การผสมเทียมและการไม่เข้ากันทางการสืบพันธุ์ระหว่างผึ้งพันธุ์ยุโรป *Apis mellifera* และผึ้งเอเชีย

นางสาวมนัญญา เพียรเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4075-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I21507247

INSTRUMENTAL INSEMINATION AND REPRODUCTIVE INCOMPATIBILITY BETWEEN THE EUROPEAN HONEYBEE, *Apis mellifera* AND ASIAN HONEYBEE SPECIES

Miss Mananya Phiancharoen

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy in Biological Sciences

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-4075-1

มนัญญา เพียรเจริญ: การผสมเทียมและการไม่เข้ากันทางการสืบพันธุ์ระหว่างผึ้งพันธุ์ยุโรป *Apis mellifera* และผึ้งเอเชีย (INSTRUMENTAL INSEMINATION AND REPRODUCTIVE INCOMPATIBILITY BETWEEN THE EUROPEAN HONEYBEE, *Apis mellifera* AND ASIAN HONEYBEE SPECIES) อาจารย์ที่ปรึกษา: ศ.ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: Professor Dr. Nikolaus Koeniger จำนวน 106 หน้า ISBN 974-17-4075-1

จุดประสงค์ของการวิจัยเพื่อศึกษาความไม่เข้ากันทางการสืบพันธุ์ระหว่างผึ้งพันธุ์ยุโรป (*Apis mellifera*) และผึ้งเอเชีย โดยการผสมเทียมนางพญาผึ้งพันธุ์กับอสุจิของผึ้งเอเชีย เพื่อดูการมีชีวิตของตัวอสุจิในถุงเก็บน้ำเชื้อของนางพญาผึ้งพันธุ์

ขั้นแรกได้ทำการศึกษาเทคนิคการเก็บอสุจิที่ต้องมีการปรับให้เหมาะสมกับจำนวนของผึ้งตัวผู้และจำนวนอสุจิที่มีน้อยในผึ้งตัวผู้ของผึ้งเอเชีย ผลการทดลองพบว่าการมีชีวิตของตัวอสุจิไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวิธีการเก็บตัวอสุจิจากการหลั่งอสุจิและจากการเก็บจากถุงเก็บน้ำเชื้อ แต่พบว่าสารละลายที่ใช้เก็บรักษาตัวอสุจิมีผลต่อการมีชีวิต (การเคลื่อนที่) ของตัวอสุจิ โดยพบว่าสารละลายที่เหมาะสมในการเก็บรักษาตัวอสุจิคือ Tris buffer diluent ส่วนเทคนิคการนำตัวอสุจิมาปั่นโดยใช้เครื่องปั่นเพื่อแยกตัวอสุจิออกจากสารละลายที่ใช้ระหว่างการเก็บ มีผลต่อการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิและจำนวนของตัวอสุจิที่เข้าไปในถุงเก็บน้ำเชื้อของนางพญา พบว่าตัวอสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุดเมื่อนำอสุจิไปปั่นที่ 1,000 g เป็นระยะเวลา 10 นาที เทคนิคการเก็บตัวอสุจิจากถุงเก็บน้ำเชื้อในสารละลาย Tris buffer และนำตัวอสุจิมาปั่นที่ 1,000 g เป็นเวลา 10 นาที ตัวอสุจิที่ได้จากเทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ในการผสมเทียมได้อย่างประสบความสำเร็จ

จากการศึกษาการผสมเทียมนางพญาของผึ้งพันธุ์ 63 ตัว โดยนางพญาผึ้งพันธุ์แต่ละตัวผสมกับอสุจิของผึ้งตัวผู้เพียง 1 ชนิดในปริมาณของตัวอสุจิ 8 ล้านตัวที่เท่ากันซึ่งได้จากผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ตัวผู้ 1 ตัว ผึ้งโพรง (*A. cerana*) ตัวผู้ 8 ตัว ผึ้งหลวง (*A. dorsata*) ตัวผู้ 5 ตัวและผึ้งมิ้ม (*A. florea*) ตัวผู้ 20 ตัว โดยพบจำนวนเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิเข้าไปในในถุงเก็บน้ำเชื้อของนางพญาผึ้งพันธุ์ระหว่าง 1.4 - 2.8 % นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ของผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรงในถุงเก็บน้ำเชื้อของนางพญาผึ้งพันธุ์ไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากการผสมเทียมภายใน 4 สัปดาห์ พบว่าตัวอสุจิของผึ้งตัวผู้ทั้ง 2 ชนิดยังคงเคลื่อนที่ 96.9% และ 93.8% ตามลำดับ แต่พบจำนวนเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิของผึ้งมิ้มเคลื่อนที่ลดลง คือ 83.4 % ภายหลังจากการผสมเทียมเป็นเวลา 3 วัน และหลังการผสมเทียม 4 สัปดาห์การเคลื่อนที่ลดลงเป็น 33.9 % นอกจากนี้พบว่าจำนวนเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิของผึ้งหลวงเคลื่อนที่ลดลง คือ 61.2 % ภายหลังจากการผสมเทียมเป็นเวลา 3 วัน และหลังการผสมเทียม 4 สัปดาห์การเคลื่อนที่ลดลงเป็น 26 % จากการศึกษาผลของการปฏิสนธิ พบว่าไข่ของนางพญาผึ้งพันธุ์ได้รับการปฏิสนธิกับอสุจิของผึ้งพันธุ์ 57% และจากการคำนวณจากจำนวนไข่ที่ไม่ฟัก พบว่าไข่ของนางพญาผึ้งพันธุ์ปฏิสนธิกับอสุจิของผึ้งโพรง ผึ้งมิ้มและผึ้งหลวง 44% 41% และ 20% ตามลำดับ

สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์ชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2546..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

###4273823523 : Biological Science

KEY WORDS : *Apis mellifera* queen / *Apis* species / Spermatozoa / Spermatheca / Instrumental insemination

MANANYA PHIANCHAROEN: INSTRUMENTAL INSEMINATION AND REPRODUCTIVE INCOMPATIBILITY BETWEEN THE EUROPEAN HONEYBEE, *Apis mellifera* AND ASIAN HONEYBEE SPECIES. THESIS ADVISOR: PROFESSOR SIRIWAT WONGSIRI, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: PROFESSOR NIKOLAUS KOENIGER, Ph.D., 106 pp. ISBN 974-17-4075-1

The aim of instrumental insemination is to investigate reproductive incompatibility between the European honeybee, *Apis mellifera* and Asian honeybee species. By this research, spermatozoa of the Asian honeybee species were injected into an *A. mellifera* queen and the survival of spermatozoa in spermatheca was monitored.

First, the technique of sperm collection had to be adjusted to the small number of drones per colony, and the spermatozoa per drone as found in Asian *Apis* species. It made no significant difference whether sperm was collected from the drone's ejaculation or from seminal vesicles. The diluents, however, had a significant effect on survival (motility) of spermatozoa: Tris buffer diluent proved to be the best diluent for storing honeybee spermatozoa. The technique of centrifugation for spermatozoa reconcentration affected on spermatozoa motility and the number of spermatozoa reaching the spermatheca of queens. A low speed at 1,000 g for 10 min had the highest motility rate. The combination of these 3 techniques such as collecting spermatozoa from seminal vesicles, dispersed in Tris buffer diluent and reconcentrated at 1,000 g for 10 min was used successfully for instrumental insemination.

Sixty-three queens of *A. mellifera* were inseminated each with about 8 million spermatozoa from either 1 *A. mellifera*, 8 *A. cerana*, 5 *A. dorsata* or 20 *A. florea* drones. Between 1.4% and 2.8% of the spermatozoa reached the spermatheca. Motility of spermatozoa of *A. mellifera* and *A. cerana* did not change within 4 weeks, it was 96.9% and 93.8%, respectively. The motility of *A. florea* spermatozoa decreased to 83.4% after 3 days and to 33.9% after 4 weeks, and of *A. dorsata* spermatozoa it decreased to 61.2% after 3 days and to 26% after 4 weeks. Fertilization of *A. mellifera* eggs was 57% by *A. mellifera* spermatozoa. Calculation based on non hatching eggs showed that 44%, 41% and 18% were fertilized by *A. cerana*, *A. florea* and *A. dorsata* spermatozoa, respectively.

Field of study.... Biological Science.....Student's signature.....

Academic year.....2003.....Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

Thesis Title	Instrumental Insemination and Reproductive Incompatibility between the European Honeybee, *Apis mellifera* and the Asian Honeybee Species
By	Miss Mananya Phiancharoen
Field of study	Biological Science
Thesis Advisor	Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Professor Nikolaus Koeniger, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

..... Dean of Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

K. Thirakhupt ..... Chairman

(Assistant Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Professor Nikolaus Koeniger, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.)

Sureerat Deowanish ..... Member

(Sureerat Deowanish, D. Agr.)

..... Member

(Assistant Professor Sirinan Aemprapa, Ph.D.)

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my thesis advisor, Prof. Dr. Siriwat Wongsiri for his valuable suggestion, advice, guidance and encouragement throughout my study. My study would be complete without his support.

I am truly grateful to my thesis co-advisor, Prof. Dr. Nikolaus Koeniger and Dr. Gudrun Koeniger of Insitut für Bienenkunde (Polytechnische Gesellschaft), Fachbereich Biologie der J.W.Goethe Universität Frankfurt am Main, Oberursel, Germany for suggestion, guidance and encouragement throughout my study, especially their support and advice me during stay in institut für Bienenkende.

My gratitude is also extended to my committee members, Dr. Kumthorn Thirakhupt, Dr. Warawut Chulalaksananukul, Dr. Sureerat Deowanish and Dr. Sirinan Aemprapa for their consistent interest in my research. Special thanks to Dr. Chanpen Chanchao and Dr. Duangkhae Sitthicharoenchai for their helpfulness and suggestion.

I would like to thank Dr. Chariya Lekprayoon for her support and advice in various ways, especially for a warm stay in the laboratory.

I sincerely thanks to the staff of the Center of Excellent in Entomology: Bee Biology, Biodiversity of Insects and Mites, Chulalongkorn University for all their help. Throughout my study, I have spend great time with Professor Piboon Naiyanert, Kanchana Rangsihirunrat, Varanya Aranyavalai, Hataitip Trisoomboon, Marut Faungarworn, Orawan Duangphakdee and Sommuk Mongkhonchaichana

I would like to send my deeply grateful to staff of Insitut für Bienenkunde, Oberursel, Germany for their helpfulness, friendship, and field assistance.

I wish to thank Beate Springer for her teaching in instrumental insemination. Special thanks to Jochen Pflugfelder, Jasna Kralj and Christal Rau for their help and warm relationship.

Very special thanks to Yorn Nouachan for collecting *Apis florea* in Samut Songkhram.

I am in dept to the Royal Golden Jubilee (PhD program), Thailand Research Fund (TRF) for financial support throughout my study.

Finally, the greatest indebtedness is expressed to my family for unlimited love, understanding, support and encouragement throughout my study and also my life.

CONTENTS

		Page
THAI ABSTRACT		iv
ENGLISH ABSTRACT		v
ACKNOWLEDGMENTS		vi
CONTENTS		vii
LIST OF TABLES		viii
LIST OF FIGURES		ix
CHAPTER I	INTRODUCTION	1
CHAPTER II	LITERATURE REVIEW	3
CHAPTER III	GENERAL MATERIALS AND METHODS	29
CHAPTER IV	MOTILITY OF SPERMATOZOA (*Apis mellifera*) IN DIFFERENT DILUENTS AND METHOD OF COLLECTIONS	58
CHAPTER V	INSTRUMENTAL INSEMINATION OF *Apis mellifera* L. QUEENS WITH HETERO-AND CONSPECIFIC SPERMATOZOA RESULTS IN DIFFERENT SPERM SURVIVAL	78
REFERENCES		97
BIOGRAPHY		106

LIST OF TABLES

Table		Page
2.1.	Drone flight periods of sympatric Asian honeybee species.....	25
4.1.	Motility of spermatozoa collected from ejaculation and seminal vesicles in Tris buffer diluent.....	64
4.2.	The motility of spermatozoa from seminal vesicles in Tris buffer diluent, Hyes diluent, and 0.9% NaCl.....	66
4.3.	Motility of spermatozoa from seminal vesicles after reconcentrated in different g/time in Tris buffer.....	68
4.4.	Concentration of spermatozoa for insemination (spermatozoa $x10^6/\mu l$) from different methods of collection.....	70
4.5.	Number of spermatozoa ($x\ 10^6$) in spermatheca after inseminated with spermatozoa from different methods of collections.....	72
5.1.	Number of spermatozoa in the seminal vesicles of 4 *Apis* species.....	84
5.2.	Number and motility of spermatozoa of 4 species stored in the spermatheca of an *A. mellifera* queen.....	87
5.3.	Development of the eggs laid by the *A. mellifera* queens 6 up to 13 days after insemination.....	88

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2.1.	Queen, worker and drone of honeybee *Apis mellifera*.....	7
2.2.	Development times and stage of honeybee.....	8
2.3.	Reproductive organs of *A. mellifera* queen.....	10
2.4.	Reproductive organs of *A. mellifera* drone.....	11
2.5.	Lateral view of everted endophalli of *A. mellifera*, *A. koschevnkovi*, *A. cerana*, *A. dorsata*, *A. florea*, and *A. andreniformis*	12
2.6.	Drone congregation areas of *A. dorsata*, *A. cerana* and *A. koschevnikovi* in Borneo.....	21
3.1.	*A. mellifera* colonies were introduced to establish at Chulalongkorn University.....	29
3.2.	*A. mellifera* drones at the entrance of colony during mating flight time.....	30
3.3.	*A. cerana* colonies were introduced to establish at Chulalongkorn University.....	30
3.4.	*A. cerana* drone at the entrance of colony during mating flight time.....	31
3.5.	*A. florea* colonies were introduced to hang under small branches of trees.....	32
3.6.	*A. florea* drones were located on the top of the colony.....	32
3.7.	A drone congregation area of *A. dorsata*.....	33
3.8.	*A. dorsata* colony hunging under a branch of a big tree.....	33
3.9.	Drone and worker of *A. dorsata*.....	34

LIST OF FIGURES (continued)

Figure	Page
3.10. *A. mellifera* drones were kept in a drone's cage on the top of a colony...	34
3.11. A rectangular cage and a small box for cage drone.....	35
3.12. Obtaining semen from a mature drone of *A. mellifera* by eversion of the endophallus.....	37
3.13. Dissection of drone to remove reproductive organs.....	38
3.14. Obtaining semen from seminal vesicles of *A. mellifera* drone.....	39
3.15. Collecting ejaculated semen from eversion's endophallus into a insemination syringe.....	41
3.16. Collecting semen from seminal vesicles into insemination syringe.....	41
3.17. Sealed queen cells at the grafted frame.....	44
3.18. Queen cell was placed in a cage and kept in incubator.....	44
3.19. Emerged queen and worker bees in each cage.....	45
3.20. Nucleus boxes are managed at Chulalongkorn University.....	45
3.21. An emerged queen is kept in queen cage and placed in a nucleus box...	46
3.22. Queens were anaesthetized with CO_2 for 10 min.....	47
3.23. A queen was placed in a cage covered with candy and transferred in a nucleus box.....	47
3.24. Standard insemination instrument.....	48
3.25. Equipment for insemination.....	49

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
3.26.	Details of insemination syringe with exchangeable flasks and cylinders...	50
3.27.	A queen backed up in a queen holder which is in a holding tube.....	51
3.28.	Opening the sting chamber of queen.....	52
3.29.	A queen was inseminated.....	52
3.30.	An inseminated queen was marked with a number plate, placed in a cage and put in the nucleus box.....	53
3.31.	The step of mapping eggs.....	54
3.32.	Sealed broods comb was place in cage and kept in incubator.....	55
3.33.	A queen was dissected to remove spermatheca.....	57
3.34.	Spermatheca was squashed by a cover glass for checking the spermatozoa motility.....	57
4.1.	Motility of spermatozoa collected from ejaculate and seminal vesicles in Tris buffer diluent.....	64
4.2.	Motility of spermatozoa from seminal vesicles in Tris buffer diluent, Hyes diluent, and 0.9% NaCl.....	66
4.3.	Motility of spermatozoa from seminal vesicles after reconcentrated. in differences g/time in Tris buffer diluent.....	69
4.4.	Concentration of spermatozoa for insemination (spermatozoa $x10^6/\mu l$) from different methods of collection.....	70

LIST OF FIGURES (continued)

Figure — Page

4.5. Number of spermatozoa in spermatheca after inseminated with spermatozoa from different methods of collections..... 72

5.1. Number of spermatozoa per drone in seminal vesicles (x 10^6) of *A. mellifera*, *A. cerana*, *A. dorsata* and *A. florea*..... 84

5.2. Number of spermatozoa in seminal vesicles (x10^6) in one drone of *A mellifera*, 8 drones of *A. cerana*, 5 drones of *A. dorsata* and 20 drones of *A. florea* 85

5.3. Number of spermatozoa of 4 species entered spermatheca of *A. mellifera*..... 86

5.4. Motility of spermatozoa stored in spermatheca 3 days and 4 weeks after insemination..... 87