

ニホンミツバチとセイヨウミツバチの混合精液を用いた異種間人工授精

吉田 忠晴

ミツバチの女王蜂は羽化8日目を過ぎると交尾飛行に飛び立ち、巣箱から数百mから数km離れた空中の特定の空間である「雄蜂の集合場所」で10匹前後の雄蜂と多回交尾をすることが知られている (Ruttner, 1985; Koeniger, 1986; Koeniger and Koeniger, 1991). 在来種が同所的に生息しているスリランカのコミツバチ, トウヨウミツバチ, オオミツバチの3種 (Koeniger and Wijayagunasekera, 1976), ボルネオのトウヨウミツバチ, サバミツバチ, オオミツバチの3種 (Koeniger et al., 1988), タイのクロコミツバチ, コミツバチ, トウヨウミツバチ, オオミツバチの4種 (Rinderer et al., 1993) は1日の中で異なる時間帯に交尾飛行が行われており, それが生殖隔離機構の主因の一つと考えられている. しかし在来種以外のミツバチが人為的に導入された場合, 交尾飛行時間がオーバーラップし, 在来種の集合場所に導入種が飛来することや (Ruttner et al., 1973; Ruttner and Maul, 1983), ミツバチ属4種の女王蜂の性フェロモンの主成分が共通で, それが4種の雄蜂に対して誘引活性をもっていることから (Butler et al., 1967; Shearer et al., 1970), ドイツにおいて実験的に導入したトウヨウミツバチの女王蜂がセイヨウミツバチ雄蜂の交尾標識をつけていることが確認され, 異種間交尾があり得ることが示された (Ruttner and Maul, 1983).

日本には在来種のニホンミツバチと導入種のセイヨウミツバチの2種が生息しているが, 2種の雄蜂の集合場所が異なった環境に独立に見つかり, 集合場所の相違が示唆された (吉田, 1994). しかし, セイヨウミツバチおよびニホ

ンミツバチのそれぞれの集合場所で極めて少ないながら異種雄蜂が捕獲された. さらにセイヨウミツバチの集合場所で実験的に地上8mのポール上の旋回装置に固定したニホンミツバチ女王蜂とセイヨウミツバチ雄蜂との交尾を確認することができた (Yoshida and Yamazaki, 1993). 人為的に異種間の女王蜂と雄蜂が出会う状況を設定した場合, 実際の交尾がおこることが観察されたため, 交尾が成立した場合をシミュレートする目的で, セイヨウミツバチ女王蜂に対してニホンミツバチ雄蜂とセイヨウミツバチ雄蜂の精子がどのように使われるかについて混合精液を用いた人工授精で検討した.

材料と方法

セイヨウミツバチ女王蜂は1993年5月2日～27日の間, 玉川大学ミツバチ科学研究施設付属蜂場において移虫法で生産した. セイヨウミツバチとニホンミツバチ雄蜂は1993年5月13日～6月11日の間, 各蜂場の正常群の巣門にトラップを取りつけ, 交尾飛行に出巣する成熟雄蜂を得るか, 通常群内の外側の巣板上のものを直接採取した.

1. 精液量と精子数の測定

両種雄蜂からの精液の採取は, 胸部を指で固定して腹部を圧迫する常法を用いて, 淡黄色の精液と白色の粘液を放出させた (Ruttner, 1976; Laidlaw, 1977; 吉田, 1989). 実体顕微鏡下で粘液が入らないように注意しながら滅菌チップ内に精液部分を吸入して精液量を測定した. 精子数の測定は, Ruttner et al. (1973) の血球計算板法に従って行った. 上述の要領で射精させた精液の全量を1mlのHyes緩衝液 (Ruttner, 1976) でガラス製時計皿に流し入

れ、パストールピペットで十分に攪拌した。この精子液を試験管に移し替え、さらに時計皿を1mlの蒸留水で洗浄した液を試験管に加えた後、蒸留水8mlを加えて10mlとした。精子の入った緩衝液に蒸留水を加えると精子は円形状になって死亡するため、血球計算板による精子数の測定は容易に行うことができた。

2. 受精囊中の精子数の測定

産卵45日後に各女王蜂を解剖して受精囊を取り出し、精子数の測定と同様に血球計算板法を用いて測定した (Woyke, 1973; 1975)。

3. 人工授精のための精液の採取

1回の授精に用いる精液量は、Woyke (1973) の報告に従って4mm³とした。セイヨウミツバチとニホンミツバチの精液を、各3本のシリンジチップに各4mm³採取したものを対照区とした。精液総量を4mm³としてセイヨウミツバチ3mm³+ニホンミツバチ1mm³、セイヨウミツバチ2mm³+ニホンミツバチ2mm³、セイヨウミツバチ1mm³+ニホンミツバチ3mm³の割合で採取したものを混合精液とした。自然交尾や人工授精において受精囊中で精子はよく混じり合っていることが報告されているが (Laidlaw and Page, 1984; Moritz, 1986)、さらに精子の混じり合いを高めるために、セイヨウミツバチとニホンミツバチの精子をシリンジチップ内に交互に採取した。

4. 人工授精

人工授精は穴あき刺針鉗子 (Schley, 1988) を用いた Ruttner 型の人工授精器で、羽化7~11日目の各3匹のセイヨウミツバチ女王を行った。処理後、女王蜂の翅を切り、巢門に隔王板を取り付けた小型巣箱に導入した。処理翌日に産卵刺激のための二酸化炭素ガス麻酔を行った (Mackensen, 1947)。処理3~4日後に最初

に女王蜂が生んだ200~280卵をチェックした。チェック後4日目に卵、15日目に蛹の状態を観察した後、定温器内で羽化成虫を判定した。

結果

セイヨウミツバチ雄蜂の一匹あたりの精液量は0.51mm³で、Harbo (1985) の報告と同様であった。ニホンミツバチ雄蜂の精液採取量は0.14mm³と明らかに少なく、トウヨウミツバチで報告されている0.2mm³ (Ruttner et al., 1973)、および0.16mm³ (Woyke, 1973) とほぼ同じ結果を示した (表1)。1mm³当たりの精液中の精子数はセイヨウミツバチで374万、ニホンミツバチで256万を示し (表1)、セイヨウミツバチとニホンミツバチの濃度比は3:2であった。これは Ruttner et al. (1973) が報告したセイヨウミツバチとトウヨウミツバチの精子濃度の結果と同様であった。人工授精時に1mm³の精液を得るのにセイヨウミツバチでは約2匹、ニホンミツバチでは8~9匹の雄蜂を必要とした。

各3匹のセイヨウミツバチ女王蜂に人工授精した結果を表2に示した。

自然交尾女王蜂の孵化率は91.6%を示したが、同種であるセイヨウミツバチ精液4mm³を人工授精した場合、孵化率は自然交尾よりやや低い84.6%で、その内90.5%がセイヨウミツバチの働き蜂になった。異種であるニホンミツバチ精液4mm³を人工授精した場合、観察した720卵の内、714卵(99.2%)で異常を認めず、その内、676卵(93.9%)は未孵化卵か新たに産卵された卵で、38卵(5.3%)は巣房内に幼虫や卵がまったく認められない空の巣房か、幼虫の餌だけが残っていた巣房であった。しかし、わずか6卵(0.8%)で孵化幼虫を認めたが、こ

表1 セイヨウミツバチとニホンミツバチ雄蜂の精液量と精子数

	セイヨウミツバチ			ニホンミツバチ		
	採取雄蜂数	範囲	平均±SD	採取雄蜂数	範囲	平均±SD
精子量 (mm ³)*	123	0.50-0.57	0.51±0.04	320	0.13-0.18	0.14±0.01
精子数 (10 ⁶ /mm ³)	25	2.2-6.4	3.74±1.48	30	1.9-2.9	2.56±0.34

* 精子量はシリンジチップに採取できた雄蜂で示した。

表2 セイヨウミツバチとニホンミツバチ精液を用いた人工授精セイヨウミツバチ女王蜂の卵の発育状態

人工授精 精液量(mm ³)		巣房中の 調査卵数	卵の発育状態*1				卵受化幼虫の 生存する 正常巣房数(%)	蛹数(%)**2	受精囊中 の精子数 (10 ⁶ /mm ³)*3
セイヨウ ミツバチ	ニホン ミツバチ		卵	空	幼虫の餌	合計(%)			
4	0	649	100	0	0	100(15.4)	549(84.6)	497(90.5)	1.64
3	1(9:2)*4	778	140	18	2	160(20.6)	618(79.4)	538(87.0)	1.70
2	2(6:4)	688	300	17	4	321(46.7)	367(53.3)	313(85.2)	1.49
1	3(3:6)	696	474	23	10	507(72.8)	189(27.2)	170(89.9)	1.52
0	4	720	676	27	11	714(99.2)	6(0.8)	0(0)	1.48
自然交尾		675	57	0	0	57(8.4)	618(91.6)	565(91.4)	4.54

*1 人工授精後3または4日目に産下した最初の巣房内の卵を記録した。記録4日後に巣房内を観察した。

*2 15日後に有蓋巣房を調査した。()内は正常巣房数に対する割合。蛹からは全て働き蜂が羽化した。

*3 巣房の観察終了後に女王蜂を解剖し、3匹の平均値を示した。

*4 ()内は精子比率。

の幼虫が働き蜂であるか、雄蜂であるかの確認はできず、孵化直後に全て死亡した。この実験区において働き蜂巣板中に32の雄蜂巣房が認められ、その内の18の巣房から雄蜂が羽化したことにより女王蜂の産卵行動は正常であることが確認された。精液量がセイヨウミツバチ3mm³+ニホンミツバチ1mm³(精子比率9:2)、セイヨウミツバチ2mm³+ニホンミツバチ2mm³(精子比率6:4)、セイヨウミツバチ1mm³+ニホンミツバチ3mm³(精子比率3:6)の混合精液では、孵化率はそれぞれ79.5、53.6、26.5%で、羽化したものは全て働き蜂であった。図1は表2で示した同種精子、異種精子および混合精子での孵化率であるが、混合精液では同種精子の割合にほぼ比例して子孫が出現した。3匹の自然交尾女王蜂の受精囊中の平均精子数は454万であった。4mm³を人工授精した各3匹の女王蜂の受精囊中の平均精子数は148万~170万で、受精囊中の精子の生存は正常であった。

考察

ミツバチの異種間交配については、トウヨウミツバチ女王蜂とセイヨウミツバチ雄蜂の報告(Ruttner and Maul, 1983)に加えて、ニホンミツバチ女王蜂とセイヨウミツバチ雄蜂の交尾を観察した。トウヨウミツバチ雄蜂のセイヨウミツバチ女王蜂に対する異種精子の活動は人工授精によって検討され、異種精子は受精囊へ移

動することが認められた(Woyke, 1973; Ruttner and Maul, 1983)。Ruttner and Maul (1983)は、異種精子を人工授精した場合、卵は胚発生初期の段階で死亡することを報告した。セイヨウミツバチ女王蜂にニホンミツバチ雄蜂の精液を人工授精した本研究においても、卵は胚発生初期の段階で死亡することが顕微鏡観察により確認された(図2)。人工授精女王蜂の受精囊中の精子数は148~170万であり、Woyke (1973)、Ruttner and Maul (1983)の結果とほぼ一致しており、精子の生存は正常であった。受精囊中の精子は完全に混じり合っていることが報告されているが(Laidlaw and Page, 1984; Moritz, 1986)、混合精液を人工授精した場合、同種精子の割合にほぼ比例して子孫が出現したことから、異種

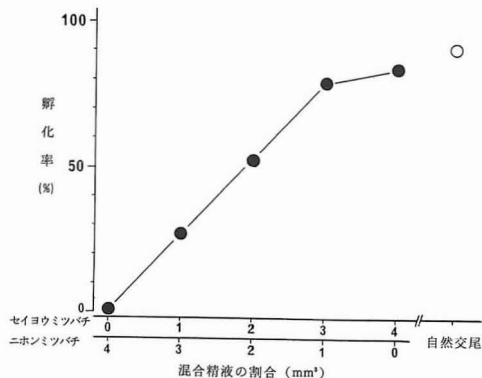


図1 セイヨウミツバチとニホンミツバチの精液を人工授精したセイヨウミツバチ女王蜂による孵化率

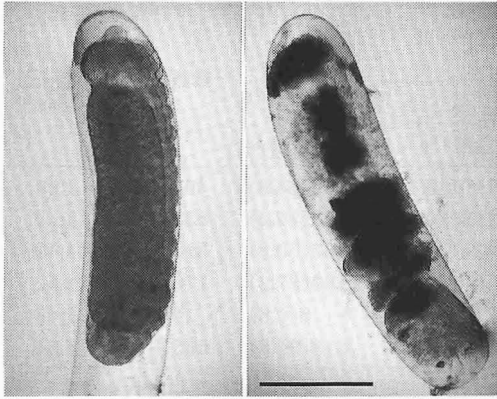


図2 卵の発生状態正常な胚発生が行われ孵化直前の卵(左)と胚発生が進んでいない卵(右)。5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で卵表面の漿膜の一部を取り除いた。スケールは0.5mm。

精子の受精囊中での生存とその混じり合いは正常であること示された。ミツバチの場合、受精囊から続く輸精管から3~10束の精子が中央輸卵管に放出され、卵との受精に使われことが報告されている(Nachtsheim, 1913)。もし異種間交配が成立して異種精子を受け取った場合、異種精子と受精した卵は孵化しないため、その群は衰退し、滅んでしまうなど大きな影響を与えることが予想された。

本報は、Appl. Entomol. Zool. 誌上に公表された論文内容を許可を得て転載した。

(〒194 町田市玉川学園 6-1-1 玉川大学)

引用文献

- Butler, C. G. et al. 1967. Nature 213:423-424.
 Harbo, J. R. 1985. Am. Bee J. 125:282-287.
 Koeniger, G. 1986. In T. E. Rinderer (ed). Bee Genetics and Breeding. Academic Press, Orlando. p. 255-280.
 Koeniger, N. and H. N. P. Wijayagunasekera. 1976. J. Apic. Res. 15:67-71.
 Koeniger, N. and G. Koeniger. 1991. Apidologie 22:581-590.
 Koeniger, N. et al. 1988. Apidologie 19:103-106.
 Laidlaw, H. H. Jr. 1977. Instrumental Insemination of Honey Bee Queens. Pictorial Instructional Manual. Dadant & Sons. pp. 144.
 Laidlaw, H. H. Jr. and R. E. Page Jr. 1984. Genetics 108:985-997.
 Mackensen, O. 1947. J. Econ. Entomol. 40:344

-349.

- Moritz, R. F. A. 1986. Experientia 42:445-448.
 Nachtsheim, H. 1913. Arch. Zellforsch. 11:169-241.
 Rinderer, T. E. et al. 1993. J. Apic. Res. 32:27-33.
 Ruttner, F. 1976. The Instrumental Insemination of the Queen Bee. Apimondia Publ. House, Bucharest. pp. 123.
 Ruttner, F. 1985. In B. Holldobler and M. Lindauer (eds). Experimental Behavioral Ecology and Sociobiology. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. p. 225-236.
 Ruttner, F. and V. Maul. 1983. Apidologie 14:309-327.
 Ruttner, F. et al. 1973. J. Apic. Res. 12:21-34.
 Schley, P. 1988. Am. Bee J. 128:282-284.
 Shearer, D. A. et al. 197. J. Insect Physiol. 16:1473-1441.
 Woyke, J. 1973. J. Apic. Res. 12:151-158.
 Woyke, J. 1975. J. Apic. Res. 14:153-159.
 吉田忠晴. 1989. ミツバチ科学 10(3): 132-138.
 吉田忠晴. 1994. 応動昆 38(2): 85-90.
 Yoshida, T. 1994. Appl. Entomol. Zool. 29 (3): 464-467.
 Yoshida, T. and M. Yamazaki. 1993. In L. J. Conner et al. (eds). Asian Apiculture. Wicwas Press, Connecticut. p. 99-103.
 YOSHIDA, TADAHARU. Interspecific instrumental insemination using mixed semen of Japanese and European honeybees. Honeybee Science (1996) 17 (1):23-26. Honeybee Sci. Res. Ctr., Tamagawa Univ. Machida-shi, Tokyo, 194 Japan.
Apis mellifera (Am) queens were inseminated mixed semen of Am drones and *Apis cerana japonica* (Acj) drones. At the control where Am queens were treated 4mm³ Am drone semen, hatchability was 84.6%. On the other hand, when 4 mm³ Acj semen was given, 0.8% hatched but they died immediately after hatching. Hatchability in cases with 3mm³ Am and 1mm³ Acj, 2mm³ Am and 2mm³ Acj, 1mm³ Am and 3mm³ Acj were 79.4%, 53.3%, and 27.2%, respectively, and they gave only Am workers. Spermatozoa activities in spermatheca seemed normal, but the heterospecific fertilization caused abnormal development. Accordingly Am workers were produced in parallel with the ratio of Am spermatozoa in mixed semen.