

中华蜜蜂与意大利蜜蜂蜂王体表信息素含量比较*

吴小波** 田柳青 潘其忠 曾志将***

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

摘要 【目的】分析中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 与意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 蜂王不同时期的体表信息素含量变化, 探索两蜂种之间蜂王交尾干扰机理。【方法】本试验通过 GC-MS 检测并分析了中华蜜蜂蜂王和意大利蜜蜂蜂王刚出房、性成熟时期以及婚飞过程中体表信息素含量变化。【结果】研究表明: 中华蜜蜂性成熟蜂王在飞行过程中, 其体表 9-ODA 含量显著高于刚出房蜂王, 9-HDA 显著高于刚出房蜂王和性成熟蜂王; 意大利蜜蜂飞行蜂王在 9-ODA 含量也显著高于刚出房蜂王。另外, 意大利蜜蜂性成熟期蜂王在 9-ODA、9-HDA、10-HDA 含量显著高于中华蜜蜂蜂王, 而两蜂种蜂王体表信息素在婚飞时期差异不显著。【结论】同种蜂王不同发育时期, 其体表信息素含量存在差异; 中华蜜蜂蜂王与意大利蜂王在婚飞过程中, 其体表信息素差异不显著, 但部分体表信息素在性成熟而未进行婚飞时差异显著。

关键词 中华蜜蜂, 意大利蜜蜂, 蜂王, 信息素

Comparison of pheromone content on the body surfaces of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* queens

WU Xiao-Bo** TIAN Liu-Qin PAN Qi-Zhong ZENG Zhi-JIANG***

(Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract [Objectives] To compare pheromones on the surface of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* queens across different life stages and explore the mechanism of queen mating interference between the two species. [Methods] The components of pheromones on the surface of newly emerged queens, sexually-mature queens and queens engaged in mating-flights were analyzed by GC-MS. [Results] The results were as follows: in *A. c. cerana* colonies, 9-ODA was significantly higher in queens engaged in mating-flights than in newly emerged queens while 9-HDA was significantly higher in queens engaged in mating-flights than in newly emerged and sexually mature queens. In *A. m. ligustica* colonies, 9-ODA was significantly higher in queens engaged in mating-flights than in newly emerged queens. In addition, 9-ODA, 9-HDA and 10-HDA were significantly higher on the body surface of sexually mature *A. m. ligustica* queens than on sexually mature *A. c. cerana* queens, but queens engaged in mating-flights had no significant between-species difference in the amount of these pheromones. [Conclusion] The quantities pheromones of *A. c. cerana* and *A. m. ligustica* queens change during maturation and the content of some pheromones was slightly different in sexually mature queens of these two species. No significant between-species difference in pheromones was detected in queens performing mating flights.

Key words *Apis cerana cerana*, *Apis mellifera ligustica*, queen, pheromones

* 资助项目: 江西农业大学青年科学基金项目 (2010-09003303); 国家自然科学基金项目 (31060327)

** E-mail: wuxiaobo21@163.com

***通讯作者, E-mail: bees1965@sina.com

收稿日期: 2014-05-30, 接受日期: 2014-10-09

蜜蜂信息素是蜜蜂之间化学通讯以及蜜蜂与其他生物之间化学联系的重要媒介。对雌性蜜蜂信息素的研究,不仅可以为蜂群内部信息素传递途径的研究提供新思路,还可以通过合成一些雌性蜜蜂信息素来建立或抑制蜂群,刺激蜂群采集花粉和哺育幼虫,在养蜂业和农业上有广泛的应用前景。早在 20 世纪 50 年代,学者就已经开始对雌性蜜蜂信息素进行了研究并发现,蜂王信息素的主要成分为:反式 9-氧代-2-癸烯酸(简称为 9-ODA)、9-羟基-2-癸烯酸(+9-HDA 和 -9-HDA)、对羟基苯甲酸甲酯(HOB)、4-羟基-3-甲氧苯基乙醇(HVA)。后来又鉴定出 4 种蜂王物质新成分:甲基油酸盐(MO)、松柏醇(CA)、十六烷-1-醇(PA)和亚麻酸(LEA)(Keeling *et al.*, 2003)。工蜂主要释放工蜂信息素,其主要成分为:反式-10-羟基-2-癸烯酸(10-HDA), 10-羟基-癸酸(10-HDAA), 癸 2 酸(C10:0DA), 反式-2-癸烯酸(C10:1DA)等(苏荣, 1995; 孟宪佐, 1997; 苏松坤和陈盛禄, 2000; 胡福良和玄红专, 2004; 曾志将和黄康, 2008; 吴小波等, 2012)。

中华蜜蜂是我国的宝贵资源,但自 1896 年中国引进西方蜜蜂 100 多年以来,西方蜜蜂已使我国原来呈优势分布的中华蜜蜂受到严重危害,分布区域缩小 75%以上,种群数量减少了 80%以上(杨冠煌, 2005)。学者推测可能是处女蜂王交尾时,中华蜜蜂处女蜂王分泌性引诱信息素不但会吸引中华蜜蜂的雄蜂来交尾,而且同时吸引大量西方蜜蜂的雄蜂,这样西方蜜蜂的雄蜂会严重干扰中华蜜蜂蜂王与中华蜜蜂雄蜂正常交配,从而使中华蜜蜂蜂王交尾成功率大幅度下降(李位三, 1991, 1993; 王启发等, 2003)。另外,在澳大利亚,亚洲蜜蜂也会干扰西方蜜蜂蜂王的交配(方兵兵, 2011),其具体干扰机理有待于进一步研究与明确。另外,有趣的是性成熟处女蜂王在蜂群内不会吸引雄蜂进行交配,但在空中进行婚飞时却能吸引雄蜂与之交配(吴小波等, 2012)。处女蜂王的婚飞过程肯定对蜂王的生理以及基因表达调控具有明显的影响,研

究发现:婚飞对性成熟处女蜂王的基因表达等具有明显的影响(吴小波等, 2013a, 2013b; Wu *et al.*, 2014),但婚飞过程中蜂王体表信息含量是否有变化尚未揭开。鉴于此,本文以中华蜜蜂及意大利蜜蜂处女王在婚飞交尾过程中会吸引雄蜂进行交配而在蜂群内却不会吸引雄蜂交尾以及两蜂种蜂王之间存在交尾干扰为切入点,分析了蜂王不同时期信息素含量的变化。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

试验蜂群为江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Fabricius (简写 ACC) 和意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spin (简写 AML)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的采集 按照标准的人工育王方法培育中华蜜蜂蜂王和意大利蜜蜂蜂王(曾志将, 2009),待蜂王羽化出房后,分别采集刚出房的中华蜜蜂和意大利蜜蜂蜂王样品。同时让剩余蜂王进一步发育,处女蜂王出房 12 d 后,分别采集中华蜜蜂和意大利蜜蜂性成熟处女蜂王样品。另外,分别将 6 只中华蜜蜂蜂王和意大利蜜蜂处女蜂王分别放入含有几百头雄蜂和工蜂的网罩(长×宽×高=3 m×4 m×5 m)中飞行 20 min 后,立即采集飞行性成熟蜂王(吴小波等, 2013a, 2013b)。样品采集后立即放入含有 800 μ L 甲醇的样品瓶中浸泡 24 h,提取体表信息素,用于气相-质谱检测。每组 6 个平行样。

1.2.2 检测条件

1.2.2.1 色谱条件

(1) 色谱柱 DB-1701MS (30 m×0.25 mm×0.25 μ m) 石英毛细管柱,或相当者;

(2) 色谱柱温度:初始温度为 100 $^{\circ}$ C,保持 2 min,以 10 $^{\circ}$ C/min 升温至 270 $^{\circ}$ C,保持 3 min;

(3) 进样口温度:280 $^{\circ}$ C;

- (4) 载气: 氦气, 纯度 $\geq 99.999\%$, 流速
1.2 mL/min, 恒流模式;
(5) 进样方式: 不分流进样;
(6) 进样量: 1 μ L。

1.2.2.2 质谱条件

- (1) 传送线温度: 280 $^{\circ}$ C;
(2) 离子源温度: 230 $^{\circ}$ C;
(3) EI 电压: 70 eV;
(4) 检测方式: SIM;
(5) 选择离子及相对丰度见表 1。

2 结果与分析

2.1 中华蜜蜂蜂王体表信息素的含量

试验结果如表 2 所示。从表 2 中可以看出, 中华蜜蜂性成熟蜂王飞行过程中, 其体表 9-ODA 含量显著高于刚出房蜂王, 9-HDA 显著高于刚出房蜂王和性成熟蜂王; 另外 6 种信息素含量在 3 种生理状态之间差异不显著。有趣的是蜂王在性成熟期, 其体表信息素成分中没有 C10:0DA。

表 1 目标化合物参考保留时间、定性定量离子及相对丰度比

Table 1 The reference retention time, ion and relative abundance of target silylation products

序号 Number	信息素 Pheromones	参考保留时间 (min) Reference retention time	定量离子 (m/z) Quantitative ions	定性离子 1 (m/z) Qualitative ions 1	定性离子 2 (m/z) Qualitative ions 2
1	HVA	9.27	227 (100*)	129 (65)	143 (35)
2	8-HOAA	9.82	209 (100*)	224 (59)	193 (27)
3	C10:1DA	10.45	289 (88*)	273 (55)	199 (100)
4	C10:0DA	11.80	209 (100*)	312 (27)	73 (60)
5	9-HDA	12.48	117 (100*)	147 (23)	315 (6)
6	9-ODA	12.73	75 (100*)	81 (55)	241 (4)
7	10-HDA	13.26	147 (100*)	225 (33)	315 (43)
8	HOB	13.81	73 (100*)	215 (22)	331 (37)

“*”表示定量离子, () 括号里的数字表示各离子的丰度, 丰度最高的离子为 100, 其它离子括号里的数字按比例计算。
*indicates the quantitative ion and the figures in brackets indicate the abundance of each ion. The highest ion abundance is identified as 100, and the figures in brackets of the other ion are calculated according to the proportion.

表 2 中华蜜蜂蜂王体表信息素的含量 (μ g)

Table 2 The content of pheromones on the body surface of queens *Apis cerana cerana* (μ g)

信息素 Pheromones	刚出房蜂王 Newly emerged queens	性成熟蜂王 Sexual matured queens	飞行性成熟蜂王 Mating flight queens
8-HOAA	69.41 \pm 8.03	69.10 \pm 6.63	66.63 \pm 2.62
HVA	151.79 \pm 56.65	119.20 \pm 0.83	120.41 \pm 1.84
C10:1DA	198.13 \pm 50.67	222.59 \pm 1.85	221.00 \pm 1.46
C10:0DA	208.43 \pm 3.32	0	0
9-ODA	418.28 \pm 4.55a	510.81 \pm 103.93ab	526.50 \pm 43.53b
9-HDA	158.92 \pm 30.66a	180.42 \pm 31.55a	278.74 \pm 79.52b
10-HDA	147.24 \pm 10.86	154.87 \pm 15.70	153.87 \pm 11.70
HOB	270.95 \pm 15.53	295.47 \pm 16.28	307.82 \pm 40.31

同一行数据后标有不同字母表示差异显著 (t -检验, $P < 0.05$)。下表同。

Data with different letters in the same raw indicate significant difference at 0.05 level by t test. The same below.

2.2 意大利蜜蜂蜂王体表信息素的含量

试验结果如表 3 所示,从表 3 中可以看出,意大利蜜蜂性成熟飞行蜂王在 9-ODA 含量也显著高于刚出房蜂王,这与中华蜜蜂蜂王体表信息素结果一致。另外 7 种信息素含量差异不显著。另外,三种状态下的蜂王体表信息素中均不含 C10:0DA。

2.3 中华蜜蜂与意大利蜜蜂性成熟蜂王体表信息素的含量比较分析

通过比较分析中华蜜蜂与意大利蜜蜂蜂王体

表信息含量发现:意大利蜜蜂蜂王性成熟期蜂王在 9-ODA、9-HDA、10-HDA 和 HOB 含量显著高于中华蜜蜂蜂王(表 4)。

2.4 中华蜜蜂与意大利蜜蜂性成熟蜂王婚飞时体表信息素的含量比较分析

通过比较分析中华蜜蜂与意大利蜜蜂蜂王在婚飞时体表信息含量发现:两蜂种蜂王在婚飞时,其体表释放的信息素差异不显著(表 5)。

表 3 意大利蜜蜂蜂王体表信息素的含量 (μg)
Table 3 The content of pheromones on the body surface of queens *Apis mellifera ligustica* (μg)

信息素 Pheromones	刚出房蜂王 Newly emerged queens	性成熟蜂王 Sexual matured queens	飞行性成熟蜂王 Mating flight queens
8-HOAA	66.91±7.85	67.54±2.02	66.79±6.58
HVA	134.03±33.29	113.824±12.55	119.04±0.47
C10:1DA	226.20±15.28	224.64±47.64	237.10±14.63
C10:0DA	0	0	0
9-ODA	429.50±11.31a	613.66±170.85ab	561.87±54.84b
9-HDA	229.96±164.92	265.75±75.69	295.17±91.66
10-HDA	265.32±229.24	277.27±113.64	227.70±99.19
HOB	379.71±178.86	500.49±73.87	411.82±102.98

表 4 中华蜜蜂与意大利蜜蜂性成熟蜂王体表信息素的含量 (μg)
Table 4 The content of pheromones of sexual matured queens between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* (μg)

信息素 Pheromones	中蜂性成熟蜂王 Sexual matured queens (ACC)	意蜂性成熟蜂王 Sexual matured queens (AML)
8-HOAA	69.10±6.63	67.54±2.02
HVA	119.20±0.83	113.824±12.55
C10:1DA	222.59±1.85	224.64±47.64
C10:0DA	0	0
9-ODA	510.81±103.93a	613.66±170.85b
9-HDA	180.42±31.55a	265.75±75.69b
10-HDA	154.87±15.70a	277.27±113.64b
HOB	295.47±16.28a	500.49±73.87b

表 5 中华蜜蜂与意大利蜜蜂性成熟蜂王婚飞时体表信息素的含量 (μg)
Table 5 The content of pheromones of sexual matured queens during mating flight between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* (μg)

信息素 Pheromones	中蜂飞行性成熟蜂王 Mating flight queens (ACC)	意蜂飞行性成熟蜂王 Mating flight queens (AML)
8-HOAA	66.63±2.62	66.79±6.58
HVA	120.41±1.84	119.04±0.47
C10:1DA	221.00±1.46	237.10±14.63
C10:0DA	0	0
9-ODA	526.50±43.53	561.87±54.84
9-HDA	278.74±79.52	295.17±91.66
10-HDA	153.87±11.70	227.70±99.19
HOB	307.82±40.31	411.82±102.98

3 讨论

本研究通过 GC-MS 比较分析了中华蜜蜂和意大利蜜蜂蜂王体表信息素含量变化。研究发现, 中华蜜蜂性成熟蜂王飞行过程中, 其体表 9-ODA 含量显著高于刚出房蜂王, 9-HDA 显著高于刚出房蜂王和性成熟蜂王, 而且意大利蜜蜂飞行蜂王 9-ODA 含量也显著高于刚出房蜂王, 这可能说明蜂王在飞行过程中, 体内信息素分泌发生了一定的变化, 这也可能是蜂王在蜂群中不会吸引雄蜂交配, 而只有在进行婚飞时才能吸引雄蜂并成功交尾的主要原因之一。比较中华蜜蜂和意大利蜜蜂蜂王性成熟时蜂王体表信息素的差异, 意大利蜜蜂性成熟期蜂王在 9-ODA、9-HDA、10-HDA 含量显著高于中华蜜蜂蜂王, 这也可能是意大利蜜蜂蜂群中会出现中华蜜蜂雄蜂的原因。然而, 两蜂种蜂王在婚飞时, 其主要体表信息素含量差异不显著, 这可能是引起两蜂种之间存在交尾干扰的原因。另外, 意大利蜜蜂三个时期和中华蜜蜂两个时期的蜂王体表信息素均不含 C10:0DA, 主要原因在于该物质为工蜂特有的体表信息素。但在刚出房的中华蜜蜂蜂王中存在, 可以与蜜蜂进化有关, 具体原因有待于进一步研究与分析。

致谢: 在信息素检测与分析过程中, 得到了江西省出入境检验检疫局综合技术中心黄丽莉, 左海根, 曾海龙和卢宜娟等老师的支持与帮助, 在此表示衷心的感谢!

参考文献 (References)

- Keeling CI, Slessor KN, Higo HA, Winston ML, 2003. New components of the honey bee (*Apis mellifera* L.) queen retinue pheromone. *PNAS*, 100(8): 4486-4491.
- Wu XB, Wang ZL, Zhang F, Shi YY, Zeng ZJ, 2014. Mating flight causes genome-wide transcriptional changes in sexually mature honeybee queens. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17(1): 37-43.
- 方兵兵, 2011. 亚洲蜜蜂困扰澳大利亚. *中国蜂业*, 62(9): 47.
- 胡福良, 玄红专, 2004. 蜜蜂蜂王信息素研究进展. *昆虫知识*, 41(3): 208-211.
- 李位三, 1991. 中华蜜蜂群体数量缩减及其原因的探讨. *蜜蜂杂志*, 11(5): 50-53.
- 李位三, 1993. 中、意蜂交尾干扰及其后果. *蜜蜂杂志*, 13(7): 3-4.
- 孟宪佐, 1997. 蜜蜂化学生态学——化学通讯与信息素研究进展. *生态学报*, 17(1): 83-90.
- 苏荣, 1995. 蜜蜂信息素的研究进展. *福建农业大学学报*, 24(2): 231-237.
- 苏松坤, 陈盛禄, 2000. 蜜蜂信息素与蜂群内化学通讯的研究进展. *养蜂科技*, 4: 5-11.
- 王启发, 李位三, 张启明, 吴树生, 2003. 中、西蜂间自然交尾干

- 扰问题的观察. 昆虫知识, 40(2): 164-167.
- 吴小波, 王子龙, 石元元, 张飞, 曾志将, 2013a. 婚飞对中华蜜蜂性成熟处女蜂王 sRNAs 表达的影响. 中国农业科学, 46(17): 3721-3728.
- 吴小波, 王子龙, 张飞, 石元元, 曾志将, 2013b. 婚飞行为影响中华蜜蜂性成熟处女蜂王的基因表达. 昆虫学报, 56(5): 486-493.
- 吴小波, 张飞, 曾志将, 2012. 蜜蜂繁殖冲突与雌性蜜蜂信息素研究进展. 应用昆虫学报, 49(5): 1372-1377.
- 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.
- 曾志将主编, 2009. 养蜂学(第二版). 北京: 中国农业出版社. 101-104.
- 曾志将, 黄康, 2008. 蜂群中化学信息通讯. 蜜蜂杂志, 28(4): 3-6.