พอลิแอนดรีและการกำจัดไข่ของผึ้งหลวง *Apis dorsata* Fabricius, 1793

นางวันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0257-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LEVEL OF POLYANDRY AND WORKER POLICING IN GIANT HONEY BEES, *Apis dorsata* Fabricius, 1793

Mrs. Wandee Wattanachaiyingcharoen

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Biological Sciences

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0257-2

Thesis Title	Level of polyandry and worker policing in giant honey bees, *Apis dorsata* Fabricius, 1793
By	Mrs. Wandee Wattanachaiyingcharoen
Field of Study	Biological Sciences
Thesis Advisor	Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Benjamin P. Oldroyd, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

..... Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Assistant Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Benjamin P. Oldroyd, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

..... Member
(Sureerat Deowanish, D.Agr.)

..... Member
(Chutikarn Kitprasert, Ph.D.)

วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ : พอลิแอนดรีและการกำจัดไข่ของผึ้งหลวง *Apis dorsata* Fabricius, 1793 LEVEL OF POLYANDRY AND WORKER POLICING IN GIANT HONEY BEES, *Apis dorsata* Fabricius, 1793 อาจารย์ที่ปรึกษา : ศ.ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : Dr. Benjamin P. Oldroyd จำนวน 132 หน้า ISBN 974-03-0257-2

ศึกษาพฤติกรรมการกำจัดไข่ในผึ้งหลวง (*Apis dosata*) โดยทำการวิเคราะห์ในส่วนไมโครแซทเทลไลท์ของดีเอ็นเอ วิเคราะห์หาความเป็นแม่ของผึ้งตัวผู้จากผึ้งจำนวน 660 ตัวจากผึ้ง 4 รัง ใช้ไพร์เมอร์ของไมโครแซทเทลไลท์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อผึ้ง *A. dorsata* จำนวน 4 ตำแหน่ง (A14, A24, A88 และ Ad3) พบว่าผึ้งตัวผู้ทั้งหมดเป็นลูกที่เกิดจากนางพญาของรัง และจากการศึกษาการพัฒนาของรังไข่ของผึ้งงานจำนวน 1,902 ตัว จาก 5 รัง พบว่า ไม่มีผึ้งงานตัวใดที่มีการสร้างไข่ จากผลการทดลองสรุปว่าในผึ้งงานของ *A. dorsata* จะไม่มีความสามารถในการขยายพันธุ์ พฤติกรรมการกำจัดไข่ในผึ้งชนิดนี้เกิดขึ้นโดยผึ้งงานตัวอื่นแสดงพฤติกรรมโดยตรงต่อผึ้งงานตัวที่มีการพัฒนาของรังไข่และพฤติกรรมนี้จะอาศัยเฟอโรโมนที่ปล่อยไว้บนไข่ของนางพญาเป็นตัวชี้นำ

ตรวจสอบจำนวนครั้งของการผสมพันธุ์ของผึ้งนางพญา *A. dorsata* โดยวิธีการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์ของดีเอนเอ โดยใช้ไพร์เมอร์ของไมโครแซทเทลไลท์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อผึ้ง *A. dorsata* จำนวน 4 ตำแหน่ง (A14, A24, A88 และ Ad3) วิเคราะห์หาความเป็นพ่อของผึ้งงานจำนวน 2,696 ตัว จาก 13 รัง โดยที่ผึ้งจำนวน 8 รังเป็นผึ้งที่เก็บจากรังที่อยู่กันเป็นกลุ่ม ส่วนอีก 5 รังเก็บจากรังที่อยู่เป็นรังเดี่ยว ผลการทดลองพบว่านางพญาของผึ้ง *A. dorsata* สามารถผสมพันธุ์กับผึ้งตัวผู้ได้มาถึง 64.11±7.39 ในผึ้งที่เก็บจากรังที่อยู่เป็นกลุ่ม และ 62.14±10.27 ในผึ้งที่อยู่เป็นรังเดี่ยว ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของจำนวนผึ้งตัวอย่าง จำนวนครอบครัว จำนวนครั้งของการผสมพันธุ์และค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างที่เก็บจากรังที่อยู่เป็นกลุ่มและตัวอย่างที่เก็บจากรังเดี่ยว

ภาควิชา ชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2544	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

##4173821123 : Biological Sciences
KEY WORDS: Giant Honey Bees / *Apis dorsata* / worker policing / polyandry / Microsatellite / worker sterility
WANDEE WATTANACHAIYINGCHAROEN : LEVEL OF POLYANDRY AND WORKER POLICING IN GIANT HONEY BEES, *Apis dorsata* Fabricius, 1793. THESIS ADVISOR : PROFESSOR SIRIWAT WONGSIRI, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : BENJAMIN P. OLDROYD, Ph.D., 132 pp. ISBN 974-03-0257-2

Worker policing in *Apis dorsata* was expected to be less effective. This due to the identical size and location of brood cells used for rearing male and female eggs. To test this hypothesis, microsatellite analysis was conducted using 4 polymorphic microsatellite loci (A14, A24, A88 and Ad3) to determine mother origin of drone brood in 4 colonies (n=660). The analysis revealed that all males are sons of queens not workers. In addition, dissection was conducted to evaluate workers' ovary activation. The dissection showed that none of 1,902 workers studied has a sign of egg development. These results suggest that functional worker sterility is near universal in *A. dorsata*. Worker policing in this species probably acts directly towards ovary-developed workers and this behaviour must only rely on pheromonal cues.

Polyandry (multiple mating) in *A. dorsata* was reassessed using 4 highly polymorphic microsateliite loci (A14, A24, A88 and Ad3) and relatively large sample sizes (n= 2,696). These samples were collected from aggregated and singly nesting colonies. Microsatellite analysis showed that *A. dorsata* queens have an extraordinarily large number of mates and this is the highest number of mating frequency in this genus. The mean effective mating frequency of aggregation was 64.11±7.39 and 62.14±10.27 in the samples from single colonies. However, no differences in the number of samples, the number of subfamily, the effective mating frequency, and the average coefficient of relatedness, were found between queens from aggregation and single colonies.

Program Biological Sciences Student's signature Wandee
Field of study Biological Sciences Advisor's signature
Academic year 2001 Co-advisor's signature

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Acknowledgements

I wish to express my gratitude to my thesis advisor, Professor Siriwat Wongsiri, for his valuable suggestions, advice and guidance since the beginning of this study.

I am truly grateful to my thesis co-advisor, Dr. Benjamin P. Oldroyd of the School of Biological Sciences, University of Sydney, New South Wales, Australia, for his precious suggestions and encouragement throughout my study. His supports, especially during my stay in Sydney, enable me to finish my laboratory work in the Bee lab. He is always being happy to advise in various ways. My study would not be completed without his supports.

I appreciate all of the members of the thesis committee for their valuable suggestions and discussions in the production of this thesis. Also my gratitude go to the committee of the Biological Sciences Programme for their advice and encouragements throughout my study.

I sincerely thanks all the staff of the Bee Biology Research Unit, Chulalongkorn University, for all of their assistants, suggestions and supports in many ways, especially Dr.Sureerat Deowanish, Tassanee Chaiyawong, Sucheera Insuan, Piyamas Nanork, Supaporn Kijinda, Surachai Leepitakrat and Tipwan Sapsat.

I would like to send my deeply grateful to staff of the Bee Lab of the School of Biological Sciences, University of Sydney, Australia, for their supports, assistants and suggestions on the molecular techniques and various aspects. My thanks go to Greg Good for his technical assistant, Jurgen Parr, Cathy Green, Keryn Wilkes and Rebecca Johnson, for all of their suggestions. Special thanks to Kellie Palmer and Luke Halling for all of their helps.

I wish to thank Dr.Robyn McConchie and Monty for their friendship and supports to my family.

My thanks are extended to many of postgraduate students of the Biological Sciences Programme, especially Pensri Srikanha, Chadnaree Meesukho and Wachira Kittimasak.

Very special thanks to Mr. Sawang Piyapichart of Naresuan University for his assistant in sample collections and guiding with bees. The assistants from the staff of the Agricultural and Environmental Integration Research and Development Unit, Naresuan University, on the production of this thesis are very helpful.

I would like to thank many anonymous honey bee hunters for sample collections.

I am in debt to the Thailand Research Fund for funding my study through the Royal Golden Jubilee Project. The financial support and assistant from this organisation and the staff are truly appreciated. Thanks also due to the Thailand National Science and Technology Development Agency for partly financial support through the Bee Biology Research Unit, Chulalongkorn University.

This study was partially financial supported by the Australian Research Council through Dr. B. P. Oldroyd.

Last but not least, I am truly grateful to my families, Chokbowonthanasarn and Wattanachaiyingcharoen. They are very supportive and encourage throughout my study and also in my life. Supports, encouragement and cheerfulness from my husband Det and my son Teddy, are always deeply appreciated.

Table of Contents

	Page
Thai Abstract	iv
English Abstract	v
Acknowledgements	vi
Table of Contents	vii
List of Tables	viii
List of Figures	ix
Chapter-1: Introduction	1
Chapter-2 : Literature Review	5
Chapter-3 : General Materials and Methods	26
Chapter-4 : Worker policing in *A. dorsata*	34
Chapter-5 : Mating Frequency in *A. dorsata*	53
Chapter-6 : General Discussion	74
References	82
Appendices	93
Biography	132

List of Tables

Table		Page
3.1	Primer sequence of four microsatellite primers	30
3.2	Optimal PCR mixtures for amplifying Microsatellite primers	31
3.3	Conditions used for all PCR reactions	32
4.1	Queen genotypes of 4 colonies	45
4.2	Frequencies of drones genotypes and testing of deviation	46
4.3	Ovary activation in *A. dorsata* workers	49
5.1	Levels of polyandry and intra-colonial genetic relationship in the genus *Apis*	56
5.2.1	Effective mating frequency (m), average coefficient of relatedness (G), number of subfamilies (k) and number of bees (n) of *A. dorsata* sampled from aggregated colonies	67
5.2.2	Effective mating frequency (m), average coefficient of relatedness (G), number of subfamilies (k) and number of bees (n) of *A. dorsata* sampled from single colonies	68
5.3	Mann-Whitney U test of the numbers of samples (n), the number of subfamilies (k), the effective mating frequency (m) and the average coefficient of relatedness (G) between aggregations and non-aggregations	70

List of Figures

Figure		Page
1.1	Sex and casts detrmination in honey bees.....	2
2.1	Classification of the family Apidae	6
2.2	A worker honey bee	7
2.3	Distribution of honey bees in the genus *Apis*	9
2.4	Cladogram of the genus *Apis*	11
2.5	Colony of *A. dorsata*	14
2.6	Plausible evolution of extreme polyandry ..... in the genus *Apis*	20
2.7	Parentage and relatedness of workers ..... adaptive organs of the legs	22
3.1	Polymerase Chain Reaction	29
4.1	Image of microsatellite at A88 locus	42
4.2	Ovary of *A. dorsata* workers	50
5.1	Aggregated colonies on the tree	59
5.2	Sample collection from aggregation	60
5.3	A singly nesting colony	61
5.4	A piece of fresh comb	62
5.5	Image of microsatellite at Ad 3 locus	69
6.1	Model represented the rate of egg misidentification	77
6.2	Reconstruction of cladogram of the genus *Apis*	80