西方蜜蜂中唇舌摄食机制力学分析方法

Mechanical Methods for Analyzing Feeding Mechanism of Honeybees

廖采莹¹, 吴志刚¹, 赵杰亮², 吴嘉宁^{1,*}

¹ 航空航天学院, 中山大学, 广州; ² 机械与车辆学院, 北京理工大学, 北京

*通讯作者邮箱: wujn27@mail.sysu.edu.cn

引用格式: 廖采莹, 吴志刚, 赵杰亮, 吴嘉宁. (2021). 西方蜜蜂中唇舌摄食机制力学分析方法. Bio-101 e1010620. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010620.

How to cite: Liao, C. Y., Wu, Z. G., Zhao, J. L. and Wu, J. N. (2021). Mechanical Methods for Analyzing Feeding Mechanism of Honeybees. Bio-101 e1010620. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010620. (in Chinese)

摘要: 蜜蜂是自然界中最重要的传粉者。为了采集花蜜花粉等食物, 蜜蜂形成了许多特化器官和特殊行为。本文以西方蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 为例, 设计观测蜜蜂中唇舌摄食机制力学分析方法的实验方案, 旨在探究蜜蜂口器的微观结构, 以及相应的蜜蜂进食的宏观及微观过程, 借此分析微观特殊结构与宏观特殊功能之间的理论联系机制, 最后定量测量中唇舌在进食过程中的力学过程, 揭示其调控及适应性机制。

关键词: 蜜蜂, 中唇舌, 微观结构, 摄食机制, 定量, 力学过程

研究背景

蜜蜂是最重要的传粉昆虫, 与传粉过程并行的摄蜜行为对蜜蜂种群的能量获取至关重要。以西方蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 为例, 西方蜜蜂口器是典型的嚼吸式口器, 主要由一对外颚叶 (galea)、下唇须 (labial palp) 和中唇舌 (glossa) 三部分组成 (图 1)。在蜜蜂饮蜜过程中, 外颚叶和下唇须会包裹着中唇舌形成一个临时的唧筒状通道, 通过中唇舌的往复运动沾取花蜜, 之后利用咽部提供的负压将花蜜从管道中抽吸摄食。关于蜜蜂解剖结构、形状特性及几何尺寸已经有相关描述 (彩万志, 2011), 但由于蜜蜂口器的尺寸较小 (长度仅为 2 mm 左右), 结构复杂度较高 (有多达 120 个左右的结构), 关于蜜蜂口器的微观结构和摄食过程的精细动态行为尚未有详细研究。本文将详述如何结合解剖、微观扫描和高速摄影技术, 研究蜜蜂摄食过程的动态特性以及完成相关参数的测量。

图 1. 蜜蜂口器结构

如图 2 所示，主要实验方法包括，(1) 蜜蜂口器体式显微镜观测、(2) 蜜蜂口器扫描电镜观测 (SEM 蜜蜂口器显微 CT 观测及三维重建)、(3) 蜜蜂进食过程高速摄像机观测、(4) 蜜蜂进食过程中唇舌受到阻力测量。其中 (1)-(2) 旨在观测蜜蜂口器微观结构，(3) 旨在捕捉蜜蜂进食过程中口器的宏观和微观运动特征，(4) 旨在探测蜜蜂中唇舌在进食过程中的受力行为。

图 2. 研究方法与技术路线

一、蜜蜂口器微观结构观测与 3D 重建

1. 蜜蜂实验样本养殖

本文所选样本为现在我国较为普遍的西方蜜蜂 (西方蜜蜂 *Apis mellifera*), 实验室养殖蜜蜂示意图如图 3 所示。实验室饲养蜜蜂使用的是蜂蜜和蔗糖溶液, 供应充足, 基于此差别观察发现, 实验室饲养蜜蜂的最适温度为 20-30 °C, 通常控制在 25 °C。如图 3 所示, 将收集到的西方蜜蜂样本装进蜂箱带回实验室, 安置在蜜蜂活动观测室上侧。由于温湿度对蜜蜂活动影响较大, 可在冬日使用加热垫、加湿器来控制整个养殖系统的温湿度。饲养皿中放置蜂蜜、蔗糖溶液、无机盐、维生素、水等蜜蜂生存必需品。蜜蜂活动观测室使用玻璃材质, 便于观察, 左侧改用铁网, 使水蒸气能进入观察室内, 从而控制湿度。为便于采集蜜蜂样本, 利用蜜蜂趋光性原理, 在观察室右侧加装一个 LED 灯: 采集时打开 LED 灯, 则大多数蜜蜂集中于在观察室右侧壁上, 少数蜜蜂留在采集室内, 极易采集。

图 3. 蜜蜂实验室养殖系统示意图

2. 蜜蜂口器微观结构观测

2.1 体式显微镜

显微镜观测是微观观测最基本的方法, 目前多使用显微镜与计算机组合系统进行实时拍摄记录。本实验将蜜蜂的中唇舌从口器中取出, 制作成样本放在载玻片上, 使用体式显微镜进行观测, 并测量中唇舌及其刚毛的几何尺寸。本实验中, 使用的目镜放大倍数为 10 ×, 物镜放大倍数为 10 ×, 总共放大 100 ×。

2.2 环境扫描电子显微镜 (SEM)

扫描电子显微镜是依据电子与物质间的相互作用原理而制造成的。当一束高能入射电子轰击物质表面时，被激发的区域将产生二次电子、俄歇电子、特征 X 射线和连续谱 X 射线、背散射电子、透射电子，以及在可见、紫外、红外光区域产生的电磁辐射。同时，也可产生电子-空穴对、晶格振动 (声子)、电子振荡 (等离子体)。被广泛应用于各种导电材料、绝缘材料、生物材料及含水材料等固体材料的形貌观察。本实验使用清华大学生物医学测试中心的扫描电子显微镜 (FEI Quanta 200)，其主要用于生物样品和其他材料表面精细形貌和结构的观察和分析。图像具有高分辨率 (3.5 nm) 和高放大倍数 (7-1000,000 ×)，最大像素为 3584 × 3094，可真实、生动地显示样品的三维结构。蜜蜂口器 SEM 样本处理方法如下：

- 1) 将新鲜蜜蜂头部样本置于装有 70%乙醇的小指形管中，使蜜蜂口器舒展并初步固定。
- 2) 用尖头吸管小心吸干乙醇，注入 2.5%的戊二醛溶液，浸没样本，固定 3 h。
- 3) 将固定好的样本用 0.1 mol/L, pH = 7 的磷酸缓冲液冲洗三次，每次 10 min。
- 4) 将样本置入特制的样本盒，依次浸入以下浓度的乙醇溶液中脱水：70%乙醇 → 75%乙醇 → 80%乙醇 → 85%乙醇 → 90%乙醇 → 95%乙醇 → 无水乙醇。每个梯度需 30 min，无水乙醇需重复三次。
- 5) 用尖头吸管小心吸干乙醇，注入 50%的叔丁醇溶液，浸没样本，固定 18 h。
- 6) 使用 Alpha1-2LDplus 冷冻干燥仪进行干燥。
- 7) 将样本放入真空镀膜仪中，接通电源，抽真空至 5 Pa 以下，然后开始镀膜，时间为 1 min。
- 8) 之后将蜜蜂置于 SEM 观察室内进行观察和拍照。

3. 蜜蜂口器 3D 重建

3.1 样本预处理

- 1) 将蜜蜂样本置入装有 50%乙醇的小试管中，待其口器舒展后取下头部。
- 2) 将蜜蜂头部置入特制的样本盒，依次浸入以下浓度的乙醇溶液中脱水：75%乙醇 → 80%乙醇 → 85%乙醇 → 90%乙醇 → 95%乙醇 → 无水乙醇，每个梯度需 20 min。

- 3) 用尖头吸管小心吸干乙醇，注入丙酮溶液，浸没样本，固定 24 h。
- 4) 使用 Leica CPD 030 临界点干燥仪进行干燥。

3.2 显微 CT 与 3D 三维重建

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、航天及医疗等多个领域。近些年，Hörnschemeyer 等将此项技术引入昆虫形态学研究领域 (Hörnschemeyer *et al.*, 2002)。与传统的组织切片技术相比，显微 CT 的优点是可快速无损地的扫描到蜜蜂头部整体及内、外 3D 构型。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。蜜蜂口器图像的获得需要如下 8 个流程 (宋余庆, 2008)。

1) 图像获取

通过显微 CT 对蜜蜂口器形态结构进行扫描，得到一组 (798 张) 二维断层图像 (图 4)。

2) 图像格式转换

将 DICOM 格式的图像转换成便于计算机处理的 bpm 或 TIFF 格式。

3) 二维图像滤波

断层图像一般含有噪声，造成图像伪影，所以需要每一张图像进行滤波处理。

4) 图像插值

原始显微 CT 图像是均匀断层图像，但实际扫描时，往往要对一些关键部位划分间距更小的断层图像，所以必须使用插值算法将 CT 图像或局部 CT 图像插值放大。一般来说，图像插值放大方法有两类。第一类是不基于边缘的图像插值放大方法，利用像素的位置和它的周围像素值的总体不变关系来计算像素值。这类插值方法存在较多缺陷，比如最近邻插值放大后的图像容易出现马赛克；双线性等插值法具有平滑功效，能有效克服马赛克的出现，但会退化图像的高频部分，使图像细节变得模糊。第二类图像插值方法，基于边缘的放大方法，根据原始图像的边缘放大图像或者进行插值，改进了图像的主观质量 (张刘, 2009)。本实验利用第二类图像插值方法，利用局部统计

和几何特征和搜索匹配处理，获得精确的模型来计算未知的像素值。

5) 三维图像滤波

为进一步提高信噪比，不仅断层图像需要进行滤波处理，生成的三维体数据也需要进行滤波处理，主要方法有三维高斯滤波、非线性滤波等。

6) 分割及归类

对体数据的不同器官进行分割提取，显示研究对象，忽略次要组织结构。如图 4 所示，黄色为蜜蜂的中唇舌组织，红色为外颚叶组织，蓝色为下唇须组织。

7) 体绘制

分割处理以后，需根据系统内存容量、计算能力和可视化目标决定绘制方法。

8) 绘制后再处理

对绘制的三维图像进行分析。

其中图像获取、分割及归类、体绘制及绘制后的再处理是需要重点掌握的技术流程，而流程 (2)-(5) 已打包在成像设备上，在图像采集的过程中会自动运行。

图 4. 蜜蜂头部显微 CT 扫描图像

本实验使用专业三维重建软件 **Amira** 对蜜蜂口器外颚叶、下唇须和中唇舌的轮廓进行三维重建。

二、蜜蜂饮蜜动态高速摄影方法

1. 高速摄像系统研制目的

立体视觉测量方法是现在昆虫运动变形测量所广泛使用的一种方法。通过对高精度图像特征信息的提取，实现高精度昆虫运动参数的测量。许多昆虫运动过程迅速且幅度微小，对于此类高速运动或瞬变现象，受人眼的时间分辨率 ($1/24\text{ s}$) 或一般摄像机的拍摄帧速 (一般 $< 200\text{ Hz}$) 限制，无法进行精确捕捉。而高速摄影能把高速形态及运动规律等清晰地展现出来，适用于蜜蜂中唇舌。

2. 常规高速摄像系统

蜜蜂饮蜜过程由高速摄像机 (Phantom, MICRO CLY310, USA) 与显微镜头 (Keyence, VH-Z50L, Japan) 组合拍摄，记录视频帧数为 500 fps。为了提供足够的拍摄进光量，冷光源与高速摄像机需放置于同一轴线上，以便提供同轴光源。透明喂食盒放置在冷光源与高速摄像机之间，实验前先用头发丝 (直径约 $50\text{ }\mu\text{m}$) 插入透明喂食盒中调整焦距并定位。透明喂食盒由玻璃胶粘接载玻片而制成，人造花蜜 (35%蔗糖水 (Yang *et al.*, 2014)) 填充厚度为 2 mm 。为便于调整视野和焦距，透明喂食盒被固定在一个有 3 个自由度的定位平台上。该定位平台由伺服电机控制，移动精度达到 $10\text{ }\mu\text{m}$ 。在实验之前，蜜蜂样本将受到饥饿 24 h 的预处理。实验时，剪掉蜜蜂翅膀，将胸部背侧粘连在高度调整器上，由上自下慢慢接近人造花蜜。如此，蜜蜂足部将首先接触到人造花蜜溶液，所以，为了不干涉蜜蜂饮蜜过程的拍摄，此实验去掉蜜蜂的足部。

3. 显微高速摄像系统

图 5 是基于常规高速摄像系统所改进的显微高速摄像系统。常规高速摄像系统无法清晰地捕捉蜜蜂中唇舌上刚毛的运动特征，因此设计了显微高速摄像系统。如图 5 所示，蜜蜂饮蜜过程由高速摄像机 (Phantom M110, USA) 和光学显微镜 (Axiostar Plus, Zeiss, Germany) 组合拍摄，放大倍数为 40 倍。透明喂食盒的喂食厚度制为 1 mm ，整个拍摄系统的光源由光学显微镜提供，无需另制。蜜蜂样本固定仍使用胸

部背侧粘连在三自由度定位台上的方法，但观测视线为竖直方向，故无需去足处理 (Zhao *et al.*, 2015)。

图 5. 显微高速摄像系统

三、蜜蜂中唇舌摄食净能量分析

蜜蜂在花蜜转运过程中展现出卓越的能量获取能力，在每一次外出飞行获取的液体食物所具有的能量，不仅需要满足自身飞行以及新陈代谢所消耗的能量，还需要为蜂巢内其它社会分工蜜蜂提供生长生活所必需的能量。自然界中，蜜蜂能进食和适应不同形式的食物，既能吸取微型沟槽结构的蜜腺中的花蜜，又能舔舐由花蜜脱水产生的结晶干糖或人工喂养的固体糖等。基于动态观测得到的中唇舌刚毛结构在摄食过程中的微观动力学行为，可以建立摄食过程的能量摄取模型，进而可对蜜蜂中唇舌的摄食经能量进行定量分析。本章提出了蜜蜂摄食能量的分析方法并给出了计算算例。

1. 蜜蜂摄食能量摄入量分析

通过对蜜蜂口器微结构的观察，将中唇舌简化为圆柱体，被浓密的圆锥形刚毛覆盖，周围的盔瓣和唇瓣可简化为管状 (Yang *et al.*, 2014) (图 6)。蜜蜂的一个摄食周期可分为三个部分：中唇舌伸出、收缩和间停，持续时间分别为 T_1 、 T_2 和 T_0 。一个周期内摄取的花蜜体积可以用一个圆筒的体积减去浸没在花蜜中的刚毛的体积来估计。

假设中唇舌伸出和收缩的平均运动速度都为 u ，时间 $T_1 = T_2 = T$ ，则周期平均摄取体积

流量 Q 为:

$$Q = \pi a u T (2h + h^2 / a) - 2\pi^2 \zeta a r^2 h u T / 3 \quad (1)$$

其中 ζ 为刚毛分布密度, r 为刚毛半径, a 为中唇舌半径, h 为刚毛直立长度。每周周期平均摄取体积流量得到周期内能量摄入量 E 为

$$E = Q \rho c s \% \quad (2)$$

其中 ρ 为花蜜密度, c 为每单位质量蔗糖的能量含量, $s\%$ 为花蜜密度。

图 6. 西方蜜蜂摄食花蜜的物理模型

2. 蜜蜂中唇舌在不同表面的摩擦力测试方法

2.1 样品制备

中唇舌在不同介质/界面的工况下, 有不同的摩擦力特性。可通过力学传感器及运动驱动装置可以测量在不同工况下的摩擦力特性。图 7 给出了样本制备的流程。首先, 将新鲜中唇舌从蜜蜂口器中解剖备用。将直径为 $200 \mu\text{m}$ 的玻璃毛细管烧制形成一个直径 $50 \mu\text{m}$ 的尖端, 在显微镜下将毛细管尖端插入中唇舌。然后, 利用镊子拖动中唇舌控制毛细管插入中唇舌的长度改变中唇舌刚毛的张开角度。当毛细管仅插入中唇舌底部时, 中唇舌刚毛并拢, 模拟中唇舌伸出时情况; 当毛细管贯穿整个中唇舌时, 中唇舌刚毛张开, 模拟中唇舌收缩时情况。最后,

利用胶水将中唇舌尾部和毛细管粘合 (Wu *et al.*, 2018)。

图 7. 样本制备过程

2.2 摩擦力测量

在摩擦力测量开始时，搭建实验装置，包括：拉力传感器、滑块、丝杠、步进电机、控制台等 (图 8)。将穿插着中唇舌样本的毛细管固定于拉力传感器一端，并将中唇舌放置于不同表面上：如图 8 中 (a) 为将中唇舌放置固体表面，(b) 为将中唇舌放置液体中。最后利用步进电机将中唇舌以一定速度驱动，利用显示器读取拉力传感器示数，由此测量中唇舌在不同表面上受到的摩擦力 (Liao *et al.*, 2020)。

图 8. 摩擦力测量装置

通过测量不同速度下中唇舌样本在固体糖和糖溶液中受到的摩擦力，得到蜜蜂中唇舌在人造花蜜与干糖表面的摩擦力特性。如图 9 所示，在一定速度下，中唇舌在固体糖表面或蔗糖溶液中，刚毛张开时受到的摩擦力都大于刚毛收缩时受到的摩擦力；且中唇舌在固体糖表面或蔗糖溶液中受到的摩擦力随中唇舌运动速度的增大而增大。

图 9. 中唇舌在人造花蜜与干糖表面的摩擦力特性

3. 净能量分析

在一个摄食周期中，由于阻力引起的平均能量消耗 W 可表示为 $W = FS$ ，其中 F 为测得的中唇舌受到的阻力，由第三章第 2.2 节方法测量得到； S 为中唇舌运动位移，可由第二章第 3 节所示方法捕捉中唇舌运动过程得到。一个舔舐周期由中唇舌伸出和收缩两个阶段组成，因此周期内总能量消耗为 W 可表示为：

$$W = (F_p + F_r)S \quad (3)$$

其中 F_p 和 F_r 分别为中唇舌伸出和收缩时受到的阻力。

最后，在一个摄食周期中，蜜蜂得到的净能量摄入量 E_{Net} 为 $E_{\text{Net}} = E - W$ ，周期净能量摄入率 $\dot{E}_{\text{Net}}$ 为 $\dot{E}_{\text{Net}} = E_{\text{Net}} / (2T + T_0)$ 。利用西方蜜蜂样本，通过实验与理论计算结合的形式，从净能量摄入率的角度分析对比蜜蜂摄食固体糖和蔗糖溶液的优劣性。如图 10 所示，蜜蜂在一个摄食周期内，摄取固体糖的净能量摄入率为 2.8 J/s。而摄取糖溶液时蜜蜂的净能量摄入率为 5.6 J/s，为摄取固体糖的 2 倍，故得到蜜蜂摄食糖溶液比摄食固体糖更有利于减小能量消耗、提高摄食效率的结论。

图 10. 蜜蜂摄食净能量分析

总结

昆虫口器是目前动物世界中研究最深入、记录最丰富的动物器官之一 (Labandeira, 1997)。蜜蜂是世界上最重要的传粉者，通常以花蜜或花粉等食物为生。其摄取的食物不仅仅需要满足其自身的飞行、新陈代谢所需能量，还需要保证群体中其他社会成员的能量消耗。因此，蜜蜂进化出一种高效的口器和摄食机制来支持它采集大量食物 (Li et al., 2016)。然而，关于蜜蜂口器的内部微观结构和摄食过程的精细动态行为尚未有详细研究。本文以西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 为例，设计了一种观测蜜蜂中唇舌摄食机制的实验方案和力学分析方法。该方法旨在探究蜜蜂口器的微观结构以及相应的蜜蜂摄食的宏观及微观过程，借此分析微观特殊结构与宏观特殊功能之间的理论联系机制，最后通过物理测量手段定量分析中唇舌在摄食过程中的力学过程，揭示其对不同形式食物的调控及适应性机制。

首先本文结合解剖、体式显微镜、扫描电镜和显微 CT 观测及三维重建技术对蜜蜂口器微观结构进行观测，并完成口器相关结构参数的测量。其次，通过高速摄像机捕捉

蜜蜂进食过程中口器的宏观和微观运动过程，研究蜜蜂摄食过程的动态特性和摄食机制。蜜蜂的中唇舌类似于被浓密刚毛覆盖的长圆柱体，在摄食过程中，中唇舌进行往复运动的同时致密的刚毛会进行相应的扩张和收拢运动 (Wu *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2016)。对此，本文建立了一种含刚毛运动过程的蜜蜂摄食模型，计算分析蜜蜂在摄食过程中的能量摄入量，并从能量角度考虑蜜蜂的摄食效率，对自然界中花蜜的浓度大致为 35% 这一现象做出解释。最后，设计了一套力学实验装置，测量并定量分析中唇舌进食的力学过程，量化了蜜蜂摄食过程中的净能量摄入率，解释了蜜蜂对于不同形式食物的偏好现象。

本文设计的一种蜜蜂中唇舌摄食机制力学分析方法，基于仿生学思路，利用交叉学科方法，结合观测手段、力学实验和数学建模的方式，揭示了西方蜜蜂摄食过程中唇舌的行为机制，并基于微观运动特性和能量协同评价指标，分析了蜜蜂进食不同食物过程中的能量优化策略。该方法有助于拓宽对蜜蜂口器结构和摄食行为的了解和认识，对未来完善蜜蜂饲养机制甚至研制仿蜜蜂口器微型流量泵、固体采样器等仿生设备都有一定的启发作用。

参考文献

1. 彩万志. (2011). *普通昆虫学*. 中国农业大学出版社. 北京. ISBN: 9787565503207.
2. 张刘, 罗扬, 胡亨武. (2009). [基于边缘保持的 CT 图像插值放大算法](#). *电脑与信息技术* 17(001): 39-42.
3. 宋余庆. (2008). *数字医学图像*. 清华大学出版社. 北京. ISBN: 9787302168737.
4. Hörnschemeyer, T., Beutel, R. G. and Pasop, F. (2002). [Head structures of *Priacma serrata leconte* \(coleptera, archostemata\) inferred from X - ray tomography](#). *J Morphol* 252(3): 298-314.
5. Yang, H., Wu, J. and Yan, S. (2014). [Effects of erectable glossal hairs on a honeybee's nectar-drinking strategy](#). *Appl Phys Lett* 104(26): 263701.
6. Zhao, C., Wu, J. and Yan, S. (2015). [Observations and temporal model of a honeybee's hairy tongue in microfluid transport](#). *J Appl Phys* 118(19): 194701.
7. Kim, W., Gilet, T. and Bush, J. W. M. (2011). [Optimal concentrations in nectar feeding](#). *Proc Natl Acad Sci USA* 108(40): 16618-16621.
8. Wu, J., Shi, G., Zhao, Y. and Yan, S. (2018). [How to dip nectar: optimal time](#)

- [apportionment in natural viscous fluid transport](#). *J Phys D: Appl Phys* 51(24): 245401.
9. Liao, C., Xu, Y., Sun, Y., Lehnert, M. S., Xiang, W., Wu, J. and Wu, Z. (2020). [Feeding behavior of honey bees on dry sugar](#). *J Insect Physiol* 124: 104059.
 10. Labandeira, C. C. (1997). [Insect mouthparts: ascertaining the paleobiology of insect feeding strategies](#). *Annu Rev Ecol Syst* 28(1): 153-193.
 11. Li, C. C., Wu, J. N., Yang, Y. Q., Zhu, R. G. and Yan, S. Z. (2016). [Drag reduction effects facilitated by microridges inside the mouthparts of honeybee workers and drones](#). *J Theor Biol* 389: 1-10.
 12. Wu, J., Chen, Y., Li, C., Lehnert, M. S., Yang, Y. and Yan, S. (2019). [A quick tongue: older honey bees dip nectar faster to compensate for mouthpart structure deterioration](#). *J Exp Biol* 222(21): jeb212191.
 13. Zhu, R., Lv, H., Liu, T., Yang, Y., Wu, J. and Yan, S. (2016). [Feeding kinematics and nectar intake of the honey bee tongue](#). *J Insect Behav* 29(3): 325-339.