

蜜蜂全脑解剖、腺体分离及不同日龄组织形态比较

魏俏红¹ 韩宾¹ 吴帆² 张旭凤³ 孟丽峰¹ 段香媛¹ 冯毛¹ 胡茵¹

(1 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; 2 中国计量大学生命科学学院浙江省生物计量及检验检疫重点实验室, 杭州 310018; 3 山西农业大学(山西省农业科学院)园艺研究所, 太原 030031)

摘要: 蜜蜂作为一种重要的社会性昆虫, 具有复杂的学习记忆和精确的信息交流能力。蜜蜂大脑是各种信息的处理中心, 是模式生物神经生物学的重要研究对象。精确解剖蜜蜂脑是研究神经生物学的关键, 但由于蜜蜂脑体积小且被几丁质外壳包裹, 完整解剖脑部并进行脑内分区一直是技术难题。为解决蜜蜂脑解剖难度大、速度慢和质量差的问题, 我们探索和改进蜜蜂脑解剖方法, 实现了快速高效的解剖蜜蜂脑及其亚分区, 为深入研究蜜蜂脑神经生物学提供帮助。取新鲜或 CO₂ 麻醉的蜜蜂, 用 2 根昆虫针穿过胸部正面固定于蜡盘, 在显微镜下用尖头镊子划开复眼后方的几丁质外壳, 掀开脑壳, 取出全脑放在含有蛋白酶/RNA 酶抑制剂溶液的载玻片上, 然后进行组织分区。经过练习掌握方法后, 可以快速准确解剖蜜蜂脑, 并获得蘑菇体、咽下腺、上颚腺、视神经叶和嗅神经叶等亚器官结构, 从解剖到分区可以在 2 分钟内完成, 且样品的外部形态完整, 质量好。蜜蜂头部的器官解剖结果显示, 出房蜂、哺育蜂和采集蜂 3 个日龄蜜蜂脑、咽下腺、上颚腺、唾液腺均有明显差异, 这与其器官发育和劳工分配具有密切关系。

关键词: 蜜蜂; 脑; 解剖; 亚区

Whole Brain Anatomy, Glandular Separation and Histological Comparison of Honeybee at Different Age

Wei Qiaohong¹, Han Bin¹, Wu Fan², Zhang Xufeng³, Meng Lifeng¹, Duan Xiangyuan¹, Feng Mao¹, Hu Han¹

(1 Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China; 2 Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 3 Institute of Horticultural Research, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031, China)

Abstract: As an important kind of social insect, honeybee has complex abilities of learning, memory, and communication of information. The brain of honeybee is the processing center of various information. It is gradually becoming the model organism in the research field of neurobiology because of the specific strengths of honeybee's brain. Brain anatomy is the first step in studying the brain of honeybee. However, the small volume and the chitinous cover of honeybee's brain make technological difficulties to complete the anatomy of the brain as well as the partition of inner brain. To get over the difficulties including the slow speed and the poor quality of the brain tissue, we perform a complete technology to dissect the bee brain and the inner brain partition and provide help to the follow-up in-depth research of honeybee's neuroscience by exploring and improving the methods of brain anatomy. Firstly, the fresh honeybee or honeybee that was smoked by CO₂ was frontally fixed to the wax tray by using two insect needles to stick through the breast. Secondly, the chitin shell was gashed from the behind of the compound eye and the skull was opened by tweezers. Then, the whole brain was taken out and put on the glass slide with PBS solution contained protease/RNA polymerase inhibitor. After mastering the methods by practicing, the process from anatomy to partition could be finished and the sub organ including the mushroom body, hypopharyngeal gland, mandibular gland, optic lobe, and olfactory lobe could be gotten in two minutes. More importantly, the external form of the brain sample was completely preserved with adequate quality. The brain of honeybee is the center of controlling behaviors and physiological activities. The

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31970428): 神经肽调控工蜂哺育蜂和采集蜂行为的分子机制研究

作者简介: 魏俏红(1994-), 女, 学士, 研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: wqh_0420@163.com

通讯作者: 胡茵(1979-), 女, 副研究员, 研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: wuhan_hh@126.com

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

images of organ samples from the newly emerged bee, nurse bee, and foraging bee have shown significant differences, which are closely related to their organ development and labor allocation.

Key words: honeybee; brain; anatomy; subregion

蜜蜂 (*Apoidea*) 是一种社会性昆虫, 也是少数人工驯化的经济昆虫之一。一个正常蜂群由一只能生育的雌性蜂王、大量不育的雌性工蜂和一定数量的雄蜂组成, 种群的生存和发展依赖于个体间的劳动分工和相互协作, 所以群体内的信息交流十分复杂^[1]。随着人们对蜜蜂行为特点的认识和研究不断深入, 蜜蜂逐渐成为研究神经生物学、社会行为学、群体遗传学等领域的新兴模式生物^[2]。

作为模式生物, 蜜蜂具备其他一些模式生物不可比拟的优点。第一, 蜜蜂脑相对简单。脑是蜜蜂主要的感觉中心, 是调控行为和生理活动的中枢, 能够接受和处理来自眼和触角的神经刺激并形成相应指令。蜜蜂脑体积较小, 大约只有 100 万个神经元^[3], 仅仅是人类大脑的十万分之一^[4]。尽管蜜蜂的神经网络复杂性有限, 但其神经元间的信息交流机制几乎与脊椎动物相同^[5]。而与模式生物果蝇相比, 蜜蜂脑虽然只有果蝇脑的 4 倍, 但行为却比独居的果蝇复杂的多, 所以蜜蜂更适合用于神经生物学机制研究^[4]。第二, 个体遗传背景可以控制。在蜜蜂育种和科研中, 蜂王人工授精技术已十分成熟^[6], 研究人员容易获得遗传性状稳定可控的个体, 使得科学研究可以持续进行。第三, 对蜜蜂感官、导航和通讯等相关的行为学研究已经有了长足的发展^[7], 获得了很多有用的行为学知识, 这有利于深入研究神经信号与行为的关系。第四, 生活史短, 且易于饲养。蜜蜂工蜂从卵发育到成虫只需 21 天, 且蜂王每日产卵近千枚, 科研人员可以获得大量实验样本^[8]。因此, 蜜蜂作为模式生物, 特别是作为研究神经生物学的模式生物具有重要意义。

对于脑科学实验, 全脑解剖是研究的第一步。蜜蜂脑较小, 整个头部更是不足 1mm³, 总量小于 1mg, 且蜜蜂脑柔软, 外周被几丁质外壳包裹^[9], 完整解剖难度较大, 相关的解剖技术发展缓慢且报道很少。Guy Bloch 等报道在干冰下进行解剖, 但没有给出详细步骤^[10]。Norman L Carreck 等和赵元洪等尽管介绍了蜜蜂脑解剖方法, 但没有涉及脑部亚区以及脑部腺体的分离^[11,12], 而蜜蜂脑由前脑、中脑和后脑三部分组成。前脑包括蘑菇体和中央复合体等高级中枢, 控制学习、记忆和运动等高级神经活动; 中脑包含触

角叶, 是嗅觉神经中心, 接受和传递各种信息素和外界气味物质的信号; 而后脑通常不发达, 主要包括内分泌神经元和控制进食与消化的运动神经元^[13-15], 所以解剖分离各个脑区和脑部腺体对准确收集样品, 进而深入研究不同脑区和腺体的功能至关重要。

因此, 在前人的基础上, 我们希望通过改进解剖方法, 探索更加快速而完善的技术, 一方面使解剖速度加快, 减少样品核酸和蛋白等成分的降解以保证样品的有效性, 另一方面一次性分离保证蜜蜂脑各组织和分区的腺体更加完整, 这项技术将为蜜蜂或其他昆虫脑科学研究提供帮助。本实验将此项解剖技术应用于出房蜂、哺育蜂和采集蜂工蜂脑、脑亚区和脑部腺体的取样, 分析不同发育期蜜蜂脑区的形态差异。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

体式显微镜 1 台 (上海缔伦光学仪器有限公司; 缔伦 XTL-206A 三目连续变倍体视显微镜)、蜡盘 1 个 (将熔化的蜂蜡过滤后倒入培养皿)、尖头镊子 2 把 (中镜科仪: 型号 5-SA)、普通载玻片、100 微升移液器 (Thermo Fimmpipette; F3)、昆虫针 2 根、蛋白酶/RNA 酶抑制剂 PBS 溶液。

1.2 取样

本实验所用蜜蜂均来自中国农业科学院 8 号楼楼顶蜂场。所取样品分 3 个日龄, 分别为出房蜂、哺育蜂、采集蜂。从蜂箱中取出一张即将出房的子脾放到培养箱 (温度 34℃, 湿度 70%~85%) 过夜, 第二天抓取出房 <24h 的蜜蜂作为出房蜂; 哺育蜂是将刚出房的蜜蜂用油漆笔标记, 待 10 日龄抓取; 采集蜂是在蜂箱口抓取后足携带花粉的蜜蜂。将新取回的蜜蜂用 CO₂ 麻醉; 镊子、载玻片、显微镜用酒精擦拭消毒; 然后在载玻片上滴加 20 微升蛋白酶/RNA 酶抑制剂溶液, 放置在冰盒中备用。

1.3 方法

1.3.1 蜜蜂脑解剖

取新鲜蜜蜂或 CO₂ 麻醉后, 首先把蜜蜂正面放在蜡盘上, 用两根昆虫针倾斜穿过胸部将蜜蜂固定在蜡盘上 (图 1)。

解剖过程主要分三个步骤: (1) 划开脑部几丁质;



图1 固定蜜蜂 (15X)

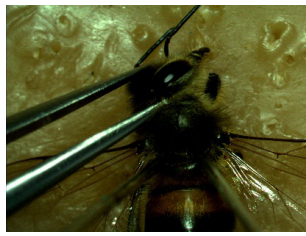


图2 左手镊子夹住头部 (15X)



图3 右手镊子在复眼上部扎一小孔 (20X)



图4 从小孔处向左右划开几丁质 (15X)



图5 掀起脑壳上部 (20X)



图6 掀掉脑壳 (15X)

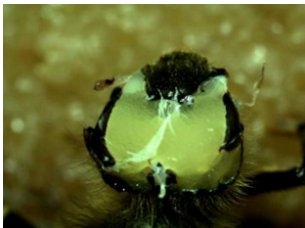


图7 揭去脑壳后 (20X)



图8 取出大脑 (20X)

用左手镊子夹住蜜蜂脑部,使其固定不动(图2),用右手镊子在蜜蜂脑部外围复眼处扎一小孔(图3),然后在小孔处沿着外围将几丁质划开(图4);(2)去除上部几丁质:左手镊子夹住喙几丁质边缘,右手镊子夹住划开处几丁质外壳(图5),向上掀起脑部上方几丁质,并挑起触角处的几丁质(图6);(3)取出脑部:掀掉上部几丁质后,脑部组织完全暴露出来(图7),右手镊子水平从蜜蜂脑后下方插入托起脑部组织(图8),使整个脑部组织完全位于镊子上方,再用镊子轻轻抬起,即可得到完整的脑组织,将获得的脑组织转移到载玻片上,放入准备好的抑制剂溶液中,预备进行下一步腺体和脑亚区的分离。

1.3.2 蜜蜂脑亚区分离

将已经取出的脑部组织放在滴有蛋白酶/RNA酶抑制剂溶液的载玻片上(图9),首先一次性分离左、

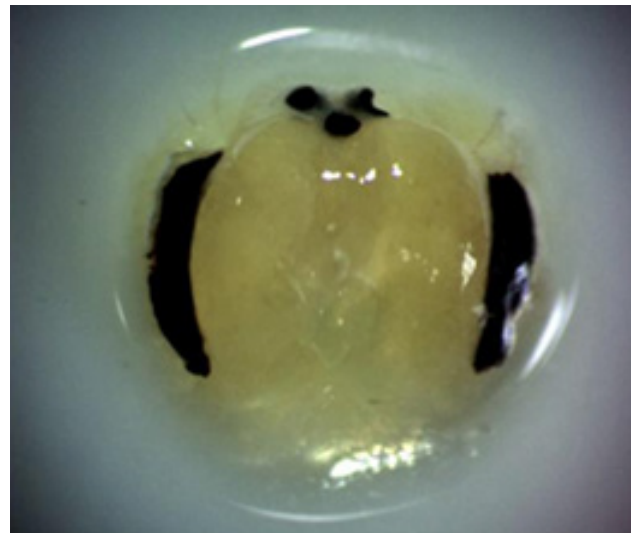
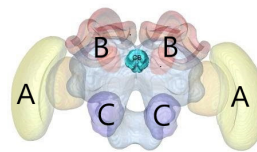
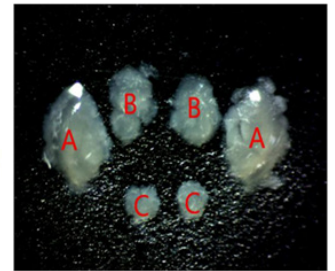


图9 完整的蜜蜂大脑 (20X)

图10 蜜蜂脑模拟图
(A 视神经叶, B 蘑菇体, C 触角神经叶)图10 蜜蜂脑分区
(A 视神经叶, B 蘑菇体, C 触角神经叶) (20X)

右两侧复眼,避免复眼破裂内容物流出使其他区域染上颜色;再剥离覆盖于脑部外层的白色膜;将两侧的视网膜分离,即可将两侧的视神经叶取出(图10A);去掉上侧单眼处物质,即可得到蘑菇体(图10B),嗅神经叶位于蘑菇体下部,去掉蘑菇体后剩余部分即为嗅神经叶,去掉周围少量的其他组织,就可得到完整干净的嗅神经叶(图10C)。

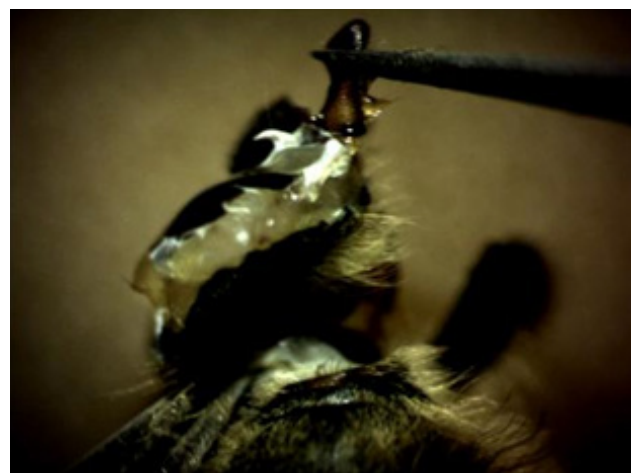


图11 取出上颚腺 (20X)

1.3.3 上颚腺、咽下腺和唾液腺的分离

上颚腺 (*Mandibular gland*) 位于脑部内上颚上面, 是一对囊状体, 开口于上颚基部两侧。上颚悬挂于头部口的两端, 紧接在上唇基部后面。上颚基部处有一凹窝为上颚腔, 有前后两个关节联系点与头部相连, 并有两条肌肉附着于活动轴的两对面, 使得上颚能左右活动。解剖时, 掀掉蜜蜂脑部几丁质后, 挑开连接在蜜蜂喙处上方的多余几丁质外壳, 夹住头部, 再用镊子夹住上颚腺体外的部位, 轻轻拔出即可 (图 11)。

咽下腺 (*Hypopharyngeal glands*) 是位于蜜蜂头部的一对外分泌腺体, 覆盖在蜜蜂脑上方 (图 9), 又称舌腺、营养腺或蜂王浆腺。咽下腺共有两条, 每条腺体由一条长而呈葡萄状的腺泡组成, 腺泡产生白色或淡黄色的蛋白质分泌物——蜂王浆。取咽下腺时, 要先将复眼去掉, 以免取出咽下腺时复眼破裂液体流出污染咽下腺和其他组织; 用镊子夹住咽下腺轻轻一拉便可拉出整条咽下腺, 再将黏附于咽下腺的杂质去掉, 就可得到干净的蜜蜂咽下腺组织 (图 13)。

唾液腺 (*Salivary glands*) 共两对, 分别为头唾液腺和胸唾液腺。头唾液腺位于蜜蜂头部背侧复眼底部左右各一串, 通常与咽下腺缠绕在一起。头唾液腺的形态与咽下腺有明显差别, 解剖时只需在剥离咽下腺后, 从中拉出唾液腺即可 (图 14)。

2 结果

2.1 脑分区

蜜蜂视神经叶 (*Optic lobe, OL*) 位于脑部两侧, 体积相对较大, 基本占蜜蜂脑体积一半以上, 实验中最先分离。首先去除复眼视网膜结构, 然后用镊子直接剥离视神经叶。

触角神经叶 (*Antennal lobe, AL*) 位于蜜蜂脑的正前方, 类似于球状结构, 是连接蜜蜂触角的区域, 也是蜜蜂的初级嗅觉中枢, 主要接收来自触角的气味信息, 再将信息传递给蘑菇体^[16]。由于触角神经叶较小, 容易丢失, 解剖过程中必须保证脑部组织的完整取出才能获得该部分。

蜜蜂的蘑菇体 (*Mushroom body, MB*) 约占大脑总体积的 19%, 共含有约 36800 个神经元, 占大脑神经元的 40%, 是蜜蜂的高级中枢^[17]。蘑菇体呈杯状结构, 又分成几个部分, 解剖时要保证其完整性。

2.2 上颚腺

对出房蜂、哺育蜂和采集蜂上颚腺比较发现, 出

房蜂上颚腺体呈透明状, 腺体内容物较少; 哺育蜂上颚腺腺体饱满呈淡黄色, 内容物多; 采集蜂上颚腺腺体也呈黄色, 干瘪且内容物少 (图 12)。

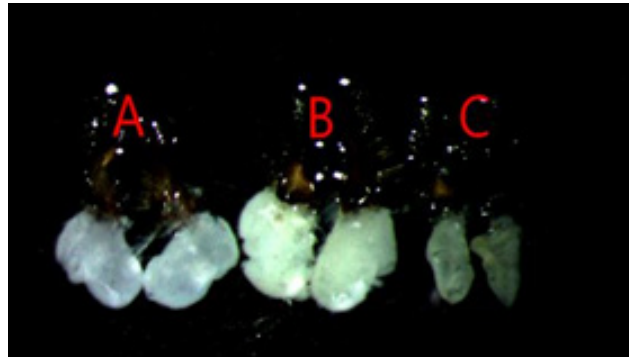


图12 蜜蜂不同日龄上颚腺
(A 出房蜂, B 哺育蜂, C 采集蜂) (20X)

2.3 咽下腺

不同日龄工蜂的咽下腺发育程度不同, 刚出房的工蜂咽下腺发育不完全, 腺体较小, 腺泡透明, 颜色呈白色 (图 13 A); 哺育蜂咽下腺腺泡饱满、圆润, 颜色呈淡黄色 (图 13 B); 采集蜂咽下腺腺泡较小, 内容物少, 外观较干瘪, 颜色呈深黄色 (图 13 C)。



A 出房蜂 B 哺育蜂 C 采集蜂
图13 蜜蜂不同日龄咽下腺 (20X)

2.4 唾液腺

出房蜂唾液腺与上颚腺、咽下腺发育阶段形态一致都较干瘪, 内容物少, 腺泡呈透明状; 哺育蜂唾液腺形态与出房蜂相比变化不显著; 而采集蜂唾液腺腺泡内容物增多, 颜色呈淡黄色 (图 14)。



A 出房蜂 B 哺育蜂 C 采集蜂
图14 蜜蜂不同日龄唾液腺 (20X)

3 讨论

3.1 影响蜜蜂解剖效率的因素

高效完整的蜜蜂解剖为更加精准的研究提供了重

要的基础。对于大部分昆虫来说,它们体积小,结构复杂,解剖更是一项具有挑战的任务。蜜蜂头部不足 1mm^3 ,总量小于 1mg ,切下解剖并不容易操作。在此,我们通过改进方法,探索出了更加简单和完整的解剖技术。

精准的解剖步骤决定样品质量。实验前应将蜜蜂使用 CO_2 麻醉,麻醉后放置到冰盒中以防止蜜蜂苏醒。在解剖过程中固定蜜蜂也很重要,固定蜜蜂应该选用两根昆虫针从蜜蜂胸部两侧倾斜插入,这样的固定不影响后续的解剖^[18]。实验中好的解剖工具能够达到事半功倍的效果,尤其是划几丁质的镊子,尖锐且较硬质的镊子较为顺手,容易划开几丁质,解剖用时最短样品质量越好。同时,经过长期冷冻或在室温久置的蜜蜂不易解剖;鲜活的未经过冷冻处理的蜜蜂,解剖蜂脑会更加容易,组织更加完全。在解剖蜂脑的过程中,应注意不要划破复眼,因为复眼内物质色深且易流出污染其他组织;正常操作时,镊子会触碰到几丁质,将头部绒毛和杂物带入,为避免污染,应及时用酒精棉擦拭干净。

3.2 不同日龄蜜蜂脑部组织存在区别

作为社会性昆虫,不同日龄的蜜蜂功能不同,所以发育阶段不同的蜜蜂脑在形态学上必然存在差异。为此,我们对工蜂出房蜂、哺育蜂和采集蜂脑部组织进行了多方面比较。从外部看,出房蜂、哺育蜂和采集蜂脑部大小没有明显差异。但是,解剖时发现它们的几丁质外壳硬度不同。几丁质也称壳多糖(chitin),为N-乙酰葡萄糖胺通过 β 连接聚合而成的结构同多糖,主要是用来作为支撑身体的骨架,以及对身体起保护的作用^[19]。出房蜂脑几丁质外壳较软,而哺育蜂和采集蜂几丁质坚硬,说明随着发育,蜜蜂脑壳逐渐变硬。几丁质外壳成分和结构随着日龄变化,这在蜜蜂寄生虫狄斯瓦螨中已有报道,即螨类在发育不同阶段利用不同的几丁质结构蛋白。但这种机制在蜜蜂中还没有相关研究。

剖开脑壳从内部看,工蜂出房蜂、哺育蜂和采集蜂脑内部组织状态也不同。整体来说,出房蜂脑内部体积较小,组织不饱满,颜色呈乳白色;哺育蜂脑内部腺体发达,各部位饱满,颜色呈淡黄色,脑部组织与咽下腺相比较小;采集蜂脑内部开始萎缩,腺体干瘪,咽下腺腺体呈深黄色。相比于采集蜂,出房蜂和哺育蜂脑内水分含量较高。

其次对蜜蜂脑各个亚区进行比较。蜜蜂脑亚区

主要包括蘑菇体、视神经叶和触角神经叶三部分,蘑菇体是蜜蜂的高级中枢^[17]。接收和处理来自外界的所有刺激,视神经叶和触角神经叶的信号最终都要经过蘑菇体处理,然后反馈或形成稳固的记忆。视神经叶主要接收和处理来自复眼的光信号,触角神经叶是蜜蜂的初级嗅觉中枢,主要接收来自触角的气味信息。三者功能明显不同,所以成功分离各个亚区对于深入研究局部功能有着重要作用,如:对中华蜜蜂和意大利蜜蜂上述三个亚区蛋白质组比较发现,蘑菇体中蛋白质主要对突触的塑造和长期记忆的形成具有重要作用,视神经叶上核糖核酸作为第二信使在视觉传导中起重要作用,而两者触角神经叶的蛋白质功能的显著差异才是决定中华蜜蜂嗅觉更加灵敏的原因^[20]。但是蜜蜂脑各个亚区体积太小,在体视镜下没有观察到三个时期蜜蜂蘑菇体、视神经叶和触角神经叶等亚器官有何差异,需要进一步通过生物学方法进行分析。

3.3 蜜蜂腺体的形态与其功能和日龄直接相关

上颚腺是蜜蜂重要的外分泌腺体,其分泌物是维系蜂群社会性结构的重要物质。虽然工蜂和蜂王的上颚腺结构相似,但其分泌物的组成和功能差别极大^[21]。蜂王上颚腺主要参与蜂王信息素的合成,包括9-ODA、顺-9-HDA、反-9-HDA以及10-HDA等物质,它们在蜂群发展和群内调控中发挥极其重要的作用。工蜂上颚腺分泌物的信息素类功能并不突出,而在蜂群营养等方面发挥着关键作用,例如在哺育蜂时期参与蜂王浆的合成^[20],因而腺体饱满充满内容物。

不同日龄蜜蜂咽下腺的形态不同,这与蜜蜂劳工分配密切相关。咽下腺是分泌蜂王浆的主要器官,这是哺育蜂的主要职能^[22]。哺育蜂的主要任务是饲喂幼虫,它们的咽下腺十分发达,即使都是哺育蜂,哺育能力强的工蜂咽下腺也比哺育能力弱的哺育蜂腺体发达^[23]。6~12日龄的工蜂,其咽下腺发育基本成熟,分泌活动最强,是分泌王浆高峰期^[24]。随着工蜂日龄的增加,到达采集蜂时期,其咽下腺逐渐萎缩退化,咽下腺已经失去分泌蜂王浆的能力^[25]。但是,工蜂咽下腺的发育却是可逆的,或者说工蜂咽下腺发育不受日龄的限制^[26]。研究表明,蜂群中缺少哺育蜂时,采集蜂会逆转为哺育蜂并饲喂幼虫,三天后其咽下腺活性增强^[27];而在无幼虫的蜂群中,哺育蜂的咽下腺虽然正常发育,其生理功能与越冬蜂群相似^[28]。咽下腺

发育的调节机制需要深入研究,所以完整解剖对后续研究具有重要意义。


蜜蜂头部唾液腺在不同日龄时期的形态变化与咽下腺和上颚腺却不完全一样,这与唾液腺的腺体功能和蜜蜂的社会劳动分工密切相关。唾液腺在采集蜂时期形态饱满,腺体发育成熟,这是由于蜜蜂在采集蜂时期外出采集花粉、花蜜,唾液腺需要分泌大量的唾液进入花粉和花蜜。唾液中的转化酶将花蜜主要的蔗糖转化为葡萄糖和果糖^[29]。

4 结论

本研究改进了蜜蜂脑部组织解剖的操作方法,一次性获得多个组织如:咽下腺、上颚腺、蘑菇体、视神经叶、嗅神经叶等,提高了解剖效率,也降低了实验样本的需求,为不同的研究工作提供优质的组织样品。本方法使用的解剖工具简单,只需要两把尖头镊子就可完成整个操作步骤。缩短了操作时间,还有效保证了组织样品中信息的完整,这也为蜜蜂的后续研究提供了有力的技术支撑。同时,初步比较了不同日龄工蜂主要腺体和脑亚区差异,这对进一步研究蜜蜂脑有一定帮助。

参考文献

[1] Slessor, K N, Winston, et al. Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.) [J]. Journal of Chemical Ecology, 2005, 31(11): 2731-2745.
[2] 郑火青, 胡福良. 蜜蜂—新兴的模式生物 [J]. 昆虫学报, 2009, 52(2): 210-215.
[3] Witthoft W. Absolute anzahl und verteilung der zellen im him der honigbiene [J]. Z. Morphol. Tiere, 1967, 61(1): 160-184.
[4] Weinstock, G M, Robinson, et al. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera* [J]. Nature, 2006, 443(7114): 931-949.
[5] Predel, Reinhard, Neupert, et al. Social behavior and the evolution of neuropeptide genes: lessons from the honeybee genome [J]. Bioessays, 2007, 29(5): 416-421.
[6] Collins A M. Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens [J]. Apidologie, 2000, 31(3): 421-429.
[7] Menzel R. The honeybee as a model for understanding the basis of cognition [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2012, 13(11): 758-768.
[8] 胡福良, 金水华, Randall Hepburn, 等. 意大利蜂多王群的组建及蜂王产卵力的观察 [J]. 昆虫学报, 2005, 48(3): 465-468.
[9] Randolph Menzel, Martin Giurfa. Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee [J]. Trends in Cognitive Sciences, 2001, 5(2): 62-71.
[10] Bloch G, Toma D P, Robinson. Behavioral rhythmicity, age, division of labor and period expression in the honey bee brain [J]. Journal of Biological Rhythms, 2001, 16(5): 444-456.

[11] Carreck N L, Andree M, Brentv C S, et al. Standard methods for *Apis mellifera* anatomy and dissection [J]. Journal of Apicultural Research, 2013, 52(4): 1-40.
[12] 赵元洪, 赵晓蒙, 苏松坤. 蜜蜂全脑解剖新方法的研究 [J]. 中国蜂业, 2014, 65: 4-7.
[13] 李兆英, 奚耕思, 严红蕾. 中华蜜蜂雄蜂脑部组织结构观察 [J]. 昆虫知识, 2009, 46(1): 121-124.
[14] 吴国云, 韩旭, 何旭江. 蜜蜂脑的神经解剖结构 [J]. 蜜蜂杂志, 2014(2): 11-13.
[15] 赵慧霞, 郑火青, 胡福良. 蜜蜂大脑的分区与功能 [J]. 应用昆虫学, 2012, 49(5): 1385-1391.
[16] Hadi Maboudi, Hideaki Shimazaki, Martin Giurfa, et al. Olfactory learning without the mushroom bodies: Spiking neural network models of the honeybee lateral antennal lobe tract reveal its capacities in odour memory tasks of varied complexities [J]. PLoS Computational Biology, 2017, 13(6): e1005551.
[17] Darren Smith, Jan Wessnitzer, Barbara Webb. A model of associative learning in the mushroom body [J]. Biological Cybernetics, 2008, 99(2): 89-103.
[18] 吴琼, C.van Achterberg, 陈学新. 膜翅目昆虫针插标本制作 [J]. 应用昆虫学报, 2017, 54(2): 340-345.
[19] 杨典洱, 林晓怡, 王艳丽, 等. 壳多糖抑制细菌生长的构效关系 [J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(7): 1277-1281.
[20] Meng L F, Huo X M, Li J K, et al. Proteomics reveals the molecular underpinnings of stronger learning and memory in eastern compared to western bees [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2018, 17(2): 255-269.
[21] 吴雨祺, 蔺哲广, 郑火青, 等. 蜜蜂上颚腺及其分泌物研究进展 [J]. 昆虫学报, 2015, 58(8): 911-918.
[22] 蔡芳, 陶挺, 陈盛禄, 等. 蜜蜂咽下腺分泌生理研究进展 [J]. 中国蜂业, 2008, 59(4): 14-16.
[23] Li J K, Feng M, Begna D, et al. Proteome comparison of hypopharyngeal gland development between Italian and royal jelly-producing worker honeybees (*Apis mellifera* L.) [J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(12): 6578-6594.
[24] 程艳华, 刘亚男, 胡福良, 等. 蛋白质营养水平对工蜂初生重和咽下腺发育的影响 [J]. 中国蜂业, 2008, 59(12): 11-13.
[25] Deseyn J, Billen J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae) [J]. Apidologie, 2005, 36(1): 49-57.
[26] 方兵兵. 蜜蜂咽下腺 [J]. 中国蜂业, 2009, 60(2): 53-54.
[27] Ohashi K, Sasaki M, Sasagawa H, et al. Functional flexibility of the honey bee hypopharyngeal gland in a dequeened colony [J]. Zoological Science, 2000, 17(8): 1089-1094.
[28] Ali H, Alqarni A S, Iqbal J, et al. Effect of season and behavioral activity on the hypopharyngeal glands of three honey bee *Apis mellifera* L. races under stressful climatic conditions of central Saudi Arabia [J]. Journal of Hymenoptera Research, 2019, 68: 85-101.
[29] 杨朝环. 中蜂的形态解剖基础知识(三)—蜜蜂的外分泌腺、呼吸系统 [J]. 蜜蜂杂志, 1997(12): 14-15. 

编辑: 李瑞珍