



公開
 密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：040601M200

行政院農業委員會苗栗區農業改良場111年度科技計畫研究報告

計畫名稱：**臺灣地區西方蜜蜂精子種原庫建置** (第2年/全程4年)
(英文名稱) **Project of paternal germline construction from western honey bee (*Apis mellifera*) in Taiwan**

計畫編號：111農科-4.6.1-苗-M2

全程計畫期間：自 110年1月1日 至 113年12月31日

本年計畫期間：自 111年1月1日 至 111年12月31日

計畫主持人：**陳本翰**
研究人員：**吳姿嫻、黃子豪**
執行機關：**行政院農業委員會苗栗區農業改良場**



1111556



一、執行成果中文摘要：

父系遺傳資源保存能維持臺灣西方蜜蜂遺傳多樣性，而人工授精是驗證保存的父系遺傳資源有效性的技術。本研究建立蜜蜂人工授精技術，分別調查人工授精蜂王與自然交尾蜂王產卵率、儲精囊儲精數量和工蜂育雛率。人工授精蜂王產卵率與儲精數量 $46.9 \pm 3.3\%$ 、 $5.5 \pm 1.6 \times 10^5$ 精細胞，顯著低於自然交尾蜂王 $59.5 \pm 3.8\%$ 產卵率、 $2.4 \pm 0.6 \times 10^6$ 儲精細胞，但人工授精蜂王生產 $95.2 \pm 1.8\%$ 受精卵可育雛為工蜂，與自然交尾蜂王無顯著差異。此外，本計畫使用冷凍精細胞授精蜂王， 28.4% 受精卵育雛為工蜂。本計畫繼代5個地方品系共21蜂群，保存蜜蜂遺傳資源。本研究證明蜜蜂人工授精技術的有效性，可提供蜂產業提升優質培育蜂種效率，同時作為驗證蜜蜂精子種原庫有效性重要技術，未來持續優化蜜蜂冷凍精子授精確效，達成有效保存蜜蜂遺傳資源之目標。

二、執行成果英文摘要：

Preservation of paternal genetic resources is important to sustain the diversity of western honey bees (*Apis mellifera*). The technique of artificial insemination is essential to verify the validity of preserved genetic resources. In this study, we surveyed the rate of oviposition, the number of spermatozoa in the spermatheca and the rate of worker brood in both artificially inseminated queens (AIQ) and naturally mated queens (NMQ). The oviposition rate and stored spermatozoa of AIQ were $46.9 \pm 3.3\%$ and $5.5 \pm 1.6 \times 10^5$ spermatozoa, respectively, which were significantly lower than $59.5 \pm 3.8\%$ and $2.4 \pm 0.6 \times 10^6$ spermatozoa of NMQ. However, the rate of worker brood was ($95.2 \pm 1.8\%$), which was developed from fertilized egg laid by AIQ, and this was not significantly different with NMQ. Furthermore, we inseminated three queens with cryopreserved spermatozoa, one of queens laid eggs that developed into worker brood at 28.4% . We were breeding 5 local bee strains in an apiary with 21 colonies, which were collected from local beekeepers. In this study, we demonstrated the effectiveness of western honey bee insemination, that will improve the efficiency of honey bee breeding. We continuously study the efficacies of queen insemination with cryopreserved spermatozoa, which will prove the effectiveness of preserved paternal genetic resources.

三、計畫目的：

建立蜜蜂精子保存技術與蒐集國內蜜蜂遺傳資源。

四、重要工作項目及實施方法：

1. 建立西方蜜蜂人工授精技術：

- (1) 處女蜂王培育：本研究以臺灣養蜂業改良朗式蜂箱飼育試驗蜂群，試驗蜂場位於在苗栗縣公館鄉。蜂王培育是以人工挑選1-2日齡幼蟲移入塑膠王台杯，移入6蜂脾以上強健蜂群哺育蜂王幼蟲，10日後蜂王蛹期成熟再介入新組建之無蜂王蜂群。





- (2) 組織核心蜂群：組建核心蜂群是從強健蜂群分拆2片蜂脾，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），新蜂群處於無蜂王狀態至少一天再介入前述方法培養之成熟王台，新蜂王羽化後形成核心蜂群。為避免新蜂王離巢婚飛，交尾蜂箱插入隔王板與紗網限制新蜂王活動範圍，並縮小蜂箱巢口僅供工蜂出入。
- (3) 雄蜂精液採集與保存：雄蜂是利用雄蜂脾供蜂王大量生產雄蜂卵，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，雄蜂羽化12-14日齡開始性成熟產生精液。捕捉成熟雄蜂帶回實驗室，從胸腹部側面輕壓刺激生殖器外翻，以微量吸管（T-10XT, Axygen®）採集黃褐色精液，每隻雄蜂採集0.5-1 μ L精液，採集多隻雄蜂精液以滅菌稀釋液混和配製成精子液。稀釋液為30mM TES free acid, 1mM disodium hydrogen phosphate, 1.1mM sodium citrate, 82mM potassium chloride, 82.9mM Sodium chloride, 5mM sodium bicarbonate, 10 μ M ethylenediaminetetraacetic acid, 1.5mM penicillin, 0.7mM streptomycin, 1.2 mM kanamycin, 34.9 μ M tylosin, 2.6mM arginine, 4.3mM proline, 0.002%w/v BSA, 0.1mM glycine, 0.002%w/v catalase (Hopkins et al., 2012)。精子液分裝在滅菌處理之200 μ L試管，15°C保存備用。
- (4) 人工授精：本計畫引進Cobey等人（2013）改良之蜜蜂人工授精方法進行操作（Cobey et al., 2013），將5-6日齡處女蜂王保定在授精儀以二氧化碳進行麻醉，利用授精儀夾勾打開蜂王尾節骨板，以滅菌處理之毛細管針（Kimble® Chase 41A2502）從生殖孔注入6-8 μ L精子液完成授精處理。完成人工授精之蜂王剪翅避免飛離蜂巢，每隻蜂王單獨靜置於33°C培養箱恢復麻醉後再接回原蜂群。
- (5) 蜂王生育調查：(1)產卵量調查：利用隔王板與紗網限制目標蜂王在2脾巢脾活動，2脾巢脾分別為空巢脾與蜜粉脾或蛹脾。蜂王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 $c=[a/(172-b)]\%$ ；每隻蜂王產卵率 $=[(c1+c2+c3)/3]\%$ 。(2)工蜂育雛率調查：西方蜜蜂受精卵發育為工蜂，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。從蜂巢取出封蓋巢脾，利用內徑7公分之圓形管在封蓋脾分別標記3個調查區。調查區內工蜂房數量(a)與雄蜂房數量(b)可供評估蜂王產受精卵能力，工蜂育雛率 $(c)=[a/(a+b)]\%$ ，每蜂王產受精卵比率 $=[(c1+c2+c3)/3]\%$ 。
- (6) 統計分析：研究數據利用SAS Enterprise Guide7.1進行統計分析，不符合常態分佈檢定資料進行角度轉換再進行ANOVA分析，試驗處理兩組差異以student's test分析，三組以上差異以LSD (Fisher's protected least significant difference test) 進行比較 ($P < 0.05$)。

2. 優化蜜蜂精子保存確效：

- (1) 精子冷凍液配製：本研究利用110年計畫成果為基礎配方A(82.2mM Sodium citrate, 24.9mM sodium bicarbonate, 5.3mM potassium chloride, 0.8mM amoxicillin, 0.02%w/v catalase 1, 10%DMSO)，配方B是在A基礎另添加5%FBS，配方C是 A基礎在添加10 % FBS，精子液配製是雄蜂精液與前述冷凍液混和成精子冷凍液(精液：冷凍液=1:9)，配方D參考Hopkins等人(2012)方法配製 (Hopkins et al ., 2012)精子液。精子冷凍流程是精子液以細胞漸凍盒 (BioCision, LLC, CA, USA) 置於4°C2小時冷卻，再置於-80°C達保存。
- (2) 冷凍精細胞授精試驗：蜜蜂精細胞以配方B冷凍液配製，置於-80°C保存12天，解凍後以6,000 rpm離心5分鐘去除冷凍液，再以稀釋液懸浮，授精7日齡蜂王。
- (3) 精子活性檢測：冷凍精子以30°C水浴20秒快速解凍，利用live/dead sperm staining kit (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA.) 進行螢光染色，在倒





立式螢光顯微鏡 (Nikon Eclipse Ts2, Japan) 視野下檢視活性精子，並計算存活率。

3. 蒐集國內蜜蜂遺傳資源：為保存蜜蜂遺傳資源，以人工移蟲育王，完成本計畫蒐集之地方蜂種繼代繁殖。

五、結果與討論：

1. 完成西方蜜蜂人工授精技術一式：本研究以 $2.5 \pm 8.4 \times 10^7$ 精細胞人工授精蜂王，並與自然交尾蜂王比較產卵率、受精卵率等生育指標。結果顯示，自然交尾蜂王產卵率 $59.5 \pm 3.8\%$ ，儲精囊儲有 $2.4 \pm 0.6 \times 10^6$ 精細胞皆顯著優於人工授精蜂王 $46.9 \pm 3.3\%$ 產卵率與 $5.5 \pm 1.6 \times 10^5$ 囊內儲精細胞，而人工授精蜂王工蜂育雛率達 $95.2 \pm 1.8\%$ ，與自然交尾蜂王無顯著差異，此外，自然交尾蜂王開始產卵重量達 254.6 ± 6.1 毫克，顯著大於工授精蜂王產卵重量達 206.3 ± 5.7 毫克，以人工培育5日齡之蜂王 151.1 ± 18.3 毫克為基礎，蜂王自然交尾後重量增加 $68.5 \pm 4.0\%$ ，發育顯著優於人工授精蜂王(表一)。本研究另以 $2.3 \pm 0.5 \times 10^7$ 精細胞人工授精蜂王(n=5)，並在蜂王開始產卵後每隔14天調查工蜂育雛率，蜂王4週工蜂育雛率達 $94.6 \pm 4.4\%$ (表二)，生育週期仍持續調查中。本研究人工授精蜂后產卵量低於自然交尾蜂后，不足以取代傳統蜂群繼代繁殖模式，但生產的受精卵，有 $95.2 \pm 1.8\%$ 育雛為工蜂，與自然交尾蜂王無顯著差異，受精卵可能有極少數多倍體等遺傳異常個體，幼雛發育可能受到蜂蟹蟎、幼蟲等危害，蜂群清潔行為會移除病亡個體，工蜂育雛率僅代表能發育至封蓋蛹期的受精卵，在健康蜂群可作為評估人工授精產生受精卵確效，本研究授精蜂王持續4週工蜂育雛率達 $94.6 \pm 4.4\%$ ，顯示應用於未來蜜蜂育種的潛力。研究指出，自然交尾蜂后每日約產下1500粒卵，營養、蜂群規模、環境都會影響產卵能力(Abou-Shaara *et al.*, 2021)。本研究未侷限蜂王活動區域，蜂王可能在活動巢脾任意產卵，產卵率是取樣範圍內評估蜂王能力，而不是蜂王全部產卵量。本研究試驗蜂群所培育蜂王，5日齡尚未交尾產卵重量為 151.1 ± 18.3 毫克(n=42)，蜂王自然交尾後卵巢發育，重量增加，表一顯示自然交尾蜂王重量顯著大於人工授精蜂王，顯示顯示交尾方式會影響蜂王生殖發育。精液組成包含精細胞與精漿，精漿中含有豐富的雄蟲副腺蛋白質、酵素等等生化物質，在雙翅目果蠅屬、斑蚊屬、瘧蚊屬的研究指出，雄蟲副腺萃取物能增加母蟲卵細胞生成、產卵率與抑制再交尾發生(Baldini *et al.*, 2012)，又有研究指出蜂王重量與卵巢重量、儲精囊體積與儲精量成正比，較重的蜂王具有儲存更多精細胞的潛力(Akyol *et al.*, 2008; Arslan *et al.*, 2021)。表一研究結果推測人工授精蜂王卵巢發育低於自然交尾蜂王，可能與本研究以稀釋液混和蜜蜂精液配製成精子液，等同稀釋精漿生化物質，導致授精蜂王卵巢發育不足，未來如能研製雄蜂副腺相關蛋白質，可再研究提升人工授精蜂王生育能力。
2. 完成蜜蜂精子冷凍液保存確效評估一式：表三顯示蜜蜂精細胞以B配方保存效果最佳，以 -80°C 保存28天維持精細胞 $67.1 \pm 4.1\%$ 活性，顯著優於基礎配方A約16%。冷凍保存的精細胞，活性隨保存時間逐漸降低，從第9天活性 $88.5 \pm 4.0\%$ 到42天下降至 $53.3 \pm 3.0\%$ (圖一)，倘以液態氮儲存，或可減緩細胞活性降解速率。本研究以冷凍保存12天的精細胞進行授精試驗，精細胞解凍後活性為 69.9% ，授精3隻7日齡蜂王，每隻蜂王授精 3.3×10^6 活性精細胞，其中2隻蜂王授精處理後10天未產卵失王，一隻蜂王產卵，有 28.4% 的受精卵育雛為工蜂(表四)。人工授精蜂王生育受到授精細胞數量、精細胞轉移進入儲精囊效率、操作損傷、授精液物質沾黏輸卵管、卵巢發育、蜂王費洛蒙表現等因素影響。蜂王自然生育是交尾一次，儲存精細胞在儲精囊供其一生1-2年產卵使用，每日約產下1500粒卵(Abou-Shaara *et al.*, 2021)，與家畜動物依排卵期一生多次交尾，每





次生育少數子代不同，因此西方蜜蜂對授精細胞品質、數量要求更加嚴格，本計畫持續研究冷凍精細胞確效、精細胞冷凍保存週期重複授精等方式研究，期達到建立精子種原庫有效性的目標。

3. 蜜蜂種群保存：本計畫利用人工移蟲培育新蜂王方式(圖二A、B)，保存台南、新竹、花蓮、台中、宜蘭等地方蜂群，共繼代繁殖地方蜂群21群，作為本研究試驗蜂群與保存遺傳資源。本計畫宜蘭蜂群購自黃姓蜂農，體長約21mm，腹部約13mm，腹部每節背板有黑色環紋，腹部末三節背板成黑色，側面有黑色單點(圖二D)。台中蜂群購自鄭姓蜂農，體長約21mm，腹部約14mm，尾節黑色，腹部背板有棕黑色塊(圖二D)。花蓮蜂群購自李姓蜂農，體長約22mm，腹部約15mm，尾節黑色，體色棕黃，腹部背板無明顯色斑(圖二D)。新竹蜂群購自江姓蜂農，體長約23mm，腹部約14mm，尾節黑色，腹部背板與前節交界有無明顯色塊(圖二D)。台南蜂群購自詹姓蜂農，體長約21mm，腹部約13mm，尾節黑色，腹部背板與後節交接處有細長黑色條紋(圖二D)。

六、結論：

本計畫建立蜜蜂人工授精技術，人工授精蜂王產卵率低於自然交尾蜂王，雖無法取代傳統婚飛繼代方式，但所生產 $95.2 \pm 1.8\%$ 受精卵可發育為工蜂，育雛工蜂時間超過1個月，足以提供育種者依據雜交組合，選育優良次代優質蜂王，顯示本技術應用潛力，未來亦能利用引進國外冷凍精子方式改良蜂種，提升國內蜂產業競爭力。本計畫將持續研究蜜蜂冷凍精子授精確效，期能達到建立種原庫有效利用遺傳資源與提升育種效率的目標。

七、參考文獻：

1. Akyo, E., H. Yeninar, and O. Kaftanoglu. 2008. Live Weight of Queen Honey Bees (*Apis Mellifera* L.) Predicts Reproductive Characteristics. J. Kans. Entomol. Soc. 81(2):92-100.
2. 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. JoBAZ.82:37
3. 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 : 2686-2691.
4. 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.
5. Cobey, Susan. W., D. Tarpy and J. Woyke. 2013. Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. J. Apic. Res. 52(4): (2013)





表一、比較人工授精蜂王與自然交尾蜂王生育指標

Table1、Comparison of fertility characteristics with artificially inseminated queen bees and naturally mated queen bees.

Sources	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 brood (%)	100±0(n=12)	95.2±1.8(n=13)	>0.05
Sperms in spermatheca	2.4±0.6x10 ⁶ (n=8)	5.5±1.6x10 ⁵ (n=12)	<0.01
Weight(mg)	254.6±6.1(n=18)	206.3±5.7(n=19)	<0.01

^x Means ± standard error.

^y Significant difference using unpaired t-test.

表二、人工授精蜂王持續育雛工蜂的時間

Table2、Duration of worker brood production by artificially inseminated queen bees

	Days	
	14	28
Percentage of worker brood (%)	81.6±18.4	94.6±4.4



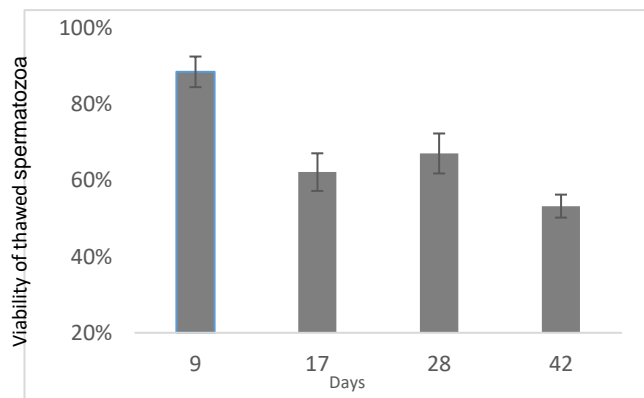


表三、冷凍液配方冷凍保存蜜蜂精細胞 28 天確效

Table3. Viability of spermatozoa after 28 days of cryopreservation with various cryopreservation solutions.

Cryopreserved solutions	A	B	C	D
Viability of spermatozoa(%)	51.5±2.7b	67.1±4.1a	61.8±3.8ab	7.6±3.0c

Means and standard error were represented within each column. Means within each treatment followed by the same letter are not significantly different at 5% by Fisher's protected LSD test



圖一、不同冷凍期精細胞活性

Fig.1 Viability of thawed spermatozoa during the cryopreservation period.





表四、冷凍精子人工授精蜂王育雛工蜂紀錄

Table4、Record of worker brood from queen inseminated with cryopreserved spermatozoa .

Queen	Status	Percentage of worker brood (%)
1	Lifespan of 10-14 days	-
2	Lifespan of 10-14 days	-
3	Oviposition	28.4





(A)



(B)



(C) Number of reproductive colonies with local honey bee strains.

Bee strains	Number of bee colonies
Yilan strain	4
Tainan strain	4
Hsinchu strain	4
Taichung strain	4
Hualien strain	5

(D) Queen bees of local strain

Queen bee of Yilan strain

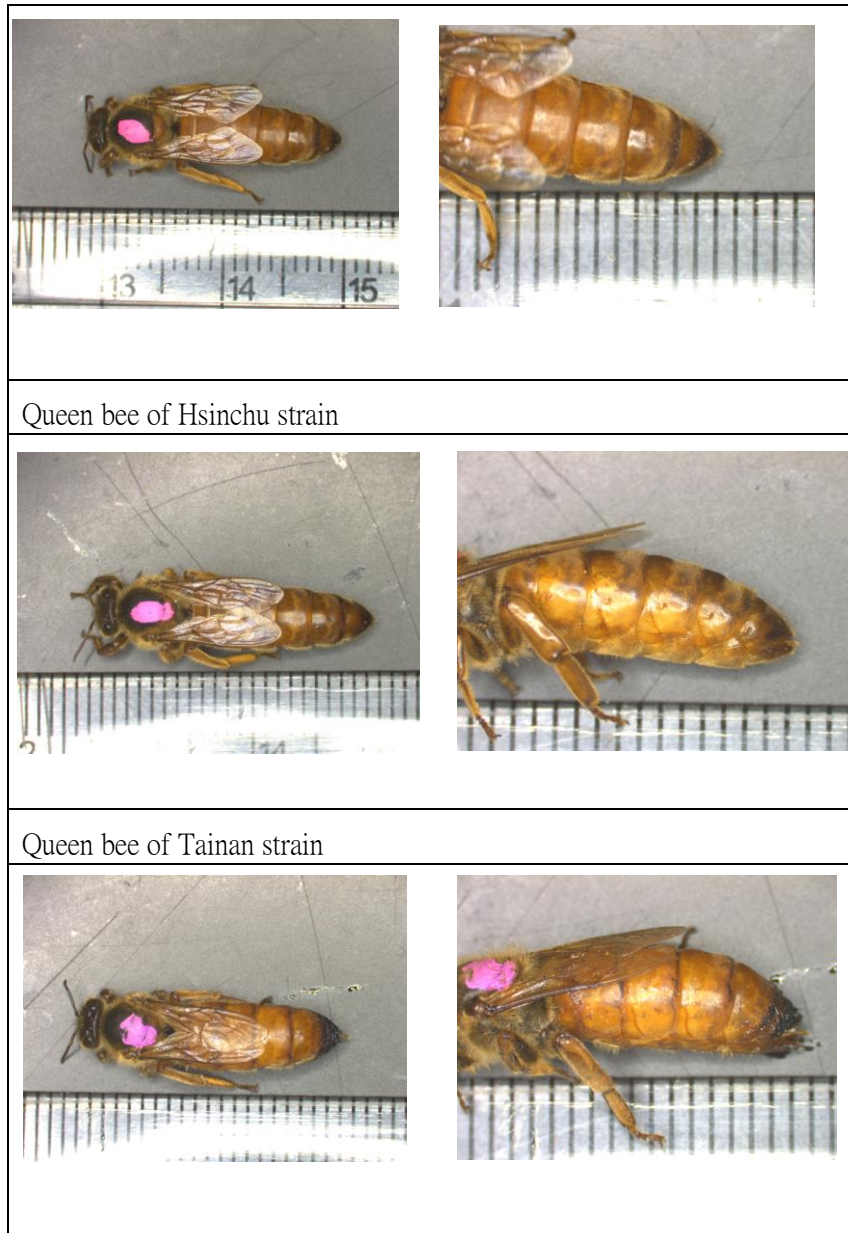


Queen bee of Taichung strain



Queen bee of Hualien strain.





圖二、繼代繁殖西方蜜蜂種群。(A)人工移蟲培育王台。(B)介入王台組織新豐群。(C)地方蜂群繁殖蜂群數。(D)地方品系蜂王。

Fig.2 Reproduction of western honey bee. (A) Queen cell culture. (B) Grafting queen cell into a new colony. (C) Number of reproductive colonies with local honey bee. A : Yilan strain, B : Tainan strain, C : Hsinchu strain, D : Taichung strain, E : Hualien strain. (D) Queen bees of local stain

