



인공수정에서 여왕벌의 이충, 나이, 인공수정 시기가 서양종꿀벌 (*Apis mellifera*) 여왕벌의 산란에 미치는 영향

이수진, 이장범¹, 최 경¹, 권천락¹, 김범진¹, 이경용*

농촌진흥청 농업생물부 양봉생태과, ¹예천군곤충연구소

Effect of Grafting, Queen Bee Age, and Insemination Timing on *Apis mellifera* Queen Bee Oviposition in Instrumental Insemination

Su Jin Lee, Jang Beom Lee¹, Gyeong Choi¹, Cheon Rak Kwon¹, Beom Jin Kim¹ and Kyeong Yong Lee*

Apiculture Division, Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Republic of Korea

¹Yecheon Entomology Institute, Yecheon 36802, Republic of Korea

Abstract

Instrumental insemination of honeybees is an essential technique for honeybee breeding. To standardize instrumental insemination techniques in Korea, we conducted research on queen bee grafting, queen bee age, and the oviposition effect of queen bees based on the timing of instrumental insemination. A higher grafting success rate of hive-producing queen bees was found to correlate with an increased oviposition success rate of inseminated queen bees ($R^2 = 0.346$). Additionally, oviposition success rate varied with queen bee age and the timing of instrumental insemination ($p < 0.05$). Consequently, it is effective to perform instrumental insemination between April and June, using queen bees aged 12~16 days, which have emerged from hives with a high grafting success rate. Our findings can provide crucial foundational data for standardizing instrumental insemination practices in Korea.

Keywords

Instrumental insemination, Grafting, Queen age, Insemination timing, Oviposition

서론

동물의 육종(Breeding)에서 특정 형질을 가지는 개체군 확보를 위해 의도적인 교배는 필수적이다(Henderson, 1975). 현대의 동물육종 전략 중 하나인 계통육종(Pedigree breeding)에서도 특정 형질을 가지는 계통들의 형태적, 생리적인 특성뿐만 아니라 유전적인 평가를 포함하기 때문에 반드시 통제된 상태에서의 계통 간 교배가 필요하다(Theunissen, 2012; Chavanne *et al.*, 2016). 꿀벌 계통육성 역시 다른 형질을 가진 꿀벌의 유입을 차단하고

원하는 형질을 가지는 여왕벌과 수벌의 교미가 이루어져야만 한다(Plate *et al.*, 2019). 그러나 꿀벌은 한 마리의 여왕벌이 15~20마리의 수벌과 개방된 장소에서 공중 교미를 하기 때문에, 다른 생물종들에 비해 통제된 교배가 어렵다(Tarpy and Nielsen, 2002; Cobey, 2016; Plate *et al.*, 2019). 꿀벌의 육종을 위해 교배를 통제하는 전략으로 ‘지리적 격리’를 통한 교배방법과(Cobey, 2007; Uzunov *et al.*, 2017), 수벌에서 정자를 채취하여 여왕벌에게 직접 주입하는 ‘인공수정’ 기술이 이용되고 있다(Laidlaw, 1987; Cobay, 2007). 꿀벌의 인공수정(Honey bee instrumental

insemination)은 1920년대에 시작되어(Prodělalová *et al.*, 2019) 여왕벌과 수벌의 생식기능 구명 및 인공수정 기구의 단순화 기술로 발전해 왔다(Cobey, 1983; Cobey and Schley, 2002). 최근에는 꿀벌 인공수정 기술이 표준화되었으며(Cobey *et al.*, 2013), 중국에서는 인공수정을 통해 꿀벌 계통 보존과 상업적 여왕벌 생산도 하고 있다(Lee, 2005; Lee and Ge, 2006). 국내에서 꿀벌 인공수정 기술은 2003년 처음 미국으로부터 도입되었다(Kim, 2003). 그러나 국내 꿀벌 인공수정 기술 관련 연구는 해외에 비해 매우 부족한 실정이다. Lee and Ge (2006)은 꿀벌의 인공수정을 위한 수벌의 비행특성, 정액채취 및 여왕벌의 인공수정률에 대하여 보고한 바 있으며, 꿀벌과 다른 화분매 개곤충인 뒤영벌의 인공수정 기술(Yoon *et al.*, 2007), 수벌 정자수집기술(Yoon *et al.*, 2014) 등이 연구되었다. 이후 인공수정을 이용한 꿀벌의 계통육성과 평가 등과 같은 연구가 수행되었으나(Kim *et al.*, 2017, 2021), 인공수정을 위한 여왕벌과 수벌의 선발방법, 인공수정의 시기, 산란유도봉군 조성, 인공수정 봉군 관리방법 등 인공수정 기술 표준화를 위한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 인공수정은 꿀벌의 계통육성을 위하여 반드시 필요한 기술로서 국내 꿀벌 사양환경에 맞는 표준화가 필요하다(RDA, 2008). 따라서 본 연구는 인공수정 기술의 표준화 일환으로 인공수정 전 여왕벌의 확보과정에 필요한 이충(Grafting)과 여왕벌 나이에 따른 인공수정 효과 그리고 월별 인공수정 이후 여왕벌의 산란율 등을 비교하여 가장 적합한 여왕벌의 선발기준과 인공수정 시기를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험곤충

꿀벌의 인공수정을 위하여 예천군곤충연구소 꿀벌육종 연구센터(36°49'37"N, 128°27'24"E)에서 사양관리하는 양봉꿀벌(*Apis mellifera*) 봉군을 사용하였다. 여왕벌 인공수정은 2017~2021년까지 5년 동안 4~8월 중에 수행하였다. 산란율 조사를 위하여 2017년 108마리, 2018년 129마리, 2019년 144마리, 2020년 85마리, 2021년 138마리의 인공수정된 여왕벌이 사용되었다.

2. 여왕벌 및 수벌 양성

꿀벌의 인공수정 전 여왕벌 및 수벌양성은 곤충의 인공수정법(RDA, 2008)을 기준으로 수행하였다. 먼저 인공수정에 사용할 여왕벌을 생산하기 위하여 다음과 같은 순서로 ‘여왕벌 양성봉군’을 만들었다. ① 양봉장에서 세력이 가장 좋은 봉군을 선택하여 벌통 내 소비(벌집)를 10장으로 만든다. 봉군의 세력은 소비 1장당 벌의 수를 1500~1700마리(소비에 붙을 수 있는 최대치의 벌의 70~80%) 정도로 조성한다. ② 계상 벌통(2층으로 된 벌통)을 준비하여 1층에는 여왕벌을 포함한 6장의 소비, 2층에는 여왕벌이 없는 4장의 소비를 배치한다. ③ 1층의 여왕벌이 2층에 올라가지 못하도록 1층과 2층 벌통 사이에 ‘수평격왕판’(Bamboo Queen Excluder, YASEANG Corp., Gwangju, Korea)을 설치한다. 여왕벌 양성봉군이 준비된 이후 여왕벌 생산을 위한 이충작업(Grafting)을 다음과 같이 수행하였다. 먼저 이충왕완틀(Queen Cell Bar Frame, Main trade corp., Yangpyeong, Korea)에 일정한 간격으로 40개의 왕완(Queen cell, YASEANG Corp., Gwangju, Korea)을 붙인 후, 이충침(Queen grafting tool, YASEANG Corp., Gwangju, Korea)을 이용하여 왕완 내부에 인공수정시키하고자 하는 계통의 1령 유충을 옮겨 주었다. 총 40마리의 이충을 완료한 후 ‘왕완틀’은 여왕벌 양성봉군의 2층 벌통에 삽입하였다. 그 이후 당액(설탕 1.5: 물 1)과 대용 화분(Premium Bee patty, Korean beekeeping cooperatives, Seoul, Korea)을 인위적으로 공급하였다. 이충 12일 후 우화 전 처녀 여왕벌이 들어있는 왕완을 떼어내 ‘왕롱’(Queenbee Isolation Case, YASEANG Corp., Gwangju, Korea)에 담아 여왕벌 양성봉군 안에 넣어 보관하였다. 왕롱 보관 48시간 후 여왕벌 우화를 확인한 후 왕완을 제거하고 우화한 여왕벌만을 다시 왕롱에 넣어 여왕벌 양성벌통에 재투입한 후, 인공수정 전까지 보관하였다. 인공수정 여왕벌은 우화 5일부터 16일까지의 벌을 사용하였다(Cobey, 2007).

인공수정을 위한 수벌 양성을 위하여 여왕벌 양성봉군과 같은 방법으로 1층 벌집만을 사용하여 ‘수벌 양성봉군’을 조성하였다. 조성된 봉군에 봄철에 제작된 수벌 소비를 삽입하고 3일 후 산란 확인을 하였다. 산란 확인 24일 후부터 매일 우화한 수벌을 확인하여 가슴에 유성펜으로 마킹하였다. 인공수정에는 우화 12일째 되는 벌을 선별하여 사용하였다(Ruttner, 1988; Cobey, 2007).

3. 인공수정

인공수정은 ‘꿀벌 인공수정기’(Schley Instrumental Insemination 1:02 Set, Schley Instrumental Insemination, Germany)를 사용하여 ① 수벌정액 채취, ② 여왕벌 고정, ③ 정액주입 순서로 수행되었다(Cobey *et al.*, 2013; Fig. 1). 먼저 수벌의 정자를 확보하기 위하여 수벌 양성봉군에서 선별된 수벌의 복부 아래쪽을 손가락으로 압박하여 정소를 노출시킨 후 인공수정주사기로 채취하였다. 여왕벌은 외부 환경의 영향을 막기 위해서 여왕벌 양성봉군에서 인공수정실까지 사각통(M700 Slidefile, Simport, Quebec, Canada)에 넣어 이동하였다. 여왕벌 고정은 탄산가스 처리와 동시에 이루어졌으며 인공수정기에 여왕벌 배면과 침이 있는 부분이 수평이 되게 하여 여왕벌 생식기에 수벌 정액 10 µL를 주입하였다. 두 번째 교미 방지를 위해 인공수정 후 여왕벌의 날개 한 쪽을 가위로 1/3 정도 잘라내었다. 또한 여왕벌을 빠르게 확인하기 위해 여왕벌 가슴에 매니큐어를 칠하여 표시하였다. 처리가 끝난 여왕벌은 왕롱에 넣고 사각통에 담아 이동하여 여왕벌 양성봉군에 넣어 보관하였다. 24시간 후 왕롱에서 여왕벌을 꺼내 탄산가스로 20초 마취 후 여왕벌 양성 벌통에 재투입하였다.

4. 산란유도

인공수정된 여왕벌의 산란을 위해 스티로폼 벌통(Styro-foam beehive, YASEANG Corp., Gwangju, Korea)을 준비하여 내역봉(nurse bee)이 양성된 소비 1장과, 꿀이 저장된 소비 1장을 삽입하여 ‘산란유도봉군’을 조성하였다. 다음으로 여왕벌 양성봉군에 재투입 후 24시간이 지난 인공수

정된 여왕벌을 철망(8 cm×8 cm×1.5 cm, 자체 제작)에 넣어서 산란유도봉군에 유입시켰다. 인공수정 여왕벌 유입 48시간 이후 철망을 제거하였다. 그 이후 인공수정 여왕벌의 2차 교미 및 유실을 방지하기 위해 ‘격왕판’의 일부를 잘라 벌통 출입구에 설치하여 여왕벌의 외부 이동을 통제하였다. 철망 제거 후 5일째부터 봉군 내 여왕벌 산란이 확인되었을 때 여왕벌 외부이동 통제를 해제하였다.

5. 여왕벌 생산 및 여왕벌 나이에 따른 인공수정 여왕벌의 산란성 비교

각 여왕벌 양성봉군의 이충성공률(여왕벌 생산성공 비율)에 따른 인공수정 여왕벌의 산란성을 확인하기 위하여, 31개의 여왕벌 양성봉군으로부터 생산된 인공수정 여왕벌의 산란율을 조사하였다. 이충성공률은 각 여왕벌 양성봉군에서 이충된 왕완의 수로부터 우화된 여왕벌의 수를 백분율로 나타내었다.

Grafting success rate (%)

$$= \frac{\text{Number of bees emerging from queen cells}}{\text{Number of queen larvae grafted into queen cells}} \times 100$$

산란율은 각 이충성공률이 계산된 여왕벌 생산봉군으로부터 인공수정된 여왕벌의 수에서 산란에 성공한 여왕벌의 수를 백분율로 계산하였다.

Ovipositing success rate (%)

$$= \frac{\text{Number of ovipositing from queen bees}}{\text{Number of instrumental inseminated queen bees}} \times 100$$

이충성공률과 산란율 간의 관계를 확인하기 위해 상관

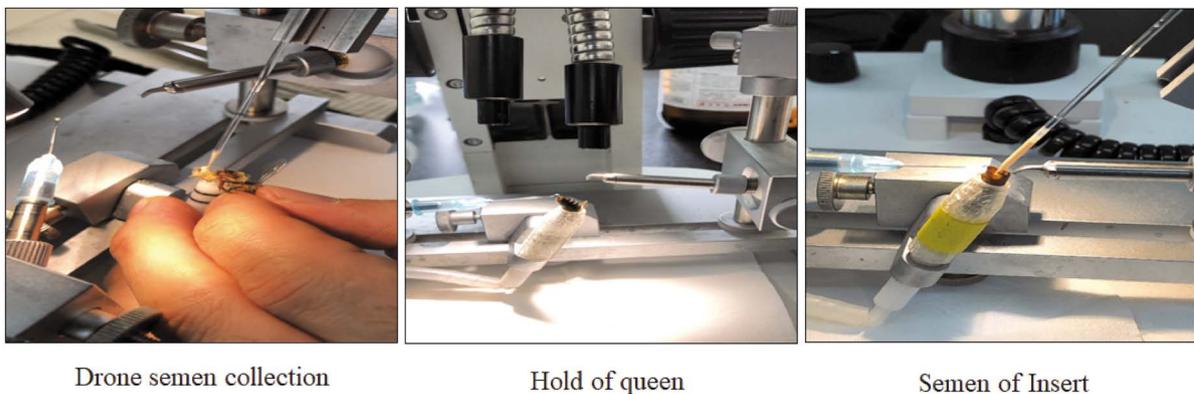


Fig. 1. Procedure for instrumental insemination in honeybee.

분석을 수행하였고, 유의미한 상관성이 확인 시 회귀분석을 통하여 관계식을 도출하였다.

여왕벌의 나이에 따른 여왕벌의 산란 효과를 비교하기 위하여, 새로 우화한 여왕벌을 대상으로 우화 후 6일 40마리, 8일 75마리, 10일 42마리, 12일 32마리, 14일 13마리, 16일 18마리의 여왕벌을 확보한 후 인공수정을 수행하였다. 각 나이에 인공수정된 여왕벌의 산란율을 확인하여 가장 효과적인 여왕벌의 연령을 확인하였다. 또한 산란에 성공한 여왕벌을 대상으로 여왕벌의 인공수정일로부터 여왕벌의 첫산란일까지 소요된 일수를 계산하여 각 나이별로 비교하였다.

6. 인공수정 시기에 따른 여왕벌의 산란 효과 비교

인공수정의 적정한 시기를 확인하기 위하여 5년 동안 4월부터 8월까지 각 월별 인공수정된 여왕벌의 산란율과 첫산란소요일수를 비교하였다. 또한 월별 기상환경의 차이가 있는지 확인하기 위하여 양봉장 주변의 경북지방기상청 안동기상대(36°87'18.3"N, 128°51'68.7"E)의 각 월별 기상데이터(기온, 습도, 풍속)를 기상청 자료개방포털 사이트(KMA, 2023)에서 확보하였다.

7. 통계분석

여왕벌 양성봉군의 이충성공률과 그 봉군에서 인공수정된 여왕벌의 산란율과의 상관관계는 Pearson correlation으로 분석하였다. 유의성이 확인되면 1차 선형 회귀분석을 진행하였다. 회귀모델은 ANOVA test를 통한 검정하고 Durbin-Watson test를 통하여 도출된 회귀식의 자기상관을 확인하였다. 여왕벌 나이에 따른 산란율의 차이는 각 나이별 인공수정된 벌의 수가 달라 단반복으로 비모수 검정인 Chi-square test로 유의성을 확인하였다. 평균비교 데이터는 Shapiro Wilks test를 통한 정규성 검정과 함께 히스토그램을 작성하여 정규분포인지 확인하였다. 여왕벌 나이별 첫산란소요일수와 인공수정 시기별 산란율과 첫산란소요일수의 차이, 월별 기상정보는 정규성 검정에 따라 oneway ANOVA test를 수행하였고, Leven F 검정으로 등분산이 만족하지 않을 경우 welch's ANOVA를 수행하여 유의성을 검정하였다. 평균을 통한 유의성 검정된 모든 데이터는 Turkey's HSD로 사후검정하였다. 본 연구의 통계분석은 SPSS PASW 26.0 for windows 통계 패키지(IBM, Chicago, USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 여왕벌 생산에 따른 인공수정 여왕벌의 산란율 비교

각 여왕벌 생산봉군으로부터 여왕벌의 이충성공률을 조사한 결과 2017년 64.8±9.9%, 2018년 76.8±9.3%, 2019년 43.2±24.2%, 2020년 53.8±14.1%, 2021년 78.6±11.4%로 나타났으며, 같은 해 여왕벌의 산란율은 각각 64.8±9.9%, 77.3±8.8%, 39.0±28.7%, 52.3±7.7%, 44.4±10.0%로 조사되었다(Table 1). 이충성공률과 여왕벌의 산란율에 대한 상관관계를 확인한 결과, 유의미한 정적 상관이 확인되었다(Pearson correlation $r=0.588$, $p=0.0001$). 이에 따라 이충성공률과 산란율 간 회귀분석을 수행한 결과(Fig. 2), 유의미한 1차 회귀식이 유도되었다($R^2=0.346$, model ANOVA $F_{1,29}=15.327$, $p=0.001$, $DW=1.44$, $y=0.6249x+17.227$). 따라서 이충성공률이 높은 여왕벌 양성봉군에서 확보된 여왕벌일수록 높은 산란율을 기대할 수 있다. 꿀벌의 인공수정에 영향을 미치는 요인 중 하나는 건강한 여왕벌이다(Khan *et al.*, 2022). 이충 작업 후 여왕벌의 발육은 양질의 먹이 공급과 내역봉의 수나 질 등 봉군의 상태에 따라 달라질 수 있다(Woyke, 1971; Gencer *et al.*, 2000; Tarpay *et al.*, 2000). 이충성공률이 높다는 것은 곧 봉군이 여왕벌을 양육할 수 있는 능력이 높다는 것으로 양질의 여왕벌이 생산될 수 있는 가능성도 높아질 수 있다(Dedej *et al.*, 1998; Cobey, 2007). 그러나 도출된 회귀식의 설명력이 0.346으로 높지 않아 이충성공률만으로 인공수정의 성공률 곧 산란율을 예측하기는 어렵다. 이는 교미 당시의 여왕벌 컨디션, 정자의 질, 유입된 봉군의 건강상태, 당시 기상조건 등 야외의 꿀벌이 사육되는 현장에서 여왕벌의 산란에 영향을 미치는 변

Table 1. Annual rates of grafting and ovipositing success in artificially inseminated Queen bees

Years ^x	N ^y	Grafting success rate (%)	Ovipositing success rate (%)
2017	6	64.8±9.9 ^z	64.8±9.9
2018	8	76.8±9.4	77.3±8.8
2019	7	43.2±24.3	39.0±28.8
2020	5	53.8±14.2	52.3±7.8
2021	5	78.6±11.4	44.4±10.0

^xData from April to August each year, from 2017 to 2021

^yNumber of hives into which queen bee larvae were grafted.

^zMean±SD value

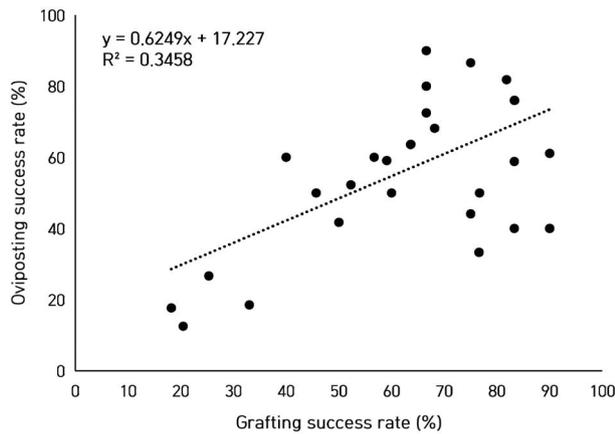


Fig. 2. Regression analysis between grafting success rate in bee hives and ovipositing success rate in inseminated queen bees. The dashed line represents the trendline based on the first-order regression equation. Regression equation: $y = 0.6249x + 17.227$, model ANOVA $F_{1,29} = 15.327$, $p = 0.001$, $DW = 1.44$.

수가 다양하기 때문이라고 생각된다(Shehata *et al.*, 1981; Szabo *et al.*, 1987; Hatch *et al.*, 1999; Skowronek *et al.*, 2002). 그럼에도 불구하고, 이러한 결과는 5년간의 인공수정 현장 데이터로부터 유의미한 회귀모델이 도출되었기 때문에 인공수정 시 여왕벌을 선발할 때의 조건으로 충분히 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

2. 여왕벌의 나이에 따른 인공수정 후 산란 효과

인공수정에 가장 적합한 여왕벌의 나이를 확인하기 위하여, 우화 후 여왕벌 나이 6일, 8일, 10일, 12일, 14일, 16일에서 각각 인공수정한 여왕벌의 산란율을 조사한 결과 (Fig. 3), 각각 50%, 44%, 52.4%, 75%, 92.3%, 94.4%로 우화 후 12일에서 16일 된 여왕벌의 산란율이 가장 높았다 (chi-square test: $\chi^2 = 39.303$, $p = 0.0001$; Fig. 3). 여왕벌 나이에 따른 첫산란소요일수를 조사한 결과 (Fig. 4), 여왕벌 나이 6일, 8일, 10일, 12일, 14일, 16일 때, 첫산란소요일수는 각각 14.5 ± 5.6 일, 14.8 ± 7.7 일, 11.6 ± 7.2 일, 8.5 ± 2.8 일, 8.2 ± 2.6 일, 10.8 ± 4.7 일로 여왕벌의 나이에 따른 첫산란소요일수는 12일과 14일에서 가장 짧은 결과를 보였다 (oneway ANOVA, $F_{5,120} = 4.987$, $p = 0.0001$). 여왕벌 나이는 인공수정 성공률에 결정적인 영향을 미치는 요소이다 (Cobey, 2017). 일반적으로 우화한 처녀여왕벌은 7~10일 안에 자연교미하며 교미 후 2~3일 안에 첫 산란을 시작한다 (Kim *et al.*, 1996). 이번 결과는 자연교미를 하는 여왕벌의 연령보다 5~9일이 더 긴 12~16일령 여왕벌의 산란 성

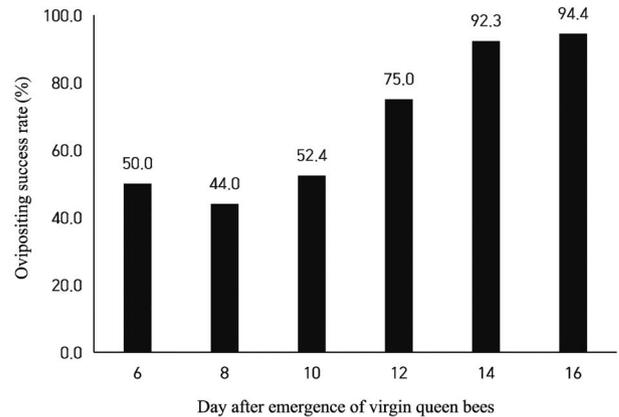


Fig. 3. Ovipositing success rate of queen bees according to day since virgin queen emergence. A statistically significant difference in oviposition success rates was observed based on the chi-square test ($p < 0.05$).

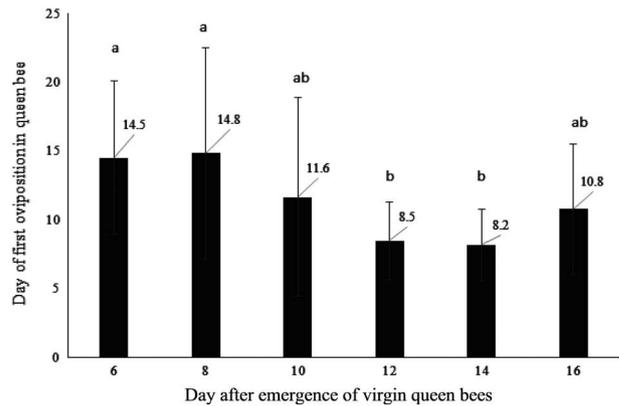


Fig. 4. Day of first oviposition in queen bees according to days since virgin queen emergence. Error bars represent standard deviation values. Different letters indicate significant differences among days since virgin queen emergence, based on the results of one-way ANOVA and Tukey's HSD ($p < 0.05$).

적이 더 뛰어난 것으로 나타났는데, 이는 인공수정 중 여왕벌 탄산가스 처리, 주사기 생식기 주입, 여왕벌 날개 제거 등과 같은 처리로 인하여 여왕벌이 생리적으로 영향을 받았기 때문으로 생각된다. 특히 탄산가스는 꿀벌의 체지방을 적게 발달시키며, 밀랍샘과 하인두샘을 억제하는 등 생리적 교란을 일으킬 수 있다 (Chuda-Mickiewicz *et al.*, 2012). 인공수정된 여왕벌의 첫산란 시작시기는 인공수정 성공에 대한 주요지표로 많은 보고가 되었지만 시기는 매우 다양하다. Wilde (1994)는 인공수정 후 10~37일 이후에 첫산란이 일어난다고 보고하였고, Khan *et al.* (2022)은 6년간 인공수정 데이터에서 여왕벌의 67%가 6~10일 내에 첫산란이 일어난다고 보고하였다. 여왕벌의 산란은 봉군

의 구성(Winston, 1987)이나 90% 이상 습도가 높거나 저온의 환경(Skowronek *et al.*, 2002) 등 다양한 요인에 의해 산란이 지연될 수 있기 때문에 산란속도의 직접적인 비교는 어렵다. 인공수정의 성공은 여왕의 산란능력인 번식력과 생존능력에 의존하기 때문에(Khan *et al.*, 2022), 첫 산란까지 소요되는 시간이 짧다는 것은 새로운 봉군에 여왕벌이 얼마나 빨리 적응하고, 새로운 형질의 후손생산이 빨리 이루어지는 것으로 해석할 수 있다. 이러한 결과를 종합할 때, 꿀벌 여왕벌의 인공수정을 위해 여왕벌 나이가 우화 후 12~16일의 여왕벌을 사용하는 것이 효과적일 것으로 생각된다.

3. 인공수정 시기에 따른 여왕벌의 산란 효과 비교

4월에서 8월까지 월별로 인공수정된 여왕벌의 산란율을 조사한 결과(Fig. 5), 7월 36.3±10.7%, 8월 40.2±3.2%는 4월 63.2±21.3%, 5월 64.0±21.4%, 6월 60.0±12.1%보다 20% 이상 낮은 산란율을 나타내었다(welch's ANOVA test: $F_{4,17}=4.455$, $p=0.038$). 월별 첫산란소요일수는 4월 13.8±3.9, 5월 11.8±2.6%, 6월 12.2±4.3, 7월 11.3±3.2, 8월 11.0±9.4일로 통계적인 차이가 확인되지 않았다(one-way ANOVA test $F_{4,17}=0.176$, $p=0.948$; Fig. 6). 여왕벌의 산란은 기상환경과 계절조건에 영향을 받는다(Woyke and Jasiński, 1990; Schlüns *et al.*, 2005). 인공수정이 완료된 여왕벌은 야외에서 사육되고 있는 산란유도봉군에 유입시켜야 하기 때문에 외부 기상환경에 영향을 받을 가능성이 높

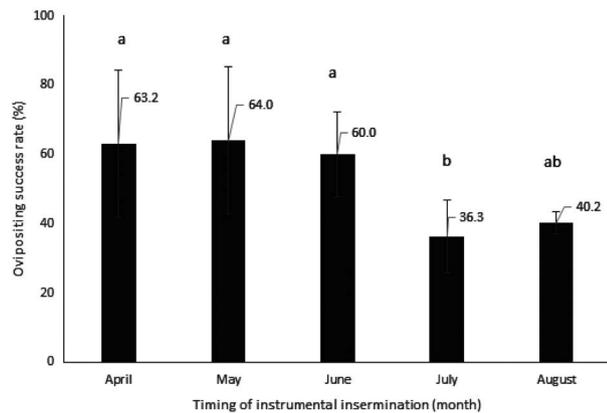


Fig. 5. Comparison of oviposition success rate in inseminated queen bees based on the timing of instrumental insemination. Error bars represent standard deviation values. Different letters indicate significant differences among the timing of instrumental insemination, as determined by the results of one-way ANOVA and Tukey's HSD ($p < 0.05$).

다. 우리나라는 계절변화가 뚜렷하여, 시기에 따라서 평균 온도, 평균습도 등이 차이가 크다(Choi *et al.*, 2006). 실제로 5년간 양봉장 주변 대구지방기상청 안동기상대에서 측정된 온도, 습도, 풍속데이터에서도 월별 유의미한 차이를 나타내었다(평균온도: $F_{4,760}=531.590$, $p=0.0001$, 평균습도: $F_{4,760}=124.471$, $p=0.0001$, 평균풍속: $F_{4,760}=74.291$, $p=0.0001$; Table 2). 이번 결과에서 여름철 7월과 8월에 산란율이 낮은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 고온다습한 기후나 먹이량이 부족한 무밀기로 인한 영향으로 볼 수 있다. 기상조건에 있어 Pettis *et al.* (2016)과 Rousseau *et al.* (2020)은 교미를 마친 여왕벌이 고온과 저온에 노출되었을 때 수정낭 내 정자의 생존력이 감소하여 산란에 영향을 미칠 수 있음을 보고하였다. 먹이 면에서는 봄철 유

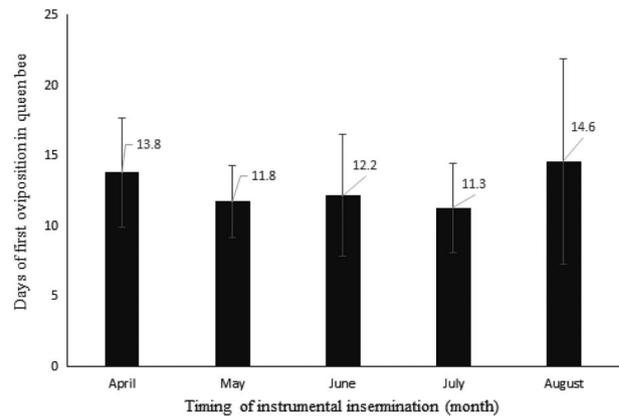


Fig. 6. Comparison of the day of first oviposition in inseminated queen bees based on the timing of instrumental insemination. Error bars represent standard deviation values. There were no significant differences among the timing of instrumental insemination ($p > 0.05$).

Table 2. Comparison of monthly air temperature, humidity and wind speed near the experimental site

Month ^y	Air temperature (°C)	Relative humidity (%)	Wind speed (m/s)
April	12.0 ± 3.6d ^z	53.0 ± 15.4d	2.8 ± 1.2d
May	17.2 ± 2.9c	62.2 ± 16.2c	2.4 ± 1.2c
June	21.5 ± 2.3b	67.9 ± 11.9b	1.8 ± 0.7b
July	24.2 ± 2.7a	79.5 ± 9.6a	1.4 ± 0.6a
August	24.4 ± 2.6a	80.4 ± 10.0a	1.4 ± 0.6a

^yData from meteorological stations nearby experimental site (36°87'18.3"N, 128°51'68.7"E) for the years 2017 to 2021

^zMean ± SD value

Diverse letters indicate significant differences among monthly atmospheric parameters based on the results of one-way ANOVA and Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

밀기인 4~6월보다 무밀기에 해당하기 때문에 외부로 유입되는 화분원의 질과 양에 따른 영향(Crailsheim *et al.*, 1992; Di Pasquale *et al.*, 2013)으로 생각될 수도 있다. 특히 계절에 따른 꽃가루의 종류에 따라 유충의 먹이 조성이 달라질 수 있으며(DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2018), Fine *et al.* (2018)은 다른 환경적인 요인이 통제된 상황에서 먹이 내 꽃가루의 조성을 달리하는 것만으로도 여왕벌의 산란에 영향을 미칠 수 있음을 밝혔다. 따라서 국내에서 인공수정에 적합한 시기는 인공수정 여왕벌 유입 후 산란이 효과적으로 일어날 수 있도록 4월에서 6월 내에 이루어져야 할 것으로 판단된다.

적 요

결과를 종합하면 인공수정 전 여왕벌을 선발할 때 이충 성공률과 여왕벌의 우화 후 일령 그리고 인공수정 후 여왕벌이 유입될 때의 시기에 따라 여왕벌의 산란은 차이가 있음을 확인하였다. 그 결과, 인공수정을 위한 여왕벌을 선발할 때 여왕벌의 생산성이 높은, 곧 이충성공률이 높은 봉군에서 12~16일령 여왕벌을 사용하도록 하고, 인공수정은 4~6월에 시행하는 것이 권장된다. 우리 연구는 국내의 인공수정의 표준화 정립에 있어 중요한 기초자료를 제공할 수 있다. 그럼에도 현장연구 특성상 여왕벌 양성봉군 상태, 질병, 계절, 인공수정 기술, 정액의 양과 질, 수벌의 상태, 양봉장 환경 등의 여러 가지 변수통제에 대한 고려가 되어있지 않기 때문에, 어떠한 변수가 여왕벌의 산란에 가장 크게 영향을 미치는지에 대한 결론을 내리기에 한계가 있다. 그러므로 차후에는 꿀벌 인공수정에 영향을 줄 수 있는 다양한 요인들에 대한 추가적인 검토가 요구된다. 아울러 인공수정에서 양질의 정자를 공급하기 위한 수벌의 양성, 선발조건도 중요하기 때문에 차후 수벌의 선발을 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구와 관련한 데이터를 이용하여 국내 꿀벌 인공수정의 기초자료 논문을 발표할 수 있게 도와주신 예천군공충연구소와 논문에 도움 주신 모든 분께 감사합니다.

인용문헌

- Chuda-Mickiewicz, B., K. Czekońska, J. Samborski and P. Ros-tecki. 2012. Success rates for instrumental insemination of carbon dioxide and nitrogen anaesthetised honey bee (*Apis mellifera*) queens. *J. Apic. Res.* 51(1): 74-77.
- Chavanne, H., K. Janssen, J. Hofherr, F. Contini, P. Haffray, A. Consortium, H. Komen, E. E. Nielsen and L. Bargelloni. 2016. A comprehensive survey on selective breeding programs and seed market in the European aquaculture fish industry. *Aquac Int.* 24: 1287-1307.
- Choi, G., W. Kwon and D. A. Robinson. 2006. Seasonal onset and duration in South Korea. *J. Korean Geographical Society* 41(4): 435-456.
- Cobey, S. 1983. The development of instrumental insemination. *J. Apic.* 123(2): 108-111.
- Cobey, S. and P. Schley. 2002. Innovations in instrumental insemination. *J. Apic.* 142(4): 433-435.
- Cobey, S. 2007. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie* 38: 390-410.
- 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.
- Cobey, S. 2016. An introduction to instrumental insemination of honey bee queens. *Bee World* 93(2): 33-36.
- Crailsheim, K., L. H. W. Schneider, N. Hrassnigg, G. Bühlmann, U. Brosch, R. Gmeinbauer and B. Schöffmann. 1992. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *J. Insect Physiol.* 38: 409-419.
- Dedej, S., K. Hartfelder, P. Aumeier, P. Rosenkranz and W. Engels. 1998. Caste determination is a sequential process: Effect of larval age at grafting on ovariole number, hind leg size and cephalic volatiles in the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *J. Apic. Res.* 37: 183-190.
- DeGrandi-Hoffman, G., S. L. Gage, V. Corby-Harris, M. Carroll, M. Chambers, H. Graham, E. Watkins deJong, G. Hidalgo, S. Calle, F. Azzouz-Olden, C. Meador, L. Snyder and N. Ziolkowski. 2018. Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J. Insect Physiol.* 109: 114-124.
- Di Pasquale, G., M. Salignon, Y. Le Conte, L. P. Belzunces, A. Decourtye, A. Kretzschmar, S. Suchail, J. Brunet and C. Alaux. 2013. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?. *PLoS One* 8(8): e72016.
- Fine, J. D., H. Y. Shpigler, A. M. Ray, N. J. Beach, A. L. Sankey, A. Cash-Ahmed, Z. Y. Huang, I. Astrauskaite, R. Chao, H. Zhao and G. E. Robinson. 2018. Quantifying the effects of pollen nutrition on honey bee queen egg laying with a new laboratory system. *PLoS One* 13(9): e0203444.

- Gençer, H. V., S. Q. Shah and Ç. Firatlı. 2000. Effects of supplemental feeding of queen rearing colonies and larval age on the acceptance of grafted larvae and queen traits. *Pak. J. Biol. Sci.* 3: 1319-1322.
- Hatch, S., R. D. Tarpay and C. D. J. Fletcher. 1999. Worker regulation of emergency queen rearing in honey bee colonies and the resultant variation in queen quality. *Insect Soc.* 46: 372-377.
- Henderson, C. R. 1975. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics* 31(2): 423-447.
- Khan, K. A., M. K. Rafique, M. A. Lashari, A. Iqbal, R. Mahmood, A. M. Ahmed, F. N. Khoso, S. Ahmad, B. M. AL-Shehri, M. E. A. Mohammed and H. A. Ghramh. 2022. Instrumental insemination: A nontraditional technique to produce superior quality honey bee (*Apis mellifera*) queens. *J. King Saud Univ. Sci.* 34(5): 102077.
- Kim, B. H., Y. W. Ryu, S. J. Park, Y. J. Song, J. N. Shin, D. H. Ho, G. S. Woo, G. Y. Lee, Y. D. Jang, G. S. Jo, S. G. Jo and G. S. Choi. 1996. *Modern Apiculture*. Sunjin Culture Press.
- Kim, H. K., C. G. Park and G. I. Han. 2021. Evaluation of hygienic ability for the selection of disease resistant honey bee (*Apis mellifera*) lines. *J. Bio-Env. Con.* 30: 206-211.
- Kim, H. K., M. L. Lee, M. Y. Lee, Y. S. Choi, S. M. Han, A. R. Kang and K. Y. Lee. 2017. Evaluation of royal jelly productivity and characteristics in *Apis mellifera* inbred lines. *J. Apic.* 32: 155-162.
- Kim, Y. S. 2003. Introduction of instrumental insemination technique with honeybee. *J. Apic.* 18: 173-178.
- KMA (Korea Meteorological Administration). 2023. Data Open Portal. (n.d.). 23. Climate Statistics Analysis. Retrieved from <https://data.kma.go.kr/cmmn/main.do/ClimateStatisticsAnalysis>
- Laidlaw, H. H. 1987. Instrumental insemination of honeybee queens: its origin and development. *Bee World* 68: 17-36.
- Lee, M. Y. 2005. Honeybee breeding in northeastern China - 1. Presentation of honeybee breeding and instrumental insemination of queen bee. *J. Apic.* 20(2): 173-180.
- Lee, M. Y. and F. C. Ge. 2006. Honeybee Breeding of Northeastern China - 2. Selection and Management of Superior Queen Bee. *Korean J. Apic.* 21(2): 83-92.
- 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(2): e0147220.
- Plate, M., R. Bernstein, A. Hoppe and K. Bienefeld. 2019. The importance of controlled mating in honeybee breeding. *Genet. Sel. Evol.* 51(1): 1-14.
- Proďlalová, J., R. Moutelíkova and D. Titára. 2019. Multiple virus infections in western honeybee (*Apis mellifera* L.) ejaculate used for instrumental insemination. *Viruses* 11(4): 306.
- RDA (Rural Development Administration). 2008. *Artificial insemination of insects*, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA press, Jeonju, Korea.
- Rousseau, A., É. Houle and P. Giovenazzo. 2020. Effect of shipping boxes, attendant bees, and temperature on honey bee queen sperm quality (*Apis mellifera*). *Apidologie* 51: 724-735.
- Ruttner, F. 1988. *Breeding techniques and selection for breeding of the honey bee*. The British Isles Bee Breeders Association by arrangement with Ehrenwirth Verlag, Munich.
- Schlüns, H., R. F. Moritz, P. Neumann, P. Kryger and G. Koeniger. 2005. Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens. *Anim. Behav.* 70: 125-131.
- Shehata, S. M., G. F. Townsend and R. W. Shuel. 1981. Seasonal physiological changes in queen and worker honeybees. *J. Apic. Res.* 20: 69-78.
- Skowronek, W., C. Kruk and J. Kłopot. 2002. Factors affecting oviposition of artificially inseminated honeybee queens. *J. Apic. Sci.* 46(2): 85-95.
- Szabo, T. I., P. F. Mills and D. T. Heikel. 1987. Effects of honeybee queen weight and air temperature on the initiation of oviposition. *J. Apic. Res.* 26: 73-78.
- Tarpay, D. R., S. Hatch and D. J. C. Fletcher. 2000. The influence of queen age and quality during queen replacement in honeybee colonies. *Anim. Behav.* 59: 97-101.
- Tarpay, D. R. and D. Nielsen. 2002. Sampling error, effective paternity, and estimating the genetic structure of honey bee colonies (Hymenoptera: Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95: 513-528.
- Theunissen, B. 2012. Darwin and his pigeons. The analogy between artificial and natural selection revisited. *J. Hist. Biol.* 45(2): 179-212.
- Uzunov, A., E. W. Brascamp and R. Büchler. 2017. The basic concept of honey bee breeding programs. *Bee World* 94: 84-87.
- Wilde, J. 1994. The effects of keeping queen honey bees after instrumental insemination on their performance. *Acta Acad. Agric. Tech. Olst. Zootechnica* 39: 153-166.
- Winston, M. 1987. *The biology of the honey bee*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Woyke, J. 1971. Correlations between the age at which honeybee brood was grafted, characteristics of the resultant queens, and results of insemination. *J. Apic. Res.* 10: 45-55.
- Woyke, J. and Z. Jasiński. 1990. Effect of the number of attendant worker bees on the initiation of egg laying by instrumentally inseminated queens kept in small nuclei. *J. Apic. Res.* 29: 101-106.
- Yoon, H. J., Y. H. Cho and B. Baer. 2007. Development of the artificial insemination instrument of bumblebee queens. *Korean J. Appl. Entomol.* 46(1): 123-129.
- Yoon, H. J., K. Y. Lee and Y. H. Cho. 2014. The optimal method and solution for collecting sperm of bumblebee male. *J. Apic.* 29: 271-277.