

中华蜜蜂自然分蜂中的亲属优惠行为^{*}

黄强^{**} 曾志将^{***}

(江西农业大学蜜蜂研究所 南昌 330045)

Nepotism in swarming honeybees (*Apis cerana cerana*). HUANG Qiang^{**}, ZENG Zhi-Jiang^{***} (*Honeybee Research Institute of Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China*)

Abstract The experiments were conducted with *Apis cerana cerana* Fabricius under natural conditions. After the start of swarming, workers were sampled randomly both from the mother colony and the swarms, and preserved in 95% alcohol for further DNA analysis. All of the sealed queen cells were transferred into the incubator for emergence and observed every 30 minutes to record the emerging order of virgin queens. Subfamily compositions were subsequently analyzed using three MRJPs. The colonies were composed of 13, 12 and 9 subfamilies, respectively. Most of the super-sister workers of immature queens were selectively chosen to stay in the colony. Subfamily distribution in both the swarms and the workers staying in the colony were significantly different from the control, which indicated that some subfamilies were active in swarming, while the others were less active. Our data from the three MRJPs firstly indicated the presence of nepotism between the workers staying in the colony and the immature queens during the swarming, and the nepotism may stimulate the swarming tendency of other workers.

Key words *Apis cerana cerana*, MRJP, nepotism, queen cell, swarming

摘要 以3群中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Fabricius 为材料, 研究自然分蜂中的亲属优惠行为。分蜂开始后, 分别对参与分蜂的工蜂和留在原巢内的工蜂随机取样, 用95%酒精保存待用。取下所有王台, 放入培养箱中培养出房, 每30 min观察1次, 记录处女王的出房顺序。运用3个MRJP (major royal jelly protein) 标记分析蜂群的亲缘关系和亚家系组成。3群实验蜂群分别由13、12和9个亚家系组成。分蜂过程中, 王台的全同胞姐妹工蜂绝大多数都选择留在原巢内, 说明工蜂能够辨认出全同胞姐妹王台, 并且给予优惠。参与分蜂的工蜂和留在原巢内的工蜂间亚家系分布差异极显著, 说明一些亚家系分蜂性更强, 而另一些亚家系分蜂性较弱。实验首次运用MRJP分子标记技术证明: 在自然分蜂过程中, 工蜂和王台之间存在亲属优惠行为, 并且这种优惠行为可能会刺激其它工蜂产生分蜂趋向性。

关键词 中华蜜蜂, MRJP, 亲属优惠, 王台, 分蜂

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结果对整个社会生物学及行为生态学领域都有深远影响^[1]。

相对于个体繁育而言, 分蜂是最重要的群体繁殖。在分蜂过程中, 蜂王会带着大约一半的工蜂和一些雄蜂离开原巢^[2]。引起分蜂的因素很多, 例如: 哺育蜂和采集蜂过多导致的食物过剩; 巢房拥挤; 蜂王物质不足等, 但是单一个因素不能引起分蜂^[3,4]。

由于蜂王属于多雄交配, 因此造成了蜂群

由许多“同母异父”亚家系组成, 这样必然造成了蜂群中蜜蜂个体之间的亲缘关系指数不同。所有工蜂和蜂王间的亲缘关系指数都为 $G=0.5$, 王台和其全同胞姐妹工蜂亲缘关系指数 $G=0.75$, 王台和其半同胞姐妹工蜂亲缘关系指数 $G=0.25+0.5/n$ (n 为与蜂王交配的雄蜂数

^{*}江西省自然科学基金资助项目(2007GZN0202); 国家自然科学基金资助项目(30760035)。

^{**}E-mail: huangqiang_0@sina.com

^{***}通讯作者, E-mail: bees1965@sina.com

收稿日期: 2008-04-23, 修回日期: 2008-06-06

量)。依据亲缘选择理论,在分蜂时王台的全同胞姐妹工蜂应该留在原巢内以增强在群内生活的绝对适合度,也正是由于蜜蜂个体之间的亲缘关系指数差异,工蜂表现出了亲属的辨认、优惠及监督行为^[5, 6, 25]。

到目前为止,在自然分蜂中,工蜂和王台间是否存在亲属优惠行为尚无研究。亲缘关系指数是否会刺激工蜂形成分蜂趋向性也没有定论。在实验中,利用王浆主蛋白(major royal jelly proteins, MRJP)的串联重复序列多态性(various number tandem repeat, VNTR)分子标记研究中华蜜蜂自然分蜂中的亲属优惠行为^[7],现总结报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验蜂群来源 以江西农业大学蜜蜂研究所饲养的3群中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 为实验蜂群,分别为39号蜂群,43号蜂群和58号蜂群。

1.1.2 主要试剂 *Taq* 酶、DNA marker、RNA 酶、蛋白酶、loading dye、dNTP、琼脂糖、gold view 等。

1.2 实验方法

1.2.1 取样 自然分蜂开始后,当分蜂群在树上结团时,用捕虫网捕获分蜂群并随机取50只工蜂个体,用以反映参与分蜂群体的亚家系组成。然后在原巢内随机取50只工蜂用以反映留在原巢内群体的亚家系组成,并用95%乙醇保存待用。最后用王笼控制王台,并且立即转入培养箱中人工培养出房,每30 min 观察1次,记录处女王的出房顺序。

1.2.2 蜜蜂基因组 DNA 的提取 用苯酚-氯仿提取法对单只蜜蜂基因组 DNA 进行提取^[8]。

1.2.3 DNA 检测 取2 μL 待测 DNA 和1 μL 上样液(Loading dye)混匀,上样于0.8%加有 gold view I 的琼脂糖凝胶,5 V/cm 电泳,待样品跑到4/5处时取下凝胶,在紫外灯下观察电泳结果并拍照保存。

1.2.4 PCR 反应和产物电泳检测 每个个体

都分别用3对MRJP引物进行扩增,结合3对引物的扩增结果进行压家系分析。3对MRJP引物由北京三博远志成(表1)。

表1 MRJP 引物序列

位点	引物序列
MRJP2	5'-TTAATGAGAAATACTCATTGCG-3'
	5'-AACGACGAAGCTTGATTATCATTTC-3'
MRJP3	5'-CGAATTTTGGGTGCGAATG-3'
	5'-ATGTGATTTTAAGAATGATGAGCTTG-3'
MRJP5	5'-AGACACTTCAAACGGTCTGTTG-3'
	5'-CTGTAATTCATACITAAAGCCATC-3'

建立最佳PCR反应体系,对各组分用量进行优化^[7],优化结果见表2。

表2 PCR 反应体系中各组分的优化结果

成分	用量(单位:μL)
10 * PCR Buffer	2
MgCl ₂ (2.38 × 10 ⁶ μg/L)	2.4
dNTP (1.95 × 10 ⁷ μg/L)	0.3
F(引物) (1.25 × 10 ⁻⁵ mol/L)	1
Taq 酶	0.5
DNA	0.5
H ₂ O	13.3
总计	20

PCR 循环参数如下:94℃预变性5 min;94℃变性1 min;60℃退火1 min;72℃延伸2 min;72℃后延伸10 min,循环40次。

PCR 产物电泳:取5 μL PCR 产物和1 μL 上样液(Loading dye)混匀,上样于1.5%含有 Goldview II 的琼脂糖凝胶,4 V/cm 电泳,待样品跑到4/5处时,将胶取下放入凝胶成像系统中拍照,保存。

1.2.5 数据处理 联合3个MRJP引物扩增后所得到的工蜂基因型分析实验蜂群的亚家庭组成。用 Fisher's exact test, 2 × n 联列表(n代表亚家系数目)分析在分蜂过程中是否存在以亚家系为单位的分蜂趋向性;用 Fisher's exact test, 2 × 2 联列表联列表分析处女王的全同胞姐妹工蜂在分蜂过程中是否会主动选择留在原巢内;每一个亚家系内的工蜂是不是随机选择留在原巢或参与分蜂用二项式分布进行检验;第

一个出房的处女王的全同胞姐妹工蜂是不是比其它处女王的全同胞姐妹工蜂有更强的趋势留在原巢内用 Fisher's exact test, 2×2 联列表联列表分析。

2 实验结果

2.1 DNA 提取结果

DNA 提取的质量往往是决定分析成功与否的关键, 所提取的基因组 DNA 主带清晰, 无降解。

2.2 MRJP 扩增结果

以上 3 对引物对基因组 DNA 进行扩增, 均成功扩增出目标片段 (图 1)。

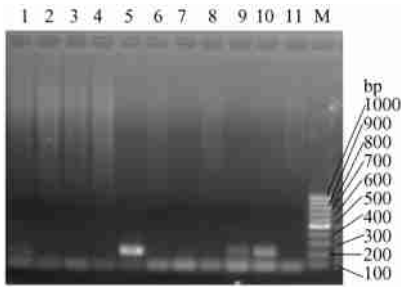


图 1 MJRP2 扩增图

2.3 亚家系组成和亲属优惠分析

分析结果 (表 3, 表 4) 表明蜂群分别由 13

个亚家系, 9 个亚家系, 和 12 个亚家系组成, 即蜂王分别与 13 只雄蜂, 9 只雄蜂和 12 只雄蜂进行了有效交配。这与中华蜜蜂蜂王自然交配次数相吻合^[9]。

表 3 三群蜂的亚家系组成

亚家系	39 号群			43 号群			58 号群		
	ws	wl	qc	ws	wl	qc	ws	wl	qc
1	3	0	0	0	5	0	1	1	0
2	0 ^A	13 ^B	0	0	1	0	16 ^A	9 ^B	①②④
3	5	13	0	5	2	0	1	0	0
4	1	1	0	0	2	0	13	21	0
5	0	5	0	11	22	0	3	1	⑤③
6	2 ^A	14 ^B	0	5	7	0	10	4	⑥
7	2	1	0	0 ^A	7 ^B	0	0	1	0
8	7 ^A	0 ^B	④	1	1	0	2	4	0
9	1	0	0	28 ^A	3 ^B	①	0	1	0
10	3	0	0				3	3	0
11	8 ^A	0 ^B	②③				0	2	0
12	4	0	0				1	3	0
13	14 ^A	3 ^B	①						

注: ws 代表留在巢内工蜂数目, wl 代表参与分蜂的工蜂数目, qc 代表封盖王台, ①②③④⑤⑥ 代表处女王在培养箱中的出房顺序 (取样时, 43 号群中只有 1 个已经出房的处女王, 其它王台已经被完全破坏)。同一个亚家系中用二项式分布检验留在原巢内个体和参与分蜂的个体是否为随机行为, a b 代表差异显著, A, B 代表差异极显著。

表 4 三群蜂的父系分析

父母代	39 号群			43 号群			58 号群		
	MRJP2	MRJP3	MRJP5	MRJP2	MRJP3	MRJP5	MRJP2	MRJP3	MRJP5
q a 1	236	532	725	228	556	734	258	544	730
q a 2	214	521	720	240	562	748	246	564	748
drone 1	224	521	725	240	556	730	226	556	698
drone 2	232	550	720	228	544	734	258	544	740
drone 3	224	532	725	228	538	734	234	556	730
drone 4	236	532	725	240	556	748	234	554	730
drone 5	243	545	680	250	582	734	226	582	698
drone 6	236	521	710	250	538	698	216	544	734
drone 7	210	545	680	228	564	748	216	556	730
drone 8	214	545	720	240	556	734	258	582	734
drone 9	236	550	735	228	564	698	216	564	698
drone 10	243	545	690				258	538	748
drone 11	236	532	680				234	538	740
drone 12	210	545	710				234	564	748
drone 13	224	558	710						

注: qa 代表蜂王基因型。通过分析后代工蜂可以分析出母系蜂王和父系雄蜂的在 3 个 MRJP 位点的基因型 (单位: bp)。

如果分蜂是一种随机行为,那么在每个亚家系内,留在巢内和参与分蜂的个体应该符合 1:1 的统计学分布。但是如果分蜂不是随机行为,工蜂能够选择性地参与分蜂,那么每个亚家系内留在巢内和参与分蜂的个体比例就应该背离 1:1。统计结果表明:分蜂过程中,39 号群和 43 号群亚家系分布差异极显著 ($P < 0.01$, Fisher's exact test), 58 号群差异不显著 ($P > 0.05$, Fisher's exact test)。统计结果并不否认 58 号群工蜂也存在分蜂趋向性,为了进一步分析分蜂趋向性,我们进行了一下检验。

根据亲缘选择理论,处女王的全同胞姐妹应该选择性地留在巢内,以增强群内生活的绝对适合度。我们对处女王的全同胞姐妹工蜂和半同胞姐妹工蜂的“去”和“留”进行分析。统计结果表明处女王的全同胞姐妹工蜂留在原巢内的趋势明显高于处女王的半同胞姐妹(在 3 群中, $P < 0.001$, Fisher's exact test)

从亚家系角度分析,蜂群表现出明显的分蜂趋向性。我们希望知道是每个亚家系都有分蜂趋向性还是个别亚家系有分蜂趋向性。统计结果表明并不是所有亚家系都表现出“离开”或“留在”原巢内的趋向性,某些亚家系的分蜂趋向性更强。

我们假设如果工蜂不仅能辨认出全同胞姐妹蜂王还能预知那只蜂王最先出房,那么最先出房的处女王的全同胞姐妹工蜂相对于其它蜂王的全同胞姐妹工蜂而言就应该有更强的趋势留在原巢内,但是统计结果不支持这种假设(39 号群和 58 号群内, $P > 0.05$, Fisher's exact test。43 号群没有进行统计因为只有 1 只处女王)。

3 讨论

Kryger 和 Moritz 证明意大利蜜蜂分蜂时具有明显的亚家系趋向性,有些亚家系分蜂性强,而有些亚家系分蜂性弱,但是在二次分蜂时,没有发现参与二次分蜂的工蜂和领导二次分蜂的处女王之间存在优惠行为。当时的解释认为分蜂的亚家系趋向性可能与遗传有关,有些个体

更趋向于分蜂。但是我们希望从王台与参与分蜂个体之间的情缘关系来解释这个问题,并且统计结果也支持参与分蜂个体与王台之间存在情缘关系远近的相关性^[10]。

虽然工蜂具有辨认全同胞姐妹和半同胞姐妹的能力^[11~17],但是在自然状况下还没有报道表明工蜂表现出亲属优惠行为。为什么在实验条件下工蜂表现亲属优惠行为,但是在正常情况下却不表现出亲属优惠行为呢?这个问题可以用 Hamilton 理论来解释,只有当 $rb - c > 0$ 时工蜂才会表现优惠行为, r 表示工蜂间的亲缘关系指数, b 表示得到优惠的个体增加的适合度, c 表示优惠行为的付出^[18,19]。蜜蜂是高度合作化的社会性昆虫,对于它们而言,让整个群体生存下去才是最重要的。只有在一些极端的情况下,工蜂才会表现出一些增强适合度的行为,例如在无王群中,工蜂会通过吃掉其它工蜂产的未受精卵增强适合度,这种行为称为工蜂监督^[20~23]。

分蜂开始后,是选择留在原巢内还是选择参与分蜂是一个非常的决定,工蜂不仅仅要增强适合度,还会评估老蜂王建立新蜂群的能力^[24]。蜜蜂能对周围环境进行评估,并且做出有意识的决定。

参 考 文 献

- 1 黄智勇. 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, 1992. 1 987~2 005
- 2 Beekman M., Fathke R., Seeley T. D. How does an informed minority of scouts guide a honeybee swarm as it flies to its new home? *Anim. Behav.*, 2006, **71**: 161~171.
- 3 Feffeman N. H., Starks P. T. A modeling approach to swarming in honey bees (*Apis mellifera*). *Insect. Soc.*, 2006, **53**: 37~45.
- 4 Zeng Z. J, Huang Z. Y, Qin Y. C, Pang H. Z. Hemolymph juvenile hormone titers in worker honey bees under normal and pre-swarming conditions. *J. Econ. Entomol.*, 2005 **92**(2): 274~278.
- 5 Hamilton W. D. The genetical evolution of social behaviour. *J. Theor. Biol.*, 1964, **7**: 1~16.
- 6 Hamilton W. D. The genetical evolution of social behaviour. *J. Theor. Biol.*, 1964, **7**: 17~52.
- 7 曾志将主编. 蜜蜂生物学. 北京: 中国农业出版社, 2007, 116~134.
- 8 Fondrk M. K., Page R. E., Hunt J. R. G. J. Paternity

- analysis of worker honeybees using random amplified polymorphic DNA. *Naturwissenschaften*, 1993, **80**: 226 ~ 231.
- 9 陈盛禄主编, 中国蜜蜂学. 北京: 中国农业出版社, 2001. 154 ~ 155.
 - 10 Kryger P., Moritz R. F. A. Lack of kin recognition in swarming honeybees (*Apis mellifera*). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 1997, **40**: 271 ~ 276
 - 11 Getz W. M., Page R. E. Chemosensory kin communication system and kin recognition in honey bees. *Ethology*, 1991, **87**: 298 ~ 315.
 - 12 Page R. E., Robinson G. E., Fondrk M. K. Genetic specialist kin recognition and nepotism in honeybee colonies. *Nature*, 1989, **338**: 576 ~ 579.
 - 13 Carlin N. F., Frumhoff P. C., Page R. E., et al. Nepotism in the honey bee. *Nature* 1990 **346**: 706 ~ 708.
 - 14 Getz W. M., Smith K. B. Genetic kin recognition; honey bees discriminate between full and half sisters. *Nature*, 1983, **302**: 147 ~ 148.
 - 15 Breed M. D., Diaz P., Lucero K. D. Olfactory information processing in honeybees *Apis mellifera*, nestmate recognition. *Anim. behav.*, 2004, **68**: 921 ~ 928.
 - 16 Dani F. R., Jones G. R., Destri S., et al. Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. *Anim. Behav.*, 2001, **62**: 165 ~ 171.
 - 17 Downs S. G., Ratnieks F. L. W. Recognition of conspecifics by honeybee guards uses nonheritable cues acquired in the adult stage. *Anim. Behav.*, 1999, **58**: 643 ~ 648.
 - 18 Moritz R. F. A., Heisler T. Super and half-sister discrimination by honey bee workers (*Apis mellifera*) in a trophallactic bioassay. *Insect. Soc.*, 1992, **39**: 365 ~ 372.
 - 19 Mateo J. M. Kin-recognition abilities and nepotism as a function of sociality. *Proc. R. Soc. B.*, 2002, **269**(1492): 721 ~ 727.
 - 20 West S. A., Mumay M. G., Machado C. A., et al. Testing Hamilton's rule with competition between relatives. *Nature*, 2001, **409**: 510 ~ 512.
 - 21 Werselleers T., Ratnieks F. L. W., Billen J. Caste fate conflict in swarm-founding social Hymenoptera: an inclusive fitness analysis. *J. Evol. Bio.*, 2003, **16**(4): 647 ~ 658.
 - 22 Ratnieks F. L. W. Reproductive harmony via mutual policing by workers in eusocial Hymenoptera. *Am. Nat.*, 1988, **132**(2): 217 ~ 236.
 - 23 Barron A. B., Oldroyd B. P., Ratnieks F. L. W. Worker reproduction in honey-bee (*Apis*) and the anarchic syndrome: a review. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 2001, **50**: 199 ~ 208.
 - 24 Lin C. C., Chen T. W., Lai C. C. The economics of honeybee swarming. *Reg. Sci. Urban. Econ.*, 2003, **33**(5): 581 ~ 594.
 - 25 吴小波, 颜伟玉, 黄康, 等. 意大利蜜蜂工蜂监督研究进展. 昆虫知识, 2008, **45**(2): 189 ~ 193.

中蜂与意蜂无王群培育非自身蜂种蜂子及改造王台特性^{*}

吴小波 颜伟玉 曾志将^{**}

(江西农业大学蜜蜂研究所 南昌 330045)

Emergency cells and breeding broods of the introduced *Apis* species in queenless colonies of *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. WU Xiao-Bo, YAN Wei-Yu, ZENG Zhi-Jiang^{**} (*Institute of Honeybee Research, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China*)

Abstract The behaviors of emergency cells and breeding broods of the introduced *Apis* species in queenless colonies of *Apis mellifera ligustica* (AML) and *Apis cerana cerana* (ACC) were investigated. The results showed that almost all of the eggs laid by the queen of AML were removed, and only a few larvae of AML were accepted as the quantity of AML workers was increasing. When the brood comb of AML was introduced to the queenless colonies of ACC, the new queen of ACC was finally reared without emergency cell of AML in queenless colonies of ACC. The eggs and larvae of ACC would be accepted as the quantity of ACC workers was increasing while the emergency cells of both

^{*} 国家自然科学基金资助项目(30560114); 江西省教育厅资助项目(GJ09163); 江西省研究生创新基金自筹项目(YC07B019)。

^{**} 通讯作者, E-mail: bees1965@sina.com

收稿日期: 2008-01-15, 修回日期: 2008-02-13 2008-06-28 再修回