

三维重建技术专题

鞘翅目形态结构的三维重建与功能之间 关系探讨的有效方法评估

葛斯琴* 任 静 高彩霞

(中国科学院动物进化与系统学重点实验室, 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

摘 要 本文简要介绍了计算机三维重建技术在鞘翅目形态学研究中的应用, 并对所涉及到的成像设备及相关技术做了简要的介绍和评估。同时, 本文也对计算机三维重建技术的未来发展方向做了初步的展望。

关键词 鞘翅目, 形态学, 三维重建, 评估

The evaluation of three dimensional reconstruction techniques in application on Coleoptera morphology and function

GE Si-Qin* REN Jing CAO Cai-Xia

(Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstracts The application of three dimensional reconstruction techniques in the morphology of Coleoptera are reviewed briefly. The related imaging devices and techniques are introduced and evaluated. At the same time, the future directions of this technique are prospected.

Key words Coleoptera, morphology, three dimensional reconstruction, evaluation

鞘翅目 Coleoptera (俗称甲虫) 已记载种类约为 35 万种 (Beutel and Leschen, 2005), 占世界已知生物种数的四分之一, 是地球上种类最多、最具多样性的类群。甲虫的种类多样也直接导致了形态结构的多样化, 其结果必然导致功能的多样化。研究甲虫的形态结构, 是对其进行相关功能探讨的前提, 也是开展进化研究及仿生学研究的重要基础。

目前世界上已开展了诸多的甲虫形态学研究工作, 其内容涉及甲虫的若干形态结构, 经典的工作涉及口器 (Eberhard, 1979; Pearson and Mury, 1979; Eberhard, 1982; Bernhardt, 2000)、翅基及翅 (Kukalová-Peck and Lawrence, 1993, 2004)、足 (Beutel and Gorb, 2001; Gorb *et al.*, 2007)、后胸叉骨 (Crowson, 1938, 1945; Balfour-Browne, 1961;

Pretorius and Scholtz, 2001)、触角 (Ernst, 1969; Leal, 1996, 1998)、肌肉 (Larsén, 1966; Rodriguez, 1994; Smith, 1964) 等, 但其研究内容均限于对平面形态结构的比较分析, 由于研究方法和手段的限制, 尚未开展大规模的基于三维 (立体) 图像的比较分析。

随着科技发展的日新月异, 越来越多的研究手段被应用于形态学研究工作, 如显微 CT、激光共聚焦显微镜、计算机三维重建等新的技术和方法, 为基于三维图像的形态学研究提供了可行的技术背景, 也为甲虫的形态学研究寻找到了可能的新的生长点。如何将上述研究手段更好的运用到甲虫功能形态学研究之中, 促进该学科快速发展, 成为我们目前所面临的最大挑战和不可推卸的责任。本文在大量实践工作的基础上, 对目

* 通讯作者, E-mail: gesq@ioz.ac.cn

收稿日期: 2013-11-10, 接受日期: 2013-11-18

前涉及的三维重建的相关技术、参数设定及在甲虫形态学中的应用提供了一个全面的综合评估,从而更进一步推进甲虫形态学的发展。

甲虫三维图像的获得需要如下 8 个流程(宋余庆等, 2008)。其中图像获取、分割及归类、体绘制及绘制后的再处理为研究者需要重点掌握的技术流程。其他的 4 项流程仅供参考,均已打包在成像设备上,在图像采集的过程中会自动运行程序,不需特别介绍。

(1) 图像获取:通过图像获取设备(显微 CT、激光共聚焦显微镜等)对甲虫的形态结构进行扫描,得到一组二维断层图像;

(2) 图像格式转化:完成从图像格式(如 DICOM)到便于计算机处理的图像格式(如 bmp, TIFF)转换;

(3) 二维图像滤波:由于断层图像一般含有噪声,为增加信噪比或消除图像伪影,需要对每一层图像进行滤波;

(4) 图像的插值:原始图像(如显微 CT 图像)是二维水平断层图像,在实际扫描过程时,对一些关键部位的扫描,层间距离可比其他部分小,在此情况下,就必须采用差值算法,使体数据的表达各向同性。

(5) 三维图像滤波:为了进一步提高信噪比,生成三维体数据后也需要进行三维数据滤波,如三维高斯滤波、非线性滤波等。

(6) 分割及归类:对体数据的不同组织器官进行分割提取,以便归类。分割归类的用途是便于显示感兴趣组织,而忽略次要的组织结构。

(7) 体绘制:分割步骤处理之后,决定该用何种绘制方法,选取的原则取决于系统的内存容量、计算能力和可视化的目标。

(8) 绘制后的再处理:对绘制出的三维图像进行操作、分析。

1 甲虫二维图像序列获得的相关技术

1.1 组织切片技术(microtome serial sections)

组织切片技术的应用已有 100 多年的历史,随着生物学和医学的发展,经过不断的改进而逐渐完善,其精度不断提高。现代切片技术已成为生物亚显微结构研究的一个重要方面。三维重建对切片的要求较高,必须为连续切片,这样才能够

提供足够完整的组织样本断层信息。连续切片的制作方法根据不同的包埋介质分为:石蜡切片、树脂切片、半薄切片、超薄切片、明胶切片和火棉胶切片等,在甲虫中主要使用树脂切片技术。组织切片可以染色,可使不同的组织呈现不同的颜色,容易识别。并且其成本相对低廉、样品尺寸要求范围广,因此在昆虫形态学中得到了广泛的应用。但甲虫成虫体壁常被覆一层坚硬的外骨骼,制作连续的组织切片存在一定的难度,需要付出大量的时间、精力和耐心。此外,做好的连续切片需要通过图像采集系统,将其导入计算机,少则百张,多可达数千张,也需要花费大量的时间。

1.2 显微 CT 技术 (micro-computer tomography, μ -CT)

显微 CT 成像技术即电子计算机 X-射线显微断层扫描、重构技术,是当前国际上一种先进的 X-射线无损检测技术,被检测样本不需做复杂的前处理就可显示其内部的细微结构。该项技术最初应用于工业、航天及医疗等各个领域,近些年逐渐被应用到动、植物学研究领域, Hörnshimeyer 等(2002)将此项技术引入昆虫形态学研究领域。随着技术的发展,目前的最高空间分辨率可达到 $0.5\ \mu\text{m}$ 左右,而最新的纳米 CT 的空间分辨率则可达到 $0.1\ \mu\text{m}$ 。与传统的组织切片技术相比,显微 CT 的优点是可快速的扫描到甲虫整体及内、外相关结构,非常适合甲虫内部组织的观察。

显微 CT 技术的样品制作简单,不需花费大量的时间即可精细显示待测样本的相关结构。这些独特优势为深入而细致地解读甲虫内部的形态信息提供了广阔空间。与扫描电子显微镜(scanning electronic microscopy, SEM)、透射电子显微镜(transmission electronic microscopy, TEM)和激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)相比,该项技术不但能够对物体外部及内部结构进行连续断层式扫描,而且能依据其多层扫描结果重构其三维立体图像,并在此基础上制成不同格式的影像。与连续的组织切片技术相比,后者需要进行繁琐的样品制备及处理,费时费力;并且通过连续组织切片所制得的图像序列在三维重建过程中,存在着不可避免的人工误差(artifacts)和独立单元的定向误差(orientation, alignment),其结果直接影响重建结构

的准确性和精确性;而显微 CT 技术样本处理及制作简单,其扫描结果无人工误差和定位误差,从而提高了观测结构的准确性与精确性。

显微 CT 的样本制作简单,对于酒精浸泡样本而言,采集图像前可将其酒精梯度脱水,之后进行临界点干燥,以减少其内部组织的形变。之后将其粘在样品台上,样品台和固定胶的种类多样,可根据不同的样品具体选择。对于已经干燥的样本,如保存于博物馆的干制标本可将其置入酒精或蒸馏水中以提高图像清晰度。因部分甲虫的样品内部组织之间的衬度(对比度)较低,可通过样本染色提高其对比度,目前具体的方法主要采用 Metscher (2009) 所提及的碘溶液处理方法,其他的染色方法仍在进一步探索之中。

用于透射电镜(TEM)观察的已制好的样品块,即四氧化钼染色后的树脂块,也可用于显微 CT 扫描,其图像的衬度也很好。因此应用此项技术,也可观察到琥珀昆虫的内部结构(Tafforeau *et al.*, 2006; Pohl *et al.*, 2010)。

1.3 激光共聚焦扫描显微镜技术(confocal laser scanning microscope, CLSM)

激光共聚焦显微镜技术的工作原理是检测针孔和照明针孔始终聚焦于同一点,使聚焦平面以外被激发的荧光不能进入检测针孔,从而形成系列的光学切片,适用于观察传统荧光显微镜的样品,能够得到高质量图像(Amos *et al.*, 1987)。因昆虫(包括甲虫)表皮中包含的蝶啶和节肢弹性蛋白能够自发荧光,昆虫样本不需要荧光染色就可以直接上镜观察。采用激光共聚焦显微镜技术可观察到昆虫(包括甲虫)的骨化结构及非骨化的组织结构,如肌肉、神经系统、消化系统等(Neff *et al.*, 2000; Klaus and Schawarocht, 2006)。

用于激光共聚焦显微镜技术成像的甲虫样本制作非常简单,仅将样本浸入 70% 酒精中即可(Michels and Gorb, 2012)。微小、体表扁平或体内部相对独立的形态结构(如外生殖器)可应用此项技术得到很好的图像序列(Klaus and Schawarocht, 2006)。但对于略大、表皮较厚的结构,因激光无法透过及视野限制,则很难得到理想的图像。通过使用若干化学试剂可使甲虫几丁化的表皮软化、透明,如 35% 的过氧化氢溶液(Stueben and Linsenmair, 2009)、水杨酸甲酯(methyl salicylate)

和乳酸(lactic acid)(Michels, 2007)、穆氏洗液(Murray's clear, 即 BABB 溶液,一份苯甲醇与一份苯甲酸苄脂)(Zucker, 2006)。可将样本置于上述溶液中,根据样本厚度及几丁质的含量,需浸泡 1 h 至几天不等。经过上述处理的样本,可以得到较好的断层图像(Deans *et al.*, 2012)。

激光共聚焦显微镜相关参数的选择与设定主要根据待测样本的厚度。为了保证采集图像的稳定性与清晰,样本必须在扫描过程中保持不动,任何样本的移动都会完全破坏样本的成像清晰度。样本可置于载玻片与盖玻片之间,其上滴一滴甘油(也可用酒精、缓冲液和蒸馏水替代)覆盖住样本。此外,摆放样本的载玻片与盖玻片之间需适当加入些许的蜡、自粘环、羊毛脂、凡士林或橡皮泥等,以给样本预留出一定的空间,从而避免被盖玻片挤压变形。在样本扫描过程中,为了防止因样本溶液的蒸发而导致的样本形变,长时间的扫描需将样本置于粘度略大的液体中,一般可选用 1% 的琼脂糖(agarose)、甘油冻(glycerine jelly)、mowiol 液或 Euparal(Schawaroch and Li, 2007)。

488 nm 的激光波长可减弱昆虫体表的自发荧光(Michels, 2007),扫描样本时需选用绿色(约 500 ~ 570 nm)和红色荧光(约 580 ~ 690 nm)两个通路的光谱。两个通路光谱的共同选用可使样本体表组织呈现不同的颜色,如膜状结构呈现绿色,骨化组织则为棕色(Deans *et al.*, 2012)。节肢弹性蛋白含量丰富的组织可通过使用 UV-light(405 nm)和选用蓝色发射光成像(420 ~ 480 nm, Michels and Gorb, 2012)。体表组织骨化较弱或经过软化透明处理的样本,基本可采集到内部组织的清晰图像。经过透明软化的组织可导致自发荧光程度的改变,从而影响骨化组织的成像,需使用戊二醛固定,这样就可 在 488 nm 波长下增强其自发荧光的强度。目前用于昆虫体壁的荧光染色剂为刚果红,扫描时需要选取的激光波长为 561 nm(发射光谱选择范围为 570 ~ 670 nm, Michels and Buentzow, 2010)。目前用于激光共聚焦显微镜成像的昆虫组织主要包括外生殖器、口器或其他骨化较好的结构(Klaus and Schawarocht, 2006; Michels, 2007)。但是对于较大尺寸的样本仍不适用于激光共聚焦图像采集。

1.4 核磁共振成像技术(magnetic resonance

imaging, MRI)

核磁共振成像技术(MRI)是利用原子核在磁场内共振所产生的信号经重建成像的一种成像技术(宋余庆等,2008)。根据检测样本特定的原子核的位置和种类,绘制成物体内部的结构图像。氢核是生物体成像的首选核种。生物体内各种组织含有大量的水和碳氢化合物,所以氢核核磁共振灵敏度较高、信号较强。氢核的核磁共振信号强度与样品中氢核密度有关,生物体内各种组织间含水比例不同,及含氢核的多少不同,则信号强度有差异,利用这种差异作为特征量,可以把不同的组成分开成像。核磁共振技术可以通过非侵入成像、调节磁场,在样本的不同平面进行连续断层,避免了形态结构对其外部和内部结构的损坏,而且可以得到昆虫组织、器官自然状态的空间分布结构。核磁共振由于其性能的限制,仅能针对含水量较高的昆虫包括甲虫进行成像(Haddad *et al.*, 2004; Meme *et al.*, 2013)。

1.5 扫描电子显微镜 (block-face scanning electron microscopy, SBFSEM)

目前基于扫描电镜技术的生物样本三维重建技术主要包括: ATLUM + SEM、Diamond-knife/

SBFSEM、FIB/SBFSEM,在昆虫形态学中仅 FIB/SBFSEM 得到了应用(Zankel *et al.*, 2009; Di Giulio *et al.*, 2012)。此项技术可以避免 TEM 产生的人工误差,也可得到高分辨率的断层图像。但是因其技术参数的限制,待测样本的尺寸需要小于 1 mm。

FIB/SBFSEM 技术是把离子束斑聚焦到亚微米甚至纳米级尺寸,通过偏转系统实现微细束加工的新技术。与其他高能粒子束流相比,聚焦离子束具有较大的质量,经加速聚焦后能够以很高的能量和较短的波长直接把图案转移到较硬的样本材料上,也可对样本进行刻蚀、沉积等微纳米整形加工。本项技术除了具有聚焦离子束(FIB)系统功能外,还具有扫描电子显微镜(SEM)的成像功能,且分辨率高。FIB 样本制备与透射电镜样本制备相同,需要用戊二醛固定样本,依据相关的流程,最后做成合适尺寸的树脂包埋块,喷碳后置于 FIB 下观察。

表 1 为上述主要技术在甲虫形态学研究中涉及到的相关参数设定,供读者参考。但需注意的是,因科技的快速发展,分辨率等参数更新很快,故表 1 具有时效性。

表 1 不同成像设备的参数及应用
Table 1 Parameter settings of different imaging devices

成像设备 Imaging device	成像光源 Imaging light source	最高分辨率 Highest resolution	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	适合样本 Suitable sample	非拼接样品 扫描部位尺寸 Sample size
显微 CT	X 射线	0.1 μm	快速,图像清晰	图像非彩色	表面及体内组织,干燥状态	约 3 ~ 50 mm
MRI	无线电波	20 μm	快速,图像清晰	图像非彩色	体内含水组织,非干燥状态	约 10 ~ 50 mm
CLSM	激光	0.5 μm	快速,图像清晰	图像彩色	含水及骨化组织	约 0.1 ~ 5 mm
FIB/ SBFSEM	X 射线	7 nm	快速,图像清晰	图像非彩色	非表皮的任何组织,干燥状态	约 0.1 ~ 1 mm

2 三维重建与可视化

甲虫形态结构的三维可视化可以准确确定相关结构的大小、立体几何形状以及与其周围之间的空间关系等空间信息,是未来甲虫及至昆虫功能形态学研究的重要内容。根据从上述成像设备上采集到的二维图像序列集合,经计算机合成后形成三维体视图像数据,通过对其体数据的可视化处理,就可直观的显示出甲虫组织物理属性和空间关系。

目前三维可视化技术主要有两大类:一类是通过集合单元拼接拟合物体的表面,进而描述物体三维结构,称为基于表面的三维面绘制方法,又称为间接绘制方法;另一类是直接将体素投影到显示平面,称为基于体数据的体绘制方法,又称为直接绘制方法(宋余庆等,2008)。

2.1 面绘制方法(surface rendering)

面绘制方法从重建过程处理的基本元素的级别上来分,可以把这些方法分成两大类:体素级重建方法(从体素重建物体表面)和切片级重建方法(从轮廓重建物体表面)。具体的面绘制算法有多种,但各种算法的不同点仅在于所采用的近似表面的几何单元不同或几何单元尺度的选择不同。最常用的面绘制算法有连接轮廓线法(conlours connection)、立方体法(cuberille)、移动立方体法(marching cubes algorithm, MC)、分解立方体法(dividing cubes algorithm, DC)。

2.2 体绘制方法(volume rendering)

体绘制是指不构造中间几何图素,直接将物体空间中的数据采样点的光亮度值变换到平面,即计算各数据采样点的光亮度值对屏幕上像素点的贡献,积累合成得到最后的图像,是实现三维数据可视化最直接、最理想的技术手段。体绘制方法根据不同的分类标准可以有不同的分类方法,如成像空间序(image order)法、物体空间序(object order)法、混合序(hybrid order)法、空间域方法及变换域方法等。体绘制的优点在于无需构造中间曲面,体素中的许多细节信息得以保留,提高了保真性,同时体绘制可以显示实体的任意剖面,保留了物体内部特征。但由于计算量的增加,重建时间会延长。

2.3 混合绘制方法

即面绘制及体绘制的综合运用。主要包括表面透明体绘制法和体数据几何单元投影法。

上述各种重建方法大都是针对不同的研究对象而提出的特定算法,因而各有利弊,各有特定的使用范围。

2.4 形态学研究常用的三维重建软件

2.4.1 Amira、Maya 及 Imaris 软件系统 这三项软件系统功能相似,均属于非常专业的三维重建及三维可视化的模块化软件,可以导入显微CT、MRI、CLSM、连续组织切片等二维连续序列数据,在上述数据源基础上,重建相关结构。其核心功能包括:直接体绘制、图像分割、表面重构、表面简化和生成四面体网格等;支持多种数据格式,如:BMP、TIFF、DICOM、PPM、JEPG、VIML 和二进制的图片数据等。

2.4.2 VG Studio MAX 该软件是一款用于分析显微CT、MRI 和其他 3D 成像设备数据的软件系统。与 Amira 等软件不同的是,可对大型数据进行双向处理,通过修改透明度和明暗度的调节,直接生成需要的 3D 数据,并具有检测、模型输出等功能。支持多组体数据合并进行三维绘制;支持从正交面或者任意平面角度上进行二维图像呈递。

3 三维重建在鞘翅目功能形态学研究中的应用及展望

基于各种数据源的三维重建方法在甲虫形态学中已开展了部分工作,其内容主要涉及高级阶元系统发育探讨(Hörnshimeyer *et al.*, 2002; Beutel *et al.*, 2008; Friedrich *et al.*, 2009),以及甲虫部分形态结构的三维重建及功能的初步探讨(Hörschemeyer, 2009; Polilov and Beutel, 2009, 2010; Li *et al.*, 2011; Hünefeld *et al.*, 2011; López-Guillén *et al.*, 2011; Di Giulio *et al.*, 2012; Ge *et al.*, 2012; Jalszynski *et al.*, 2012),目前仍缺乏大规模的三维重建及后期分析工作,因此也是以后的工作重点和重要发展方向。下面为作者对三维重建在甲虫形态学中的具体前景所做的初步概述:

3.1 三维重建图像的优化及改进

主要包括样品前处理体系的建立,样本可涉及化石、琥珀、现生昆虫(包括成虫、幼虫、蛹及模

式标本等)。同时,也会兼顾三维数字图像获取体系的建立及优化,主要包括图像分辨率的提高、图像分割和三维重建精度及速度的提高等。

3.2 高级阶元系统发育探讨

在以往基于形态学数据研究结果的基础上,加入大规模的三维形态数据,从而为系统树的构建做出贡献。

3.3 部分组织结构的三维重建及功能探讨

主要包括口器、翅基等基于三维空间结构的力学分析;外生殖器官、消化道及神经系统等结构的三维重建及功能探讨;同时,加强交叉学科的融合,通过引入生物信息学,建立和推演甲虫形态结构的进化模型;通过引入计算生物学、立体几何学等,对甲虫重要形态结构的功能进行推演等。

参考文献 (References)

- Amos WB, White JG, Fordham M, 1987. Use of confocal imaging in the study of biological structures. *Applied Optics*, 26:3239 – 3243.
- Balfour-Browne F, 1961. The metendosternite in the Coleoptera. *Journal of the Linnean Society London, Zoology*, 44:337 – 354.
- Bernhardt P, 2000. Convergent evolution and adaptive radiation of beetle-pollinated angiosperms. *Plant Systematics and Evolution*, 222:293 – 320.
- Beutel RG, Gorb SN, 2001. Ultrastructure of attachment specializations of hexapods, (Arthropoda): evolutionary patterns inferred from a revised ordinal phylogeny. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 39: 177 – 207.
- Beutel RG, Leschen RAB, 2005. Phylogenetic analysis of Staphyliniformia (Coleoptera) based on characters of larvae and adults. *Systematic Entomology*, 30:510 – 548.
- Beutel RG, Ge SQ, Hörnschemeyer T, 2008. On the head morphology of *Tetraphalerus*, the phylogeny of Archostemata and the basal branching events in Coleoptera. *Cladistics*, 24:270 – 298.
- Crowson RA, 1938. The metendo-sternite in Coleoptera: a comparative study. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 87:397 – 416.
- Crowson RA, 1945. Further studies on the metendosternite in Coleoptera. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 94:273 – 310.
- Deans AR, Miko I, Wipfler B, Friedrich F, 2012. Evolutionary phenomics and the emerging enlightenment of arthropod systematics. *Invertebrate Systematics*, 26:323 – 330.
- Di Giulio A, Maurizi E, Stacconi MVR, Romani R, 2012. Functional structure of antennal sensilla in the myrmecophilous beetle *Paussus favieri* (Coleoptera, Carabidae, Paussini). *Micron*, 43:705 – 719.
- Eberhard WG, 1979. The function of horns in *Podischnus agenor* (Dynastinae) and other beetles//Blum MS, Blum NA (eds.). *Sexual Selection and Reproductive Competition in Insects*. New York: Academic Press. 231 – 258.
- Eberhard WG, 1982. Beetle horn dimorphism - making the best of a bad lot. *American Naturalist*, 119:420 – 426.
- Ernst KD, 1969. Fine structure of olfactory sensilla on antenna of carrion beetle (*Necrophorus*). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 94:72 – 102.
- Friedrich F, Farrell BD, Beutel RG, 2009. The thoracic morphology of Archostemata and the relationships of the extant suborders of Coleoptera (Hexapoda). *Cladistics*, 25: 1 – 37.
- Ge SQ, Wipfler B, Pohl H, Hua Y, Ślipiński A, Yang XK, Beutel RG, 2012. The first complete 3D reconstruction of a spanish fly primary larva (*Lytta vesicatoria*, Meloidae, Coleoptera). *PLoS ONE*, 7(12):e52511.
- Gorb S, Varenberg M, Peressadko A, Tuma J, 2007. Biomimetic mushroom-shaped fibrillar adhesive microstructure. *Journal of the Royal Society Interface*, 4: 271 – 275.
- Hünefeld F, Marvaldi AE, Müller B, Lawrence JF, Beutel RG, 2011. The male postabdomen of the “ancestral” archostematan beetle *Tetraphalerus bruchi* Heller, 1913 (Ommatidae) and its phylogenetic significance. *Arthropod Structure & Development*, 40:146 – 158.
- Haddad D, Schaupp F, Brandt R, Manz G, Menzel R, Haase A, 2004. NMR imaging of the honeybee brain. *Journal of Insect Science (Tucson)*, 4:1 – 7.
- Hörnschemeyer T, 2009. The species-level phylogeny of archostematan beetles-where do *Micromalthus debilis* and *Crowsoniella relictus* belong? *Systematic Entomology*, 34:533 – 558.
- Hörnshimyer T, Beutel RG, Pasop F, 2002. Head structures of *Priacma serrata* Leconte (Coleoptera, Archostemata) inferred from X-ray tomography. *Journal of Morphology*, 252:298 – 314.
- Jaloszynski P, Hünefeld F, Beutel RG, 2012. The evolution of “deformed” brains in ant-like stone beetles (Scydmaeninae, Staphylinidae). *Arthropod Structure &*

- Development*, 41:17 – 28.
- Klaus AV, Schawaroch V, 2006. Novel methodology utilizing confocal laser scanning microscopy for systematic analysis in arthropods (Insecta). *Integrative and Comparative Biology*, 46:207 – 214.
- Kukalová-Peck J, Lawrence JF, 1993. Evolution of the hind wing in Coleoptera. *Canadian Entomologist*, 125:181 – 258.
- Kukalová-Peck J, Lawrence JF, 2004. Relationships among coleopteran suborders and major endoneopteran lineages: Evidence from hind wing characters. *European Journal of Entomology*, 101:95 – 144.
- Li DE, Zhang K, Zhu PP, Wu ZY, Zhou HZ, 2011. 3D configuration of mandibles and controlling muscles in rove beetles based on micro-CT technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401:817 – 825.
- López-Guillén G, Carrasco JV, Cruz-López L, Barrera JF, Malo EA, Rojas JC, 2011. Morphology and structural changes in flight muscles of *Hypothemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) females. *Environmental Entomology*, 40:441 – 448.
- Larsén O, 1966. On the morphology and function of the locomotor organs of the Gyrinidae and other Coleoptera. *Opuscula Entomologica*, 30(Suppl):1 – 242.
- Leal WS, 1996. Chemical communication in scarab beetles: Reciprocal behavioral agonist-antagonist activities of chiral pheromones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:12112 – 12115.
- Leal WS, 1998. Chemical ecology of phytophagous scarab beetles. *Annual Review of Entomology*, 43:39 – 61.
- Meme S, Joudiou N, Szeremeta F, Mispelter J, Louat F, Decoville M, Locker D, Beloeil JC, 2013. In vivo magnetic resonance microscopy of *Drosophila* at 9.4 T. *Magnetic Resonance Imaging*, 31:109 – 119.
- Metscher BD, 2009. MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiology*, 9:11.
- Michels J, 2007. Confocal laser scanning microscopy: using cuticular autofluorescence for high resolution morphological imaging in small crustaceans. *Journal of Microscopy*, 227:1 – 7.
- Michels J, Buentzow M, 2010. Assessment of Congo red as a fluorescence marker for the exoskeleton of small crustaceans and the cuticle of polychaetes. *Journal of Microscopy*, 238:95 – 101.
- Michels J, Gorb SN, 2012. Detailed three-dimensional visualization of resilin in the exoskeleton of arthropods using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Microscopy*, 245:1 – 16.
- Neff D, Frazier SF, Quimby L, Wang RT, Zill S, 2000. Identification of resilin in the leg of cockroach, *Periplaneta americana*: confirmation by a simple method using pH dependence of UV fluorescence. *Arthropod Structure & Development*, 29:75 – 83.
- Pearson DL, Mury EJ, 1979. Character divergence and convergence among tiger beetles (Coleoptera, Cicindelidae). *Ecology*, 60:557 – 566.
- Pohl H, Wipfler B, Grimaldi D, Beckmann F, Beutel RG, 2010. Reconstructing the anatomy of the 42-million-year-old fossil aEuro *Mengea tertiaria* (Insecta, Strepsiptera). *Naturwissenschaften*, 97:855 – 859.
- Polilov AA, Beutel RG, 2009. Miniaturisation effects in larvae and adults of *Mikado* sp. (Coleoptera: Ptiliidae), one of the smallest free-living insects. *Arthropod Structure & Development*, 38:247 – 270.
- Polilov AA, Beutel RG, 2010. Developmental stages of the hooded beetle *Sericoderus lateralis* (Coleoptera: Corylophidae) with comments on the phylogenetic position and effects of miniaturization. *Arthropod Structure & Development*, 39:52 – 69.
- Pretorius E, Scholtz CH, 2001. Geometric morphometrics and the analysis of higher taxa: a case study based on the metendosternite of the Scarabaeoidea (Coleoptera). *Biological Journal of the Linnean Society*, 74:35 – 50.
- Rodriguez V, 1994. Function of the spermathecal muscle in *Chelympha alternans* Boheman (Coleoptera, Chrysomelidae, Cassidinae). *Physiological Entomology*, 19:198 – 202.
- Schawaroch V, Li SC, 2007. Testing mounting media to eliminate background noise in Confocal microscope 3-D images of insect genitalia. *Scanning*, 29:177 – 184.
- Smith DS, 1964. Structure + development of flightless coleoptera - light + electron microscopic study of wings thoracic exoskeleton + rudimentary flight musculature. *Journal of Morphology*, 114:107 – 183.
- Stueben M, Linsenmair KE, 2009. Advances in insect preparation: bleaching, clearing and relaxing ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*, 12:15 – 21.
- Tafforeau P, Boistel R, Boller E, Bravin A, Brunet M, Chaimanee Y, Cloetens P, Feist M, Hoszowska J, Jaeger JJ, Kay RF, Lazzari V, Marivaux L, Nel A, Nemoz C,

- Thibault X, Vignaud P, Zabler S, 2006. Applications of X-ray synchrotron microtomography for non-destructive 3D studies of paleontological specimens. *Applied Physics A-Materials Science & Processing*, 83;195 – 202.
- Zankel A, Kraus B, Poelt P, Schaffer M, Ingolic E, 2009. Ultramicrotomy in the ESEM, a versatile method for materials and life sciences. *Journal of Microscopy-Oxford*, 233;140 – 148.
- Zucker RM, 2006. Whole insect and mammalian embryo imaging with confocal microscopy: Morphology and apoptosis. *Cytometry Part A*, 69;1143 – 1152.
- 宋玉庆, 陈建美, 朱峰, 董建成. 2008. 数字医学图像. 北京:清华大学出版社. 233.