

西方蜜蜂人工授精效益之研究

陳本翰*

農業部苗栗區農業改良場

摘要

人工授精有提升西方蜜蜂育種與遺傳研究的潛力，因此，本研究著重於分析：(1) 精子數量對授精蜂后產卵、生產子代工蜂率以及儲精囊儲精量的影響；以及 (2) 人工授精蜂后的生殖發育是否與自然交尾蜂后相同？本研究證實授精子數量影響蜂后產卵量與產受精卵效率，但不影響蜂后體重，本研究建議以 $(2.4 \pm 0.3) \times 10^7$ 精子授精蜂后並確認蜂后儲有 $(3.9 \pm 0.8) \times 10^5$ 精子，成功授精處理的蜂后能產受精卵，有 $93.5 \pm 4.4\%$ 可育雛為工蜂，在巢脾上調查範圍有 516 個巢房，授精蜂后產卵率達 $34.3 \pm 3.4\%$ 。本研究比較人工授精蜂后與自然交尾蜂后生殖特徵如產卵率、體重、儲精量與卵巢重，並發現前述特徵人工授精蜂后均顯著低於自然交尾蜂后，顯示本研究建立之人工授精蜂后尚無法取代自然交尾蜂后進行蜂產品生產，但研究結果仍可提供臺灣蜂產業利用人工授精技術進行育種、品系純化與遺傳等研究發展。

關鍵詞：西方蜜蜂、人工授精、精子、受精卵

*論文聯繫人

e-mail: BanHen@mdares.gov.tw

前言

西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 是重要的經濟昆蟲，依據聯合國糧食及農業組織 2021 世界糧食與農業統計，全球蜂蜜與糖貿易額度約 42 億美元，並有逐年增長的趨勢 (FAO, 2021)，臺灣蜂產業有蜂蜜、蜂王漿、蜂花粉等蜂產品，每年產值約 23 億元新臺幣 (陳及張, 2017)。除了蜂產品生產，蜜蜂亦是重要的授粉昆蟲，估計約有 30% 作物需要授粉動物協助生產，蜜蜂授粉效益約貢獻人類 1/3 糧食所需，拉丁美洲是供應全球糧食的重要生產地區，估計授粉動物每年的貢獻經濟效益達 229.5 億美元，養蜂業健全發展不只能提升環境平衡，更是全球糧食安全不可或缺的一環 (Basualdo *et al.*, 2022；Khalifa *et al.*, 2021)。

培育優質品種是維繫產業競爭力不可缺少的一環，畜禽產業利用人工授精建立雜交譜系，經過世代選育出優良品種，人工授精不但能增加選育品種的效率，還能應用於瀕危物種保護與畜禽動物純系培育，並具有提升父系遺傳資源利用效率、增加牲畜產量與克服地理限制雜交等優點 (Mengistu, 2019)。西方蜜蜂繁殖是一妻多夫制，成熟雄蜂會飛行聚集，散發性費洛蒙吸引其他雄蜂與處女蜂后加入婚飛，蜂后可與多達 20 隻雄蜂交尾，並將精子儲存於儲精囊，供未來與卵子受精用 (Bastin *et al.*, 2017; Strang, 1970)，因此西方蜜蜂傳統繁殖無法精準建立父系與雜交譜系，往往需要耗費多年世代選拔才能達到育種目標。為提升西方蜜蜂育種效率，1980 年後許多學者投入蜜蜂人工授精的研究，並逐漸完善相關人工授精的設備及技術，提供發展蜜蜂育種、遺傳研究及品系改良等基礎 (Cobey, 1983; Hopkins *et al.*, 2012)。

發展蜜蜂人工授精首先需要適合的精子保存液以維持精子體外滲透壓、細胞代謝能量、防止汙染與維持精子活性等功能 (El-Shahat *et al.*, 2020; Parodi, 2014)。許多研究提出保存液用於保護蜜蜂精子，例如：Kiev solution (82.2 mM sodium citrate, 24.9 mM sodium bicarbonate, 5.3 mM potassium chloride, 16.7 mM glucose, 1.7 mM sulfanilamide) (Ruttner, 1976)，Tris 緩衝液 (*Tris* (hydroxymethyl) aminomethane) 或 TES 緩衝液 (N-*tris* (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethanesulfonic acid) 為基礎配方的蜜蜂精子保存液，並能作為介質授精處女蜂后 (Hopkins *et al.*, 2012; Rhodes, 2008)。我們於 2021 年的研究建立蜜蜂精子短期保存條件，利用 TES 保存液配方保存精子在 10~20°C 下，能維持精子良好活動力，可維持精子 80% 以上活性達 72 小時，達到蜜蜂精子保存與運送基礎條件之目標 (陳及黃，2021)。

蜂后婚飛交尾後，其身體開始經歷卵巢膨大、體重增加與卵黃原蛋白質生成等生殖發育 (Kocher *et al.*, 2008)，學者們為研究授精量對蜂后生理的影響，分別以 1 μL 和 8 μL 雄蜂精液授精蜂后並分析蜂后脂肪體基因表現，大尺度基因矩陣分析透漏授精量會影響蜂后基因表現，但對卵黃原蛋白基因 (*vitellogenin*) 與運鐵蛋白基因 (*transferrin*)，以及卵巢活化程度沒有顯著影響 (Niño *et al.*, 2013)；此外，亦有研究分別以單隻雄蜂精液與 10 隻雄蜂精液授精蜂后，結果顯示以 10 隻雄蜂精液授精的

蜂后能吸引較多的工蜂交哺，再以氣相層析法 (gas chromatography, GC) 分析蜂后大顎腺萃取物，顯示授精量明顯影響蜂后大顎腺生化表現 (Richard *et al.*, 2007)；Payne 與 Rangel 又分別以 1.5 μL 和 9.0 μL 精子液進行蜂后人工授精，隨後進行田間蜂群發育分析，發現精子液體積對蜂后生產工蜂與雄蜂、蜂糧儲存與蜂群存活時間等蜂群發展指標沒有顯著關聯 (Payne and Rangel, 2018)。綜觀上述研究，除了授精量會影響蜂后生理表現，研究處理、飼養環境、蜜粉源資源、管理模式與遺傳背景等差異都可能影響實驗室研究與田間調查結果。蜜蜂人工授精專家 Cobey 於 2007 年彙整分別經人工授精與自然交尾蜂后的研究，指出該兩種蜂后在壽命、生殖力等方面無孰優孰劣之差異 (Cobey, 2007)，蜂群遺傳背景、營養、蜂場環境與新蜂后培育模式等都可能影響蜂后產卵、蜂群經濟生產力與群勢發展 (Cobey, 2007; Dolasevic *et al.*, 2020; Hasnat, 2018; Lee *et al.*, 2019)。

畜牧業利用人工授精育成優質動物已有上百年的發展歷史 (Bortolozzo *et al.*, 2015; Mengistu, 2019)，採集種公豬或種公牛精液配製成 $1 \times 10^7 \sim 3 \times 10^7$ 精子/mL 精子液，可進行 20~40 次人工授精並有 80% 受孕率，顯示研究有效精子數量是提升經濟動物牲畜產量、遺傳利用效益的關鍵 (Knox, 2016; Mohanty *et al.*, 2018)。臺灣蜂產業所用之蜂種仰賴傳統田間繼代，需要有人工授精技術提升育種、品系純化與遺傳研究，因此本研究將討論：(1) 精子數量對授精蜂后產卵效益的影響；(2) 人工授精蜂后生殖發育如卵巢重、微卵管數量等是否與自然交尾蜂后相同，可作為是否能取代自然交尾蜂后之參考。

材料與方法

一、試驗蜂群管理

- (一) 處女蜂后培育：本研究以臺灣養蜂業改良之朗式蜂箱飼育試驗蜂群，試驗蜂場位於苗栗縣公館鄉 (GPS：24.4956, 120.8253)。蜂后培育是以人工挑選 1~2 日齡幼蟲，移入塑膠王台杯，再將該王台杯移入 6 蜂脾以上之強健蜂群，哺育蜂后幼蟲，移蟲 10 日後，將該蜂后王台介入新組建之無蜂后蜂群。

(二) 組織試驗蜂群：試驗蜂群是從強健蜂群分拆 2 脾蜂脾，包含成熟蛹脾、蜜粉脾與工蜂群移入交尾蜂箱 (內徑長 48cm、寬 20cm、高 25.5cm) 形成新蜂群，新蜂群處於無蜂后狀態至少一天，再介入前述方法培育之成熟王台，待新蜂后羽化後形成新蜂群。為避免新蜂后離巢婚飛，在巢口放置隔王柵欄阻擋蜂后，僅容工蜂出入。

二、調查精子數量對授精蜂后產卵效益的影響

(一) 雄蜂精液採集：試驗蜂群利用雄蜂脾供蜂后大量生產雄蜂卵，雄蜂從卵期發育至羽化需 24 日，羽化雄蜂以油漆筆在胸節背板標記以利計算成熟期，蒐集 12~14 日齡以上性成熟雄蜂在實驗室採集精液。精液採集方式為輕壓雄蜂胸腹部側面刺激生殖器外翻，採集性成熟雄蜂生殖器末端泌出黃褐色精液，操作過程須避免雄蜂排遺與異物污染 (Cobey *et al.*, 2013)。

(二) 精子液配製：本研究每隻雄蜂採集 0.5~1 μL 精液，利用微量吸管 (T-10XT, Axygen®) 採集多隻雄蜂精液懸浮於滅菌保存液配製成精子液，保存液為 30 mM TES free acid、1 mM 磷酸一氫鈉 (disodium hydrogen phosphate)、1.1 mM 檸檬酸鈉 (sodium citrate)、82 mM 氯化鉀 (potassium chloride)、82.9 mM 氯化鈉 (sodium chloride)、5 mM 碳酸氫鈉 (sodium bicarbonate)、10 μM 乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid)、1.5 mM 盤尼西林 (penicillin)、0.7 mM 鏈黴素 (streptomycin)、1.2 mM 卡納霉素 (kanamycin)、34.9 μM 泰黴素 (tylosin)、2.6 mM 精氨酸 (arginine)、4.3 mM 脯氨酸 (proline)、0.002 %w/v 牛血清白蛋白 (BSA)、0.1 mM 甘氨酸 (glycine)、0.002 %w/v 過氧化氫酶 (catalase) (Hopkins *et al.*, 2012)。雄蜂精子數量在顯微鏡 (Zeiss Scope A1, Japan) 200 倍視野下，以血球計數盤 (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Germany) 進行計算，再以保存液分別調整精子液為高濃度約 3.00×10^9 精子/mL、中濃度約 5.63×10^8 精子/mL 與低濃度約 2.88×10^7 精子/mL 分裝在滅菌處理之 200 μL 試管，15°C 保存備用。

(三) 人工授精：本研究依據 Cobey 等人於 2013 年改良之蜜蜂人工授精方法進行操作 (Cobey *et al.*, 2013)，人工授精所使用之毛細管針製備為加熱毛細管

(Kimble® Chase 41A2502)拉成細針後滅菌備用。在解剖顯微鏡視野下(Leica S9D, Germany)將羽化後 5~6 日齡之處女蜂后保定在授精儀，並以二氧化碳進行麻醉，利用授精儀夾勾打開蜂后腹部尾節骨片，每次授精處理以毛細管針於生殖孔固定注入 8 μL 精子液，分別為高量 $(2.4 \pm 0.3) \times 10^7$ 精子處理 4 隻處女蜂后、中量 $(4.5 \pm 1.2) \times 10^6$ 精子處理 5 隻處女蜂后與低量 $(2.3 \pm 0.18) \times 10^5$ 精子處理 3 隻處女蜂后。完成人工授精之蜂后剪翅避免飛離蜂巢，每隻蜂后單獨靜置於 33° C 培養箱，待恢復活力後再導入原試驗蜂群。

(四) 蜂后生育調查

1. 產卵率：蜂后開始產卵 2 週後，利用隔王板與紗網限制蜂后在 2 脾巢脾間活動，2 脾巢脾分別為空巢脾與蜜粉脾或蛹脾。蜂后產卵一天後取出產卵脾，再以內徑 7 公分之圓形管在卵脾中間區域隨機標記 3 個調查區，每調查區可計算 172 個完整巢房，分別調查 3 個調查區內產卵數 (a) 與蜜粉房數 (b)，每區產卵率 (c) = $[a / (172 - b)]\%$ ；每隻蜂后產卵率 = $(c1 + c2 + c3) / 3$ 。
2. 工蜂封蓋房率：西方蜜蜂受精卵發育為工蜂或蜂后，工蜂蛹房封蓋表面平整；未受精卵發育為雄蜂，蛹房封蓋表面突出 (Ratnieks and Keller, 1998)。蜂后生產之卵不易以外觀辨識是否為受精卵，故本研究調查幼蟲發育成工蜂封蓋蛹房比率，用以評估蜂后產受精卵能力。利用內徑 7 公分之圓形管在封蓋脾分別標記 3 個調查區，調查區內工蜂封蓋房數量 (a) 與雄蜂封蓋房數量 (b) 可供評估蜂后產受精卵能力參考，工蜂封蓋房率 (c) = $[a / (a + b)]\%$ ，代表蜂后產受精卵比率 = $(c1 + c2 + c3) / 3$ 。
3. 儲精囊儲精量與精子轉移率：本研究精子轉移率係指精子授精數量 (a) 與人工授精蜂后儲精囊精子儲量之比值，計算方法是解剖蜂后儲精囊，利用保存液序列稀釋囊內精子，稀釋倍率 = A，顯微鏡視野下 (Zeiss Scope A1, Japan) 以血球計數盤計算精子數量 (b)，精子數量 (c) = $b \times 10^4 \times A$ 精子 / mL。儲精囊為圓球狀，體積約為 0.605 μL (Arslan *et al.*, 2021)，儲精囊精子數 (d) = $c \times 10^{-3} \times 0.605$ ，精子轉移率 = $(d / a)\%$ 。

三、人工授精與自然交尾蜂后生殖發育調查

本研究分別測量處女蜂后、已產卵之人工授精蜂后與已產卵之自然交尾蜂后體重，並依 Carreck *et al.* (2013) 方法解剖三種蜂后卵巢與秤重，解剖的卵巢浸泡在 99% 酒精使組織固定與變色，以利在解剖顯微鏡 (Leica S9D, Germany) 下計算微卵管數量。

四、統計分析

研究數據利用 SAS Enterprise Guide 7.1 進行統計分析，試驗資料進行必要之轉換後進行統計運算。兩組試驗處理以 Student's t test 分析其組間差異，三組試驗處理則以 LSD (Fisher's protected least significant difference test) 分析組間差異性 ($p < 0.05$)。

結 果

一、精子數量影響授精蜂后產卵效益

本研究分別以高、中、低三種不同精子濃度之精子液進行處女蜂后人工授精處理，高授精量授予 $(2.4 \pm 0.3) \times 10^7$ 精子、中授精量授予 $(4.5 \pm 1.2) \times 10^6$ 精子與低授精量授予 $(2.3 \pm 0.18) \times 10^5$ 精子，處理後蜂后接回蜂群調查產卵率與工蜂雛育率等生育指標，表一顯示高、中授精量組蜂后產卵率無顯著差異，但顯著優於低授精量處理，其中以高授精量組蜂后產卵率達 $34.3 \pm 3.4\%$ 為最佳。高授精量組工蜂封蓋房率達 $93.5 \pm 4.4\%$ 為最佳，顯著優於中授精量組 $59.6 \pm 10.2\%$ 與低授精量組 $0.4 \pm 0.4\%$ 。解剖蜂后儲精囊，高授精量組蜂后儲有 $(3.9 \pm 0.8) \times 10^5$ 精子為最佳，顯著優於中、低處理組，高授精量處理精子轉移率 $1.5 \pm 0.3\%$ ，與中授精量處理 $0.7 \pm 0.3\%$ 沒有顯著差異，但均顯著優於低授精量處理，蜂后重量以低授精量處理組 206.0 ± 33.4 mg 略高，但各處理組間無顯著差異。另調查授精蜂后的壽命，工蜂封蓋房率大於 98.5% 的蜂后至少可存活 60 天，有 3 隻授精蜂后維持 100% 工蜂封蓋房率，產卵率維持 $31.7 \pm 0.5\%$ (數據未顯示) 並存活至少 3 個月，工蜂封蓋房率低於 42.7% 的蜂后，僅存活 60~70 天 (表二)。

表一、精子數量影響人工授精蜂后生育特徵

Table 1. Reproductive characteristics of the artificially inseminated queen bees affected by different quantity of spermatozoa

Number of inseminated spermatozoa	Number of queen bees (n)	Oviposition rates (%)	Percentage of worker cap (%)	Number of spermatozoa in spermatheca	Migration rate of spermatozoa (%)	Weight (mg)
High quantity (2.4 ± 0.3) $\times 10^7$	4	34.3 \pm 3.4 a	93.5 \pm 4.4 a	(3.9 \pm 0.8) $\times 10^5$ a	1.5 \pm 0.3 a	178.1 \pm 6.5 a
Medium quantity (4.5 \pm 1.2) $\times 10^6$	5	31.2 \pm 8.1 a	59.6 \pm 10.2 b	(4.3 \pm 2.2) $\times 10^4$ b	0.7 \pm 0.3 a	200.0 \pm 15.9 a
Low quantity (2.3 \pm 0.18) $\times 10^5$	3	1.7 \pm 0.8 c	0.4 \pm 0.4 c	0 \pm 0 c	0 \pm 0 b	206.0 \pm 33.4 a

Means and standard errors within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

表二、人工授精蜂后壽命紀錄

Table 2. Lifespan records of inseminated queens

Code number of queens	Percentage of worker brood (%)	Lifespan during the observation period
1	100.0%	> 4 months
2	100.0%	> 4 months
3	42.7%	76 days
4	100.0%	> 3 months
5	98.5%	62 days
6	3.4%	59 days

二、蜂后生殖發育比較

表一顯示高授精量之人工授精蜂后生育表現最佳，以此授精量處理之人工授精蜂后與自然交尾蜂后比較，蜂后開始產卵 2 週後進行調查，結果顯示自然交尾蜂后產卵率 59.5 \pm 3.8%，儲精囊儲有 $2.4 \pm 0.6 \times 10^6$ 精子皆顯著優於人工授精蜂后 46.9 \pm 3.3% 產卵率與 $5.5 \pm 1.6 \times 10^5$ 精子儲存量，但人工授精蜂后工蜂封蓋房率達 95.2 \pm 1.8%，與自然交尾蜂后無顯著差異 (表三)。此外，自然交尾蜂后體重與卵巢濕重分別為 254.6 \pm 6.1 mg 與 76.8 \pm 0.0 mg，皆顯著優於人工授精蜂后體重 206.3 \pm 5.7 mg

與卵巢濕重 46.6 ± 0.0 mg (表四)，但處女蜂后、人工授精蜂后與自然交尾蜂后微卵管數量分別為 192.3 ± 16.2 、 193.2 ± 21.5 ，以及 204.0 ± 6.2 ，無顯著差異。

表三、人工授精與自然交尾蜂后生育特性比較

Table 3. Comparison of fertility characteristics with artificially inseminated queen bees and naturally mated queen bees

Source	Queen bees		
	Natural mating	Artificial insemination	Prob (t) ^y
Oviposition rates (%)	59.5 ± 3.8^x (n = 12)	46.9 ± 3.3 (n = 13)	< 0.05
Percentage of worker cap (%)	100 ± 0 (n = 12)	95.2 ± 1.8 (n = 13)	> 0.05
Number of spermatozoa in spermatheca	$2.4 \pm 0.6 \times 10^6$ (n = 8)	$5.5 \pm 1.6 \times 10^5$ (n = 12)	< 0.01

^x Means \pm standard errors.

^y Significant differences were analyzed by unpaired t-test.

表四、比較蜂后體重、卵巢重與微卵管數量

Table 4. Comparison of queen weights, ovary weights and the number of ovarioles

Physical characteristics of queen bees	Queen bees		
	Virgin	Artificial insemination	Natural mating
Body weights (mg)	151.1 ± 18.3^x c (n = 42)	206.3 ± 5.7 b (n = 18)	254.6 ± 6.1 a (n = 19)
Ovary weights (mg)	5.4 ± 0.0 c (n = 6)	46.6 ± 0.0 b (n = 6)	76.8 ± 0.0 a (n = 3)
No. of ovarioles	192.3 ± 16.2 a (n = 6)	193.2 ± 21.5 a (n = 6)	204.0 ± 6.2 a (n = 3)

^x Means \pm standard errors.

Means and standard errors within each horizontal column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

討 論

西方蜜蜂的受精卵 (染色體為二倍體) 可發育為工蜂或蜂后，而未受精卵 (單倍體) 則發育為雄蜂 (Ratnieks and Keller, 1998)。幼蟲育雛受到殘留農藥的亞致死效

應、蜂群規模、疫病、蜂蟹蟻與營養缺乏等影響羽化率 (Eckert *et al.*, 1994; Islam *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2011; Kretzschmar and Maisonnasse, 2022)，工蜂封蓋房率為蜂后所產之受精卵可發育為工蜂之比率，本研究用以評估蜂后產受精卵能力。蜂后自然交尾後每日約產下 1,500 粒卵，營養、蜂群規模、季節與環境變化都會影響產卵量 (Abou-Shaara *et al.*, 2021)，本研究蜂后限制在 2 脾蜂活動，產卵率僅代表取樣調查範圍內表現。本研究人工授精蜂后產卵率、重量、儲精量均低於自然交尾蜂后 (表二)，故不足以取代傳統田間繼代或繁殖田間生產之蜂群。但操作良好之授精蜂后，可維持 4 個月以上 100% 的工蜂封蓋房率，足以提供育種研究培育特定親本組合之 F1 蜂后所需。此外，表一顯示蜂后授精至少應授予 $(4.5 \pm 1.2) \times 10^6$ 精子，儲精量至少 $(4.3 \pm 2.2) \times 10^4$ 精子，蜂后產卵才有 $59.6 \pm 10.2\%$ 的受精卵發育為工蜂，授精數量增加至 $(2.4 \pm 0.3) \times 10^7$ 精子，儲精量有 $(3.9 \pm 0.8) \times 10^5$ 精子，蜂后產卵有 $93.5 \pm 4.4\%$ 受精卵發育為工蜂，本研究羽化 14 日齡以上雄蜂精液精子濃度為 $(4.15 \pm 0.4) \times 10^9$ 精子 /mL (數據未顯示)，若以每隻雄蜂平均可採集 0.5~1 μ L 精液計算，推估人工授精蜂后至少需採集 6 隻雄蜂精液才可達到較高的工蜂封蓋房率。

表一顯示提高授精數量可增加精子進入儲精囊效率，低授精量處理未發現精子進入儲精囊，有研究分別以精液漿與保存液懸浮精子進行西方蜜蜂人工授精，結果顯示精液漿處理授精之蜂后有較高的儲精量，顯示精液漿含有促進精子移動物質 (Gül *et al.*, 2017)。本研究使用保存液調整精子數量，等同稀釋精液漿中的副腺蛋白質、酵素與礦物質等生化物質，可能影響精子生理而影響移動效率。此外，在一妻多夫嚙齒類的研究，發現同源精子更容易聚集形成精子束，精子束移動更快，更具有競爭卵細胞完成授精的優勢 (Fisher and Hoekstra, 2010; Fisher *et al.*, 2014)，但蜜蜂精子同時具有圓周運動與鞭毛運動 (Rhodes, 2008)，與哺乳動物精子蝌蚪狀的運動方式不同，蜜蜂精子是否有合作機制以及劑量依賴效應仍待進一步研究。蜂后以儲精囊保存精子，可維持精子 2 年以上活性並持續產下受精卵，儲精量是維繫蜂群發展關鍵 (Al-Lawati *et al.*, 2009)。研究指出，人工授精蜂后儲精量與工蜂封蓋房率呈正相關 (Gül *et al.*, 2017)，表一儲精量對比工蜂封蓋房率有相同的結果，高授精量、中授精量處理蜂后儲精量分別為 $(3.9 \pm 0.8) \times 10^5$ 、 $(4.3 \pm 2.2) \times 10^4$ 精子，工蜂封蓋房

率從 $93.5 \pm 4.4\%$ 下降至 $59.6 \pm 10.2\%$ ，顯示較低的儲精量影響蜂后產卵時儲精囊釋放精子，此結果亦可說明雄蜂數量對處女蜂后交尾之的重要性，蜂后交尾如未能獲得足夠的精子，會影響蜂后生育品質造成產卵量低或有產雄蜂的現象。學者研究蜂后產卵儲精囊釋放精子數量，估算每次產卵釋放 2 個精子（中位數），當蜂后齡期增加而儲精量逐漸減少，精子釋放量隨之下降到不能穩定產下受精卵，不久蜂群產生新蜂后取代 (Baer *et al.*, 2016)。儲存的精子是否形成儲精囊內壓力，當內壓不足影響精子釋放時，可能無法形成受精卵，相關生理機制仍需進一步研究。

蜜蜂人工授精專家 Cobey 認為，精子儲存數量會影響蜂后壽命，蜂勢足夠能維持巢內溫度有助於精子轉移至儲精囊 (Cobey, 2007)，此外，有學者指出蜂后大顎費洛蒙與幼蟲費洛蒙均會抑制工蜂卵巢發育，並促進內勤蜂下咽頭腺發育與哺育行為 (Traynor *et al.*, 2014)，表二顯示操作良好的授精蜂后能維持 3 個月以上 100% 工蜂封蓋房率，而產受精卵能力低，即工蜂封蓋房率不佳的蜂后壽命較短，不過影響蜂后壽命的因素還有很多，例如：營養、產卵能力、環境、抗氧化能力與腸道菌相等都會影響蜂后壽命 (Anderson *et al.*, 2018; Remolina and Hughes, 2008; Gomes *et al.*, 2019)。人工授精蜂后費洛蒙表現以及與工蜂之間交哺行為是否正常，進而影響蜂后壽命仍待詳細研究。

研究指出蜂后重量與儲精囊體積、卵巢重與微卵管數量呈正相關，微卵管數量在交尾前後沒有顯著差異，而發育良好蜂后重量至少有 200 mg 以上，具有儲存更多精子的潛力 (Al-Sarhan *et al.*, 2019; Arslan *et al.*, 2021)。昆蟲卵巢由微卵管組成，微卵管是細長管腔內有卵母細胞與哺育細胞組成卵腔，尖端有端絲集成束，研究指出蜜蜂生殖細胞在胚胎期已開始發育與分化 (Dearden, 2006; Tanaka *et al.*, 2009)。表四顯示 3 種蜂后微卵管數量之間沒有顯著差異與前人研究相符，表示微卵管數量於蜂后羽化後已發育完成，交尾與卵巢膨大發育不影響微卵管數量。本研究以處女蜂后重量為基礎，估算自然交尾蜂后重量約增加 68.5%，卵巢濕重約增加 14.2 倍；人工授精蜂后重量僅約增加 36.5%，卵巢濕重僅增加約 8.7 倍。精液組成包含精子與精液漿，表一顯示精子數量與蜂后重量發育沒有顯著關係，雄蟲精液漿含有豐富的副腺蛋白質，研究指出雙翅目果蠅屬、斑蚊屬、瘧蚊屬的雄蟲副腺萃取物能刺激

雌蟲微卵管發育、卵細胞生成、產卵與抑制雌蟲再交尾等 (Baldini *et al.*, 2012)，又有研究發現雄蜂精液漿影響蜂后大腦神經與細胞訊息傳導路徑，並暫時性影響蜂后視覺 (Liberti *et al.*, 2019)，相關研究證明精液漿生化物質影響蜂后的生理表現，本研究操作過程可能稀釋精液漿生化物質，造成授精蜂后的卵巢發育不如自然交尾蜂后，未來如能研製雄蜂副腺液內含之胜肽與機制，有望再提升人工授精蜂后產卵能力。

結 論

本研究人工授精蜂后之產卵率、體重及儲精囊儲精量不如自然交尾蜂后，雖尚無法取代傳統田間繼代繁殖，但可以蜜蜂人工授精進行具優良種性之育種，本研究明確顯示至少可採 $(4.5 \pm 1.2) \times 10^6$ 精子授精蜂后，蜂后能產約 60% 受精卵能發育為工蜂。最有成效為授精蜂后 $(2.4 \pm 0.3) \times 10^7$ 以上精子，並確保蜂后儲精量達 $(3.9 \pm 0.8) \times 10^5$ 精子，蜂后能產約 93% 受精卵能發育為工蜂。本研究證明精子數量會影響授精蜂后產卵量與產受精卵能力，提供後續利用人工授精進行育種、品系純化與遺傳等研究發展。

誌 謝

本研究承蒙農業部農業科技計畫經費補助 (計畫編號：111 農科 -4.6.1- 苗 -M2)，並感謝劉享芳先生、陳慶旺先生、劉家慧小姐與鍾彩膺小姐協助蜂群田間管理與數據整理，謹致謝忱。

引用文獻

陳本翰、黃子豪。2021。西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 精子保存品質之研究。苗栗區農業改良場研究彙報 10：101-114。

陳楷廷、張羽萱。2017。全球蜂產業問題及臺灣蜂產業發展現況。林下經濟 52：53-57。

- Abou-Shaara, H. F., N. Adgaba, and A. A. Al-Ghamdi. 2021. Current knowledge about behaviors of honey bee queens with highlighting of the importance future studies. *J. Basic Appl. Zool.* 82: 37.
- Al-Lawati, H., G. Kamp, and K. Bienefeld. 2009. Characteristics of the spermathecal contents of old and young honeybee queens. *J. Insect Physiol.* 55(2): 116-121.
- Al-Sarhan, R., N. Adgaba, Y. Tadesse, Y. Alattal, A. Al-Abbadi, A. Single, and A. Al-Ghamdi. 2019. Reproductive biology and morphology of *Apis mellifera jemenitica* (Apidae) queens and drones. *Saudi J. Biol. Sci.* 26: 1581-1586.
- Anderson, K. E., V. A. Ricigliano, B.M. Mott, D. C. Copeland, A. S. Floyd, and P. Maes. 2018. The queen's gut refines with age: Longevity phenotypes in a social insect model. *Microbiome.* 6(1): 108.
- Arslan, S., M. M. Cengiz, A. Gül, and S. Sayed. 2021. Evaluation of the standards compliance of the queen bees reared in the Mediterranean region in Turkey. *Saudi J. Biol. Sci.* 28(5): 2686-2691.
- Baldini, F., P. Gabrieli, D. W. Rogers, and F. Catteruccia. 2012. Function and composition of male accessory gland secretions in *Anopheles gambiae*: a comparison with other insect vectors of infectious diseases. *Pathog. Glob. Health.* 106(7): 405-412.
- Baer, B., J. Collins, K. Maalaps, and S. P. A. den Boer. 2016. Sperm use economy of honeybee (*Apis mellifera*) queens. *Ecol. Evol.* 6(9): 2877-2885.
- Bastin, F., H. Cholé, G. Lafon, and JC. Sandoz. 2017. Virgin queen attraction toward males in honey bees. *Sci Rep.* 7: 6293.
- Bortolozzo, F. P., M. B. Menegat, A. P. Mellagi, M. L. Bernardi, and I. Wentz. 2015. New artificial insemination technologies for swine. *Reprod. Domest. Anim.* 50(Suppl 2): 80-84.
- Basualdo, M., P. Cavigliasso, R. S. de A. Jr, P. Aldea-Sánchez, A. Correa-Benítez, J. M. Harms, A. K. Ramos, V. Rojas-Bravo, and S. Salvarrey. 2022. Current status and economic value of insect-pollinated dependent crops in Latin America. *Ecol. Econ.* 196: 107395.
- Carreck, N. L., M. Andree, C.S. Brent, D. Cox-Foster, H. A. Dade, J. D. Ellis, F. Hatjina, and D. vanEnglesdorp. 2013. Standard methods for *Apis mellifera* anatomy and dissection. *J. Apic. Res.* 52: 1-40.

- Cobey S. 1983. The development of instrumental insemination of honeybees. *Am. Bee J.* 123(2): 108-111.
- Cobey, S. 2007. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie.* 38: 390-410.
- Cobey, S. W., D. R. Tarpy, and J. Woyke. 2013 Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *J. Apic. Res.* 52(4): 1-18.
- Dearden, P. K. 2006. Germ cell development in the honeybee (*Apis mellifera*); *vasa* and *nanos* expression. *BMC Dev. Biol.* 6: 6.
- Dolasevic, S., J. Stevanovic, N. Aleksic, U. Glavinic, N. Deletic, M. Mladenovic, and Z. Stanimirovic. 2020. The effect of diet types on some quality characteristics of artificially reared *Apis mellifera* queens. *J. Apic. Res.* 59(1): 115-123.
- Eckert, C. D., M. L. Winston, and R. C. Ydenberg. 1994. The Relationship between population size, amount of brood, and individual foraging behaviour in the honey Bee, *Apis mellifera L.* *Oecologia*, 97(2): 248-255.
- El-Shahat, K., M. Waheed, A. Ali, A. A. Sallam, and B. El-Saidy. 2020. Influence of sugars and osmoregulators on the motility and viability of cooled and frozen-thawed ram semen. *Rocz. Nauk. PTZ.* 16(2): 51-57.
- FAO. 2021. World Food and Agriculture - Statistical Yearbook 2021. Rome.
- Fisher, S. H and H. E. Hoekstra. 2010. Competition drives cooperation among closely-related sperm of deer mice. *Nature.* 463: 801-803.
- Fisher, H. S., L. Giomi, H. E. Hoekstra, and L. Mahadevan. 2014. The dynamics of sperm cooperation in a competitive environment. *Proc. R. Soc. B.* 281: 20140296.
- Gomes, R. V. R. de S., K. P. Gramacho, and L. S. Gonçalves. 2019. Longevity and reproduction period of africanized queen bees in the Northeast region of Brazil. *Medicina Veterinária (UFRPE).* 13(1): 96-101.
- Gül, A., N. Sahinler, A. G. Onal, B. K. Hopkins, and W. S. Sheppard. 2017. Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera L.*) drone frozen-thawed semen fertility. *Theriogenology.* 101: 109-113.
- Hasnat, M. A. 2018. Reproductive potential difference of artificially inseminated and naturally mated honey bee queens (*Apis mellifera L.*). Stockholm University, Stockholm.

- Hopkins, B. K., C. Herr, and W. S. Sheppard. 2012. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reprod. Fertil. Dev.* 24(8): 1079-1083.
- Islam, N., R. Mahmood, G. Sarwar, S. Ahmad, and S. Abid. 2020. Development of pollen substitute diets for *Apis mellifera ligustica* colonies and their impact on brood development and honey production. *Pakistan J Agri. Res.* 33(2): 381-388.
- Kocher, S.D., F. J. Richard, D. R. Tarpy, and C. M. Grozinger. 2008. Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*). *BMC Genom.* 9: 232.
- Knox, R. V. 2016. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology.* 85(1): 83-93.
- Khalifa, S. A. M., E.H. Elshafiey, A. A. Shetaia, A. A. A. El-Wahed, A. F. Algethami, S. G. Musharraf, M. F. AlAjmi, C. Zhao, S. H. D. Masry, M. M. Abdel-Daim, M. F. Halabi, G. Kai, Y. Al Naggar, M. Bishr, M. A. M. Diab, and H. R. El-Seedi. 2021. Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects.* 12(8): 688.
- Lee, K. V., M. Goblirsch, E. McDermott, D. R. Tarpy, and M. Spivak. 2019. Is the brood pattern within a honey bee colony a reliable indicator of queen quality? *Insects.* 10(1): 12.
- Kretzschmar A and A. Maisonnasse. 2022. More worker capped brood and honey bees with less varroa load are simple precursors of colony productivity at beekeepers' disposal: an extensive longitudinal survey. *Insects.* 13(5): 472.
- Liberti, J., J. Görner, M. Welch, R. Dosselli, M. Schjøtt, Y. Ogawa, I. Castleden, J. M. Hemmi, B. Baer-Imhoof, J. J. Boomsma, and B. Baer. 2019. Seminal fluid compromises visual perception in honeybee queens reducing their survival during additional mating flights. *ELife.* 8: e45009.
- Mengistu Z. 2019. A review on artificial insemination of cattle in Ethiopia. *Glob. J. Reprod. Med.* 6(5): 5556700.
- Mohanty, T. K., S. A. Lone, A. Kumaresan, M. Bhakat, R. Kumar, K. B. Rubina, R. Sinha, A. R. Paray, H. P. Yadav, S. K. Sahu, and A. K. Mohanty. 2018. Sperm dosage and site of insemination in relation to fertility in bovines. *Asian Pac. J. Reprod.* 7(1): 1-5.
- Niño, E. L., D. R. Tarpy, and C. M. Grozinger. 2013. Differential effects of insemination

- volume and substance on reproductive changes in honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Insect Mol. Biol.* 22: 233-244.
- Parodi, J. 2014. Motility, viability, and calcium in the sperm cells. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 60: 65-71.
- Payne, A. N and J. Rangel. 2018. The effect of queen insemination volume on the growth of newly established honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie.* 49: 594-605.
- Ratnieks, F. L. W and L. Keller. 1998. Queen control of egg fertilization in the honey Bee. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 44(1): 57-61.
- Remolina, S. C and K. A. Hughes. 2008. Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees. *Age (Dordr).* 30(2-3): 177-185.
- Rhodes, J. W. 2008. Semen production in drones honey bees. Rural Industries Research and development Corporation. Canberra, ACT, Australia.
- Richard F-J., D. R. Tarpy, and C.M. Grozinger. 2007. Effects of insemination quantity on honey bee queen physiology. *PLoS ONE.* 2: e980.
- Ruttner, F. 1976. The instrumental insemination of the queen bee. Apimondia Publishing House Bucharest.
- Strang, G. E. 1970. A study of honey bee drone attraction in the mating response, *J. Econ. Entomol.* 63(2): 641-645.
- Tanaka, É. D., W. C. Santana, K. Hartfelder. 2009. Ovariole structure and oogenesis in queens and workers of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) kept under different social conditions. *Apidologie.* 40 (2): 163-177.
- Traynor, K. S., Y. L. Conte, and R. E. Page Jr. 2014. Queen and young larval pheromones impact nursing and reproductive physiology of honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 68(12): 2059-2073.
- Wu, J.Y., C. M. Anelli, and W. S. Sheppard. 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS ONE.* 6: e14720.

Study of artificially inseminated effectiveness in western honey bee (*Apis mellifera*)

Pen-Han Chen *

Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Ministry of Agriculture

ABSTRACT

Artificial insemination (AI) has great potential to improve breeding and genetic studies in western honey bee (*Apis mellifera*). In this study, we conducted to verify: (1) the number of spermatozoa would affect the oviposition, the percentage of worker cap, and the number of stored spermatozoa in spermathecal. (2) The reproductive development of AI queens has the same characteristics as naturally mated (NM) queens. Our data showed that the quantity of inseminated spermatozoa affects the amount of oviposition, and the efficiency of fertilized eggs laid by queens, but did not affect the weight of queens. We recommend better insemination spermatozoa number is $(2.4 \pm 0.3) \times 10^7$ spermatozoa in a queen, and check if there was $(3.9 \pm 0.8) \times 10^5$ spermatozoa stored in the spermatheca, which the inseminated queens laid fertilized eggs and brood develop into workers at $93.5 \pm 4.4\%$. The percentage of AI queens laying eggs on honey frames in the surveyed area was $34.3 \pm 3.4\%$, which included 516 cells. We compared the reproductive characteristics such as oviposition, body weights, number of stored spermatozoa, and ovary weights between AI queens and NM queens, and verified that AI queens were significantly lower than NM queens, which implied that NM queens were irreplaceable for bee products production. Our findings would contribute to the development of breeding, strains purification and genetic studies using artificial insemination in Taiwan apiculture.

Keywords: *Apis mellifera*, artificial insemination, spermatozoa, fertilized eggs

*Corresponding author email: BanHen@mdares.gov.tw