



# БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



## ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ УСЛОВНЫХ РЕФЛЕКСОВ У ДВУХ ВИДОВ ПЧЕЛ *APIS CERANA* И *APIS MELLIFERA*

<sup>2</sup>Джунг Джевон, <sup>1,2</sup>Ким Донг Ин, <sup>1,3</sup>Ильясов Рустем\*\*, <sup>1,2</sup>Ким Килвон, <sup>1,2</sup>Квон Хюн Вук\*

<sup>1</sup>Отдел наук о жизни и основных биологических наук, Инчхонский национальный университет, 22012, Инчхон, Ёнсу-гу, Академи-ро, 119, Южная Корея

<sup>2</sup>Научно-исследовательский центр насекомых-переносчиков болезней, Инчхонский национальный университет, 22012, Инчхон, Ёнсу-гу, Академи-ро, 119, Южная Корея

<sup>3</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, 450054, г. Уфа, Пр. Октября, 71, Россия

\*E-mail: hkwon@inu.ac.kr \*\*E-mail: apismell@hotmail.com

### Резюме

*Apis cerana* и *Apis mellifera*, родственные виды пчел, которые дивергировали около 6 - 9 миллионов лет назад и были географически изолированы более миллиона лет. В последние несколько сотен лет назад эти виды снова встретились в Азии в результате антропогенной деятельности. Оба вида являются важными опылителями и играют ключевую роль в жизни человека. Для успешного развития пчелам важно быстро формировать и сохранять разные условные рефлексы. Рабочие пчелы должны помнить путь как к цветущим растениям, так и обратно к ульям. Кроме того, рабочие пчелы должны запоминать запахи многих присутствующих цветов для хорошего ориентирования в пространстве и быстрого сбора нектара и пыльцы. Чтобы понять различия в особенностях запоминания и эффективности памяти у двух видов пчел, мы исследовали различия в формировании обонятельных навыков *A. mellifera* и *A. cerana* на основе рефлекса удлинения хоботка на определенные запахи. Нами показано, что особенности запоминания и эффективность памяти различны у двух видов пчел. Мы показали, что виды пчел *A. cerana* и *A. mellifera*, несмотря на большое сходство, обладают разными способностями формирования условного рефлекса удлинения хоботка при воздействии условного запаха на обонятельные рецепторы антенн. Обучение *A. cerana* происходит медленнее *A. mellifera*, но кратковременная память через 1 час у *A. cerana* выражена лучше, чем у *A. mellifera*. Однако долговременная память через 24 часа гораздо лучше выражена у *A. mellifera* по сравнению с *A. cerana*. Полученные данные позволяют расширить знания о способностях к обучению и памяти у разных видов пчел и могут стать важной основой для разработки новых подходов по разведению пчел и опылению сельскохозяйственных культур.

**Ключевые слова:** обучение, память, условный рефлекс, *Apis mellifera*, *Apis cerana*, рефлекс удлинения хоботка

## FEATURES OF FORMATION CONDITIONAL REFLEXES IN TWO BEE SPECIES *APIS CERANA* AND *APIS MELLIFERA*

<sup>2</sup> Jung Jewon, <sup>1,2</sup> Kim Dong In, <sup>1,3</sup> Ilyasov Rustem\*\*, <sup>1,2</sup> Kim Kilwon, <sup>1,2</sup> Kwon Hyung Wook\*

<sup>1</sup>Division of Life Sciences, Major of Biological Sciences, Incheon National University, 22012, Incheon, Yeonsu-gu, 119 Academy-ro, South Korea

<sup>2</sup>Convergence Research Center for Insect Vectors, Incheon National University, 22012, Incheon, Yeonsu-gu, 119 Academy-ro, South Korea

<sup>3</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, 450054, Ufa, Prospekt Otyabrya, 71, Russia

\*E-mail: hkwon@inu.ac.kr

\*\*E-mail: apismell@hotmail.com

### Resume

*Apis cerana* and *Apis mellifera* sisterly bee species, which diverged about 6 - 9 million years ago and were geographically isolated more than millions years. Last hundreds year ago these species met again in Asia due human actions. Both species are important pollinators and play key role in human life. For successful development of bees, it is important to quickly form and maintain various conditioned reflexes. Worker bees must remember the way to both flowering plants, and back to the hives. As well, worker bees must remember the smells of most presented flowers for good orientation in space and quickly collecting nectar and pollen. In order to understand the differences in the memory and memory efficiency of the two species of bees, we investigated the differences in the formation of the olfactory skills of *A. mellifera* and *A. cerana* on the basis of the reflex of the elongation of the proboscis on certain odors. Our present study demonstrated that learning and memory performance was different between two honeybee species. We showed the species of *A. cerana* and *A. mellifera*, despite their great similarity, have different abilities for forming a conditioned reflex of elongation of the proboscis under the influence of a conditional smell on the olfactory receptors of the antennae. Learning of *A. cerana* is slower than *A. mellifera*, but short-term memory after 1 hour in *A. cerana* is expressed better than *A. mellifera*. However, the long-term memory after 24 hours is much better expressed in *A. mellifera* compared to *A. cerana*. The received data allow to expand a knowledges about abilities to training and memory of different species of bees and can become an important basis for the development of new approaches for breeding bees and pollination of crops.

**Keywords:** learning, memory, conditional reflexes, *Apis mellifera*, *Apis cerana*, proboscis extension reflex

### Введение

*Apis cerana* F. и *Apis mellifera* L. - родственные виды пчел, важнейшие опылители сельскохозяйственных культур. *A. cerana* является эндемичным видом для большинства стран Азии, где

он использовался для производства меда и опыления растений в течение нескольких тысяч лет. Вид *A. mellifera* занимает западную часть Евразии и всю территорию Африки. До вмешательства человека их ареалы не перекрывались (рис. 1).

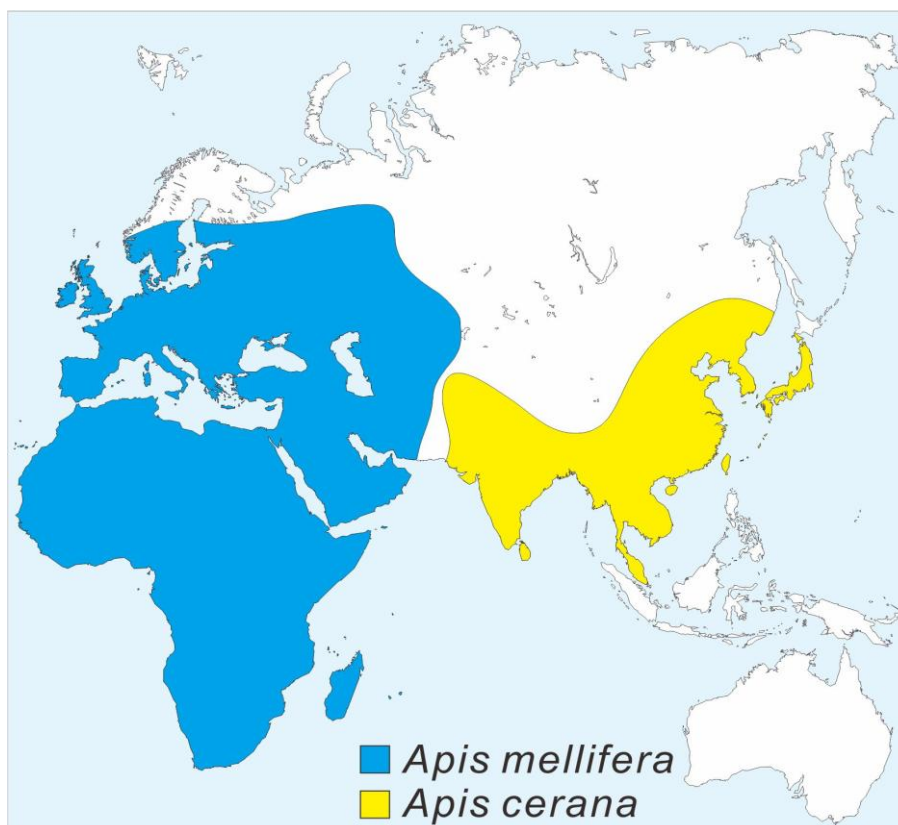


Рис. 1. Естественные ареалы пчел видов *A. mellifera* и *A. cerana*

Пчелы *A. cerana* и *A. mellifera* являются сестринскими видами и характеризуются широким спектром вариаций и адаптаций [Ruttner, 1988]. Подобно *A. mellifera*, *A. cerana* населяет широкий ареал с различными климатическими условиями: от прохладных регионов высоких широт и абсолютных высот до жарких сухих полупустынь и влажных тропиков. *A. cerana*, так же, как и *A. mellifera* генетически и морфологически подразделяется на десятки подвидов, которые различаются по экологии и поведению, особенно между представителями умеренного и тропического климатов [Ruttner, 1988].

Медоносная пчела *A. mellifera* всегда являлась модельным организмом при изучении памяти, социальной организации, разделения труда и сложного поведения насекомых [Smith, 1991; Zhang et al., 2000; Menzel, 2012]. Известно, что медоносная пчела характеризуется хорошей способностью запоминать цвета [von Frisch, 1914], узоры [Horridge, 1996] и запахи [Menzel et al., 1996]. Было показано, что виды пчел *A. mellifera* и *A. cerana* [Qin et al., 2012], а также подвиды *A. mellifera* характеризуются разной способностью запоминать цвета и узоры [Menzel et al., 1973; Qin et al., 2012]. Кроме того, известно, что медоносная пчела способна запоминать объекты [Collett et al., 1983], различать ориентиры [Giurfa et al., 2001] и формировать долговременную память, на основе которой она может оптимизировать траекторию своего полета [Zhang et al., 1996].

Восприятие запахов у медоносной пчелы происходит в антеннах посредством обонятельных рецепторов нейронов, которые преобразуют воздействие запахов в электрические импульсы и передают их в грибовидное тело - центр памяти насекомых [Laska et al., 1999]. Размеры и площадь поверхности антенн у рабочих особей *A. cerana* и *A. mellifera* примерно одинаковые, но распределение сенсорных волосков и сенсилл на антеннах существенно различается. У рабочих особей *A. cerana* на антеннах представлены преимущественно четыре класса сенсилл: плакодеа, триходеум типов А и Б, базиконика, а у *A. mellifera* – четыре класса других сенсилл: кампаниформия, целоконика, ампуллака и хэтика [Jung et al., 2014].

Известно, что медоносная пчела *A. mellifera* обладает рефлексом удлинения хоботка в ответ на обонятельный безусловный раздражитель. Показано, что последовательное воздействие условного и безусловного раздражителя на *A. mellifera* [Takeda et al., 1961; Smith et al., 1994; Gerber et al., 1999] и *A. cerana* [Qin et al., 2012; Wang et al., 2014] способно вырабатывать у пчел ассоциативную память и формировать рефлекс удлинения хоботка на действие условного обонятельного раздражителя.

На данный момент мало известно об особенностях запоминания и формирования

условного рефлекса у видов пчел *A. cerana* и *A. mellifera*. Также, еще не достаточно хорошо изучены особенности кратковременной и долговременной памяти у видов пчел *A. cerana* и *A. mellifera*. В данной работе мы провели сравнительное изучение особенностей запоминания и формирования приобретенного рефлекса удлинения хоботка пчел на действие условного обонятельного раздражителя линалола у двух видов пчел *A. cerana* и *A. mellifera*.

### Материалы и методы

Два вида пчел *A. mellifera* и *A. cerana*, содержатся на пасеках кампуса Инчхонского национального университета в городе Инчхоне, Южная Корея. Эксперимент проводился в период с июня по июль 2017 года. Перед началом эксперимента все семьи были выровнены таким образом, что каждый из них содержал по четыре рамки со взрослыми рабочими особями, по две рамки расплода и по две рамки пыльцы и меда. Фуражирующие особи обоих видов пчел отлавливались на летках у входа в ульи. Для эксперимента было использовано по 80 рабочих особей пчел каждого вида. Все эксперименты проводились с повторностью четыре раза. Отобранные пчелы содержались голодными в течение ночи, согласно описанной методике [Menzel et al., 1973] (рис. 2).



Рис. 2. Экспериментальная установка для изучения процесса запоминания и формирования условных рефлексов пчелы. Перед антеннами пчелы находится наконечник пипетки с условным раздражителем обонятельных рецепторов - раствором линалола.

Отбор особей пчел для эксперимента проводился по максимальному проявлению рефлекса удлинения хоботка в ответ на воздействие безусловного раздражителя 1М раствора сахарозы на антенны. Условный обонятельный раздражитель 1% раствор линалола в минеральном масле (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) подносится к пчеле через пластиковый наконечник пипетки. Скорость потока воздуха вокруг пчелы составляла 1,5 м/с.

Этап формирования условного рефлекса

состоял из поочередного воздействия растворов линалола (3 сек.) и сахарозы (2 сек.) на рецепторы антенн пчелы. Представленный пчеле запах линалола быстро удалялся с помощью вакуумного эксгаустера. Эта процедура проводилась в 7-кратной повторности с интервалом 7 минут. Эксперимент по изучению особенностей долговременной памяти пчел проводился через 1 ч и 24 ч после завершения этапа формирования условного рефлекса.

Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием компьютерной программы SPSS v. 20.0 (IBM, NY, USA). Оценка эффективности формирования условного рефлекса удлинения хоботка пчел разных видов проводилась на основе Q критерия Кохрена. Оценка эффективности сохранения приобретенного условного рефлекса удлинения хоботка пчел разных видов проводилась на основе U критерия Манна-Уитни.

### Результаты

Результаты формирования условного рефлекса пчел *A. mellifera* и *A. cerana* на воздействие раствора линалола представлены на графике (рис. 3). Доля пчел с приобретенным условным рефлексом удлинения хоботка на воздействие раствора линалола повышалась вместе ростом количества обработок у обоих видов пчел (Q критерий Кохрена для *A. cerana*  $Q = 112,3$  и для *A. mellifera*  $Q = 121,9$ , при  $df = 6$ ,  $P < 0,01$ ). При этом кривые характеризуются неравномерным ростом. Так, для *A. mellifera* отмечается небольшое снижение эффективности приобретения условного рефлекса на последних двух этапах испытаний, тогда как для *A. cerana* небольшое снижение эффективности приобретения условного рефлекса отмечается на 5 этапе испытаний, которое сменяется резким ростом, после чего показатели приобретения условного рефлекса для обоих видов пчел выравниваются на 6 и 7 этапах (U критерий Манна-Уитни  $Z = 1,51$ , при  $P = 0,15$ ).

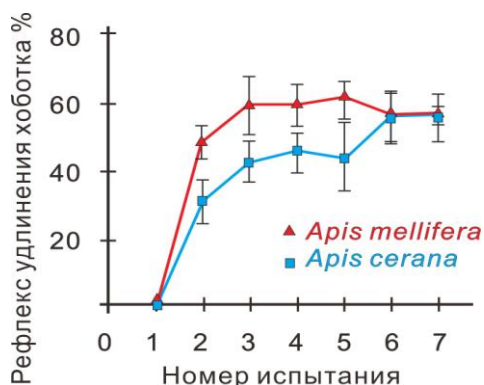


Рис. 3. Особенности формирования условного рефлекса удлинения хоботка пчел *A. mellifera* и *A. cerana* на воздействие раствора линалола при разном числе испытаний.

Исходя из наблюдений можно заключить, что представители вида *A. mellifera* характеризуются большей скоростью приобретения условного рефлекса по сравнению с *A. cerana*. Итоговая эффективность приобретения условного рефлекса у обоих видов пчел не различается. Таким образом, *A. mellifera* обладает большей скоростью приобретения новых навыков и быстрее приспосабливается к изменяющимся условиям среды обитания по сравнению с *A. cerana*. Возможно, такие различия являются результатом особенностей биологии и экологии двух видов пчел.

Исследование сохранения приобретенного условного рефлекса пчел *A. mellifera* и *A. cerana* показало, что спустя 1 час после этапа формирования, рефлекс удлинения хоботка пчел на воздействие раствора линалола сохраняется у 73% *A. cerana* и 62% *A. mellifera* (U критерий Манна-Уитни  $Z = 1,99$ , при  $P < 0,05$ ). Однако через 24 часа условный рефлекс удлинения хоботка пчел сохраняется у 32% *A. cerana* (U критерий Манна-Уитни  $Z = 2,62$ , при  $P < 0,05$ ) и 48% *A. mellifera* (U критерий Манна-Уитни  $Z = 2,04$ , при  $P < 0,05$ ) (рис. 4).

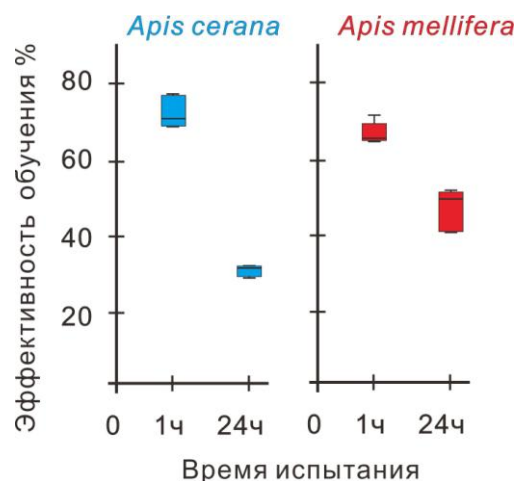


Рис. 4. Особенности сохранения приобретенного условного рефлекса удлинения хоботка пчел *A. mellifera* и *A. cerana* на воздействие раствора линалола через 1 час и 24 часа после этапа формирования.

Следовательно, по результатам эксперимента можно заключить, что *A. cerana* обладает лучшей кратковременной памятью по сравнению с *A. mellifera*, а *A. mellifera* характеризуется лучшей долговременной памятью по сравнению с *A. cerana*. Такие особенности сохранения приобретенного рефлекса во времени у пчел можно объяснить различиями в особенностях биологии и поведения *A. cerana* и *A. mellifera*.

### Обсуждение

Исследование показало, что *A. cerana* уступает *A. mellifera* как по скорости формирования, так и по длительности сохранения условного рефлекса удлинения хоботка на воздействие раствора линалола. Хотя по характеристикам кратковременной памяти *A. cerana* немного превосходит *A. mellifera*.

Другими авторами также было показано, что *A. mellifera* обладают большей скоростью формирования условного обонятельного рефлекса удлинения хоботка по сравнению с *A. cerana*. Однако, по данным авторов, *A. mellifera* не отличается от *A. cerana* по длительности сохранения приобретенного условного рефлекса [Wang et al., 2014]. Такое несоответствие с нашими данными может быть объяснено как особенностями самого эксперимента, поскольку использовались другие условные раздражители, так и биологическими особенностями линий анализируемых пчел.

Обнаруженные нами различия в приобретении и сохранении условного рефлекса *A. mellifera* и *A. cerana* могут быть объяснены биологическими особенностями этих видов пчел. Известно, что *A. mellifera* имеет тенденцию к сбору нектара и пыльцы с более отдаленных территорий по сравнению с *A. cerana* [Koetz, 2013]. Было показано, что рабочие особи *A. mellifera* летают за нектаром и пыльцой на расстояние от 6 до 10 км от улья [Visscher, Seeley, 1982; Beekman, Ratnieks, 2000; Abrol, 2011; Koetz, 2013], тогда как фуражирующие особи *A. cerana* характеризуются сбором нектара и пыльцы на расстоянии от 250 м до 2,5 км [Dhaliwai, 1974; Dyer, Seeley, 1991; Bakker, 1999; Bhuiyan, 2002; Koetz, 2013]. Полеты на дальние расстояния *A. mellifera* занимают длительное время, что требует от пчелы долговременного запоминания запаха и цвета цветов и других объектов, а также важнейшие ориентиры в пространстве. Полеты *A. cerana* более короткие и долговременное запоминание уже не является столь необходимым, как для *A. mellifera*.

Способность к более быстрому запоминанию приобретенных навыков *A. mellifera* по сравнению с *A. cerana* является показателем лучшей приспособляемости *A. mellifera* к изменяющимся условиям среды обитания. Возможно, что более широкий ареал *A. mellifera* по сравнению с *A. cerana* может быть следствием особенностей формирования и сохранения условных рефлексов у этих видов – большие скорость и длительность запоминания дали преимущество в адаптации и позволили *A. mellifera* широко распространиться по всему Старому Свету (рис. 1).

### Заключение

Данное исследование по изучению особенностей запоминания и формирования

условного рефлекса удлинения хоботка на действие обонятельного раздражителя линалола у двух видов пчел *A. cerana* и *A. mellifera* позволяет нам сделать следующее заключение. Виды пчел *A. cerana* и *A. mellifera*, несмотря на большое сходство, обладают разными особенностями формирования условных рефлексов. Обучение *A. cerana* происходит медленнее *A. mellifera*, но кратковременная память через 1 час у *A. cerana* выражена лучше, чем у *A. mellifera*. Однако долговременная память через 24 часа гораздо лучше выражена у *A. mellifera* по сравнению с *A. cerana*. Обнаруженные нами особенности памяти и обучения у двух видов пчел *A. cerana* и *A. mellifera* могут быть применены при разведении пчел для формирования и закрепления определенных навыков поведения, например, предпочтительного опыления определенных видов сельскохозяйственных культур и сбора пыльцы и нектара с определенных видов цветущих растений. Развитие подходов управления поведением пчел позволит повысить эффективность сельского хозяйства и качества жизни человека в целом.

### Благодарности

Работа была проведена при поддержке Совместной исследовательской программы развития сельского хозяйства и технологий (Cooperative Research Program for Agriculture Science and Technology Development) (номера проектов: PJ012285 и PJ012526), а также стипендии для научных исследований докторов наук Инчхонского национального университета, Инчхон, Южная Корея (postdoctoral fellowships of Incheon National University, Incheon, South Korea).

### Литература

1. Abrol D. P. Foraging // Honeybees of Asia. Berlin: Heidelberg, Germany. 2011. P. 257-292.
2. Bakker D. R. Foraging and habitat selection by two species of honey bee near Lore Lindu National Park in Sulawesi, Indonesia // Master of Science Thesis. Guelph: The University of Guelph, Canada. 1999. 119 p.
3. Beekman M., Ratnieks F. L.W. Long-range foraging by the honeybee, *Apis mellifera* L. // Functional Ecology. 2000. V. 14. P. 490-496. DOI: 10.1046/j.1365-2435.2000.00443.x.
4. Bhuiyan M. K.H., Hossain M. M., Bari M. N. Rearing and management of *Apis cerana* (F.) and occurrence of pests in honeybee colonies // Journal of Biological Sciences. 2002. V.2. P. 14-17. DOI: 10.3923/jbs.2002.14.17.
5. Collett T. S., Cartwright B. A. Eidetic images in insects: their role in navigation // Trends in Neurosciences. 1983. V.6. P. 101-105. DOI: 10.1016/0166-2236(83)90048-6.
6. Dhaliwai H. S., Sharma P. L. Foraging range of the Indian honeybee // J. Apicultural Research. 1974.

- V.13. P. 137-141. DOI: 10.1080/00218839.1974.11099769.
7. Dyer F. C., Seeley T. D. Dance dialects and foraging range in three Asian honey bee species // Behavioral Ecology and Sociobiology. 1991. V.28. P. 227-233. DOI: 10.1007/BF00175094.
  8. Gerber B., Ullrich J. No evidence for olfactory blocking in honeybee classical conditioning // Journal of Experimental Biology. 1999. V.202. P. 1839 - 1854.
  9. Giurfa M., Zhang S., Jenett A., Menzel R., Srinivasan M. V. The concepts of 'sameness' and 'difference' in an insect // Nature. 2001. V.410. P. 930 - 932. DOI: 10.1038/35073582.
  10. Horridge G. A. The honeybee (*Apis mellifera*) detects bilateral symmetry and discriminates its axis // Journal of Insect Physiology. 1996. V.42. P. 755 - 764. DOI: 10.1016/0022-1910(96)00026-1.
  11. Jung J. W., Park K. W., Oh H. W., Kwon H. W. Structural and functional differences in the antennal olfactory system of worker honeybees of *Apis mellifera* and *Apis cerana* // J. Asia-Pacific Entomology. 2014. V.17. P.639-646. DOI: 10.1016/j.aspen.2014.01.012.
  12. Koetz A. H. Ecology, behaviour and control of *Apis cerana* with a focus on relevance to the Australian incursion // Insects. 1980. V.4. P. 558 - 592. DOI: 10.3390/insects4040558.
  13. Laska M., Galizia C., Giurfa M., Menzel R. Olfactory discrimination ability and odor structure-activity relationships in honeybees // Chemical Senses. 1999. V.24. P. 429 - 438.
  14. Menzel R., Freudel H., Rühl U. Rassenspezifische unterschiede im lernverhalten der honigbiene (*Apis mellifica* L.) // Apidologie. 1973. V.4. P. 1-24.
  15. Menzel R., Hammer M., Müller U., Rosenboom H. Behavioral, neural and cellular components underlying olfactory learning in the honeybee // Journal of Physiology, Paris. 1996. V.90. P. 395 - 398.
  16. Menzel R. The honeybee as a model for understanding the basis of cognition // Nature Reviews Neuroscience. 2012. V.11. P. 758 - 768. DOI: 10.1038/nrn3357.
  17. Qin Q.H., He X.J., Tian L.Q., Zhang S.W., Zeng Z.J. Comparison of learning and memory of *Apis cerana* and *Apis mellifera* // Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology. 2012. V.198. P. 777 - 786. DOI: 10.1007/s00359-012-0747-9.
  18. Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honeybees. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. 288 p. DOI: 10.1016/0169-5347(89)90176-6.
  19. Smith B. H., Cobey S. The olfactory memory of the honeybee, *Apis mellifera*. II. Blocking between odorants in binary mixtures // Journal of Experimental Biology. 1994. V.195. P. 91 - 108.
  20. Smith B. H. The olfactory memory of honeybee, *Apis mellifera*: I. Odorant modulation of short and inermediated-term memory after single trial conditioning // Journal of Experimental Biology. 1991. V.161. P. 367 - 382.
  21. Takeda K. Classical conditioned response in the honeybee // Journal of Insect Physiology. 1961. V.6. P. 168-179.
  22. Visscher P. K., Seeley T. D. Foraging strategy of honeybee colonies in a temperate deciduous forest // Ecology. 1982. V.63. P. 1790 - 1801.
  23. Von Frisch K. Der Farbensinn und Formensinn der Biene. Jena: Verlag von Gustav Fischer, 1914. 211 p. DOI: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.11736>.
  24. Wang Z., Tan K. Comparative analysis of olfactory learning of *Apis cerana* and *Apis mellifera* // Apidologie. 2013. V.45. P. 45 - 52. DOI: 10.1007/s13592-013-0228-3.
  25. Zhang S., Mizutani A., Srinivasan M. Maze navigation by honeybees: learning path regularity // Learning and Memory. 2000. V.7. P. 364 - 374.
  26. Zhang S. W., Bartsch K., Srinivasan M. V. Maze learning by honeybee // Neurobiology of Learning and Memory. 1996. V.66. P. 267 - 282.