



公開  
 密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：040601M300

## 農業部苗栗區農業改良場112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3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：112農科-4.6.1-苗-M3

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 112年1月1日 至 112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**



1121134



## 一、執行成果中文摘要：

西方蜜蜂(*Apis mellifera*)是重要的授粉昆蟲，並是蜂產業主要生產蜂種。近年來，台灣農業面臨氣候變遷的威脅，需要保護蜜蜂遺傳多樣性以調適環境變化，促進農糧產業永續經營。本計畫前期以建立蜜蜂精子冷凍保存技術，今年度建立蜜蜂人工授精所需精細胞數量標準以驗證冷凍保存精子授精確效。本計畫建議至少有 $(4.5 \pm 1.2) \times 10^6$ 新鮮精子授精蜂王，蜂王約能產 $59.6 \pm 10.2\%$ 受精卵，提供 $(2.4 \pm 0.3) \times 10^7$ 新鮮精子，蜂王能產 $93.5 \pm 4.4\%$ 受精卵，操作良好的蜂王可維持超過5個月產受精卵。基於前述授精細胞量標準，本計畫平均提供 $(2.96 \pm 5.3) \times 10^7$ 冷凍精子，結果顯示冷凍36-38天精子授精蜂王平均產 $83.7\%$ 受精卵(2%-100%)，冷凍58-68天精子授精蜂王平均產 $45.1\%$ 受精卵(9.1%-73.5%)。本計畫人工授精蜂王產卵量與卵巢重量等生殖相關表現不如自然交尾蜂王，不建議以人工授精蜂王做為田間生產使用，但可做為育種、保種及純化種原等利用。本計畫成果是試驗改良場所首次成功以新鮮精液或冷凍精子授精蜂王並成功產下受精卵，可培育F1蜂王，將提升蜂產業精子種原保存、育種與品系純化等效率。

## 二、執行成果英文摘要：

The Western honeybee (*Apis mellifera*) is not only an important pollinating insect but also contributes significantly to profits in apiculture. In recent years, Taiwanese agriculture has faced threats from climate change. We have to protect the genetic diversity of honey bees, and that will increase the adaptability and sustainability of agriculture. In the preliminary studies of this project, we developed a procedure for the cryopreservation of honeybee spermatozoa. This year, we aim to verify the fertilization efficiency by studying the quantities of cryopreserved sperm used in artificial insemination.

We verified that queen bees lay  $59.6 \pm 10.2\%$  fertilized eggs by inseminating with  $(4.5 \pm 1.2) \times 10^6$  fresh spermatozoa, and lay  $93.5 \pm 4.4\%$  fertilized eggs by inseminating with fresh  $(2.4 \pm 0.3) \times 10^7$  spermatozoa. Based on the criteria of quantities of inseminated spermatozoa, we conducted to inseminate the queen bees with  $(2.96 \pm 5.3) \times 10^7$  cryopreserved spermatozoa. The mean percentage of fertilized eggs is  $83.7\%$  (2-100%) after queen bees were inseminated with spermatozoa that were cryopreserved for 36-38 days, and the mean percentage of fertilized eggs is  $45.1\%$  (9.1-73.5%) after queen bees were inseminated with spermatozoa that were cryopreserved for 58-68 days.

However, the reproductive expression (quantities of oviposition, weights of the ovary, etc.) of inseminated queen bees was lower than the natural mated queens, and we do not recommend replacing traditional subcultured queens with artificially inseminated queens for bee product production. In this project, we first carried out the fertilized eggs laid by inseminated queen bees with fresh sperm or cryopreserved spermatozoa. We expect to increase the efficiencies of germline preservation, bee breeding, and the purification of strains in apiculture.

## 三、計畫目的：





完成西方蜜蜂人工授精生育確效研究，與建立冷凍精細胞授精確效研究各一式，並保存蜜蜂遺傳資源。

#### 四、重要工作項目及實施方法：

1. 蜂王人工授精：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)，處女蜂王培育是以人工挑選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王幼蟲，移蟲10日後，將該蜂王王台介入無蜂王蜂群形成試驗蜂群。處女蜂王6-7日齡進行第一次授精處理，蜂王固定在授精儀並以二氧化碳進行麻醉，以毛細管針於生殖孔固定注入8  $\mu$ L精子液。為避免蜂王離巢，完成人工授精之蜂王剪翅，單獨靜置於35°C培養箱，待恢復活力後再導入原試驗蜂群，蜂王間隔24小時約8-9日齡再進行第二次人工授精處理。
2. 調查授精細胞數量影響蜂王產卵能力：本調查是利用空巢脾供蜂王產卵，利用直徑7公分之圓形管在卵脾上標記3個調查區，每調查區可計算172個巢房，調查區內產卵房(a)與蜜粉房數(b)，每區產卵率 $c=a/(172-b)X\%$ ，產卵率 $=(c1+c2+c3)/3X\%$ 。
3. 調查授精細胞數量影響蜂王產授精卵能力：蜜蜂是受精卵發育為工蜂、蜂王，未受精卵發育為雄蜂，調查子脾上工蜂封蓋與雄蜂封蓋比率，作為評估人工授精蜂王產授精卵能力。將封蓋巢脾從蜂巢取出，利用內徑7公分之圓形管在封蓋脾分別標記3個調查區。分別調查調查區內工蜂封蓋(a)與雄蜂封蓋數量(b)，調查區內工蜂比率  $(c)=/(a+b)\%$ ，調查蜂王產授精卵能力 $=(c1+c2+c3)/3x\%$ 。
4. 冷凍保存精子授精確效評估：
  - (1) 精子冷凍與解凍流程：配製無菌冷凍液(82.2mM Sodium citrate, 24.9mM sodium bicarbonate, 5.3mM potassium chloride, 0.8mM amoxicillin, 0.02%w/v catalase 182.2mM Sodium citrate, 24.9mM sodium bicarbonate, 5.3mM potassium chloride, 0.8mM amoxicillin, 0.02%w/v catalase 1,5%FBS, 10%DMSO)，蜜蜂新鮮精液與冷凍液均勻混和(1:9)，在室溫以0.5mL冷凍管儲放在冷凍盒 (BioCision, LLC, CA, USA)，移入4°C保存2小時冷卻，再置入-80°C保存。精子解凍是將冷凍精子取出，置於桌上型乾浴槽25°C 30秒，解凍後靜置於室溫備用。
  - (2) 精子活性檢測：精子樣本利用live/dead sperm staining kit (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA.) 進行精子螢光染色，以倒立式顯微鏡 (Nikon Eclipse Ts2, Japan) 檢視解凍後活性精子。
  - (3) 人工授精：解凍精子以6,000 rpm (MySPIN 6 Mini, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA.) 15秒移除冷凍液，重複4次以減少冷凍液中DMSO對蜂王的影響。冷凍精子以保護液(30mM TES free acid, 1mM disodium hydrogen phosphate, 1.1mM sodium citrate, 82mM potassium chloride, 82.9mM Sodium chloride, 5mM sodium bicarbonate, 10  $\mu$ M ethylenediaminetetraacetic acid, 1.5mM penicillin, 0.7mM streptomycin, 1.2mM kanamycin, 34.9  $\mu$ M tylosin, 2.6mM arginine, 4.3mM proline, 0.002%w/v BSA, 0.1mM glycine, 0.002%w/v catalase) 懸浮製成精子液於室溫備用。
5. 蒐集蜜蜂遺傳資源：本計畫已蒐集宜蘭、花蓮、台中、台南、新竹等5個蜜蜂地方品系，本年度預計再蒐集嘉義、彰化等地方蜂群，每地方蜂群至少完成繼代繁殖3群，共21群。

#### 五、結果與討論：





1. 授精細胞數量影響蜂王表現：本計畫分別以高、中、低三種不同精子量之精子處理處女蜂王，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，處理後蜂王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、中授精量組蜂王產卵率無顯著差異，但顯著優於低授精量處理，其中以高授精量組蜂王產卵率達  $34.3 \pm 3.4\%$  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  $0.4 \pm 0.4\%$ ，顯示高授精處理組蜂王產授精卵能力最佳。解剖蜂王儲精囊，高授精量組蜂王儲有  $(3.9 \pm 0.8) \times 10^5$  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，蜂王重量以低授精量處理組  $206.0 \pm 33.4$  毫克略高，但各處理組間無顯著差異。另調查授精蜂王的壽命，工蜂封蓋房率大於100%的蜂王可存活超過5個月以上持續產授精卵。
2. 冷凍精子授精蜂王產工蜂比率：
  - (1) 本計畫為建立精子種原庫有效性，111年研究優化蜜蜂精子冷凍保存液配方，顯示含10%DMSO與5% FBS為最佳配方，精子保存於  $-80^\circ\text{C}$  28天後以  $30^\circ\text{C}$  水浴20秒快速解凍，可維持  $67.1 \pm 4.1\%$  (結果呈現於111年度計畫報告)，本計畫今年再研究解凍溫度對冷凍精子活性的影響，精子保存於  $-80^\circ\text{C}$  21天，分別以  $25-40^\circ\text{C}$  30秒水浴，結果顯示  $25^\circ\text{C}$  解凍精子活性達  $72.0 \pm 0.03\%$  為最佳(圖一)，顯著優於高溫解凍。
  - (2) 表一結果顯示，精子數量影響蜂王產卵表現，至少提供  $(4.5 \pm 1.2) \times 10^6$  精子蜂王約產60%受精卵，解凍精子約維持72%活性，估計至少提供  $6.25 \times 10^6$  精子才能達到預期目標，本研究3個精子冷凍期(組)處理的蜂王( $n=13$ )，2次授精處理提供  $(2.96 \pm 5.3) \times 10^7$  精子，冷凍36天精子處理組6隻蜂王，有5隻蜂王100%產受精卵發育為工蜂，冷凍44-57天精子處理組4隻蜂王，受精卵為14.4%-31.0%，冷凍58-65天精子處理組3隻蜂王，表現最佳蜂王產受精卵達73.5%(表三)。
3. 人工授精與自然交尾蜂王生理特徵比較：本研究分別調查自然交尾蜂王、新鮮精液授精處理蜂王與冷凍精子授精處理蜂王生育相關的生理表現，自然交尾蜂王儲精囊的儲精量達  $(2.4 \pm 0.6) \times 10^6$  精子，顯著優於新鮮精液組蜂王  $(5.5 \pm 1.6) \times 10^5$  儲存精子，以及冷凍精子處理組蜂王  $(4.8 \pm 1.1) \times 10^4$  儲存精子(表四)。產卵量調查是插入一片空脾讓蜂王產卵，48小時後取出在蜂脾中央取  $30\text{cm} \times 15\text{cm}$  的調查區，結果顯示冷凍精子授精的蜂王每日產卵量  $253.6 \pm 103.8$  顆卵粒，顯著低於新鮮精液授精蜂王組  $423.3 \pm 85.7$  顆與自然交尾蜂王組  $616.0 \pm 127.6$  顆卵(表四)。此外，自然交尾蜂王體重達  $254.6 \pm 6.1\text{mg}$  最佳，但各處理組間無顯著差異(表四)。自然交尾蜂王卵巢發育最佳達  $76.8\text{mg}$ ，顯著優於人工授精處理蜂王，而2個人工授精處理組間蜂王卵巢重量無顯差異，重量約  $42-46\text{mg}$ (表四)。
4. 蜜蜂地方品系保存：本計畫利用人工移蟲培育新蜂王(圖二)，共保存宜蘭、台南、新竹、台中、彰化、花蓮和嘉義等7個地區蜜蜂品系共26蜂群(表五)，又冷凍保存蜜蜂精子至少16管，蜜蜂精液混和冷凍保存液至少  $90-100 \mu\text{L}$ ，保存蜜蜂遺傳資源42筆(圖三)，同時作為本計畫所需研究材料。

## 六、結論：

1. 授精細胞數量影響蜂王表現：本研究蜂王限制在2蜂脾範圍內自由活動，產卵率為單片巢脾取樣調查範圍內結果，表一顯示授精細胞數量會影響蜂王產卵表現，至少提供  $4.5 \times 10^6$  以上精子，蜂王才能有較佳的產卵量(表一)。西方蜜蜂無性別決定染色體，由染色體套數決定性別，受精卵(二倍體)發育為工蜂或蜂王，而未受精卵(單倍體)則發育為雄蜂(Ratnieks and Keller, 1998)，工蜂封蓋房率為蜂王所產之受精卵可發育為工蜂之比率，用以評估蜂王產受精卵能力。本研究建立授精細胞數量標準，至少提供







$4.5 \times 10^6$ 以上精子，蜂王產卵約60%為受精卵，提供 $2.4 \times 10^7$ 精子，蜂王產卵約93%為受精卵，處理良好的蜂王，可觀察到維持5個月以上100%的工蜂封蓋房率，足以提供蜂種選所需子代數量(表二)。表一顯示高授處理組蜂王儲精量與精子轉移效率均為最佳表現，低授精量組未發現精子進入儲精囊，精子轉移率是解剖蜂王儲精囊計算儲精量，再計算與授精細胞數量比率，Gül 等(2017)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王有較高的儲精量，顯示精液漿含有促進精子移動物質，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，可能影響精子生理影響移動能力。有關蜂王體重發育，表一各處理組蜂王體重無顯著差異，顯示授精細胞數量對蜂王體重無明顯影響。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 $0.5-1 \mu\text{L}$ 精液計算，推算每隻蜂王至少需提供6隻雄蜂精液，達到高授精量標準可有90%以上的受精卵率。

## 2. 冷凍精子授精蜂王產工蜂比率：

- (1) 本計畫研究不同保存期的精子處理蜂王，使用冷凍36-38天的精子授精蜂王，最佳表現可產100%受精卵發育為工蜂，使用冷凍58-65天的精子授精蜂王，最佳可產73.5%受精卵，為試驗場所首次利用冷凍精子授精蜂王並產下受精卵，預期能提升蜜蜂遺傳資源利用效率。
- (2) 雄蜂發育從卵期至成蜂羽化需要24天，成蜂12-14日齡開始性成熟可採集精液，Rhodes等(2011)的研究指出14日齡雄蜂採集到精液的比例為58.6%，35日齡增加到75.8%，本計畫在苗栗縣公館鄉試驗蜂場調查亦有相似結果，14日齡雄蜂約有43.3%可採集精液，21日齡約60.0%可採集精液，顯示雄蜂性成熟比例隨日齡增加，但個體生殖成熟期有差異，由此可推算雄蜂從卵發育至性成熟約需40天。雄蜂在蜂群主要任務為交尾，並不會擔任採蜜、清潔等工作，蜂群自然繁殖以春、秋最旺盛，雄蜂數量自然增加，夏、冬季節因外界蜜粉源缺乏以及氣溫影響蜂王產卵，蜂群自然減少雄蜂數量，故夏、冬季節不易有足夠雄蜂進行實驗。綜上，本年度研究冷凍期影響蜂王授精確效總計雄蜂成熟期與冷凍期需要70-100天，當年度計畫如欲再研究更長的精子冷凍期授精確效有期程上的困難，明年度會持續研究優化冷凍精子授精蜂王技術，目標為冷凍期達3個月的冷凍精子授精確效，並逐步建立更新精子種原庫週期。
- (3) 本計畫冷凍精子處理的蜂王，產受精卵100%壽命最高為96天(表二)，明顯少於新鮮精液授精蜂王，Pettis 等人(2016)調查馬里蘭州4個地區的商业蜂場，發現蜂王儲精囊所儲的精子活性介於52%-92%，而儲精囊精子活性低的蜂王其蜂群較容易瓦解，顯示儲精子活性影響蜂群延續時間，又有研究指出，蜂王交尾後儲精囊抗氧化基因如catalase, thioredoxin 2與thioredoxin reductase 1等表現上升，而年輕蜂王體內ROS(Reactive oxygen species)低於老王，顯示蜂王克服氧化壓力與影響蜂王壽命的機制(Corona et al., 2016; Gonzalez et al., 2018)。本計畫解凍精子活性約72%，估計有26%無活性精細胞注入蜂王，大量無活性精細胞凋亡過程產生的氧化壓力，以及冷凍液中殘留的微量DMSO可能影響蜂王生理使蜂王壽命縮短。此外，Harbo(1977)嘗試以液態氮保存精子48小時，授精處理的蜂王明顯產未受精卵發育為雄蜂，Gül等人(2017)冷凍蜜蜂精子2週後分別以葡萄糖液、公羊精液漿與蜜蜂精液漿等不同溶液懸浮解凍精子，蜂王產受精卵比率為40-47%，Hopkins等(2012)研究冷凍精子授精蜂王，蜂王產受精卵率17.9~100%，平均為49.5%，壽命約2個月，Wegener等人(2014)以液態氮保存精子9個月，授精處理蜂王產受精卵平均為59.4%。本計畫冷凍保存36-38天精子處理的蜂王，可產100%受精卵發育為工蜂，平均為83.7%；冷凍58-65天精子處理組，表現最佳的蜂王產73.5%受精卵，平均為45.7%發育為工蜂(表三)，研究結果與上述文獻相近。本計畫觀察冷凍精子處理的蜂王，有延遲產受精卵的現象，開始產卵1-2週多為未受精卵，產卵2週後受精卵比率逐漸增加(資料未呈現)，但自然





交尾與新鮮精液授精的蜂王不曾觀察到此現象，表三冷凍44-57天處理組蜂王可能未等到最佳產受精卵期即汰除，冷凍精子影響蜂王產受精卵的相關機制仍需要再研究。本研究為試驗改良場首次成功以冷凍精子使蜂王產下受精卵，達到驗證精子種原庫有效性的目標，研究成果預期能應用於保存蜜蜂遺傳多樣性，加速優質蜂種選育或提供精子種原交換潛力等，將提升蜜蜂遺傳利用效率與產業競爭力。

3. 蜂王生育生理表現：表四顯示自然交尾蜂王儲精量顯著優於人工授精處理組蜂王，新鮮精子的活性與活動力均優於冷凍精子(資料未呈現)，使新鮮精液組儲精量表現優於冷凍精子組，推測儲精量會影響蜂王產受精卵期程。蜂王體重個處理組間無顯著差異，但自然交尾蜂王卵巢發育顯著優於人工授精處理，蜂王產卵量調查為單片巢脾上調查範圍內結果，調查過程未限制蜂王活動範圍，並非蜂王實際卵量，但足以顯示自然交尾蜂王產卵量優於人工授精蜂王。研究指出，雄蟲精液漿含有豐富的副腺蛋白質，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)，人工授精需要以保護液稀釋精液或懸浮冷凍精子，等同稀釋精液漿中生化物質，可能影響人工授精蜂王卵巢發育與產卵表現，未來如能研製雄蜂副腺液中的關鍵蛋白質，有望再提升人工授精蜂王產卵能力。本計畫研究結果顯示人工授精蜂王生育表現不如自然交尾蜂王，故難以取代傳統繼代繁殖進行蜂產品生產，但人工授精蜂王產授精卵良足以提供培育F1世代蜂王，預期能利用遺傳譜系提升育種、品系純化與遺傳等研究效益。
4. 蜜蜂地方品系保存：精子種原庫之建立為保存蜜蜂遺傳多樣性，本計畫未來持續蒐集蜜蜂地方品系，並與「耐病蟲害高產蜜西洋蜂種選育」計畫合作，蒐集高產蜜品系蜂種精子種原，以及巢房清潔能力強，耐病蟲害蜂種精子種原，達到充實種原庫資源目標。

## 七、參考文獻：

1. 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.
2. 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.
3. Corona, M., K. A. Hughes, D. B. Weaver, G. E. Robinson. 2016. Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mech. ageing dev.* 126 (11) : 1230-1238.
4. 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.
5. Gonzalez, A. N., N. Ing, and J. Rangel. 2018. Upregulation of antioxidant genes in the spermathecae of honey bee (*Apis mellifera*) queens after mating. *Apidologie* 49 : 224-234.
6. Harbo, J. R. 1977. Survival of honey bee spermatozoa in liquid-nitrogen. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 70 (2) : 257-258.
7. 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) :1079-83.
- 8.





- Pettis, J. S., N. Rice , K. Joselow , D. vanEngelsdorp, and V. Chaimanee. 2016. Colony failure linked to low sperm viability in honey bee (*Apis mellifera*) queens and an exploration of potential causative Factors. PLOS ONE 11 (5) : e0155833.
9. Ratnieks, F. L. W., and L. Keller. 1998. Queen control of egg fertilization in the honey Bee. Behav. Ecol. Sociobiol. 44 (1) : 57-61.
  10. Rhodes, R. A. W. 2011. Thinking on: A Career in Public Administration. Public Adm. 89 (1) :196-212.
  11. Wegener, J., T. May, G. Kamp, and K. Bienefeld. 2014. A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. Cryobiology. 69 : 236-242.





表一、授精量影響人工授精蜂王蜂生殖表現。

Table 1. The effects of the quantities of spermatozoa on the reproductive performance within inseminated queen bees.

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) x10 <sup>7</sup>	4	34.3 ± 3.4 a	93.5 ± 4.4 a	(3.9 ± 0.8) x10 <sup>5</sup> a	1.5 ± 0.3 a	178.1 ± 6.5 a
Medium quantity (4.5±1.2) x10 <sup>6</sup>	5	31.2 ± 8.1 a	59.6 ± 10.2 b	(4.3 ± 2.2) x10 <sup>4</sup> b	0.7 ± 0.3 a	200.0 ± 15.9 a
Low quantity (2.3±0.18) x10 <sup>5</sup>	3	1.7 ± 0.8 c	0.4 ± 0.4 c	0 ± 0 c	0 ± 0 b	206.0 ± 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.

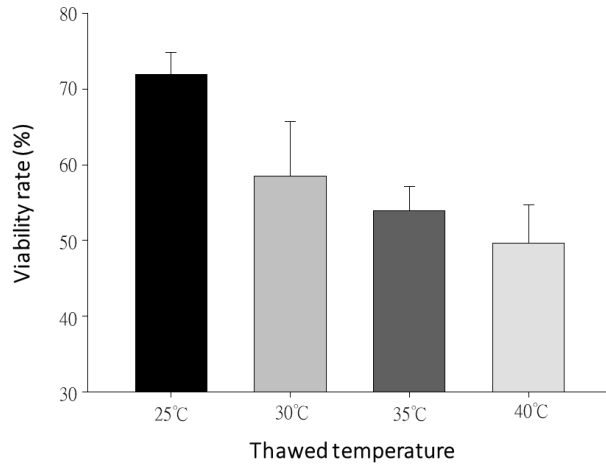
表二、人工授精蜂后壽命紀錄

Table2、Lifespan records of inseminated queens.

Treatment	Percentage of worker brood (%)	Lifespan during the observation period
Fresh semen	1	100.0%
	2	100.0%
	3	98.0%
	4	100.0%
Cryopreserved semen (36 days)	1	2.0%
	2	100.0%
	3	100.0%
	4	100.0%







圖一、不同解凍溫度精子活性

Fig1. Viability of cryopreserved spermatozoa with different thawing temperatures

表三、冷凍精子授精蜂王產工蜂比率

Table 3. Percentage of worker cap laid by cryopreserved spermatozoa inseminated queens.

Inseminated treatment	Queens	Worker cap (%)
Fresh semen	1	100.0
	2	98.0
	3	100.0
	4	100.0
Cryopreserved spermatozoa for 36-38 day	1	100.0
	2	100.0
	3	100.0
	4	2.0
	5	100.0
	6	100.0
Cryopreserved spermatozoa for 44-57 days	1	14.41
	2	31.03
	3	13.79
	4	25.00
Cryopreserved spermatozoa for 58-65 day	1	54.5
	2	73.5
	3	9.1





表四、人工授精與自然交尾蜂王生理表現比較

Table 4、Comparison of physiological expression with artificially inseminated queen bees and naturally mated queen bees.

Source	Queen bees		
	Natural mating	Insemination with fresh semen	Insemination with cryopreserved spermatozoa
Number of spermatozoa in spermatheca	$(2.4 \pm 0.6) \times 10^6$ <sup>a</sup> (n=8)	$(5.5 \pm 1.6) \times 10^5$ <sup>b</sup> (n=12)	$(4.8 \pm 1.1) \times 10^4$ <sup>c</sup> (n=12)
Body weights (mg)	$254.6 \pm 6.1$ <sup>a</sup> (n=19)	$206.3 \pm 5.7$ <sup>a</sup> (n=18)	$196.3 \pm 9.0$ <sup>a</sup> (n=18)
Ovary weights (mg)	$76.8 \pm 0.0$ <sup>a</sup> (n=3)	$46.6 \pm 0.0$ <sup>b</sup> (n=6)	$42.2 \pm 3.6$ <sup>b</sup> (n=12)
Quantities of oviposition	$616.0 \pm 127.6$ <sup>a</sup> (n=3)	$423.3 \pm 85.7$ <sup>b</sup> (n=3)	$253.6 \pm 103.8$ <sup>c</sup> (n=8)

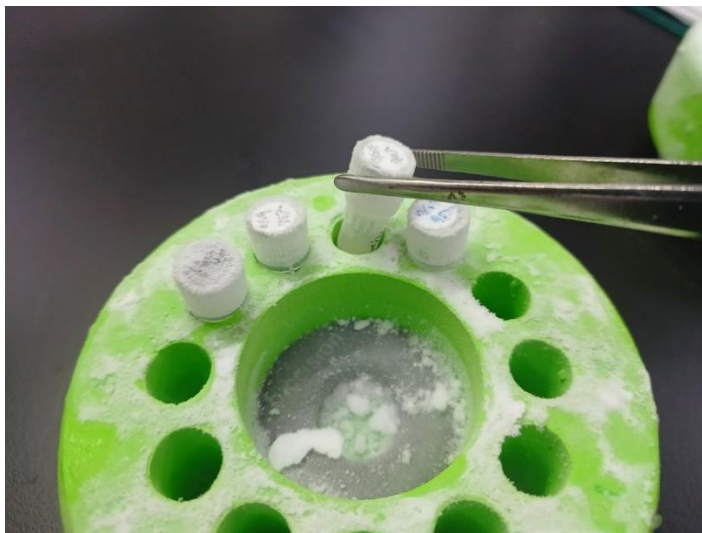
Means and standard errors within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.





圖二、人工培育王台導入新蜂群。

Fig2. Cultivated queen cell was grafted into a new honey bee colony.



圖三、細胞漸凍盒冷凍蜜蜂精子

Fig3. Spermatozoa from drones was cooled and cryopreserved by using cell freezing container.





表五、繁殖繼代臺灣蜜蜂地方品系數量

Number of subculture colonies of local honey bee strains.

Strains of Taiwan local honeybee	Number of bee colonies
Yilan strain	4
Tainan strain	4
Hsinchu strain	4
Taichung strain	4
Changhua strain	4

