剧增长。

在幼虫早期 ,在成神经细胞丛中可以看到少量小型的神经节母细胞 ,到第 4 龄幼虫 ,数量有了较大的增加。神经节母细胞的有丝分裂最初在距成神经细胞丛较远的边缘进行 ,到产生 Kenyon 细胞后 ,便移至细胞丛的表面。新产生的 Kenyon 细胞将老的细胞从边缘推至中心 ,或者是移至冠区的背侧 ,这同君主蝴蝶(*Danaus plexippus*)蕈形体的发育相似^[15]。果蝇蕈形体的 Kenyon 细胞是由位于蕈形体背侧的成神经细胞形成 ,因此 ,它不呈现细胞的向心排列 ,但是在柄区和根区的轴突依然保持了发育中的“内外”模式^[16]。蕈形体的这种发育模式已经在鳞翅目、双翅目和膜翅目被证实。蕈形体神经纤维的体积在前三周增加了约 30% ,这可能同它的摄食活动有关 ,摄食行为可使蕈形体的生长过程加速^[2]。

在幼虫早期 ,蕈形体的成神经细胞很小 ,但大型的前脑成神经细胞非常显著。在前脑成神经细胞下边 ,常常能看到成串的小的子代细胞。

在某些昆虫,蕈形体的成神经细胞丛的出现通常是同这些大型的前脑成神经细胞相关联,但是,也不能因此就断定蕈形体的成神经细胞就来源于这些大型的成神经细胞,这还需要进一步的研究来证实。

通过 H.E 染色发现,通常位于侧面的成神经细胞丛更大一些,并容易辨认,中间的细胞丛较小,但位置比例更靠前。尽管在蛹期以前,中间的成神经细胞丛的细胞数量和体积都要小于侧面的细胞丛,但它们都是由在幼虫早期就已出现的几个成神经细胞发育而来。

蕈形体柄区和神经纤维的 α 叶和 β 叶的快速生长大约从 4 龄幼虫开始,而冠区的生长则是在蛹期。这说明 Kenyon 细胞首先形成了轴突投射,在随后的发育过程中逐渐形成树突投射,最终形成蕈形体的冠区。在昆虫中,一些较原始有翅类(如蜻蜓目)的蕈形体没有冠区^[17]。

3.2 脑结构神经发生模式的比较 膜翅目社会性昆虫的蕈形体,无论在体积还是复杂程度上,都领先于其他昆虫,这可能同社会性昆虫复杂的社会认知需求有关。成年蜜蜂的蕈形体占脑容积比例约为 1/136,蚂蚁为 1/174,鳃角金龟科(Melolonthidae)仅有 1/3 290,龙虱科(Dytiscidae)仅有 1/4 200^[18]。从蕈形体在脑部所占的比例来看,蜜蜂的蕈形体几乎占去整个脑部的 40%。Hanström 等将膜翅目一些种类的蕈形体与整个脑的大小进行比较表明,锯蜂科(Megalodontidae)的级别最低,群居性的膜翅目最高,而独居的蜂则居于中间地位。就蕈形体所包含的 Kenyon 细胞的数量而言,蜜蜂约有 340 000 个 Kenyon 细胞,而果蝇却只有约 5 000 个^[19]。在蜜蜂脑的发育过程中,每个脑叶约有 1 000 个成神经细胞参与形成 Kenyon 细胞,这个数字比以前所报道的其他昆虫都要高出许多:果蝇每个脑叶约有 4 个^[8],君主蝴蝶约有 30 个^[15],蝗虫(*Schistocerca gregaria*)在全脑约有 103 个^[20]。昆虫的神经元是由不均匀分布的成神经细胞所产生,成年工蜂的蕈形体中所有的 Kenyon 细胞都是由脑发育过程中的约 85 000 个神经节母细胞所产生。Kenyon 细胞是蜜蜂在约 10 d 左右

的时间内形成的,这个时间对于神经节母细胞形成所有的 Kenyon 细胞已经足够了。

蕈形体是昆虫脑中重要的学习以及其他复杂行为的整合中心。对中华蜜蜂脑部发育过程的研究有助于揭示其生命活动的机理。社会性昆虫神经系统在昆虫中是比较复杂的,因此对其脑的研究除了可为一些神经方面的热点问题提供理论基础外,同时可为解决高等动物神经生物学的基础理论问题提供帮助。

参 考 文 献

- [1] Snodgrass R E. Anatomy of the Honey Bee. Ithaca, New York : Cornell, 1956 62 ~ 120.
- [2] Durst C, Eichmüller S, Menzel R. Development and experience lead to increased volume of subcompartments of the honeybee mushroom body. *Behav Neural Biol*, 1994 62 :259 ~ 263.
- [3] Rybak J, Menzel R. Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain. The neuronal connections of the alpha-lobe. *J Comp Neurol*, 1993 334 :444 ~ 465.
- [4] Grünewald B. Morphology of feedback neurons in the mushroom body of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol*, 1999 404 :114 ~ 126.
- [5] Davis R L. Physiology and biochemistry of *Drosophila learning mutants*. *Physiol Rev*, 1996 76 :299 ~ 317.
- [6] Heisenberg M. What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. *Learn Mem*, 1998 5 :1 ~ 10.
- [7] Truman J W. Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*. *J Neurobiol*, 1990 21 :1 072 ~ 1 084.
- [8] Ito K, Hotta Y. Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 1992 149 :134 ~ 148.
- [9] Gronenberg W, Hlldobler B. Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and the mushroom bodies of the ant, *Camponotus floridanus*. *J Exp Biol*, 1996 199 :2 011 ~ 2 019.
- [10] 王荫长. 昆虫生理生化学. 北京:中国农业出版社, 1994, 116 ~ 139.
- [11] Bertholf L M. The moults of the honeybee. *J Econ Entomol*, 1925 18 :380 ~ 384.
- [12] Sawata M, Yoshino D, Takeuchi H, et al. Identification and punctate nuclear localization of a novel noncoding RNA, κ s-1, from the honeybee brain. *RNA*, 2002 8 (6) :772 ~ 785.
- [13] Witthoft W. Absolute Anzahl und Verteilung der Zellen im Hirn der Honigbiene. *Z Morphol Tiere*, 1967 61 :160 ~ 164.
- [14] Farris S M, Robinson G E, Davis R L, et al. Larval and pupal

development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol*, 1999 **414** 97 ~ 113.

[15] Nordlander R H, Edwards J S. Postembryonic brain development in the Monarch butterfly, *Danaus plexippus plexippus*, L. III. Morphogenesis of centers other than the optic lobes. *Roux's Arch*, 1970 **164** 247 ~ 260.

[16] Armstrong J D, de Belle J S, Wang Z, et al. Metamorphosis of the mushroom bodies; large-scale rearrangements of the neural substrates for associative learning and memory in *Drosophila*. *Learn Mem*, 1998 **5** :102 ~ 114.

[17] Strausfeld N J, Hansen L, Li Y S, et al. Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learn Mem*,

1998 **5** :11 ~ 37.

[18] 伊姆斯(忻介六译).普通昆虫教程(第十版).北京:高等教育出版社,1987 90 ~ 290.

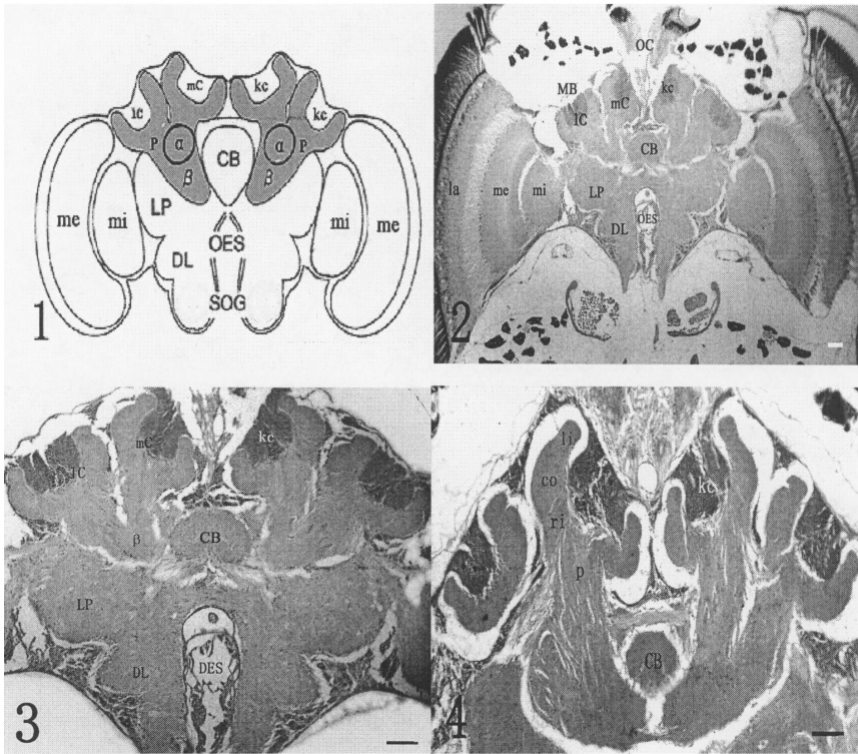
[19] Balling A, Technau G M, Heisenberg M. Are the structural changes in the adult *Drosophila* mushroom bodies memory traces? Studies on biochemical learning mutants. *J Neurogenet*, 1987 **4** 65 ~ 73.

[20] Zacharias D, Williams J L D, Meier T, et al. Neurogenesis in the insect brain: cellular identification and molecular characterization of brain neuroblasts in the grasshopper embryo. *Development*, 1993 **118** 941 ~ 55.

李兆英等:中华蜜蜂蕈形体的发育

LI Zhao-Ying et al.: Development of the Mushroom Bodies in *Apis cerana cerana*

图版 I
Plate I



中华蜜蜂成年工蜂脑部形态。

1. 工蜂脑部形态模式图(仿 Sawatzki^[12]); 2. 工蜂脑部整体形态显微结构; 3. 工蜂脑中间部分显微结构; 4. 蕈形体剖面图。CB: 中央体; mC: 蕈形体的中冠; IC: 侧冠; p: 蕈形体的柄; α : α 叶; β : β 叶; kc: Kenyon 细胞; LP: 侧前脑叶; me: 视外髓; mi: 视内髓; SOG: 咽下神经节; OES: 食道; la: 视神经节层; li: 唇; co: 颈; ri: 环。标尺 = 50 μ m。

The morphology of the *Apis cerana cerana* adult worker brain.

1. Schematic diagram of an adult honeybee brain; 2. Middle transverse section of the adult honey bee brain; 3. Middle transverse section of the adult honey bee brain; 4. Transverse section of the mushroom bodies in the adult honey bee brain.

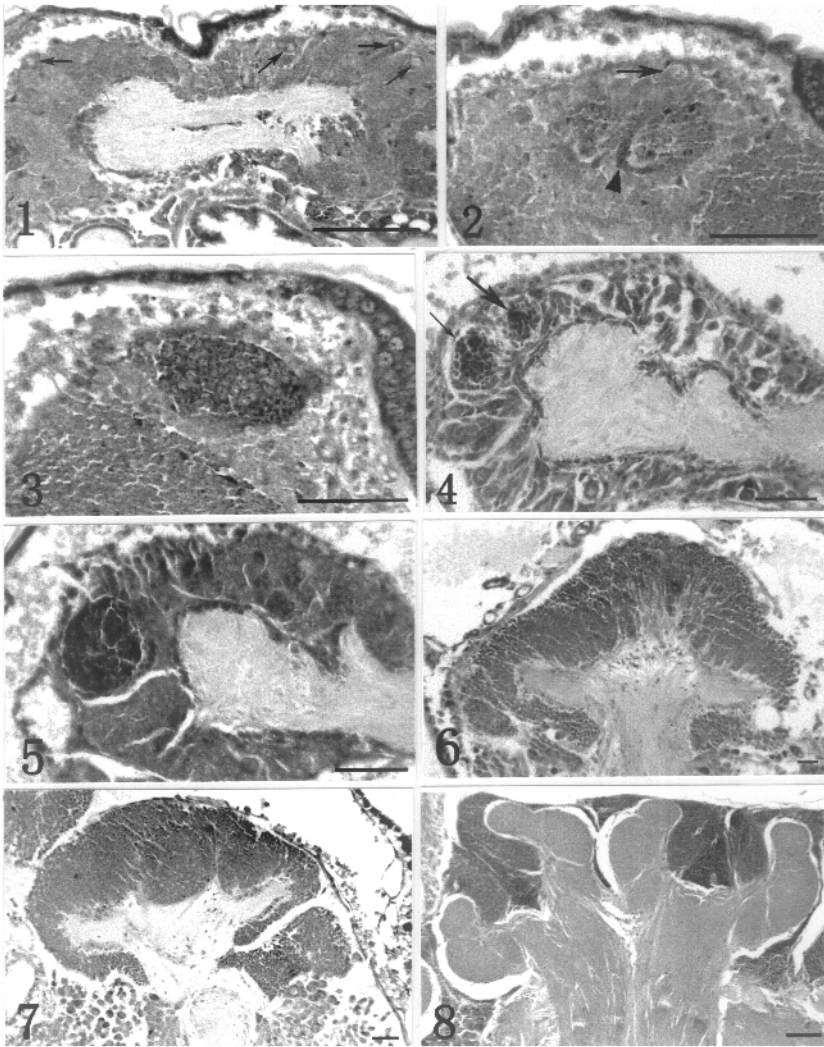
CB: central body; mC: medial calyx; IC: lateral calyx; p: pedunculus; α : alpha lobe; β : beta lobe; kc: Kenyon cells; LP: lateral protocerebrum; me: medulla externa; mi: medulla interna; SOG: subesophageal ganglion; OES: esophagus; la: lamina; li: lip; co: collar; ri: basal ring. Bar = 50 μ m.

李兆英等 :中华蜜蜂蕈形体的发育

图版 II

LI Zhao-Ying *et al.* :Development of the Mushroom Bodies in *Apis cerana cerana*

Plate II



中华蜜蜂工蜂蕈形体的发育。

1. 工蜂 1 龄幼虫 (L1) 脑部横切, 箭头指示为大型的成神经细胞; 2. 工蜂 2 龄幼虫 (L2) 右脑叶, 左为中间的成神经细胞丛, 右为侧面的细胞丛, 箭头指示为大型的成神经细胞, 三角指示为神经节母细胞; 3. 工蜂 3 龄幼虫 (L3) 右脑叶, 没有显示神经纤维网; 4. 工蜂 4 龄幼虫 (L4) 左脑叶, 大箭头指示为中间的成神经细胞丛, 小箭头指示为侧面的成神经细胞丛; 5. 工蜂 5 龄幼虫 (L5) 左脑叶侧面的成神经细胞丛, Kenyon 细胞位于细胞丛的边缘; 6. 工蜂第 4 d 蛹 (P4) 右脑叶的蕈形体; 7. 工蜂第 8 d 蛹 (P8) 右脑叶的蕈形体; 8. 工蜂成虫右脑叶的蕈形体。标尺 = 50 μm 。

Development of the Mushroom Bodies in *Apis cerana cerana* worker.

1. The brain of the first instar larva. Large neuroblasts of the protocerebrum are indicated by arrowheads; 2. Right side of the brain of the second instar larva. Medial (left) and lateral (right) neuroblast clusters at higher magnification. Large neuroblasts are indicated by arrowheads; 3. Right side of the brain of the third instar larva. Note the absence of calycal neuropil; 4. Left side of the brain of the fourth instar larva. Medial (right) and lateral (left) neuroblast clusters of the brain; 5. Left side of the brain of the fifth instar larva; 6. Two mushroom body calyx of P4; 7. Two mushroom body calyx of P8; 8. The mushroom bodies of the adult worker honey bee. Bar = 50 μm .