

蜂群中不同亚家庭的工蜂寿命分析^{*}

王 欢^{**} 张少吾 张 飞 曾志将^{***}

(江西农业大学蜜蜂研究所 南昌 330045)

摘 要 在蜂群中,蜂王与多个雄蜂自然交尾,形成不同亚家庭。为了研究不同亚家庭中工蜂寿命是否有差异,我们以西方蜜蜂 *Apis mellifera* L. 为实验材料,随机从一群自然群中取 270 只刚孵化的工蜂,单独饲养于有蜜粉脾小蜂箱内,每天将自然死亡个体取出标记。并利用 3 对微卫星进行个体基因型分析,通过 Matesoft 软件划分亚家庭,然后分析了各亚家庭工蜂的自然寿命及生存曲线。结果表明:实验蜂群由 12 个亚家庭组成,其中 2 个亚家庭工蜂寿命与其他亚家庭存在显著差异 ($P < 0.05$)。

关键词 工蜂, 亚家庭, 微卫星, 寿命, 生存分析

Analysis of lifespans of workers from different subfamilies in a honeybee colony

WANG Huan^{**} ZHANG Shao-Wu ZHANG Fei ZENG Zhi-Jiang^{***}

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

Abstract In colonies, virgin queens naturally mate with several males, forming subfamilies. In order to find differences in lifespan between subfamilies, an experiment was conducted with *Apis mellifera* L. We collected 270 emerging workers from a naturally mated queen colony, holding them separately in a small box with a comb with sufficient food, and picked out and counted the naturally dead insects every day. We determined genotypes of marker workers based on 3 microsatellite primers and identified the patriline. Survival curves of the different subfamilies were drawn for survival analysis. The results indicate that the experimental colony was made up of 12 subfamilies, with two of these having significant survival differences from the other subfamilies ($P < 0.05$).

Key words worker, subfamily, microsatellite, lifespan, survival analysis

蜜蜂是社会性昆虫 (Linksvayer and Wade, 2005),有复杂的父系结构,是行为研究的理想模型 (Robinson *et al.*, 2005; Consortium, 2006)。近年来,蜜蜂行为的遗传基础引起了很多人的兴趣 (Rüppell *et al.*, 2004)。在自然蜂群中,一只蜂王可能与 7~17 只雄蜂交配 (Winston, 1987),造成蜂群由许多“同母异父”的亚家庭组成,工蜂间亲缘关系指数不同。

不同亚家庭工蜂在采集水分行为和扇风频率有显著差异 (Kryger *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2007);不同亲缘关系指数的工蜂间也存在相互监督现象 (谢究兵等, 2008)。这表

明遗传背景对工蜂行为有一定影响。

食物、环境、分工等因素对工蜂寿命的影响已经有很多研究 (Huang and Robinson, 1996; Visscher and Dukas, 1997; Remolina and Hughes, 2008),但遗传背景对工蜂寿命的影响还未见报道。正是鉴于此,我们通过本实验研究了蜂群中不同亚家庭的工蜂寿命是否存在差异,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的西方

^{*} 资助项目:国家蜂产业技术体系资助项目 (No. CARS-45-kxj12)。

^{**} E-mail: wanghuan111986@163.com

^{***} 通讯作者, E-mail: bees1965@sina.com

收稿日期:2012-05-04, 接受日期:2012-07-28

蜜蜂 *Apis mellifera* L.。首先将一张即将出房的封盖子脾置于小型饲养箱 (46 cm × 25 cm × 7 cm), 然后将饲养箱放入蜂箱, 第 2 天取出同日龄的工蜂, 将工蜂转移至装有蜜粉脾的另一个小型饲养箱, 然后放回自然蜂群, 并每天取出死亡蜜蜂, 置于 95% 的乙醇中, 标记日期, 保存。

1.2 实验方法

1.2.1 工蜂基因组 DNA 提取 单个工蜂 DNA 的提取方法是根据 Chelex 方法 (Suenaga and Nakamura, 2005) 稍加修改而来。

1.2.2 PCR 扩增反应 实验所用的 3 对微卫星引物由上海生工合成 (表 1)。PCR 反应体系: 反应总体系为 25 μ L, 其中包含 10 × Buffer 2.5 μ L; 正向引物 0.1 μ L; 反向引物 0.4 μ L; 荧光引物 0.4 μ L; dNTP 2 μ L; *Taq* 酶 0.3 μ L; 模板 DNA 用量见表 1; 剩下的用 ddH₂O 补足。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 60 s, 退火 60 s (不同微卫星位点退火温度和循环次数见表 1), 72℃ 延伸 120 s; 72℃ 再延伸 10 min; 最后 4℃ 保存。

表 1 微卫星位点及部分 PCR 反应条件

Table 1 Core sequences in cloned alleles and parts of PCR condition for 3 used microsatellites

位点 Locus	引物序列 Sequence of primers	荧光染料 Fluorescent label	模板 DNA 体积 Volumn of DNA (μ L)	退火温度 Ta (℃)	循环次数 No. cycles	目的片段 Sizerang (bp)
A14	5' - GTGTCGCAATCGACGTAACC - 3' 5' - GTCGATTACCGATCGTGACG - 3'	FAM	5	58	30	200 - 260
A107	5' - CCGTGGGAGGTTTATTGTCTG - 3' 5' - GGTTCGTAACGGATGACACC - 3'	FAM	4	60	25	150 - 200
B124	5' - GCAACAGGTCGGGTTAGAG - 3' 5' - GTCGTCGGACCGATGCG - 3'	HEX	6	60	30	200 - 260

1.2.3 PCR 扩增产物的检测 PCR 扩增效果直接决定个体基因型分析, 在进行毛细管电泳分析片段前检测 PCR 的扩增效果, 确保样品中目的片段已被扩增。将 5 μ L PCR 产物和 1 μ L Loading Buffer 混匀上样于 2% 的 0.5 × TBE 琼脂糖胶中, 100 V 电压, 60 mA 电流电泳 1 h, 染色后在紫外灯下观察扩增结果, 若有未扩增或者扩增效果不好的个体, 重新进行扩增。

1.2.4 PCR 扩增产物的片段分析及等位基因的判定 取 PCR 产物 2 μ L, 加入灭菌 ddH₂O 稀释 20 倍, 取 1.2 μ L 混装液, 加入分子量内标, 利用 MegaBACE - 100 DNA 片段分析系统对 3 对微卫星引物的 PCR 产物进行毛细管全自动基因型分析。

GeneScan 分析软件把电泳收集的图谱信息经过计算机处理成数据信息。本试验采用 2 种荧光染料, FAM 代表蓝色, HEX 代表绿色, 电泳图谱中不同位点的等位基因由于不同荧光标记而显示出不同颜色, 同一位点的不同等位基因为同一颜色,

但它们的迁移率各不相同, 根据扩增片段的长度判定等位基因, 读取了标记个体的基因型。

利用 Matesoft 软件 (Moilanen *et al.*, 2004), 根据 MegaBACE - 100 DNA 片段分析系统自动生成的基因型, 分析各工蜂个体的亚家庭。

1.2.5 生存分析 寿命统计结果采用 SPSS 软件建立数据库, 生存率的非参数估计法采用 Kaplan-Meier 法, 绘制生存曲线, 描述生存状况, 计算中位生存时间, 采用 Log-rank 检验对各亚家庭生存率进行两两比较。

2 结果与分析

2.1 亚家庭分析结果

利用 3 对微卫星引物成功分析出了 268 只工蜂的基因型, 另外有 2 只工蜂由于扩增效果不佳, 未能分析确定其基因型。在这 268 只工蜂中, 经 Matesoft 软件分析, 得到 12 个亚家庭, 其基因型及各亚家庭个体数结果见表 2。

表 2 亚家庭各位点基因型
Table 2 Microsatellites genotype of subfamily

亚家庭 Subfamily	个体数 Individual number	位点 Locus			亚家庭 Subfamily	个体数 Individual number	位点 Locus		
		A14	A107	B124			A14	A107	B124
Q	1	237/244	184/187	236/254	Q	1	237/244	184/187	236/254
M1	39	237	191	242	M7	15	237	191	236
M2	38	251	187	236	M8	15	237	191	254
M3	36	237	187	236	M9	11	251	191	242
M4	30	251	191	236	M10	12	237	187	242
M5	28	251	187	242	M11	12	244	187	242
M6	23	237	184	254	M12	9	237	184	242

注:Q 代表蜂王,M1~M12 代表 12 个亚家庭。Q represents queen, M1—M12 represent subfamily.

2.2 生存分析结果

从图 1 可见,M6 亚家庭的中位生存时间低于其它 11 个亚家庭。图 2 显示不同亚家庭的整体生存状况,直到亚家庭的个体全部死亡。

从表 3 可知,M6 和 M8 亚家庭与除 M9 之外的其他亚家庭间生存率差异显著,且 M5 与 M10 及 M5 与 M12 之间也存在显著差异,均有统计意义($P < 0.05$),其余的亚家庭之间无显著差异。

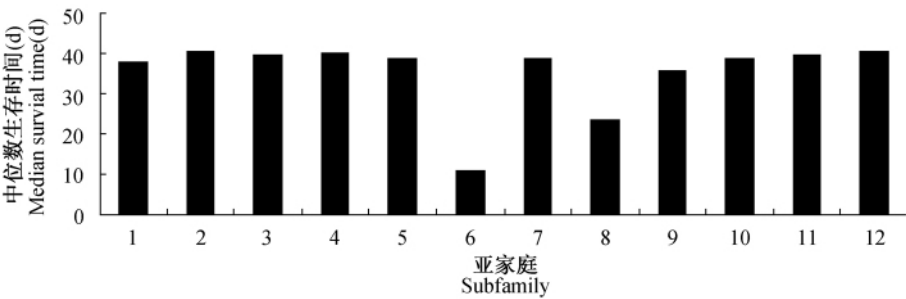


图 1 亚家庭中位生存时间
Fig.1 Median survival time of subfamilies

表 3 亚家庭生存率比较
Table 3 Survival times comparison between subfamilies

亚家庭 Subfamily	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
M1 <i>P</i>		0.355	0.483	0.105	0.713	0.002*	0.698	0.012*	0.707	0.076	0.311	0.101
M2 <i>P</i>	0.355		0.980	0.536	0.051	0.000*	0.642	0.000*	0.168	0.128	0.623	0.203
M3 <i>P</i>	0.483	0.980		0.420	0.115	0.002*	0.584	0.007*	0.329	0.199	0.475	0.151
M4 <i>P</i>	0.105	0.536	0.420		0.084	0.001*	0.239	0.000*	0.206	0.622	0.878	0.515
M5 <i>P</i>	0.713	0.051	0.115	0.084		0.015*	0.450	0.005*	0.909	0.027*	0.186	0.031
M6 <i>P</i>	0.002*	0.000*	0.002*	0.001*	0.015*		0.024*	0.482	0.050	0.000*	0.017*	0.002*
M7 <i>P</i>	0.698	0.642	0.584	0.239	0.450	0.024*		0.006*	0.486	0.283	0.390	0.170
M8 <i>P</i>	0.012*	0.000*	0.007*	0.000*	0.005*	0.482	0.006*		0.081	0.003*	0.018*	0.004*
M9 <i>P</i>	0.707	0.168	0.329	0.206	0.909	0.050	0.486	0.081		0.050	0.331	0.101
M10 <i>P</i>	0.076	0.128	0.199	0.622	0.027*	0.000*	0.283	0.003*	0.050		0.781	0.988
M11 <i>P</i>	0.311	0.623	0.475	0.878	0.186	0.017	0.390	0.018*	0.331	0.781		0.757
M12 <i>P</i>	0.101	0.203	0.151	0.515	0.031*	0.002*	0.170	0.004*	0.101*	0.988	0.757	

注:数字后标有 * 代表差异显著。

* Data with * indicate significant difference.

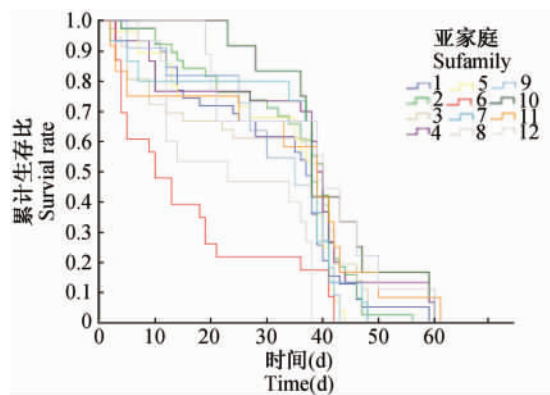


图 2 各亚家庭生存曲线

Fig.2 The survival curves of rates
in different subfamilies

3 讨论

在自然蜂群中,蜂王可能与 7~17 只雄蜂交尾(Winston,1987)。本实验结果得到的亚家庭数与前人研究相一致。

关于蜜蜂寿命的研究主要集中在工蜂与蜂王差异,而工蜂个体间寿命差异的研究较少。Neukirch(1982)比较了具有不同飞行经验的工蜂寿命,发现其寿命与飞行经验呈现负相关。也有研究表明:工蜂越早开始采集,也越早开始老化(Rueppell *et al.*, 2007)。此外,蜂群中环境改变可以加速、延迟甚至逆转哺育蜂与采集蜂过渡时间,从而直接延缓其老化过程(Amdam *et al.*, 2005)。本实验首次进行了蜂群中不同亚家庭中工蜂寿命研究,发现父系的遗传背景可能会影响工蜂寿命,但具体机理还有待于进一步研究。

致谢: 实验中得到了江西农业大学蜜蜂研究所甘海燕,刘亭亭,王文祥等同学的支持和帮助,在此表示感谢。

参考文献(References)

Amdam GV, Aase ALTO, Seehuus SC, Fondrk MK, Norberg K, Hartfelder K, 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp. Gerontol.*, 40(12):939—947.

Consortium HGS, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee, *Apis mellifera*. *Nature*, 443(7114):931—949.

Huang ZY, Robinson GE, 1996. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 39(3):147—158.

Jones JC, Myerscough MR, Graham S, Oldroyd BP, 2004. Honey bee nest thermoregulation: diversity promotes stability. *Science*, 305(5682):402—404.

Kryger P, Kryger U, Moritz RFA, 2000. Genotypical variability for the tasks of water collecting and scenting in a honey bee colony. *Ethology*, 106(9):769—779.

Linksvayer TA, Wade MJ, 2005. The evolutionary origin and elaboration of sociality in the aculeate Hymenoptera: maternal effects, sib-social effects, and heterochrony. *Q. Rev. Biol.*, 80(3):317—336.

Molanan A, Sundstroem L, Pedersen JS, 2004. MATESOFT: a program for deducing parental genotypes and estimating mating system statistics in haplodiploid species. *Mol. Ecol. Notes*, 4(4):795—797.

Neukirch A, 1982. Dependence of the lifespan of the honeybee (*Apis mellifica*) upon flight performance and energy consumption. *J. Comp. Physiol. B*, 146(1):35—40.

Remolina SC, Hughes KA, 2008. Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees. *Age*, 30(2):177—185.

Robinson GE, Grozinger CM, Whitfield CW, 2005. Sociogenomics: social life in molecular terms. *Nat. Rev. Genet.*, 6(4):257—270.

Rueppell O, Bachelier C, Fondrk MK, Page RE Jr, 2007. Regulation of life history determines lifespan of workers honey bees (*Apis mellifera* L.). *Exp. Gerontol.*, 42(10):1020—1032.

Rüppell O, Pankiw T, Page RE Jr, 2004. Pleiotropy, epistasis and new QTL: the genetic architecture of honey bee foraging behavior. *J. Hered.*, 95(6):481—491.

Su S, Albert S, Zhang S, Maier S, Chen S, Du H, Tautz J, 2007. Non-destructive genotyping and genetic variation of fanning in a honey bee colony. *J. Insect. Physiol.*, 53(5):411—417.

Suenaga E, Nakamura H, 2005. Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair. *J. Chromatogr. B*, 820(1):137—141.

Visscher P, Dukas R, 1997. Survivorship of foraging honey bees. *Insectes Soc.*, 44(1):1—5.

Winston ML, 1987. The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press, Cambridge. 1—281.

谢宪宾, 苏松坤, 郑云林, 吴小波, 曾志将, 2008. 应用微卫星 DNA 技术研究中华蜜蜂群内工蜂监督效果. *中国农业科学*, 41(6):1816—1821.