

日本弓背蚁亲系识别的研究：攻击行为测试与 RAPD-PCR 分析

谭声江¹，陈晓峰^{1*}，王正军¹，刘志斌²

(1. 中国科学院动物研究所，农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100080；

2. 陕西师范大学生命科学学院，西安 710062)

关键词：日本弓背蚁；亲系识别；攻击行为；RAPD-PCR

中图分类号：Q966 文献标识码：A 文章编号：0454-6296(2001)03-0373-05

亲系识别在社会性昆虫繁衍、维持社群的生命力和个体间的通讯协作等方面具有重要作用。不少学者已应用气相色谱和行为观察方法分析了几种社会性昆虫的亲系识别现象、识别能力及其化学本质，但在揭示其遗传背景方面的研究较少^[1-3]。作者对采自西安地区陕西师范大学校园和长安县不同巢穴的日本弓背蚁进行了攻击行为测试和 RAPD-PCR 分析，旨在探讨它们的亲系识别能力及其遗传背景。

1 材料与方法

1.1 实验蚂蚁

实验所用日本弓背蚁 *Camponotus japonicus* 大型工蚁（即兵蚁）于 1997 年 5 月分别采自陕西师范大学校园、陕西师范大学校外体育场、长安县等共 6 个巢穴（表 1），采集后带回实验室，进行攻击行为实验，然后将供试个体保存于 100% 乙醇中，以进行 RAPD-PCR 分析。

1.2 攻击行为测定

在蚂蚁的行为识别过程中，按攻击性程度的强弱，将攻击行为划为 3 个等级：强攻击、弱攻击、亲合^[4]。强攻击指两个体遭遇后，触角几乎未碰到一起就开始互相咬击，或追逐叮咬，或互相咬在一起长时间不分开，有时腹部呈 C 形弯曲喷毒；弱攻击，指两个体遭遇，触角碰击后迅速分开，有时张开双颚相威胁，但不互相叮咬，或自行其事；亲合，两个体遭遇后相安无事，彼此照顾，有时发生交哺（mutual nursing）现象。取不同巢穴的大型工蚁各一头置于一垫有滤纸的培养皿中，自两头蚂蚁第一次相遇后，记录 3 min 内各级攻击次数和彼此咬住的持续时间。每两巢穴间取不同个体重复 10 次。按识别过程中的能量分布状况^[4-6]，每咬住 3 秒视为一次强攻击，每喷一次毒视为 3 次强攻击，每 5 次弱攻击视为一次强攻击，分析攻击性强弱与巢穴间距离的关系。

1.3 基因组 DNA 的提取

蚂蚁基因组 DNA 提取方法由 Qiao 等^[7]改进而来，所有样品均为 100% 乙醇浸泡标本。取单头蚂蚁，去头腹，置于 1.5 mL 离心管中，加入 300 μ L 匀浆液（含 25 mmol/L NaCl，25 mmol/L EDTA，1% SDS，50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0）匀浆；65℃ 水浴 45 min；加入等体积 3 mol/L pH 4.5 KAc，冰上放置 1 h 以上；12 000 r/min 离心 15 min，移上清液于另一离心管中；加入 RNA 酶 37℃ 水浴 1 h；酚抽提，取上层水相于另一离心管中，无水乙醇

基金项目：国家教委资助项目

* 通讯作者

收稿日期：1999-06-23；接受日期：2000-05-19

沉淀; 70% 酒精洗涤沉淀, 凉干; 加入 100 μL TE, 充分溶解后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 PCR 反应体系

反应体积为 25 μL , 其中含模板 DNA 约 25 ng, dNTPs 25 $\mu\text{mol/L}$, 随机单引物 (表 2) 20 ng, 2 mmol/L Mg^{2+} , 0.01% 明胶, Taq DNA 聚合酶 1U; 加样混匀后加入 25 μL 石蜡油覆盖; 样品于 PE-480 PCR 仪中扩增, 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 后进入循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、36 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 共 45 个循环; 然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

表 1 供试蚂蚁样品

Table 1 Ant colonies for test

| 巢穴 Colonies | 采集地点 Collected location | 采集时间(年.月) Time (Year. Month) |
|----------------|----------------------------|---------------------------------|
| X1 | 陕西师范大学校园 ^① | 1997.5 |
| X2 | 陕西师范大学校园 ^① | 1997.5 |
| X3 | 陕西师范大学校园 ^① | 1997.5 |
| T | 陕西师范大学校外体育场 ^② | 1997.5 |
| C1 | 西安市长安县 ^③ | 1997.5 |
| C2 | 西安市长安县 ^③ | 1997.5 |

① campus of Shaanxi Normal University; ② the playground outside Shaanxi Normal University; ③ Chang'an County of Xi'an

表 2 RAPD 引物

Table 2 Primers for RAPD

| 引物 Primer | 序列 (5'→3') Sequence (5'→3') |
|--------------|--------------------------------|
| OPC-18 | T G A G T G G G T G |
| OPC-19 | G T T G C C A G C C |
| OPC-20 | A C T T C G C C A C |
| OPD-2 | G G A C C C A A C C |
| OPD-11 | A G C G C C A T T G |
| OPD-13 | G G G G T G A C G A |
| OPD-15 | C A T C C G T G C T |

1.5 产物检测分析及数据处理

扩增产物在含溴化乙锭 (EB) 的 1.2% 琼脂糖凝胶上水平电泳, 标准分子量为 $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III} + \text{EcoR I}$, 电泳缓冲液为 $0.5 \times \text{TBE}$, 恒压 4 V/cm, 电泳结束后紫外照相, 并于 EAGLEEYE-II 紫外透射仪上读带。读带后计算共享带率 S_{ij} (又称相似性指数): $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ 。其中 N_i 、 N_j 分别为来自 i 、 j 个体的电泳带的数目, N_{ij} 为二者共享带的数目。读带数据输入 RAPD-PHILIPY 软件包进行统计分析, 计算 Nei 氏无偏差遗传距离 (Nei's unbiased distance)。

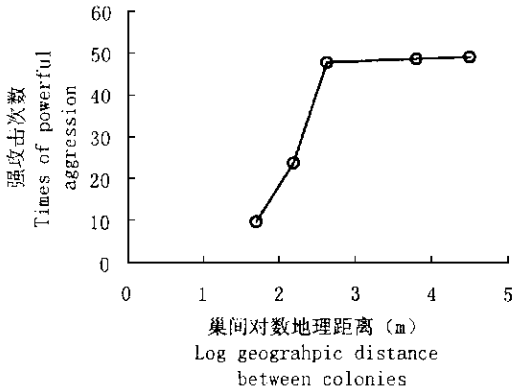


图 1 不同距离巢穴蚂蚁间 3 min 内的强攻击次数
Fig. 1 Times of powerful aggression in 3 minutes between individuals from colonies at different distances

2 结果和讨论

2.1 攻击性与识别能力

攻击行为是蚁群社会性行为中的一种主要识别行为方式, 在种群的建立、扩大和防卫过程中具有重要作用; 在种及种下分类中也有一定的应用^[4]。从图 1 和表 3 可以看出, 随着巢穴间距的加大, 不同巢穴日本弓背蚁个体间的攻击性强弱发生了较为明显的变化。相距 150 m 以内的巢穴间个体有不同比例的亲合现象发生, 相距 400 m 以内的巢穴间个体的攻击性随地理距离增大而加强, 当巢穴间距达到 400 m 以上时, 攻击性程度进入一个平台期, 变化较小。在巢穴间距 400 m 范围内, 攻击性强弱与巢穴间距相关显著 ($P < 0.05$, $r = 0.99$)。由于蚁后在蚁群气味的形成中起着关键作用^[5-8], 而日本弓背蚁以单蚁后种群聚居^[8], 150 m 内的巢穴间个体皆有

亲合现象发生, 提示这些巢穴的个体间亲缘关系较近; 巢穴间距在 400 m 以上后, 不再有亲合现象发生, 攻击程度明显加强且进入平台期, 可推测该种蚂蚁婚飞时一次最远距离在 400 m 左右, 这对于蚂蚁种群遗传结构变化和种群动态的研究具有重要价值。

表 3 巢间蚂蚁的攻击行为测试*

Table 3 Test of aggressive behavior

| 供试巢 Colony for test | 巢间距(m) Distance between colonies | 强攻击(次) Powerful aggression (times) | 咬住时间(s) Biting period | 喷毒(次) Poisoning (times) | 弱攻击(次) Inferior aggression (times) | 亲合 Intimacy |
|---------------------------|---|---|-----------------------------|-------------------------------|---|----------------|
| X1, X2 | 50 | 7.12 ± 0.03 | 0 | 0 | 6.62 ± 0.08 | 0.80 ± 0.01 |
| X1, T | 150 | 13.89 ± 0.05 | 15.02 ± 0.09 | 1.28 ± 0.02 | 5.7 ± 0.08 | 0.30 ± 0.01 |
| X1, X3 | 400 | 20.98 ± 0.05 | 50.08 ± 0.13 | 1.91 ± 0.02 | 1.90 ± 0.07 | 0 |
| X1, C1 | 6 000 | 21.53 ± 0.05 | 46.72 ± 0.12 | 3.53 ± 0.02 | 2.28 ± 0.08 | 0 |
| X1, C2 | 30 000 | 23.46 ± 0.04 | 48.06 ± 0.15 | 2.87 ± 0.02 | 3.68 ± 0.08 | 0 |

* 表中数据为测试 3 min 的平均值 ± 标准差 The data in the table are means ± SD tested within three minutes

2.2 识别能力与巢穴间亲缘关系

RAPD-PCR 技术可很快检测到 DNA 多态性, 快捷方便, 因此它在遗传标记、基因定位、基因图谱构建、物种亲缘关系, 特别是在种或种下的分类中有相当广的应用前景^[9]。本实验从 *Opc*, *Opd* 系列 40 个引物中筛选出了扩增结果稳定、巢穴内差异较小、巢穴间差异较大的 7 个长度为 10 个碱基的随机引物 (表 2), 对所选样品进行了 RAPD-PCR 分析 (图 2), 7 种引物, 共扩增出 68 条带, 分子量为 300 ~ 30 000 bp。

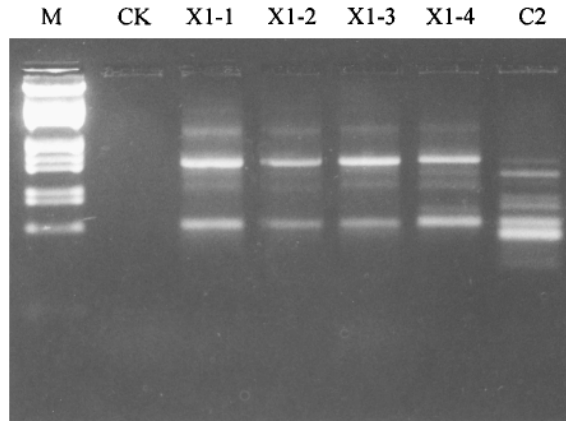


图 2 巢内、巢间个体 RAPD 结果比较 (Opc-18)

Fig. 2 Comparison of RAPD-PCR results amplified by the primer *Opc*-18 between individuals from the same and different colonies

M: 标准分子量 DNA standard molecular weight marker; CK: 空白对照 the blank control;

X1-1、X1-2、X1-3、X1-4 为巢 X1 不同个体

X1-1, X1-2, X1-3 and X1-4 are different individuals from the colony X1;

C2 为巢 C2 个体 C2 is an individual from the colony C2

表 4 巢穴间共享带率及遗传距离*

Table 4 Average bands sharing indexes and genetic distance coefficient among colonies

| | X1 | X2 | X3 | T | C1 | C2 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| X1 | | 0.173 | 0.318 | 0.351 | 0.336 | 0.397 |
| X2 | 0.744 | | 0.255 | 0.342 | 0.415 | 0.491 |
| X3 | 0.685 | 0.725 | | 0.446 | 0.436 | 0.474 |
| T | 0.641 | 0.634 | 0.592 | | 0.262 | 0.465 |
| C1 | 0.638 | 0.571 | 0.605 | 0.677 | | 0.297 |
| C2 | 0.616 | 0.595 | 0.659 | 0.597 | 0.659 | |

* 下三角部分为共享带率, 上三角部分为遗传距离系数

The lower part is average bands sharing indexes, and the upper part is genetic distance coefficient

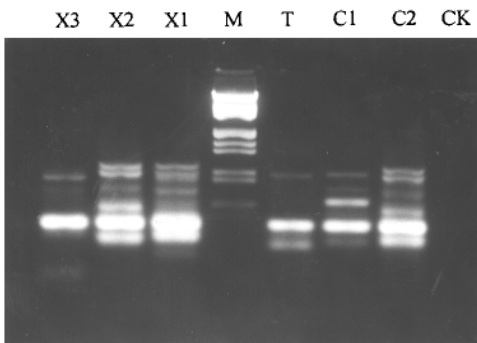


图 3 引物 Opd-2 扩增的 RAPD-PCR 结果

Fig. 3 RAPD-PCR results amplified by the Opd-2 primer

由图 2 可以看出, 巢穴 X1 的 4 个个体间仅有一条带的差异, 而巢穴 C2 与 X1 巢穴的个体间差异较大。因此, 我们以每巢穴 10 头蚂蚁基因组 DNA 混合样为模板进行了 RAPD-PCR 分析。扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上能分出清晰的带 (图 3)。根据读带数据进行计算及统计, 得到巢穴间个体遗传距离及共享带率 (表 4)。结果表明, 巢穴 X1 与 X2 个体间亲缘关系最近, 巢穴 C2 与 X2 间亲缘关系最远。同攻击行为测试一样, 以 X1 巢穴为参照, 随着巢穴间距的加大, 遗传距离逐渐增大, 共享带率则降低。统计分析显示, 攻击性程度与遗传距离间有显著相关性 ($P < 0.01$, $r = 0.94$), 说明虽然环境因素对识别行为的影响不容忽视^[11, 12], 行为识别受遗传因素影响较大。而巢穴间地理距离和遗传距离间没有显著相关性

($P > 0.10$, $r = 0.60$), 提示日本弓背蚁巢穴间有较强的基因交流, 但对于具体的基因交流状况还需进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Ross K G, Vander M R K, David J C F *et al.* Biochemical phenotypic and genetic studies of two introduced fire ants and their hybrid (Hymenoptera: Formicidae). *Evolution*, 1987, 41: 280~293
- [2] Nowbahari E, Lenoir A, Clement J L *et al.* Individual, geographical and experimental variability of cuticular hydrocarbons of the ant *cataglyphis curror* (Hymenoptera: Formicidae). Their use in nest and sub-species recognition. *Biochem. Syst. Ecol.*, 1990, 18: 63~73
- [3] 谭声江, 刘志斌, 郑哲民. 蚂蚁亲系识别及其研究方法进展. *昆虫知识*, 1998, 35 (4): 246~249
- [4] Mori A, Moli F L. The aggression test as a taxonomic tool: evolution in synaptic and allopathic populations of wood ant species. *Aggressive Behavior*, 1993, 19 (1): 151~156
- [5] Jaisson P. Kinship and fellowship in ants and social wasps. In: Heppert D G ed. *Kin Recognition*. London: Cambridge Univ. Press, 1991. 60~93
- [6] Holldobler B, Wilson E Q. *The Ants*. Oxford: Harvard University Press, 1990

- [7] Qiao C L, Raymond M. The same esterase B1haplotype is amplified in insecticide-resistant mosquitoes of the culled pipes complex from the America and China. *Heredity*, 1995, 74 (2): 339 ~ 345
- [8] 谭声江, 金黎, 郑哲民等. 日本弓背蚁社群生活史的研究. 陕西师范大学学报 (自然科学版), 1997, 25 (增刊): 31 ~ 34
- [9] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18: 6 531 ~ 6 535
- [10] Errard C. Development of interspecific recognition behavior in the ants *Mancia rubida* and *Formica selysi* (Hymenoptera: Formicidae) reared in mixed-species groups. *J. Insect Behavior*, 1994, 7 (1): 83 ~ 99
- [11] Errard C. Long-term memory involved in nestmate recognition in ants. *Animal Behavior*, 1994, 48 (1): 263 ~ 271

Studies on kin recognition of *Camponotus japonicus*: test of aggressive behavior and RAPD-PCR analysis

TAN Sheng-jiang¹, CHEN Xiao-feng¹, WANG Zheng-jun¹, LIU Zhi-bin²

(1. State Key Laboratory of Integrated Management of Insect Pests and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

2. Life Science College, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)