

西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 精子保存品質之研究

陳本翰*、黃子豪

行政院農業委員會苗栗區農業改良場

摘 要

西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 是臺灣蜂產業主要經濟蜂種，也是農糧產業重要的授粉昆蟲。蜜蜂繁殖是蜂后與多隻雄蜂空中交尾，無法建立父系品系譜，並且在同一蜂場可能近親交配增加選育優質蜂種的困難，因此蜂產業需發展人工授精以提升育種效率。精子保存是發展人工授精的關鍵，本研究探討精子稀釋液與溫度對精子保存的影響。研究結果顯示，蜜蜂精子體外保存適合溫度為 10~20°C。本研究篩選稀釋液 E 保存蜜蜂精子 72 小時維持 81.3±3.5% 存活率為最佳配方，保存性顯著優於其他稀釋液；以鏡檢評分精子活動力，發現懸浮在稀釋液 D、E 的精子，活動力指數為 2.37~3.49，顯著優於懸浮在其他稀釋液。依據精子存活率與活動力試驗結果，選擇 3 種稀釋液與 DMSO 配製成冷凍液試驗精子液態氮保存確效，保存 7 天後存活率最高為 62.4±5.6%。後續以提升冷凍保存確效為研究目標，研究結果可供臺灣蜂產業發展以人工授精培育蜂后之基礎。

關鍵詞：西方蜜蜂、精子保存、精子存活率、人工授精、精子稀釋液

前 言

臺灣西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 所生產的產品產值約 23 億元新臺幣，蜜蜂授粉對農作物產值約達 200 億至 300 億元新臺幣 (陳及張, 2017)，是維持農糧生產不可缺少的授粉昆蟲。在美洲、歐洲地區發生蜂群崩解症 (colony collapse disorder, CCD) (van Engelsdorp *et al.*, 2009)，蜂群大量消失使得蜜蜂健康成為全世界糧食

*論文聯繫人

e-mail: BanHen@mdais.gov.tw

安全的重要議題。研究指出，蜂群崩解症是由氣候變遷、寄生蟎危害、疫病發生、農藥等複合因素引起 (Simon-Delso *et al.*, 2014; vanEngelsdorp *et al.*, 2009)。為降低氣候變遷與病蟲害威脅，農糧產業將抗性育種視為提升調適能力維持生產的重要策略 (Okada *et al.*, 2017; Oladosu *et al.*, 2019)，傳統育種仰賴雜交組合以選育優良子代，豐富的遺傳資源是選育優勢子代的重要基礎，國際上有 IRRI (International rice research institute)、CIMMYT (International maize and wheat improvement center) 等機構保存豐富的稻米、小麥品系種子並選育出高產、抗逆境品系 (Peng and Khush 2003; Gourdjji *et al.*, 2013)。畜禽業利用人工授精選育優質畜產動物，並以冷凍卵及精細胞保存家畜動物遺傳物質，以保護遺傳多樣性 (Leroy *et al.*, 2019; Sadeghi *et al.*, 2020)，具有提供親本基因選擇與減少保種飼育空間等優點。蜜蜂自然繁殖是蜂后與多隻雄蜂空中交尾 (Bastin *et al.*, 2017)，無法建立父系譜系與無法避免近親交尾的特性使蜂種選育費時耗工，若改以人工授精則可提升育種效率 (Hopkins *et al.*, 2012)。

精子保存是人工授精的關鍵，精子體外活性易受環境影響 (Mohamed *et al.*, 2012; Thijssen *et al.*, 2014)，需要保存在稀釋液以維持細胞滲透壓、提供細胞代謝能量並避免乾燥失去活性 (El-Shahat *et al.*, 2020; Parodi, 2014)。Ruttner (1976) 提出 Kiev solution 作為蜜蜂精子稀釋液可維持蜜蜂精子活性 (Ruttner, 1976)，亦有 Tris 緩衝液 (Rhodes, 2008)、TES 緩衝液 (Hopkins *et al.*, 2012) 與葡萄糖生理食鹽水等 (薛, 2016; Ruttner, 1976) 為基礎的相關研究用以保存蜜蜂精子。近年來研究蜜蜂精液發現含有豐富的蛋白質滋養精細胞成熟 (Collins *et al.*, 2006)，並有過氧化氫酶減少精子氧化損傷 (Gonzalez *et al.*, 2018)。依據蜜蜂精液特性，利用 EDTA、海藻糖、胺基酸等研究蜜蜂精子稀釋液，維持精細胞滲透壓與提供代謝能量 (Hopkins *et al.*, 2010; Rajamohan *et al.*, 2020)，以及利用過氧化氫酶減少細胞氧化損傷 (Taylor *et al.*, 2009)。

臺灣蜂產業目前仍以自然繁殖繼代飼養，需要長時間篩選以育成優質蜂種，為因應急遽的氣候變遷，需要發展人工授精提高選育效率。建立蜜蜂精子短期及長期保存方法是進行人工授精的重要關鍵，本研究目的在探討精子稀釋液配方與溫度對

蜜蜂精子活性之影響以及蜜蜂精子冷凍保存後活性確效，以作為臺灣蜂產業蜜蜂人工授精技術與遺傳資源保存之基礎。

材料與方法

一、蜜蜂精子採集及稀釋液配製

試驗蜂群飼養在苗栗區農業改良場(苗栗縣公館鄉)。本研究利用雄蜂脾讓蜂后大量生產雄蜂，羽化後進行標記。精液採集是捕捉 14~20 日齡雄蜂，固定後壓碎胸節再輕壓腹部使生殖器外翻，以玻璃毛細管採集生殖器末端黃褐色精液，並保存在高壓滅菌後的蜜蜂精子稀釋液，本研究使用稀釋液成分如表一。

表一、蜜蜂精子稀釋液成分

Table 1. The components of semen diluents in this study

Diluent	Concentration	Reference
A	273.8mM Sodium chloride, 26.8mM potassium chloride, 33.3mM glucose	薛, 2016
B	1.9 M Sodium chloride, 55.5mM glucose, 404.4mM Tris aminomethane (Base7~9), 95.2mM Tris aminomethane hydrochloride, 2.6mM L-arginine, 6.8 mM L-lysine	Rhodes, 2008
C	82.2mM Sodium citrate, 24.9mM sodium bicarbonate, 5.3mM potassium chloride, 16.7mM glucose, 1.7mM sulfanilamide	Ruttner, 1976
D	82.2mM Sodium citrate, 24.9mM sodium bicarbonate, 5.3mM potassium chloride, 0.8mM amoxicillin, 0.02%w/v catalase	Taylor <i>et al.</i> , 2009
E	30mM TES free acid, 1mM disodium hydrogen phosphate, 1.1mM sodium citrate, 82mM potassium chloride, 82.9mM Sodium chloride, 5mM sodium bicarbonate, 10μM ethylenediaminetetraacetic acid, 1.5mM penicillin, 0.7mM streptomycin, 1.2mM kanamycin, 34.9μM tylosin, 2.6mM arginine, 4.3mM proline, 0.002%w/v BSA, 0.1mM glycine, 0.002%w/v catalase	Hopkins <i>et al.</i> , 2012
F	Components were same with diluent E and containing 16.7mM glucose	

二、蜜蜂精子保存及品質分析

- (一) 蜜蜂精子保存：蜜蜂精液採集後分別懸浮在稀釋液 A、B、C、D、E、F（蜜蜂精液：稀釋液 =1：99），分別保存在 4、10、15、20、25°C，72 小時後進行精子存活率檢測。
- (二) 存活率檢測：蜜蜂精子以 live/dead sperm staining kit（Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA.）進行螢光染色，以倒立式顯微鏡（Nikon Eclipse Ts2, Japan）200 倍記錄死亡精子與具活性精子數量，每處理 3 重複。
- (三) 活動力檢測：蜜蜂精液與稀釋液混和（蜜蜂精液：稀釋液 =1:99）後分別於 4、10、15°C 保存 24 小時，再利用血球計數盤（Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Germany）以光學顯微鏡（Zeiss ScopeA1, Japan）記錄蜜蜂精子活動力，活動力評分標準如表二。

表二、蜜蜂精子活動力評分標準

Table 2. Standard scores of mobile honey bee sperm

分 數	活動狀態	參考文獻
1	沒有移動	
2	精子鞭毛擺動 <50%	
3	精子鞭毛擺動 >50%，但無圓周運動或前進移動	Rhodes, 2008
4	精子鞭毛擺動 > 50%，但精子圓周運動或前進移動 < 50%	
5	精子圓周運動或前進移動 >50%	

三、蜜蜂精子冷凍保存

- (一) 冷凍液 CP1 及 CP2 為細胞冷凍保存液商品，冷凍保存哺乳動物細胞、幹細胞、組織等（Shimazu *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2020），為本試驗對照試劑。CP1 為 STEM-CELLBANKER[®]（Zenoaq resource CO., LTD., FKS, Japan）；CP2 為 NutriFreez[®] D10（Biological Industries, CT, USA）。冷凍液 CP3 及 CP4 分別為利用精子稀釋液 C 配製含有 10% 及 15% DMSO（Dimethyl

sulfoxide) 之冷凍液。冷凍液 CP5、CP6 分別為利用精子稀釋液 D 配製含有 10% 及 15% DMSO (Dimethyl sulfoxide) 之冷凍液。冷凍液 CP7 及 CP8 分別為利用精子稀釋液 E 配製含有 10% 及 15% DMSO 之冷凍液。

(二) 冷凍與解凍流程：蜜蜂精液與冷凍液混和 (蜜蜂精液：冷凍液=1:9) (Taylor *et al.*, 2009)，在室溫以 0.5mL 冷凍管儲放在冷凍盒 (BioCision, LLC, CA, USA)。蜜蜂精液以冷凍盒從室溫移入 4°C 保存 1 小時，冷凍盒降溫速率為 1°C / 分鐘，再移入 -65°C 儲放 24 小時後移入液態氮內 7 天。蜜蜂精液樣本從液態氮取出以 30°C 乾浴槽 30 秒快速解凍，再利用 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。

四、統計分析

- (一) 蜜蜂精子存活率分析：所得數據經過角度轉換以 SAS Enterprise Guide 7.1 進行 ANOVA 分析，處理組差異以 LSD (Fisher's protected least significant difference test) 進行比較 ($P < 0.05$)。
- (二) 蜜蜂精子活動力分析：蜜蜂精子活動力評分以 IBM SPSS statistics 25.0 進行 Kruskal-Wallis 檢定，處理組差異以 Dunn's multiple comparison test 進行比較 ($P < 0.05$)。

結 果

一、蜜蜂精子品質分析

(一) 不同稀釋液對蜜蜂精子保存之影響：本試驗為探討稀釋液以及體外溫度對蜜蜂精子保存的影響，表三為蜜蜂精子保存 72 小時之存活率，蜜蜂精子以稀釋液 E 保存在 4~20°C 有 70~80% 存活率，以稀釋液 A、B 保存在 4~15°C 有 70~80% 存活率；蜜蜂精子保存在稀釋液 C、D、F 存活率低於 56%，又以稀釋液 F 保存的精子衰退速度最快，48 小時存活率低於 60% (資料未呈現)，顯示稀釋液 A、B、E 有較好的保存性，顯著高於稀釋液 C、D、F。蜜蜂精子以任何配方保存在 25°C，存活率皆低於 25%，顯示短期保存之適

合溫度為4~20°C。Green and Fishel (1999) 指出異常精子有頭部膨大、縮小，鞭毛捲曲，雙鞭毛等形態 (Green and Fishel, 1999)。蜜蜂精子以稀釋液 A、B 在 4°C 保存 72 小時，可觀察到精細胞有頭部膨大現象 (圖一紅色箭頭所示)，蜜蜂精子以稀釋液 E 保存則無明顯形態異常 (圖一 D)，保持精細胞完整性。

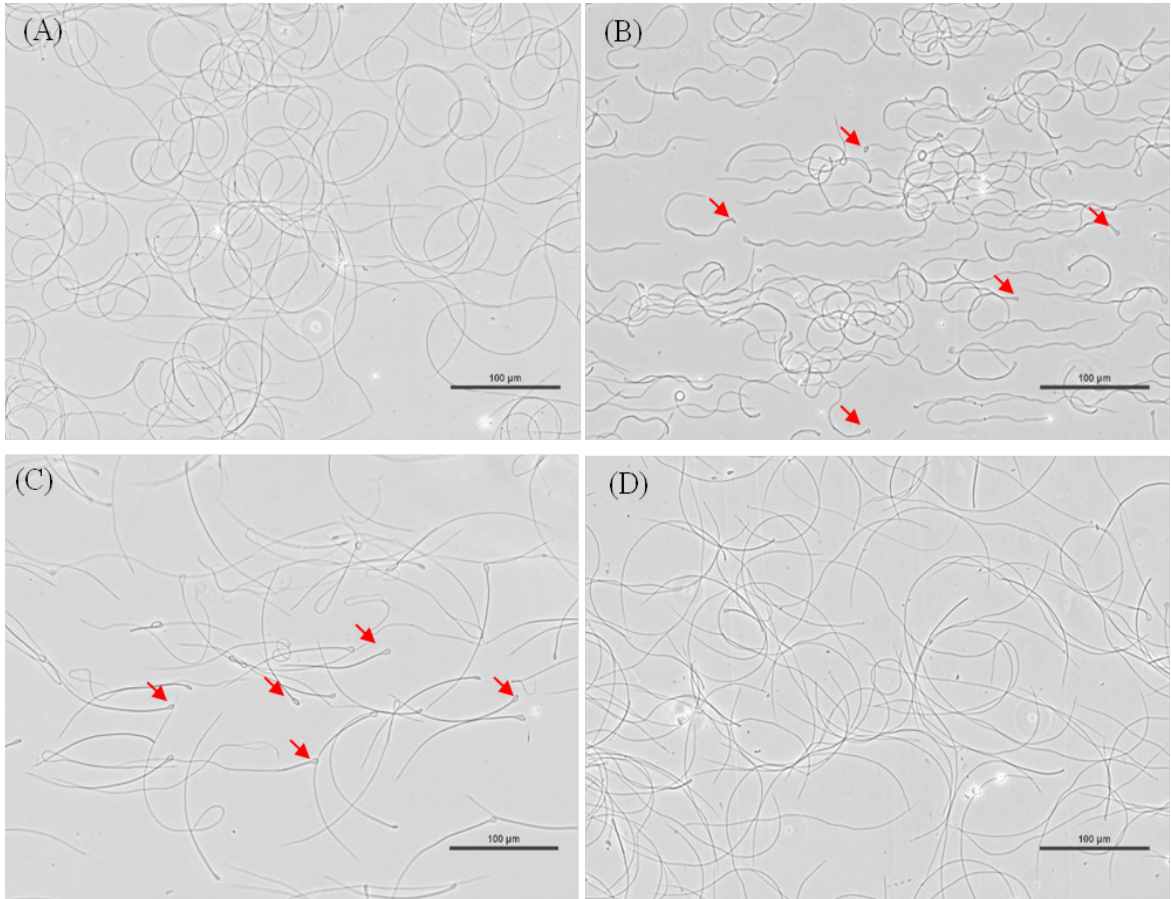
表三、稀釋液與溫度對蜜蜂精子保存 72 小時活性之影響

Table 3. The vital efficacy of honey bee sperm was suspended in diluents and preserved in different temperatures

Diluents	Temperature(°C)									
	4		10		15		20		25	
A	75±7.9	Aa	78.2±5.9	Aa	68.5±2.9	ABa	4.0±1.8	Cb	0±0	Ab
B	72.5±5.8	Aa	80.8±5.1	Aa	71.2±6.7	ABa	42.8±10.3	Bb	0±0	Ab
C	15.6±3.7	Ba	7.3±3.7	Cb	13.1±7.6	Ca	24.9±4.7	Ca	0±0	Ab
D	30.8±14.6	Ba	37.2±18.6	Ba	28.6±14.1	Ca	14.4±12.7	Ca	6.7±6.7	Aa
E	71.3±2.7	Ab	79.2±3.1b	Aa	81.3±3.5	Aa	79.4±1.1	Aab	22.4±2.5	Ac
F	34.0±6.0	Ba	56.9±14.3	ABa	53.1±2.8	Ba	3.2±3.2	Ca	7.5±4.8	Aa

Means and standard errors were represented in each column. The capital letters within vertical column were represented significance at the same temperature. The lowercase letters within horizontal column were represented significance in the same diluent. Means within each treatment followed by the same letter are not significantly different at 5% by Fisher's protected LSD test.

(二) 蜜蜂精子活動力檢測：蜜蜂精子以稀釋液 F 保存，活性衰退快，未再進行活動力檢測。蜜蜂精子以稀釋液 A、B、C、D、E 懸浮 24 小時後記錄活動力，每處理記錄 70 個以上蜜蜂精子。蜜蜂精子保存在稀釋液 D、E 活動力分數介於 2.7~3.2，優於稀釋液 A、B、C，以 Kruskal-Wallis 檢定具顯著差異 (表四)。另分析溫度對精子活動力的影響，稀釋液 A、B、C、D 保存的蜜蜂精子，溫度對活動力無明顯差異；稀釋液 E 保存於 15°C 的蜜蜂精子，活動力顯著優於保存在 4°C (表四)。



圖一、正常蜜蜂精子與保存在 4°C，72 小時之蜜蜂精子形態。(A) 正常精子。(B) 蜜蜂精子稀釋液 A 保存 4°C，72 小時。(C) 蜜蜂精子稀釋液 B 保存 4°C，72 小時。(D) 蜜蜂精子稀釋液 E 保存 4°C，72 小時。紅色箭頭為異常膨大的蜜蜂精子頭部。

Fig. 1. A light microscope was used to monitor the morphology of honey bee spermatozoa. Origin of honey bee spermatozoa was collected from ejaculated drones (A). Honey bee spermatozoa suspended in diluents A, B, C and preserved at 4 °C for 72 hours, denoted by (B), (C), (D) respectively. The red arrows were represented large head of abnormal spermatozoa.

表四、蜜蜂精子活動力評分表

Table 4. The motility of honey bee sperm was assessed by scores

Diluents	Temperature(°C)					
	4		10		15	
A	1.01±0.01	Ba	1.06±0.03	Ba	1.07±0.03	Ca
B	1.18±0.06	Ba	1.10±0.04	Ba	1.43±0.06	BCa
C	1.45±0.12	Ba	1.52±0.12	Ba	1.86±0.16	Ba
D	2.76±0.17	Aa	3.34±0.17	Aa	3.49±0.14	Aa
E	2.37±0.18	Ab	3.00±0.22	Aab	3.11±0.12	Aa

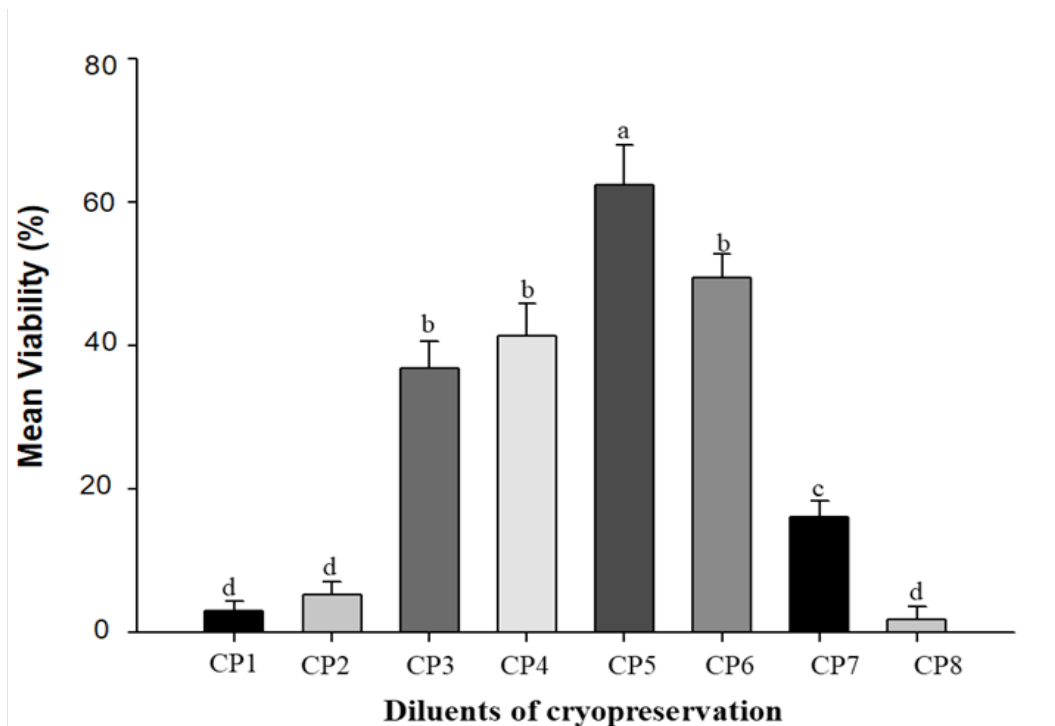
Means (n=70) and standard errors were represented in each column. The capital letters within vertical column were represented significance at the same temperature. The lowercase letters within horizontal column were represented significance in the same diluent. Means within each treatment followed by the same letter are not significantly different at 5% by Kruskal-Wallis test.

二、蜜蜂精子冷凍液保存確效分析

由存活率與活動力試驗發現，稀釋液 F 保存的蜜蜂精子衰退速度快，稀釋液 A、B 保存的蜜蜂精子活動力低，因此選擇稀釋液 C、D、E 為基礎配方再進行液態氮保存試驗。本試驗以 DMSO 為抗凍劑與稀釋液 C、D、E 再分別配製成含有 10%、15%DMSO 之試劑，以研究稀釋液配方與抗凍劑濃度組合之精子冷凍保存確效。試驗結果顯示，CP5 為利用稀釋液 D 配製含 10%DMSO 之冷凍液，蜜蜂精子解凍後具最高存活率 62.4±5.6%（圖二），高濃度 DMSO 無顯著增加精子冷凍保存活性。CP1、CP2 為冷凍保存商品，於本試驗中蜜蜂精子解凍後存活率低於 10%（圖二），不適用於冷凍保存蜜蜂精子。

討 論

稀釋液 E 是以 TES 緩衝液添加胺基酸與鹽類，有效維持精子活性與活動力，體外保存性優於本研究其他配方。蜜蜂利用胸節肌肉維持蜂巢核心溫度 32~35°C，保持蜂巢溫度恆定（Stabentheiner *et al.*, 2010），本研究蜜蜂精子體外適合保存溫度為



圖二、蜜蜂精子以液態氮保存 7 天後精子存活率。CP1：STEM-CELLBANKER® 產品 (ZENOAQ RESOURCE CO., LTD.)。CP2：NutriFreez® 產品 (Biological Industries)。CP3：精子稀釋液 C 包含 10%DMSO。CP4：精子稀釋液 C 包含 15%DMSO。CP5：精子稀釋液 D 包含 10%DMSO。CP6：精子稀釋液 D 包含 15%DMSO。CP6：精子稀釋液 E 包含 10%DMSO。CP7：精子稀釋液 E 包含 15%DMSO。

Fig. 2. Viability (means \pm standard error) of thawed honey bee sperm after cryopreserved in liquid nitrogen for 7 days. CP1: STEM-CELLBANKER® (ZENOAQ RESOURCE CO., LTD.). CP2: NutriFreez® (Biological Industries). CP3: Diluent C contain 10%DMSO. CP4: Diluent C contain 15%DMSO. CP5: Diluent D contain 10%DMSO. CP6: Diluent D contain 15%DMSO. CP6: Diluent E contain 10%DMSO. CP7: Diluent E contain 15%DMSO. Means within each diluents followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher,s protected LSD test.

低於蜂群核心溫度 10~20°C，與哺乳動物保存精子的研究相同 (Freitas-Dell' Aqua *et al.*, 2013; Thijssen *et al.*, 2014)，Thijssen 等人 (2014) 認為精子在體外保持在低溫環境，降低代謝速率呈現休息狀態，能減緩細胞衰退 (Thijssen *et al.*, 2014)。本研究篩選具潛力稀釋液配方與適合保存溫度，提供人工授精所需精子短期保存與運送參考。

精子的鞭毛運動與卵子結合的活化反應 (hyperactivation) 受陽離子 (Na^+ 、 K^+ 、 Ca_2^+) 調控，因此稀釋液需要維持陽離子濃度以增加人工授精的成功率 (Darszon *et al.*, 2007; Parodi, 2013)。蜜蜂生殖是交尾後，精子進入蜂后儲精囊，可維持 2 年以上活性 (Al-Lawati *et al.*, 2009)。蜜蜂受精卵發育雌性工蜂或蜂后，未受精卵則發育為雄蜂 (Ratnieks and Keller, 1998)。Gül 等人 (2017) 發現蜂后儲精囊儲存精子濃度低時會增加未受精卵生產 (Gül *et al.*, 2017)。本研究發現稀釋液 D 及 E 短時間保存 (24 小時) 的蜜蜂精子活動力優於其他保存配方，但配方對精子進入儲精囊的影響仍需進一步研究。

哺乳動物研究利用 DMSO 與甘油冷凍保存精子，避免細胞內水分子因低溫凝成冰晶造成冷凍傷害 (Hall *et al.*, 2017; Villaverde *et al.*, 2013)，亦有研究指出牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 可提高精子冷凍保存確效 (Ugur *et al.*, 2019)。Hokins and Herr (2010) 及 Taylor 等人 (2009) 發現以 DMSO 冷凍蜜蜂精子比使用甘油冷凍存活率高約 20~30%，顯示 DMSO 適合用於冷凍蜜蜂精子 (Hokins and Herr, 2010; Taylor *et al.*, 2009)。為建立蜜蜂精子長期保存技術，本研究利用不同稀釋液與不同濃度 DMSO 組合探討蜜蜂精子冷凍保存確效，以 CP5 配方保存蜜蜂精子最佳，解凍存活率 62.4%，與 Talyor 等人研究結果精子解凍後存活率達 60~65% 結果相似 (Talyor *et al.*, 2009)，增加 DMSO 濃度未能提高蜜蜂精子解凍後存活率的結果，與 Hokins and Herr (2010) 研究結果相似 (Hokins and Herr, 2010)。研究指出，調整冷凍流程減少細胞內冰晶形成，以及調整冷凍液配方減少細胞內自由基氧化傷害，能提升精子冷凍保存確效 (Ugur *et al.*, 2019)。本研究蜜蜂精子在冷凍及解凍過程損失約 40% 精子活性，未來應進一步研究蜜蜂精子冷凍流程，或研究冷凍液配方以提高蜜蜂精子解凍後存活率。

結 論

本研究顯示稀釋液 E 對蜜蜂精子具良好保存性，適合保存溫度範圍在 10~20°C 間，提供蜜蜂精子短期保存與運送之條件。另本研究篩選之精子冷凍液，能維持蜜蜂精子液態氮保存 7 天後 62.4% 活性，可作為臺灣發展蜜蜂精子長期保存與人工授精之研究基礎。

引用文獻

- 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。
- 薛運波。2016。蜜蜂人工授精技術。北京農業出版社。第 6 章。
- 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):117-122.
- Bastin, F., H. Cholé, G. Lafon, and JC. Sandoz. 2017. Virgin queen attraction toward males in honey bees. *Sci Rep.* 7(1):6293.
- Collins, A. M., T. J. Caperna, V. Williams, W. M. Garrett, and J. D. Evans. 2006. Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating. *Insect Mol. Biol.* 15(5):541-549.
- Darszon, A., C. L. Treviño, C. Wood, B. Galindo, E. Rodríguez-Miranda, J. J. Acevedo, E. O. Hernandez-González, C. Beltrán, P. Martínez-López, and T. Nishigaki. 2007. Ion channels in sperm motility and capacitation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65:229-244.
- 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.
- Freitas-Dell'Aqua, C. d. P., G. A. Monteiro, J. A. Dell'Aqua, and F. O. Papa. 2013. The effects of refrigeration temperature and storage time on apoptotic markers in equine semen. *J. Equine Vet. Sci.* 33(1):27-30.
- Green, S., and S. Fishel. 1999. Morphology comparison of individually selected hyperactivated and non-hyperactivated human sperm. *Hum. Reprod.* 14(1):123-130.
- Gourdji, S. M., K. L. Mathews, M. Reynolds, J. Crossa, and D. B. Lobell. 2013. An assessment of wheat yield sensitivity and breeding gains in hot environments. *Proc. R. Soc. B* 280(1752):20122190.
- 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.
- 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.

- Hopkins, B. K., and C. Herr. 2010. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) sperm. *Apidologie* 41:548-556.
- 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.
- Hall, S. E., C. Negus, D. Johnke, and R. Bathgate. 2017. Adjusting cryodiluent composition for improved post-thaw quality of rabbit spermatozoa. *PLoS One* 12(4):e0175965.
- Jiang, X., C. C. Baucom, and R. L. Elliott. 2020. Mitochondria dynamically transplant into cells *in vitro* and in mice and rescue aerobic respiration of mitochondrial DNA-depleted motor neuron NSC-34. *J. Biomed. Eng.* 13(9):203-221.
- Leroy, G., P. Boettcher, B. Besbes, C. Danchin-Burge, R. Baumung, and S. J. Hiemstra. 2019. Cryoconservation of animal genetic resources in Europe and two African countries: A Gap Analysis. *Diversity* 11(12):240.
- Mohamed, J., M. N. Ismail, T. Y. Chou, S. R. Louis, and S. B. Budin. 2012. A study of sperm quality characteristics changes in different storage temperatures above freezing point. *Int. J. Collab. Res. Intern. Med. Public Health* 4(5):736-743.
- Okada, Y., A. Kobayashi, H. Tabuchi, and T. Kuranouchi. 2017. Review of major sweet potato pests in Japan, with information on resistance breeding programs. *Breed Sci.* 67(1):73-82.
- Oladosu, Y., M. Y. Rafii, C. Samuel, A. Fatai, U. Magaji, I. Kareem, Z. S. Kamarudin, I. Muhammad, and K. Kolapo. 2019. Drought resistance in rice from conventional to molecular breeding: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 20(14):3519.
- Peng, S., and G. Khushg. 2003. Four decades of breeding for varietal improvement of irrigated lowland rice in the International Rice Research Institute. *Plant Prod. Sci.* 6(3):157-164.
- Parodi, J. 2014. Motility, viability, and calcium in the sperm cells. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 60:65-71.
- Ruttner, F. 1976. *The Instrumental Insemination of the Queen Bee*. Apimondia Publishing House Bucharest.
- Ratnieks, F. L. W., and L. Keller. 1998. Queen control of egg fertilization in the honey Bee. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 44(1):57-61.
- Rhodes, J. W. 2008. *Semen production in drones honey bees*. Rural Industries Research and development Corporation. Canberra, ACT, Australia.

- Rajamohan, A., R. G. Danka, B. K. Hopkins, and J. P. Rinehart. 2020. A non-activating diluent to prolong in vitro viability of *Apis mellifera* sperm: Effects on cryopreservation and on egg fertilization. *Cryobiology* 92:124-129.
- Stabentheiner, A., H. Kovac, and R. Brodschneider. 2010. Honeybee colony thermoregulation--regulatory mechanisms and contribution of individuals in dependence on age, location and thermal stress. *PLoS One* 5(1):e8967.
- Simon-Delso, N., G. S. Martin, E. Bruneau, L. A. Minsart, and C. Mouret. 2014. Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. *PLoS ONE* 9(7):e103073.
- Shimazu, T., Y. Mori, A. Takahashi, H. Tsunoda, A. Tojo, and T. Nagamura-Inoue. 2015. Serum- and xeno-free cryopreservation of human umbilical cord tissue as mesenchymal stromal cell source. *Cytotherapy* 17(5):593-600.
- Sadeghi, S., R. D. Gallego, B. García-Colomer, E. A. Gómez, J. L. Yániz, J. Gosálvez, C. López-Fernández, and M. A. Silvestre. 2020. Effect of sperm concentration and storage temperature on goat sperm during liquid storage. *Biology* 9(9):300.
- Taylor, M. A., E. Guzmán-Novoa, N. Morfin, and M. M. Buhr. 2009. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with elected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology* 72(2):149-159.
- Thijssen, A, E. Klerkx, C. Huyser, E. Bosmans, R. Campo, and W. Ombelet. 2014. Influence of temperature and sperm preparation on the quality of sperm. *Reprod. Biomed. Online* 28(4):436-442.
- Ugur, M. R., A. S. Abdelrahman, H. C. Evans, A. A. Gilmore, M. Hitit, R. I. Arifiantini, B. Purwantara, A. Kaya, and E. Memili. 2019. Advances in cryopreservation of bull sperm. *Front Vet. Sci.* 6:268.
- van Engelsdorp, D., J. D. Evans, C. Saegerman, C. Mullin, E. Haubruge, B. K. Nguyen, M. Frazier, J. Frazier, D. Cox-Foster, Y. Chen, R. Underwood, D. R. Tarpy, and J. S. Pettis. 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS ONE* 4(8):e6481.
- Villaverde, A. I. S. B., E. G. Fioratti, M. Penitenti, M. R. V. Ikoma, M. H. Tsunemi, F. O. Papa, and M. D. Lopes. 2013. Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on domestic cat spermatozoa. *Theriogenology* 80:730-737.

Study on the preservation quality of honey bee (*Apis mellifera*) sperm

Pen-Han Chen*, Zih-Hao Huang

Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan

ABSTRACT

Honey bee (*Apis mellifera*) is not only contributing major bee products profit in Taiwan apiculture but also the main pollinator in agriculture. The reproduction of honey bee is carried out by polyandry and mating in flying. It is increasing the risk of inbreeding in the same apiary cause from the patrilineal donor coming from in the same colony. It has to increase honey bee breeding efficiency by using artificial insemination. The key point of developing artificial insemination is preservation of sperm. In this study, we evaluated effects of diluents and temperatures on preserving sperm of drones. Our results show that is suitable for preservation of honey bee sperm *in vitro* at 10 °C to 20 °C. Moreover, we carried out the selection of diluents by assessing the viability of sperm after preservation for 72 hours. It is suggested that diluent E should be the most suitable to preserve sperm of honey bees. The motility of sperm was assessed visually. The motility of sperm suspended in diluents D and E was significantly higher than that of sperm suspended in the other diluents, with indices of motility was assessed as 2.37-3.49. As assessments of sperm viability and motility, three diluents were selected for cryopreservation experiments in combination with dimethyl sulfoxide (DMSO). The highest viability of sperm after thawing was 62.4±5.6%. This study will be contributed the development of artificial insemination technique for honey bee breeding in Taiwan apiculture.

Keywords: *Apis mellifera*, sperm preservation, sperm vitality, artificial insemination, sperm diluent

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