

Original article

Simplified apparatus for instrumental insemination of queen bees with the 'flexible insemination technique'

ME Kühnert¹, HH Laidlaw²

¹ Institut für Bienenkunde (Polytechnische Gesellschaft), Fachbereich Biologie der JW Goethe-Universität Frankfurt am Main, Karl-von-Frisch-Weg 2, 61440 Oberursel, Germany; ² University of California, Department of Entomology, Davis, CA 95616-8584, USA

Summary — With the usual insemination method the sting chamber is kept open by two hooks and the sting retracted with the dorsal hook (sting hook). With the new apparatus, and the 'flexible' insemination technique, hook supports are no longer required. The sting is simply grasped by a pair of forceps and pulled up to create a large opening into which the insemination syringe can be easily inserted. The sternite is kept in place by a small hook attached to the queen holding tube. In 10 pairs of queens inseminated with either the classical (A) or the new (B) method, no differences were found in the number of spermatozoa that reached the spermatheca. Queens inseminated with 5 µl semen had 2.7 ± 0.3 million (A; $n = 6$), and 2.8 ± 0.9 million (B; $n = 6$) spermatozoa in the spermatheca. With 10 µl semen the average was 4.7 ± 1.0 million (A; $n = 4$), and 4.9 ± 1.4 million (B; $n = 4$) spermatozoa in the spermatheca. Size and costs of the equipment are significantly reduced and the insemination routine becomes faster.

Apis mellifera / reproduction / instrumental insemination / equipment

INTRODUCTION

Instrumental insemination of queen bees is accomplished with a complex apparatus that keeps the queen narcotized and held in position (Laidlaw, 1949; Ruttner *et al*, 1974; Laidlaw and Lorenzen, 1977; Laidlaw and Goss, 1990; Woyke, 1991). Usually the sting chamber is kept open by two hooks (Notian 1932, 1937a, b), one ventral hook and one dorsal or sting hook (Laidlaw, 1944). With the aid of a probe, or with the syringe tip itself, the valvifold is lifted to allow the syringe to enter the queen's median oviduct (Laidlaw, 1944, 1977; Mackensen, and Roberts, 1948; Ruttner, 1975; Schley, 1983; Harbo, 1985; Moritz, 1989). Correct placement of the hooks is essential and alignment of the syringe a matter of experience.

After more knowledge about anatomical details during the mating flight became available (Koeniger, 1984) new dorsal hooks have been designed (Schafferhans, 1987;

Schley 1988) and the 'flexible insemination technique' without dorsal hook was developed (Kühnert, 1989, 1991). The insemination procedure has thus become less complicated, however, equipment has become sophisticated and expensive in the 'classical' insemination method. Our objective was to simplify the apparatus so the average bee breeder will be able to afford the equipment. A new insemination apparatus has been designed which is both simple and inexpensive.

MATERIALS AND METHODS

Insemination equipment

General description (fig 1A)

The base for the queen holder is a 20-mm thick disk cut from a brass rod 60 mm in diameter (1). The bottom side of the disk is recessed 2 mm to avoid 'rocking' on a surface (2). A blind hole, 6 mm in diameter (optionally threaded) is drilled from the top, 18 mm from one side at the preferred angle (25° to 32° from perpendicular) (3). Another hole is drilled from the side into the staining blind hole to receive a brass tube 'fitting' for attachment of latex tubing for conduction of CO₂ (4). The stopper, a tube that fits into the 6-mm slanted hole (5), holds the queen holding tube slanted according to Laidlaw and Goss (1990) with a CO₂ outlet at the flattened end (6) and a rubber O-ring (7) for the queen holding tube to sit on and prevent CO₂ leakage. A piece of 10 X 33 mm sheet metal (brass) (9) is shaped to gird the queen holding tube just tight enough to be easily moved up and down. This clasp carries the ventral hook (10) which is made of a piece of 0.2 mm stainless steel wire welded or glued to the outside of the clasp. The wire is shortened to exceed the metal by 1.5 to 1.8 mm and is hammered flat at the protruding end. Cutting edges are ground. The wire is bent to form a hook that grips the sternite of the queen.

Insemination procedure

To introduce the queen into the holding tube the CO₂ gas is turned on and the clasp with the ventral hook is slid towards the upper end of the queen holding tube (fig 2A). The queen's head is introduced into the tube and upon crawling into the tube, she is immediately narcotized. As queens tend to bend ventrally it is easier to have the queen's dorsal side facing left (towards the ventral hook). In this case the holding tube with the narcotized queen is then rotated 180° (while the clasp is kept in place) to have the queen in correct position for insemination (ventral side to the left, dorsal to the right). Queens can also be narcotized in their cages before introduction into the queen holder. The semen syringe is aligned with the queen holding tube and the clasp is lowered until the ventral hook catches the sternum of the queen (fig 2B). If necessary a needle or hook can be used to open the queen's sting chamber.

The base with the queen holder can be easily moved out of the way when space is needed for semen collection. For easy repositioning, two marks on the microscope stage and matching ones on the queen holder base are useful. Any convenient orientation to the microscope may be learned. Learning the base against two microscope clamps (fig 2C) or against suction cups prevents sliding. If a base plate that carries the syringe holder post is used above the microscope stage, a position guide can be made of a right angle brass fixed to the plate. The two arms fit against the edge of the properly placed queen-holding base.

The base of the apparatus is a metal block in which the CO₂ supply tube connects the Laidlaw-Goss queen holder. A new type of ventral hook is fastened to one side of the queen holder tube like a pencil holding clip. It can be adjusted up and down as needed. The dorsal hook (sting hook) is eliminated and a hand-held pair of forceps is used (Kühnert, 1989, 1991). The type of syringe and syringe holder can be of various designs. We used a rack and pinion syringe slide after Ruttner *et al* (1974) and a Schley (1982) syringe. A 180–220 mm syringe post is recommended, fixed to a base plate of any convenient size to fit over or under the binocular base. The stand can also be separate.

device. Practical use will show whether the described apparatus will be accepted and helps to make instrumental insemination more commonly used in bee breeding.

ACKNOWLEDGMENTS

We dedicate this work to Prof F Ruttner at his 80th birthday, who is a pioneer of instrumental insemination of queen bees.

We are grateful to N Koeniger and S Fuchs for support and comments on the manuscript. We thank P Walzer for manufacturing the apparatus, Ch Rau for the photographs, and A Mohr for the drawing.

Deutsche Version

Vereinfachter Apparat zur instrumentellen Besamung von Bienenköniginnen mit der 'Flexiblen Besamungsmethode'

Zusammenfassung — Bei der herkömmlichen Besamungsmethode halten zwei Haken die Stachelapertur jedoch nicht sichtbar wird. Mit dem neuen Apparat und der "Flexiblen Besamungsmethode" werden Hakenhalterungen überflüssig. Der Ventralhaken ist verschiebbar auf das gerade Königinnenröhrchen aufgesteckt. Mit einer Pinzette wird der Königinnenstachel angehoben und nach dorsal bewegt, bis die Vaginöffnung deutlich sichtbar ist und die Besamungsspritze eingeführt werden kann. In einem Vergleich zwischen Besamungen mit herkömmlicher Methode und -Gerät (A) und dem neuen Gerät (B) wurde kein Unterschied in der Anzahl der Spermien, die die Spermatheka erreichen, festgestellt. Königinnen, die mit 5 µl Sperma besamt waren, hatten $2,7 \pm 0,3$ Millionen Spermien ($n = 6$) (A), und $2,8 \pm 0,9$ Millionen Spermien ($n = 6$) (B) in der Spermatheka. Mit 10 µl Besamungsmenge lag der Durchschnitt bei $4,7 \pm 1,0$ Millionen ($n = 4$) (A) und $4,9 \pm 1,4$ Millionen ($n = 4$) (B) Spermien in der Spermatheka. Das Gerät ist leicht und preiswert herzustellen. Die Methode ist schnell zu erlernen und die Besamung damit ist einfach und zeitsparend.

Apis mellifera / Reproduktion / Instrumentelle Besamung / Besamungsapparate

One of the major advantages of the new device is that it can be manufactured at low costs with standard parts. Using the new clip-on hook and a pair of forceps, the conventional pairs of expensive hooks, stands and hook holders are no longer necessary. Additionally, mobility of the queen block allows plenty of space during semen collection and queen manipulation. Repositioning is easily accomplished with matching marks around the block and on the microscope stage or syringe stand. Also the queen's position can be corrected precisely by fractional horizontal movements of the small block. Thus it is possible to use a simple type of syringe holder. If a fixed position is preferred the queen block can be connected to the syringe stand.

One problem with the classical insemination apparatus is that the working distance is too small to be used with many common microscopes. Low height and small size of the new insemination apparatus plus the ability to move the syringe stand further away from the queen holder permit more types of microscopes to be used without alterations. To utilize lower working distances, four holes for the stopper were drilled into the base plate at angles of 25°, 27°, 29° and 32°. We preferred to work at the 25° angle, but even with working distances lower than that implied by the 32° angle, there is no hook to hinder insertion of the syringe. The new device allows the use of various syringe designs, including those with very long capillary tubes.

Narcotizing the queens before placing them into the queen holder eases the introduction procedure and makes sure that the duration of CO₂ treatment is sufficient to start onset of oviposition.

After 5 years experience in using forceps instead of a dorsal hook, we have found that the insemination procedure can be accomplished with the same success rate in about 20% less time. By lifting the sting with forceps the vaginal opening becomes visible

With pointed forceps the sting is gripped and lifted in the dorsal direction (fig 2C,D). To get hold of the sting with a steady left hand it is important to support the elbow and the hand, regardless of whether the sting is grasped from the rear of the apparatus (fig 2C) or from the front. While lifting and hook holders are no longer necessary. Additionally, mobility of the queen block allows plenty of space during semen collection and queen manipulation. Repositioning is easily accomplished with matching marks around the block and on the microscope stage or syringe stand. Also the queen's position can be corrected precisely by fractional horizontal movements of the small block. Thus it is possible to use a simple type of syringe holder. If a fixed position is preferred the queen block can be connected to the syringe stand.

Comparison of efficacy of the novel and the traditional apparatus

The efficacy of the above insemination apparatus and method (B) was compared to the classical and method (A) using insemination apparatus and method (A) using the conventional ventral hook, dorsal hook and valvefold probe. Glass tips were used in both cases.

Twenty queens were inseminated with 5 µl or 10 µl semen from consecutive portions of stirred semen in a syringe by random choice of the insemination apparatus. They received a 5-min CO₂ treatment 24 h prior to insemination. The queens were kept in mating cages with about 1500 workers. Four or six weeks after insemination the number of spermatozoa in the spermatheca was counted in 10 pairs of queens with a Fuchs-Rosenthal haemocytometer.

RESULTS AND DISCUSSION

There was no difference (table 1) in the number of spermatozoa found in the spermatheca of queens inseminated by the two methods ($t = 0,36$, ns, $DF=9$). All queens did not show any sign of damage. With the new apparatus the number of spermatozoa found in the spermatheca is within the range found by Mackensen (1964) and Woyke (1971).

seringue très simple, puisque les corrections horizontales de position peuvent être faites avec l'appareil au lieu d'être faites avec la seringue. À l'aide d'une pince pointue, l'aiguillon de la reine peut être facilement soulevé dans la direction dorsale (fig 2D) jusqu'à ce que l'ouverture vaginale soit visible. Dans cette méthode «flexible» Si la chambre de l'aiguillon de la reine ne s'ouvre pas d'elle-même, on peut l'y aider avec une aiguille (ou la sonde). Lorsque l'on pousse vers le bas la boucle métallique, le crochet ventral saisit le sternite et le maintient en position durant l'insemination (fig 2B). La reine peut également être mise dans le tube de contention une fois anesthésiée. L'appareil est facile à déplacer et ne doit être installé dans le champ de vision de la binoculaire, à l'endroit marqué précédemment, que peu de temps avant l'insemination, ce qui laisse beaucoup de liberté de mouvement pour le prélèvement du sperme. La mobilité de l'appareil avec la reine anesthésiée permet aussi d'utiliser un porte-

Apis mellifera / insemination artificielle / appareil / reproduction

et raccourci en temps.

à apprendre ; l'insemination en est simplifiée bon marché à fabriquer, mis à part les crochets et les supports. La méthode est facile

le système du crochet dorsal a été remplacé par une pince tenue à la main. On a comparé le résultat d'inseminations faites avec la méthode traditionnelle et l'appareil A et avec le nouvel appareil B ; aucune différence n'a été trouvée dans le nombre de spermatozoïdes présents dans la spermatheque (tableau I). L'appareil est facile et

la reine est tournée vers la gauche, en direction du crochet ventral). La boucle métallique avec le crochet ventral (9 + 10) est alors complètement poussée vers le haut (fig 2A). Avant l'insemination le tube de contention (8) subit une rotation de 180° dans la boucle métallique (9) de sorte que la face ventrale soit tournée vers la gauche. Si la chambre de l'aiguillon de la reine ne s'ouvre pas d'elle-même, on peut l'y aider avec une aiguille (ou la sonde). Lorsque l'on pousse vers le bas la boucle métallique, le crochet ventral saisit le sternite et le maintient en position durant l'insemination (fig 2B). La reine peut également être mise dans le tube de contention une fois anesthésiée. L'appareil est facile à déplacer et ne doit être installé dans le champ de vision de la binoculaire, à l'endroit marqué précédemment, que peu de temps avant l'insemination, ce qui laisse beaucoup de liberté de mouvement pour le prélèvement du sperme. La mobilité de l'appareil avec la reine anesthésiée permet aussi d'utiliser un porte-

Table 1. Number of spermatozoa (millions) in the spermatheca of 10 pairs of queens inseminated with 5 µl or 10 µl semen using the classical equipment (method A) and the new equipment (method B).
Table 1. Anzahl der Spermatozoen (Millionen) in der Spermatheka von Königinnen, die mit 5 µl bzw 10 µl Sperma mit herkömmlichem Apparat (Methode A), oder mit dem neuen Apparat (Methode B) besamt wurden.

	Classical method (A)		New method (B)	
Semen volume	5.9	4.6	6.1	4.9
10 µl	4.9	3.0	5.7	4.9
Means SD	4.7 ± 1.0	3.2	5.7	4.9 ± 1.4
Semen volume	2.9	2.4	2.9	2.4
5 µl	2.5	2.8	2.6	2.4
Means SD	2.7 ± 0.3	3.1	3.3	2.8 ± 0.9
2.6	2.6	4.0		

sionen bei der Erstellung des Manuskriptes. Wir möchten P. Walzer für den Bau des Gerätes ebenso danken wie Ch. Rau für die Fotos und A. Mohr für die Zeichnung.

Résumé — Appareil simplifié pour l'insemination artificielle des reines d'abeilles

Il existe de nombreux modèles d'appareils pour l'insemination artificielle des reines d'abeilles. En général on maintient la chambre de l'aiguillon ouverte par 2 crochets (Nolan, 1932, 1937a, b ; Laidlaw, 1944) pour introduire éventuellement avec l'aide d'une sonde) la seringue d'insemination dans l'ouverture vaginale (Laidlaw, 1944, 1977 ; Mackensen et Roberts, 1948 ; Rüttner, 1975 ; Schley, 1983 ; Harbo, 1985). De nombreuses propositions d'améliorations ont été publiées dans les années passées en s'appuyant sur les nouvelles connaissances concernant les détails anatomiques au cours du vol nuptial (Koeniger, 1984) et la technique s'est, de ce fait, très simplifiée (Schaffertans, 1987 ; Schley, 1988, Kühner, 1989, 1991 ; Laidlaw et Goss, 1990 ; Woyke, 1991 et de nombreux autres auteurs). Néanmoins l'appareil à insérer reste un outil relativement compliqué et coûteux. Nous présentons ici un nouvel appareil, très simple et peu coûteux à produire à partir de pièces disponibles dans le commerce. L'outil (fig 1A, B) comporte un disque en latin plein, évité par dessous (fig 1B, 1 + 2) avec une perforation oblique de 6 mm (3) qui aboutit à une perforation latérale où arrive le CO₂ (4). L'arrêt (5) du tube de contention de la reine est enfoncé (ou vissé) dans la perforation selon Laidlaw-Goss (1990). Un nouveau crochet ventral (10), constitué d'un fil en acier spécial (0,2 mm) recourbé, est soudé à une boucle métallique (9) qui enserre le tube de contention de la reine (8). Pendant qu'on envoie le CO₂, on fait entrer la reine dans le tube de contention (8) qui repose sur l'anneau de caoutchouc de l'arrêt (7) (le côté dorsal de

chen den Einsatz einer größeren Anzahl Gerätes nach ergonomischen Gesichtspunkten ist möglich. Alle Besamungsspritzern mit entsprechender Halterung können verwendet werden. Die Justierung der Spritze zum Einführen in die Geschlechtswege ist einfach. Da die Königin nunmehr bei der Besamung langgestreckt wird und ihr Genitaltrakt nicht, wie bisher, bajonetförmig geknickt ist (Rüttner, 1975), wird die Besamungsspritze in Verlängerung der Königinenachse ausgerichtet. Durch das Sichtbarwerden der Vaginalöffnung beim Bewegung des Stachels wird der Zeitpunkt für die Spritze eindeutig vorgegeben und diese kann ohne Behinderung durch Haken eingeführt werden. Es konnte durch die Vaginalöffnung beobachtet werden, wie sich die dahinterliegende Scheidenklappe durch Hochziehen des Stachels niederlegen bzw wieder aufrichten läßt.

In tünfähriger Praxis mit der 'flexiblen Besamungsmethode' zeigte sich, daß bei Besamungen mit gleicher Erfolgsrate bei 20%iger Zeitersparnis durchgeführt werden können.

In Besamungskursen an der Universität von West Sydney (Hawkesbury), Australien und in den Forschungsinstituten in Kirchapparel, très simple et peu coûteux à produire à partir de pièces disponibles dans le commerce. L'outil (fig 1A, B) comporte un disque en latin plein, évité par dessous (fig 1B, 1 + 2) avec une perforation oblique de 6 mm (3) qui aboutit à une perforation latérale où arrive le CO₂ (4). L'arrêt (5) du tube de contention de la reine est enfoncé (ou vissé) dans la perforation selon Laidlaw-Goss (1990). Un nouveau crochet ventral (10), constitué d'un fil en acier spécial (0,2 mm) recourbé, est soudé à une boucle métallique (9) qui enserre le tube de contention de la reine (8). Pendant qu'on envoie le CO₂, on fait entrer la reine dans le tube de contention (8) qui repose sur l'anneau de caoutchouc de l'arrêt (7) (le côté dorsal de

DANKSAGUNG

Diese Arbeit ist Prof. F. Rüttner zum 80. Geburtstag gewidmet, der ein Wegbereiter auf dem Gebiet der instrumentellen Besamung von Bienenköniginnen ist. Wir danken N. Koeniger und S. Fuchs für Unterstützung und wertvolle Diskus-

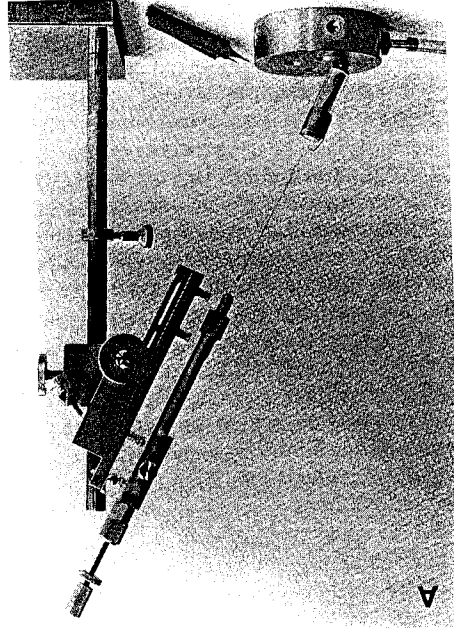
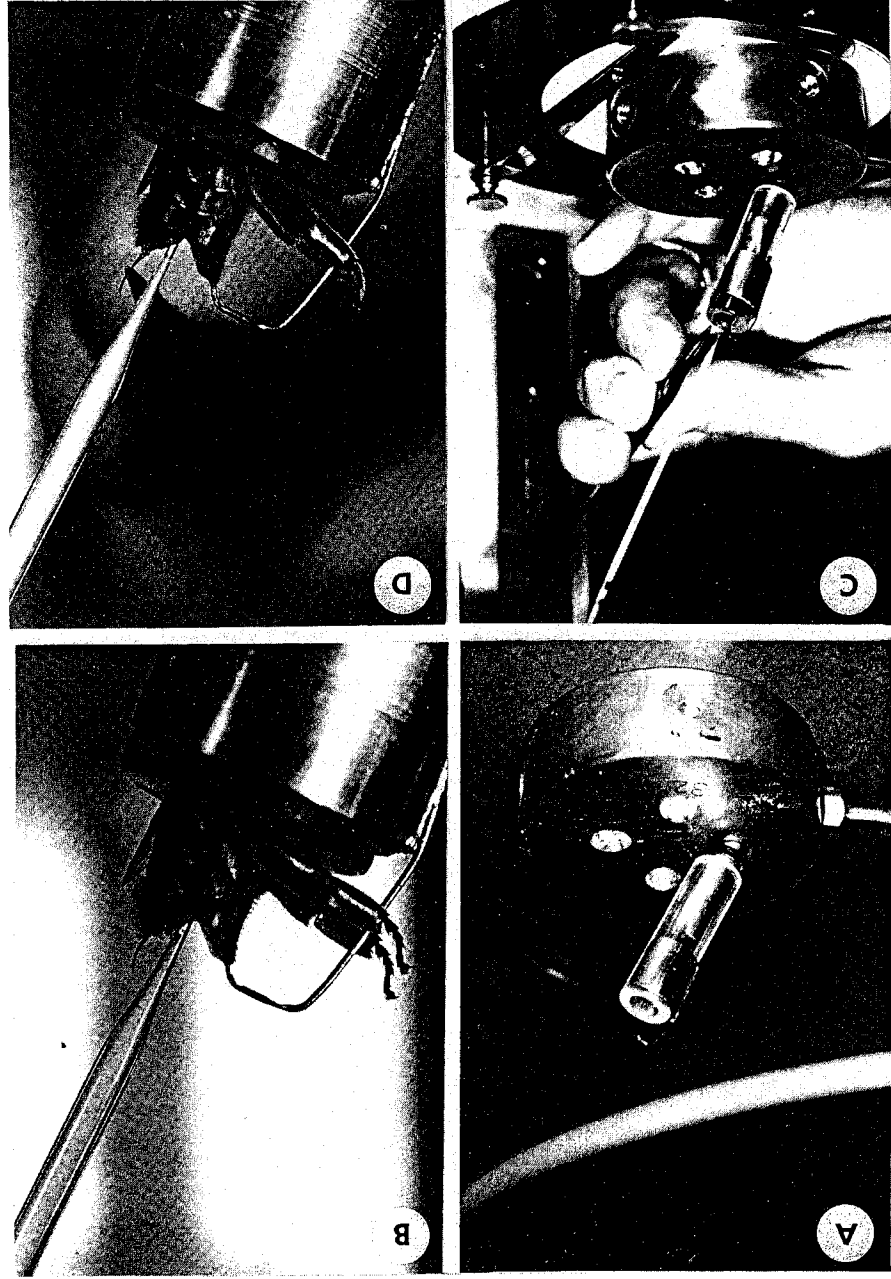


Fig 1.A. Complete insemination apparatus with queen block and syringe holder.

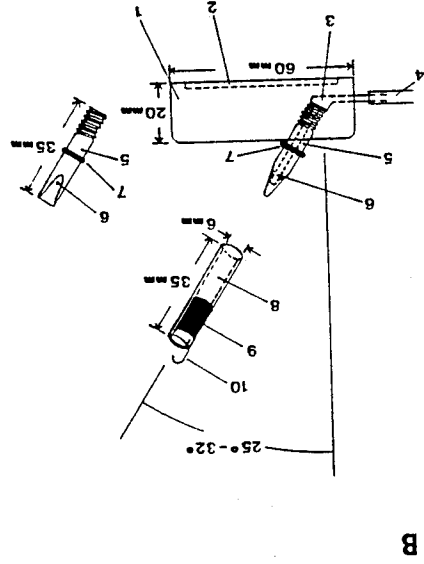


Fig 1.B. The parts of the insemination apparatus: 1 = base plate; 2 = recessed bottom; 3 = slanting hole; 4 = CO₂ access; 5 = stopper; 6 = CO₂ outlet; 7 = rubber o-ring; 8 = acrylic tube; 9 = metal clasp; 10 = ventral hook.

Abb 1.B. Die Teile des Besamungapparates: 1 = runde Messingscheibe; 2 = Aussparung; 3 = schräge Bohrung; 4 = CO₂-Zutühr; 5 = Stopper; 6 = CO₂-Austritt; 7 = Gummiring; 8 = Acrylrohrchen; 9 = Metallsperre; 10 = Drahthaken (Ventralhaken).

Fig 2.A-D. Insemination procedure. A. The clasp with ventral hook is slid towards the upper end of the queen holding tube ready for introduction of the queen. B. The clasp around the queen holding tube is lowered until the ventral hook catches the sternum of the queen and the semen syringe is aligned with the queen's abdomen. C. With the left hand the sling is gassed with fine forceps from the rear of the apparatus (or the front). D. By pulling the sling up and moving dorsally the vaginal orifice becomes visible and the syringe can be inserted.

Abb 2. A-D. Besamungsvorgang. A. Zum Einlaufen der Königin in das Halterörchen wird der CO₂-Zutührer mit dem Ventralhaken in das Halterörchen bis zum oberen Ende geschoben. B. Die Sperre, die das Königinnenhalterörchen umgreift wird heruntergeschoben, bis der Ventralhaken das Sternit der Königin greift. C. Mit einer feinen Pinzette wird der Stachel der Königin gefaßt; dabei ruht die ausführende, linke Hand hinter (oder vor) dem Königinnenblock. D. Durch das Anheben und Bewegen des Stachels nach dorsal wird die Königin gesteckt und die Vaginaöffnung wird sichtbar, so daß die Spritze leicht eingeführt werden kann.

REFERENCES

- Mortiz RFA (1989) *Die instrumentelle Besamung der Bienenkönigin*. Apimondia Publishing House, Bucharest, 191 p
- Nolan WJ (1932) Breeding the honeybee under controlled conditions. *USDA Techn Bull No 326*, 490 p
- Nolan W J (1937a) *Bee breeding*. USDA Year-book 1396-1418
- Nolan W J (1937b) Improved apparatus for insemination queen bees by the Watson method. *J Econ Entomol* 30, 700-105
- Rutner F (1975) *Die instrumentelle Besamung der Bienenkönigin*. Apimondia Publishing House, Bucharest, 122 p
- Rutner F, Schneider H, Fresnaye J (1974) Standardapparat zur instrumentellen Besamung der Bienenkönigin. *Apidologie* 5, 357-369
- Schaffnerhans F (1987) Instrumentelle Besamung der Bienenkönigin, ein Beitrag zur Verbesserung der Technik. *Imkerei und 12*, 508-509
- Schley P (1982) Neue Kolbenbesamungsspritze mit Sichtkontrolle und auswechselbaren Einsätzen. *Allg Dtsche Imkerztg* (4), 107
- Schley P (1983) *Praktische Anleitung zur instrumentellen Besamung von Bienenköniginnen*. Selbstverlag Giessen
- Schley P (1988) An important improvement in the insemination technique of queen honey bees. *Am Bee J* 128, 282-284
- Woyke J (1971) Correlations between the age at which honeybee brood was grafted, characteristics of resultant queens and results of insemination. *J Apic Res* 10/1, 45-55
- Woyke J (1991) Syringe guide for instrumental insemination apparatus of queen bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 22, 81-85
- USDA Bull Entomol and Plant Quar ET-250
- Mackensen O, Roberts WC (1948) *A manual for the artificial insemination of queen bees*. honey bees. *J Econ Entomol* 57 (4), 581-583
- Mackensen O (1964) Relation of semen volume to success in artificial insemination of queen bees. *J Econ Entomol* 57 (4), 581-583
- Am Bee J 130 (11), 734-737
- Laidlaw HH, Goss JR (1990) Laidlaw-Goss queen bee pre-set artificial insemination instrument. *Am Bee J* 117, 428-432
- Laidlaw HH, Lorenzen C (1977) Laidlaw Instrumental Insemination Instrument. *Am Bee J* 114 p
- Laidlaw H H (1977) *Instrumental insemination of Honey Bee Queens*. Dadant and Sons, Inc Hamilton, Ill, 144 p
- Laidlaw H H (1949) Development of precision instruments for artificial insemination of queen bees. *J Econ Entomol* 42/2, 254
- Laidlaw H H (1944) Artificial insemination of the queen bee (*Apis mellifera* L.): Morphological basis and results. *J Morphol* 74, 429-465.
- Laidlaw H H (1944) Artificial insemination of the queen bee (*Apis mellifera* L.): Morphological basis and results. *J Morphol* 74, 429-465.
- Laidlaw H H (1944) Artificial insemination of the queen bee (*Apis mellifera* L.): Morphological basis and results. *J Morphol* 74, 429-465.
- Apicta XXVI (1), 2-7
- Kühnert M (1991) Demonstration of new techniques using instrumental insemination. Apimondia Publ House, 467-474.
- 32 Int Congr Apic Rio de Janeiro, Bucharest
- Kühnert M (1989) *Demonstration neuer Techniken bei der instrumentellen Besamung*. Proc
- Koeniger G (1984) Funktionsmorphologische Befunde bei der Kopulation der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 15, 189-204
- Harbo JR (1985) Instrumental insemination of queen bees-1985. *Am Bee J* 125, 197-202; 282-287