

中华蜜蜂卵表面微观结构及化学成分初步研究

颜伟玉, 曾志将*, 吴小波, 刘益波

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

摘要: 为认识蜜蜂的工蜂监督机制, 利用扫描电镜分别观察了中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 不同类型卵(蜂王产的受精卵、未受精卵以及工蜂产的未受精卵)的表面超微结构, 同时用气-质联用技术测定了各类型卵新产卵(0 h)和5 h卵的表面化学信息素成分。结果表明: 中华蜜蜂3种卵表面均覆有六边形的结构, 结构内充满小突起, 3种卵的大小及表面超微结构无显著差异。受精卵表面化学信息素种类比未受精卵更为丰富, C27:2 和 C27:1 可能是卵带有的标记化学信息素。

关键词: 中华蜜蜂; 卵; 微观结构; 化学成分; 工蜂监督

中图分类号: Q968.1 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2009)01-116-05

A preliminary study on the ultrastructure and chemical components of egg surface of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*

YAN Wei-Yu, ZENG Zhi-Jiang*, WU Xiao-Bo, LIU Yi-Bo (Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: To understand the worker policing mechanism of honeybees, we compared the surface ultrastructure of queen-laid diploid and haploid eggs of *Apis cerana cerana* to that of worker-laid eggs using SEM and conducted a detailed comparative analysis on chemical components of newly laid (0 h) and 5 h eggs of various types by GC-MS. The results show that the egg surface is covered with an outer layer typified by hexagonal structures filled with small nodules and there are no differences between different types of eggs. The chemical components coating queen eggs, diploid and haploid, are more abundant than those of workers. C27:2 and C27:1 may be the chemical pheromones on the egg surface.

Key words: *Apis cerana cerana*; egg; ultrastructure; chemical components; worker policing

蜜蜂社会行为学特性一直受到广大生物学家关注,其原因一方面是人们意识到蜜蜂给农作物授粉的重要性,另一方面是蜜蜂社会行为学研究对整个社会行为生物学领域有深远影响(黄智勇, 1992; 曾志将, 2003; 杨冠煌, 2005; 郭冬生等, 2007; 姜玉锁等, 2007)。近20年来,蜂群中工蜂监督一直是蜜蜂社会行为研究的热门课题。工蜂监督是指工蜂通过某种行为或机制来限制其他工蜂产卵。大量研究表明:西方蜜蜂 *Apis mellifera*、小蜜蜂 *Apis florea*、黄蜂 *Vespa vulgaris* 都存在工蜂监督行为(Ratnieks and Kvesscher, 1989; Halling *et al.*, 2001; Foster and Ratnieks, 2004)。有研究表明:中

华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 群内同样存在着工蜂监督现象(谢宪兵等, 2007),蜜蜂分子生物学研究也为中华蜜蜂群内存在工蜂监督行为提供了有力证据(Su *et al.*, 2005; 谢宪兵等, 2008)。

工蜂监督机制尚不清楚,工蜂要进行工蜂产卵相互监督,工蜂显然必须辨别出蜂王与工蜂产的卵。目前对于工蜂是如何辨别蜂王产的卵与工蜂产的卵有两种学术观点,一是认为蜂王产的未受精卵与工蜂产的未受精卵表面形态可能存在结构差异;二是蜂王产的未受精卵可能带有标记的化学信息素,而工蜂产的未受精卵却没有这种标记的化学信息素(Ratnieks, 1995; Katzav-Gozansky *et al.*, 2003;

基金项目:国家自然科学基金项目(30560114;30760035)

作者简介:颜伟玉,女,1978年2月生,江西玉山人,讲师,博士研究生,主要从事蜜蜂教学与研究工作, E-mail: yanbees@mail.jxau.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: bees1965@sina.com

收稿日期 Received: 2008-03-03; 接受日期 Accepted: 2008-12-07

Martin *et al.*, 2004)。至目前为止, 还未见有关中华蜜蜂这方面的研究报道。鉴于此, 我们研究了中华蜜蜂蜂王产的受精卵(queen-laid diploid eggs, QD)、未受精卵(queen-laid haploid eggs, QH)以及工蜂产的未受精卵(worker-laid haploid eggs, WH)的微观形态和卵表面化学成分, 初步探讨了中华蜜蜂工蜂监督机制, 现总结报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验蜂群: 江西农业大学蜜蜂研究所自然条件下饲养的中华蜜蜂。

1.1.2 主要试剂: 正己烷(色谱纯, 上海凌峰化学试剂有限公司), 戊二醛(分析纯, 天津市津宇精细化工有限公司), 二十烷烃(色谱纯, 购于 Sigma 公司, 为进口分装)等。

1.2 实验方法

1.2.1 3种卵的取样: 在2007年3月至5月份期间选取群势在4~5脾的3群蜂, 用中蜂隔王板将蜂王固定在一张已经工蜂清理的空工蜂巢脾上产卵, 每隔2h观察蜂王是否在空工蜂巢脾上产卵。若蜂王已在空工蜂巢脾上产卵(0h), 抖落巢脾上的蜜蜂, 用不锈钢移卵器(购自德国)快速取5~6个蜂王产的受精卵放入装有4%戊二醛固定液的样品瓶中保存, 供电镜扫描的观察卵的形态使用。同时用不锈钢移卵器移取蜂王产的10只受精卵放入装有100 μ L正己烷的样品瓶中浸泡10min, 吸取液体转移至另一样品瓶中, 同时加入浓度为50ng/ μ L的标样二十烷烃(C20)5 μ L。每群分别取平行样3个, 标记好放入-26 $^{\circ}$ C冰箱冷冻保存, 供分析卵的表面化学成分使用。

当取完0h卵后, 马上把产了卵的工蜂巢脾放入35 $^{\circ}$ C培养箱, 5h时按以上同样的方法取蜂王产的5h受精卵样品。用空雄蜂巢脾代替空工蜂巢脾, 取蜂王产的未受精卵, 方法同上。

当取完所需的蜂王产的受精卵或未受精卵样品后, 从蜂群中取出2~3脾工蜂组成无王群, 每天除去蜂群中出现的急造王台, 直至蜂群内工蜂开始产卵。同样按以上方法取研究需要的0h和5h工蜂产的未受精卵样品。

1.2.2 3种卵表面超微结构分析: 把以上经4%戊二醛固定液中固定的卵, 每个样品随机取3个卵经磷酸缓冲液冲洗, 1%锇酸固定液中固定2h, 经磷酸

缓冲液冲洗, 逐级丙酮脱水, 醋酸戊酯置换, 日立IB-3型离子溅射仪喷金, 日立S-570扫描电镜观察照相, 并按照相上的尺寸, 计算3种卵的长度。每种类型的卵重复3次(每个卵只做1次)。

1.2.3 3种卵表面化学信息素成分分析: 经美国Finni-gan Voyager GC-MS仪分析3种卵表面化学信息素成分。色谱柱HP-5MS(30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m)。载气为氦气, 载气流量1mL/min, 分流比10:1, 进样器温度250 $^{\circ}$ C, 检测器温度250 $^{\circ}$ C, 流速1mL/min, 升温程序: 柱初温60 $^{\circ}$ C(5min), 程序升温20 $^{\circ}$ C/min至180 $^{\circ}$ C, 然后升温5 $^{\circ}$ C/min至250 $^{\circ}$ C, 最高柱温350 $^{\circ}$ C。电离方式E1, 电离能70eV; 离子源温度250 $^{\circ}$ C, 扫描范围40~450u。标准谱库为美国NIST02.L。(每个样品只测定1次, 每种类型的卵重复3次)

1.3 数据分析

实验数据采用StatView软件“ANOVA and *t*-test”中的“ANOVA or ANCOVA”进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 3种卵的大小与表面超微结构

蜂王产的受精卵和未受精卵长分别为1.29 \pm 0.05mm和1.27 \pm 0.02mm, 工蜂产的未受精卵长为1.32 \pm 0.08mm, 3种卵长度差异不显著($P > 0.05$)。从图1可见, 3种卵的表面结构非常相似, 均为圆柱状(图1:A, D, G)。卵表面均覆有六边形结构(图1:B, E, H), 六边形内布满直径为0.5~1 μ m的小突起(图1:C, F, I)。

2.2 3种卵表面化学成分分析

从表1可见, 蜂王和工蜂卵表面的化学成分主要是C21至C29的烷烃和烯烃类化合物, 烃类化合物中以烷烃C23, C25, C27和C29为主; 0h和5h时, 蜂王产的受精卵表面化学信息素种类比蜂王产的未受精卵和工蜂产的未受精卵更为丰富, 即受精卵表面化学信息素种类比未受精卵更为丰富; 在0h和5h这两个不同的时间段, 3种卵表面化学成分种类和含量有所变化, 但没有显著性变化规律。

3种类型的卵表面化学成分在种类上存在差异, 蜂王产的受精卵和未受精卵表面均含有C27:2和 α -C27:1, 而工蜂产的未受精卵表面却含另一种物质 γ -C27:1。

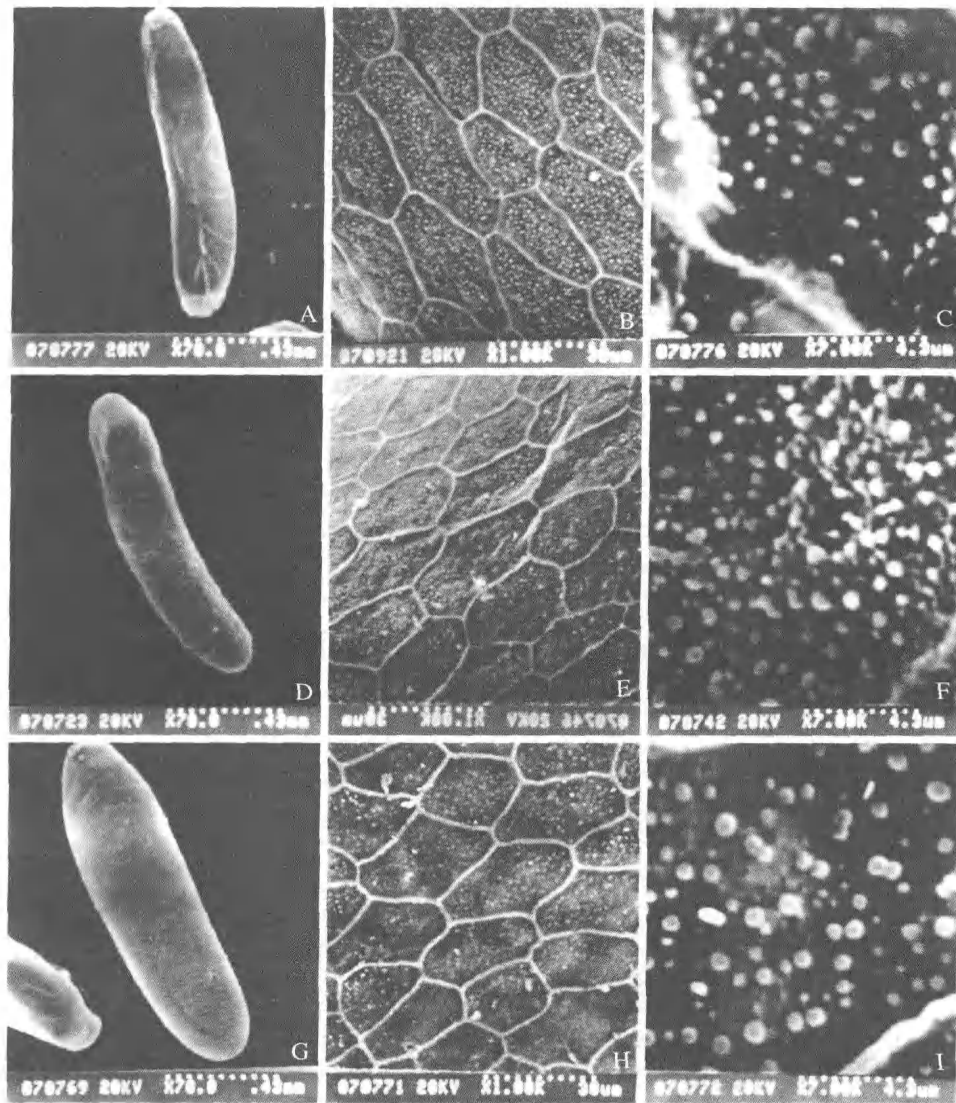


图1 中华蜜蜂卵的超微结构

Fig. 1 Ultrastructure of egg surface of *Apis cerana cerana*

A - C: 蜂王产的受精卵 Queen-laid fertilized egg; D - F: 蜂王产的未受精卵 Queen-laid unfertilized egg; G - I: 工蜂产的未受精 Worker-laid unfertilized egg.

3 讨论

本文利用扫描电镜对中华蜜蜂3种卵进行表面超微结构扫描,发现3种卵长度及微观结构并无显著差异,且卵表面都覆盖有六边形结构,六边形内充满许多小突起,这与西方蜜蜂的一些研究结果相似(John, 2002; Katzav-Gozansky *et al.*, 2003)。

虽然西方蜜蜂工蜂监督机制研究较多,但是仍未发现工蜂在卵辨别中起作用的化学信息素。有研究通过分析卵表面的碳氢化合物差异表明 C25 和 C27 可能作为西方蜜蜂工蜂辨别卵类型的关键成分(Martin *et al.*, 2004),但是前期的研究结果并不支持这种结论(Martin *et al.*, 2002; Katzav-Gozansky *et*

al., 2003)。有实验证明蜜蜂能识别出直链烷烃 C23 和 C25 的特定比例混和物,但不能识别两种纯的化合物(Getz and Smith, 1987)。物质结构差异在化合物功能上可能起不同作用(Dani *et al.*, 2003)。

中华蜜蜂工蜂监督研究表明,在4 h时蜂王产的受精卵和未受精卵剩余率都显著高于工蜂产的未受精卵(谢宪兵等,2007)。若要从化学信息素角度来解释工蜂监督结果,有2种可能:一是蜂王产的受精卵和未受精卵可能带有标记化学信息素,而工蜂产的未受精卵却没有这种标记化学信息素;二是工蜂产的未受精卵本身可能带有标记化学信息素,而蜂王产的受精卵和未受精卵却没有这种标记化学信息素。这样工蜂就很容易辨别出蜂王产的卵与工蜂产的卵。

表 1 中华蜜蜂蜂王和工蜂卵表面的化学成分比较

Table 1 Comparison of the chemical components on the egg surface of worker and queen honeybee, *Apis cerana cerana*

波峰 Peak	峰保留时间 Peak retention time (min)	化学成分 Chemical components	0 h (ng)			5 h (ng)		
			QD	QH	WH	QD	QH	WH
1	34.98	C20	250	250	250	250	250	250
2	36.84	C21	10.95 ± 3.11	*	-	26.24 ± 3.25	-	6.96 ± 2.36
3	38.63	C22	8.24 ± 1.96	-	-	32.77 ± 4.50	-	4.68 ± 1.06
4	40.36	C23	75.17 ± 10.89ab	62.86 ± 9.27a	90.56 ± 12.93b	112.09 ± 9.23A	55.18 ± 3.51B	106.58 ± 19.85A
5	42.00	C24	15.18 ± 5.92	-	*	57.23 ± 18.68	-	11.78 ± 3.28
6	43.11	C25:1	27.03 ± 9.59	19.54 ± 3.06	-	31.75 ± 0.02	20.06 ± 4.93	*
7	43.59	C25	238.30 ± 36.76	247.28 ± 44.29	241.218 ± 47.50	299.19 ± 9.34	256.23 ± 27.77	239.22 ± 91.01
8	44.41	未知 Unknown	7.48 ± 4.17	12.43 ± 3.92	*	*	*	15.84 ± 9.47
9	45.66	C26	16.27 ± 3.40	*	34.62 ± 17.16	66.02 ± 11.23A	11.54 ± 2.83B	25.81 ± 12.13B
10	45.83	C27:2	15.96 ± 5.91	14.86 ± 3.94	-	15.21 ± 1.50	10.57 ± 0.84	-
11	46.16	x-C27:1	130.91 ± 32.06	136.83 ± 26.98	-	129.94 ± 8.20	142.45 ± 7.77	-
12	46.23	y-C27:1	-	-	43.13 ± 8.77	-	-	43.21 ± 25.16
13	46.59	C27	133.34 ± 27.42A	184.21 ± 77.71A	367.69 ± 60.78B	240.61 ± 7.85	273.01 ± 70.69	333.46 ± 140.88
14	48.00	C28	19.84 ± 4.10	-	26.588 ± 21.32	75.39 ± 21.42	13.01 ± 0.71	15.23 ± 12.98
15	48.60	未知 Unknown	14.44 ± 13.36	-	21.31 ± 3.14	14.78 ± 3.62	*	*
16	49.38	C29	45.61 ± 6.60a	32.34 ± 3.04a	41.97 ± 22.30a	113.67 ± 17.56A	30.04 ± 3.93B	29.05 ± 20.41B

* 表示少量(含量少于 1 ng); - 表示无;不同样本色谱图中时间误差在 0.05 min 内的视为同一波峰。同一行相同时间段中,不同的大、小写字母分别表示在 1% 和 5% 水平上存在差异显著性。*: A low amount (less than 1 ng); -: Not detectable. The peak retention time error within 0.05 min can be looked as the same chemical in different sample chromatograms. At the same time of one line, the capital and small letters indicate the 1% and 5% significant difference respectively.

本研究发现的 C27:2、x-C27:1 和同分异构体 y-C27:13 种二十七碳烯炔,前一种为含 2 个双键的烯炔,后二种为含 1 个双键的烯炔同分异构体。烯炔由于双键的存在,因此比直链烷烃含有更丰富的信息,较适合作为蜜蜂卵的信息素成分。显然,确定这 3 种二十七碳烯炔双键的位置并进一步进行行为学研究,将有助于人们揭示中华蜜蜂的工蜂监督机制。

致谢 在实验过程中,得到了南昌大学电镜室余杨帆老师以及南昌大学分析测试中心气-质联用分析室鄢爱平老师帮助和指导,在此一并表示衷心感谢。

参 考 文 献 (References)

Dani FR, Jones GR, Morgan ED, Turillazzi S, 2003. Re-evaluation of the chemical secretion of the sternal glands of *Polistes* social wasps (Hymenoptera: Vespidae). *Ethology Ecology and Evolution*, 15: 73-82.

Foster KR, Ratnieks FLW, 2004. Facultative worker policing in a wasp.

Nature, 407: 692-693.

Getz WM, Smith KB, 1987. Olfactory sensitivity and discrimination of mixtures in the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology A*, 160: 239-245.

Guo DS, Sun LX, Zeng ZJ, Zhang QL, 2007. Sperm-mediated *egfp* gene transfer in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 50(9): 878-882. [郭冬生,孙亮先,曾志将,张巧利,2007. 中华蜜蜂精子介导 *egfp* 基因转移. 昆虫学报, 50(9): 878-882]

Halling L, Oldroyd BP, Patimus B, Wattanachaiyingcharoen W, Barron AB, Nanork P, Wongsiri S, 2001. Worker policing in the bee *Apis florea*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49(6): 509-513.

Huang ZY, 1992. The advancement of honeybee ecology. In: Liu JG ed. *The Conceptus of Modern Ecology*. China Science and Technology Press, Beijing. 198-205. [黄智勇,1992. 蜜蜂生态学进展. 见:刘建国主编. 当代生态学博论. 北京:中国科学技术出版社. 198-205]

Jiang YS, Liu WZ, Zhang CX, Qiao LY, Zhu WJ, Zhang GX, Guo CJ, 2007. AFL Panalysis of genetic diversity of *Apis cerana* Fabricius distributed in different geographic areas in China. *Acta Entomologica*

- Sinica*, 50(2): 144 - 152. [姜玉锁, 刘文忠, 张春香, 乔利英, 朱文进, 张桂贤, 郭传甲, 2007. 中国境内不同地区型东方蜜蜂遗传多样性的 AFLP 分析. 昆虫学报, 50(2): 144 - 152]
- John W, 2002. Social insects: The police state. *Nature*, 416: 782 - 784.
- Katzav-Gozansky T, Soroker V, Kamer J, Schulz C, Francke W, Hefetz A, 2003. Ultrastructural and chemical characterization of egg surface of honeybee worker and queen-laid eggs. *Chemoecology*, 13: 129 - 134.
- Martin SJ, Jones GR, Chaline N, Middleton H, Ratnieks FLW, 2002. Reassessing the role of the honeybee (*Apis mellifera*) Dufour's gland in egg marking. *Naturwissenschaften*, 89: 528 - 532.
- Martin SJ, Chaline N, Oldroyd BP, Jones GR, Ratnieks FLW, 2004. Egg marking pheromones of anarchistic worker honeybees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology*, 15(5): 839 - 844.
- Ratnieks FLW, Kvesscher P, 1989. Worker policing in the honeybee. *Nature*, 342: 796 - 797.
- Ratnieks FLW, 1995. Evidence for a queen-produced egg-marking pheromone and its use in worker policing in the honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 34(1): 31 - 37.
- Su SK, Albert S, Chen SL, 2005. Molecular cloning and analysis of four cDNAs from the heads of *Apis cerana cerana* nurse honeybees coding for major royal jelly proteins. *Apidologie*, 36(3): 389 - 401.
- Xie XB, Xue YB, Wu XB, Huang K, Zeng ZJ, 2007. A study on the worker policing in *Apis cerana cerana*. *Journal of Jiangxi Agricultural University*, 29(5): 818 - 820. [谢宪兵, 薛运波, 吴小波, 黄康, 曾志将, 2007. 中华蜜蜂群内工蜂监督研究. 江西农业大学学报, 29(5): 818 - 820]
- Xie XB, Su SK, Huang K, Zeng ZJ, 2008. Queen mating frequency and maternity of drones in honeybee colonies detected with VNTR molecular markers. *Acta Entomologica Sinica*, 51(1): 20 - 25. [谢宪兵, 苏松坤, 黄康, 曾志将, 2008. 利用 VNTR 分子标记鉴定蜜蜂群内蜂王交配次数和雄蜂母系来源. 昆虫学报, 51(1): 20 - 25]
- Yang GH, 2005. Harm of introducing the western honeybee *Apis mellifera* L. to the Chinese honeybee *Apis cerana* F. and its ecological impact. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 401 - 406. [杨冠煌, 2005. 引入西方蜜蜂对中蜂的危害及生态影响. 昆虫学报, 48(3): 401 - 406]
- Zeng ZJ, 2003. Apiculture. China Agriculture Press, Beijing. 55 - 60. [曾志将, 2003. 养蜂学. 北京: 中国农业出版社. 55 - 60]

(责任编辑: 袁德成)