



顯微斷層掃描 (Micro CT) 在昆蟲學研究的應用

廖浩全、蔡漢祥、陳妤欣、吳佳倩、陳慕璇、李俊鋒*

國立中興大學昆蟲學系

* 通訊作者 email: houfeng@nchu.edu.tw

收件日期：2023 年 8 月 12 日 接受日期：2023 年 10 月 4 日 線上刊登日期：2023 年 11 月 10 日

摘 要

顯微斷層掃描是一項針對小型動物研究的造影技術。利用 X 光的穿透性及三維影像的構築，相比過去的解剖切片，非侵入性的手法觀察生物體內部的構造可以減少目標的變形。過去的機型主要應用於針對小型活體動物的醫學研究，而近年來在影像技術的進步下，影像的解析度已提升至奈米 (nanometer, nm) 等級，更有利於將此技術使用在昆蟲學的研究上。台灣的研究單位所配置的機型，解析度為 0.1 至 9 μm ，使用者可以依照自身需求選擇。但初期的樣本製備，影像測試及修正，以及後期的影像處理上需要許多繁雜的技術。為了讓更多的使用者在使用顯微斷層掃描之前，能夠理解並活用此項技術於更多的研究上，本文章以現有的成果，以及目前該技術的過往研究整理以供參考。顯微斷層掃描藉由 X 光的非侵入性觀察可以讓我們更加了解生物或非生物內部的構造，但它在樣本的選擇及製備上卻有許多限制。樣本密度差異過大以及厚度不平均都會造成影像品質的下降，現今較長的造影時間也難以完成活體觀察。肌肉等軟組織還需要輔以碘液 (iodine solution) 或是磷鎢酸 (phosphotungstic acid) 作為顯影劑長時間浸染，並且依照樣本的不同，所需的顯影劑濃度及染色時間也需要個別調整。儘管如此，非破壞性多角度切片及三維結構提供了昆蟲學的研究上許多新的發展。透過觀察昆蟲外部形態的特徵和內部組織的變化，我們可以推斷棲地環境和食性，進一步深入研究物種的分類和特徵演化。其中肌骨組織運動的模擬，對於力學研究方面可以用來製作立體模型和仿生機器。那些難以使用光學儀器觀察的化石標本，也在維持樣本完整性的同時獲得內部結構的資訊。三維影像還有助於研究者之間的信息交流，以及在收藏和展示方面提供便利性。除了昆蟲本身，這項技術也適用於觀察非生物體，包括白蟻巢腔內部的挖掘情況和周圍棲息地的變化，進一步了解昆蟲的行為和防治研究。因此近年來，顯微斷層掃描已經成為防檢疫、法醫昆蟲學和考古學等領域不可或缺的技术。

關鍵詞：斷層掃描、昆蟲、形態、顯影劑、化石。

技術發展背景

昆蟲的研究與人類生活緊密相關，涵蓋農業 (Eteraf-Oskouei and Najafi, 2013)、工業

(Franceschini *et al.*, 2007) 以及疾病防治 (Gan *et al.*, 2021) 等各種應用。而這些研究需要深入檢視昆蟲的形態和內部結構，因此樣本處理和攝影成像技術的開發變得極為重要。為了獲取正確的資訊，有時

必須對樣本進行拆解，而這可能導致稀有物種、古蹟、化石或模式標本 (holotype) 等重要資料的損毀風險，引發價值觀衝突。除此之外，過去需要藉由大量的個體進行解剖、組織染色或包埋切片等處理來觀察不同處理後內部組織在一定時間內的反應。然而，個體之間的差異可能產生誤差，進而導致實驗結果正確性的疑慮。同時，包埋切片、解剖和組織染色等內部觀察手法，容易使外骨骼與軟組織塌陷、毛列斷裂或位移，甚至造成不可逆的破損 (Mensa *et al.*, 2022)。掃描式電子顯微技術 (Scanning Electron Microscope, SEM) 能夠提供微小構造的觀察，經過製備的標本外骨骼也不易塌陷。然而，內部軟組織也會因為乾燥和金屬濺鍍等處理而產生萎縮變形，複雜且交疊的結構也可能因為濺鍍不均勻而難以得到詳細的成像 (Mensa *et al.*, 2022)。在進行二維距離測量時，維持樣本的水平狀態也是一個難題。立體顯微設備可以迅速調整角度，但放大倍率僅介於 2.5 至 100 倍之間，面對小型動物的細節觀察仍有明顯不足 (Lee *et al.*, 2001, Houck, 2013)；SEM 在觀察內部結構時，則需要對樣本進行截切。進行量測分析時，也僅能針對截切的表面進行觀察，加上小型動物的內部結構在外部結構破壞後，失去原本的支撐點，可能造成結構變形，難以完整觀察到原有的形狀結構 (Ho and Hutmacher, 2006)。

隨著影像技術的提升，斷層掃描 (Computed Tomography, CT) 在醫學治療及醫材開發上提供相當大的協助 (Cleynenbreugel *et al.*, 2006, Schwass *et al.*, 2009)。隨著醫學研究的需求的提高，使用 CT 進行小型活體動物的研究也日益增加，類似的技術也在有機、無機，甚至是地球科學等學科的研究上不斷發展 (Munkholm *et al.*, 2012)。通過 X 光射線的穿透力及軟體的輔助，將投影的切面整合，即可在非侵入性處理下獲得物體內外的三維結構，相比過往的手法更能減少對目標的破壞 (Tarver *et al.*, 2006)。近年成像技術的進步，分子影像 (molecular imaging) 也逐漸導入小型動物的研究。其中，顯微斷層掃描 (Micro Computed Tomography, Micro CT) 的開發提供高於 50 μm 以上的解析度 (resolution)，有效觀察動物細胞並改善過去光學觀察當中阻光度的遮蔽問題 (Ritman, 2004, Kypke and Solodovnikov, 2020)，多角度觀察的立體模型也在未來的生物模擬及力學實驗上有重要的幫助 (Ho and Hutmacher, 2006)。除了小型動物外，顯微斷層掃描在昆蟲的分類學、行為學等研究上能夠獲得更多的資訊。傳統的解剖手法，可能造

成樣本產生無法預期的結構變形或是目標的破損 (Alba-Tercedor and Alba-Alejandre, 2017)。但透過顯微斷層掃描事先觀察腺體或腦部組織並確認位置，可以保持樣本完整性的同時得知內部結構，增加解剖時的精確性。除此之外，建構的立體模型也有助於標本的典藏，減少實體標本的運輸成本及損毀風險 (Nguyen *et al.*, 2014)。針對不同的物種肌肉群的研究，解析各個器官的功能性，或是模擬昆蟲的地面移動及飛行能力 (Brandt *et al.*, 2015)。

觀察材料及方法

顯微斷層掃描的成像是將目標物安置於載台上後，通過射線管 (X-ray tube) 打出 X 光射線穿透目標，後方的偵檢器 (detector) 接收不同衰減程度的 X 射線，完成一次造影。不同於一般醫療單位，顯微斷層掃描是由載台將目標旋轉，整合多次造影成為三維影像。依據吸收 X 射線的不同，以亨氏單位 (Hounsfield units, HU) 計算物體的放射密度 (radiodensity)。根據定義，蒸餾水的放射密度為 0 HU，而空氣為 1000 U。密度較高的組織，放射密度也越高，成像上也會越接近白色，反之則接近黑色。一般來說，人體的骨骼放射密度在 500 HU 以上，肌肉則約為 35 至 55 HU 左右 (Herbert, 2000, Patrick *et al.*, 2017)。在昆蟲研究當中，構成外骨骼的幾丁質遠低於金屬或人體骨骼的密度，因此以較低的能量 (約 40 kV) 就可以清楚拍攝外部構造。但是製備樣本時還需考慮觀察物體的大小及密度的影響。當可視範圍內密度差異過大時，使用較低的能量會使密度較高的部位容易發生射束硬化效應 (beam hardening effect)，導致周遭成像模糊 (Van de Casteele *et al.*, 2004, Jung *et al.*, 2005)。相反地，較高的能量雖然會降低射束硬化效應，但密度較低的部分會難以成像。

顯微斷層掃描在對於內部軟組織的觀察上，通常需要使用顯影劑 (radiocontrast agent) 來加強成像的對比度。過去常使用四氧化銻 (osmium tetroxide, OsO₄) 已知對人體的毒性較強，因此目前較少使用。近年來常見的方式則是長時間浸泡不同濃度的盧戈氏碘液 (Lugol's iodine)、乙酸鈾鹽 (uranyl acetate)，或是磷鎢酸 (phosphotungstic acid, PTA)，使內部軟組織得以成像 (Pauwels *et al.*, 2013, Smith *et al.*, 2016, Khalife and Peeters, 2020)。並且在觀察密度較低的內部臟器時，依照顯影劑的不同，可能需要花費數周以上的時間才足以

表一 國內外常見 Micro CT 機型與其他廠牌的解析度比較

Table 1. Micro-computed tomography models currently in use in Taiwan and other countries

Brand	Model	Spatial resolution (minimal voxel size, μm)
Bruker	Skyscan 1076	9
	Skyscan 1174	6
	Skyscan1176	9
	Skyscan 1276	2.8
	Skyscan 2211	0.1
	Skyscan 1272	0.35
Delta	DELab μCT -100X	1
Rigaku	CT Lab HX100 / 130	1.3
ST Instruments	NeoScan N80	2
Waygate	Phoenix Nanotom 180	0.5
	Phoenix vtomex m300	2
ZEISS	Xradia 600-series Versa	0.04

觀察。長時間的染色會導致樣本過度染色 (overstain) 導致軟組織之間對比降低，產生收縮變形 (Li *et al.*, 2015, Callahan *et al.*, 2021)。另外材料組成的不同也會影響所需染色的時間及顯影劑的濃度 (Heimel *et al.*, 2019)。因此在處理上建議以低濃度顯影劑來調整染色時間，避免樣本過染。觀察時可以選擇浸液標本連同離心管放入機器內掃描，或是經由乾燥處理，利用二氧化碳的超臨界乾燥或六甲基二矽氮烷 (hexamethyldisilazane, HDMS) 等手法去除標本內的酒精，也能夠進一步的增加成像的清晰度 (Faulwetter *et al.*, 2013)。掃描拍攝的時間根據物件的大小、解析度及影像的清晰度有所不同，最長可達一天以上 (Wipfler *et al.*, 2016a)，時間及器材的維護成本都遠高於傳統的光學觀察。長時間的攝影下，樣本可能因為自然或人為產生的振動導致偏移，在影像上出現假影 (artifacts)。在目前的條件下，對於活體昆蟲的觀察難度也相對提高。根據 Poinapen *et al.* (2017) 使用二氧化碳氣體誘導可以在不影響生理的狀態下重複固定活體，但對於不同物種的適用性還有待確認。

DICOM (digital imaging and communications in medicine) 是由斷層掃描所取得的影像經過合成後，作為後續分析處理的通用檔案規格。一般來說，Avizo (<http://www.avizo3d.com/>) 是最多研究人員所使用的圖像處理軟體，提供多方面的分析、測定及檔案的後製及模擬，但操作較為困難，使用者需要花費大量時間熟悉各式指令；Dragonfly (<https://www.theobjects.com/>) 儘管工具的數量不比前者，但依舊保有測量長度、體積大小、比例計算及物體標定等常用的分析功能，使用者介面在使用上也相對容易理解。但不論哪一種程式，都需要較高等級的電

腦配置才能支援大量立體像素 (voxel) 的運算。一般使用者在瀏覽上，則可以選擇 MicroDicom DICOM Viewer (<https://www.microdicom.com/>) 或是 RadiAnt DICOM Viewer (<https://www.radiantviewer.com/ja/>) 兩種軟體確認。選用若是要將資料用於工程建模等領域，只需將資料轉換成通用的 CAD 文件 (例如: stereolithography, STL)，即可進行進一步的應用研究。

顯微斷層掃描的應用面向

顯微斷層掃描在昆蟲學上常被運用於成像更為精準及全面的解剖特徵，以利內部或細微構造的觀察及測量。依照量測目標大小，主要分為桌上型和大型落地的機型，所提供的有效視野 (field of view, FOV) 也有相當大的差異，但皆在昆蟲學研究的範圍之內。數款常見的機型所支援的最小解析度整理於表一，最新的設備甚至達到奈米等級。儘管越高的解析度所需的掃描時間也相對需要更長，但比起過去更加精準地取得外部形態或是內部組織的資訊 (Van de Castele *et al.*, 2004)。現今使用此技術觀察及測量的方向整理於表二當中，並區分為下列幾種項目：

難以觀察的外部構造

經由顯微斷層掃所得到的三維影像，可以有效地解決目前分類學在檢視標本上的問題外，也提高保存紀錄的方便性。一直以來，新物種的發現及既存物種的確認，皆需要藉由模式標本 (holotype) 詳細比對觀察。以往的標本描述大多以文字或手繪圖為主，近年攝影技術的提升，疊焦 (focus stacking) 處

表二 顯微斷層掃描 (Micro CT) 針對不同昆蟲標本的部位進行掃描研究

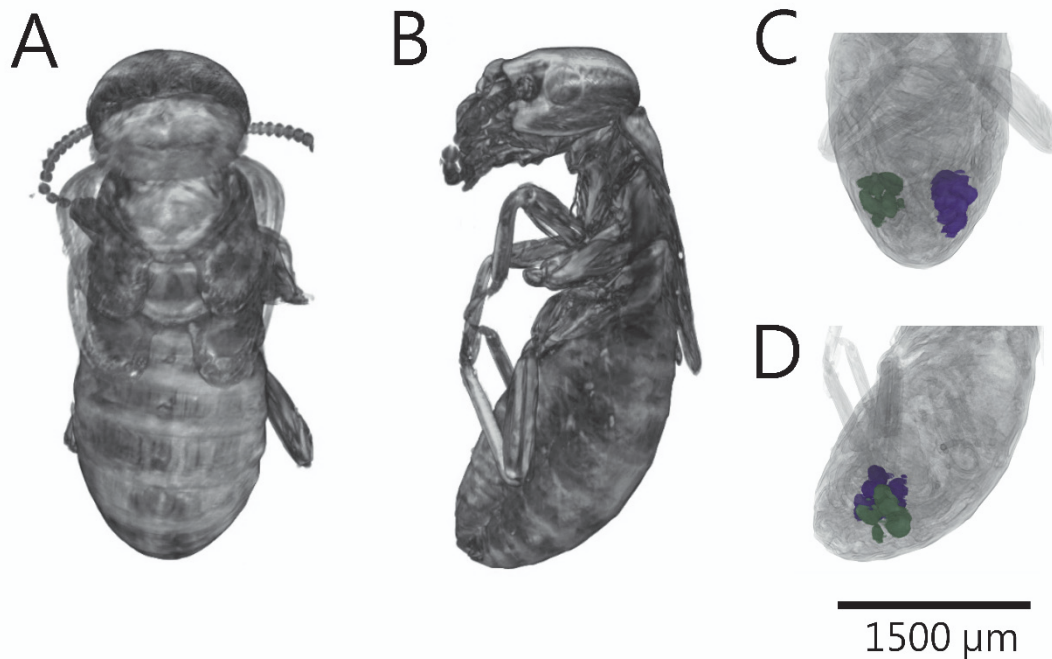
Table 2. Studies involving application of micro-computed tomography for examining various sections of insect specimens

Family	Species	Target	Resolution (μm)	Reference
Blattodea				
Blattellidae	<i>Periplaneta americana</i>	Head and mandible	3.07	Weihmann <i>et al.</i> , 2015a, b, Wipfler <i>et al.</i> , 2016b
Termitidae	<i>Duplidentitermes furcatidens</i>	Head	1.5-3.9	Berankova <i>et al.</i> , 2022
	<i>Indotermes</i> sp.	Head	1.5-3.9	Berankova <i>et al.</i> , 2022
	<i>Jugositermes tuberculatus</i>	Head	1.5-3.9	Berankova <i>et al.</i> , 2022
	<i>Machadotermes rigidus</i>	Head	1.5-3.9	Berankova <i>et al.</i> , 2022
Coleoptera				
Lucanidae	<i>Cyclommatus metallifer</i>	Mandible	0.96-4.1	Goyens <i>et al.</i> , 2015
Ptinidae	<i>Xestobium rufovillosum</i>	Esophagus	137	Brock <i>et al.</i> , 2021
	<i>Nicobium castaneum</i>	Esophagus	2	Parracha <i>et al.</i> , 2021
Scarabaeidae	<i>Pachnoda marginata</i>	Leg	1	Gorb <i>et al.</i> , 2019
	<i>Termitotrox icarus</i>	Metasoma (egg)	2.97	Kakizoe <i>et al.</i> , 2020
	<i>Trypoxylus dichotomus</i>	Primordia, mesosoma, leg and wing	79; 9	Niiyama, 2016, Adachi <i>et al.</i> , 2020
Diptera				
Drosophilidae	<i>Drosophila melanogaster</i>	Larve, pupa and imago	0.7-11.54	Schoborg <i>et al.</i> , 2019
Tephritidae	<i>Dirioxa pornia</i>	Gut	3.4	Bhandari <i>et al.</i> , 2019
Hemiptera				
Pentatomidae	<i>Halyomorpha halys</i>	Parasitized egg	5.7	Konopka <i>et al.</i> , 2020
Hymenoptera				
Apoidea	<i>Apis mellifera</i>	Mandible and metasoma	9, 2.564	Wang <i>et al.</i> , 2013, Smith <i>et al.</i> , 2021
	<i>Bombus terrestris</i>	Head (oceli, brain)	0.81, 3.5-3.9	Wilby <i>et al.</i> , 2019, Rother <i>et al.</i> , 2021
Formicidae	<i>Melissotarsus</i> sp.	Mandible	0.882-2.662	Khalif <i>et al.</i> , 2018
	<i>Strumigenys</i> sp.	Mandible		Booher <i>et al.</i> , 2021
	<i>Temnothorax curvispinosus</i>	Acorns (ant colony)	6.08-19.3	Varoudis <i>et al.</i> , 2018
Scelionidae	<i>Trissolcus euschisti</i>	Egg	5.7	Konopka <i>et al.</i> , 2020
Lepidoptera				
Gracillariidae	<i>Caloptilia stigmatella</i>	Wing	1.96	Robinson <i>et al.</i> , 2018
Saturniidae	<i>Eacles imperialis</i>	Larve (muscle, gland)		Sourakov <i>et al.</i> , 2021

理所提供的影像在物種的特徵紀錄上更為清楚。但平面的圖像所能呈現的角度仍有所限制，重要的形質也可能因體節之間互相遮擋而無法完整觀察。文章內的描述依照作者的判斷時而被省略或是不明確，使後續的研究需要多次借取模式標本重新確認。除了造成時間成本上的消耗，也增加模式標本在運送中損壞的可能性。近年利用三維影像提高觀察樣本的方便性外，也得以辨認過去微小的標本上難以確認的形質，完成物種的分類研究 (Kundrata *et al.*, 2020, Kypke and Solodovnikov, 2020, Arriaga-Varela *et al.*, 2021, 圖一)，並完整記錄包含昆蟲外骨骼及內部骨片、生殖器等細部的構造 (Wipfler *et al.*, 2016a)，甚至是在不破壞蟲體的前提下紀錄昆蟲體內，因寄生或是自行生育所產下的卵的構造及發育模式 (Kakizoe *et al.*, 2020,

Konopka *et al.*, 2020)。另外，標本以電子化的方式保存後，減少運輸時產生標本及時間的損失的同時，也提升學術單位在典藏上的豐富度及便利度 (Moser *et al.*, 2023)。但因為斷層掃描所得到的資料皆為灰質，體色紀錄方面依然無法取代傳統乾燥和浸液標本的收藏。

由三維影像的資料轉換的立體模型也應用於許多方面。以金龜子科(Scarabaeidae)的胸部、前後翅和前足的肌骨系統作為力學模擬，製作獨角仙(*Trypoxylus dichotomus*)的仿生型機器人以重現其飛行機制的模板 (Niiyama, 2016)；在足部肌肉的力傳遞機制上 (force transmission mechanism)，也在觀察黃邊金龜 (*Pachnoda marginata*) 的跗節上縮肌的伸縮造成掣爪片 (unguitractor plate) 的位置移動 (Gorb *et al.*, 2019) 上可以得知肌肉間



圖一 黃原鼻白蟻的雄性補充生殖型。樣本經過 PTA 染色兩個月。使用機型為 Delta DELab μ CT-100X，拍攝的解析度為 $3\ \mu\text{m}$ 。A、背面觀；B、側面觀；C、生殖腺背面觀；D、生殖腺側面觀。

Fig. 1. Male neotenic of *Prorhinotermes flavus*. The samples were stained using phosphotungstic acid for 2 months. The three-dimensional image was captured using the Delta DELab μ CT-100X at a $3\text{-}\mu\text{m}$ resolution. A, dorsal view; B, lateral view; C, testis in dorsal view; D, testis in lateral view.

的關聯性。近年來更是配合積層製造 (additive manufacturing) 等技術製作出仿實際生物的模型，增加教學及學術推廣上的材料。琥珀所保留下的化石，對於現今物種的演化上是極為有利的證據。其中所包覆的昆蟲即使經過數萬年也依舊完整地將外部形態保留下來。但內容物本身卻也容易被其它雜質、氣泡層及琥珀本身的不透明度所遮蔽，難以利用傳統的光學儀器觀察 (Dierick *et al.*, 2007, Kypke and Solodovnikov, 2020)。因此目前許多研究團隊透過顯微斷層掃描成像，發現許多各種未知的節肢動物 (Henderickx *et al.*, 2006, Márton *et al.*, 2022)。直至今日，波羅的海於始新世出土的許多琥珀化石與被鑑定出來的昆蟲已整理於表三當中。當中包含許多不同的科別，以及許多新種的發現，有助於周圍地區的生物地理的研究發展。

內部構造的探索

顯微斷層掃描的三維影像不同於單一角度的解剖切片，數個角度的觀察有助於了解組織之間的連動關係。以分類學為基礎，對於生物的各部位的功能性、發生機制及物理學的研究發展上有相當大的突破性。透過完整的頭部及單眼結構成像，推測不同單

眼的視覺範圍及頭部毛列對視界的影響 (Wilby *et al.*, 2019)，配合免疫標示法 (immunolabeling)，降低解剖的失誤並建立完整的昆蟲腦圖譜研究 (Rother *et al.*, 2021)。此外不同齡期的昆蟲經過斷層掃描的結果，配合特定基因的開關，可以了解昆蟲各部位的發育圖譜以及發生模式 (Schoborg *et al.*, 2019, Adachi *et al.*, 2020)。

大顎作為昆蟲分類研究的重要形質，豐富的多樣性和功能性上的差異可以提供特徵演化上的證據，也因此許多研究針對大顎與頭部內各種相連的肌肉群。在家蟻亞科 (Myrmicina) 當中，*Melissotarsus* 屬有著明顯碩大的頭部及與控制大顎開合的發達肌肉。推測該屬長期棲息於樹皮下，需要強壯的大顎肌骨系統使它們擁有挖掘通道的能力 (Khalif *et al.*, 2018)。另外，瘤顎家蟻屬 (*Strumigenys*) 所擁有的細長大顎，幫助於它們捕食和逃離敵人。根據外型及內部肌肉群的構造，配合高速攝影比較其中 470 種的大顎形態及閉合速度，以此推論本屬在大顎的特徵演化上至少經過七次以上 (Booher *et al.*, 2021)。其他方面，針對美他利佛細身翅鍬形蟲 (*Cyclommatus metallifer*) 位於大

表三 顯微斷層掃描 (Micro CT) 針對波羅的海地區所發現的琥珀化石標本進行掃描研究，以及所發現的昆蟲標本

Table 3. Studies focused on examining Baltic Sea region amber insect fossils through micro-computed tomography

Family	Speceis	Resolution (μm)	Reference
Blattodea			
Blattellidae	<i>Periplaneta americana</i>	3.39-33.6	Hornig <i>et al.</i> , 2016
Coleoptera			
Carabidae	<i>Balticeler kerneggeri</i>	2.4-4.81	Schmidt <i>et al.</i> , 2021
Chelonariidae	<i>Chelonarium andabata</i>	7	Alekseev and Bukejs, 2021
	<i>Chelonarium dingansich</i>	7	Alekseev and Bukejs, 2021
Elateridae	<i>Baltelater bipectinatus</i>	2-3.49	Kundrata <i>et al.</i> , 2022
Hydrophilidae	<i>Anacaena morla</i>	2.2-9.0	Arriaga-Varela <i>et al.</i> , 2019
	<i>Crenitis profechuyi</i>	2.2-9.0	Arriaga-Varela <i>et al.</i> , 2019
Diptera			
Pipunculidae	<i>Metanephrocerus groehni</i>	8	Kehlmaier <i>et al.</i> , 2014
	<i>Metanephrocerus hoffeinsorum</i>	8	Kehlmaier <i>et al.</i> , 2014
Ephemeroptera			
Leptophlebiidae	<i>Calliarcys antiquus</i>	4.05	Godunko <i>et al.</i> , 2022

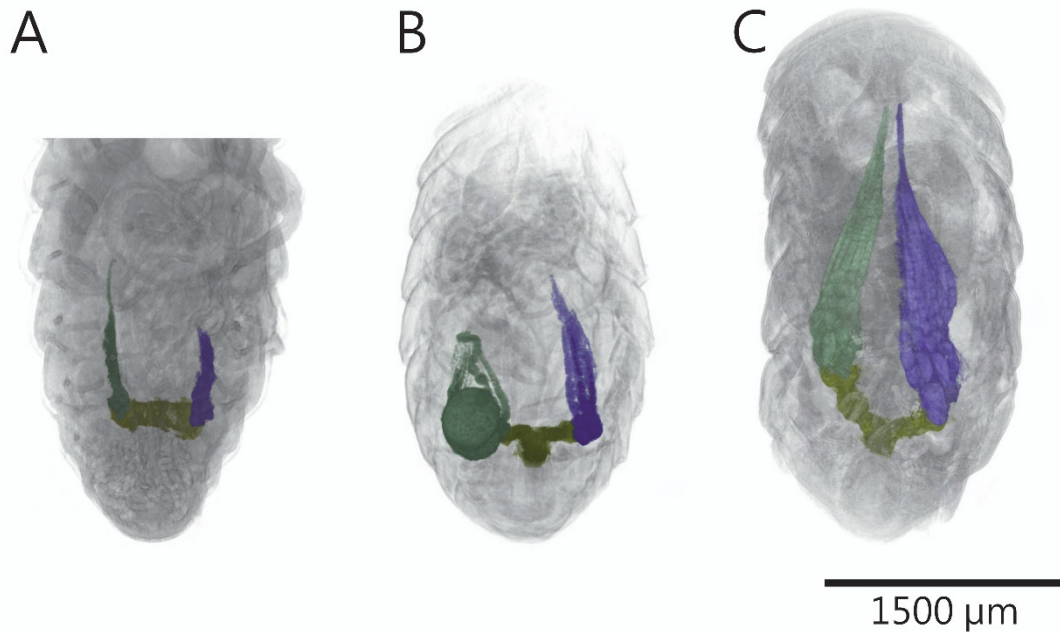
顎上的壓力感受器 (Goyens *et al.*, 2015) 及美洲蜚蠊 (*Periplaneta americana*) 的大顎及頭部肌肉 (Weihmann *et al.*, 2015a, b), 研究咀嚼器官的功能及牽引機制, 並進一步的評估該物種主要的食性。

肌肉組織外, 大腦、腺體、神經等體內構造及分布, 透過斷層掃描也有許多新的發現。白蟻作為社會性昆蟲, 階級之間的分工十分複雜。先前研究指出, 擁有生殖能力的白蟻階級 (ergatoid, nymphoid, alate) 相比其他非生殖階級 (soilder, worker) 大腦容量有明顯的增加 (Ishibashi *et al.*, 2023)。其中有翅型白蟻 (alate) 為了適應巢外的活動, 視葉比起其他兩種生殖型白蟻更加發達, 但蟻王 (king) 在巢群建立後, 為了降低能量消耗, 視葉在第二年開始就有明顯的退化 (Niven and Laughlin 2008, Ishibashi *et al.*, 2023)。另一方面, 腺體的發育也受到環境與行為的影響而有所改變。額腺 (frontal gland) 或唇腺 (labial glands) 一般存在白蟻兵蟻頭部當中, 經由窗點 (fontanelle) 分泌防禦性物質。但透過觀察分布於西非的 *Machadotermes* 屬兵蟻頭部內側, 這一類腺體已經退化或消失, 取而代之的是極為特殊, 不受神經元控制的 intramandibular gland, 推測其分泌物可以驅趕螞蟻等捕食者以保護工蟻及兵蟻 (Quenedey, 1984, Beránková *et al.*, 2022)。在生殖腺發育的研究上, 原鼻白蟻屬 (*Prorhinotermes*) 的有翅生殖蟻及補充生殖蟻 (neotenic) 皆有生殖能力, 但目前依舊缺少有翅生殖蟻以外判斷性別的形質證據。因此藉由測量雌雄蟻各階級的性腺大小, 確認生殖腺發育時期外, 也有

助於有翅生殖蟻以外階級的性別判斷 (圖一, 圖二)。而在結合 SEM 以及核磁共振 (Magnetic Resonance Imaging, MRI) 的觀察, 甚至可以了解昆蟲體內各種金屬累積殘留的位置及元素種類, 分析進食來源是否受到汙染進而影響其行為 (Wang *et al.*, 2013)。

非生物體的研究

結構分析不僅是針對生物體本身, 同樣也影響了周遭的環境因子及實驗材料的研究發展。了解昆蟲巢腔內的組成有助於分析昆蟲的行為模式, 但複雜且立體的內部通道難以藉由切片觀察。藉由顯微斷層掃描的三維成像確認沉積物中殘留下的白蟻巢體, 完整地觀察到內部呈現海綿狀的微型結構, 或是由植物組織所組成的菌圃 (Villagran *et al.*, 2019, 圖三), 以及山蟻亞科中的 *Lasius flavus* 會因為沉積物的存在而改變挖掘通道的方向 (Minter *et al.*, 2012)。咖啡果小蠹 (*Hypothenemus hampei*) 的生命週期幾乎都在果實內生長, 對於高經濟作物的咖啡產量造成莫大的損害 (Oliveira *et al.*, 2013); 觀察受害的果實內部, 了解幼蟲的發育成長及食痕, 有助於未來在農業上的害蟲防治研究 (Alba-Tercedor *et al.*, 2018)。同樣因昆蟲活動而產生的食道研究, 自 1765 年開始服役的皇家海軍勝利號戰艦 (HMS Victory), 目前作為古蹟保存在英國皇家海軍博物館館藏, 其中船艙內部所使用的橡樹材受到竊蠹亞科 (Anobiinae, *Xestobium rufovillosum*) 的蛀蝕。一般光學儀器在觀測時, 由於通道中昆蟲排遺



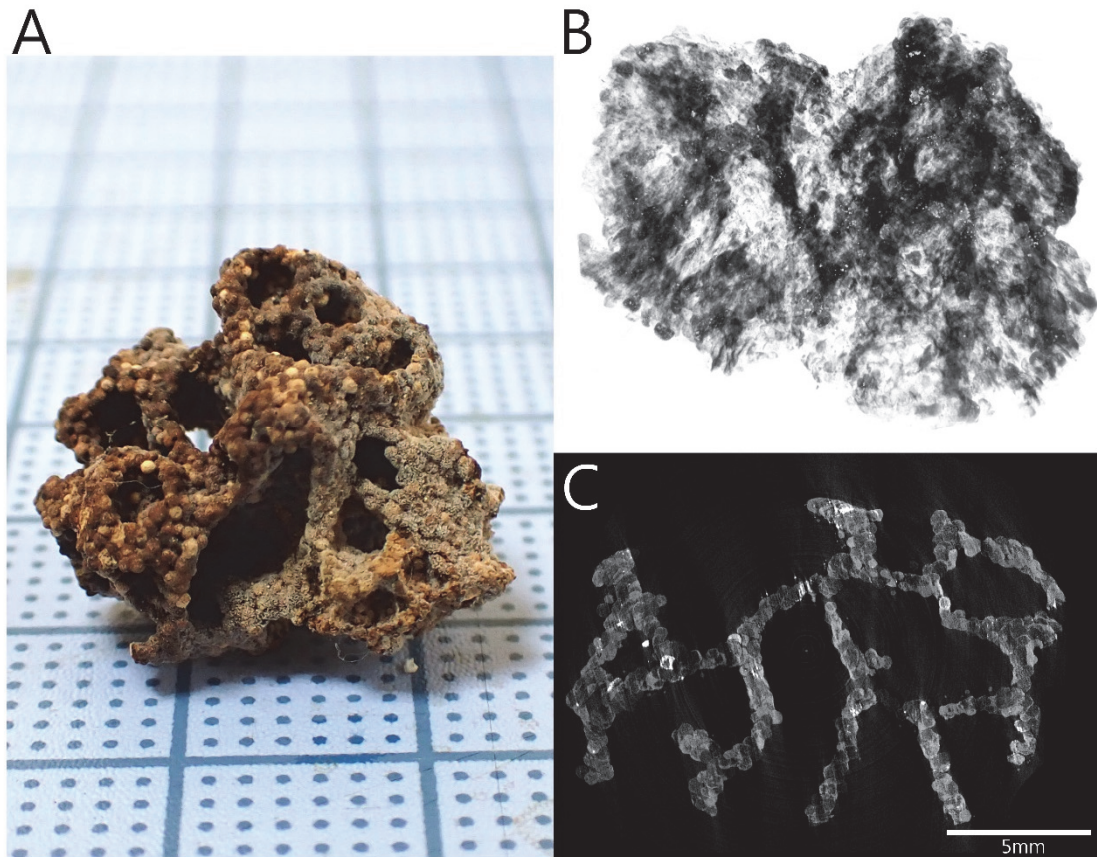
圖二 雌性黃原鼻白蟻的有翅芽若蟲及補充生殖型的卵巢發育。有翅芽若蟲經過 1% 碘液染色一周，補充生殖型經過 PTA 染色兩個月。使用機型為 Delta DELab μ CT-100X，拍攝的解析度為及 $1\ \mu\text{m}$ 。顏色標記及體積測量由 DELCTomo Ver 2.1 製作。A、有翅芽若蟲，左側卵巢及微卵管（綠色）體積約為 $8.35 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$ ，右側卵巢及微卵管（藍色）體積約為 $6.02 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$ ；B、補充生殖型，左側卵巢及微卵管（綠色）體積約為 $38.45 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$ ，右側卵巢及微卵管（藍色）體積約為 $8.7 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$ ；C、補充生殖型，左側卵巢及微卵管（綠色）體積約為 $24.98 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$ ，右側卵巢及微卵管（藍色）體積約為 $31.19 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$ 。

Fig. 2. Ovary of the female nymph and neotenic of *Prohinotermes flavus*. The nymph was stained with 1% iodine for 1 week, and the neotenic was stained with phosphotungstic acid for 2 months. The three-dimensional image was captured using the Delta DELab μ CT-100X at $1\text{-}\mu\text{m}$ resolution. Color markings and volume measurements were performed using DELCTomo Ver 2.1. A, nymph: left ovary and ovariole (green; volume = $8.35 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$), right ovary and ovariole (blue; volume = $6.02 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$), and uterine tubes (yellow); B, neotenic: left ovary and ovariole (green; volume = $38.45 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$), right ovary and ovariole (blue; volume = $8.7 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$), and uterine tubes (yellow); C, neotenic: left ovary and ovariole (green; volume = $24.98 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$), right ovary and ovariole (blue; volume = $31.19 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$), and uterine tubes (yellow).

或其他廢物的阻塞，無法觀察到完整的內部結構。但透過 X 光可以在不破壞古蹟的前提下得知船材內部損壞情形，並分析竊蠹的行為偏好 (Brock *et al.*, 2022)。相似的情況也用於建立房屋建材內部因竊蠹 (*Nicobium castaneum*) 等昆蟲蛀蝕的情況及後續的維護問題 (Parracha *et al.*, 2021)，以及檢視南方古猿 (*Australopithecus sediba*) 標本裡昆蟲在蛀蝕骨骼時所遺留的痕跡 (Backwell *et al.*, 2020)。

顯微斷層掃描在許多工具開發及研究也提供了許多新的開發方向。近年來，細胞培養支架 (cell culture scaffolds) 是一種依照細胞種類，在不同材料與結構的環境下進行體外細胞培養的技術。比起以往的平面培養，經由三維影像所製成細胞支架可以提供近似體內的結構，更貼近人體環境 (Palmroth *et al.*, 2020)。而在滲透力學的研究中，

多孔介質 (porous medium) 材料的研究有助於濾心等吸附過濾用材料的開發利用。內部孔洞及當中的細微裂隙空間，計算各種加工複合材料之間的平均粒徑和孔密度數據，並根據密度和抗壓強度來評估材料的實用性 (Zhang and Peng 2007, Lee *et al.*, 2020)。在器材開發上，逆向工程 (reverse engineering) 是一種經由分析樣品的構造，回推製造方法及原理，進而回推出設計圖的技術。尤其近年來極為精細的集成電路設計，配合顯微斷層掃描的資訊，有效地協助確認及確保線路的完成，在降低成本及時間的同時也提高了正確性 (Favata and Shahbazmohamadi, 2018)。儘管這些技術的發展並未直接針對昆蟲學的研究有所幫助，但論現今，大多的研究需要複合式的學術知識整合，全面性且非侵入性的手法得到的內部結構及三維影像。例如在法醫昆蟲學中，觀察麗蠅的內部組織推估精確的成



圖三 白蟻的菌圍結構。使用機型為 Delta DELab μ CT-100X，拍攝的解析度為 $5\ \mu\text{m}$ 。菌圍大小為 $18 \times 15 \times 12\ \text{mm}^3$ 。A、菌圍樣本；B、菌圍的三維成像；C、截面圖。
Fig. 3. Structure of fungus combs built by fungus-growing termite. The image was captured using the Delta DELab μ CT-100X at $5\text{-}\mu\text{m}$ resolution. The sample size of the combs is $18 \times 15 \times 12\ \text{mm}^3$. A, sample of combs; B, three-dimensional image of combs; C, sectional view.

長齡期，推估屍體死亡時間及變化 (Richards *et al.*, 2012, Ruttly *et al.*, 2013)，以及考古學上調查骨骼上昆蟲及其他無脊椎動物所造成的活動痕跡 (Villagran *et al.*, 2019, Backwell *et al.*, 2020)。因此對於未來的應用研究上依舊是十分有潛力的項目。

研究發展及未來展望

非侵入性的觀察是 CT 最大的優勢，因此如何觀察活體動物依舊是顯微斷層掃描最大的課題。動物微小的運動或內部器官的脈動可能會影響影像品質。目前，四次元斷層掃描 (four-dimensional computed tomography, 4D-CT) 已經能夠在一段時間內捕捉多次造影的結果，用於觀察受環境影響而產生的變化，這在醫學治療中已被應用於監測臟器跳動或血液流動的情況 (Endo and Mori, 2005, Birkhold *et al.*, 2015)。近年在機台的解析度及成像上的運算快速發展的背景下，已經可以記錄下小型

動物在活體時的運動軌跡模式 (Mokso *et al.*, 2015)。

但是，軟組織的觀察需要依靠顯影劑輔助成像依舊是斷層掃描的難題。自斷層掃描技術開發以來，成像技術及材料的更新，讓解析度提升至微米，甚至是奈米等級。這樣的結果使得研究人員可以精確地觀察更多微小的生物或非生物樣本。因為 X 光的特性，在掃描高密度的物質時，選擇加強電壓或是設置不同厚度及材質的金屬片 (filter) 可以增加射線對物質的穿透力。但是肌肉及脂肪組織等密度較低且相近，需要顯影劑的輔助才能成像。儘管市面上已有針對軟組織觀察的顯微磁共振 (Micro Magnetic Resonance Imaging, Micro MRI) 或是顯微正子 (Micro Positron Emission Tomography, Micro PET) 造影成像服務 (Luyten *et al.*, 2012, Yao *et al.*, 2018)，但兩者的解析度目前遠遠不及顯微斷層掃描，難以在昆蟲或是相同大小的生物研究上利用。

顯影劑的選擇及使用的問題也尚未完全解決。碘液的製備較為簡單且容易購買，但各種樣本所對

應的濃度及時間皆有所不同，並且有造成樣本過染的可能性，需要花費一定的時間及樣本來做測試及校正。經過碘液處理後的樣本也會改變表面的顏色，對於需要長期保存或富有價值的樣本來說並不理想。根據 Lanzetti and Ekdale (2020) 的研究，鬚鯨 (mysticeti) 的胚胎可以透過 3% 硫代硫酸鈉 (sodium thiosulfate) 溶液清除樣本所染上的碘液，但無法確認是否可以同樣作用在昆蟲標本上。另一方面，磷鎢酸的染色相對平均，成像清晰，也可以避免樣本的過染，且卻需要花費相對更長的時間才能確保浸透內部的組織。在體壁上打洞可以加速顯影劑快速流入體腔，但卻無法保持樣本的完整性。因此目前仍然需要找尋染色時間更短更方便的顯影劑。

儘管目前顯微斷層掃描還有許多需要改善的空間，尤其軟組織的分析可能還尚未達到現有的解剖或光學觀察手法的精細程度。但樣本整體的結構觀察方面比起過去的研究方法有許多無法取代的優勢，加上奈米等級的解析度與新儀器的開發，在未來依舊是值得期待的觀察手段。

誌謝

本篇研究感謝台達電子工業股份有限公司 (Delta Electronics, Inc.) 提供顯微斷層掃描儀器使用的技術協助，以及中華民國國家科學及技術委員會 (NSTC 112-2313-B-005 -024) 專題研究計畫經費提供。

引用文獻

- Adachi H, Matsuda K, Niimi T, Kondo S, Gotoh H.** 2020. Genetical control of 2D pattern and depth of the primordial furrow that prefigures 3D shape of the rhinoceros beetle horn. *Sci Rep* 10: 18687. doi: 10.1038/s41598-020-75709-y
- Alba-Tercedor J, Alba-Alejandre I.** 2017. Comparing micro-CT results of insects with classical anatomical studies: The European honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) as a benchmark (Insecta: Hymenoptera, Apidae). *Microsc Anal* 3: 12-15.
- Alba-Tercedor J, Alba-Alejandre I, Vega FE.** 2018. Micro-CT unveils the secret life of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*; Coleoptera, Curculionidae: Scolytinae) inside coffee berries. *Proceedings of Bruker Micro-CT Users Meeting*; 2018 Apr 16-19; Ghent, Belgium. pp 165-173.
- Alekseev VI, Mitchell J, McKellar RC, Barbi M, Larsson HCE, Bukejs A.** 2021. The first described turtle beetles from Eocene Baltic amber, with notes on fossil Chelonariidae (Coleoptera: Byrrhoidea). *Foss Rec* 24: 19-32. doi: 10.5194/fr-24-19-2021
- Arriaga-Varela E, Brunke A, Girón JC, Szawaryn K, Bruthansová J, Fikáček M.** 2021. Micro-CT reveals hidden morphology and clarifies the phylogenetic position of Baltic amber water scavenger beetles (Coleoptera: Hydrophilidae). *Hist Biol* 33: 1395-1411. doi: 10.1080/08912963.2019.1699921
- Backwell L, Huchet JB, Jashashvili T, Dirks PHGM, Berger LR.** 2020. Termites and necrophagous insects associated with early Pleistocene (Gelasian) Australopithecus sediba at Malapa. South Africa. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 560: 1-17. doi: 10.1016/j.palaeo.2020.109989
- Beránková T, Buček A, Bourguignon T, Arias JR, Akama PD, Sillam-Dussès D, Šobotník J.** 2022. The ultrastructure of the intramandibular gland in soldiers of the termite *Machadotermes rigidus* (Blattodea: Termitidae: Apicotermitinae). *Arthropod Struct Dev* 67: 1-17. doi: 10.1016/j.asd.2021.101136
- Bhandari K, Crisp P, Keller MA.** 2019. The oesophageal diverticulum of *Dirioxa pornia* studied through micro-CT scan, dissection and SEM studies. *BMC Biotechnol* 19: 1-8. doi: 10.1186/s12896-019-0585-8
- Birkhold AI, Razi H, Weinkamer R, Duda GN, Checa S, Willie BM.** 2015. Monitoring in vivo (re) modeling: A computational approach using 4D microCT data to quantify bone surface movements. *Bone* 75: 210-221. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.027
- Booher DB, Gibson JC, Liu C, Longino JT, Fisher BL, Janda M, Narula N, Toulkeridou**

- E, Mikheyev AS, Suarez AV, Economo EP.** 2021. Functional innovation promotes diversification of form in the evolution of an ultrafast trap-jaw mechanism in ants. *PLoS Biol.* 19: 1-22. doi: 10.1371/journal.pbio.3001031
- Brandt J, Doig G, Tsafnat N.** 2015. Computational aerodynamic analysis of a micro-CT based bio-realistic fruit fly wing. *PLoS One* 10: 1-16. doi: 10.1371/journal.pone.0124824
- Brock F, Southwell R, Hazell Z, Wessling R, Green M, Davis D.** 2022. Using high-resolution digital photography and micro-CT scanning to investigate deathwatch beetle damage to an historic timber from HMS Victory. *Environ Archaeol*: 1-17. doi: 10.1080/14614103.2021.2024689
- Callahan S, Crowe-Riddell JM, Nagesan RS, Gray JA, Davis Rabosky AR.** 2021. A guide for optimal iodine staining and high-throughput diceCT scanning in snakes. *Ecol Evol* 11: 11587-11603. doi: 10.1002/ece3.7467
- Cleynenbreugel TV, Schrooten J, Oosterwyck HV, Sloten JV.** 2006. Micro-CT-based screening of biomechanical and structural properties of bone tissue engineering scaffolds. *Med Biol Eng Comput* 44: 517-525. doi: 10.1007/s11517-006-0071-z
- Dierick M., Cnudde V., Masschaele B., Vlassenbroeck J. Van Hoorebeke L. Jacobs P.** 2007. Micro-CT of fossils preserved in amber. *Nucl Instrum Methods Phys Res* 580, 641-643. doi: 10.1016/j.nima.2007.05.030
- Endo M, Mori S.** 2005. Development of 4D-CT and prospect of its clinical application. *Med Imaging Technol* 23: 69-76. (in Japanese)
- Eteraf-Oskouei T, Najafi M.** 2013. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. *Iran J Basic Med Sci* 16: 731-742. doi: 10.22038/IJBMS.2013.988
- Faulwetter S, Dailianis T, Vasileiadou A, Arvanitidis C.** 2013. Contrast enhancing techniques for the application of micro-CT in marine biodiversity studies. *Microsc Anal* 27: S4-S7.
- Favata J, Shahbazmohamadi S.** 2018. Realistic non-destructive testing of integrated circuit bond wiring using 3-D X-ray tomography, reverse engineering, and finite element analysis. *Microelectron Reliab* 83: 91-100. doi: 10.1016/j.microrel.2018.02.015
- Franceschin N, Ruffier F, Serres J.** 2007. A bio-inspired flying robot sheds light on insect piloting abilities. *Curr Biol* 17: 329-335. doi: 10.1016/j.cub.2006.12.032
- Gan SJ, Leong YQ, bin Barhanuddin MFH, Wong ST, Wong SF, Mak JW, Ahmad RB.** 2021. Dengue fever and insecticide resistance in *Aedes* mosquitoes in Southeast Asia: a review. *Parasit Vectors* 14: 1-19. doi: 10.1186/s13071-021-04785-4
- Godunko RJ, Alba-Tercedor J, Grabowski M, Rewicz T, Staniczek AH.** 2022. Integrated Micro-CT and DNA-based study reveals Cenozoic origin of mayfly genus *Calliarcys* and its systematic position within Leptophlebiinae (Insecta: Ephemeroptera). *Res Sq*: 1-31. doi: 10.21203/rs.3.rs-1494665/v1
- Gorb SN, Pullwitt T, Kleinteich T, Busshardt P.** 2019. The insect unguitactor plate in action: Force transmission and the micro CT visualizations of inner structures. *J. Insect Physiol* 117: 1-7. doi: 10.1016/j.jinsphys.2019.103908
- Goyens J, Dirckx J, Aerts P.** 2015. Mechanoreceptor distribution in stag beetle jaws corresponds to the material stress in fights. *Arthropod Struct Dev* 44: 201-208. doi: 10.1016/j.asd.2015.03.003
- Goyens J, Dirckx J, Aerts P.** 2016. Jaw morphology and fighting forces in stag beetles. *J Exp Biol* 219: 2955-2961. doi: 10.1242/jeb.141614
- Heimel P, Swiadek NV, Slezak P, Kerbl M, Schneider C, Nürnberger S, Redl H, Teuschl AH, Hercher D.** 2019. Iodine-enhanced Micro-CT imaging of soft tissue on

the example of peripheral nerve regeneration. *Contrast Media Mol Imaging* 2019: 1-15. doi: 10.1155/2019/7483745

Henderickx H, Cnudde V, Masschaele B, Dierick M, Vlassenbroeck J, Van Hoorebeke L. 2006. Description of a new fossil *Pseudogarypus* (Pseudoscorpiones: Pseudogarypidae) with the use of X-ray micro-CT to penetrate opaque amber. *Zootaxa* 1305: 41-50. doi: 10.11646/zootaxa.1305.1.4

Herbert L. 2000. *Prostatic Diseases*. W.B. Saunders Company. 586 pp

Ho ST, Hutmacher DW. 2006. A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomater* 27: 1362-1376. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.08.035

Hörnig MK, Sombke A, Haug C, Harzsch S, Haug JT. 2016. What nymphal morphology can tell us about parental investment- a group of cockroach hatchlings in Baltic Amber documented by a multi-method approach. *Palaeont Electr* 19: 1-20. doi: 10.26879/571

Houck MM. 2013. Analytical Light Microscopy, pp. 609-611. in: Siegel JA, Saukko PJ, Houck MM (Eds.), *Encyclopedia of Forensic Sciences (Second Edition)*. Academic Press, Waltham. doi: 10.1016/B978-0-12-823677-2.00062-3

Ishibashi T, Waliullah ASM, Aramaki S, Kamiya M, Kahyo T, Nakamura K, Tasaki E, Takata M, Setou M, Matsuura K. 2023. Plastic brain structure changes associated with the division of labor and aging in termites. *Develop Growth Differ* 2023: 1-10. doi: 10.1111/dgd.12873

Jung M, Lommel D, Klimek J. 2005. The imaging of root canal obturation using micro-CT. *Int Endod J* 38: 617-626. doi: 10.1111/j.1365-2591.2005.00990.x

Kakizoe S, Liang W-R, Myint KM, Maruyama M. 2020. *Termitotrox icarus* sp. nov. (Coleoptera: Scarabaeidae): a new

termitophilous beetle from Myanmar with observations of carrying behavior by host termites. *Acta Entomol Musei Natl Pragae* 60: 427-436. doi: 10.37520/aemnp.2020.27

Kehlmaier C, Dierick M, Skevington JH. 2014. Micro-CT studies of amber inclusions reveal internal genitalic features of big-headed flies, enabling a systematic placement of *Metanephrocera* Aczél, 1948 (Insecta: Diptera: Pipunculidae). *Arthropod Syst Phylogeny* 72: 23-36. doi: 10.3897/asp.72.e31784

Khalife A, Keller RA, Billen J, Hita Garcia F, Economo EP, Peeters C. 2018. Skeletomuscular adaptations of head and legs of *Melissotarsus* ants for tunnelling through living wood. *Front Zool* 15: 1-11 doi: 10.1186/s12983-018-0277-6

Khalife A, Peeters C. 2020. Food storage and morphological divergence between worker and soldier castes in a subterranean myrmicine ant, *Carebara perpusilla*. *J Nat Hist* 54: 3131-3148. doi: 10.1080/00222933.2021.1890851

Konopka JK, Poinapen D, Gariepy T, Holdsworth DW, McNeil JN. 2020. Timing of failed parasitoid development in *Halyomorpha halys* eggs. *Biol Control* 141: 1-8. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.104124

Kundrata R, Bukejs A, Prosvirov AS, Hoffmannova J. 2020. X-ray micro-computed tomography reveals a unique morphology in a new click-beetle (Coleoptera, Elateridae) from the Eocene Baltic amber. *Sci Rep* 10: 1-12. doi: 10.1038/s41598-020-76908-3

Kypke JL, Solodovnikov A. 2020. Every cloud has a silver lining: X-ray micro-CT reveals *Orsunius* rove beetle in Rovno amber from a specimen inaccessible to light microscopy. *Hist Bio* 32: 940-950. doi: 10.1080/08912963.2018.1558222

Lanzetti A, Ekdale EG. 2020. Enhancing CT imaging: A safe protocol to stain and destain rare fetal museum specimens using

- diffusible iodine- based staining (diceCT). *J Anat* 239: 229-241. doi: 10.1111/joa.13410
- Lee S, Lee CY, Ha JH, Lee J, Song IH, Kwon SH.** 2020. Effect of processing conditions on the properties of reticulated porous diatomite-kaolin composites. *Appl Sci* 7297: 1-14. doi: 10.3390/app10207297
- Lee SJ, Kim K, Kim DH, Park JO, Park GT.** 2001. Recognizing and tracking of 3D-shaped micro parts using multiple visions for micromanipulation. *Proceedings of 2001 International Symposium on Micromechatronics and Human Science*; 2021 Sept 9-12; Nagoya, Japan. pp. 203-210. doi: 10.1109/MHS.2001.965246
- Li Z, Clarke JA, Ketcham RA, Colbert MW, Yan F.** 2015. An investigation of the efficacy and mechanism of contrast-enhanced X-ray computed tomography utilizing iodine for large specimens through experimental and simulation approaches. *BMC Physiol* 15: 1-16. doi: 10.1186/s12899-015-0019-3
- Luyten L, Casteels C, Vansteenwegen D, van Kuyck K, Koole M, Van Laere K, Nuttin B.** 2012. Micro-positron emission tomography imaging of rat brain metabolism during expression of contextual conditioning. *J Neurosci* 32: 254-263. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3701-11.2012
- Márton S, Manuel B, Vincent P, Imre S, Ákos K, Attila Ó.** 2022. A unique record of the Late Cretaceous of East-Central Europe: The first fossil wasps (Hymenoptera: Bethyliidae, Spathiapterygidae) from the ajkaite amber (Bakony Mts., western Hungary). *Cretac Res* 139: 1-11. doi: 10.1016/j.cretres.2022.105314
- Mensa F, Muzzi M, Spani F, Tromba G, Dullin C, Di Giulio A.** 2022. When the utility of micro-computed tomography collides with insect sample preparation: an entomologist user Guide to solve post-processing issues and achieve optimal 3D models. *Appl Sci* 12: 1-17. doi: 10.3390/app12020769
- Minter NJ, Franks RN, Brown KAR.** 2011. Morphogenesis of an extended phenotype: four-dimensional ant nest architecture. *J R Soc Interface* 9: 586-595. doi: 10.1098/rsif.2011.0377
- Mokso R, Schwyn DA, Walker SM, Doube M, Wicklein M, Müller T, Stampanoni M, Taylor GK, Krapp HG.** 2015. Four-dimensional in vivo X-ray microscopy with projection-guided gating. *Sci Rep* 5: 1-6. doi: 10.1038/srep08727
- Moser M, Ulmer JM, van de Kamp T, Vasilița C, Renninger M, Mikó I, Krogmann L.** 2023. Surprising morphological diversity in ceraphronid wasps revealed by a distinctive new species of *Aphanogmus* (Hymenoptera: Ceraphronoidea). *Eur J Taxon* 864: 146-166. doi: 10.5852/ejt.2023.864.2095
- Munkholm LJ, Heck RJ, Deen B.** 2012. Soil pore characteristics assessed from X-ray micro-CT derived images and correlations to soil friability. *Geoderma* 181-182: 22-29. doi: 10.1016/j.geoderma.2012.02.024
- Nguyen CV, Lovell DR, Adcock M, La Salle J.** 2014. Capturing natural-colour 3D models of insects for species discovery and diagnostics. *PLoS One* 9: 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0094346
- Niven JE, Laughlin SB.** 2008. Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *J Exp Biol* 211: 1792-1804. doi: 10.1242/jeb.017574
- Niiyama R.** 2016. Micro CT study of soft/elastic structures of beetle toward insect-inspired robotics. *Proceedings of 2016 IEEE/SICE International Symposium on System Integration (SII)*; 2016 Dec 13-15. pp. 610-615.
- Oliveira, CM, Auad AM, Mendes SM, Frizzas MR.** 2013. Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. *J Appl Entomol* 137: 1-15. doi: 10.1111/jen.12018
- Palmroth A, Pitkänen S, Hannula M, Paakinaho K, Hyttinen J, Miettinen S, Kellomäki M.** 2020. Evaluation of scaffold microstructure and comparison of cell seeding methods

- using micro-computed tomography-based tools. *J R Soc Interface* 17: 1-11. doi: 10.1098/rsif.2020.0102
- Parracha J, Pereira M, Maurício A, Faria P, Lima D, Tenório M, Nunes L.** 2021. Assessment of the density loss in anobiid infested pine using X-ray micro-computed tomography. *Buildings* 11: 173. doi: 10.3390/buildings11040173
- Patrick S, Birur NP, Gurushanth K, Raghavan AS, Gurudath, S.** 2017. Comparison of gray values of cone-beam computed tomography with hounsfield units of multislice computed tomography: An in vitro study. *Indian J Dent Res* 28: 66-70. doi: 10.4103/ijdr.IJDR_415_16
- Pauwels E, Van Loo D, Cornillie P, Brabant L, Van Hoorebeke L.** 2013. An exploratory study of contrast agents for soft tissue visualization by means of high resolution X-ray computed tomography imaging. *J Microsc* 250: 21-31. doi: 10.1111/jmi.12013
- Peris D, Mähler B, Kolibáč J.** 2022. Review of the family Thaneroceridae (Coleoptera: Cleroidea) and the description of *Thanerosus* gen. nov. from Cretaceous amber using micro-CT scanning. *Insects* 13: 1-14. doi: 10.3390/insects13050438
- Poinapen D, Konopka JK, Umoh JU, Norley CJD, McNeil JN, Holdsworth DW.** 2017. Micro-CT imaging of live insects using carbon dioxide gas-induced hypoxia as anesthetic with minimal impact on certain subsequent life history traits. *BMC Zool* 2: 1-13. doi: 10.1186/s40850-017-0018-x
- Quennedey A.** 1984. Morphology and ultrastructure of termite defense glands. pp 151-200. In: Hermann HR (eds). *Defensive Mechanisms in Social Insects*. Praeger.
- Richards CS, Simonsen TJ, Abel RL, Hall MJR, Schwyn DA, Wicklein M.** 2012. Virtual forensic entomology: improving estimates of minimum post-mortem interval with 3D micro-computed tomography. *Forensic Sci Int* 220: 251-264. doi: 10.1016/j.forsciint.2012.03.012
- Ritman EL.** 2004. Micro-computed tomography-current status and developments. *Annu Rev Biomed Eng* 6: 185-208. doi: 10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140130
- Robinson J, Gibson J, Arevalo-Maldonado HA, Prins J, Windmill J.** 2018. A non-destructive virtual dissection by micro-CT reveals diagnostic characters in the type specimen of *Caloptilia stigmatella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Zootaxa* 4441: 137-150. doi: 10.11646/zootaxa.4441.1.8
- Rother L, Kraft N, Wipfler DB, Jundi B, Gill RJ, Pfeiffer K.** 2021. A micro-CT-based standard brain atlas of the bumblebee. *Cell Tissue Res* 386: 29-45. doi: 10.1007/s00441-021-03482-z
- Rutty GN, Brough A, Biggs MJP, Robinson C, Lawes SDA, Hainsworth SV.** 2013. The role of micro-computed tomography in forensic investigations. *Forensic Sci Int* 225: 60-66. doi: 10.1016/j.forsciint.2012.10.030
- Schmidt J, Scholz S, Maddison DR.** 2021. *Balticeler kerneggeri* gen. nov., sp. nov., an enigmatic Baltic amber fossil of the ground beetle subfamily Trechinae (Coleoptera, Carabidae). *Dtsch Entomol Z* 68: 207-224. doi: 10.3897/dez.68.66181
- Schoborg TA, Smith SL, Smith LN, Morris HD, Rusan NM.** 2019. Micro-computed tomography as a platform for exploring *Drosophila* development. *Dev* 146: 1-15. doi: 10.1242/dev.176685.
- Schwass DR, Swain MV, Purton DG, Leichter JW.** 2009. A system of calibrating microtomography for use in caries research. *Caries Res* 43: 314-321. doi: 10.1159/000226230
- Smith DB, Bernhardt G, Raine NE, Abel RL, Sykes D, Ahmed F, Pedroso I, Gill RJ.** 2016. Exploring miniature insect brains using micro-CT scanning techniques. *Sci Rep* 6: 1-10. doi: 10.1038/srep21768
- Smith J, Cleare XL, Given K, Li-Byarlay H.** 2021. Morphological changes in the mandibles

accompany the defensive behavior of indiana mite biting honey bees against *Varroa destructor*. *Front Ecol Evol* 9: 1-9. doi: 10.3389/fevo.2021.638308

- Sourakov A, Markee A, Stanley EL.** 2021. CT scanning as a promising tool for studying Lepidoptera immatures. *News Lepid Soc* 63: 66-67. doi: 10.13140/RG.2.2.19872.71687
- Tarver MR, Shade RE, Tarver RD, Liang Y, Krishnamurthi G, Pittendrigh BR, Murdock LL.** 2006. Use of micro-CAT scans to understand cowpea seed resistance to *Callosobruchus maculatus*. *Entomol Exp Appl* 118: 33-39. doi: 10.13140/RG.2.2.19872.71687
- Varoudis T, Swenson AG, Kirkton SD, Waters JS.** 2018. Exploring nest structures of acorn dwelling ants with X-ray microtomography and surface-based three-dimensional visibility graph analysis. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 373: 1-10. doi: 10.1098/rstb.2017.0237
- Van de Castele E, Van Dyck D, Sijbers J, Raman E.** 2004. The effect of beam hardening on resolution in X-ray microtomography. *J X-Ray Sci Technol* 12: 53-57. doi: 10.1117/12.535263
- Villagran XS, Strauss A, Alves M, Oliveira RE.** 2019. Virtual micromorphology: the application of micro-CT scanning for the identification of termite mounds in archaeological sediments. *J Archaeol Sci Rep* 24: 785-795. doi: 10.1016/j.jasrep.2019.02.035
- Wang TH, Jian CH, Hsieh YK, Wang FN, Wang CF.** 2013. Spatial distributions of inorganic elements in honeybees (*Apis mellifera* L.) and possible relationships to dietary habits and surrounding environmental pollutants. *J Agric Food Chem* 61: 5009-5015. doi: 10.1021/jf400695w
- Weihmann T, Kleinteich T, Gorb S, Wipfler B.** 2015a. Functional morphology of the mandibular apparatus in the cockroach *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae)- A model species for omnivore insects. *Arthropod Syst Phylogeny* 73: 477-488. doi: 10.3897/asp.73.e31833
- Weihmann T, Reinhardt L, Weißing K, Siebert T, Wipfler B.** 2015b. Fast and Powerful: Biomechanics and Bite Forces of the Mandibles in the American Cockroach *Periplaneta americana*. *PLoS One* 10: 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0141226
- Wilby D, Aarts T, Tichit P, Bodey A, Rau C, Taylor G, Baird E.** 2019. Using micro-CT techniques to explore the role of sex and hair in the functional morphology of bumblebee (*Bombus terrestris*) ocelli. *Vis Res* 158: 100-108. doi: 10.1016/j.visres.2019.02.008
- Wipfler B, Pohl H, Yavorskaya MI, Beutel RG.** 2016a. A review of methods for analysing insect structures — the role of morphology in the age of phylogenomics. *Curr Opin Insect Sci* 18: 60-68. doi: 10.1016/j.cois.2016.09.004
- Wipfler B, Weißing K, Klass K-D, Weihmann T.** 2016b. The cephalic morphology of the American cockroach *Periplaneta americana* (Blattodea). *Arthropod Syst Phylogeny* 74: 267-297. doi: 10.3897/asp.74.e31866
- Yao Z, Yan LW, Wang T, Qiu S, Lin T, He FL, Yuan RH, Liu XL, Qi J, Zhu QT.** 2018. A rapid micro-magnetic resonance imaging scanning for three-dimensional reconstruction of peripheral nerve fascicles. *Neural Regen Res* 13: 1953-1960. doi: 10.4103/1673-5374.238718
- Zhang Y, Peng X.** 2007. Micro-CT scanning analysis for inner structure of porous media. *Asian Res* 36. doi: 10.1002/htj.20155

Micro Computed Tomography in Entomological Research

Hauchuan Liao, Han-Hsiang Tsai, Yu-Hsin Chen, Chia-Chien Wu, Mu-Xuan Chen, and Hou-Feng Li*

Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan

* Corresponding email: houfeng@nchu.edu.tw

Received: 12 August 2023 Accepted: 4 October 2023 Available online: 10 November 2023

ABSTRACT

Micro-computed tomography (Micro-CT) is an imaging technology used in small animal research. It employs noninvasive X-rays that do not harm a sample, thereby facilitating detailed observations of *in vivo* structures. Initially, micro-CT was used primarily in medical research involving small living animals. As the process of imaging techniques, nano-level resolution has been achieved, expanding its applications. This high-resolution imaging technique is particularly useful for observing minute samples. In Taiwan, several micro-CT machines with varying resolutions are currently available. However, the utilization involves various complex processes, such as sample preparation, image testing, and editing. This article introduces and provides a discussion of the principles of micro-CT, suitable samples for this technique, preparation methods, and relevant studies and applications. Micro-CT enables the noninvasive observation of X-rays to gain insights into the internal structures of biological samples. Nevertheless, there are limitations associated with the sample selection and preparation processes of micro-CT. Problems such as beam hardening and uneven thickness can result in low image quality and noise. Additionally, the lengthy imaging time required for performing micro-CT poses challenges for observing live samples. For soft tissues such as muscles, the use of iodine solution or phosphotungstic acid as a radiocontrast agent is necessary. The concentration and staining duration for an agent should be adjusted for each sample. Nevertheless, micro-CT enables researchers to visualize three-dimensional structures, which is highly valuable in entomological research. The external structures and internal tissues of insects can be observed to identify differences in habitat and food preferences, which, in turn, can clarify their taxonomy and evolution. The simulation of musculoskeletal tissue motion aids in mechanical research, facilitating the creation of three-dimensional models and bionic machines. To obtain useful information, micro-CT can be used to study fossil samples that are difficult to observe through optical instruments, without damaging them. Furthermore, exchanging, collecting, and displaying three-dimensional images are straightforward. Through micro-CT, researchers can observe nonbiological aspects, including the internal of nests and adjacent habitats, to further understand insect behavior and conduct pest control research. Micro-CT has also been applied to develop various types of equipment in fields such as quarantine research, forensic entomology, and archaeology, and it has become an indispensable technique in multiple scientific fields.

Key words: Computed Tomography, Insect, Morphology, Radiocontrast agent, Fossil