

생식기관과 교미에 의한 국내산 호박벌(*Bombus ignitus*)의 성적 성숙시기

윤형주* · 이경용 · 고현진

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 곤충산업과

Sexual Maturity Time of Reproductive Organ Development and Mating in the Korean Native Bumblebee, *Bombus ignitus*

Hyung Joo Yoon*, Kyeong Yong Lee and Hyeon-Jin Ko

Department of Agricultural Biology, The National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

ABSTRACT: To increase the mating rate of *Bombus ignitus* used as insect pollinator, we investigated the sexual maturity time of *B. ignitus*. In investigating ovary development such as the number of eggs per ovariole and spermatheca size, the time of sexual maturity of queen was 10 days after eclosion. In case of male, the number of sperm was 246 thousand at immediately after eclosion, and was highest as 480 thousand at 9 days, and tended to show a dramatic decline at 35 days (87 thousand). The more mating time, the less the number of sperm. In consideration of number of sperms, the time of sexual maturity of male was 3-15 days after eclosion. In the sexual maturity time of queen in mating, the queen was not mated at immediately after eclosion, and showed a decrease in 20 days. In terms of the rate of mating and oviposition, the favorable time for mating of queen was 9-20 days. On the other hand, the male showed 3.3% of mating at immediately after eclosion, showed the highest of 43.3% at 6 days after eclosion, and tended to decrease in 25 days. The sexual maturity time for mating of male was 6-20 days. In summary, our results indicate that sexual maturity time of *B. ignitus* in reproductive organs and mating is most favorable in 9-12 days after eclosion for queen and 6-9 days for male.

Key words: Bumblebee, *Bombus ignitus*, Ovary, Sperm, Mating, Sexual maturity

초 록: 화분매개곤충인 호박벌(*B. ignitus*)의 교미율을 높이기 위하여 생식기관 발육과 교미에 의한 성적 성숙시기를 조사하였다. 난소 소관 당 알수와 수정낭 크기 등 난소 발육으로 볼 때, 여왕벌의 성적 성숙시기는 우화 10일 이내이었다. 수벌의 정자수는 우화당일에 24.6만개이었고, 우화 9일째가 48.0만개 정도로 가장 많았으며, 우화 35일(8.7만개) 이후 정자수가 감소하는 경향을 보였다. 또한 교미횟수가 증가함에 따라 정자수가 줄어드는 것을 알 수 있었다. 수벌의 정자수에 의한 성적 성숙시기는 우화 3~15일이었다. 교미에 의한 성적 성숙시기 조사결과, 여왕벌은 우화직 후에는 전혀 교미를 하지 않았으며, 우화 20일 이후에는 교미율이 떨어지는 경향을 보였다. 교미율과 산란율 등으로 볼 때 여왕벌의 교미에 적합한 시기는 우화 9~20일이었다. 반면에 수벌은 우화 직후에도 3.3% 교미하였으며, 우화 6일째가 43.3%로 가장 높았으며, 우화 25일 이후부터는 감소하는 경향이 있었다. 교미율과 산란율 등으로 볼 때, 수벌의 교미 성숙시기는 우화 6~20일이었다. 이상의 생식기관 발육과 교미에 의한 봉세발달 등으로 볼 때 호박벌 여왕벌의 최적 성적 성숙시기는 우화 9~12일, 수벌은 우화 6~9일로 판단된다.

검색어: 뒤영벌, 호박벌, 난소, 정자수, 교미, 성적성숙

최근 시설재배작물이 다양화되고 재배면적이 확대되면서 화분매개곤충의 중요성이 부각되고 있는데, 화분매개곤충인 뒤영벌은 진동수분형 벌이기 때문에 꿀이 없는 가지과 식물 특히 토마토, 가지 등에 효과적이며, 비닐하우스 등 좁은 공간에

대한 적응성이 높은 특징이 있다. 또한 꿀벌에 비하여 저온 및 약천후에 활동성이 높아 방화활동이 우수하며 공격성이 약하기 때문에 시설 재배 농가에게 화분매개에 필요한 노동력을 절감시키고, 질적, 양적으로 우수한 상품을 제공하는 장점을 가지고 있다(Buchmann and Hurley, 1978; Iwasaki, 1995). 뒤영벌은 북반구의 온대와 아한대에 분포 중심을 갖고 한냉, 다습한 기후에 적응해온 진사회성 곤충으로 전 세계에 약 239 종이 보

*Corresponding author: yoohj1023@korea.kr

Received October 23 2018; Revised October 31 2018

Accepted November 14 2018

고되고 있다(Hannan et al., 1998; Williams, 1998). 유럽산 뒤영벌은 1987년 북유럽을 중심으로 시설 채소 및 과수 등의 화분매개곤충으로 상품화되어 세계 각국에 판매되기 시작하여(de Ruijter, 1997; Free, 1993; Masahiro, 2000), 2004년, 전 세계 뒤영벌 생산량은 약 100만 상자로 추정된다. 그 중에서 유럽산 *Bombus terrestris* 930,000봉군(93%), 북아메리카의 *B. impatiens* 55,000 봉군(5.5%), 유럽산 *B. lucorum*, 동아시아의 *B. ignitus*, 그리고 북아메리카의 *B. occidentalis* 수천봉군(1.5%)으로 전 세계 239종의 뒤영벌 중에 단지 5종만이 상업적으로 판매되고 있다(Velthuis and van Doorn, 2006). 2015년 기준 전 세계 뒤영벌 생산량은 약 250만 봉군으로 추정되며, 국내에서는 약 10만 5천 봉군이 판매되었으며 이중 89%가 자체 생산 판매되었다(Yoon, H. J. 개인자료).

뒤영벌은 꿀벌처럼 여왕벌, 일벌, 수벌로 이루어진 기본단위로 봉군을 형성한다(Free, 1993; Duchateau and Velthuis, 1988). 1년에 1세대인 뒤영벌은 가을철에 일벌, 수벌이 차례로 죽고, 교미를 끝낸 신여왕벌만이 땅속에 잠입하여 6~7개월간 휴면하여 이듬해 봄에 땅속에 산란을 하는 생활사를 가진다(Heinrich, 1979; Duchateau and Velthuis, 1988). 뒤영벌의 생활사에서 여왕벌과 일벌, 수벌을 생산하는 결정적인 시기는 교미시기이다. 교미를 위해서 서양뒤영벌(*B. terrestris*) 여왕벌은 큰턱 샘에서 분비되는 성페르몬을 방출한다(Bergstrom, 1981; Van et al., 1978). 수벌 또한 머리의 아래턱 샘에서 분비되는 'farnesol'로 밝혀진 페르몬을 적당 지점에 표시해 두고 순찰비행을 하며, 여왕벌과 표시해둔 비행길에서 만나 교미를 시도한다(Svensson, 1980; Williams 1991). Djegham et al. (1994)은 혼인비행을 확인할 수 없는 교미상자 내에서 성벌과 여왕벌의 움직임에 의한 더듬이의 감지가 성공적인 교미를 하는데 중요한 요인이라고 하였다. 서양뒤영벌의 교미에 적당한 나이, 정소관에서 정자의 양과 전달 등이 보고되었고(Röseler, 1973; Duchateau, 1985; Duchateau and Mariën, 1995; Duvoisin et al., 1999), 나이, 성별에 따른 행동 및 정자 생산과의 관계가 밝혀졌다(Tasei et al., 1998). 뒤영벌 수벌은 꿀벌 수벌보다는 크지만 정자수는 40만~60만으로 꿀벌 수벌 정자수의 1/10 정도밖에 되지 않는다(Röseler, 1973; Duchateau and Mariën, 1995, Baer and Schmid-Hempel, 2000). 또한 교미할 때 여왕벌의 재교미를 막기 위해서 수벌은 정자 전달 직후 여왕벌의 생식기 속에 4가지의 fatty acid와 cycloprolyproline으로 구성된 mating plug를 전달한다고 보고하였다(Baer et al., 2000, 2001). 이처럼 서양뒤영벌의 교미시기, 나이, 성별에 따른 행동 및 정자 생산 등에 대한 연구는 많이 보고 되어있지만 토종 뒤영벌인 호박벌(*B. ignitus*)의 성별에 따른 교미 행동 및 정자 생산 대한 연구는 적은 편이다.

이에 본 연구에서는 국내산 뒤영벌인 호박벌의 교미율을 높여 우량형질을 확보하기 위한 방법으로 여왕벌과 수벌의 생식기 발달과 교미에 적합한 나이와 수벌의 교미능력을 확인하고자 하였다. 따라서 호박벌 여왕벌의 난소내 알 수, 수정낭 크기, 수벌의 정자수 등 생식기 발육과 교미에 의한 봉세발달 그리고 수벌의 교미횟수에 따른 정자수와 교미율 등을 조사하였다.

재료 및 방법

실험곤충 및 사육

실험곤충은 국립농업과학원 농업생물부 화분매개곤충연구실에서 실내 계대사육한 2세대 호박벌(*B. ignitus*)을 사용하였다. 실험곤충 사육은 온도 $27 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $65 \pm 5\%$ R.H., 암 조건으로 하였다(Yoon et al., 2003). 실험곤충은 산란용($10.5 \times 14.5 \times 6.5$ cm) 및 봉군 증식용 상자($21.0 \times 21.0 \times 15.0$ cm)를 이용하여 사육하였다. 산란용 상자는 여왕벌을 실내에 정착시켜 산란을 유도하기 위한 것으로 첫째의 일벌이 출현하면 봉군 증식용 상자로 옮겨서 사육하였다. 먹이로는 40%의 설탕물과 화분단자를 공급하였다. 화분단자는 양봉장에서 채취한 신선 화분을 40%의 설탕물로 혼합하여 긴 원통형 소시지 형태로 만든 다음 필요할 때마다 잘라서 난괴 가까이 주었다. 40%의 설탕물은 부패방지를 위하여 0.2%의 sorbic acid를 첨가하였다.

생식기에 의한 호박벌 여왕벌 및 수벌의 성적 성숙시기 조사

생식기 발육에 의한 호박벌 여왕벌의 성적 성숙시기를 조사하기 위하여 우화일별 미교미 및 교미 여왕벌의 난소발육을 조사하였다. 여왕벌은 우화 5일, 10일, 15일 및 20일의 2세대 처녀 여왕벌과 우화 9일된 수벌과 교미한 우화 5일, 10일, 15일 및 20일의 여왕벌을 사용하였다. 난소발육조사는 우화일별로 미교미와 교미 여왕벌을 해부하여 난소 내 난소소관 당 미성숙 알과 성숙한 알 수, 수정낭 크기 등을 조사하였다. 실험곤충 수는 실험구당 3마리 여왕벌, 28개의 난소소관을 이용하였다.

생식기 발육에 의한 수벌의 성적 성숙시기는 정자수로 조사하였다. 실험곤충인 수벌은 우화 직후, 3일, 6일, 9일, 12일, 15일, 20일, 25일, 30일, 35일 및 40일의 미교미 수벌을 사용하였다. 우화일별로 3마리의 수벌을 해부하여 정소 안에 들어있는 정자수를 계산하였다. 교미횟수에 따른 정자수 역시 동일한 방법을 사용하였으며, 우화 9~10일된 수벌을 사용하였다. 실험곤충 수는 실험구당 3마리 수벌을 사용하였다.

호박벌 수벌의 정자수 측정

호박벌 수벌의 정자수를 측정하기 위하여 먼저 수벌의 정자를 채취하였다. 수벌의 정자채취는 Yoon et al. (2006)의 방법을 이용하였다. 채취한 수벌의 accessory test는 5°C의 냉장고에 보관 후 필요에 따라 400배의 현미경하에서 정자수를 관찰하였다. 시험구당 3마리 수벌의 정소를 사용하였으며 정소당 16개 cell 즉 48개 cell에서 정자수를 측정하였다. 정자수의 측정은 0.5 ml의 튜브(ependorf tube)에 100 µl의 생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)와 정소를 넣고 혼합기(vortex mixer)를 이용하여 혼합하였다. 이 혼합액 중에서 10 µl를 피펫으로 헤모사이토미터(hemocytometer)에 떨어트리 정자수를 측정한 다음 계산하였다.

교미에 의한 호박벌 여왕벌 및 수벌의 성적 성숙시기 조사

교미에 의한 호박벌 여왕벌의 성적 성숙시기 조사를 위해서 여왕벌은 우화 직후, 3일, 6일, 9일, 12일, 15일, 20일, 25일, 30일, 35일 및 40일의 2세대 처녀여왕벌과 우화 9일된 수벌을 사용하였다. 실험군총 수는 여왕벌과 수벌의 비율은 1:3의 비율로 총 각 시험구당 총 30마리의 여왕벌과 90마리의 수벌을 사용하였다. 55 × 65 × 40 cm 크기의 교미상자에 여왕벌 10마리와 수벌 30마리씩 총 3개의 교미상자를 사용하였다. 23~25°C, 65% R.H., 1,000 lux의 교미환경에서 오전 10~12시까지 2시간 동안 교미율을 조사하였다. 또한 산란율을 조사를 위하여 우화 시기별로 교미한 여왕벌을 탄산가스 처리한 다음(Yoon et al., 2003), 사육하였다. 사육시작부터 40일 이내에 산란하기 못한 여왕벌은 산란율에서 제외하였다. 수벌의 경우, 우화 직후, 3일, 6일, 9일, 12일, 15일, 20일, 25일, 30일, 35일 및 40일째의 수벌을 우화 6일된 처녀여왕벌을 사용하여 교미율과 산란율을 조사하였다. 실험군총 수와 교미조건은 호박벌 여왕벌의 성적 성숙시기와 동일하게 하였다.

수벌의 우화일수 및 교미횟수에 따른 교미율 조사

수벌의 교미능력을 확인하기 위하여 또한 오전 9시부터 오후 5시까지 교미시간대별 교미율과 우화일수 및 교미횟수에 따른 교미시간도 조사하였다. 우화 직후, 3일, 6일, 9일, 12일, 15일, 20일, 25일, 30일, 35일 및 40일째의 수벌을 우화 6일된 처녀여왕벌과 교미하여 우화일수별로 교미율을 조사하였다. 실험군총 수는 여왕벌과 수벌의 비율은 1:3의 비율로 총 각 시험구당 총 30마리의 여왕벌과 180마리의 수벌을 사용하였다. 교

미횟수별 수벌의 교미율 조사는 우화 6일째 여왕벌 30마리와 우화 9일째 수벌 30마리를 넣어 실험하였다. 총 6개의 교미상자를 이용하여 여왕벌 180마리와 수벌 180마리를 실험군총으로 사용하였다. 1회 교미한 수벌을 대상으로 동일한 수의 우화 6일째 처녀여왕벌과 교미시켜 2회 교미율과 교미시간을 조사하였다. 3회, 4회 교미도 1회 교미와 동일한 방법으로 교미횟수에 따른 수벌과 같은 수의 처녀여왕벌을 사용하였다. 즉 수벌의 실험총수는 1회 교미 58마리, 2회 41마리, 3회 11마리, 4회 1마리로 하였다.

통계분석

본 실험의 통계분석은 SPSS PASW 22.0 for windows 통계 패키지(IBM, Chicago, USA)을 이용하여 one-way ANOVA test (post Hoc: Tukey's HSD)와 Chi-square test로 통계 분석하였다. 미교미 및 교미 호박벌 여왕벌의 난소 내 알 수, 여왕벌의 수정낭 크기, 우화일별 및 교미횟수에 의한 수벌의 정자수 등은 one-way ANOVA test를 사용하였다. 또한 교미에 의한 여왕벌과 수벌의 교미율과 산란율 등은 Chi-square test를 이용하였다. one-way ANOVA test를 한 자료 중 유의성이 있는 데이터는 Tukey's HSD로 사후검정을 수행하였다.

결과 및 고찰

생식기 발달에 의한 호박벌 여왕벌의 성적 성숙시기

우화 5일부터 20일까지 5일 간격으로 미교미 및 교미 호박벌 여왕벌의 난소 내 알의 수와 수정낭의 크기 등으로 생식기 발달에 의한 성적 성숙시기를 조사하였다. 호박벌 여왕벌은 1쌍의 난소와 각 난소 당 4개의 난소소관을 가지고 있다(Yoon et al., 1999, Fig. 1). 이에 우화일별로 미교미 여왕벌의 난소 내 난소소관 당 알 수를 성숙란과 미성숙란으로 나누어 조사한 결과(Table 1), 난소 소관 당 성숙란수가 2.00~2.25개로 우화일별 간에 성숙란 수에 차이가 없었다(one-way ANOVA test, $F(3,92) = 1.197, P = 0.316$). 난소 소관 당 미성숙 알 수는 1.79~2.13개로

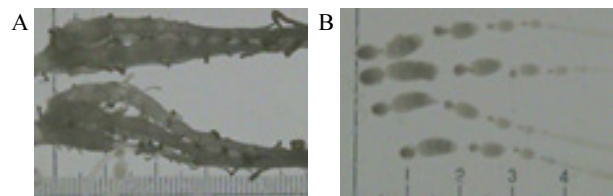


Fig. 1. Ovarioles (A) and eggs (B) of mated *B. ignitus* queen.

Table 1. The number of eggs per ovariole at age of non-mated *B. ignitus* queen

Age of queen	Number		Total
	Matured egg	Non-matured egg	
5	2.25 ± 0.11	1.79 ± 0.10	4.04 ± 0.11
10	2.00 ± 0.09	2.13 ± 0.09	4.13 ± 0.11
15	2.08 ± 0.13	1.92 ± 0.15	4.00 ± 0.16
20	2.21 ± 0.18	1.88 ± 0.11	4.08 ± 0.12
Total	2.14 ± 0.05	1.93 ± 0.06	4.06 ± 0.06

- 1) Twenty four ovarioles of three non-mated *B. ignitus* queens were allotted for each experimental age of queen regime.
 2) There was no significant difference in number of eggs per ovariole at age of non-mated queens at $P < 0.05$ using the oneway ANOVA.

Table 2. The number of eggs per ovariole at age of mated *B. ignitus* queen

Age of queen	Number		Total
	Matured egg	Non-matured egg	
5	2.21 ± 0.10ab	2.04 ± 0.13	4.25 ± 0.15
10	2.58 ± 0.12a	1.71 ± 0.11	4.29 ± 0.11
15	2.38 ± 0.10ab	1.88 ± 0.09	4.25 ± 0.09
20	2.13 ± 0.13b	1.96 ± 0.11	4.08 ± 0.13
Total	2.32 ± 0.06	1.90 ± 0.06	4.22 ± 0.06

- 1) Twenty four ovarioles of three mated *B. ignitus* queens were allotted for each experimental age of queen regime.
 2) There was no significant difference in number of eggs per ovariole at age of mated queens at $P < 0.05$ using the oneway ANOVA and Tukey's HSD test.

성숙란 수보다 적었지만, 미성숙란 수 역시 우화일별 간에는 통계적 유의차가 없었다($F(3,92) = 1.529, P = 0.212$). 성숙란과 미성숙란을 합한 미교미 여왕벌의 난소 소관 당 알 수는 4.00~4.13개로 우화 10일째의 알 수가 4.13개로 가장 많았고, 그 후부터 감소하는 경향을 보였다. 하지만 통계적으로 유의성은 확인되지 않았다($F(3,92) = 0.180, P = 0.909$).

교미 여왕벌의 경우(Table 2), 난소 소관 당 성숙란의 수는 2.13~2.58개로($F(3,92) = 3.224, P = 0.026$), 미교미 여왕벌의 것보다 다소 많았으나, 미성숙란의 수는 1.71~2.04개($F(3,92) = 1.626, P = 0.189$)로 미교미 여왕벌의 것보다 적었다. 교미 여왕벌의 난소 소관 당 알 수는 4.08~4.29개로 우화 10일째의 알 수가 4.29개로 가장 많았다. 미교미 여왕벌과 유사하게 우화 10일 후부터 감소하는 경향을 보였으나, 교미 여왕벌의 우화일별 알 수는 차이가 없었다($F(3,92) = 0.558, P = 0.644$). 결론적으로 호박벌의 미교미와 교미 여왕벌의 우화일별 난소 내 알 수는 차이가 없었지만 전반적으로 교미 여왕벌의 난소 소관 당 알 수가 미교미 여왕벌보다 다소 많은 경향을 보였다. 또한 미교미와 교미 여왕벌 모두 우화 10일째 이후로 알 수가 감소하는 것을 알 수 있었다. Yoon et al. (1999)은 호박벌 여왕벌의 난소발육 조사 결과, 교미한 여왕벌의 난소 소관 당 알 수가 미교미 여왕

벌보다 많으며, 우화일별(6, 10, 15일)로는 우화 10일째 여왕벌의 알 수가 가장 많고 15일째의 알 수는 적다고 하였다.

우화일별로 미교미와 교미 여왕벌을 해부하여 수정낭 크기를 조사한 결과(Fig. 2, Table 3). 미교미 여왕벌의 수정낭의 단경은 297~330 μm , 장경은 390~413 μm 로 우화 15일 이후부터 수정낭의 크기가 작아지는 경향을 보였다(Table 3). 하지만 우화일별로 수정낭의 크기는 차이가 없었다(단경 $F(3,8) = 0.324, P = 0.808$; 장경 $F(3,8) = 0.088, P = 0.965$). 교미 여왕벌의 수정낭 크기는 단경은 310~373 μm , 장경은 383~403 μm 로 미교미 여왕벌의 수정낭과 비교해볼 때, 단경은 다소 커지는 반면, 장경은 작아지는 경향이였다. 이는 아마도 수정란의 경우, 정자가 가득 저장되어있기 때문에 정자가 없는 미수정란(Fig. 2A)

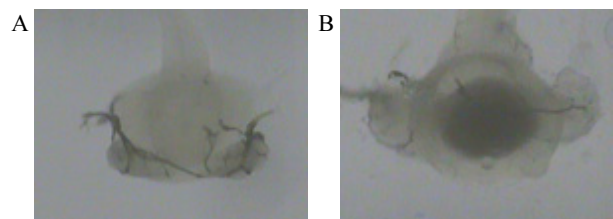
**Fig. 2.** Comparison of spermatheca of non-mated (A) and mated (B) *B. ignitus* queen.

Table 3. Comparison of spermatheca size at age of non-mated and mated *B. ignitus* queen

Age of queen	Spermatheca (100 μ m)			
	Non-mating		Mating	
	Width	Length	Width	Length
5	3.23 \pm 0.23	4.13 \pm 0.38	3.10 \pm 0.06	4.00 \pm 0.06
10	2.97 \pm 0.18	3.90 \pm 0.44	3.40 \pm 0.20	3.97 \pm 0.03
15	3.30 \pm 0.36	4.13 \pm 0.50	3.73 \pm 0.22	4.03 \pm 0.03
20	3.23 \pm 0.23	3.97 \pm 0.24	3.43 \pm 0.23	3.83 \pm 0.17
Total	3.18 \pm 0.12	4.03 \pm 0.17	3.42 \pm 0.11	3.96 \pm 0.05

1) The spermathecae of three non-mated and mated *B. ignitus* queens were allotted for each experimental age of queen regime.
 2) There was no significant difference in spermatheca size at age of non-mated and mated queens at $P < 0.05$ using the oneway ANOVA test.

보다 원형에 가까워지는 것으로 판단된다(Fig. 2B). 교미한 여왕벌의 수정낭 역시 우화 15일 이후부터 수정낭의 크기가 작아 지기는 하였으나, 우화일별로 크기에는 유의성이 없었다(단경 $F(3,8) = 1.842, P = 0.218$; 장경 $F(3,8) = 0.922, P = 0.473$).

이상의 미교미와 교미 여왕벌의 난소 내 알 수와 수정낭의 크기 등 생식기 발달의 결과로 볼 때, 미교미 여왕벌보다 교미한 여왕벌의 난소가 더 발달된 것을 알 수 있었다. 또한 난소 소관 당 알 수와 수정낭 크기로 볼 때, 호박벌 여왕벌의 성적 성숙 시기는 우화 10일 이내인 것으로 판단된다. Medler (1962)는 여왕벌이 우화 직후부터 5일 동안에는 대부분의 알이 작거나 중간 크기였고, 25일까지는 큰 알이 발견되었지만 26~50일 사이에는 큰 알이 없어지는 알의 재흡수가 일어난다고 하였다.

정자수에 의한 호박벌 수벌의 성적 성숙시기

호박벌 수벌의 성적 성숙시기를 알아보기 위해서 우화 직후부터 3~5일 간격으로 우화 40일까지 수벌의 정자수를 조사하였다(Figs. 3, 4). 그 결과, 우화당일 수벌의 정자수는 $246,400 \pm 144,900$ 개였고, 우화 3일부터 증가하여 우화 9일에는 $443,900 \pm 107,700$ 개로 가장 많았다. 우화 12일($380,100 \pm 111,400$ 개)부터 우화 30일($346,300 \pm 116,200$ 개)는 서서히 감소하는 경향을 보였다. 하지만 우화 35일부터는 급격하게 감소하여 $86,900 \pm 45,600$ 개, 우화 40일에는 $34,700 \pm 11,300$ 개로 정자수가 가장 많았던 우화 9일의 12.8배나 감소하여 수벌의 정자수는 우화일에 따라 크게 차이가 있었다($F(10,121.810) = 182.404, P = 0.0001$). 이와 같이 우화일별 수벌의 정자수로 볼 때 호박벌 수벌의 성적 성숙시기는 우화 3일부터 30일까지 가능하나 최적 성숙시기는 우화 9일로 생각된다. 서양뒤영벌 수벌의 정자수는 40만~60만 정도(Röseler, 1973; Duchateau and Mariën, 1995, Baer and Schmid-Hempel, 2000)로 우화 6일 이후부터

정자가 정소관(또는 수정관 Vas deferentiae)으로 이동하여 정소관은 커지고 고환은 작아지며, 각 정소관의 중간부분은 결국

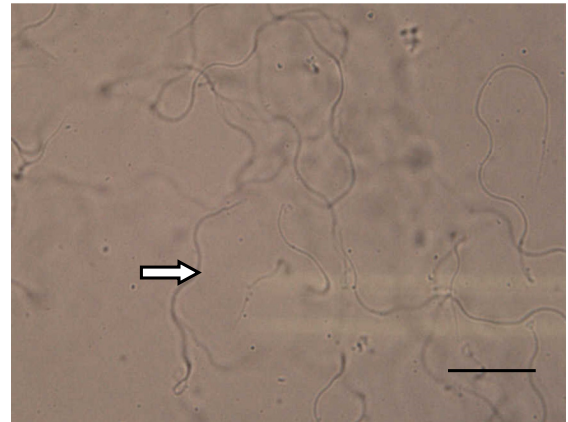


Fig. 3. The sperm of non-mated *B. ignitus* male. Arrow, sperm; scale bar, 20 μ m.

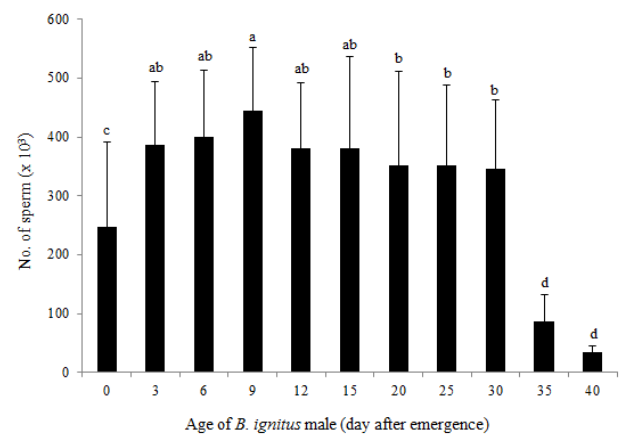


Fig. 4. The number of sperm at age of non-mated *B. ignitus* males. The testes of three non-mated *B. ignitus* males were allotted for each experimental age of male regime. There was significant difference in sperm number at age of non-mated males at $P < 0.0001$ using the oneway ANOVA test.

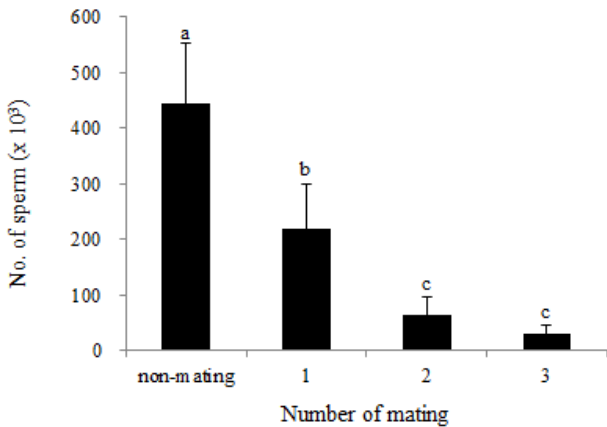


Fig. 5. The number of sperm of *B. ignitus* male at number of mating. The testes of three *B. ignitus* males were allotted for each experimental number of mating regime. There was significant difference in sperm number at number of mating at $P < 0.0001$ using the oneway ANOVA test.

두꺼워지고, 성숙한 정자를 위한 저장기관으로서 제공되는 정소낭(Accessory testis)을 형성한다. 또한 정소관에서 정자수는 우화 13일 동안은 증가하지만 그 후부터는 감소를 한다 (Dechateau and Mariën, 1995).

우화 9일된 수벌을 사용하여 교미횟수별 정자수를 조사한 결과(Fig. 5), 미교미 수벌의 정자수는 $443,900 \pm 107,700$ 개인데 반하여 1회 교미한 수벌의 정자수는 $220,000 \pm 78,300$ 개로 2배로 감소하였고, 2회 교미 수벌의 정자($63,100 \pm 32,200$ 개)는 7배, 3회 교미($31,100 \pm 14,000$ 개)는 무려 14배나 감소하였다. 교미횟수에 따른 수벌의 정자수는 고도의 통계적 유의성이 확인되었다($F(3,42.153) = 177.715, P = 0.0001$). 교미횟수의 증가에 따른 정자수의 감소로 볼 때, 우량형질의 호박벌을 생산 보급하기 위해서는 수벌을 1회만 교미하여 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된다. Yoon et al. (2016)은 서양뒤영벌 수벌의 경우, 교미횟수가 증가됨에 따라서 교미율, 산란율, 봉군형성을 등 봉세발달이 현저히 감소된다고 보고하였다.

교미에 의한 호박벌 여왕벌과 수벌의 성적 성숙시기

교미에 의한 호박벌의 성적 성숙시기를 교미율, 산란율 및 일벌출현율 등으로 조사하였다. 여왕벌의 교미율은 우화직후부터 우화 40일째의 처녀여왕벌과 우화 9일된 수벌을 가지고 오전 10~12시까지 2시간 동안 조사하였다(Fig. 6). 여왕벌의 경우, 우화직후에는 전혀 교미를 하지 않았으며, 우화 3일째(3.3%)부터 교미를 하였고, 우화 6일부터 우화 12일까지는 10.0~13.3%의 교미율을 보였다. 우화 20일째에 23.3%로 가장 높았고 25



Fig. 6. Mating rate at the age of *B. ignitus* queens and males. The mating rate was investigated 10:00 to 12:00 at the first day of mating periods. There was significant difference in mating rate at the age of queens at $P < 0.05$ using the Chi-square test.

일(16.7%) 이후부터 교미율이 감소하기 시작하여, 우화 40일째에는 6.7%의 교미율을 나타내었으나 우화일별 여왕벌의 교미율은 통계적 유의성이 없었다(Chi-square test: $\chi^2 = 13.666, df = 10, P = 0.189$). 반면에 수벌은 여왕벌과 달리 우화직후에도 3.3%의 교미율을 보였으며, 우화 3일째는 같은 시기의 여왕벌보다 6배나 높은 20%의 교미율을 나타내었다. 우화 6일째가 43.3%로 가장 높았으며, 우화 9~25일까지는 20.0~30%의 교미율을 보이다가 우화 30일(12.7%) 이후에는 다소 급격하게 낮아지는 경향을 보였다. 우화 일별로 수벌의 교미율은 차이가 인정되었다($\chi^2 = 25.480, df = 10, P = 0.005$). 호박벌의 경우, 수벌은 우화직후부터 교미가 가능하고, 수벌의 우화일별 교미율이 높은 점 등을 고려할 때, 여왕벌보다 수벌의 교미행동이 더 적극적인 것으로 생각된다. 동일한 교미환경 조건에서 서양뒤영벌 여왕벌은 우화직후에도 6.7%나 교미를 하고, 우화 7~9일까지는 72.4~73.3%, 우화 10일째에는 교미율이 85.0%로 가장 높고, 우화 25일째(34.4%)부터 교미율이 현저하게 낮아진다. 또한 서양뒤영벌 수벌도 우화 직후에 38.3%의 높은 교미율을 나타내며, 우화 1~3일째는 54.3~55.3%, 우화 20일이 80.0%로 가장 높고 우화 30일(54.5%) 이후에는 낮아지는 경향을 보였다 (Yoon et al., 2016). 위의 보고와 비교해 볼 때, 호박벌의 우화일별 교미율은 서양뒤영벌보다 적어도 2~5배 이상 교미율이 낮은 것을 알 수 있었다.

호박벌 여왕벌과 수벌의 우화일별 산란율을 Fig. 7에 나타내었다. 여왕벌의 경우, 우화직후가 16.7%이었고, 우화 3일(26.7%)부터 12일(36.7%)까지는 증가하였다. 그러나 우화 15일(40.0%) 이후로는 떨어지는 경향을 보였고, 우화 35일(6.7%)부터는 급



Fig. 7. Oviposition rate at the age of *B. ignitus* queens and males. There was significant difference in colony development at the age of queens at $P < 0.05$ using the Chi-square test.

격하게 낮아져 우화 40일째의 산란율은 3.3%이었다. 여왕벌의 우화일별 산란율은 통계적 유의성이 있었다($X^2 = 25.568$, $df = 10$, $P = 0.004$). 수벌의 산란율은 우화 9일이 52.4%로 가장 높았고, 우화 3일(46.7%), 우화 15일과 20일(43.3%), 우화 6일(36.7%) 순이었다. 우화직후는 16.7%이었고 우화 40일째 수벌과 교미한 여왕벌은 전혀 산란을 하지 않았으며 우화일별 수벌의 산란율은 유의차가 없었다($X^2 = 9.677$, $df = 10$, $P = 0.377$).

이상의 교미율과 산란율로 볼 때 호박벌 여왕벌의 교미에 적합한 성적 시기는 우화 9~15일 사이, 수벌은 우화 6~20일 사이로 여왕벌보다 성적시기가 더 긴 것으로 생각된다. Yoon et al. (2016)은 서양뒤영벌 여왕벌의 교미에 의한 성적시기는 우화 6~8일, 수벌은 우화 6~20일사이라고 보고하였다. Tasei et al. (1998)은 서양뒤영벌 여왕벌의 평균 교미나이는 6.1 ± 0.4 일, 수벌은 우화 6일에서 27일까지 교미가 가능하지만 평균 수벌의 교미나이는 12.1 ± 1.3 일이라고 보고하였다. Sauter and Brown (2001)은 수벌의 교미 전 구애행동보다 오히려 여왕벌의 생식상태가 교미의 가장 중요한 결정요인이라고 보고하였다.

호박벌 수벌의 우화일수 및 교미횟수에 따른 교미율 조사

호박벌 수벌의 교미가 주로 어느 시간대에 이루어지는 지를 알아보기 위하여 오전 9시부터 오후 5시까지 교미시간대별 교미율을 조사하였다(Fig. 8). 그 결과, 오전 10시대가 29.6%로 가장 높았고, 그다음은 오전 11시대(25.9%), 오후 1시대(14.1%) 순이었으며, 오후 4시 이후로는 거의 교미가 이루어지지 않았다. 호박벌의 경우, 오전 9~11시에 67.4%의 교미율을 나타내어 대부분 오전에 교미가 이루어지는 것을 알 수 있었다. 교미시간대별 호박벌 수벌의 교미율은 고도의 통계적 유의성이 있었다

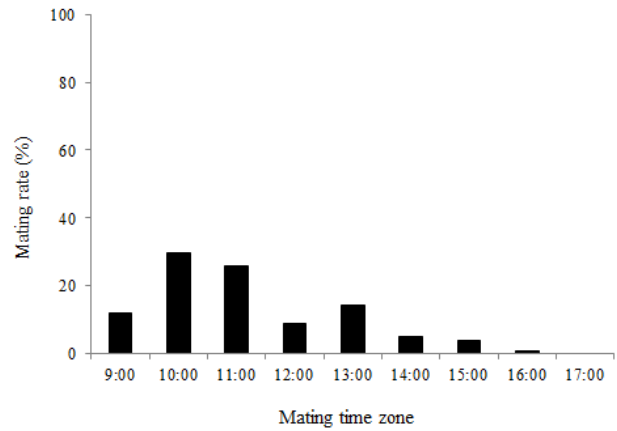


Fig. 8. Mating rate at the mating time zone of *B. ignitus* males. The mating rate was investigated 09:00 to 17:00 at the first day of mating periods. The mating age of queen and male were 6 days and 9 days, respectively. There was significant difference in mating rate at mating time zone of males at $P < 0.0001$ using the Chi-square test.

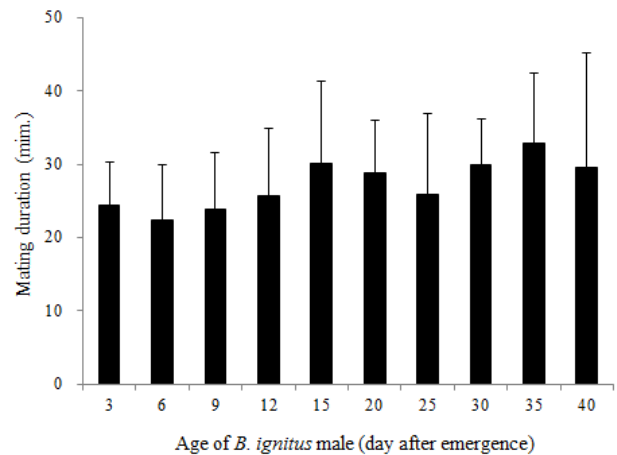


Fig. 9. Mating duration at the age of *B. ignitus* males. The mating age of queen was 6 days. There was significant difference in mating rate at the age of queens at $P < 0.05$ using the oneway ANOVA test.

($X^2 = 122.700$, $df = 8$, $P = 0.0001$). 또한 우화 3~40일까지 우화일수별 교미시간을 조사한 결과(Fig. 9), 평균 22.4 ± 7.5 분~ 32.9 ± 9.5 분으로 우화일수가 늦을수록 교미시간이 길어지는 경향을 보였다($F(9,125) = 2.184$, $P = 0.027$).

교미횟수에 따른 수벌의 교미율과 교미시간을 조사하였다. 교미횟수별 교미율의 경우(Fig. 10), 1회 교미율은 36.7%, 2회는 27.2%이었으나, 3회 교미는 6.1%로 1회 교미율보다 6배 이상 현저하게 낮아졌다. 4회 교미율은 0.6%에 불과하였지만 호박벌 수벌은 4회까지 교미가 가능하다는 것을 알 수 있었다. 교미횟수에 따른 수벌의 교미율은 고도의 통계적 유의성이 있었다($X^2 = 108.864$, $df = 3$, $P = 0.0001$). 교미횟수별 교미시간을

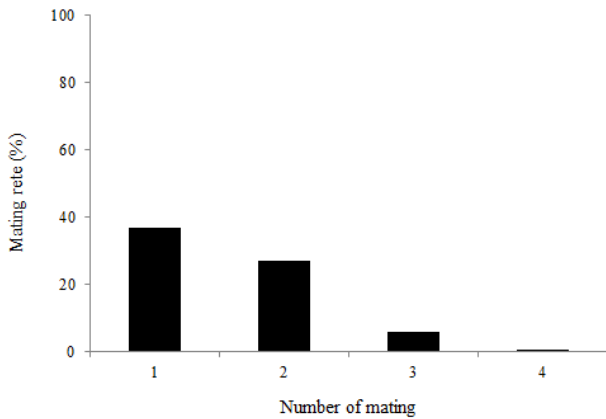


Fig. 10. Mating rate at the number of mating of *B. ignitus* males. The mating ages of queen and male were 6 days and 9 days, respectively. There was significant difference in mating rate at the age of queens at $P < 0.0001$ using the Chi-square test.

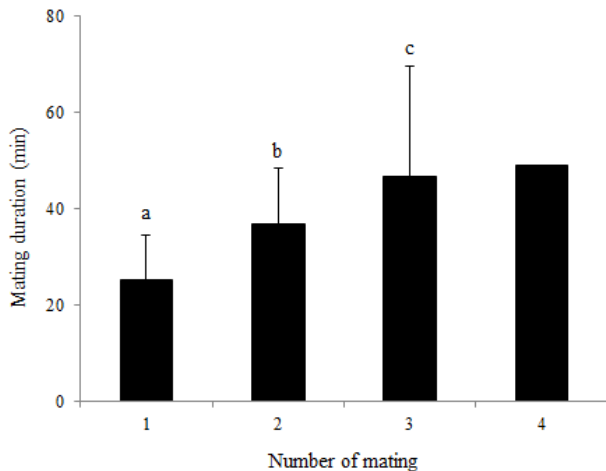


Fig. 11. Mating duration at the number of mating of *B. ignitus* males. The mating ages of queen and male were 6 days and 9 days, respectively. There was significant difference in mating rate at the age of queens at $P < 0.0001$ using the oneway ANOVA test.

조사한 결과(Fig. 11), 1회 교미시간이 25.4 ± 9.1 분, 2회 36.8 ± 11.7 분, 3회 46.7 ± 23.1 분, 4회 49.0분으로 교미횟수가 많아질 수록 교미시간은 길어지는 경향을 나타내었다($F(2,24.341) = 17.048$, $P = 0.0001$). Yoon et al. (2016)은 서양뒤영벌 수벌은 7회까지 교미가 가능하다고 보고하였다. Tasei et al. (1998)은 수벌 69마리 중 50%가 1회 교미를 하였고, 8회까지 수벌이 교미하는 것을 확인하였다. 이런 결과와 비교해 볼 때, 호박벌 수벌은 서양뒤영벌보다 교미능력이 다소 떨어지는 것으로 판단된다.

이상의 호박벌 여왕벌의 난소 내 알 수, 수정낭 크기, 수벌의 정자수 등 생식기 발육과 교미에 의한 봉세발달 등으로 볼 때 호박벌 여왕벌의 최적 성적 성숙시기는 우화 9~12일, 수벌은

우화 6~9일로 판단된다. 또한 1회 교미한 수벌의 교미율과 정자수가 2회 교미한 수벌의 것보다 거의 1.5~2배 이상의 차이를 보였다. 따라서 호박벌의 교미율을 높이고 우량 품종을 생산 보급하기 위해서는 수벌을 1회 교미하여 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

사사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ01005104)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

Literature Cited

- Baer, B., Maile, R., Schmid-Hempel, P., Morgan, E.D., Jones, G.R., 2000. Chemistry of a mating plug in bumblebees. *J. Chem. Ecol.* 26, 1869-1875.
- Baer, B., Morgan, E.D., Schmid-Hempel, P., 2001. A nonspecific fatty acid within the bumblebee mating plug prevent females from remating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 3926-3928.
- Baer, B., Schmid-Hempel, P., 2000. The artificial insemination of bumble-bee queens. *Insect. Soc.* 47, 183-187.
- Bergstrom, G., 1981. Chemical composition, similarity and dissimilarity in volatile secretions: examples of indications of biological function, *Les médiateurs chimiques agissant sur le comportement des insectes*, pp. 289-296. *Les colloques de l'INRA.*
- Buchmann, S.L., Hurley, J.P., 1978. A biophysical model for buzz pollination in angiosperms. *J. Theor. Biol.* 72, 639-657.
- De Ruijter, A., 1997. Commercial bumblebee rearing and its implications. *Proc. 7th Int. Symp. Pollination, Acta Hort.* 437, 261-269.
- Djegham, Y., Verhaeghe, J.C., Rasmout, P., 1994. Couplation of *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) in captivity. *J. Apicul. Res.* 33, 15-20.
- Duchateau, M.J., 1985. Analysis of some methods for rearing bumblebee colonies. *Apidologie* 16, 225-227.
- Duchateau, M.J., Mariën, J., 1995. Sexual biology of haploid and diploid males in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Insect. Soc.* 42, 255-266.
- Duchateau, M.J., Velthuis, H.H.W., 1988. Development and reproductive strategies in *Bombus terrestris* colonies. *Behavior* 107, 186-207.
- Duvoisin, N., Boris, B., Schmid-Hempel, P., 1999. Sperm transfer and male competition in a bumblebee. *Anim. Behav.* 58, 743-749.
- Free, J.B., 1993. *Insect pollination of crops*. 2nd ed., Academic Press, London, 684 pp.
- Hannan, M.A., Maeta, Y., Hoshikawa, K., 1998. Feeding behavior

- and food consumption in *Bombus (Bombus) ignitus* under artificial condition (Hymenoptera: Apidae). *Entomol. Sci.* 1, 27-32.
- Heinrich, B., 1979. *Bumblebee economics*. Harvard University Press. Cambridge, Massa, 245 pp.
- Iwasaki, M., 1995. Introduction of commercial bumblebees into Japan. *Honeybee Sci.* 16, 17-21.
- Masahiro, M., 2000. Pollination of crops with bumblebee colonies in Japan. *Honeybee Sci.* 21, 17-25.
- Medler, J.T., 1962. Development and absorption of eggs in bumblebee (Hymenoptera : Apidae). *Can. Ent.* 94, 825-833.
- Röseler, P.F., 1973. Die anzahl der spermien im receptaculum seminis von hummelköniginnen (*Hymenoptera, Apoidea, Bombinae*). *Apidologie.* 4, 267-274.
- Sauter, A., Brown, M.J.F., 2001. To copulate or not? The importance of female status and behavioural variation in predicting copulation in bumblebee. *Anim. Behav.* 62, 221-226.
- SPSS PASW® Statistics 22.0. 2013. PASW® Core System User's Guide, SPSS inc. USA.
- Svensson, B.G., 1980. Species-isolating mechanisms in male bumble bees (Hymenoptera, Apidae), 176 pp. *Acta Universitatis Upsaliensis*.
- Tasei, J.N., Moinard, C., Moreau, L., Himpens, B., Guyonnaud, S., 1998. Relationship between aging, mating and sperm production in captive *Bombus terrestris*. *J. Apicul. Res.* 37, 107-113.
- Van Honk, C.G.J., Velthuis, H.H.W., Röseler, P.F., 1978. A sex pheromone from the mandibular glands in bumblebee queens. *Experientia.* 34, 838-839.
- Velthuis H.H.W., Van Doorn, A., 2006. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie* 37, 421-451.
- Williams, P.H., 1991. The bumble bees of the Kashmir Himalaya (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Bull. Nat. Hist. Mus. (Ent.)*. 60, 1-204.
- Williams, P.H., 1998. An annotated checklist of bumble bees with an analysis of patterns of description (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Bull. Nat. Hist. Mus. (Ent.)*. 67, 79-152.
- Yoon, H.J., Kim, S.E., Lee, S.B., Park, I.G., 2003. Effect of CO₂-treatment on oviposition and colony development of the bumblebee, *Bombus ignitus*. *Korean J. Appl. Entomol.* 42, 139-144.
- Yoon, H.J., Kim, Y.S., Lee, S.B., Cho, Y.H., 2006. An easy method for collecting sperm of bumblebee. *Korean J. Apicul.* 21, 157-162.
- Yoon, H.J., Lee, K.Y., Shin, M., Kim, S.Y., 2016. Sexual Maturity and Mating Ability of the Bumblebees, *Bombus terrestris*. *Korean J. Apicul.* 21, 157-162.
- Yoon, H.J., Mah, Y.I., Lee, M.Y., Park, I.G., 1999. Studies on ovary development and mating of bumblebee, *Bombus ignitus* Smith. *Korean J. Apicul.* 14, 35-42.