



☒ 公開
☐ 密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：0406010400

農業部苗栗區農業改良場113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4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：113農科-4.6.1-苗-04

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 113年1月1日 至 113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：農業部苗栗區農業改良場



1131053



一、執行成果中文摘要：

本計畫為建立精子種原庫，建立蜜蜂精子冷凍與解凍流程與蜜蜂人工授精技術，結果顯示，使用新鮮精液可使蜂王產99.5%受精卵，並維持約3個月以上的生殖能力。冷凍精子授精確效，會隨延長冷凍保存期而下降，使用冷凍保存36天的精子人工授精蜂王，產卵約80.4%為受精卵；使用凍保存200天的精子，蜂王產受精卵確效下降至46.4%，此外，冷凍精子授精組蜂王壽命為 41.6 ± 15.0 天，顯著低於新鮮精液處理組蜂王壽命 89.4 ± 9.3 天。本研究從全台各地區63個養蜂場收集樣本，發現粒腺體血統86.4%為C型，13.6%為Z型，並完成宜蘭、台南、新竹、台中、彰化、花蓮和嘉義等七個地區的西方蜜蜂品系，共28蜂群的繼代繁殖。臺灣蜂產業面臨環境變遷與疾病挑戰，精子種原庫可保護基因多樣性，進一步透過育種提升蜜蜂的抗病力和生產效能，以提升蜂產業的調適能力與韌性，確保糧食安全與永續發展。

二、執行成果英文摘要：

This project aims to establish a sperm gene bank, develop honeybee sperm cryopreservation and thawing protocols, and establish honeybee artificial insemination techniques. The results showed that using fresh semen enabled queens to produce 99.5% fertilized eggs and maintain reproductive capacity for over three months. The fertilization success rate of cryopreserved sperm decreased with prolonged storage. Queens inseminated with sperm cryopreserved for 36 days produced approximately 80.4% fertilized eggs, while insemination with sperm stored for 200 days resulted in a fertilization rate of only 46.4%. Additionally, the lifespan of queens inseminated with cryopreserved sperm was 41.6 ± 15.0 days, significantly lower than the 89.4 ± 9.3 days observed in queens inseminated with fresh semen. This study collected samples from 63 apiaries across Taiwan and found that 86.4% of the samples belonged to the C mitochondrial lineage, while 13.6% belonged to the Z lineage. The study also completed the breeding of 28 honeybee colonies from seven regions: Yilan, Tainan, Hsinchu, Taichung, Changhua, Hualien, and Chiayi. As the Taiwanese beekeeping industry faces challenges from environmental changes and diseases, the establishment of a sperm gene bank will protect genetic diversity and enhance honeybee resistance and productivity through breeding. This will improve the adaptability and resilience of the beekeeping industry, ensuring food security and sustainable development.

三、計畫目的：

強化蜜蜂遺傳資源管理效率：建立長期冷凍精細胞影響蜂王產卵確效，並蒐集蜜蜂遺傳資源。

四、重要工作項目及實施方法：

1. 長期冷凍精子授精確效評估：



1131053



- (1) 冷凍保存蜜蜂精子：在春、秋蜂群旺盛季節，插入雄蜂脾讓蜂王整齊產卵，40天後捕捉成熟雄蜂採集精液，並利用前期計畫建立之冷凍流程凍存精子，保存高過2個月後再進行授精確效分析。
 - (2) 組織試驗蜂群：利用人工挑選1-2日齡幼蟲移入塑膠王杯，10天後將成熟王台介入無蜂王蜂群，蜂王出台後形成試驗蜂群。
 - (3) 人工授精：冷凍精子以25℃水浴30秒快速解凍，以6,000 rpm(MySPIN 6 Mini, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA.)15秒移除冷凍液，重複4次直到完全移除，冷凍精子以保護液(Hopkins and Herr, 2010)懸浮製成精子液於室溫備用。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)，蜂王出台後6-10日內進行人工授精，第一次處理後間隔24小時再進行第二次處理，以確保提供精子數量達 10^7 以上。處理後蜂王接回原蜂群，7-10天後觀察蜂王產卵。
 - (4) 蜂王產受精卵確效：西方蜜蜂受精卵發育為工蜂或蜂王，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)，蜂卵外觀難以辨識是否為受精卵，故本研究調查幼蟲發育至蛹期，觀察蛹期封蓋型態判斷為工蜂(a)或雄蜂(b)。蜂王產卵2-3週達穩定狀態後，在蛹脾中央取20cmx10cm的調查區，先調查蜂王產卵量，幼蟲孵化進入蜂改蛹期後再調查受精卵率 $=a/(a+b) \times 100\%$ 。
2. 保存蜜蜂遺傳資源：本計畫已蒐集宜蘭、花蓮、台中、台南、新竹、嘉義與彰化等7個蜜蜂地方品系，利用春、秋蜂群旺盛季節以傳統田間方式繼代蜂群，每品系至少3群。本計畫與本場執行之與「耐病蟲害高產蜜西洋蜂種選育」計畫協力，進行年度採蜜量調查與清潔力調查後選擇優良蜂群生產雄蜂，再依前述方法採集蜜蜂精液與冷凍液在室溫混和，以0.5mL冷凍管儲放在冷凍盒(BioCision, LLC, CA, USA)，冷凍盒降溫速率為1℃/分鐘，移入4℃冷卻2小時再移入-80℃儲放。

五、結果與討論：

結果：

1. 蜜蜂精子冷凍保存確效：為建立蜜蜂精子種原庫，本計畫建立西方蜜蜂人工授精技術，表一為本研究使用新鮮蜜蜂精液，可使蜂王產99.5%受精卵，並能存活約3個月，又分別以冷凍36天、58天、136天與200天的精子人工授精處理蜂王，36天處理組豐厚平均產80.4%受精卵，保最佳蜂王產100%受精卵；58天處理組平均產48.7%受精卵，表現最佳蜂王產73.5%受精卵；136天處理組平均產52.6%受精卵，表現最佳蜂王產100%受精卵；200天處理組平均產46.4%受精卵，表現最佳產80.1%受精卵，顯示精子授精確效隨延長冷凍期逐漸降低。
2. 蜂王壽命：表二為分別以新鮮精液與冷凍精子人工授精處理蜂王，新鮮精液處理可維持 89.4 ± 9.3 壽命並可持續產受精卵，但冷凍精子組蜂王壽命僅 41.6 ± 15.0 天，顯著低於新鮮精液處理。
3. 蜜蜂遺傳資源保存：本計畫收集宜蘭、台南、新竹、台中、彰化、花蓮與嘉義共7個地方品系，並完成年度繼代繁殖共28群(表三)，並與「耐病蟲害高產蜜西洋蜂種選育」計畫協力合作，利用液態氮冷凍殺死封蓋蛹方法，篩選清潔力強的蜂群，並採集雄蜂精液以液態氮冷凍保存(圖一)。本計畫冷凍保存蜜蜂精子以建立蜜蜂精子種原庫保存蜜蜂遺傳資源，亦提供研究冷凍精子保存確效之研究。
4. 西方蜜蜂粒腺體血統研究：表四利用限DraI、BglIII、HinfI、EcoRI和HincII制酶切位分析西方蜜蜂粒腺體DNA，可分為非洲(A)、西歐(M)、東南歐(M)與中東(O)等地理種原，其中O種原有可區分C和Z血統(Engel, 1999; Meixner et al., 2013)。本研究從全台北各地、中、南、東各地區收集63個蜂場蜜蜂樣本，發現86.4%為粒腺體血統為C型，



1131053



13.6%為Z型(圖二A)，其中北部20個樣本有2個Z型；中部15個樣本有2個Z型；南部12個樣本有4個C型，東部16個樣本均為C型。

討論：

1. 蜜蜂冷凍保存精子授精確效評估：本研究為建立蜜蜂精子種原庫，建立蜜蜂人工授精流程，可克服蜜蜂傳統田間繁殖無法紀錄父系譜系的缺點，並進一步建立蜜蜂精子冷凍保存與解凍流程，可使用冷凍精子使豐厚產下受精卵，有提升蜜蜂遺傳資源保存與異地交流潛力。冷凍蜜蜂精子的研究，從Harbo (1977)嘗試以液態氮保存精子48小時，但未能使蜂王產下受精卵，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)研究冷凍精子人工授精蜂王，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200天平均產46.4%受精卵，表現最佳蜂王產80.1%受精卵與前述研究結果相近。然而，冷凍精子授精確效不可避免地隨延長冷凍期而降低，使用冷凍精子人工授精蜂王，明顯降低蜂王壽命，因此，蜜蜂冷凍保存精子不宜替代傳統田間繁殖，但能提供育種者建立利用遺傳資源交流，例如引入精子種原或依優良親本性狀建立特定雜交組合。
2. 蜜蜂冷凍保存精子更新週期：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，年輕蜂王體內 ROS(Reactive oxygen species)低於超過1年蜂王，顯示代謝氧化壓力的能力與機制會影響蜂王壽命(Corona et al., 2016; Gonzalez et al., 2018)。本計畫112年的研究指出解凍精子活性約 72%，估計有28%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，縮短冷凍精子處理的蜂王的壽命，同時處理後蜂王存活率亦低於新鮮精液處理(資料未呈現)。蜜蜂生殖方式是蜂王交尾後將精子儲存於體內儲精囊，並提供終身1-2年產下受精卵所需精子，在外界蜜粉源充足，氣候溫暖的繁殖季節，蜂王每天約能產1000個卵(Al-Lawati et al., 2009)。陳(2023)研究指出，蜜蜂人工授精至少提供 $(4.5 \pm 1.2) \times 10^6$ 精細胞，並確保儲精囊儲有 $(4.3 \pm 2.2) \times 10^4$ 以上精子，才能維持約60%的受精卵率。蜂王生殖相比豬、牛等脊椎畜產動物每胎僅產下少量子代，且母體可重複授精多胎妊娠，蜂王僅能人工授精處理一次，開始產卵後，卵粒從生殖孔排出，將無法再次從生殖孔注入精子。此外，蜂王羽化即使無法順利交尾，14-20日齡亦會排卵並產下未受精卵。因此，完成蜂王人工授精需要掌握精子的數量、活動力與蜂王齡期等條件。表一顯示蜜蜂精子冷凍7個月會降低50%的授精確效，顯示長期在液態氮保存，仍會影響精子活性與活動力，為確保冷凍精子效用，建議每半年更新精子種原。
3. 臺灣西方蜜蜂粒線體血統分析：粒線體為母系遺傳，西方蜜蜂粒線體血統依據地理起源，可分為源自非洲的A型；歐洲西部的M型；歐洲東南的C型；中東的O型；從O型中再分離的次群Z型(Alburaki et al., 1999; Frank et al., 1998; Gupta, 2014; Ruttner, 1988)。西方蜜蜂約在1911年日據時期引進臺灣，其產蜜與蜂王漿等經濟特性遂成為養蜂業主要飼養蜂種，本場曾於1991年自夏威夷引進歐洲黑蜂和義大利蜂蜂(陳，2008)，1997年自中國大陸引進意大利蜂5品系、黑色種的卡尼鄂拉蜂2品系與喀爾巴阡蜂1品系(林與吳，2000)，但當時未進行粒線體血統分析，直到Wu等(2016)調查臺灣養蜂場，顯示發現臺灣西方蜜蜂87%粒線體血統屬於C型，13%屬於Z型，顯示C與Z型蜂種適應台灣氣候環境，亦可能是蜂農飼養偏好長期汰選結果。西方蜜蜂粒線體血統C型為義大利與高加索品系，Z型為敘利亞、伊拉克中東地區品系(Utzeri et al., 2022; Ruttner, 1988)。蜜蜂繁殖是一妻多夫制，因此蜂群的二倍體工蜂與蜂王每世代因染色體組合具有遺傳多樣性，粒線體血統分析僅為探討母系遺傳地理起源，是否能代表蜜蜂



1131053



基因遺傳的多樣性仍須要進一步研究，但本研究結果可作為技術輔導單位教育蜂農養蜂之參考，避免僅從少數表現優良的蜂群培育下一代蜂王，選擇複數蜂群留種培育下一代蜂王可減少多樣性流失的風險，同時未來種原蒐集，可須區分為粒線體血統，以及與「耐病蟲害高產蜜西洋蜂種選育」計畫協力合作，篩選並保留高產蜜與清潔力優良之蜂群精子種原，以建構具功能性的蜜蜂精子種原庫。

六、結論：

本計畫為建置蜜蜂精子種原庫，分別段建立(1)大量採集雄蜂精液流程與篩許短期保存精細胞緩衝液最佳配方；(2)建立蜜蜂精子冷凍與解凍流程，解凍後蜜蜂精子約能維持72%活性；(3)導入蜜蜂人工授精技術，分別以蜜蜂新鮮精液與冷凍精子處理蜂后，均可使蜂后產下受精卵；(4)調查蜜蜂粒線體血統，86.4%C型，13.6%為Z型，未來可分為粒線體血統與採蜜量或清潔力等功能性指標進行種原蒐集，以建構多樣性精子種原庫，達到保存蜜蜂遺傳多樣性與提供育種資源等目的。

七、參考文獻：

1. 林俊彥、吳登楨。1997。中國大陸養蜂技術交流訪問及引種。蠶蜂業專訊，21。
2. 陳吉同。2008。引進之兩蜜蜂品種與本省蜂種之比較。苗栗區農情月刊，4。
3. 陳本翰。2023。西方蜜蜂人工授精效益之研究。苗栗區農業改良場研究彙報，12：43-58。
4. Al-Lawati, H., Kamp, G., & Bienefeld, K. (2009). Characteristics of the spermathecal contents of old and young honeybee queens. *Journal of Insect Physiology*, 55(2), 117-122.
5. Alburaki, M., Moulin, S., Legout, H., Alburaki, A., & Garnery, L. (2011). Mitochondrial structure of Eastern honeybee populations from Syria, Lebanon and Iraq. *Apidologie*, 42(5), 628-641.
6. Cobey, S. W., Tarpy, D. R., & Woyke, J. (2013). Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-18.
7. Engel, Michael S. (1999). The Taxonomy of Recent and Fossil Honey Bees (Hymenoptera: Apidae; Apis). *Journal of Hymenoptera Research*, 8(2):165-196.
8. Harbo, J. R. (1977). Survival of honey bee spermatozoa in liquid nitrogen1. *Annals of the Entomological Society of America*, 70(2), 257-258.
9. Hopkins, B. K., Herr, C., & Sheppard, W. S. (2012). Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(8), 1079.
10. Franck, P., Garnery, L., Solignac, M., & Cornuet, J.-M. (1998). The origin of west european subspecies of honeybees (*apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*, 52(4), 1119-1134



1131053



11. Corona, M., Hughes, K. A., Weaver, D. B., & Robinson, G. E. (2005). Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(11), 1230-1238.
12. Gupta, R.K. (2014). Taxonomy and distribution of different honeybee species. In: *Beekeeping for Poverty Alleviation and Livelihood Security*, 1, 63-103.
13. Gül, A., ahinler, N., Onal, A. G., Hopkins, B. K., & Sheppard, W. S. (2017). Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility. *Theriogenology*, 101, 109-113.
14. Gonzalez, A. N., Ing, N., & Rangel, J. (2018). Upregulation of antioxidant genes in the spermathecae of honey bee (*Apis mellifera*) queens after mating. *Apidologie*, 49(2), 224-234.
15. Meixner, M. D., Pinto, M. A., Bouga, M., Kryger, P., Ivanova, E., & Fuchs, S. (2013). Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-28.
16. Ruttner, F. (1988). *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Springer.
17. Ratnieks, F. L. W., & Keller, L. (1998). Queen control of egg fertilization in the honey bee. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 44(1), 57-61.
18. Wegener, J., May, T., Kamp, G., & Bienefeld, K. (2014). A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology*, 69(2), 236-242.
19. Wu, M.-C., Lu, T.-H., & Lu, K.-H. (2016). PCR-RFLP of mitochondrial DNA reveals two origins of *Apis mellifera* in Taiwan. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(5), 1069.
20. Utzeri, V. J., Ribani, A., Taurisano, V., & Fontanesi, L. (2022). Entomological authentication of honey based on a DNA method that distinguishes *Apis mellifera* mitochondrial C mitotypes: Application to honey produced by *A. m. ligustica* and *A. m. carnica*. *Food Control*, 134, 108713.





表一、冷凍保存精子的週期影響蜂王產受精卵率

Table1、The period of cryopreserved sperm affects queen bees to lay fertilized eggs.

Inseminated spermatozoa	Code of queen bee	Percentage of worker cap (%)
Fresh semen	1	100.0
	2	98.0
	3	100.0
	4	100.0
Cryopreserved spermatozoa for 36 days	1	100.0
	2	100.0
	3	100.0
	4	2.0
	5	100.0
Cryopreserved spermatozoa for 58 days	1	54.5
	2	73.5
	3	9.1
Cryopreserved spermatozoa for 136 days	1	18.4
	2	39.4
	3	100
Cryopreserved spermatozoa for 200 days	1	31.8
	2	27.4
	3	80.1

表二、人工授精蜂王壽命紀錄

Table2、Lifespan records of inseminated queens.

source	Inseminated queen bees		Prob(t) ^y
	Fesh semen	Cryopreserved spermatozoa	
Longevity (days)	89.4 ± 9.3 ^x (n=12)	41.6 ± 15.0 (n=7)	<0.05

^x Means ± standard errors.

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





表三、臺灣蜜蜂地方品系繼代繁殖數量

Table 3. Number of subculture colonies of local honey bee strains.

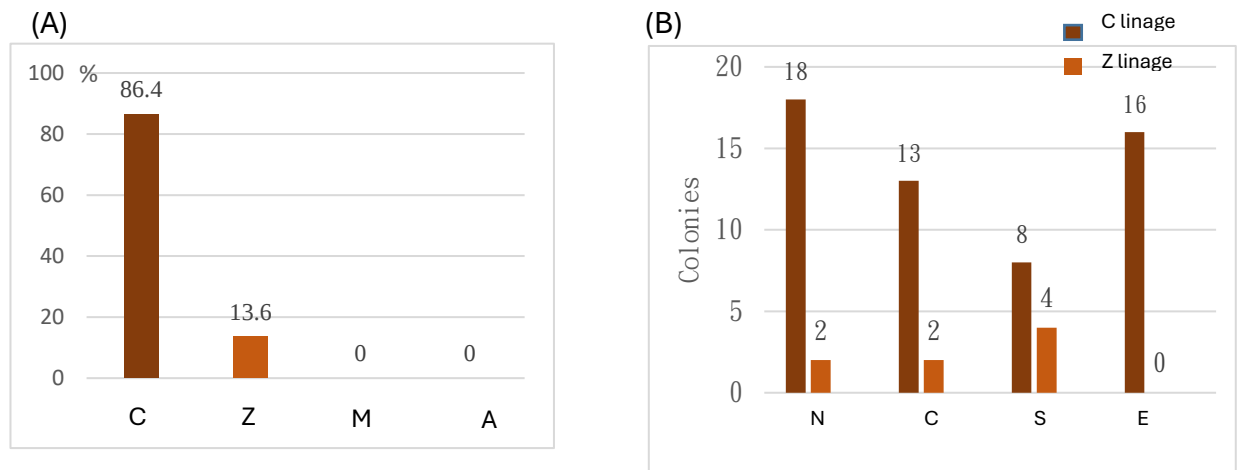
Strains of Taiwan local honeybee	Number of subculture bee colonies
Yilan strain	4
Tainan strain	5
Hsinchu strain	3
Taichung strain	4
Changhua strain	5
Hualien strain	4
Chiayi strain	3

表四、西方蜜蜂(*Apis mellifera*)粒腺體血統(M、A、C、O)的限制酶切位

Table4. Restriction enzyme cutting sites in the mitochondrial lineage (M、A、C、O)of western honeybee (*Apis mellifera*).

Mitochondrial genes	Restriction enzymes	Lineages of <i>A. mellifera</i>		
		M	A	C
tRNA ^{leu} -COII	<i>DraI</i>	+	+	+
	<i>BglII</i>	+	-	+
Cyt b	<i>HinfI</i>	+	+	-
	<i>EcoRI</i>	-	-	+
Ls rRNA	<i>HinCII</i>	+	-	-





圖二、臺灣蜂群粒腺體血統調查。(A)63 個樣蜂群樣本 86.4%為 C 型，13.6%為 Z 型。(B)各地區蜂群粒線體血統百分比，N：來自新北市、新竹縣、苗栗縣蜂群；C：樣本來自台中市、雲林縣、彰化縣蜂群；S：樣本來自嘉義縣、台南市、屏東縣與高雄市蜂群；E：樣本來自宜蘭縣與花蓮縣蜂群。

Fig. 2 Survey of mitochondria lineages in Taiwan honey bee (*A. mellifera*) colonies. (A) The percentages of mitochondria C and Z lineage is 86.4% and 13.6% in 63 colony samples were 86.4% and 13.6% respectively. (B) The percentages of mitochondria C and Z lineages in northern, central, southern and eastern Taiwan. N : Samples were collected from New Taipei city, and Hsinchu and Miaoli counties. C : Samples from Taichung City and Yunlin, Changhua counties. S : Samples from Tainan and Kaohsiung cities, Chiayi and Pingtung counties. E : Samples from Yilan and Hualien counties.

