

Université de Neuchâtel

Institut de zoologie

Adaptations comportementales
de l'acarien ectoparasite *Varroa jacobsoni*
durant sa phase de reproduction
dans les alvéoles operculées
de l'abeille mellifère
Apis mellifera

Behavioural attributes of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* during its
reproductive phase in the brood of the honeybee *Apis mellifera*

par
Gérard Donzé
1995

Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
pour obtenir le titre de docteur ès sciences

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Adaptations comportementales de l'acarien ectoparasite
Varroa jacobsoni durant sa phase de reproduction dans
les alvéoles operculés de l'abeille mellifère *Apis mellifera*

de M. Gérard Donzé

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

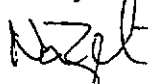
La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

MM. P.-A. Diehl et P. Guerin, H. Richner (Berne), A. Imdorf
(Liebefeld) et J. Baumgärtner (Coire)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 22 août 1995

Le doyen,



H.-H. Nägeli

*Je ne sais comment les autres me
jugeront. Mais pour moi, il me semble
n'avoir été qu'un enfant occupé à jouer sur
le rivage, content de découvrir de temps en
temps un galet plus lisse, un coquillage
plus beau, tandis que le grand océan de la
vérité s'étendait devant lui tout entier
inconnu.*

Isaac Newton

A Christine,
Adrien et Camille

Sommaire

	page
I. Introduction	
Cycle biologique de l'hôte <i>Apis</i> ssp	7
Cycle biologique de <i>Varroa jacobsoni</i>	9
<i>Apis cerana</i> et <i>Varroa jacobsoni</i> : hôte et parasite	14
Adaptations morphologiques de <i>Varroa</i>	16
Pathologie causée par <i>Varroa</i> chez <i>A. mellifera</i>	17
Les cousins systématiques et évolutifs de <i>Varroa</i>	18
Propos de cette étude	19
 II. Matériel et méthodes	
Animaux	21
Cellules artificielles et infestation par <i>Varroa</i>	21
Observations des cellules artificielles	25
Utilisation de l'espace dans l'alvéole	26
Activité de nutrition et compétition au lieu de nutrition	27
Géotaxisme	28
Survie des protonymphes en l'absence des <i>Varroa</i> infestantes	28
Analyse des trajets	29
Accouplements et fertilisation	29
Succès de reproduction dans les cellules naturelles	30
Analyse statistique	30
 III. Résultats.	
Les résultats sont divisés en quatre chapitres reconnaissables aux en-têtes suivantes: "Reproductive phase"; "Behavioural activity"; "Reproductive success"; et "Feeding site occupancy". Chaque chapitre est structuré sous la forme classique des publications scientifiques.	
1 ^{ère} partie: publication	
Behavioural attributes and parental care in <i>Varroa</i> mites parasitizing honeybee brood (Reproductive phase)	
Abstract	33
Introduction	33

Methods	34
Results	
From cell capping to pupation	35
Fecal accumulation	35
Oviposition	37
From pupation to bee emergence	38
<i>Varroa</i> mothers reactions to bee pupation	38
Eggs and developmental stages	38
Feeding pattern of <i>Varroa</i> mother	39
Establishment and importance of the feeding site	39
Competition at the feeding site	40
Multiinfested cells	40
<i>Varroa</i> 's use of the structured living space	41
Discussion	
Behaviors leading to establishment of the fecal accumulation	42
Significance of the fecal accumulation	42
Special oviposition adaptations	43
The single feeding site	43
Behavior and space structuring	43
Group behavior in <i>Varroa</i>	44
Consequences for <i>Varroa</i> as a parasite	45
References	45

2^{ème} partie

Time-activity budgets of the infesting female and of different life stages of offspring of *Varroa jacobsoni* in the honeybee capped brood (Behavioural activity)

Introduction	48
Material and methods	
Behavioural observations	49
Observations periods on the infesting female	50
Observations on offspring	50
Analysis	51
Behaviour time budget	51
Principal components analysis	51
Results	
Time spent on the cell wall <i>versus</i> on the bee	54
Behaviour of the <i>Varroa</i> mother	55

Protonymphs	58
Deutonymphs	60
Female and male adult descendants	61
Other types of behaviour	61
Moulting sites	61
Principal component analysis	64
Discussion	
Nymph behaviour	66
Behaviour of the infesting female	67
Behavioural convergence	69

3^{ème} partie: manuscript

The rate of infestation of brood cells and mating frequency affects the reproductive success of the honeybee parasite

Varroa jacobsoni (Reproductive success)

Abstract	71
Introduction	72
Material and methods	
Behavioural observations	74
Mating and fertilization	74
Reproduction in natural brood cells	75
Reproductive success and fitness	76
Frequency distribution of infestation rates	76
<i>Varroa</i> reproductive success in drone <i>versus</i> worker brood	77
Results	
Mating	78
Mating and fertilization	79
Reproduction in natural brood cells	80
Infestation pattern	81
Aggregated distributions and reproductive success	82
Discussion	
Reproduction in natural brood cells	82
<i>Varroa</i> 's mating and fertilization strategy	84
<i>Varroa</i> 's frequency distribution in cells and reproductive success	86
References	89
Figures and tables	93

4^{ème} partie

Can over-occupancy of the feeding site lead to a reduction of the *Varroa* population in one cell? (Feeding site occupancy)

Introduction	100
Material and methods	
Oviposition rate	101
Feeding pattern	101
Simulations of feeding site occupancy	102
Results	
Oviposition rate	103
Feeding pattern	103
Simulations of the feeding site occupancy	106
Discussion	106

IV. Discussion

Alvéoles artificielles	109
Adaptations au parasitisme ou régressions?	110
Gestion de l'espace	112
Ponte et développement	116
Induction et arrêt de la ponte	118
Sexe ratio	120
Le sexe ratio chez <i>Varroa</i> est-il adaptatif?	121
Nombre d'oeufs	123
Distribution des <i>Varroa</i> dans les alvéoles	126
Facteurs proximaux	126
Facteurs ultimaux	129
En conclusion	130

V. Références	131
---------------	-----

VI. Remerciements	145
-------------------	-----

VII. Summary	147
--------------	-----

VIII. Résumé	150
--------------	-----

I Introduction

L'association entre des espèces d'acariens et d'autres arthropodes n'est pas rare, et présente une très grande diversité quant aux méthodes d'attachement et au type d'adaptations existantes (Eickwort 1990; Hunter et Rosario 1988; OConnor 1982). A l'exception de quelques espèces, nos connaissances concernant leur biologie sont fragmentaires. Ceci n'est toutefois pas le cas de *Varroa jacobsoni* Oudemans 1904 (Acari: Mesostigmata: Varroidae) (Delfinado et Baker 1974) qui, depuis 20-30 années fait l'objet d'un grand nombre de recherches.

Originaire d'Asie, *Varroa* parasite l'abeille eusociale *Apis cerana* Fabricius 1793 dont l'aire de répartition est séparée de celle d'*Apis mellifera* L. 1758 par les zones désertiques d'Iran et d'Afghanistan. La relation existante entre l'abeille indienne *A. cerana* et l'acarien est dans un état d'équilibre, si bien qu'aucune perte de colonie due à ce parasite n'a été mentionnée (Rademacher 1990; Robaux 1986).

L'importation, pour leur plus fort rendement en miel, de colonies d'*A. mellifera* en Asie a permis la colonisation de ce nouvel hôte par *Varroa*. Les mécanismes de résistance de l'hôte et d'adaptation du parasite, ne sont pas en équilibre dans la relation *A. mellifera* - *V. jacobsoni* et ce dernier est devenu un ravageur pour l'apiculture. L'attention portée à *Varroa* s'est accentuée au fur et à mesure que, par le biais de transport de colonies, son aire de distribution s'étendait à tous les continents (Bradbear 1988; De Jong et al. 1982a; Grobov 1977; Mateson 1993).

Dans ce contexte, l'étude de *Varroa* peut être orientée vers son aspect apicole, c'est-à-dire les moyens à mettre en oeuvre pour se prémunir des dégâts aux ruches, ou bien être orientée vers la connaissance des aspects adaptatifs de la relation abeille - acarien. La présente étude est consacrée à la phase de reproduction de l'acarien et met l'accent sur le fait que *Varroa* est obligatoirement associé aux espèces du genre *Apis* ssp.

Dans le but de permettre au lecteur une compréhension rapide des résultats de mon étude, j'introduirai dans les prochains chapitres un certain nombre de données sélectionnées sur la biologie de l'hôte et du parasite, ainsi que certaines de mes observations sur le développement de l'abeille.

Cycle biologique de l'hôte *Apis* ssp

Varroa doit être considéré comme un parasite obligatoire du genre *Apis* ssp. Bien que sa présence chez d'autres groupes systématiques d'insectes ait été mentionnée, elle est purement accidentelle et ne représente aucune partie de son cycle biologique (Kevan & al. 1990). Les abeilles du genre *Apis* ssp sont caractérisées par des colonies eusociales pérennes, qui stockent des réserves alimentaires (miel, pollen) pour survivre aux saisons d'hivernage. Les colonies ne se multiplient que par essaimage, c'est-à-dire que la reine et une partie des ouvrières quittent la ruche pour un nouveau lieu de nidification, tandis que les ouvrières restantes élèvent une nouvelle reine. Durant la période d'essaimage, afin que les jeunes reines puissent être fécondées, les colonies produisent des faux-bourçons. Les accouplements se déroulent lors de vols nuptiaux durant lesquels les reines rejoignent les congrégations de mâles. Les reines stockent dans leur spermathèque le sperme de plusieurs mâles. Il en résulte qu'une ruche est composée d'ouvrières ayant la même mère mais pas forcément le même père (demi-soeurs).

Les colonies des régions tropicales effectuent également des migrations. Durant la superscédure (absconding), la colonie entière abandonne le lieu de nidification et le couvain qu'il contient afin de rejoindre une région où la nourriture est abondante. Chez *A. cerana*, selon le climat, l'élevage du couvain d'ouvrière peut avoir lieu toute l'année tandis que le couvain de faux-bourçons est présent entre novembre et avril puis parfois en mai - août en Thaïlande (Rath 1991a) ou de février à mai dans le nord de l'Inde (Tewarson et al., 1992). Chez *A. mellifera*, en Europe tempérée, le couvain d'ouvrières apparaît lentement en janvier - février, atteint un maximum en mai - juin (Imdorf et al., 1987) et disparaît en octobre. Le couvain de faux-bourçons est présent entre fin avril et début juillet.

Le développement de l'abeille est constitué d'une première phase, dite du couvain ouvert, représentée par l'oeuf, et cinq stades larvaires. Les larves se trouvent à la base de l'alvéole (partie hémisphérique), couchées sur un côté et enroulées de telle manière que la zone anale rejoigne la tête. Rappelons que dans la ruche, l'axe longitudinal des alvéoles est incliné de 5-8 degrés par rapport à l'horizontale. Les larves baignent dans la gelée larvaire et sont nourries par des ouvrières âgées de 3-15 jours post-émergence (Brouwers et al. 1987; Lindauer 1952, 1953; Seeley, 1982).

La deuxième phase, dite du couvain operculé, débute lorsque les alvéoles sont operculées, soit 8-8½ jours après la ponte des oeufs d'ouvrières, (9 jours pour les faux-bourçons). A cette période, la larve qui est au cinquième stade, commence à se dérouler par un mouvement en spirale, puis, après avoir ingéré les restes de gelée, elle se met à tisser son cocon qu'elle applique contre la paroi de la cellule (Jay 1964). Lors du tissage du cocon, la larve est continuellement en mouvement, le dos plaqué à la paroi de l'alvéole et effectue des roulés-boulés, tandis que la tête oscille de gauche à droite en appliquant la soie produite par ses glandes séricigènes. Dès 10 heures post-operculation (**hpo**), le septum entre l'intestin moyen et postérieur se rompt et la larve émet ses excréments (Snodgrass 1956). Ceux-ci sont toujours déposés contre la paroi à la base de l'alvéole. Le tissage du cocon se termine 33-36 hpo chez l'ouvrière (48-52 hpo chez le faux-bourçon) et est suivi du stade de prépupe (Streckmade). La prépupe est couchée sur le dos, la zone anale remplit la base de l'alvéole et la tête est orientée vers l'opercule. Selon Jay (1963), la prépupe s'oriente grâce à la différence de rugosité des 2 extrémités de l'alvéole (base de la cellule et opercule). Notons qu'au début du stade prépupe, et pour une période d'environ 6 - 10 heures, la prépupe effectue régulièrement les mouvements suivants: elle étend et raccourcit ses segments abdominaux et ainsi se meut d'avant en arrière. De plus, des contractions latérales des segments abdominaux provoquent une reptation latérale et la larve monte ainsi sur le côté de l'alvéole jusqu'à un angle de plus de 90°.

Comme nous le verrons dans les résultats, la métamorphose de la prépupe en pupe (pupation) ne dure que 30-40 minutes et transforme radicalement l'espace occupé par l'abeille. Contrairement à un grand nombre de représentations trouvées dans la littérature, la pupe a approximativement le même diamètre que l'alvéole (figure 1, chapitre Reproductive phase), ce qui ne laisse que peu

d'espace libre pour le parasite. La description détaillée de la pupation est donnée par Jay (1962b) et se déroule dans la présente étude à 93 hpo et à 121 hpo pour respectivement le couvain d'ouvrières et de faux-bourçons (environ 88 hpo chez les ouvrières, Rosenkranz 1990a, au Brésil). La jeune pupe, qui est totalement blanche, va progressivement se teinter, ce qui permet d'estimer son âge (Jay 1962a). De plus, son volume diminue quelque peu et sa cuticule se sclérotise.

Suite à la mue imaginale, l'abeille reste dans l'alvéole durant 10-20 heures et est très active, effectuant des rotations dans l'axe longitudinal et exerçant ses pattes et ses pièces buccales qu'elle utilisera pour inciser l'opercule. L'émergence de la jeune abeille se déroule vers 270-290 hpo chez les ouvrières (Büchler 1990; Rosenkranz 1990) et vers 330 hpo pour les faux-bourçons (Moritz et Jordan 1992). Chez *A. cerana*, le couvain reste operculé durant respectivement 265 et 338 heures (Nguyen Quang Tan 1992, au Vietnam).

Cycle biologique de *Varroa jacobsoni*

Durant la ou les périodes d'hivernage, seules les femelles *Varroa* parasitent les abeilles adultes. Puis, lorsque la colonie élève du couvain, elles infestent des cellules de couvain pour s'y reproduire. A la fin de l'hiver, le taux de femelles fertiles est bas puis augmente progressivement (Otten 1991). Les femelles *Varroa* infestent le couvain en se glissant sous la larve d'abeille durant une période de 20 heures (ouvrières) ou 40 heures (faux-bourçons) précédant l'operculation de l'alvéole (Boot et al. 1992; Ifantidis 1988). Sous la larve d'abeille, *Varroa* reste immergée dans la gelée larvaire et est ainsi à l'abri des abeilles (Ifantidis 1988). Le processus d'infestation des alvéoles a été principalement étudié sous l'aspect de l'attraction chimique (Le Conte et al. 1989; Rickli et al. 1992, 1994; Rosenkranz 1990a) et n'a fait l'objet que de peu d'observations *in vivo* (Boot et al. 1992, 1994). Ainsi plusieurs substances chimiques attractives pour *Varroa* et extraites de la cuticule de larves d'abeilles ont été mises en évidence.

Dans des olfactomètres, les esters palmitate de méthyle, linoléate de méthyle, et palmitate d'éthyle (Le Conte et al. 1989) ainsi que l'acide palmitique (Rickli et al. 1992) attirent les femelles *Varroa*. Les esters sont présents sur les larves des deux sexes, mais en plus grande concentration chez les faux-bourçons, ce qui pourrait en partie expliquer le taux d'infestation huit fois supérieur dans le couvain

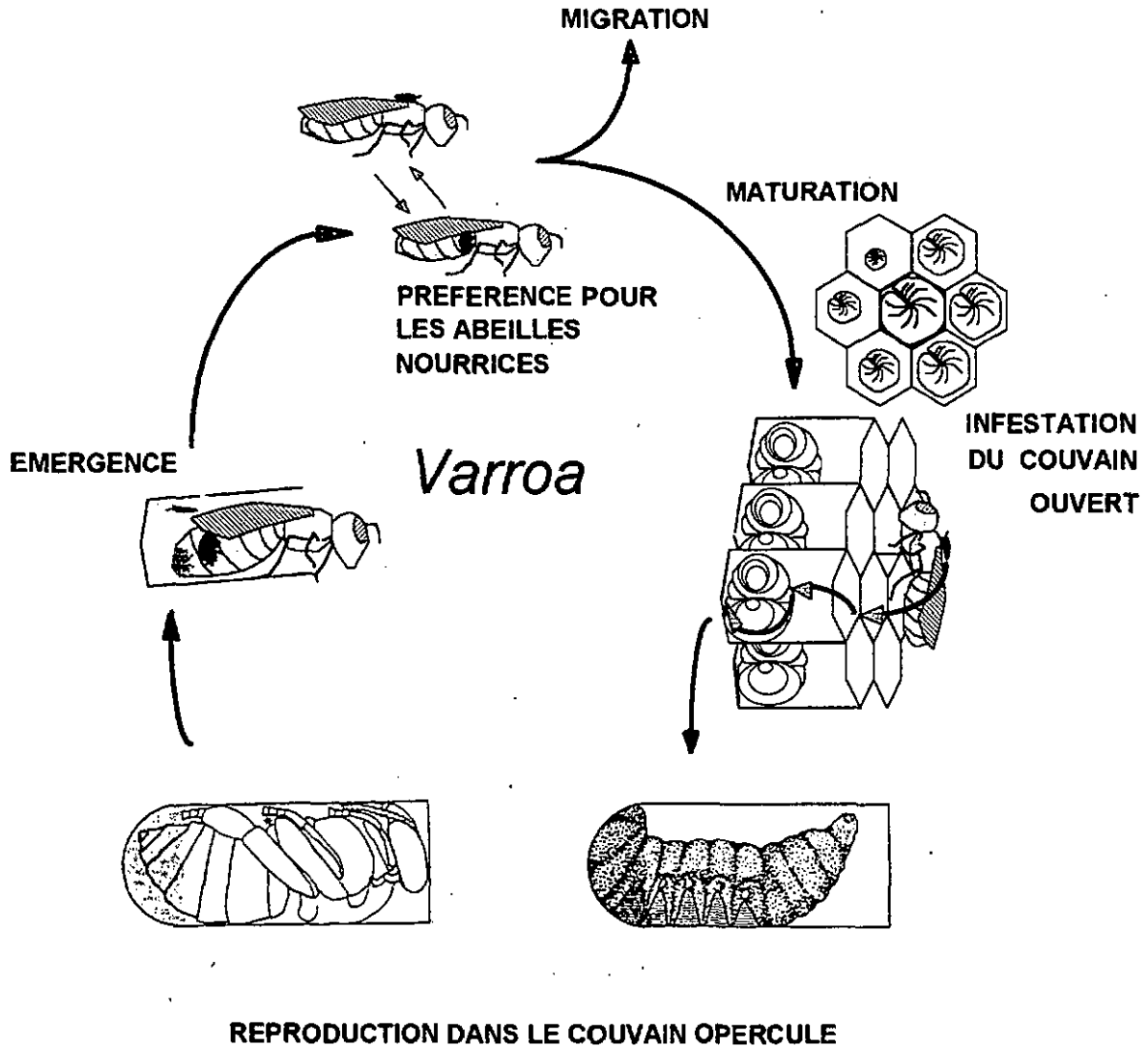


Figure 1.1 Cycle biologique de *Varroa*. Chaque femelle peut effectuer plusieurs cycles au cours de sa vie. Seules les *Varroa* femelles parasitent les abeilles adultes. A la fin du cycle de reproduction elles délaissent les abeilles émergentes au profit d'abeilles d'âge moyen. La position sur l'hôte est de préférence sous la tergite latérale gauche entre le 2-3^{ème} segment abdominal. Durant cette phase une faible proportion de *Varroa* émigre avec son hôte dans des colonies voisines. Pour se reproduire, les acariens vont infester une alvéole de couvain ouvert peu avant son operculation. La larve d'abeille est au cinquième stade et remplit toute la base de l'alvéole si bien que le parasite doit littéralement forcer son entrée entre la paroi de l'alvéole et la larve. *Varroa* se glisse jusqu'à ce qu'elle atteigne la gelée larvaire à la base de l'alvéole. La phase de reproduction débute lorsque l'alvéole est operculée, que l'abeille consomme le reste de gelée larvaire et ainsi permet au parasite de s'agripper à son hôte. Je décris dans les résultats ce qui se déroule dans l'alvéole. A l'émergence de la jeune abeille, les femelles adultes et parfois d'autres stades (nymphe, mâles) quittent l'alvéole seules ou sur l'abeille; mais seules les femelles sont capables de survivre dans la colonie. Les restes dans les alvéoles sont nettoyés par les ouvrières.

de mâles (Schulz 1984; Fuchs 1990). Selon Le Conte & al. (1990), deux de ces esters représentent un signal chimique qui induit l'operculation des alvéoles par les ouvrières. Leur quantité augmente fortement avant cet événement pour diminuer ensuite (Trouiller et al. 1991, 1992). Récemment, d'autres propriétés phéromonales des esters larvaires ont été mises en évidence. Par contact, par diffusion ou par ingestion, les dix esters que compte l'extrait larvaire inhibent le développement ovarien d'ouvrières d'abeilles maintenues en cagettes (Arnold et al. 1994). De plus, ces esters augmentent la sécrétion par les ouvrières de gelée larvaire et agissent sur le titre d'hormone juvénile (Le Conte comm. pers.). La reconnaissance et l'utilisation de ces substances olfactives par l'hôte et le parasite, rend leur utilisation difficile dans la lutte contre *Varroa*.

Les réactions de *Varroa* lorsqu'il se déplace sur un extrait de larves d'abeilles au cinquième stade ont été étudiées par Matthias Rickli. Sur une membrane de baudruche, une zone annulaire est traitée avec un extrait cuticulaire de larves. Les *Varroa* qui se déplacent sur cet anneau évitent de le quitter en retournant sur eux-mêmes lorsqu'ils arrivent au bords (arrestment). Cette réaction gustative est induite par l'hydrocarbure saturé n-C₂₁:0 (heneicosane) lorsqu'il est appliqué seul. De plus, une forte synergie est observée en présence de plusieurs hydrocarbures saturés dont la chaîne carboxyle est de 19 à 27 atomes de carbone. Ces molécules sont présentes sur la cuticule de la larve d'abeille (Rickli et al. 1994).

Les substances modifiant le comportement de *Varroa* n'ont toutefois pas été testées quant à l'induction de ce fantastique comportement qui consiste à ce qu'une femelle *Varroa* se glisse sous la larve d'abeille. Comme je l'ai observé 3 fois, l'acararien se fraye activement un passage entre la paroi de la cellule et les bourrelets pleuraux qu'il compresse. Sa progression continue jusqu'à atteindre la gelée larvaire. Ce comportement a une similitude flagrante avec celui de se glisser entre les tergites des abeilles adultes. Dans les deux cas des stimuli mécaniques pourraient être utilisés par le parasite.

Au moment de l'operculation, l'ovaire des femelles fertiles contient environ 30 oocytes; l'un d'eux mesure environ 80 µm de diamètre, les autres 20 µm. Ce dernier poursuit sa croissance cytoplasmique (pré-vitellogénèse) peu après

l'operculation (Akimov et al. 1990; Steiner 1992a,b; Steiner et al. 1994).

L'induction de l'oogenèse semble clairement liée aux premières heures suivant l'operculation puisque les *Varroa* expérimentalement introduites ultérieurement dans le couvain operculé (>10 hpo) voient leur taux d'infertilité augmenter fortement (Rosenkranz 1990a; Beetsma & Zonneveld 1992). A environ 65 hpo, la femelle *Varroa* pond le premier oeuf qui contient un embryon haploïde au stade de protonymphe, et qui se développera en mâle (parthénogenèse arrhénotoque) (Ifantidis 1983; Rehm 1988; Rehm et Ritter 1989; de Rujter et Pappas 1983; Steiner et al. 1982).

L'oogenèse du deuxième oeuf reprend à environ 25 hpo de telle manière que la ponte est étagée dans le temps, avec un oeuf toutes les 28-36 heures (Ifantidis 1983; Rehm 1988). Seul le premier oeuf de chaque cycle de reproduction est haploïde (mâle), tandis que tous les descendants suivants sont diploïdes et se développent en femelles. La conséquence de l'étagement de la ponte dans le temps est que les descendants matures l'un après l'autre. Il en résulte que le succès d'un cycle de reproduction est dépendant de la durée à disposition. Celle-ci est déterminée par le développement de l'abeille et par conséquent le nombre de descendants qui atteignent le stade adulte sera supérieur dans le couvain operculé de faux-bourçons, d'une durée de 14-15 jours, que dans celui d'ouvrières qui dure 11-12 jours (fig. 1, chapitre Reproductive phase).

Le développement post-embryonnaire de *Varroa* passe par deux stades nymphaux (proto- et deutonymphes) constitués chacun d'une phase mobile et d'une phase immobile. La description de ces stades est donnée par un grand nombre d'auteurs (Hirschmann 1980; Ifantidis 1983; Delfinado-Baker 1984; Haragism et Samsinak 1986; Nannelli 1986; Robaux 1986; Rehm 1988; Steiner 1988): ici nous noterons que la mue imaginale est caractérisée par une exuvie coriace. Ces exuvies nous permettront de déterminer le nombre de femelles filles adultes. En effet, elles passent du jaune-brun au brun foncé en l'espace de 24 - 48 heures, après quoi elles se confondent avec la mère.

Les descendants adultes copulent avant l'émergence de l'abeille. Le déroulement de l'accouplement n'est pas connu, mais selon certaines observations, ainsi que les caractéristiques anatomiques des femelles et des mâles, il s'apparenterait à la podospermie, fréquente chez les mésostigmates

(Athias-Henriot, 1969; Alberti et Hänel 1986). Le mâle *Varroa* possède des chélicères modifiés en spermadactyle (Akimov et al. 1988; Ifantidis et Rosenkranz 1988), avec lesquels il introduit le sperme dans les solénostomes de la femelle. Ce sont des pores situés à la base des pattes III - IV et qui communiquent avec la spermathèque par des canaux (rami et sacculi) le long desquels migreront les prospermatozoides. Ceux-ci sont stockés dans la spermathèque où ils terminent leur maturation (Alberti et Hänel 1986).

La phase de reproduction est interrompue par l'émergence de l'abeille et seules les femelles adultes (générations parentale et fille) survivent dans la ruche, où elles parasitent les abeilles adultes. Les acariens délaissent rapidement les abeilles émergeantes au profit d'abeilles âgées de 5 - 12 jours (Kraus et al. 1986; Kraus 1993; Le Conte et Arnold 1987; Steiner 1993). Sur les abeilles adultes, il est intéressant de noter que les *Varroa* se trouvent de préférence sur le côté gauche de l'abeille et principalement entre les tergites abdominaux II et III (Delfinado-Baker et al. 1992).

La phase de parasitisme sur les abeilles adultes semble varier de quelques jours à plusieurs semaines et ceci même lorsque du couvain est disponible (Calis et al. 1991; Boot et al. 1993). Cette phase influence positivement la fécondité des femelles *Varroa* (Beetsma et Zonneveld 1992). Entre les cycles successifs de reproduction elle ne semble pas être une condition à la ponte d'oeufs (de Ruyter 1987). La régulation des infestations du couvain par les parasites est également dépendante du cycle biologique de l'hôte. Par exemple en automne, lorsque la population d'acariens est forte et que la quantité de couvain diminue, celui-ci n'est pas infesté par tous les acariens. Ce comportement évite que *Varroa* surparasite le couvain produit à cette période. De plus, lorsqu'expérimentalement, on empêche la reine de pondre, le taux de *Varroa* fertiles diminue progressivement et l'oocyte de taille supérieur observé dans l'ovaire des *Varroa* rapetisse (Steiner 1992a). La libération de la reine rétablit la fertilité des femelles dans les 35 jours (Rosenkranz 1990a). Cette situation pourrait être similaire à celle rencontrée naturellement à la fin de l'hivernage lorsque la colonie recommence à élever du couvain.

On sait que l'état physiologique des abeilles d'hiver est différent de celles d'été. Le titre d'hormone juvénile III augmente brusquement avec l'âge chez les

abeilles d'été alors qu'il reste bas chez les abeilles d'hiver. Les glandes hypopharyngiales sont développées chez les abeilles d'été mais pas chez celles d'hiver. Par contre, la quantité de protéines (titre total) et de vitéllogénine dans l'hémolymph est faible chez les abeilles d'été mais élevé chez celles d'hiver (Fluri et al. 1982).

Lorsque la colonie est privée de couvain en été l'état hormonal des ouvrières devient semblable à celui des abeilles d'hiver (Bühler et al. 1983; Fluri et al. 1982), alors cette situation pourrait pareillement influencer la biologie du parasite.

***Apis cerana* et *Varroa jacobsoni* : hôte et parasite**

Des 70 colonies d'*A. cerana* traitées par Rath (1991) en Thaïlande, 56 contenaient moins de 100 *Varroa*, le nombre maximum d'acariens était de 798 et le nombre moyen de 70. Une seule colonie ne contenait pas d'acarien. En Europe, des colonies traitées chaque année peuvent contenir plusieurs milliers d'acariens en automne et meurent deux ou trois années après l'infestation en l'absence de traitement. Ce contraste est le résultat de plusieurs mécanismes de défense observés chez *A. cerana* et qui n'existent pas ou faiblement chez *A. mellifera* en Europe.

Premièrement, les acariens qui parasitent les abeilles adultes sont attrapés par les ouvrières, puis blessés à l'aide des mandibules (Peng et al. 1987a,b; Bühler et al. 1992). La détection des *Varroa* par *A. cerana* est probablement de nature chimiosensorielle car elle est plus forte lorsque les acariens proviennent de colonies d'*A. mellifera* (Bühler et al. 1992; Rosenkranz et al. 1993b). Puisque les proportions des hydrocarbures cuticulaires de l'acarien se modifient en fonction du stade de développement de l'hôte parasité (Nation et al. 1992) on peut admettre que *Varroa* adopte un revêtement cuticulaire similaire à celui de son hôte (mimétisme). Ceci diminue les risques de se faire détecter.

Deuxièmement, les ouvrières d'*A. cerana* ouvrent la presque totalité du couvain operculé d'ouvrières infesté par *Varroa*. Par contre, ce comportement reste à un niveau très bas envers le couvain de faux-bourdons (Boecking 1993; Rath et Drescher 1990; Tewarson et al. 1992). Rath (1992) montre que les ouvrières soignent moins bien le couvain de faux-bourdons. Ainsi, lorsqu'il tue par

congélation du couvain operculé et qu'il le replace dans la ruche, celui d'ouvrières est rapidement ouvert et nettoyé tandis que celui de faux-bourçons est laissé tel quel. *Varroa* profite du peu de soins prodigués et se reproduit presque exclusivement dans le couvain de faux-bourçons (Koeniger et al. 1981; Koeniger et Koeniger 1983; Tewarson et al. 1992; Wongsiri et al 1987).

Si l'on considère le cycle biologique des espèces du genre *Apis*, il est évident que la croissance de la population du parasite est grandement limitée aux courtes périodes durant lesquelles l'abeille indienne élève du couvain de mâle. Toutefois, malgré le faible nombre d'acariens trouvé dans les colonies d'*A. cerana*, ils infestent principalement le couvain de faux-bourçons. Comme la quantité de celui-ci est limitée, cela peut provoquer une compétition entre les *Varroa*. Ainsi, chez *A. cerana*, jusqu'à 60% des cellules de faux-bourçons peuvent être infestées (Tewarson et al. 1992).

Le comportement d'ouverture du couvain infesté a été étudié en Europe chez *A. mellifera* où il est également présent, mais dans une proportion plus faible (Boecking et Drescher 1991, 1992; Boecking 1993) si bien que *Varroa* se reproduit dans les deux types de couvain. Toutefois, également chez *A. mellifera*, le couvain de faux-bourçons a les avantages suivants pour le parasite : la durée de développement de l'abeille est plus longue, ce qui permet à un plus grand nombre de descendants d'atteindre l'âge adulte; la quantité de nourriture est plus importante puisque les pupes de faux-bourçons pèsent environ 290 mg contre 120 mg pour celles d'ouvrières; et de plus la perte de poids pour une même charge parasitaire est inférieure chez les pupes de faux-bourçons (Schneider & Drescher 1987, 1988).

Un troisième mécanisme de résistance est l'incompatibilité physiologique de *Varroa* à se reproduire dans le couvain d'ouvrières. Plusieurs études montrent le faible taux de reproduction dans le couvain d'ouvrières chez *A. cerana* (de Jong 1988; Koeniger et al. 1981; Rath 1991b; Tewarson et al. 1992). Ce phénomène est intéressant, car chez *A. mellifera*, on observe un faible taux de fertilité du parasite en Tunisie (Ritter 1990; Ritter et al. 1990) et en Amérique du Sud (Moretto et al. 1991; Ritter et de Jong 1984; Rosenkranz 1990; Ruttner et al. 1984). Actuellement, une explication des causes de ce phénomène n'est pas disponible. En plus il faut noter que l'étude suivie de colonies en Tunisie a montré que le taux d'infertilité n'est pas stable (voir revue de Boecking & Ritter, 1994).

Adaptations morphologiques de *Varroa*

Varroa est remarquablement adapté morphologiquement à sa vie d'ectoparasite de l'abeille. Son corps est fortement aplati dorso-ventralement, est plus large que long et est très peu épais sur le devant tandis que ses pattes sont positionnées latéralement. Ces formes lui permettent de se glisser entre les sternites des abeilles adultes, d'infester les alvéoles en se glissant sous la larve V et de vivre dans le peu d'espace libre de l'alvéole operculée. Notons que cette forme de corps se rencontre également chez les acariens parasites de reptiles tels que *Omentolaelaps mehelyae* Fain (Mesostigmata: Omentolaelapidae) et qui vivent sous les écailles de l'hôte (Fain 1969).

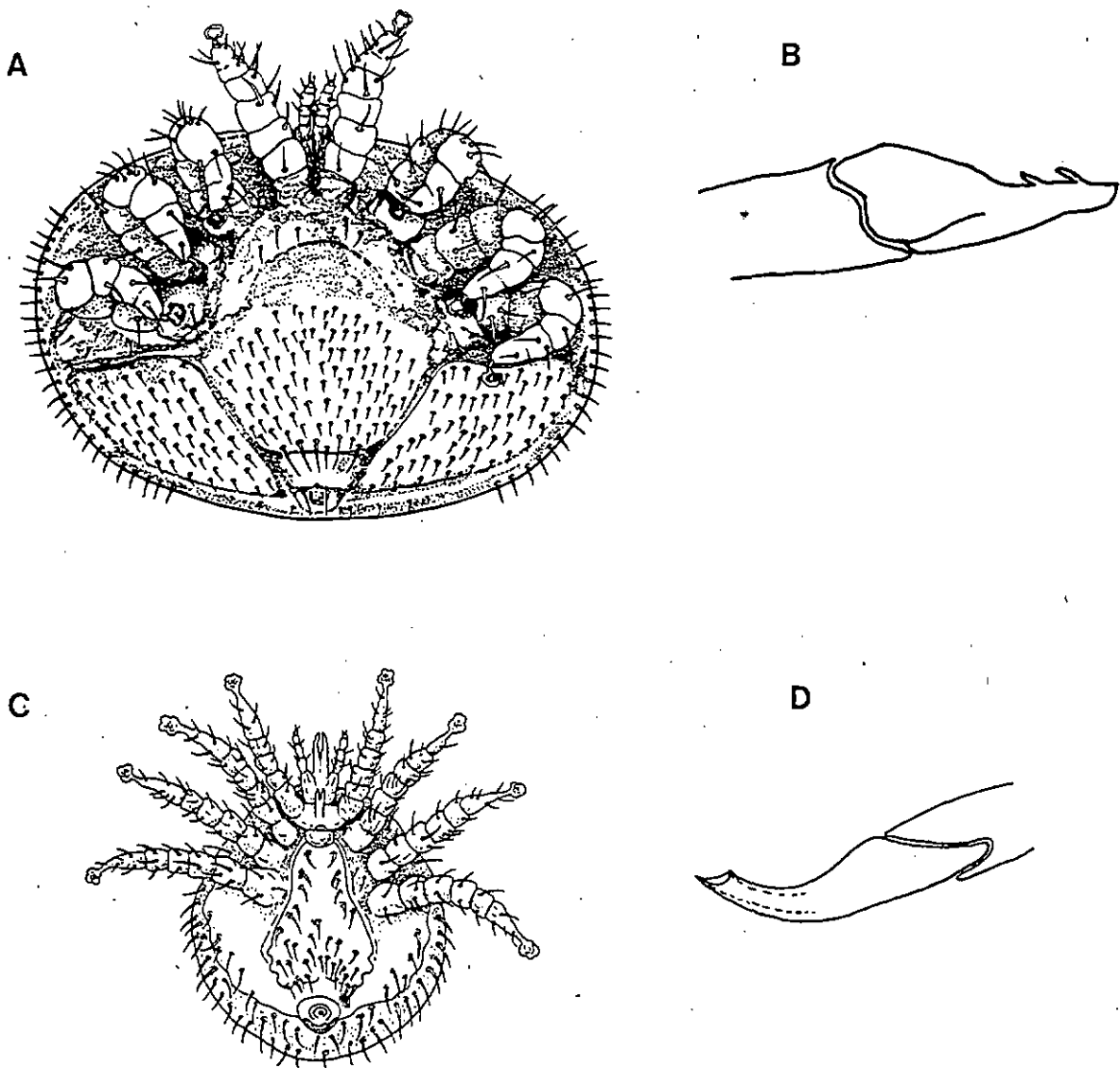


Figure 1.2 (A), Vue ventrale d'une femelle *Varroa*; (B), vue latérale d'un chélicère de femelle. (C), Vue ventrale d'un mâle adulte de *Varroa*; (D), vue latérale d'un chélicère de mâle.

Le tarse de chaque patte est muni d'un ambulacre qui a la forme d'une ventouse puissante et qui se gonfle régulièrement lorsqu'on observe un acarien sous la loupe. Comme nous le verrons, il permet à *Varroa* de se tenir des heures durant au plafond de la paroi de l'alvéole. Son mode de fonctionnement n'est pas clair et selon les auteurs il agit comme une ventouse (Lui et Peng 1990) ou par accrochement grâce aux sclérites présentes à sa surface (Ramirez et Malavasi 1991).

Les deux chélicères sont fortement modifiés par la perte de l'appendice fixe (fixed jaw) et par la transformation en lame de l'appendice mobile (apotèle) qui sert à perforer. La structure sous-jacente est composée de l'hypostome et des stylets salivaires. La cavité buccale s'ouvre à la base de l'hypostome (Griffiths 1988; Steiner 1988). Nuzzaci et al. (1992) ont étudié l'ultrastructure des sensilles présentes sur les pièces buccales des *Varroa* femelles. Un continuum dans la perte de l'appendice immobile des chélicères est observé chez les Mesostigmates des nids des vertébrés. Nous verrons que cette évolution des pièces buccales vers le type perceur va également de pair avec une perte d'autonomie des stades de développement (Radovsky 1985).

Pathologie causée par *Varroa* chez *A. mellifera*

Chez l'abeille européenne, *Varroa* se reproduit aussi bien dans le couvain de faux-bourdon que celui d'ouvrières, et la population d'acariens atteint son maximum en automne, lorsque la population de la colonie diminue. Il en résulte que la charge parasitaire augmente brusquement ce qui aboutit à l'effondrement des ruches. De plus, l'affaiblissement des colonies favorise le développement pathologique des nombreuses maladies des abeilles. Ces maladies secondaires sont fréquemment la cause de l'effondrement des colonies.

Les coûts du parasitisme ont surtout été étudié en fonction du nombre d'acariens présents sur les abeilles en développement. Cette phase est particulièrement critique, car la larve et la pupa ne sont pas nourries durant toute la durée du couvain operculé et le prélèvement d'hémolymphe par le parasite ne peut pas être compensé par l'hôte. Ainsi, les abeilles parasitées pendant leur développement montrent, à l'émergence, une diminution de leur poids et de leur volume en hémolymphe et parfois des malformations (de Jong et al. 1982b; de Jong et de Jong 1983; Gelbe & Madel 1988; Koch & Ritter 1991; Marcangeli et al.

1992; Schneider & Drescher 1987, 1988; Strick & Madel 1988; Weinberg et Madel 1985). Les abeilles parasitées au cours de leur développement auront une longévité plus courte, les acini des glandes hypopharyngiennes atrophiées et les faux-bourdons produiront moins de sperme (Schneider & Drescher 1987, 1988).

Les cousins systématiques et évolutifs de *Varroa*

L'utilisation du couvain par des acariens pour se reproduire n'est pas l'apanage du seul *Varroa jacobsoni*. Chez les abeilles eusociales d'Asie, on connaît quelques espèces de Varroidae (Delfinado-Baker 1987; Delfinado-Baker & Aggarwal 1987; Delfinado-Baker et al. 1989; Lekprayoon & Tangkanasing 1991) dont le cycle biologique semble proche de celui de *V. jacobsoni* (Mossadegh 1990). Les parasites de cette famille sont tous profilés pour se glisser entre les tergites et dans le couvain; de plus, leurs pièces buccales sont du type piqueur (Koeniger et al. 1993; Morin & Otis 1993).

Ceci n'est pas le cas d'un autre parasite du couvain, *Tropilaelaps clareae* Delfinado et Baker 1961 (Acari : Mesostigmata : Laelapidae) dont le corps est allongé, peu aplati dorso-ventralement et dont les pièces buccales en forme de pinces sont du type primitif (Griffiths 1988). *Tropilaelaps* se reproduit également dans le couvain operculé et vit sur les abeilles adultes; toutefois, sa biologie reste mal connue bien qu'il représente un ravageur pour *A. mellifera* en Asie (Burgett et Akkratanakul 1985; Burgett et al. 1983; Delfinado-Baker et al. 1989).

Chez des abeilles solitaires, des acariens se reproduisent dans le couvain où ils profitent de passer la période d'hiver (Cross et Bohart 1992; Skaife 1952). Les deux espèces étudiées par ces auteurs montrent une synchronisation de leur reproduction avec le développement de l'hôte. Dans le cas d'*Imparipes apicola* (Acari : Scutacaridae) qui se nourrit de champignon, l'oogenèse ne débute que lorsque la jeune abeille a déféqué et que *Ascosphaera* ssp se développe sur ces excréments (Cross et Bohart 1992). *Dinogamasus braunsi* Vitzthum se nourrit des exsudats cuticulaires de son hôte. La ponte ne débute qu'une fois que la pupation de l'abeille s'est déroulée (Skaife 1952). Dans cette dernière espèce, il faut encore noter que les fèces sont déposées sur la paroi de la cellule (bambou). D'autres similitudes écologiques existent dans la biologie d'autres acariens; nous les discuterons lors de l'introduction du chapitre Reproductive phase.

Propos de cette étude

Au début de cette étude, les méthodes d'élevage *in vitro* de *Varroa* utilisées jusqu'alors ne permettaient pas d'envisager des expériences ou des observations dans le temps sur la reproduction de *Varroa*. J'ai posé les conditions suivantes pour le développement de la méthode d'élevage et d'observation.

Premièrement, il me fallait obtenir des cellules transparentes, de la taille des alvéoles naturelles et parasitées naturellement dans la ruche, afin que les acariens soient matures et prêts physiologiquement à se reproduire.

Deuxièmement, je devais pouvoir observer ces cellules parasitées en laboratoire dans des conditions physico-chimiques simulant celles de la colonie.

Les observations effectuées sur les premières cellules obtenues ont mis en lumière les grandes lacunes de nos connaissances sur ce qui se déroule dans les alvéoles operculées. De plus, en comparaison de ce qui est connu chez d'autres acariens, il m'a semblé que l'association entre *Varroa* et l'abeille est très évoluée, et en cela, méritait une étude descriptive détaillée. Dans la mesure du possible, cette étude descriptive a été mise en oeuvre par des méthodes quantitatives et expérimentales.

Dans la première partie des résultats, j'analyse les grands traits de la phase de reproduction depuis l'operculation de l'alvéole jusqu'à l'émergence de la jeune abeille. Je montre quelles sont les adaptations du parasite aux changements morphologiques de l'hôte ainsi que celles en relation avec les ressources limitées à la disposition du parasite. Celles-ci sont représentées par l'espace laissé libre par l'abeille dans l'alvéole; par la durée de développement de l'hôte; et par la source de nourriture qui est non-renouvelable dans la mesure où l'hôte n'est pas nourri durant toute la phase d'operculation. J'étudie également les interactions entre les individus présents dans l'alvéole et montre que *Varroa* présente des comportements sociaux primitifs.

Dans la deuxième partie des résultats, l'activité comportementale de tous les stades de développement de l'acarien est décrite. Je montre que le comportement de la femelle fondatrice et de ses descendants tend vers un même état d'équilibre. Cet état d'équilibre du comportement semble favorisé par les structures mises en place par la femelle mère.

Dans la troisième partie des résultats, je me concentre sur le nombre de descendants produits lors des cycles de reproduction. L'équilibre du comportement obtenu au cours du développement contribue au succès des accouplements et donc influence la fertilité potentielle des descendants adultes produits dans chaque alvéole. Comme le nombre de femelles filles par femelle mère est dépendant de l'intensité d'infestation des alvéoles, j'étudie certains aspects de l'épidémiologie de *Varroa*. La distribution, dans les alvéoles, des *Varroa* infestantes n'est pas aléatoire et ce biais se répercute positivement sur le succès de reproduction de ce parasite.

Dans la dernière partie, je propose une explication à la diminution du nombre total de descendants adultes par mère dans les alvéoles multi-infestées. J'utilise l'hypothèse d'une compétition entre les descendants pour la source de nourriture. A l'aide de simulations on montre à quel niveau d'infestation une compétition effective est attendue.

Tout au long de cette étude, je reste attentif au fait que nos observations ont été faites chez *A. mellifera*, qui est un nouvel hôte de *V. jacobsoni* qui, à l'origine, parasite *A. cerana*. Nous verrons que les résultats obtenus sont fortement empreints de l'association équilibrée existante chez l'abeille indienne.

II Matériel et méthodes

Animaux

Des colonies d'*A. mellifera* fortement infestées par *Varroa* ont été placées sur l'aire de la station à Liebefeld à l'écart des autres colonies. Elles n'ont pas été traitées l'année précédente ou ne l'ont été que partiellement à l'acide lactique, produit qui ne laisse aucun résidu. Afin d'éviter le développement de maladies secondaires, les colonies ont été éliminées à la fin de chaque automne et de nouvelles sont utilisées l'année suivante. Si au cours de l'été, la population de *Varroa* s'est avérée être trop forte et a menacé la colonie, j'ai réduit le nombre d'acariens en retirant une partie du couvain operculé de la ruche. Cette technique a l'avantage de ne pas interrompre le cycle du couvain, situation qui modifierait la biologie des parasites (Rosenkranz 1990; Steiner 1992).

Cellules artificielles et infestation par *Varroa*

Lors de la mise au point de la méthode des alvéoles artificielles, j'ai testé plusieurs types de matériaux; mais seul le verre, à deux reprises seulement, et le polystyrol ont permis d'obtenir des cellules avec du couvain. La taille des cellules a également fait l'objet de tests mais finalement, les mesures se rapprochant des alvéoles naturelles ont montré de très bons résultats.

Cependant, j'ai opté pour des cellules légèrement plus longues, ce qui évite de blesser l'abeille si l'on aplatit l'opercule. Les dimensions adoptées pour l'intérieur des cellules ont été 5.1 mm de diamètre et 14 mm de long pour les ouvrières et 6.7 mm de diamètre et 16 mm de long pour les faux-bourçons.

Les tubes à essais en polystyrol (ouvrières : No. 100101; Greiner GmbH & Cie, D-7440 Nürtingen; faux-bourçons : No. 1587, Semadeni, CH-3072 Ostermundigen) ont été coupés à la longueur désirée à l'aide d'un tour mécanique (environ 920 t/min.). Puis 60-70 cellules artificielles sont assemblées en quinconce sur une couche de cire avec une inclinaison de 5-10° vers le haut (fig. 2.1A).

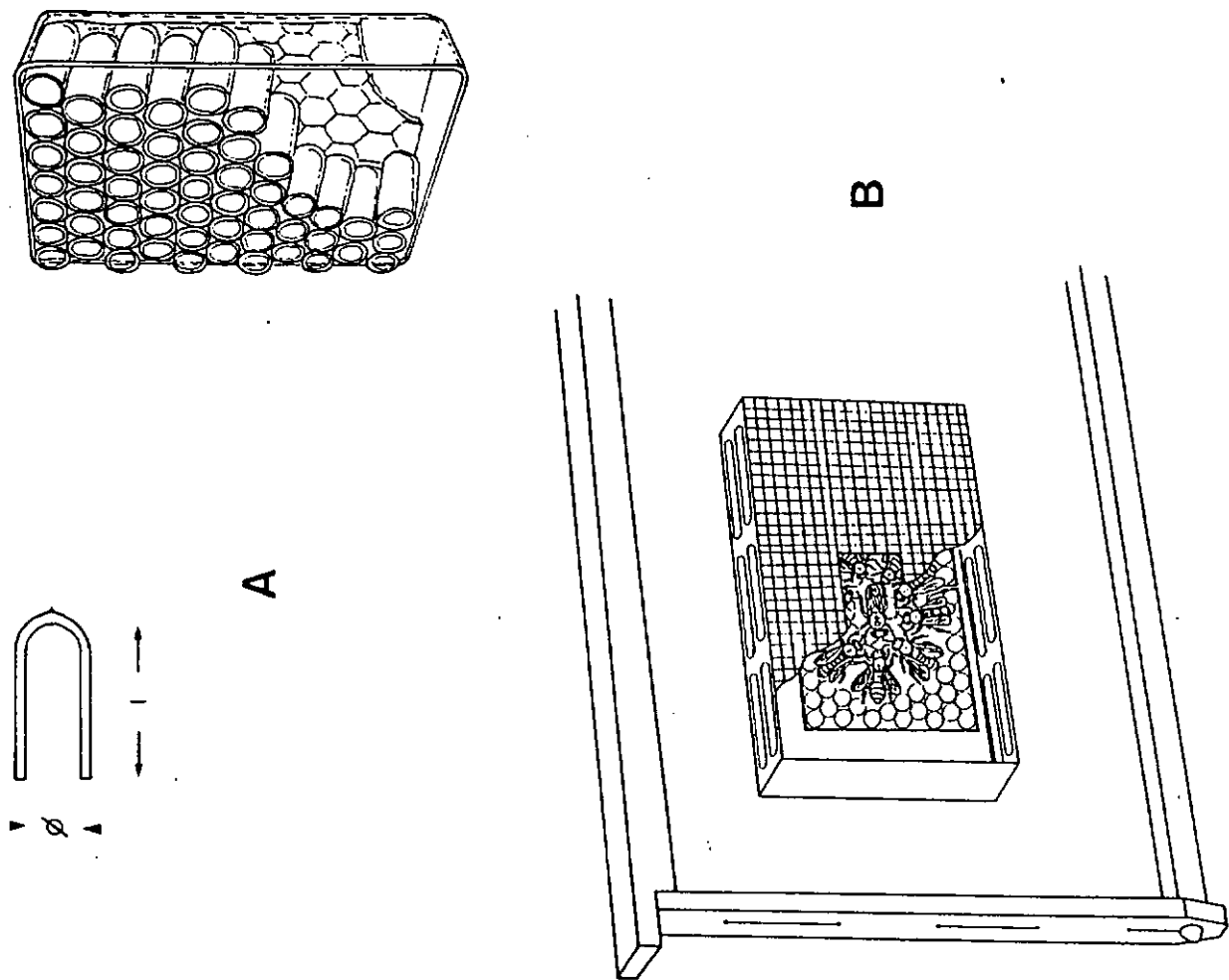
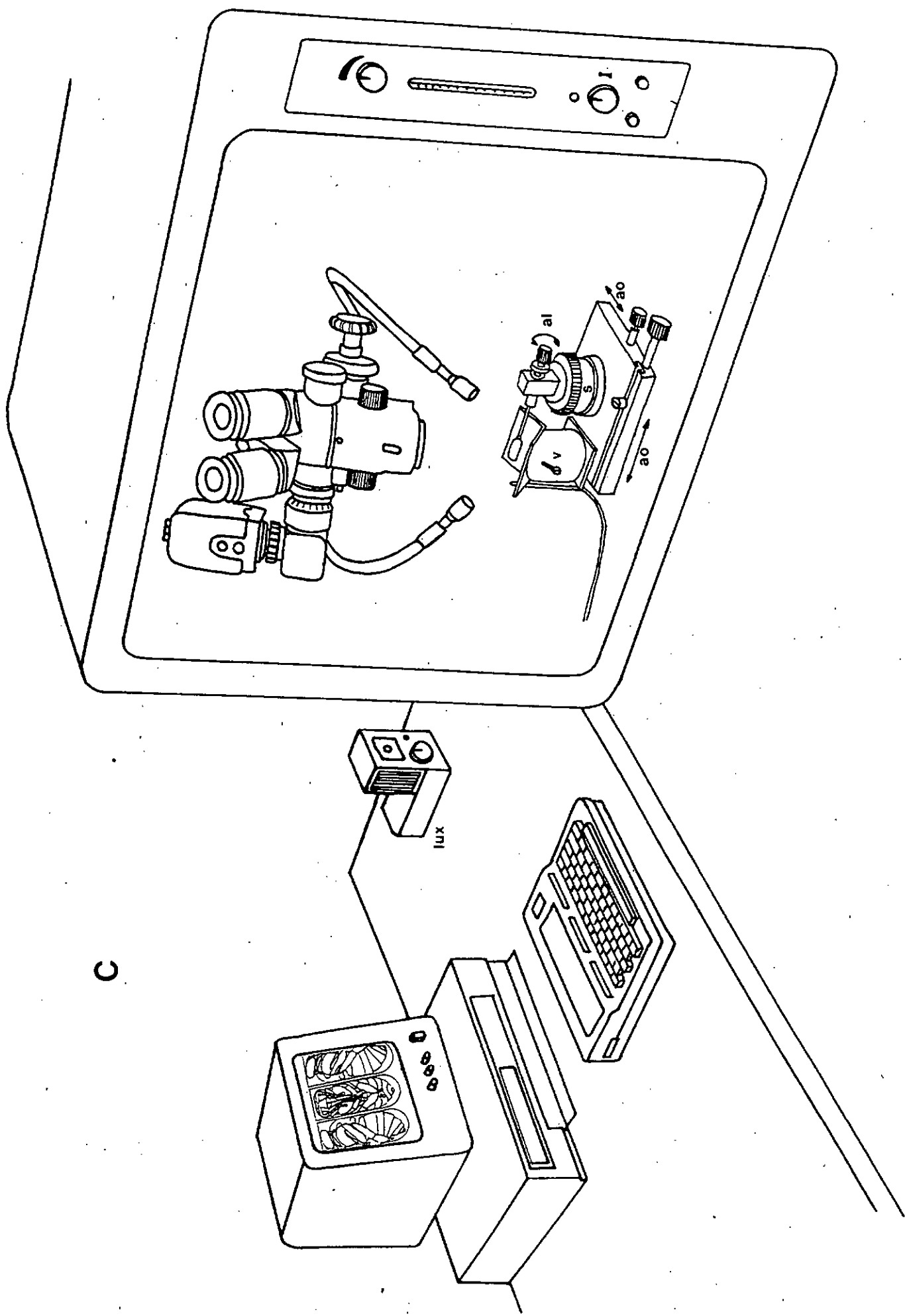


Figure 2.1 Représentation schématique de l'obtention et des possibilités d'observation des cellules artificielles infestées par *Varroa jacobsoni*. (A) Des tubes à essai en polystyrol sont coupés puis assemblés en quinconce à une inclinaison de 5-10° pour former un cadre artificiel. Les dimensions des cellules sont 5.1 mm de diamètre ($\emptyset$) x 14 mm de long (l) pour les ouvrières et 6.7 mm $\emptyset$ x 16 mm de long pour les faux-bourçons. Le cadre artificiel est incorporé dans un cadre naturel de couvain, enduit d'une couche de miel et doté d'une grille à reine. Celle-ci est enfermée sur le cadre artificiel pour une période déterminée (B). Les alvéoles sont laissées dans la ruche fortement infestée pour l'élevage des larves et l'infestation par *Varroa*. Après leur operculation, les alvéoles sont transférées dans un incubateur pour être observées à l'aide d'une loupe binoculaire reliée à une installation vidéo (C). La source de lumière froide (lux) est placée hors de l'incubateur pour éviter le réchauffement de celui-ci, tandis que la lumière est transmise par deux fibres optiques. Durant l'observation, l'alvéole est placée sous la loupe et peut être manipulée de l'extérieur grâce à deux manchons de couveuses montés dans la porte de l'incubateur. L'alvéole peut être inclinée grâce à une articulation sphérique (s); tournée dans l'axe longitudinal (af) et déplacée dans les deux axes orthogonaux (ao). Deux miroirs, inclinables grâce à des vis (v), sont placés sous l'alvéole. Selon l'inclinaison des miroirs, on voit les côtés ou le dos de l'alvéole. Ainsi, comme montré sur le moniteur, on obtient une vue ventrale et deux vues latérales du contenu de l'alvéole.



Ce cadre artificiel, enduit d'une couche de miel, a été incorporé dans un cadre naturel contenant du couvain. Sans la couche de miel, les cellules étaient ignorées par les abeilles et la reine ne pondait pas. Pour activer la ponte et surtout, pour la concentrer dans le temps, la reine a été enfermée durant environ 12 heures sur les cellules artificielles à l'aide d'une grille à reine (fig. 2.1B). Notons que la reine a toujours pondu dans toutes les cellules, par contre les ouvrières n'ont pas toujours élevé les larves. C'est pourquoi, pour augmenter nos chances d'obtenir des larves dans les cellules artificielles, j'ai enfermé simultanément les reines dans plusieurs ruches.

8½-9 jours plus tard, l'operculation des alvéoles a été notée sur une feuille plastique à intervalles réguliers de 1-2 heures. Pour cela, les cellules étaient soit laissées dans la ruche où les larves avaient été élevées, soit transférées dans des ruches d'observations. Ces dernières avaient des vitres en Plexiglas percées d'une fenêtre coulissante. Les paquets de cellules étaient placés dans une loge fraisée dans le cadre plastique (Apis Nova Products, D-7320 Goppingen). Cette deuxième technique a l'avantage d'éviter l'ouverture des ruches et a été utilisée pour les operculations se déroulant en période de mauvais temps ou durant la nuit. Après l'operculation, un numéro et la position de l'apex ont été gravés sur les cellules transférées au laboratoire. Ces cellules ont été maintenues en incubateur dans leur position naturelle, collées sur une bande adhésive et ont été manipulées avec précaution lors des observations.

L'intérieur de l'incubateur a été maintenu à 34°C et environ 60 % d'humidité relative. La source d'humidité a été un flux d'air frais passé à température ambiante dans un flacon laveur muni d'une frite et, si besoin, d'une ou deux soucoupes d'eau distillée, placée dans l'incubateur. Deux ventilateurs ont assuré l'homogénéisation de l'air, tandis que plusieurs sondes hygrométriques et thermiques ont permis le contrôle de ces paramètres. La cellule observée a été placée sous une loupe équipée d'un appareil photo et d'une caméra vidéo reliée à un enregistreur et à un moniteur. L'observation s'est faite, soit sur le moniteur vidéo, soit directement à travers les oculaires de la loupe qui émergent à travers la porte de l'incubateur.

L'alvéole a été collée sur une tige de métal tenue par une pince de tour qui permet sa rotation sur l'axe longitudinal (360°) tandis qu'une articulation

sphérique permet son inclinaison. Toutefois, l'alvéole n'a été tournée que rarement et pour de courtes observations afin de ne pas occasionner des changements dans l'organisation spatiale de ses constituants. L'observation des côtés, et dans une moindre mesure du dos de la pupe, a été rendue possible grâce à deux miroirs inclinables placés juste sous la cellule transparente. A faible grossissement, trois cellules étaient visibles sur le moniteur : au centre en vue ventrale et deux vues des côtés. Le tout a été fixé sur une platine de microscope permettant le déplacement dans les deux axes orthogonaux (fig. 2.1C).

Observations des cellules artificielles

Les observations qui ont été effectuées sur les alvéoles maintenues dans l'incubateur peuvent être groupées en observations ponctuelles et en observations continues. Les observations ponctuelles ont consisté en des contrôles réguliers (intervalles variant de ¼ heure à 1 jour) de l'évolution du développement de l'abeille, de la reproduction et du développement des acariens. Ils ont livré des données quantifiées sur l'organisation spatiale des acariens dans les alvéoles. Les données ainsi récoltées dans les cellules artificielles ont été confirmées en ouvrant des alvéoles naturelles à différentes phases de la reproduction.

Les observations continues ont été effectuées pour une cellule à la fois (parfois 2 ou 3) placée sous la loupe, observée en permanence et filmée (24 ou 3 images/seconde). Elles ont fourni des résultats quantitatifs de longue durée sur le comportement des acariens; leur durée de développement; leurs périodes de ponte; leur comportement de nutrition et leur activité sexuelle.

Les périodes exactes de ces observations au cours de la reproduction (femelle infestante) ou au cours du développement (descendants) sont décrites au chapitre Behavioural activity.

Puisque le but de la présente étude était de décrire la phase de reproduction de *Varroa*, j'ai, sur la base de mes observations et de la littérature, défini un état "normal" de la reproduction et du développement des jeunes (Fuchs et Langenbach 1989; Ifantidis 1983, 1984; Ifantidis et Rosenkranz 1989; Nannelli 1986; Rehm 1988; Rehm et Ritter 1989). Pratiquement, cela signifie que j'ai exclu

les cellules où la ponte n'a pas eu lieu, ou celles où le développement des descendants se révélait clairement anormal.

Utilisation de l'espace dans l'alvéole

Afin d'étudier l'utilisation de l'espace disponible pour les acariens dans les alvéoles naturelles et artificielles, j'ai subdivisé l'alvéole. L'axe longitudinal est divisé en 6 sections tandis que dans l'axe latéral, j'ai utilisé des estimations des coordonnées circulaires (fig. 2.2). De plus, durant le stade de pupe, la morphologie de l'abeille a été également utilisée pour définir avec plus de précision les différentes zones utilisées par les *Varroa* (fig. 3.2.6).

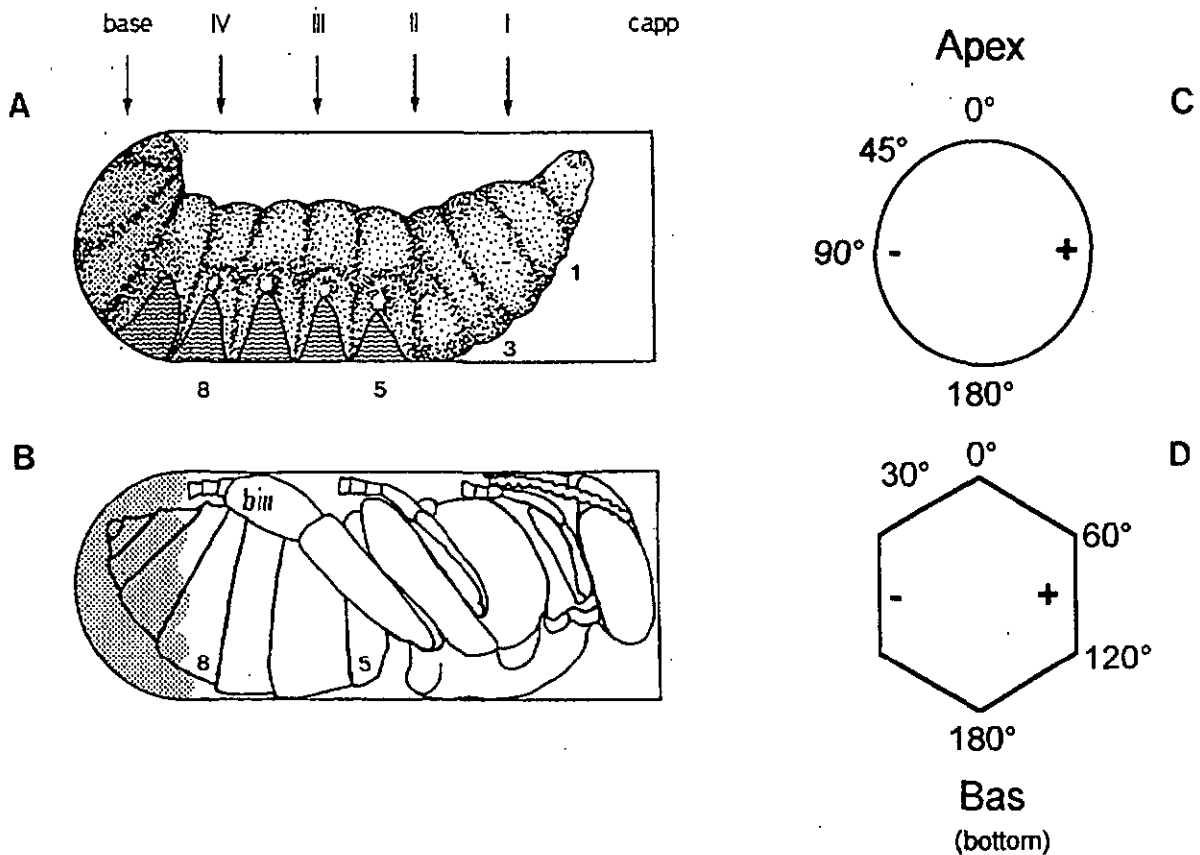


Figure 2.2 Vue latérale des 6 sections définies le long de l'axe longitudinal des alvéoles ainsi que leur correspondance durant le stade de prépupe d'une ouvrière (A) et de pupe d'un faux-bourdon (B). Les segments de l'abeille sont numérotés à partir du premier thoracique. *bin* indique le basitarsus de la troisième paire de pattes. Coordonnées circulaires de la coupe transversal d'une alvéole artificielle (C) et d'une alvéole naturelle (D). Pour les cellules artificielles, l'estimation $0^\circ \pm 15^\circ$ représente l'apex, tandis que pour les cellules naturelles, l'apex correspond à l'angle supérieur. La zone plate des cellules naturelles correspond à $30^\circ \pm 15^\circ$ mais à $45^\circ \pm 15^\circ$ pour les cellules artificielles.

Activité de nutrition et compétition au lieu de nutrition

J'ai établi l'activité de nutrition de chaque stade de développement en visionnant les bandes vidéo enregistrées 24 heures sur 24. La durée des nutritons est définie par le temps que l'acarien a été observé immobile sur le lieu de nutrition.

Pour chaque stade et chaque individu, on a calculé la fréquence moyenne, la durée horaire et la durée moyenne des nutritons. Pour les protonymphes et les deutonymphes, j'ai également calculé la durée cumulée des nutritons depuis l'éclosion ou la mue jusqu'à l'immobilisation pour la prochaine mue.

L'emplacement des succions, le nombre de lieux de nutrition utilisés par les acarins à une période donnée, ainsi que les changements de lieux de nutrition dans le temps ont été notés. Ces derniers paramètres ont également été étudiés de la manière suivante: J'ai placé une série de cinq à dix cellules sur un disque et les ai observées sous la loupe chaque 5-10 minutes afin de noter quel stade et à quel emplacement les acarins ont sucé. J'ai observé les séries deux jours consécutifs.

En utilisant les résultats relatifs aux nutritons nous avons, en collaboration avec Madame Jacqueline Moret, modélisé l'occupation du lieu de nutrition en fonction du nombre de familles présentes dans l'alvéole. Les simulations sont décrites au chapitre "feeding site occupancy".

L'utilisation d'un trou de nutrition par plusieurs individus peut aboutir à une compétition pour la nourriture même si le trou n'est pas occupé en permanence. Une cellule infestée par une famille et une autre infestée par deux familles ont été suivies durant une période totale de 147 heures lorsque plusieurs individus étaient en phase mobile, c'est-à-dire de nutrition. J'ai observé le nombre de nutritons de chaque stade de développement, le nombre de fois qu'ils ont dû attendre parce que le trou était occupé et le nombre de repas interrompus après avoir été heurtés par un autre acarien qui cherchait le trou pour se nourrir. La durée de l'attente a été calculée comme suit : on a enclenché le chronomètre lorsque l'individu qui cherche touche celui qui est en train de sucer. Le temps est arrêté lorsque l'individu qui cherche se place sur le trou de nutrition. Cela signifie que si cet individu n'arrive pas à trouver le trou libéré et qu'un autre acarien le trouve avant lui, le temps continue de courir jusqu'à ce qu'il pique effectivement.

Géotaxisme

Afin de tester le rôle de la gravité sur le positionnement du paquet de fèces, j'ai utilisé des cellules artificielles d'ouvrières non-parasitées et âgées de 60 hpo. A cette période la prépupe adhère à l'alvéole. J'y ai introduit des femelles *Varroa* provenant de cellules naturelles d'ouvrières âgées de 30 hpo, soit à la fin du tissage du cocon. A cette période, les acariens vont entamer la formation du paquet de fèces. Les cellules ainsi infestées sont maintenues en incubateur dans leur position naturelle (témoin) ou à l'envers avec une rotation de 180° dans l'axe longitudinal de telle manière que la prépupe est suspendue au plafond de la cellule (fig. 2.3). La position des fèces a été notée après 24 heures.

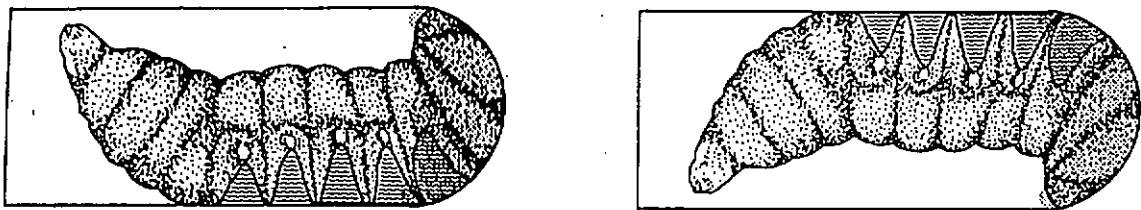


Figure 2.3 Position des cellules lors des expériences sur le géotaxisme. Position naturelle de la prépupe (à gauche); et position inverse tournée de 180° dans l'axe longitudinal de l'alvéole (à droite).

Survie des protonymphes en l'absence des *Varroa* infestantes

Plusieurs indices m'ont fait émettre l'hypothèse que les descendants ne peuvent survivre par eux-mêmes dans les alvéoles. Cette hypothèse a été testée à l'aide de cellules artificielles de faux-bourçons. La période choisie a été la mue entre la prépupe et la pupa qui se déroule à environ 120 hpo chez les faux-bourçons. A cette période, chaque femelle *Varroa* a pondu deux oeufs, soit le mâle qui est au stade de protonympe et la première femelle qui se trouve encore dans l'oeuf.

Des cellules parasitées âgées d'environ 110 hpo et contenant encore une prépupe ont été désoperculées. A l'aide de très fine brucelles, on a retiré la ou les femelles *Varroa* des cellules test tandis que les cellules témoins étaient

uniquement désoperculées. Puis toutes les cellules ont été refermées, assemblées dans leur position naturelle, protégées d'un grillage fin et transférées dans leur ruche d'origine. Le développement des descendants a été observé quatre jours plus tard, soit lorsque le premier descendant est au stade de deutonymphe immobile ou au stade adulte, et le deuxième au stade de deutonymphe immobile. Dans les cellules témoins, les *Varroa* infestantes ont naturellement poursuivies leur reproduction. Le troisième descendant est au stade de deutonymphe mobile et donc facilement reconnaissable des deutonymphes immobiles.

Analyse de trajets

L'analyse des trajets précédant l'expulsion des fèces et la ponte des oeufs durant le stade de prépupe est décrite en détails dans le chapitre "Reproductive phase".

Accouplements et fertilisation

Le déroulement des accouplements a pu être observé durant les observations continues effectuées sur les cellules artificielles naturellement infestées. J'ai voulu mettre en évidence l'importance du nombre d'accouplements sur le succès de reproduction de ce parasite. Ceci peut être important dans la mesure où le temps à disposition pour les accouplements est limité par l'arrivée de la mue imaginale de l'hôte.

Le problème majeur est l'impossibilité de suivre les femelles *Varroa* lors de leurs cycles successifs de reproduction et donc de connaître le nombre de leur descendants. Toutefois, les données de la littérature nous apprennent que le nombre d'oeufs pondus par des femelles transférées successivement d'une cellule de couvain à l'autre, est de 30 (de Ruijter, 1987). Le nombre maximal de spermatozoïdes contenus dans la spermathèque des femelles est également de 30 (Alberti & Hänel, 1986) et est donc clairement un facteur qui limite le succès de reproduction des femelles *Varroa*. J'ai donc considéré que le nombre de spermatozoïdes stockés dans la spermathèque après un nombre défini d'accouplements pouvait être un indicateur du taux maximal d'oeufs qu'une femelle pouvait escompter pondre si elle survit dans la ruche.

Les méthodes utilisées pour obtenir des femelles vierges et pour les faire féconder, puis pour les disséquer sont décrites au chapitre Reproductive success.

Succès de reproduction dans les cellules naturelles

Le succès de reproduction de *Varroa* dans les conditions de la colonie a été étudié dans différents ruchers à Säriswill, à Frienisberg et à Allenwil. Les méthodes de récolte et d'analyse sont décrites dans le chapitre "Reproductive success".

Analyse statistique

L'analyse statistique de cette étude a été appliquée soit à l'aide du programme Systat[®], soit à l'aide des programmes de M^{me} Moret ou du programme SAS[®] à Neuchâtel.

Les différences entre les fréquences de variables qualitatives ont été testées, pour les tableaux de contingence à 2 colonnes et 2 lignes, avec le test exact de Fisher qui ne souffre pas de restrictions d'application. Dans les autres cas, le Pearson χ^2 a été utilisé. Malheureusement, nos résultats se révélaient parfois si tranchés que la proportion des classes ayant des fréquences <5 était supérieur à 20%, et le test du χ^2 n'a pu être appliqué (p. expl. tableau 2, chapitre Reproductive phase).

Les valeurs de nos échantillons à variables continues étaient rarement distribuées normalement, si bien que j'ai la plupart du temps utilisé des tests non-paramétriques (test de rangs) soit le test du U de Mann-Whitney pour les échantillons indépendants ou le test de Wilcoxon pour les échantillons appariés. Ces tests ont le grand avantage d'être très puissants également lorsque les données se distribuent normalement (Scherrer 1984). Malgré l'utilisation de tests non-paramétriques, les valeurs indiquées dans le texte et les tableaux ont été la moyenne $\pm$ écart type. Dans le chapitre "Behavioural activity", j'ai indiqué les valeurs médianes car j'ai utilisé les "box plots" pour les représentations graphiques des comportements. Cette représentation a l'avantage d'indiquer clairement la distribution des différents individus dans l'échantillon. La raison de ce choix est que cette étude détaillée du comportement de tous les stades de développement des acariens est prospective. Les box, qui indiquent la médiane, les percentiles 25 et le 75, montrent les changements dans le temps du

comportement de la moitié des individus les moins dispersés. De plus, les "T" extérieurs (percentiles 0 et 100) permettent de connaître la dispersion des individus de l'échantillon.

III Résultats

Les résultats sont divisés en quatre chapitres reconnaissables aux en-têtes suivantes:

"Reproductive phase"

"Behavioural activity"

"Reproductive success"

"Feeding site occupancy"

Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood

Gérard Donzé¹, Patrick M. Guerin²

¹ Department of Apiculture, Federal Dairy Research Institute, 3097 Liebefeld-Bern, Switzerland

² Institute of Zoology, University of Neuchâtel, Chantemerle 22, 2007 Neuchâtel, Switzerland

Received: 23 August 1993 / Accepted after revision: 28 February 1994

Abstract. *Varroa jacobsoni*, an ectoparasite of the Asian honeybee *Apis cerana*, has been introduced world-wide, and is currently decimating colonies of the European honeybee *Apis mellifera*. *Varroa*'s reproductive cycle is tuned to that of drone cells, those mainly parasitized in the original host. We describe here how a single fertilized female, infesting a brood cell, can produce two to four adult fertilized females within the limited time span of bee development (270 h in worker and 330 h in drone cells), despite the disturbance caused by cocoon spinning and subsequent morphological changes of the bee. From observations on transparent artificial cells we were able to show how the mite combats these problems with specialized behaviors that avoid destruction by the developing bee, prepares a feeding site for the nymphs on the bee pupa, and constructs a fecal accumulation on the cell wall which serves as a rendezvous site for matings between its offspring. The proximity of the fecal accumulation to the feeding site facilitates feeding by the maturing progeny. However, communal use of the feeding site leads to competition between individuals, and protonymphs are most disadvantaged. This competition is somewhat compensated by the timing of oviposition by the mites. Use of a common rendezvous and feeding site by two or more *Varroa* mothers in multiinfested cells may have developed from the parental care afforded to them as nymphs.

Key words: Acari – *Varroa jacobsoni* – Reproduction – Parental care – Behavior

Introduction

Varroa jacobsoni (Acari: Mesostigmata) was originally an ectoparasite of the Asian eusocial bee, *Apis cerana*, but is causing severe damage to honeybee colonies since its transfer to the European honeybee, *Apis mellifera*. *Var-*

roa's entire life-cycle occurs in the beehive, and all stages are obligate ectoparasites feeding on haemolymph. Female mites reproduce within the concealed habitat provided by brood cells and parasitize adult bees between reproductive cycles. Such females quickly invade open brood cells, attracted by volatiles released by bee larvae prior to capping, and prefer the drone brood cells (Schulz 1984; Le Conte et al. 1989; Fuchs 1990; Rickli et al. 1992). When inside, the mite soon conceals itself in the jelly behind the larva (Ifantidis 1988; Boot et al. 1992). Normal reproduction in this species consists of producing one male and two to four females, fertilized by their brother, during the period between capping of the cell and emergence of the adult bee (Ifantidis 1983, 1990; Ifantidis and Rosenkranz 1988; Rehm and Ritter 1989). Griffiths (1988) and Akimov et al. (1988) reviewed the morphological adaptations of *Varroa* for its parasitic life in the brood cells. In *Apis cerana* the mite reproduces only on the less cared-for male brood, as most infested worker cells are detected by worker bees and eliminated from the hive (Tewarson et al. 1992); Asian bees engage in mutual grooming and even remove mites from colonies (Peng et al. 1987a,b; Rath and Drescher 1990). European bees do not undertake systematic cleaning (Peng et al. 1987a; Boecking and Drescher 1991, 1992), so once established in a colony the parasite population explodes by using all the available brood.

Other parasitic mite species also live in family groups and utilize well-defined habitats such as a mammal's nest (Radovsky 1985), woven cells on a leaf surface (Saitô 1983, 1986a), or cavities of the noctuid tympanic organ (Treat 1958, 1975). These habitats are structured in different ways by the mites, occasioning use of different sites for different behaviors. In some Tetranychidae, the mites' web or leaf surface is often used for distinct behavioral activities (e.g. oviposition, defecation, feeding). In some species, all instars accumulate their feces at a common site, presumably to prevent fouling of resources or to repel predators (Saitô 1983). The structuring of space and behavior reaches a high level in *Dichrocheles phalaenodectes* (Mesostigmata) as feeding, egg-laying and

306

molting always occur in three different cavities of the noctuid tympanic organ. Feces, for example, are accumulated in the countertympanic cavity, and seem to have a biological significance as it is supposed that it is here that nymphs moult and adults mate. However, no direct observations were possible (Treat 1958, 1975). The interactions between cohabitants are limited to feeding at a common wound in the case of mammalian ectoparasites, which in fact permits nymphs to feed since they cannot pierce the host's skin when experimentally isolated (see Radovsky 1985). Saito (1986a,b) shows that adults of the spider mite *Schizotetranychus celarius* manifest biparental care in the form of defence of the nest, and consequently the offspring, against predators.

At first sight the brood cell would appear to provide an ideal environment for reproduction in *Varroa*, with its stable temperature and humidity, accessible food source, and absence of predators or competitor species. However, the time available to *Varroa* is limited and the many changes occasioned by the bee's development limit the space available for the female mite and its family. From video observations on transparent polystyrol cells containing naturally infested brood from the beehive we set out to establish how the female succeeds in parasitizing the developing bee, structures the living space for its developing family, chooses sites for oviposition, and, in multiinfested cells, cohabits in these structures with members of other families. We wished to establish if nymphs could survive on the pupa on their own. Furthermore, using these observations we have endeavoured to elucidate the genesis and biological role of space and behavior structuring in *Varroa*.

Methods

Infestation of artificial brood cells. Artificial brood cells were infested naturally within *A. mellifera* colonies in cylindrical transparent polystyrol cells (internal dimensions: 5.1 mm diameter $\times$ 14 mm long for worker and 6.7 mm diameter $\times$ 16 mm long for drones) incorporated at an inclination of 5–10° in groups of 60–70 in normal wax combs and coated with honey. The dimensions of these polystyrol cells are similar to those of natural ones in our beehives (5.2–5.3 mm $\times$ 12 mm long for workers and 6.5–6.8 mm $\times$ 14–15 mm long for drones) and to those cited in the literature (5.1–5.4 mm for workers; Erickson 1990). The queen was confined to the artificial cells for 12 h in a beehive heavily infested with *Varroa*. Some 8.5 days later, the time of sealing of each cell was recorded at intervals of 1–2 h in an observation beehive. After capping, these naturally infested (0–10%) cells were removed for observation in an incubator at 34°C and 60% RH.

Direct observations of these cells were made with an operation microscope (Zeiss OPM1 1-FC) mounted with a black and white CCD video-camera (Canon Ci-20PR) connected to a time-lapse VHS recorder (Bischke UB-480). A cold-light source (300–500 lux) illuminated the cell, which was fixed by wax to a metal stem gripped in a lathe-holder. This allowed rotation in the longitudinal axis. To permit slight inclination of the cell, the holder was mounted on a ball-joint and this on a microscope plate which allowed displacement of the cell in the two horizontal axes. Simultaneous observation of the sides and back of the cell was made possible with two inclinable mirrors placed under the cell, such that three views of the cell were recorded, i.e., from above and from each side. All manipulations of cells and optical settings were done through two air-tight

hand ports in the door of the incubator. The eyepieces of the microscope also passed through this door.

Observations on brood cells. Cells in which reproduction was observed to proceed normally (Fig. 1) were placed in their natural position (i.e., pupa on its back) under the microscope and observed round the clock by time-lapse video (24 or 3 frames sec⁻¹). Duration of development, feeding activity and utilisation of the available space in the cell by each individual was recorded. Interactions between individuals such as mating and competition for feeding were studied. Additionally, infested artificial cells kept in the incubator were observed one or more times daily. To confirm that results relating to position of first eggs and the feces were not artefacts arising only in the artificial cells, we observed the position of feces and the location of eggs and pharate nymphs in natural cells. Pearson's χ^2 and the Fisher exact test were used to compare frequencies. Throughout this article means $\pm$ standard deviations (SD) are indicated.

Track analysis. Records of *Varroa*'s movements were obtained in order to understand how *Varroa* initiates and subsequently succeeds to build a fecal accumulation (FA) on the cell wall in the posterior part of the brood cell during the prepupal stage and to show how it chooses a site for first oviposition. Since tracks leading to defecation start once *Varroa* climbs onto the cell wall after feeding, records were obtained by simply transcribing the position of the mites' mouthparts onto plastic sheets on the video screen as it walked on the cell wall. Thus, when the mite pivots the resulting track is circular. The hemispheric view of the cell wall was rendered planar without correction, resulting in most distortion at the lateral borders. Analysis of the different track types was made by plotting coordinates of points at which the tangent to the track was parallel to the long axis of the cell. The difference between two points, termed an interversal leg (IRL), is then ascribed a Δx and Δy value, corresponding to, respectively, displacement perpendicular to and parallel to the long axis of the cell. Since tracks in two different cell sizes were analyzed, the cell diameter was ascribed 100 units, and Δy values were calculated with reference to the same scale, which thus can exceed 100 units. For each track, medians (to exclude outliers) were calculated for the first and last five Δx values and means were calculated for the first and last six Δy values (normally distributed); tracks with fewer than eight IRLs were excluded. The Wilcoxon matched-pair signed rank test was used to compare the start and end of tracks, and the Mann-Whitney *U*-test to compare values obtained for different track types.

Role of geotaxis in feces deposition. To test for a role of negative geotaxis in feces deposition, 102 *Varroa* mites were transferred from natural cells at the end of spinning (just prior to when they are normally predisposed to form the FA at 30 h post-capping, hpc) to non-infested artificial worker cells containing a prepupa at 60 hpc. During this period the prepupa adheres to the bottom of the cell permitting us to rotate the test cells ($n = 54$) 180° in the longitudinal axis so that the prepupa hung down. Control cells ($n = 48$) were not rotated. After introducing the females all cells were closed again with the original cap and held in the incubator. The position of all feces in the cell was noted after 24 h.

Ability of protonymphs to survive on their own. A few hours before pupation infested drone cells contain the first protonymph and the second egg (Fig. 1). Since the bee rids itself of the prepupal cuticle at pupation, we set out to determine if the protonymphs are capable of surviving on the as yet unpierced pupa on their own. Artificial drone cells were uncapped shortly before pupation and *Varroa* mothers within were retrieved with fine forceps. Control cells were only opened. All cells were closed again with the natural cap and maintained in a beehive protected by a metal mesh to prevent opening by worker bees. The cells were opened 4 days later to examine the state of offspring present at manipulation.

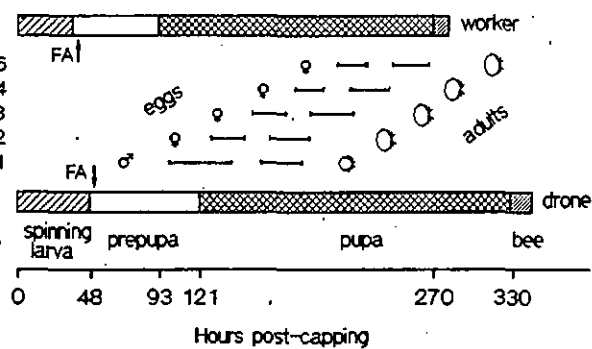


Fig. 1. Oviposition by *Varroa* and development of progeny from cell capping until bee emergence within artificial worker and drone honeybee cells. Horizontal bars represent mobile proto- and deutonymphs, and intervening blanks immobile stages (i.e., eggs and pharate nymphs); pooled data from single and multiinfested worker and drone cells. The fecal accumulation (FA) appears in both cell types only after the bee has stretched out as a prepupa. Note that two eggs are laid during the prepupal stage in drone cells but only one in worker cells. Durations of development for the different life-stages are given in Table 3. A sixth egg was laid in a small percentage of drone cells

Results

From cell capping to pupation

After capping, the bee larva begins to make regular somersaults, which last 39 ± 8.4 min ($n = 40$), and feeds in bouts on the jelly for the first 5 h. After this it starts to spin the cocoon against the cell wall. The *Varroa* female climbs from the jelly onto the bee as it feeds, and almost immediately feeds itself for the first time. The mite evidently avoids being trapped by "piggy-backing" alternately on the larval extremities and ventral side, surfaces which come least in contact with the cell wall. *Varroa* thus stays almost exclusively on the spinning larva, which moves all the time, but the mite succeeds in feeding for ca 207 ± 125 s ($n = 12$) every 1.6 h. *Varroa* defecates for the first time at some 5 hpc. During this early phase of bee development the rather transparent feces are deposited randomly by *Varroa* on the cell wall and are subsequently covered by the cocoon. By 24 hpc *Varroa* has already defecated 11 ± 3.5 times ($n = 9$ cells).

The cocoon is spun by 33–36 hpc in worker and by 48–52 hpc in drone cells (Fig. 1). The bee prepupa then stretches out on its back with its head towards the cell cap leaving most free space in the upper half of the cell (Fig. 2A), and remains so until pupation. At the early prepupal stage the mite already spends $46 \pm 27\%$ ($n = 12$ worker cells) of the time in section IV of the cell. The mite demonstrates a fervent interest in the anal zone of the bee, regularly probing it with up-down movements of the head. In drone cells, the bee's anal zone is so attractive to *Varroa* that some get trapped behind the terminal abdominal segments until pupation.

Fecal accumulation

At the beginning of the prepupal stage, the *Varroa* female shows a preference for defecation near the cell apex of

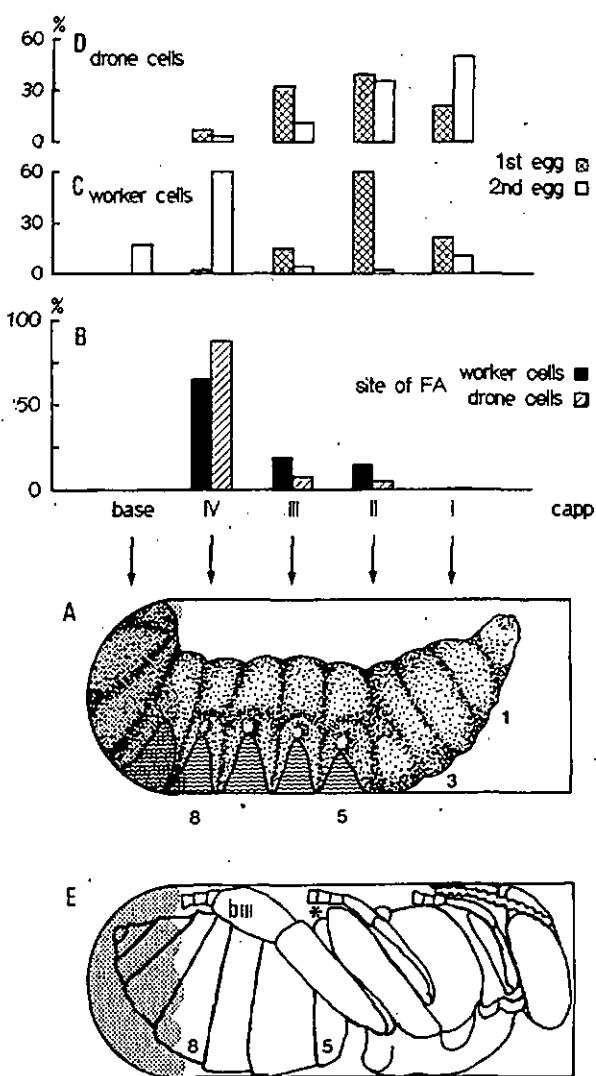


Fig. 2. A Lateral view of a worker prepupa with segments numbered from the first thoracic. For this study, the cell was arbitrarily divided into sections I to IV and cell base. Wavy lines drawn on abdominal segments represent contact with the cell wall. Bee excrement (shaded) is always deposited at the cell base and only during spinning. B Frequency of the fecal accumulation (FA) in different sections of natural and artificial worker and drone cells containing only a single FA (data pooled). C and D Site of deposition of first and second eggs in worker and drone artificial cells respectively (pooled data from single and multiinfested cells). E Lateral view of a young drone pupa. Asterisk indicates the feeding site on the 5th segment; bIII is basitarsus of leg III in its natural position. Thorax plus leg pair II form a barrier separating the cell into an anterior (i.e., towards the cap) and posterior part. The only opening in this barrier is between the tarsi of legs II

section IV, corresponding to the position of basitarsus III of the pupa (Fig. 2B, 2E). At this period, the feces become milky. The process by which *Varroa* builds the fecal accumulation (FA) on the cell wall is best understood by dividing the tracks leading to its formation into the following classes: (a) before FA formation when no feces are as yet deposited on the new cocoon; (b) onset of FA formation when a few feces have already been deposited near one another; (c) tracks leading directly to the FA after it is well formed, i.e., when *Varroa* climbs onto the cell wall in its immediate vicinity; and (d) rejoining the FA in the

Table 1. Lateral (Δx) and longitudinal (Δy) displacement of *Varroa* mothers leading to defecations and first oviposition on the cell wall of brood cells of the prepupal stage of bee development (mean $\pm$ SD per track). The start and end of the same track type was compared (horizontally) by the Wilcoxon matched pair test. Comparisons

(vertically) between values for different track types were made with the Mann-Whitney *U*-test. Values within columns followed by different letters are significantly different at the 5% level. FA, fecal accumulation

Track type	Displacement in the lateral axis						Displacement in the longitudinal axis				
	n	Track		Comparisons			Track		Comparisons		
		Start	End	Start-end	Start-start	End-end	Start	End	Start-end	Start-start	End-end
				Wilcoxon	Mann-Whitney				Wilcoxon	Mann-Whitney	
Before FA formation	6	80 $\pm$ 12.0	82.7 $\pm$ 11.0	n.s.	a	a	1.7 $\pm$ 1.9	0.5 $\pm$ 1.6	n.s.	ab	a
Begin FA formation	11	68 $\pm$ 20.0	30.5 $\pm$ 8.0	<0.001	a	b	0.1 $\pm$ 1.4	0.5 $\pm$ 2.2	n.s.	a	a
Direct to FA	8	30 $\pm$ 7.8	21.1 $\pm$ 2.7	<0.05	b	c	0.5 $\pm$ 2.0	0.1 $\pm$ 0.7	n.s.	a	a
Rejoins FA from anterior	15	36 $\pm$ 13.4	29.5 $\pm$ 8.0	<0.05	b	b	4.5 $\pm$ 3.2	1.4 $\pm$ 2.0	<0.05	b	a
Before laying	9	51 $\pm$ 12.4	51.6 $\pm$ 24.3	n.s.	c	d	-6.4 $\pm$ 5.5	-0.5 $\pm$ 3.8	<0.05	c	a

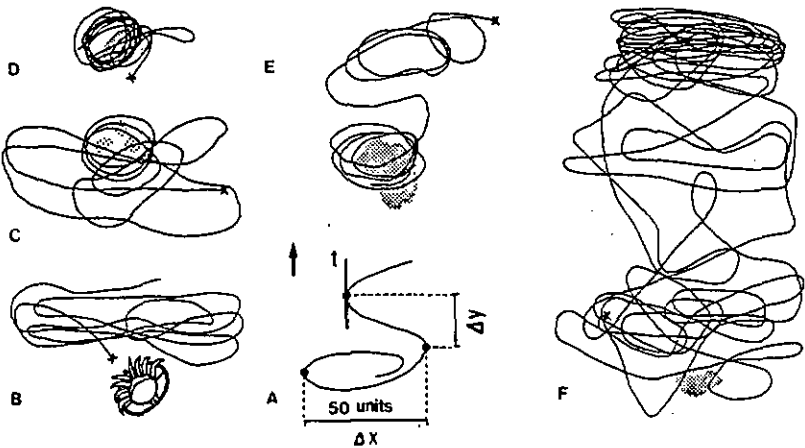


Fig. 3A-F. Tracks made by *Varroa* on the cell wall prior to defecation (B-E), and before oviposition (F) in artificial cells. Shaded zones represent *Varroa*'s feces on the cell wall, x the start of each track leading to defecation once *Varroa* regains the cell wall from the bee, and the arrow indicates the longitudinal axis of the cell towards the cell cap. A Difference between two points (●) on the track at which tangent (t) is parallel to the longitudinal axis of the cell (arrow) is ascribed a Δx and a Δy value corresponding, respectively, to displacement perpendicular and parallel to the long axis of the cell. B When no feces are present on the newly spun cocoon the mite

climbs onto the cell wall from the anal zone and regularly recrosses the cell before defecating at the cell apex. C In a cell where four feces have already been deposited near one another the mite circles on the previously deposited feces. D The mite normally regains the cell wall from the bee via the borders of section IV during the prepupal stage such that the fecal accumulation (FA) is encountered almost immediately, and the mite pivots. E When *Varroa* regains the roof of the cell anterior to the FA it circles along one side of the cell before orienting to the FA. F Track leading from the FA to the first oviposition site anterior in the cell

posterior part of the cell after *Varroa* has climbed onto the cell wall anteriorly. The track types c and d are made when the FA is well formed and were therefore studied at > 70 hpc.

The following analyses show characteristics of the tracks which lead the mite to the chosen defecation site (Table 1, Fig. 3). *Before FA formation* (Fig. 3B): within the newly spun cocoon, the mite mostly climbs. (i.e., up-turned) onto the cell wall from the anal zone and recrosses the lateral axis of the cell 8 ± 4 times in 28 ± 13 s, $n = 12$ tracks (80 units Δx^{-1} at outset versus 83 units Δx^{-1} at end for $n = 6$ tracks, n.s.) without leaving section IV (1.7 units Δy^{-1} at outset versus 0.5 units Δy^{-1} at end, n.s.). Suddenly, the mite stops at the cell apex to defecate and then moves 0.5–1 mm away. *Onset of FA formation*

(Fig. 3C): In cells where a few feces have already been deposited near one another in section IV, the number of times *Varroa* recrosses the cell roof before defecation is somewhat reduced (mean 5.4 ± 2.3 crossings in 31 ± 8.3 s, $n = 12$ tracks, n.s. compared to previous type), for once the mite encounters a previously deposited feces it turns 180° and successive IRLs grow shorter until the mite pivots on the previously deposited feces to defecate (68 units Δx^{-1} at outset versus 30.5 units Δx^{-1} at end, $P < 0.001$, $n = 11$ tracks). Such pivoting prior to defecation eventually leads to the construction of a compact FA since all feces are deposited near one another (Figs. 3C–D and 4). *Tracks leading directly to the FA* (Fig. 3D): During the prepupal stage the mite normally regains the cell wall from the bee via the borders of sec-

Table 2. Number and location of fecal accumulations (FA) in natural and artificial cells infested by a single *versus* several *Varroa* females. Sections refer to parts of the cell (Fig. 2) where single FAs

were located: contingency test for randomness by Pearson χ^2 . This test is not applicable when more than one-fifth of data sets have sparse values (<5)

Type of cell	Infestation level	Number of FA			Sections				Test for randomness
		One FA	>One FA	Fisher exact test	I	II	III	IV	
Artificial drone	uninfested	88	13	$P > 0.4$	5	5	10	68	$\chi^2 = 49.4$, $df = 3$, $P < 0.0001$ Test not applicable
	multiinfested	34	8		3	0	5	26	
Natural drone	uninfested	34	10	$P > 0.2$	0	1	4	29	Test not applicable $\chi^2 = 42$, $df = 3$, $P < 0.0001$
	multiinfested	51	8		0	0	9	42	
Artificial worker	uninfested	138	21	$P > 0.7$	3	19	18	98	$\chi^2 = 66.9$, $df = 3$, $P < 0.0001$ Test not applicable
	multiinfested	27	5		0	1	2	24	
Natural worker	uninfested	126	15	$P > 0.08$	1	6	29	89	$\chi^2 = 73.9$, $df = 3$, $P < 0.0001$ Test not applicable
	multiinfested	11	4		0	0	1	10	
Total		509	84		12	32	78	386	

tion IV (81% of 312 observations in drone and 47% of 76 observations in worker cells) such that the FA is encountered almost immediately. In this case the mite pivots on the FA (30 units Δx^{-1} at start and 21 units Δx^{-1} at end, $P < 0.05$, $n = 8$ tracks). *Rejoining the FA* (Fig. 3E): When *Varroa* regains the roof of the cell anterior to the FA the return journey to the feces typically involves circling behavior (i.e., short IRLs, 36 units Δx^{-1} , $n = 15$ tracks) unilaterally along the roof with a net displacement to section IV (4.5 units Δy^{-1} at outset versus 1.4 units Δy^{-1} at end, $P < 0.05$) where it pivots on the FA (29.5 units Δx^{-1} , $P < 0.05$ by comparison with the start) before defecation. For all tracks analyzed *Varroa* shows a significant tendency to turn repetitively in the same direction once it has started to turn. This tendency increases with feces concentration (for all tracks types $P < 0.001$, $17.8 < \chi^2 < 95$, $df = 1$).

Comparison between the different track types shows a significant decrease in lateral displacement both at the start and end of tracks as the feces is concentrated (Table 1); *Varroa* does not displace itself in the longitudinal axis of the cell during FA formation. According to where a particular mite habitually climbs onto the cell wall to defecate, the FA is sometimes placed in more anterior sections of the cell, but here also without any longitudinal displacement for cell apex location. With time, *Varroa* shows a behavior typical of that normally performed on the FA once it regains the cell wall, as shown by the short lateral displacement (35.5 units Δx^{-1}) which are observed immediately after it climbs onto the cell wall anterior to the FA. Even here, *Varroa* avoids depositing feces outside the FA towards which it eventually orients.

Only one FA was found in 509 of 620 artificial and natural worker and drone cells, and the FAs are placed preferentially in section IV in all types of cells (Fig. 2B, Table 2). The preference for section IV over other sections is the same in natural and in artificial cells ($P > 0.8$ in worker cells; $P > 0.2$ in drone cells; two-tailed Fisher exact test). In the hexagonal natural cells, feces are found at

one or both sides of the apex but we consider it as one FA here for purposes of comparison. No FA was found in only 4.3% of cells, whereas two FAs were found in 13.5% of all cells observed (Table 2).

From 44 to 48 hpc in worker cells a pronounced FA has been formed. From here on *Varroa* spends more time holding station on it (from $19 \pm 27\%$ at 48 hpc to $79 \pm 20\%$ at 90 hpc) while regularly undertaking half-circle movements on the accumulation. These regular displacements lead *Varroa* across the FA, but the mite stops at the opposite border holding its mouthparts outside the FA. Subsequently all behavior of *Varroa* appears to be with reference to the FA and progressively the mite demonstrates the following behavioral routine: once hungry, *Varroa* descends onto the bee and accesses the feeding site. After feeding, the mite soon returns to the cell wall where it stops on or near the FA, usually to defecate. The duration of successive journeys between these two sites grows shorter with time.

The position of the FA near the cell apex indicates that *Varroa* may be displaying negative geotaxis for defecation. After 24 h in upturned cells, 87% of *Varroa* had formed the FA on the cell wall, 43% of these at the usual site on the floor of the upturned cell in section IV, and 35% in section I over the head of the prepupa. Only 3.7% of FAs were found on the prepupa. In unturned controls, where 81% constructed an FA, 51% of these were at the usual site in section IV and none behind the head of the prepupa ($P < 0.001$, $\chi^2 = 17.8$, $df = 3$, compared to test).

Oviposition

Although *Varroa* has access to all parts of the brood cell at the prepupal stage it uses specific sites for egg laying. Tracks leading to first oviposition at 70 hpc (Fig. 3F, Table 1) involves heading away from the FA, recrossing the cell (5.8 ± 5 crossings; 51 units Δx^{-1} , $n = 8$ tracks), and fast displacement away from section IV (6.4 units

310

Δy^{-1}) to forward sections of the cell where it undertakes vigorous criss-crossing of the cell (23 ± 19 crossings, $P < 0.05$; 52 units Δx^{-1} , n.s., $n = 8$ tracks), without displacement in the longitudinal axis (0.5 units Δy^{-1}), before stopping to oviposit at the cell apex. The whole track lasts 5.5 ± 4 min ($n = 30$). During this time *Varroa* probes the substrate with its mouthparts at each step, resulting in a characteristic jerky walk.

Once at the oviposition site, *Varroa* stops at the apex of the cell but continues to repeatedly sample the substrate with leg pair I for 1 ± 0.5 min ($n = 32$). As the egg emerges from the genital opening the first two pairs of legs bear it and sustain it against the cell wall. After some 10 ± 3.7 min ($n = 25$), *Varroa* removes her legs one at a time from the egg, leaving it slowly some 23 ± 5.7 min ($n = 31$) after laying. The reason why *Varroa* shows so much care in placing her eggs becomes clear when one considers that the protonymph within always has its legs oriented to the substrate, allowing it to walk away at hatching: protonymphs in disturbed eggs do not succeed in leaving the eggshell ($n > 15$).

The positions of eggs laid during the prepupal stage by the mite are described here with reference to the lateral and longitudinal axes of the cell. In artificial cells, 68% of eggs ($n = 238$) were placed at the cell apex. In natural cells, 63% of eggs ($n = 49$) were likewise placed in the apex angle and 27% in the upper lateral angles of these hexagonal cells. Thus, the upper angles of natural cells are employed for oviposition in 90% of cases, a mechanical guide evidently absent in our artificial cells. Furthermore, the first egg is laid preferentially in section II of worker cells ($P < 0.0001$, $df = 3$, $\chi^2 = 37$ and 40, respectively, for 70 natural and 107 artificial cells; test for randomness). The section of the cell in which the first egg is laid in natural and artificial worker cells is the same ($P > 0.25$, $\chi^2 = 3.9$, $df = 3$). In artificial drone cells, the second egg ($n = 61$) is laid before pupation (Fig. 1) and placed preferentially anterior to the first ($n = 104$) ($P < 0.001$, $\chi^2 = 17.5$, $df = 3$), but neither egg is placed at random ($P < 0.01$, $df = 3$, $\chi^2 = 15.5$ and 22 for first and second egg in test for randomness) (Fig. 2C,D). Most eggs laid after pupation in both cell types are placed in section IV on the border of the bee excrement.

From pupation to bee emergence

Varroa mothers reactions to bee pupation

A major change in the free space available for *Varroa* occurs when the prepupa moults into the pupa (Figs. 2A,E and 4). During the bee's movements, lasting some 30 min, to extend appendages and deposit the exuvium at the base of the cell, *Varroa* is frequently pushed off the FA but quickly returns. In 91% of pupated cells ($n = 168$) *Varroa* is located in the posterior part of the cell. Immediately after pupation *Varroa* engages in "leg-pushing" resulting in the displacement of one or both of the pupa's third legs (legs were displaced in 124 of 215 natural cells and in 131 of 206 artificial cells), thus enlarging the free space around the FA. This behavior, which

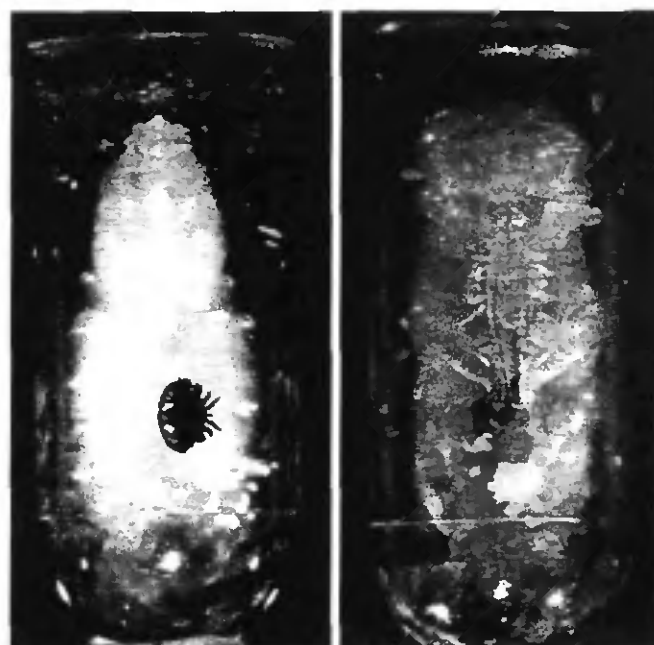


Fig. 4. *Varroa* mite parasitizing honeybee brood in artificial cells, prepupa (left) and young pupa (right); bee pupation occurs within 30 min, causing a radical change in the free space available for *Varroa*. Left The parasite begins to construct a fecal accumulation (white mass on cell wall of both cells) even at the prepupal stage. The first egg is laid on the cell wall at the level of the constriction between the abdominal and thoracic segments of the prepupa. Right *Varroa* has moved the pupal legs III laterally for access to the ventral side of segment 5, the preferred feeding site (occupied)

takes up $67 \pm 14\%$ of the time prior to the first feeding on the pupa, disappears completely some 5–6 h later. In multiinfested cells, females were seen pushing simultaneously, but in an uncoordinated way. In all uninfested cells ($n > 1000$) the tarsi III are united on the ventral side of abdomen. In artificial and natural infested cells examined ($n = 421$), pupae present three different positions of their third legs: leg pair III unmaneuvered by *Varroa* (47 and 35% respectively, of drone and worker pupae), leg pair III separated and moved to the sides of the abdomen (27 and 42%, respectively, Fig. 4), and cells with one leg III pushed forward so that more space is free on one side of the pupal abdomen (27 and 24%, respectively). The proportion of pupae presenting these three-third leg positions is the same in natural and artificial infested cells ($P > 0.17$, $\chi^2 = 3.4$, $df = 2$, $n = 259$ in worker; $P > 0.9$, $\chi^2 = 0.2$, $df = 2$, $n = 162$ in drone pupae).

Eggs and developmental stages

Despite the difference in host development between drone and worker cells, oviposition of the single haploid egg (i.e., male) begins at the same time in both cell types, at 71.8 ± 2.7 hpc ($n = 21$) and 69.5 ± 2.6 hpc ($n = 12$), respectively (Table 3). Diploid eggs (females) are laid thereafter at 29.7 ± 1.1 h intervals ($n = 43$) and the fifth egg is laid at 190.3 ± 7.7 hpc ($n = 6$ worker cells). In some drone cells a sixth egg is laid. Successive newly moulted

Table 3. Oviposition and duration of development of successive *Varroa* descendants (means $\pm$ SD; h). Hpc, hours post-capping

	First descendant		Second descendant		Third descendant		Fourth descendant		Fifth descendant	
	Mean $\pm$ SD	n	Mean $\pm$ SD	n	Mean $\pm$ SD	n	Mean $\pm$ SD	n	Mean $\pm$ SD	n
Oviposition (hpc)	70.9 $\pm$ 3.2	34	101.7 $\pm$ 2.9	23	130.3 $\pm$ 3.3	8	161.2 $\pm$ 8.5	5	190.3 $\pm$ 7.7	6
Hours since previous laying			30.2 $\pm$ 1.1	21	29.3 $\pm$ 0.8	7	29.0 $\pm$ 0.9	8	29.5 $\pm$ 1.0	7
Egg ¹	29.9 $\pm$ 1.4	28	27.4 $\pm$ 1.5	8	26.8 $\pm$ 2.0	6	25.4 $\pm$ 2.2	5	24.0 $\pm$ 1.9	6
Mobile protonymph ²	42.5 $\pm$ 5.7	16	22.9 $\pm$ 1.7	8	23.2 $\pm$ 1.9	7	18.7 $\pm$ 2.1	7	19.3 $\pm$ 3.9	9
Pharate protonymph ³	20.0 $\pm$ 1.1	9	17.0 $\pm$ 1.5	7	16.9 $\pm$ 1.7	6	17.2 $\pm$ 2.1	8	17.2 $\pm$ 1.9	6
Mobile deutonymph ²	28.1 $\pm$ 2.4	9	27.3 $\pm$ 3.0	7	27.7 $\pm$ 2.7	6	25.7 $\pm$ 1.2	5	24.6 $\pm$ 1.7	3
Pharate deutonymph ³	35.1 $\pm$ 2.4	9	48.0 $\pm$ 2.2	7	47.1 $\pm$ 2.2	5	49.0 —	1	— —	—

Data from single and multiinfested worker and drone cells (pooled); ¹ from oviposition until onset of hatch, ² from onset of moult or hatch until immobilization, ³ from immobilization until onset of moult

adult females therefore have decreasing lengths of time within the cell for mating and maturation before emergence of the bee (Figs. 1 and 5). Two eggs are laid during the prepupal stage in drone cells, such that the first protonymph is mobile at bee pupation.

Feeding pattern of *Varroa* mother

The feeding pattern of the mother varies greatly during the course of the reproduction cycle (Fig. 5). On the prepupa she feeds often (1.1 ± 0.36 bouts h^{-1} , $n = 13$ individuals) but for short periods (161 ± 109 s per bout, $n = 425$) and there is still no preference for a particular segment as a feeding site. Although the *Varroa* female often changes location she always feeds on the abdominal pleural pads (523 of 525 observations). On the contrary, during the pupal stage she feeds less often (0.34 ± 0.04 bouts h^{-1} , $n = 10$ females) but longer than on the prepupa (495 ± 254 s per bout, $n = 127$; $P < 0.0001$, Student *t*-test), and always at the same site (see below). Despite these differences the mean duration of feeding per unit time is exactly the same (173 ± 46 and 173 ± 51 s h^{-1} , $n = 13$ and 10 individuals for prepupal and pupal stages, respectively; $P < 1.0$, Student *t*-test). These periods correspond to oogenesis in *Varroa*, considered here to occur during the prepupal and pupal stages from 36 until 180 hpc. The 20 h following pupation when *Varroa* feeds for prolonged periods were not included in these calculations since during this period the feeding bouts are very long, decreasing exponentially to stabilise some 15 h later (Fig. 5). Between laying the last egg and imaginal ecdysis, the mother feeds less often (0.12 ± 0.04 bouts h^{-1} , $n = 8$ individuals) and for longer (693 ± 259 s per bout, $n = 56$) but only for 84 ± 18 s h^{-1} ($n = 8$ individuals; $P < 0.001$, Student *t*-test).

Establishment and importance of the feeding site

During the "leg-pushing" period the female feeds for the first time at 132 ± 40 min ($n = 15$) after onset of pupa-

tion. By contrast with the short feeding bouts of 2.7 ± 2 min ($n = 525$) on the prepupa, the first feed by the adult female on the pupa lasts 60 ± 25 min ($n = 15$) (Fig. 5). In cases where *Varroa* succeeds in prising the third pair of basitarsi apart, 39 of 50 feeding sites were established ventrally on abdominal segment 5 (Fig. 4). Even when *Varroa* does not succeed in pushing the legs apart, some (12 of 63) still reach the ventral zone of segment 5 to feed. In all other cases, *Varroa* preferentially feeds laterally on one of the abdominal segments 6–8. This single feeding site per pupa is used thereafter by adults and progeny (including adults of both sexes) in single and multiinfested cells. This is true in 86% of cases where the 5th segment was the choice ($n = 36$ cells for at least 48 h of observation), but when another feeding site was chosen only 50% used the same one throughout the observation period ($n = 30$ cells). In the latter case, mites either moved from a feeding site which had become melanized or fed simultaneously from two sites. Apparently an advantage stems from use of segment 5, since feeding other than on this segment occasionally resulted in bee hemorrhage and then drowning of *Varroa* progeny was observed ($n = 6$ of 67 cells).

Is the investment by the mother in establishing the single feeding site critical to her descendants? When the mother was experimentally retrieved from cells before her first feed on the pupa, all protonymphs ($n = 93$) were recovered dead 4 days later in 33 cells with mothers removed, whereas 57 of a total of 85 offspring at opening developed normally in 26 control cells. Despite modifications of its chelicerae as spermadactyls, the male feeds regularly thanks to the prepared feeding site (Fig. 5). Ingestion of hemolymph by males was confirmed by the fact that they continued to defecate even several days after molting. As *Varroa* oviposits in the anterior part of the cell during the prepupal stage in both drone and worker cells (Figs. 1 and 2) one individual hatches following pupation in front of leg pair II which form a barrier across the cell (Figs. 2E and 4). These protonymphs are hyperactive until accessing sections III + IV of the cell via the only passage between tarsi II (33 succeeded out of 51 observed). Those which remain forward of leg pair II die after some 20 h for want of access to the feeding site.

312

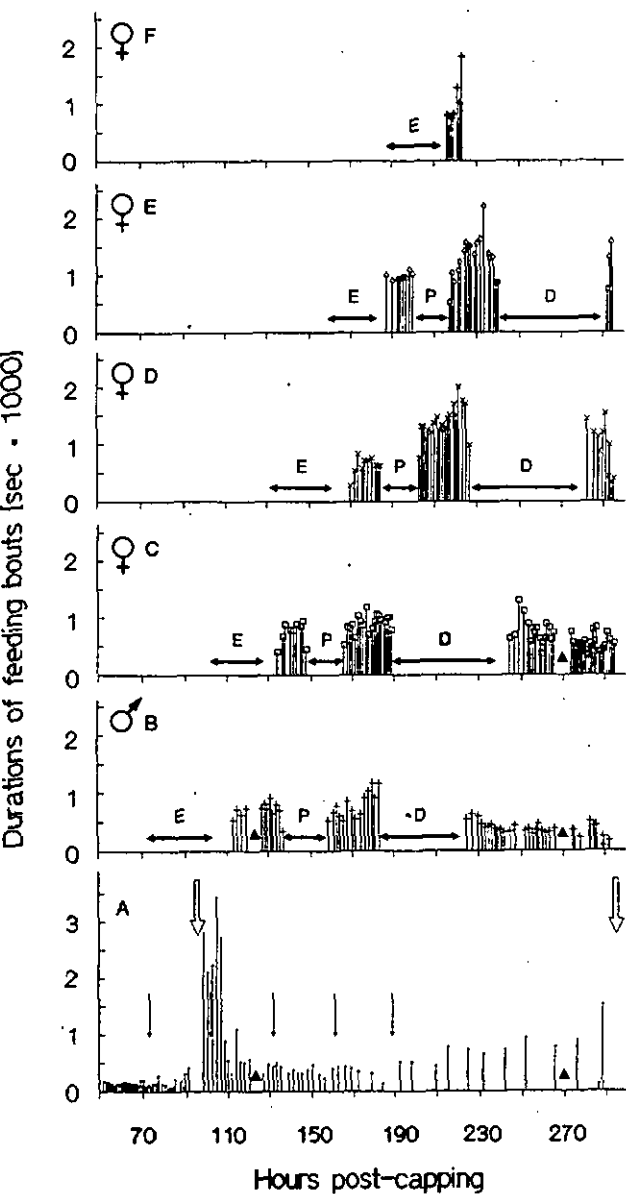


Fig. 5A–F. Incidence and duration of feeding bouts by all mites in a singly infested artificial worker cell from 50 h post-capping (hpc) until emergence of the bee. A *Varroa* mother feeding pattern. The open arrows indicate pupation (96 hpc) and imaginal ecdysis (294 hpc) of the bee, and the five thin arrows indicate ovipositions. B The feeding pattern of the single male descendant, and C–F feeding pattern of the four successive female descendants. Horizontal arrows represent immobile development stages (E, egg from oviposition until onset of the hatch; P and D, pharate proto- and deutonymph from immobilization until onset of ecdysis). The fifth descendant did not survive. Missing data are indicated by $\blacktriangle$. All feeding took place at a single feeding site on the pupa at the ventral side of the 5th segment as in Fig. 4

Competition at the feeding site

Concentration of the activity of all mites to two zones within the cell, i.e., at the FA and feeding site, results in frequent interactions between them. On the FA mites are often pushed off but halt nearby before they return to it. Such disturbance on the FA is probably not prejudicial

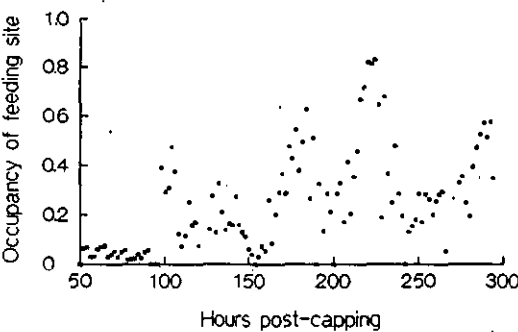


Fig. 6. Occupancy of the single feeding site in the worker cell represented in Fig. 5, as a proportion of 2-h observation intervals

to the development of nymphs. In contrast, occupancy of the single feeding site (Fig. 6) is cyclic due to regular reappearance of mobile instars in the cell, and negative consequences could be expected here if competitive interactions arise between individuals. To investigate this, we followed two cells (one singly and one doubly infested) during a 147-h period when high numbers of mobile stages occur. To determine the length of time mites showing appetitive behavior had to “wait” because the single feeding site was already occupied by another individual, the time from encounter with the previously feeding mite until the site was freed for the searching mite was measured. The searching mite was occasionally obliged to “wait” even longer due to opportunistic occupancy of the site by yet another individual.

“Waiting” individuals not only engage themselves in active search for a feeding site but were often observed to push the feeding mite and sometimes even tried to slip under it. Others just stay immobile behind the feeding mite or return to the FA. All instars were obliged to “wait” at least once at the feeding site even in singly infested cells. Although frequency of waiting does not differ statistically between instars, protonymphs must wait significantly longer than all other instars (Table 4). This difference is because protonymphs have difficulty in localizing the feeding site (Fig. 7), to the point of even permitting an additional mite to occupy it first. Furthermore, we observed that adult mites regularly displaced a feeding protonymph: 32 out of 73 protonymphs were observed to desert the feeding site just after being pushed by a newly arriving adult or deutonymph. The frequency of interrupted meals decreases in bigger instars (in deutonymphs, $P < 0.0001$; males, $P < 0.05$; and *Varroa* mothers, $P < 0.0001$, comparison with protonymphs, Fisher exact tests). The duration of the interrupted feeding bouts is shorter than uninterrupted ones for almost all instars (but significant only for the deutonymphs). These observations clearly indicate that competition arises between individuals at the feeding site and that protonymphs are most disadvantaged.

Multiinfested cells

What happens when two or more females invade a cell simultaneously? Do they form the same FA, show the

Table 4. Interactions at the single feeding site for *Varroa* developmental stages and adults. The Fisher exact test was employed to make pairwise comparisons (horizontal) of "waiting" and interruption frequencies between instars. The Mann-Whitney *U*-test was

used to compare differences in "waiting" durations between instars (horizontal), and feeding bout durations of interrupted as against uninterrupted feedings (vertical). Different letters indicate significance at the 5% level or lower

	Protonymphs	Deutonymphs		Adults		
		female	male	male	daughter	mother
Observed feeding bouts	73	98	11	21	29	32
Observed "waiting" for feeding site	35	35	7	8	11	13
Fisher exact test	a	a	a	a	a	a
Duration of "wait" [min.]	33 ± 26	10 ± 7	13 ± 10	16 ± 10	13 ± 8	9 ± 8
Mann-Whitney U-test	a	b	b	b	b	b
<i>P</i> values for comparison with protonymphs		<0.0001	<0.01	<0.05	<0.001	<0.0001
Number of interrupted feedings	32	14	4	4	7	2
Fisher exact test	a	cb	ab	bc	abc	c
Feeding duration: uninterrupted [sec.]	836 ± 320	1120 ± 320	914 ± 230	439 ± 108	653 ± 342	585 ± 304
Feeding duration: interrupted [sec.]	788 ± 422	873 ± 314	798 ± 325	381 ± 121	670 ± 345	268 ± 216
Mann-Whitney U-test comparison between interrupted & uninterrupted feeds	n. s.	<i>P</i> < 0.02	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

same oviposition site preferences and occupy the same feeding site? The proportion of all cells, i.e., single and multiinfested, worker and drone, natural and artificial cells, where only a single FA is formed varies between 73 and 89%. Comparisons between single and multiinfested cells of all types do not show any significant difference (overall *P* > 0.08, Fisher exact test, Table 2). For all types of single and multiinfested cells, the single FA is situated preferentially in section IV. Eggs laid during the prepupal stage are placed preferentially in the anterior part of both single and multiinfested cells. However, these eggs are deposited on average more anteriorly in multiinfested cells than in singly infested ones (*P* < 0.01; $\chi^2 = 15.1$, *df* = 3 in artificial drone cells; test not applicable to other cell types due to low *n*). During the pupal stage a single feeding site was used in 27 of 43 single infested cells and in 17 of 23 multiinfested cells (*P* > 0.4, Fisher exact test). The latter cells were infested by either two or three females, but we have no information for cells with higher rates of infestation. Despite the dense population of *Varroa* mothers and progeny in certain cells, we never observed cannibalism.

Varroa's use of the structured living space

During the pupal stage the mite population in the cell increases with hatching of successive protonymphs so that at 240 hpc this leads to the presence of mother, adult son and daughter, and at least one mobile nymph. Except for a few hours at the beginning of the protonymphal stage, the behavior of all mobile instars is clearly dominated by a strong tendency to remain on the FA, with individuals leaving it only to feed on the pupa. The mites mostly follow the same path (62 of 106 observations) to cover the distance between these two sites. With time, the duration of successive return trips to and from the feeding site made within a given developmental stage shortens, and this is conserved after molting (Fig. 7). Since activity of the mobile instars is concentrated in the zones

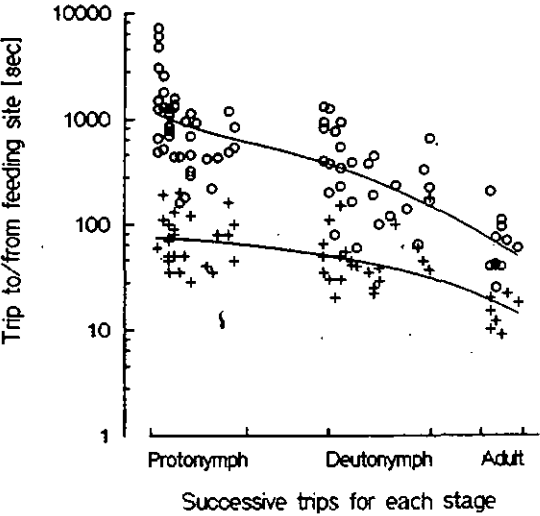


Fig. 7. Duration of successive trips from the fecal accumulation on the cell wall to the feeding site on the bee (O), and vice versa (+), made by developmental stages and adult *Varroa*. Trend lines were calculated with the distance-weighted least-squares method (Wilkinson 1990). Trip durations represent time from mobilization on the FA until onset of sucking at the feeding site, and from removal of mouth parts from the bee to arrival on the fecal accumulation. Only trips made when the feeding site was accessible were retained, so values plotted correspond to the true search efficiency

where the FA and the feeding site occur, a high proportion of deutonymphs move to the bottom of the cell behind the pupa to moult, where there is less risk of being disturbed by congeners. However, newly moulted individuals return to the FA almost immediately. Remaining on the FA evidently facilitates frequent rematings since first mating occurs within 14 ± 10 min of arrival of newly moulted adult females on the FA (*n* = 10), and over 90% of all mating events observed (*n* = 143) occur on the FA. *Varroa* males simply await female arrival at the FA, criss-crossing it regularly from one side to the other but rarely moving away from it except to feed. A male was never seen to attempt to mate with nymphs, but sometimes

314

began the mating sequence with his mother only to quickly desist.

After imaginal ecdysis the adult bee is very active until emergence some 20 h later, so that normal activity of the *Varroa* family within the cell is totally disrupted.

Discussion

These results demonstrate some remarkable adaptations on the part of *Varroa* in parasitizing the developing bee within the brood cells. This starts with hiding in the jelly to avoid detection before capping of the cell (Ifantidis 1988). Following this the mite shows great ability in making the appropriate movements on the spinning larva to avoid being trapped. When the prepupal stage is reached, the infesting *Varroa* establishes a fecal accumulation (FA) at the apex of the cell near the preferred feeding site on the pupa and within the closed-off end of the brood cell. The mother and all mobile nymphs and young adults rendezvous on the FA and matings between mature descendants occur exclusively here. Since production of a maximum number of fertilized daughters is at a premium for *Varroa jacobsoni* as a parasite of honeybee brood cells, the time limit set between capping of the cell and bee emergence probably acted as a selective pressure for the development of specialized adaptations.

Behaviors leading to establishment of the fecal accumulation

Construction of the FA on the cell wall rather than on the bee obviously preempts its disappearance at pupation and its position on the cell roof is due to the fact that *Varroa* shows negative geotaxis when defecating. This was demonstrated in the upturned prepupal cells where a third of mites sought out the only available free space to defecate, i.e., on the roof of the cell behind the head of prepupa. Only a few *Varroa* defecated on the bee, despite the fact that it covered most of the roof. Other *Varroa* females did defecate on the vacant floor of these upturned cells, but mostly near the anal zone – the region for which the mite shows greatest affinity during the early prepupal stage. The combined effects of negative geotaxis, attraction to the anal zone and avoidance of the bee go some way to explain why *Varroa* shows a preference for defecating on the cell roof not far from the anus in natural brood cells.

Varroa undertakes frequent criss-crossing of the cell before stopping at or near the apex to defecate on the unsoiled wall of the cocoon. One must remember that in natural cells the apex forms an angle and probably can be more easily located. *Varroa* no longer undertakes cell crossings to the same extent before defecating once a few feces have been placed on the cocoon, but is arrested on the previously deposited ones and pivots before defecation. Placement of the FA at one or both sides of the apex angle, rather than placing of the feces into the angle, would suggest that *Varroa* also pivots before defecation

in natural cells. Pivoting behavior is often seen in arthropods following their perception of a chemostimulant (Bell 1985; Rovner 1991; Royalty et al. 1993). Our results suggest that the female learns to recover the FA by circling once on the cell wall, but flexibility in the type of arc described is shown when the FA is not immediately encountered. This behavior evidently permits *Varroa* to systematically regain the FA, thus avoiding construction of another.

Significance of the fecal accumulation

Due to the tenacity of *Varroa* in maintaining contact with the FA during bee pupation, the mite finds itself posterior to the obstacle created by the bee's leg pair II across the cell after the pupation. The only passage to the anterior is between the tarsi of leg pair II, but this is not sufficiently wide to allow *Varroa* adults to pass. Use of the posterior region of the cell by *Varroa* and concentration of its feces at one site there could reduce any odorous emissions, a factor which may be of significance in the context of reducing detection by workers of the original Asian host *A. cerana*. Phytoseiid predators are known to be attracted by prey silk and associated feces of Tetranychidae (Hislop and Prokopy 1981; Dong and Chant 1986), and *A. cerana* workers frequently open infested brood (Peng et al. 1987a,b; Rath and Drescher 1990). It is worth noting that the cap of *A. cerana* drone brood is perforated (diameter = 0.3 mm) (Hänel and Ruttner 1985; Rath 1992), a factor which may facilitate detection of any mites living in the anterior part of the cell. By confining the family to the rear end of the cell, and by concentrating its feces in one place, *Varroa* has probably developed a tactic of reducing detection, at least when infestation densities are low.

Varroa re-establishes the behavior routine shown on the prepupa after establishing a feeding site on the pupa, i.e., holding station on the FA interrupted by trips to the bee to feed. Defecation followed immediately after feeding in most cases. The FA eventually functions as a rendezvous site for all the *Varroa* progeny in the cell, for very soon after the first meals on the bee, each protonymph finds its way to the FA. This serves to avoid both crowding of the feeding site and soiling of the bee with feces. Nymphs only leave the FA to feed and moult, so few *Varroa* stray off to other areas of the cell. The distance to the feeding site is minimal, and return trips from the FA to the feeding site made by the successive development stages shortened with time. Whether this is due to more efficient use of a chemically marked path or memorizing of the way is unclear. The net result is a reduced journey time. All this suggests that the rendezvous by *Varroa*'s mobile stages on the FA serves as a great time and energy saver for the parasite in its race to maximize the number of fertilized offspring before bee emergence.

Since males do not survive outside brood cells, fertilization of the adult daughters within the cell is paramount. However, low male survival in the brood cell acts as a factor limiting population growth. The first of

the two eggs laid during the prepupal stage in drone cells is male and this protonymph is active at bee pupation. A proportion of these male protonymphs, and eggs in both cell types does not survive the bee's movements during pupation. This partially explains why only 60% of males were found to survive in singly infested cells (Fuchs and Langenbach 1989; Otten 1991). The probability of finding a male in multiinfested cells increases (Fuchs and Langenbach 1989; Donzé et al., in prep.). The male, which matures first, passes an extended period on the FA with his mother and attempts to mate with her but without success. Newly moulted adult daughters are fertilized within a few minutes of arrival on the FA. Contrary to what occurs in other mite species, where males seek out pharate females (Potter and Wrensch 1976), *Varroa* males simply await female arrival at the FA. Concentration of all females at the same site, as against random encounters between the sexes elsewhere in the brood cell, probably serves to augment the proportion of fertilized females. This can be suggested for two reasons. Newly moulted adult females are more attractive than previously mated ones as the male shows selective attention to them once they arrive on the FA, and females already on the FA are remated frequently (Donzé et al., in prep.).

Once the last egg has been laid, the *Varroa* mother feeds less, clearly indicating her lowered requirement for nutrients. She shows a progressive loss of interest in returning to the FA, and in some brood cells shrinking of the bee allows the mother to make her way to forward sections of the cell before bee emergence.

Special oviposition adaptations

Varroa lays its eggs on the roof in anterior sections of the cell at the prepupal stage. Evidently, laying eggs on the cell wall and not on the bee preserves them from being entrapped in the exuvium at bee pupation. Subsequent eggs are likewise laid on the roof of both worker and drone cells in the posterior sections of the cell, but never on the FA. Negative geotaxis would appear to influence oviposition as almost all eggs are found at the cell apex. During the prepupal stage, when eggs can be laid in anterior sections of the cell, the mite exhibits directed movements away from the FA along the cell roof until the preferred zone for oviposition is reached. She then undertakes numerous lateral crossings of the cell, just as prior to first defecations on the cocoon, in what is obviously an effort to locate the cell apex, for it is here that most eggs are located in natural cells. The high number of crossings observed in our round artificial cells before oviposition could be interpreted to arise from the difficulty of localising the apex. However, one should remember that natural cells are rounded following spinning of the several cocoons, in which case they no longer really differ from our artificial cells. This could explain the ability of the mite to localize the apex of our round cells. Eggs are deposited very meticulously by the mother to insure that the protonymph can walk away at hatching; disturbed eggs do not yield viable offspring.

One may ask what advantage accrues to *Varroa* from

depositing its first eggs in forward sections of the cell, zones virtually cut off after pupation from sections III and IV where the *Varroa* family matures. Firstly, it distances eggs from potential disturbance by female activity on and around the FA, an activity which is heightened after pupation when females engage in creating a living space. Secondly, by being placed at the apex angle in forward section of the cell the eggs escape the unpredictable hind pushing movements of the pupal appendages, thus avoiding being pushed away with the exuvium to the base of the cell.

The single feeding site

It is of significance that *Varroa* never feeds on the thorax or head of the prepupa, thus avoiding possible damage to the developing appendages. The mother restricts her feeding to one site on the bee after pupation. This is remarkable in a number of respects. Firstly, the length of time invested by the mother on the feeding site suggests that opening of the wound on the pupa requires a high investment. The long period of some 60 min spent by the female at this task is probably not related to any physiological requirement of hers, since the meal is disproportionate to any undertaken before or after. It is more likely to be related to the incapacity of protonymphs to pierce the host. Mites do not feed from abandoned and melanized feeding sites. Since the female feeds regularly, a single feeding site located in the vicinity of the FA is maintained. This will evidently reduce the time invested in searching for a meal by all nymphal stages at one as against a number of feeding sites, some of which may not have been maintained.

Descendants who first reach adulthood are more capable of competing for the feeding site and consequently are probably endowed with a higher chance of survival. Another advantage of the fixed feeding site is that adult males can also feed despite modification of chelicerae as spermadactyls. This repudiates the belief that male *Varroa* do not feed. Feeding permits male *Varroa* to survive and produce sperm during the 5 days from imaginal ecdysis of the male to bee emergence, the period over which female progeny moult into adults.

Feeding on the pupa via the 5th segment, as occurs in the case of another insect parasitic mite (Baker 1991), appears to have a significance for *Varroa*. *Varroa* females also show a strong preference for the lateral intertergites III on the left side of the abdomen on adult bees (Delfinado-Baker et al. 1992). When the parasite cannot access the preferred site on the 5th segment of the pupa, it can feed from a number of sites on the abdomen, but the suitability of any single one of them is apparently shorter in duration. Furthermore, in such cells the risk of hemorrhaging of the bee is higher, and this can lead to drowning of the nymphs.

Behavior and space structuring

One of the most pronounced features of the *Varroa* mother's behavior is her ability to switch on appropriate be-

haviors required for specific situations within the brood cell. Although the brood cell can be viewed as a rather constant environment, the bee's development causes some dramatic changes in the space available for *Varroa* and, during specific events such as pupation, can render the brood cell pretty inhospitable for the parasite. Although certain behaviors of *Varroa* are strictly programmed, such as feeding and oviposition, the parasite shows some plasticity with others. The *Varroa* mother, for example, feeds regularly on the bee larva, prepupa and pupa except immediately after pupation. Feeding therefore appears to be directly linked to oogenesis, which begins shortly after capping of the cell (Akimov et al. 1990; Steiner 1992, 1993) and to be induced by a host factor present only for a short period (Rosenkranz 1990; Beetsma and Zonneveld 1992). Oogenesis progresses independently of whether the mite feeds on worker or drone developmental stages, since oviposition follows the same time pattern and regularity in both types of cells. In contrast to this physiologically driven fixed type of behavior, *Varroa* demonstrates great plasticity in responding to the changes in the space available. The mite for example makes no attempt to build an FA until the bee has spun the cocoon and has stretched out as a prepupa. This occurs some 12 h earlier in worker than in drone cells. It is therefore the nature of the space available which serves as the cue for the mite to construct the FA, and not *Varroa*'s physiological age. Once the FA has been constructed, the mite becomes progressively rigid in its behavior routine. In fact it only leaves the FA to feed on the bee, faithfully returning to it after each feeding bout to defecate. Holding station in this manner on the FA serves its purpose during bee pupation, when the mite is often jostled by the pushing movements of the bee's legs. By holding ground on the FA, *Varroa* is sure of finding itself in the posterior part of the cell after pupation, the preferred zone for feeding and defecation.

The basitarsi of leg III frequently cover the region of the upper cell wall near the FA following pupation. At this point *Varroa* undertakes "leg-pushing" from its position on the FA in order to dislodge the basitarsi laterally, thus providing access to both the FA and the preferred feeding site on pupal segment 5, and simultaneously enlarges the living space available in the posterior of the cell. This energy-demanding engagement by *Varroa* with the legs of its host will persist for over 90 min before its first feed on the pupa, at a time when the parasite has not fed for over 3 h. *Varroa* fails to dislodge either one or both legs in some 40% of cells. In this case the parasite again manifests some behavioral plasticity and establishes a feeding site on one of the more accessible abdominal segments.

One of the consequences of the structured living space for the *Varroa* female and her progeny is a simplification of behavioral activity, which becomes rhythmic following the physiological requirements of the mites. This limits the consumption of energy by restricting activity of mobile individuals to a small part of the cell and simultaneously facilitates mating.

Group behavior in Varroa

The evolution of the sociality in arthropods is thought to have followed the subsocial (Wheeler 1926) and the parasocial routes (Lin and Michener 1972). The subsocial sequence is characterized by co-operation in the daughter generation which stays in the family nest. The evolution of subsociality follows a continuum in the development of its complexity from simple oviposition, through egg watching, to direct feeding of the maturing descendants (Eickwort 1981; Brandmayr 1992). The evolution of sociality is thus aided by relatedness between cohabitants (kin selection; Wilson 1975) and, in some cases of haplodiploid species, by inclusive fitness (Hamilton 1964). In the parasocial scenario, on the contrary, several adults of the same generation (related or not) form a common nest and care for offspring (Michener 1974). Although many arachnid species are known to present a large variety of social behaviors which probably evolved in the above mentioned ways (Buskirk 1981), only a few examples of primitive sociality are known for the Acarina (Treat 1958, 1975; Saito 1983, 1986a,b). In these species the structure of the group is subsocial since it is formed by a fertile female, and young adult offspring remain in the nest.

Maintenance of a single feeding site on the bee by the *Varroa* female has consequences for survival of her offspring. This is shown by the incapacity of protonymphs to survive on their own on the pupa after removing the mother, or when confined to the anterior of the cell by the bee's legs after pupation. The feeding site has added advantages for adult males allowing them to feed all their life. Utilization of the FA as a rendezvous site has the double function of facilitating the localization of the feeding site nearby for offspring, and inhibits descendant dispersal. The latter has consequences for fertilization of daughters. Since the behavior of the mother not only serves herself, but also her offspring, we conclude that *Varroa* exercises parental care.

Since all individuals contribute to cell sanitation and avoid crowding of the feeding site this represents an aspect of group behavior. Despite the competition between individuals at the feeding site, the overall picture is one of mutualistic (co-operative) behavior permitting the highest number of descendants to survive, as against monopolization of the single feeding site by the biggest (oldest) one. Thus, despite the cost of each trip to the feeding site (i.e., about 1000 s for protonymphs), the benefit is represented by the accessibility of the maintained feeding site once the individual gets there. Establishment of a number of feeding sites would probably increase the risk of host mortality.

In multiinfested cells, which occur frequently with *Varroa* (Moosbeckhofer 1988; Fuchs and Langenbach 1989; Tewarson et al. 1992), construction of a single FA, and use of the same FA by several mites of the same generation, are relevant to the definition of parasociality (Lin and Michener 1972). One may therefore ask how facultative "parasocial" behavior arose or is indeed maintained, considering how *Varroa*'s communal habit within the brood cells is so rudely disrupted by emergence of the

bee. One must distinguish between innate and learned responses in any discussion on the factors which may contribute to this. Outside the brood cell (*in vitro*), *Varroa* is arrested on a flat surface by chemostimuli extractable from the feces and the bee's cuticle (Donzé and Rickli, unpublished). It is therefore plausible to suggest that *Varroa* also responds to chemostimuli under appropriate conditions within the brood cell i.e., to bee chemostimuli when hungry and to feces-associated stimuli when it wishes to defecate. Construction of the FA by the mother might therefore result from a need to maximize chemosensory input from feces at the preferred location on the roof. *Varroa* protonymphs, incapable of feeding on their own, emerge into an environment where a living space, feeding site and FA have all been prepared. The descendants are therefore preadapted from the outset for the communal use of resources. In addition, maturing individuals show a remarkable ability to learn the most efficient use of this structured space, as exemplified by the shorter duration of return trips to the feeding site from the FA made by successive development stages. Experiences in the early stages of life are known to profoundly affect the life-long behavior of a whole range of species including insects (Lewis and Tumlinson 1988; Hérard et al. 1988; Vet and Groenewold 1990; Tumlinson et al. 1993). So the communal habit and tolerance described here for *Varroa* mothers in multiinfested brood cells could well result from experiences, such as waiting at the feeding site and holding station on the FA, made with other family members during their own maturation.

Other acarine species known to practice group behavior all live in defined habitats and form structures similar to *Varroa* (Treat 1958, 1975; Saito 1983, 1986a,b). We must therefore ask if use of "cavities" by Acari (as represented by the host tympanic organ, web cells or brood cell) has permitted or even required the development of these structuring behaviors. On the one hand, these concealed habitats protect the mites and provide a stable environment near a food source, but on the other hand they require the mites to avoid competition and fouling of the habitat. Furthermore, some predisposing factors may contribute to the development of the habits particular to *Varroa*. This includes the predictability of the environment in which *Varroa* reproduces and the low genetic variability of the species (Biasiolo 1992). The latter arises from the poor dispersal of the parasite between honeybee colonies (Sakofski et al. 1990), and from its peculiar mode of reproduction where the haploid male fertilizes his diploid sisters. However, we refrain from cataloguing *Varroa*'s group behavior within any particular "sociality" category as most of the behaviors observed within the confines of the brood cell can be described as being either innate responses of the species or as resulting from the parental care afforded to progeny.

Consequences for *Varroa* as a parasite

Although dispersion of progeny within the hive is assured due to the quantity and proximity of brood cells, the original host exerts strong pressure on parasite popu-

lation growth through grooming and elimination of infested brood cells (Peng et al. 1987a,b; Rath and Drescher 1990; Boecking and Drescher 1991; Büchler et al. 1992). To combat this, the parasite is required to maintain a high rate of reproduction within the time and resource limitations of the brood cell. Structuring of the space within the cell helps in this by reducing the time spent by nymphs in searching for a feeding site, and by maximizing energy conservation through minimal displacement of all instars thanks to arrestment on the FA. However, with an increase in the number of families within a given brood cell, *Varroa* runs the risk of overexploiting the host; a dead host or one too weak to emerge imprisons the parasite (Rath 1992). The limited number of drone cells in hives of the original Asian host causes a high rate of infestation, and suggests that multiinfestation is frequent (Tewarson et al. 1992). Here *Varroa*'s group habit and resulting competition at the feeding site may contribute to limiting offspring development. This may explain the reduction in the number of adult progeny per female in multiinfested cells (Fuchs and Langenbach 1989; Moosbeckhofer et al. 1988). The trade-off for *Varroa* in multiinfested cells is the higher probability of finding a male, and consequently gene mixing between surviving progeny (Donzé et al., in prep.). Furthermore, even unmated brood-invading females may lay haploid eggs and thus transfer some of their genes via their sons in multiinfested brood cells.

Although reproduction in *Varroa* is tuned to drone cell development, this does not prevent the parasite from exploiting smaller worker cells either in *A. cerana* or *A. mellifera*. In the case of European honeybee, this exploitation of workers cells is eventually maladaptive when large numbers of workers emerge deformed (De Jong et al. 1982; Koch and Ritter 1991), prone to infection (Glinkski and Jarosz 1992) and too weak to perform essential tasks within the hive (Schneider and Drescher 1988), so bee colonies decline.

Acknowledgements. G.D. is indebted to T. Imdorf for the introduction to apiculture. The authors are grateful to P. Fluri, P.-A. Diehl, M. Rickli and T. Imdorf for helpful discussions, and to J. Moret for invaluable assistance with statistics. The research was supported by the Swiss Federal Research Institute, Liebefeld-Bern and Swiss Apiculture Societies. This paper forms part of the Ph.D. thesis being submitted by G.D. at the University of Neuchâtel.

References

- Akimov IA, Yastrebtsov AV, Gorgol VT (1988) Functional and morphological specialization of *Varroa jacobsoni* for parasitism. In: Needham GR, Page RE Jr, Delfinado-Baker M, Bowman CE (eds) Africanized honey bees and bee mites. Ellis Horwood, Maidenhead, pp 475-478
- Akimov IA, Pileckaja IP, Jastrěbcov AV (1990) Reproductive cycle of *Varroa jacobsoni* and its host connections (translated from Russian). Vestnik Zool:41-46
- Baker RA (1991) Development and life-history strategies in mussel mites (Hydrachnellae: Unionicolidae). In: Schuster R, Murphy PW (eds) The Acari. Reproduction, development and life-history strategies. Chapman and Hall, New York, pp 65-73
- Beetsma J, Zonneveld K (1992) Observations on the initiation and stimulation of oviposition of the *Varroa* mite. Exp Appl Acarol 16:303-312

318

- Bell JW (1985) Sources of information controlling motor patterns in arthropod local search orientation. *J Insect Physiol* 31:837-847
- Biasiolo A (1992) Lack of allozyme variability among *Varroa* mite populations. *Exp Appl Acarol* 16:287-294
- Boecking O, Drescher W (1991) Response of *Apis mellifera* L. colonies infested with *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 22:237-241
- Boecking O, Drescher W (1992) The removal response of *Apis mellifera* L. colonies to brood in wax and plastic cells after artificial and natural infestation with *Varroa jacobsoni* Oud. and to freeze-killed brood. *Exp Appl Acarol* 16:321-329
- Boot WJ, Calis JNM, Beetsma J (1992) Differential periods of *Varroa* mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Exp Appl Acarol* 16:295-301
- Brandmayr P (1992) Short review of the presocial evolution in Coleoptera. *Ethol Ecol Evol Special Issue* 2:7-16
- Büchler R, Drescher W, Tormier I (1992) Grooming behaviour of *Apis cerana*, *Apis mellifera* and *Apis dorsata* and its effect on the parasitic mites *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*. *Exp Appl Acarol* 16:313-319
- Buskirk RE (1981) Sociality in the Arachnida. In: Herrmann HR (ed) *Social insects*, vol II. Academic Press, New York London Toronto Sydney San Francisco, pp 281-367
- De Jong D, De Jong PH, Gonçalves LS (1982) Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *J Apicult Res* 21:165-167
- Delfinado-Baker M, Rath W, Boecking O (1992) Phoretic bee mites and honeybee grooming behavior. *Int J Acarol* 18:315-322
- Dong Huiqin, Chant AD (1986) The olfactory response of three species of predacious phytoseiid mites (Acarina: Gamasina) to a prey tetranychid species. *Intern J Acarol* 12:51-55
- Eickwort GC (1981) Presocial insects. In: Hermann HR (ed) *Social insects*, vol II. Academic Press, New York London Toronto Sydney San Francisco, pp 199-280
- Erickson EH, Lusby DA, Hoffman GD, Lusby EW (1990) On the size of cells speculations on foundation as a colony management tool. *Gleanings Bee Cult* 118:98-101
- Fuchs S (1990) Bevorzugung von Drohnenbrutzellen in Bienenenvölkern von *Apis mellifera carnica* durch *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 21:193-200
- Fuchs S, Langenbach K (1989) Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood cells and reproduction in *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 20:257-266
- Głinski Z, Jarosz J (1992) *Varroa jacobsoni* as a carrier of bacterial infections to a recipient bee host. *Apidologie* 23:25-31
- Griffiths DA (1988) Functional morphology of the mouthparts of *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae* as a basis for the interpretation of their life-styles. In: Needham GR, Page RE Jr, Delfinado-Baker M, Bowman CE (eds) *Africanized honey bees and bee mites*. Ellis Horwood, Maidenhead, pp 479-486
- Hamilton WD (1964) The genetical evolution of social behaviour I and II. *J Theor Biol* 7:1-52
- Hänel H, Ruttner F (1985) The origin of the pore in the drone cell capping of *Apis cerana* Fabr. *Apidologie* 16:157-164
- Hérard F, Keller MA, Lewis WJ, Tumlinson JH (1988) Beneficial arthropod behavior mediated by airborne semiochemicals. IV. Influence of host diet on host-oriented flight chamber responses of *Microplitis demolitor* Wilkinson. *J Chem Ecol* 14:1597-1606
- Hislop RG, Prokopy RJ (1981) Mite predator responses to prey and predator-emitted stimuli. *J Chem Ecol* 7:895-904
- Ifantidis MD (1983) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honeybee brood cells. *J Apicult Res* 23:200-206
- Ifantidis MD (1988) Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honeybee *Apis mellifera* brood cells. *Apidologie* 19:387-396
- Ifantidis MD (1990) Reexamination of reproduction parameters of the mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. In: Ritter W, Laere van O, Jacobs F, Wael de L (eds) *Proc intern symposium on recent research on Bee pathology*, Gent 1990. Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium, pp 20-26
- Ifantidis MD, Rosenkranz P (1988) Reproduktion der Bienenmilbe *Varroa jacobsoni* (Acarina: Varroidae). *Entomol Gener* 14:111-122
- Koch W, Ritter W (1991) Experimental examinations concerning the problem of deformed emerging bees after infestation with *Varroa jacobsoni*. *J Vet Med B* 38:337-344
- Le Conte Y, Arnold G, Trouiller J, Masson C, Chappe B, Ourisson G (1989) Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honey-bees by simple aliphatic esters. *Science* 245:638-639
- Lewis WJ, Tumlinson JH (1988) Host detection by chemically mediated associative learning in a parasitic wasp. *Nature* 331:257-259
- Lin N, Michener CD (1972) Evolution of sociality in insects. *Q Rev Biol* 47:131-159
- Michener CD (1974) *The social behavior of the bees*. Harvard University Press, Cambridge
- Moosbeckhofer R, Fabsitz M, Kohlich A (1988) Untersuchungen über die Abhängigkeit der Nachkommensrate von *Varroa jacobsoni* (Oudemans) vom Befallsgrad der Bienenenvölker. *Apidologie* 19:181-207
- Otten C (1991) Vergleichende Untersuchungen zum Populationsswachstum von *Varroa jacobsoni* Oud. in Völkern von *Apis mellifera* L. unterschiedlicher geographischer Herkunft. PhD Thesis, Univ. Frankfurt am Main
- Peng Y-S, Fang Y, Xu Sh, Ge L (1987a) The resistance mechanism of the Asian honeybee *Apis cerana* Fabr. to an ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *J Invert Pathol* 49:54-60
- Peng Y-S, Fang Y, Xu Sh, Ge L, Medhat, Nasr E (1987b) Response of foster Asian honeybee *Apis cerana* colonies to the brood of European honeybee *Apis mellifera* infested with parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *J Invert Pathol* 49:259-264
- Potter DA, Wrensch DL, Johnston DE (1976) Aggression and mating success in male spider mites. *Science* 193:160-161
- Radovsky FJ (1985) Evolution of mammalian mesostigmatid mites. In: Ke Chung Kim (ed) *Coevolution of parasitic arthropods and mammals*. Wiley & Sons, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore, pp 441-504
- Rath W (1992) Der Schlüssel für *Varroa*: Die *Apis cerana*-Drohnen und ihr Zelldeckel. *Allg Dtsch Imkerz* 26:12-14
- Rath W, Drescher W (1990) Response of *Apis cerana* Fabr. towards brood infested with *Varroa jacobsoni* (Oudemans) and infestation rate of colonies in Thailand. *Apidologie* 21:311-321
- Rehm SM, Ritter W (1989) Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for the calculation of the developmental period. *Apidologie* 20:339-343
- Rickli M, Guerin PM, Diehl PA (1992) Palmitic acid released from honeybee worker larvae attracts the parasitic mite *Varroa jacobsoni* on a servosphere. *Naturwissenschaften* 79:320-322
- Rosenkranz P (1990) Wirtsfaktoren in der Steuerung der Reproduktion der parasitischen Bienenmilbe *Varroa jacobsoni* in Völkern von *Apis mellifera*. PhD Thesis, Univ. Tübingen
- Rovner JS (1991) Turning behavior during pheromone-stimulated courtship in wolf spiders. *Anim Behav* 42:1015-1016
- Royalty RN, Phelan PL, Hall FR (1993) Quantitative and temporal analysis of effects of twospotted spider mite Acari: Tetranychidae female sex pheromone on male guarding behavior. *J Chem Ecol* 19:211-223
- Saitō Y (1983) The concept of "life types" in Tetranychinae. An attempt to classify the spinning behaviour of Tetranychinae. *Acarologia* 24:377-391
- Saitō Y (1986a) Biparental defence in a spider mite (Acari: Tetranychidae) infesting *Sasa bamboo*. *Behav Ecol Sociobiol* 18:377-386
- Saitō Y (1986b) Prey kills predator: counter-attack success of a spider mite against its specific phytoseiid predator. *Exp Appl Acarol* 2:47-62
- Sakofski F, Koeniger N, Fuchs S (1990) Seasonality of honey bee colony invasion by *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 21:547-550

- Schneider P, Drescher W (1988) Die Folgen eines unterschiedlich hohen *Varroa*-Befalls während der Puppenentwicklung auf die erwachsene Biene. Allg Dtsch Imkerz 22:16-18/54-56/87-91
- Schulz AE (1984) Reproduktion und Populationsentwicklung der parasitischen Milbe *Varroa jacobsoni* Oudemans in Abhängigkeit vom Brutzyklus ihres Wirtes *Apis mellifera* L. Apidologie 15:401-420
- Steiner J (1992) Reproduktion der ektoparasitischen Bienenmilbe *Varroa jacobsoni* in Völkern von *Apis mellifera carnica*. Ph.D. Thesis, Univ. Tübingen
- Steiner J (1993) Vom Ei zur Milbe: *Varroa jacobsoni*. Dtsch Bienen J 1:296-300
- Tewarson NC, Singh A, Engels W (1992) Reproduction of *Varroa jacobsoni* in colonies of *Apis cerana indica* under natural and experimental conditions. Apidologie 23:161-171
- Treat AE (1958) Social organization in the moth ear mite *Dichtocheles (Myrmonyssus) phalaenodectes*. Proc. 10th Intern. Congress Entomol., Montreal, 1956. Vol. 2, pp 475-480
- Treat AE (1975) Mites of moths and butterflies. Cornell University Press, Ithaca London
- Tumlinson JH, Turlings TCJ, Lewis WJ (1993) Semiochemically mediated foraging behavior in beneficial parasitic insects. Insect Biochem Physiol 22:385-391
- Vet LEM, Groenewold AW (1990) Semiochemicals and learning in parasitoids. J Chem Ecol 16:3119-3135
- Wheeler WM (1926) Les sociétés d'insectes - leur origine - leur évolution. Gaston Doin, Paris
- Wilkinson L (1990) Sygraph: The system for graphics. Systat Inc, Evanston
- Wilson EO (1975) Sociobiology. Belknap Press, Cambridge

Time-activity budgets of the infesting female and of the different life stages of offspring of *Varroa jacobsoni* in the honeybee capped brood.

Introduction

In its feeding habits and compartmented use of the cell space (see previous chapter) the behaviour of *Varroa* shows similarities to that of other acarine species having some forms of presociality, i.e. all infra stages of sociality (Treat 1958, 1975; Buskirk 1981; Saitô 1983, 1986; Radovsky 1985). Up to now, little has been established about the behaviour of these species in their nests, and nothing about the development of the behavioral patterns of the mites which lead to such complicated life cycles. Since the transparent artificial brood cells permit the study of the whole reproductive cycle, here an account of the behaviour of all developmental and adult instars of *Varroa* is presented. We have constructed time-activity budgets for the infesting female and for the offspring during their development. The aim of this chapter is to show how the infesting female adapts her behavioural activity during her reproductive phase along with metamorphosis of the bee. Following on this, it is possible to demonstrate how the behaviour of the offspring is modulated by the structured space until it finally converges with that of the infesting female.

Materials and methods

Behavioural observations

The observations reported here were made with the help of a computer software which analyses behavioural events as a function of time ("Observer", Noldus 1991). The focal sampling method was employed and all behaviours described in the repertoire (table 3.2.1) were recorded continuously during the observation time. During cocoon spinning by the bee larva and at the prepupal stage, *Varroa* behaviours were directly observed and recorded simultaneously, whereas during the pupal stage all observations were made *a posteriori* from long duration time-lapse video recordings (3 frames s⁻¹). We report here only on cells where reproduction and the development proceeded normally (Ifantidis 1983; Rehm and Ritter 1989, Donzé and Guerin 1994). The position of the mite in the cell, the surface on which it was situated, i.e. the cell wall or the bee cuticle, and its behaviour were recorded simultaneously. All observations made during the pupal stage were on cells where the *Varroa* family was located between the pupa's legpair III and the feeding site was situated on the 5th segment. To avoid disturbance of normal behaviour, the observation began 20 minutes after the cell was placed under the microscope. Considering the importance of geotaxis, the cell was kept in its natural position and was only turned when this was necessary for a particular observation.

Observation periods were chosen after a preliminary study of the whole reproduction cycle and were distributed non-randomly in time to get the best description of the changes occurring during the whole reproduction or development process. For this, we made a series of observations shortly after each morphological change of the bee; less frequent observations were made during periods with no changes of the host. The behaviour of *Varroa* described during these latter observations is valid for longer timespans than the observations made after the host's morphological changes. For example, as *Varroa*'s behaviour changes remarkably in the 10 hours following the bee's pupation, we chose three others observation periods during this period, whereas during the next 170 hours of the

pupal stage where *Varroa*'s behaviour evolves slowly, we only chose three observation periods.

Observations periods on the infesting female

Observations on the invading *Varroa* were ordered in hours post-capping (hpc), (fig. 3.2.1).

Spinning larva: The first observation period began just after *Varroa* came out of the larval jelly (0-1 hpc), and the three other observations were made during cocoon spinning by the larva at about 6, 12 and 24 hpc.

Prepupa: At the beginning of the prepupal stage, i.e. from 36 to 48 hpc, we chose four observation periods. At this time the *Varroa* mother copes with the new type of space available in the cell and she forms the faecal accumulation (FA).

All observations made during cocoon spinning by the larva and the prepupal stage began randomly without consideration for the mite's behavioural rhythm and lasted 60 minutes.

Pupa: Considering the major changes caused to the space available to *Varroa* by bee pupation three observation periods were made after this event. The first began as soon as the pupal appendages were completely extended (96 hpc). The second (100 hpc) and the third (103 hpc) observations on the female mite on the young pupa began at the end of her first and second feeding bouts, respectively. These three observations excluded the feeding period and lasted ca. 60 minutes. The female was next observed at 160 hpc, i.e., during the period of oogenesis, then shortly after laying of the last egg (200 hpc) and finally at 260 hpc. Because of the reduced activity of the infesting *Varroa* female during the pupal stage, these last three observations lasted 4 hours.

Observations on offspring

Observations of the offspring were ordered in hours post-mobilization (fig. 3.2.2):

a) *before the first feed* after they had left the moulting or the hatching site (i.e. mobilization) until onset of feeding; b) *for three hours from the end of the first feed*; c) *for four hours some 10 hours after mobilization*, i.e., the typical stabilized behaviour of the instar; d) *during the search for the moulting site*, starting from the end of the

last feed and lasting until immobilization at the moulting site. From onset of moult or hatch until immobilization at the moulting site the female protonymph and deutonymph last 23 and 27 hours respectively (Donzé & Guerin, 1994). e) In addition, *protonymphs situated anterior to the leg pair II* were observed for four hours before they passed between leg pair II to join the family in the posterior end of the cell.

We observed the young adult mites twice for four hours: the first observation began as soon as the male or the female *left the moulting site*, and the second observation of the young female began *20 hr after mobilization*. The second observation period on adult males began when *the first daughter arrived on the faecal accumulation*.

Analysis

Behaviour time budget

For each observation, the "Observer" software calculated both the total duration and the frequency of each behaviour displayed either on the bee or the cell wall. By dividing the time during which the mite exhibits a particular behaviour by the time during which the mite was situated on the particular surface, i.e., bee or cell wall we obtain a proportion for the behaviour which varies from 0 to 1 (or from 0 to 100%). For each observation period, the proportions obtained for each individual were plotted with the Tukey box plots (Tukey 1977; Wilkinson 1990). The box show the median, the 25th and the 75th percentiles while the bars show the minimum and the maximum values except the outliers (*) and the far outlying (o) values. This graphical representation which shows the behavior of all individuals was chosen because it gives the truest picture of trends in the behavioural activity of the mites.

Principal components analysis

Each observation period for the infesting *Varroa* and the different life stages of offspring can be characterized by the proportion of time spent at each behaviour either on the cell wall or on the bee. To avoid fragmentation of the behaviour, the method of principal components analysis (Frey & Pimental 1978) was used. With this

Table 3.2.1 Ethogram of the adult *Varroa* female.***Behaviours when immobile***

<i>"Resting"</i>	<i>Varroa</i> is immobile and performs no detectable behavioural activity
<i>Cleaning of pedipalps and legpair I :</i>	One of the legs I is held between the pedipalps which make up-down scissors movements. The pedipalps are rubbed against the first leg only during the downwards movement.
<i>Cleaning of leg-pairs II to IV</i>	The legs II to IV of one side are rubbed against each other, pairwise:
<i>Feeding :</i>	The head region is inclined and pushed against the cuticle of the bee. The chelicerae are introduced in the host cuticle, while the pedipalps remain outside on each side of the feeding lesion. Contractions of the intestine are sometimes visible through the body wall.

Displacement behaviours

<i>Walking (searching) :</i>	<i>Varroa</i> walks, while simultaneously "sampling" the substrate with its pedipalps and first legs.
<i>Repetitive sampling :</i>	The succession of short back-forward movements of the whole body without displacement. This results from alternate stretching and flexions of legs. Simultaneously, <i>Varroa</i> touches the substrate rhythmically with its pedipalps and legpair I.
<i>Pivoting :</i>	<i>Varroa</i> pivots on itself.
<i>Leg-pushing :</i>	<i>Varroa</i> abuts against an obstacle (usually against the legs of the newly moulted pupa) and pushes so fervently that the ambulacrum slide on the substrate.

Other behaviours

<i>Defecating :</i>	After relocating the faecal accumulation, <i>Varroa</i> abruptly stops, waggles its anus dorso-ventrally, deposits the feces and stops some 0.5 mm away.
<i>Legpair I high :</i>	<i>Varroa</i> raises its stretched legpair I. The whole body also has an upwards slant.
<i>Egg laying :</i>	Behaviour leading to oviposition (Donzé 1991; chapter on Reproductive phase)

multivariate analysis we attempt to represent the whole process of behaviour modulation. Here too we wish to follow trends in behaviour changes during the course of the reproduction cycle and during *Varroa* development. To obtain congruent values, the analysis was performed simultaneously for the infesting females and the descendants, but the results are plotted separately for clarity.

Results

A short description of each behaviour category displayed by the *Varroa* females is given in table 3.2.1. As the behavioural pattern of all instars on the bee as compared to the cell wall differ considerably, we analysed the mites' activity on the two surfaces separately.

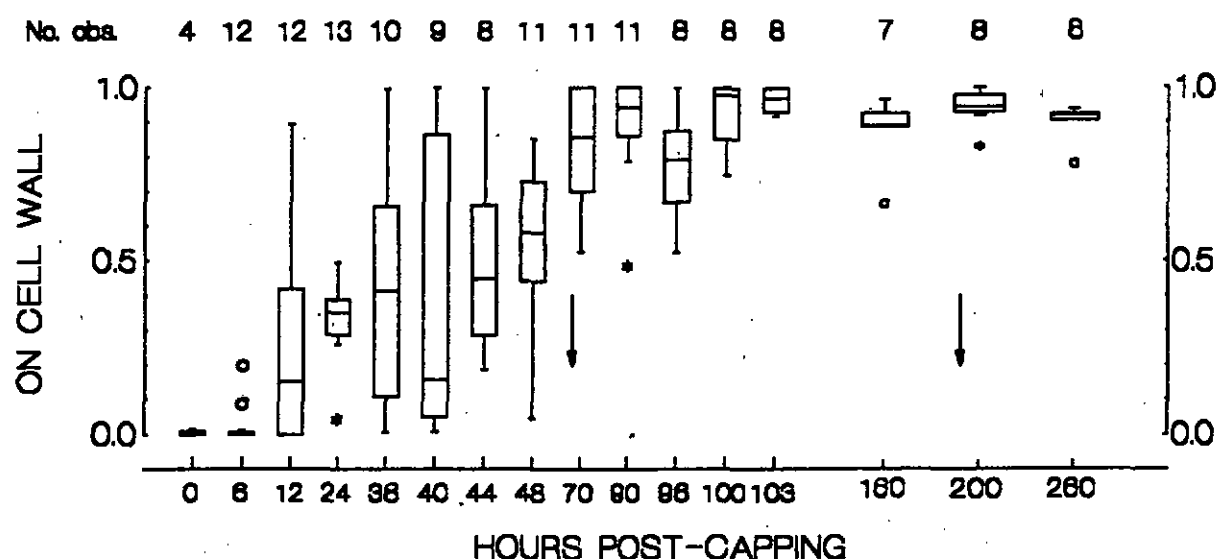


Figure 3.2.1 Amount of time spent on the cell wall by the infesting *Varroa* female as a proportion of the total duration of the observations. The observations are grouped in periods on the abscissa (not linear) as a function of hours post-capping (hpc). The number of observations per period is given above the graph. The bee's development corresponds to a worker i.e., the prepupal stage begins at some 33 hpc and the pupal stage at some 93 hpc. *Varroa* lays the first egg on average at 69 hpc and the last one at 190 hpc (arrows).

Time spent on the cell wall versus on the bee

Following departure from the larval jelly, the infesting mite was almost never observed on the cell wall. Afterwards, however, the proportion of time the mother spends on the cell wall increases progressively and reaches a median value of 0.94 at the end of the prepupal stage (90 hpc, fig. 3.2.1). The variance between individuals is maximal at the beginning of the prepupal stage. The proportion of time spent on the cell wall remains high during the whole pupal stage.

All developmental stages and young adults showed a high preference for the cell wall (figure 3.2.2) with the exception of the protonymph after the first feeding bout. This is due to the tendency by all stages to rejoin the cell wall following each feeding bout and to arrest on the FA. However, the protonymph acquires this tendency progressively (see below). Soon after the last feed, the proto- and deutonymphs search for the moulting site which is exclusively on the cell wall (medians= 0.95 and 0.97, respectively). Similarly, protonymphs situated in the anterior part of the cell were always observed on the cell wall (median=0.95).

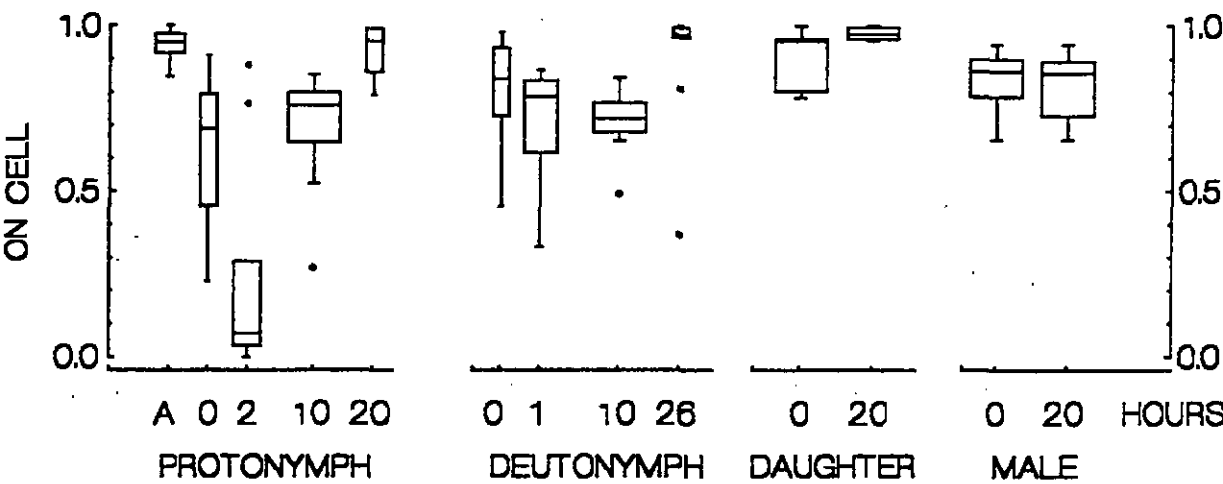


Figure 3.2.2 Amount of time spent on the cell wall by all the mobile life stages of offspring as a proportion of the total duration of the observation period. The observations are grouped in periods on the abscissa (not linear) as a function of hours post-mobilization for each instar. A indicates the protonymphs situated anterior to tarsi II (n=8). The number of observations per period is given in the table 3.2.3. The width of each box indicates the approximate duration of the observation (see text, maximum is 4 hr)

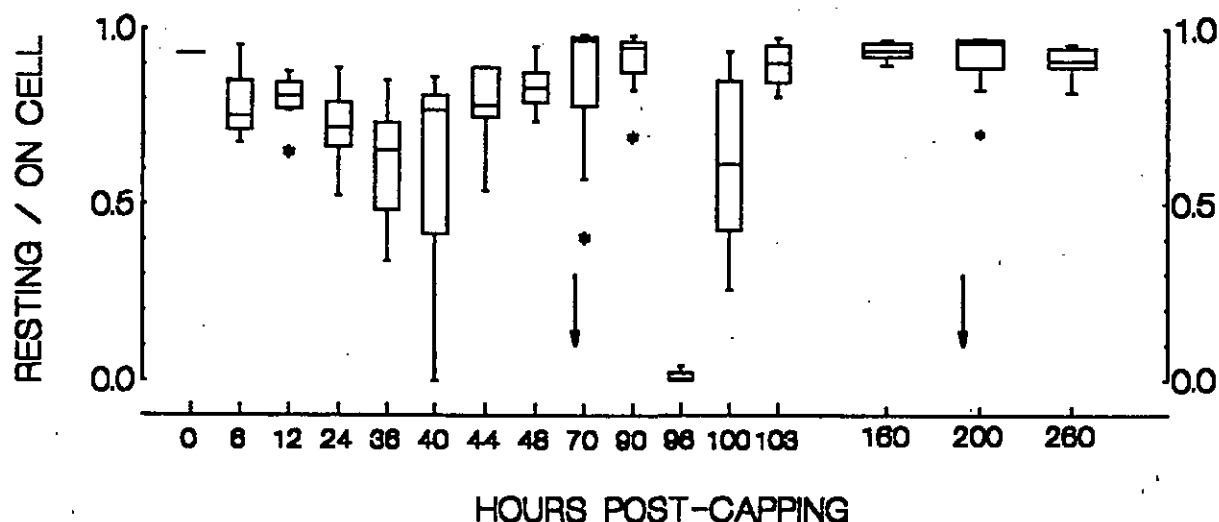


Figure 3.2.3 Proportion of time spent by the *Varroa* mother at rest when observed on the cell wall. See figure 3.2.1 for explanation.

Behaviour of the Varroa mother

On the cell wall, the mother was frequently inactive during most of the observation periods, whereas on the bee she shows a more varied behaviour (fig. 3.2.4). The first persistent behavioural change of the infesting *Varroa* commences at ca. 40 hpc. On the bee, her activity is increasingly focused on searching for the feeding site (0.05 at 0 hpc to 0.51 at 160 hpc) and feeding (from 0.007 at 40 hpc to 0.49 at 160 hpc) while the time spent resting diminishes (fig. 3.2.4). On the contrary, the mite uses the cell wall increasingly for resting (fig. 3.2.3), cleaning itself and defecating. These behavioural changes begin with the formation of the FA and are reinforced thereafter. This moulding of the female behaviour is also illustrated by the length of time which separates the end of a feed and the arrival on the FA: this duration of the trip shortens greatly to just some 20-30" at the pupal stage (fig. 3.2.5). As a consequence, the proportion of time the mother spends on the FA increases from 0.1 at 48 hpc to 0.9 at 90 and this lasts until at least 160 hpc (table 3.2.2). At the end of the prepupal stage, the *Varroa* mother demonstrates a consistent behavioural rhythm

which is maintained until the end of oogenesis, except for the short period following bee pupation.

The second durable modification of the mother's behaviour occurs following deposition of the last egg. After the last oviposition (200-260 hpc), the mother sometimes stays immobile on the bee (fig 3.2.4), whereas on the cell wall she rests far away from the FA (table 3.2.2). This is facilitated by the shrinking of the pupa so that more space is formed between the basitarsi III and the cell wall. She returns regularly onto the FA to defecate where she arrests. But, at each encounter with another individual the mother moves away from the FA towards the side of the cell.

The very strong reaction of the *Varroa* to bee pupation merits some details. Due to a new behaviour category named "leg-pushing" (table 3.2.1) the amount of time spent in "displacement" on the cell wall increases suddenly from 0.015 at 90 hpc to 0.98 at the end of pupation (96 hpc, fig. 3.2.3, 3.2.4). Prior to the first and the

Table 3.2.2 Time spent by the *Varroa* mother on three different zones of the cell wall. The proportion of time for each position is calculated as a function of the total time spent on the cell wall : median (minimum - maximum) values; n=number of individuals observed. The three sites are : *On FA* which represents the faecal accumulation and its environs; *Basitarsus III* are the zones of cell wall situated above the two basitarsi III of the pupa; and *Outside basitarsi III* are the lateral zones on the cell wall above the abdomen of the pupa but outside of the basitarsi III. See also figure 3.2.6b

Hours post-capping	On FA			Basitarsi III		Outside basitarsi III ±90° on the side	
	n	Median	Min-Max	Median	Min-Max	Median	Min-Max
48	11	0,1	(0-0.8)				
70	11	0,7	(0.3-1)				
90	11	0,9	(0-1)				
160	7	0,9	(0.8-1)	0	(0-0.1)	0	(0-0)
200	8	0,5	(0-1)	0,1	(0-0.6)	0	(0-0.4)
260	6	0,2	(0.1-0.3)	0,4	(0.1-0.8)	0,2	(0-0.8)

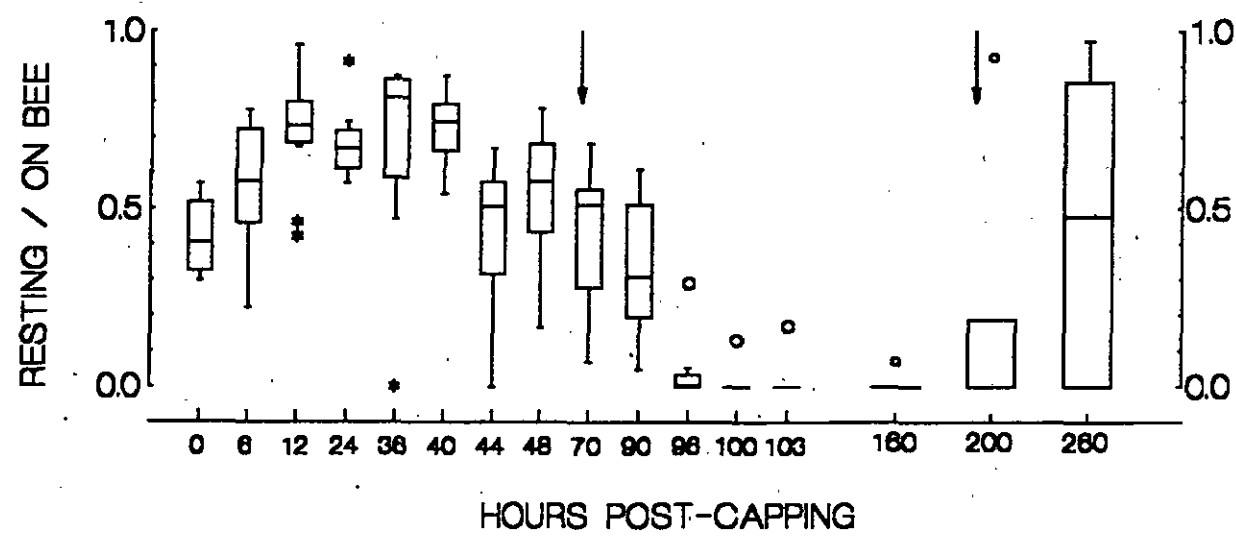


Figure 3.2.4 Proportion of time spent by the *Varroa* mother at rest when observed on the bee. See figure 3.2.1 for explanation.

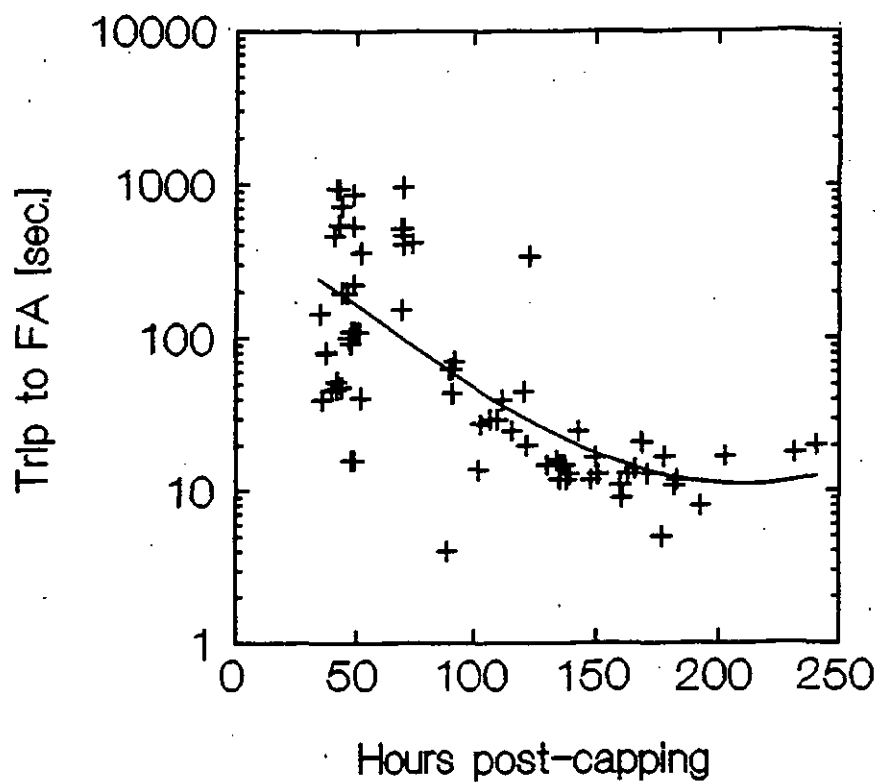


Figure 3.2.5 Trip duration of the infesting *Varroa* from the feeding site until arrival on the FA.

second feeding bouts on the young pupa, leg-pushing behaviour represents a mean of 70 ± 14 % ($n=8$) of the total displacement on both substrates. Leg-pushing behaviour leads in some cells to the displacement of one or both legs III (fig. 3.2.6) (see previous chapter for frequencies). The frequency and the duration of the leg-pushing bouts varies as follows: before the first feed, it occurs 37 ± 18 times hr^{-1} for 71 ± 38 sec bout $^{-1}$, while after the first feed it occurs only 5 ± 5 times hr^{-1} for 179 ± 118 sec bout $^{-1}$ ($n=8$ individuals). It disappears, independent of whether the position of the bee's appendages is modified or not.

Protonymphs

After hatching, the protonymphs stay at the oviposition site for several hours. Once mobile, all protonymphs (i.e. located either in the posterior or in the anterior part of the cell) are highly active on either substrate (in all cases median ≥ 0.97 ; fig. 3.2.7). Out of 9 protonymphs observed in the posterior part of the cell, only two stopped once; all the others moved permanently until onset of the first feed. Protonymphs are not at first arrested by the FA. Despite the long duration of the searching activity for the feeding site (54 ± 43 min., $n=9$), protonymphs are rarely observed in zones far from the FA and the feeding site (table 3.2.3). When they approach the feeding site they do not always succeed in locating it at once, but show an intense local search activity. We could not detect any methodical searching behaviour on the part of the protonymphs situated in the anterior part of the cell. They are very active until they join the family or until death some 20 hr after mobilization in the case where they do not succeed in locating the passage between basitarsi II. Once they pass posteriorly between the tarsi II, their level of search activity remains high until they feed for the first time.

After the first feed, 18 out of 19 protonymphs stayed immobile on the pupa (fig. 3.2.2) near the feeding site. Here, the protonymph prevents other mites from accessing the feeding site, and in 13 out of 29 cases they were consequently disturbed. After having been touched once or several times by another mite, all disturbed protonymphs moved away, and 8 out of 13 climbed onto the cell wall where they subsequently arrested on the FA. The number of protonymphs staying

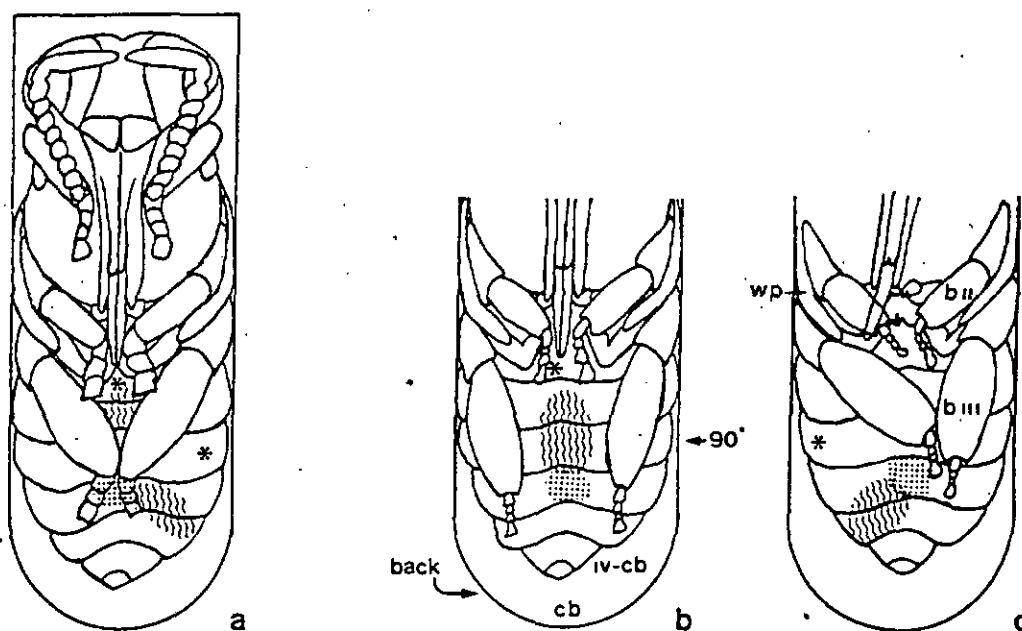


Figure 3.2.6 Defined positions on the cell wall and on the bee during the pupal stage. *Shaded zone* indicates the location of the fecal accumulation (FA) formed at the prepupal stage and the *wavy zone* represents its extension made by the *Varroa* family during the pupal stage. *Asterisks* indicate preferred feeding sites according to the *Varroa* family location. The *Varroa* family is normally situated between or outside the legs III which may be in any of the three different positions shown in this figure (see the chapter on the Reproductive phase for frequencies): a) legs III unmaneuvered by *Varroa* are united over the centre of abdomen. b) one or both legs III separated and moved to the sides of the pupal abdomen. c) One leg III is pushed forwards so that more space is available on one side of the pupal abdomen. *cb*, cell base; *bII* and *bIII*, basitarsi of the legs II and III; *90°*, *90°* on the side of the cell; *wp*, wing pads; *back*, back of the pupa or of the cell wall; *IV-cb*, border of the bee excrement, the junction-zone between section IV and the base of the cell.

spontaneously on the bee, decreases to 10 out of 19 after the second, and to 1 out of 19 after the third and fourth feeding bouts. Thereafter, all protonymphs return immediately to the FA after each feeding bout. After the first feeding bout, the protonymphs stay immobile near the feeding site for a significantly shorter duration when disturbed (42 ± 26 min., $n = 12$) than when undisturbed (78 ± 35 min, $n = 16$; $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test). Surprisingly, the protonymphs which stay on the bee do not find the feeding site quicker than those who visit there from the FA ($p > 0.5$ Mann-Whitney U-test, $n = 5$ and 6 , medians = 870 and 995 respectively). All were observed searching on both substrates.

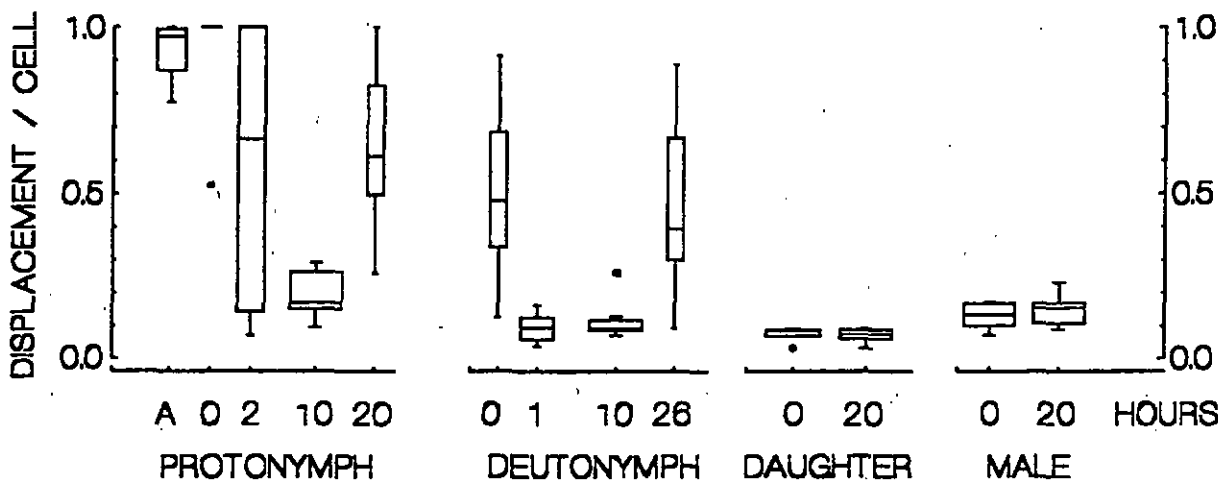


Figure 3.2.7 Time spent by the offspring in displacement as a function of the time observed on the cell wall. See figure 3.2.2 for more explanations.

Ten hours after mobilization the protonymphs exhibit a different activity according to the substrates on which they are situated. They displace themselves and feed for 30% and 68% of the time on the bee (medians). Thus, as observed for the mother, the protonymphs go onto the bee exclusively for feeding. On the other hand they rest for some 83% of the time on the cell wall.

Deutonymphs

The deutonymphs show less variation in their behaviour than the protonymphs. Once mobile, 8 of 10 deutonymphs quickly rejoined the FA where they arrested for 18 ± 17 min ($n=10$) before they began searching for the feeding site. In the period prior to the first feed, the deutonymphs walk 100% of the observation time on the bee whereas they walk only during 48 % of the time spent on the cell wall (median values). The set of behaviour acquired during the protonymph stage, i.e., to return to the FA just after feeding, is conserved. After the first feed 8 out of 10, after the second all 10 and after the third feed 9 out of 10 deutonymphs returned immediately to the FA where their displacement activity was low (median=0.1, $n=10$) (fig. 3.2.7). The deutonymphs were

strongly arrested on the FA during most of the life-stage (medians from 0.79 to 0.87), except during their search for a moulting site.

Female and male adult descendants

Just after mobilizing, the young adults rejoined the FA where they arrested. During the first four hours, they spent 75% of the time on or near the FA (medians; $n=8$ males and 6 females). In this zone, the behaviour of the adult descendants is characterised by a regular crossing of the FA (table 3.2.3). The first feeding bout occurs in the male only 4.3 ± 2.7 hr after mobilization. The males are more susceptible to stay immobile on the bee than the daughters. A description of the mating behaviour is given in the chapter on Reproductive success.

Other types of behaviour (table 3.2.1)

All instars were observed defecating on the FA but neither protonymphs nor deutonymphs nor males pivot or waggle their anus dorso-ventrally before feces deposition. These two types of behaviours were observed only in daughters and infesting mites.

Just after its liberation from the larval jelly, the infesting mite spent 30% of the time cleaning itself and six hours later this proportion had dropped to 10 % (medians). The cleaning behaviours are difficult to observe in proto- and deutonymphs, while the young females regularly show the two cleaning behaviours, mostly when they were situated on the FA. Prior to copulation, the male often cleans his chelicerae and pedipalps.

Moulting sites

After the last feed, the nymphs arrest on the FA and then begin a search activity which takes place exclusively on the cell wall (medians= 0.96 and 0.97 for proto- and deutonymphs). Some mites travel along the FA borders (fig. 3.2.8) while other individuals crisscross between the FA and the future moulting site (e.g. between the FA and the wing pads). This search activity occurs in bouts with stops (means $\pm$ SD = 6.9 ± 3 and 9.6 ± 3.6 bouts hr^{-1} for proto- and deutonymphs as

Table 3.2.3 Frequency of visits to different parts of the cell during the bee's pupal stage by all life-stages, Mean per hour $\pm$ SD per individual observed. See figure 3.2.4 for zoning of the cell. Hpm = Hours post-mobilization of the developmental stage.

Varroa Instars	hpm	n individuals	On FA	Along wing pads	Outside basitarsi III $\pm 90^\circ$ on the cell sides	Border with bee's excrements (section IV)	Base and back of cell
Protonymph							
Before feeding	0	9	2,2 $\pm$ 1,3	0,8 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,1 $\pm$ 4,0	0,2 0,4
After 1st feed	2	9	0,6 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1
10 hr after mobilization	10	9	1,7 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0
Before moulting	20	8	13,5 $\pm$ 8,4	6,5 $\pm$ 4,1	0,0 $\pm$ 0,0	6,9 $\pm$ 3,0	0,9 $\pm$ 1,8
Deutonymph							
Before feeding	0	10	4,3 $\pm$ 2,3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 1,7	1,0 $\pm$ 1,6
After 1st feed	1	10	2,0 $\pm$ 0,6	0,2 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,1
10 hr after mobilization	10	10	2,2 $\pm$ 1,0	0,2 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,1
Before moulting	26	9	15,8 $\pm$ 10	9,1 $\pm$ 5,9	0,1 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 4,5	1,0 $\pm$ 1,9
Young female							
After mobilization	0	6	4,4 $\pm$ 0,7	0,1 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,2
20 hr after mobilization	20	6	3,0 $\pm$ 0,9	0,9 $\pm$ 0,8	0,0 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,4
Young male							
After mobilization	0	8	5,4 $\pm$ 1,6	0,5 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 1,3	0,3 $\pm$ 0,3
After arrival of young female on FA	± 25	8	7,7 $\pm$ 2,6	0,5 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 2,8	0,4 $\pm$ 0,5
Infesting female							
160 hpc		7	2,2 $\pm$ 0,9	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,6	0,3 $\pm$ 0,9
200 hpc		8	1,6 $\pm$ 1,0	0,0 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,2
260 hpc		6	1,9 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0

Table 3.2.4 Positions of the eggs and pharate instars on the cell wall. Cells with pupa as shown in the figure 3.2.6. The cells are grouped according to the position of the *Varroa* family during the pupal stage. The values indicate the percentage of individuals for each instar.

Instars		n	Back of abdomen %	Cell base %	Side of abdomen %	Section IV %	Along wing pads %
Varroa family situated outside of leg pair III	Egg	27	11.1	18.5	14.8	44.5	0
	Protonymph	22	36.4	27.3	18.2	0	4.5
	Deutonymph						
	Male	39	85.7	9.5	0	0	0
	Deutonymph Female	21	71.8	5.1	10.3	0	10.3
Varroa family situated between leg pair III	Egg	53	1.9	9.4	24.5	47.2	15.1
	Protonymph	64	15.6	6.2	17.2	12.5	32.8
	Deutonymph						
	Male	69	62.5	3	6.2	3	12.5
	Deutonymph Female	32	42	5.8	14.5	4.3	24.6

against 2.3 ± 0.8 and 4 ± 1 bouts hr^{-1} , respectively, during the previous observation period, mean $\pm$ SD) and by a higher occurrence of visits to different parts of the cell (table 3.2.3). Eventually the nymph definitively leaves the rendezvous site for the moulting site which is always on the cell wall and removed from FA (table 3.2.4). During this latter trip segment the nymph moves imperceptibly as far as possible in direction of the moulting site

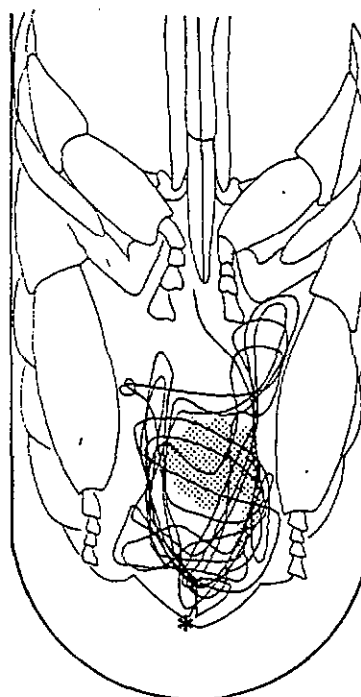
The deutonymphs moult a greater distance from the FA than the protonymphs do and a higher proportion reaches the wall at the bottom of the cell behind the abdomen of the pupa (fig. 3.2.6; table 3.2.4).

Principal component analysis

The data for all behavior types (considered separately for both substrates) plus the total time spent on the cell wall, on the bee and on the FA were analysed simultaneously for infesting females and offspring. The results of the principal component analysis are presented for the most important variables in table 3.2.5. The first principal component accounts for 39 % of the total variance and the dominant variables are "on cell wall" (weighted -0.31) and "on bee" (+0.31) (figures 3.2.9 and 3.2.10). The second principal component absorbs 31 % of the total variance and the dominant factors are "resting on the cell" (-0.27) and "displacements" (+0.29 on bee and +0.28 on cell wall).

The behaviour of the infesting female evolves progressively along the first principal component (from bee to cell wall). After the last oviposition (260 hpc) more time is spent on the bee. The females are predominantly immobile except during the period following bee pupation (96-103 hpc) (fig. 3.2.9). The behavioural activity of offspring show two main clusterings : firstly when mites search for the feeding or moulting sites, and secondly when they arrest on the FA and feed on the bee. All life stages use the cell wall preferentially except the protonymphs after the first feed (fig. 3.2.10).

Figure 3.2.8 Track made by a protonymph on the cell wall prior to immobilization on the moulting site. Track starts from the faecal accumulation and ends (asterisk) at the border of the bee excrement. Shaded zone represents the feces of mites on the cell wall. Stops by the protonymph are not indicated.



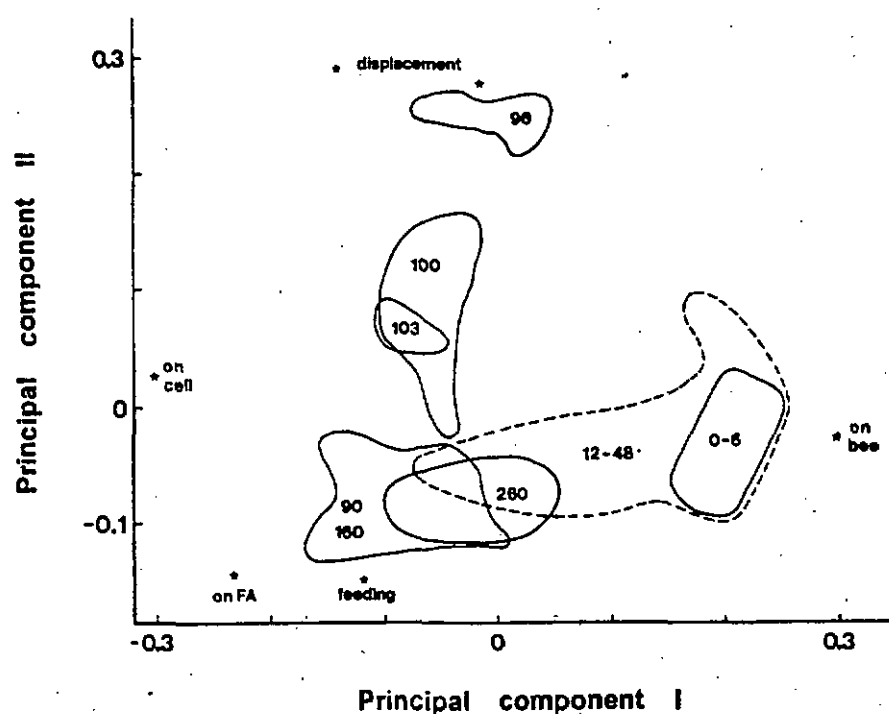


Figure 3.2.9 First two principal components of the time-activity budgets of the infesting *Varroa* from cell capping (0 hours post-capping, hpc) until late bee pupal stage (260 hpc). For clarity, some observation periods are grouped in one cluster while two are omitted (70, 200 hpc). Stars indicate the position of principal behaviours and substrates (see table 3.2.5 for coordinates).

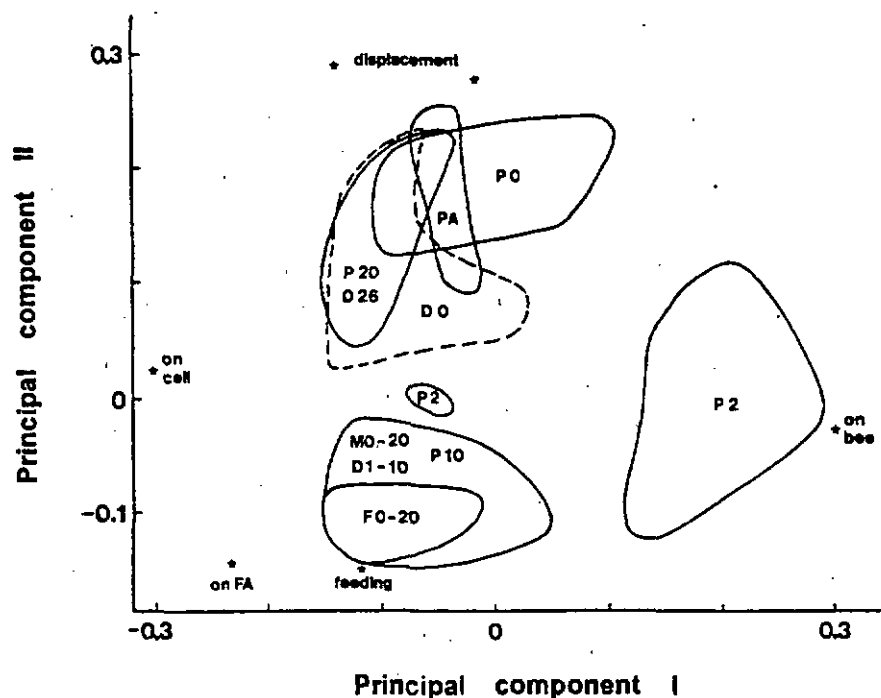


Figure 3.2.10 First two principal components of the time-activity budgets of developmental stages of *Varroa* offspring. *P* and *D* signify the proto- and deutonymphs, and the numbers indicate the observation periods in hours post-mobilization for each instar. *PA* = protonymphs situated anteriorly to legs II of the bee pupa. For clarity, some observation periods are grouped in one cluster. Stars indicate the position of principal behaviours and substrates (table 3.2.5 for coordinates).

Discussion

Nymph behaviour

The behaviour of nymphs evolves quickly to a defined pattern characterised by two components, according to the substrate used by the mite. After feeding, the mites return to the cell wall where they arrest on the FA. On the bee, however, feeding and searching behaviours represent the main occupations. The fixed pattern is reached after the third or fourth feed by protonymphs and after the first feed by deutonymphs. Once acquired, this behavioural pattern is exhibited during the rest of the instar except after the last feed when the mite searches for the moulting site. Therefore, the beginning and end of the nymphal stages can be considered as periods of transition towards the next stable phases: (i) the phase of nutrition and growth and (ii) the pharate and ecdysis phase. The results show that arrestment on the FA is inhibited only by the need to feed, as is clearly shown by the very high activity of protonymphs prior to their first feed. This data is congruent with observations on insects where food intake alters chemoreceptor sensitivity and thus influences behaviour (reviewed by Blaney et al. 1986).

The protonymphs do not seek out the cell wall after the first feed. Several reasons for this behaviour can be proposed. Due to the long search activity to find the feeding site, followed by the feeding activity, the mite is probably exhausted. Moreover, because of its increased weight, the protonymph is more likely to fall from the cell wall, where one must remember, it walks upturned. Another hypothesis could be that by resting on the bee the protonymph may localise the feeding site more quickly for the next feed, but our results do not support this. By resting near the feeding site the protonymph prevents other mites from approaching it, and so enters into conflict with cohabitants. The disturbance by other individuals eventually causes the protonymph to leave the bee for the cell wall where it encounters the FA to which they become receptive.

Arrestment on the FA is inhibited on two occasions. First, when the nymphs search for the moulting site and second, when the mother searches for an oviposition site during the pupal stage when little space is available to her. On these two occasions

the mites cross the FA or travel along its borders before leaving it. All tracks lead to a site removed from the FA. This behaviour prevents placement of eggs or pharate nymphs where the activity of the family is concentrated and therefore, the high incidence of deutonymphs moulting at the back of the cell serves to reduce their mortality following disturbance.

Table 3.2.5 Eigenvectors of the principal components, eigenvalues, percentage of variance and cumulative percentage of variance. Only the most important positions and behaviours are indicated.

Variables	Principal components				
	1	2	3	4	5
Positions					
On cell	-0.31	0.02	-0.09	-0.04	0.07
On bee	0.31	-0.02	0.09	0.04	-0.07
On FA	-0.24	-0.15	0.23	-0.12	-0.04
Behaviours					
Resting on cell	-0.13	-0.27	-0.13	-0.02	-0.06
Resting on bee	0.26	-0.10	-0.03	-0.14	0.03
Displacement on cell	-0.02	0.28	0.11	-0.03	0.07
Displacement on bee	-0.14	0.29	-0.04	-0.00	-0.14
Feeding on bee	-0.12	-0.15	0.10	0.16	0.03
Eigenvalue	0.4	0.3	0.1	0.1	0.04
% variance	0.39	0.31	0.12	0.07	0.04
% cumulative variance	0.39	0.70	0.82	0.88	0.93

Behaviour of the infesting female

The behaviour of the infesting female just after its liberation from the larval jelly shows two interesting aspects. What is at first clear is that the mite never tries to enter the narrow space between the bee larva and the cell wall, although this behaviour permitted the female mite to invade the brood cell only a few hours earlier. On the contrary, the parasite moves away to avoid being crushed by the bee larva

which undertakes somersaults after capping of the cell. Secondly, the *Varroa* females were observed exclusively on the bee larva for the first 6 hpc. This behaviour is coherent with the attractivity of the larva for the mite (Kraus & al. 1986; Le Conte & al. 1989; Rosenkranz 1990; Rickli & al. 1992, 1994) but does not explain why the mite never join the rest of larval jelly in the cell base.

At the beginning of the prepupal stage *Varroa*'s activity is concentrated in the posterior part of the cell where the FA is formed. During this time the composition of *Varroa*'s feces changes. Arrestment on the FA increases, and simultaneously, the *Varroa* mother shows a twofold activity: searching for the feeding site on the bee, and resting and cleaning itself on the FA. The stability of the behaviour induced by the FA is obvious since despite the abrupt changes of *Varroa*'s behaviour induced by pupation it is only temporarily distracted from arresting on the FA. The *Varroa* mother's activity is elevated on the young pupa and she moves everywhere in the available space. As she has not fed for a relatively long time she probably lacks the force for long leg-pushing bouts. After the first feed the available space left by the bee is defined and the motivation to engage in leg pushing is increased, as manifested by the longer duration of leg-pushing bouts.

After the last oviposition act the behaviour of the female shows some changes. For instance, she sometimes stays immobile on the pupa. Although this represents only a very small proportion of the total time observed, we must relate these events with what happens in some drone cells at the end of the bee's development (~320 hpc) where the mother has moved to the anterior part of the cell and deposited her feces at random on the cell wall or even sometimes on the bee.

Two hypothesis may be proposed to interpret the two long lasting trends which occur in the behaviour of the infesting female during the reproduction cycle. The first is related to the endogenous regulation of behaviour. After cell capping, oogenesis quickly sets in and *Varroa* increasingly uses the cell wall where it lays its eggs. After the last oviposition act, the cell wall may lose its attractivity for the mite which prepares itself for the next phase, i.e., parasitizing adult bees. In *Varroa* we do not

know either the cues which trigger oogenesis nor the ones that end it. However, it is known that behaviour can induce ovarian development in arthropods (Scott and Traniello 1987) and that the feeding status or oogenesis can influence the behaviour of mosquitoes (see Blaney et al. 1986; Klowden 1990).

The second hypothesis is that the behaviour of the mites is influenced by chemostimuli (exteroceptive influences). We know that *Varroa* reacts to olfactory (aliphatic esters, palmitic acid) and to contact (hydrocarbons) chemostimuli from larvae (Le Conte 1989; Rickli & al. 1992; Rickli & al. 1994). Some of these chemostimuli reach a maximum at cell capping and diminish in quantity by the spinning larval stage (Trouiller & al. 1992). At the same time, the larva spins its cocoon on the cell wall, deposits secretions other than the cocoon webbing (Jay 1964) and defecates at the cell base at some 10-15 hpc. Recent studies have clearly shown that cocoon extracts arrest the mites (unpublished data). Therefore, the decrease in time spent on the bee by *Varroa* during cocoon spinning could reflect a loss of larval attractivity and an increase of cell wall attractivity. This is reinforced during the prepupal stage when *Varroa* aggregate its faeces on the cell wall. *Varroa* is highly sensitive to mixtures of alkanes *in vitro* (Rickli & al. 1994) and the hydrocarbon pattern is modified during the bee's life (Nation & al. 1992; Rickli 1994). This could explain the behaviour described here at the end of bee development as well as the preference of *Varroa* for adult bees of middle age (Kraus & al. 1986; Kraus 1993; Steiner 1993). Such changes have also been described for wasps where the cuticular hydrocarbon pattern of newly-emerged adults is similar to that of the mature larvae (Brown et al. 1991). These changes do not occur in Diptera (Arnold and Regnier 1975), but the exact hydrocarbon pattern has not been described for different bee developmental stages.

Behavioural convergence

The most important aspect of the activity pattern of all *Varroa* instars is the differential use of the space within the cell. We can compare the behaviour of *Varroa* when returning to the FA after feeding with other arthropods returning to their nest (*sensu lato*) (philopatry) (Michener 1974; Buskirk 1981; Saito 1986). Thus, the

relatively short time needed by the protonymphs to establish their behavioural pattern within the cell is facilitated by the manner in which it has been compartementalized by the infesting female. This is confirmed by the behaviour of the mother which itself only stabilizes after the FA has been formed. Even here the behavioral activity of the *Varroa* female is disturbed only temporarily after bee pupation.

The principal component analysis shows that the time activity budget of the infesting female shifts principally from the bee as substrate to the cell wall (principal component I), while the time activity budgets of all developmental stages changes from displacement to resting (principal component II). This indicates the fundamental contribution of the FA to establishing a behavioural pattern by the mites.

References

Please, see the end of the thesis.

Manuscript submitted to Ecological Entomology

The effect of mating frequency and infestation rate of brood cells on the reproductive success of the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*

Gérard Donz ¹, Miriam Hermann¹, Boris Bachofen¹, Patrick M. Guerin²

¹ Department of Apiculture, Federal Research Institute, Schwarzenburgstrasse 155; 3097 Liebefeld-Bern, Switzerland

² Institute of Zoology, University of Neuchâtel, Chantemerle 22; 2007 Neuchâtel, Switzerland

Abstract. 1. The reproductive biology of *Varroa jacobsoni*, whose females infest honeybee brood, was studied in natural and transparent artificial brood cells. These investigations were made under the headings of maturation behaviour and fertilization, and the influence of infestation rate of brood cells on the number of mated females produced per infesting *Varroa*.

2. Mating of *Varroa* daughters, observed in the transparent brood cells with time-lapse video, occurs just after ecdysis as soon as they arrive on the faecal accumulation prepared by the mother. Such females are remated for as long as no other freshly molted daughter arrives on the faecal accumulation.

3. The number of spermatozoa stocked in the spermatheca increases with remating, a strong indication for sperm mixing in this species when brood cells contain more than one *Varroa* foundress.

4. The number of daughters per infesting mother decreases at higher rates of infestation per cell, but the proportion of such daughters with a mate rises sharply due to the higher probability of finding a male within multiinfested cells. The number of mated daughters per mother is maximal in cells with two foundress *Varroa* females.

5. The frequency distributions of infesting mites are not random in drone cells, but are aggregated, and approximate to negative binomial distributions.

6. We postulate from the above that the observed non random infestation by *Varroa* in drone brood augments the mite's mean reproductive success through the production of a higher number of mated daughters than the corresponding Poisson distributions would.

Key words. *Varroa*, Acari, parasite, mating, reproductive success, infestation rate, *Apis*

Page headline *Varroa* reproductive success

Introduction

Varroa jacobsoni Oud. (Acari: Mesostigmata) is one of several mite species originally infesting the Asian honeybee *Apis cerana*. Since its transfer on the European bee, *Apis mellifera*, over 50 years ago, *Varroa* has caused severe damage to its new host populations, and has by now reached an almost world-wide distribution. *Varroa* females may reproduce several times in *Apis mellifera* capped brood (Schulz 1984; Rosenkranz, 1993), and between reproduction cycles parasitize adult bees. Within the brood cell *Varroa* maintains a strictly programmed clutch size and a precise sex ratio independent of the number of foundresses. Oviposition starts at 60-70 hours post-capping with a male egg (haploid), followed by 4 - 5 female diploid eggs laid at regular 30 hr intervals (Ifantidis, 1983, 1991; Ifantidis & Rosenkranz, 1988; Rehm & Ritter, 1989; Martin 1994; Donzé & Guerin, 1994). Thanks to this, the *Varroa* male matures first and the oldest daughter moults to adulthood some 20 hours later. No reproduction occurs outside brood cells since males do not survive on adult bees, so the duration of each reproductive cycle is limited by the duration of bee development, i.e., between capping of the cell and bee emergence. This lasts longer in drone than in worker cells and more offspring will consequently mature in drone brood. Bees remove almost all mites invading worker brood on the original Asian host (Rath &

Drescher, 1990; Tewarson et al., 1992; Rosenkranz et al., 1993) so reproduction occurs exclusively in the less cared for drone brood which is seasonal (Rath, 1992; Boecking & Ritter, 1994). So the mite's population oscillates (showing a saw-tooth like pattern) between beginning and end of the drone brood season (Fries et al., 1994). On *A. mellifera*, the mites invade both worker and drone brood despite the fact that the latter is still more attractive for *Varroa* (Le Conte et al., 1989; Fuchs, 1990) and the *Varroa* population grows unchecked until the decline of the colony.

Protandry in *Varroa* permits the fertilization of a maximum number of daughters within the limited time span of the capped brood. For this, however, the newly emerged adult daughters must encounter a male. Due to developmental mortality adult males are scarce, occurring in only 60% of single infested cells, (Fuchs & Langenbach, 1989; Otten, 1991). Our observations on *Varroa* reproduction within transparent polystyrol brood cells show that the infesting mother forms a rendezvous site with her faeces on the cell wall on which all mobile individuals aggregate, and on which matings preferentially occur (Donzé and Guerin, 1994). The *Varroa* mother also prepares a feeding site on the bee pupa which is used by all offspring including the male. In cells infested by more than one *Varroa* foundress no aggressiveness between them was observed, and members of different families construct and cohabit the above mentioned structures. The increased number of progeny in such cells does, however, lead to competition at the feeding site (Donzé, 1995).

The influences of the number of foundresses and of developmental mortality on sex allocation in parasitoids have recently been modelled, albeit separately (Nagelkerke, 1993; Nagelkerke & Hardy, 1994; Heimpel, 1994). However, both parameters prevail in a population. Since *Varroa* must multiply on strictly delimited resource within the confines of the brood cell, it is not surprising that the number of adult daughters per female decreases as the number of foundresses increases (Fuchs and Langenbach, 1989; Moosbeckhofer, 1988; Eguaras et al., 1994). Despite this, multiinfested cells regularly occur. This might suggest a non random distribution of infestation as recorded for other parasites (Randolph, 1975; Anderson & May, 1978; Guyatt et al., 1990; Maizels et al., 1993) with certain advantages for the parasite. The common use

of the structures within the cells by co-foundresses would appear to indicate that some advantages accrue from multiinfestation. Thanks to observations on transparent artificial brood cells we are able to show how the frequency of rematings influences the potential fertility of daughters. Furthermore, we demonstrate that the aggregated infestation by *Varroa* of natural brood cells contributes to the occurrence of males and, as a consequence, *Varroa*'s mean reproductive success.

Material and methods

Behavioural observations

Artificial polystyrol cells (internal dimensions: 5.1 mm $\varnothing$ x 14 mm long for worker and 6.7 mm $\varnothing$ x 16 mm long for drones) containing naturally reared brood and infested by *Varroa* within *A. mellifera* colonies were used for continuous observations. After capping, the cells were transferred to a laboratory incubator maintained at 34°C and 60 % R.H.. Humidified air (2 l min⁻¹) entered the bottom of the incubator and two small fans placed at the ceiling ensured an air mix. Considering the importance of geotaxis in *Varroa* (Donzé & Guerin, 1994), the cells were kept in the natural position and turned only occasionally for observations. Matings in naturally infested artificial cells were observed round the clock from time-lapse video recordings.

Mating and fertilization

Considering the frequency with which rematings occur, we set out to estimate the possible influence of this on the number of spermatozoa stored in the spermatheca. This character was used as a parameter to estimate potential fecundity, since the number of spermatozoa contained in the spermatheca corresponds with the maximum number of eggs laid by a *Varroa* female and with the number of oocytes in the ovary (i.e. up to 30; Akimov & al., 1988; Alberti & Hänel, 1986; de Ruijter, 1987).

Young virgin female mites were obtained as follows : we introduced a healthy young worker pupa into polystyrol tubes (internal dimensions: 5.1 mm $\varnothing$ x 14 mm long) and we separated its leg pair III to permit access to the 5th segment where

mites prefer to feed (Donzé & Guerin, 1994). Then, 3-5 pharate deutonymphs were carefully deposited on their ventral face on the cell wall behind the pupa's abdomen. The tube was closed at the head end with a natural cap and at the other end with parafilm. Twelve hours later, we introduced one of these moulted virgin females and two males into new tubes with pupae. To assure the sexual maturity of the males, only those from natural brood cells which already contained one adult daughter were used. By means of direct observations, we determined the number of complete matings (i.e., those which lasted at least 6 min.) which occurred with each of the introduced virgin females. These females were isolated on bee pupae after (A) *one complete mating*, (B) *two complete matings*; and (C) *as females which had spent 48 hr with males*. The number of spermatozoa in *females from natural brood cells* (D) was compared with those in the experimental ones. Sperm counts were made on *Varroa* females three days after exclusion of males. For this, the female was maintained on its back in a ringer solution by piercing the base of the peritreme with a fine needle (0.25 mm Ø). With a second needle, the genito-ventral and metapodal shields were torn out and the genital organs (ovary, lyrate organ and spermatheca) were retrieved from the haemocoel, isolated from the digestive organs, and transferred onto a glass slide with a Pasteur pipette. Having separated the spermatheca from the other organs, a slight pressure was applied to the cover slip to expulse the spermatozoa from the spermatheca for counting.

Reproduction in natural brood cells

One empty drone or worker comb was introduced into separate *A. mellifera* colonies strongly infested by *Varroa* and the queen was enclosed on the comb for 48 hours. Once adult bees started to emerge, the combs were frozen. The age of pupae was determined on opening of the brood cells by their colour (Jay, 1962). All instars of *Varroa* infesting these cells were determined (Ifantidis, 1983; Nannelli, 1986; Rehm, 1988; Milani, 1992). Exuviae were intensively searched for, and the number of infesting females per cell, as against females progeny, was estimated by subtracting the number of adult exuviae from the total number of adult females in the cell. In order to unify the data, we calculated the average probability for each immature *Varroa* to reach adulthood before imaginal ecdysis of the host (Fuchs & Langenbach,

1989). The reproductive success was thus analysed for every infested cell according to its rate of infestation.

Reproductive success and fitness

The exact reproductive rate of each infesting female could only be ascertained from single infested cells, since multiinfested cells can contain fertile and sterile infesting females simultaneously. Therefore, our data for multiinfested cells are represented by a mean value for all foundresses in each cell. As males do not survive outside the brood, we consider the reproductive success in terms of daughters which have the opportunity to mate. Furthermore, fitness was calculated considering the following assumptions : (1) all females have the same clutch size, (2) all foundresses lay only a single male egg, (3) all foundresses in cells without adult males have zero fitness, (4) offspring of all females have equal mortality rates, (5) all adult daughters have the same chance of mating, (6) the fitness criterion is phenotypic without consideration for the genetic system, (7) the influence of inbreeding plays no role. To measure fitness (Nagelkerke, 1993) we take into count the total number of daughters (d) and males (m) as well as the mean number of males (m_f) and daughters (d_f) per mother in each infested cell.

$$F = d_f + m_f \left(\frac{d}{m} \right)$$

F is calculated for each cell and is the mean fitness gained per mother when $m > 0$; if $m = 0$ then $F = 0$ for all foundresses. The fitness gained at the level of granddaughters was not calculated since it depends of the frequency distribution of cell infestation.

Frequency distributions of infestation rates

The frequency of infestation classes (i.e. brood cells infested by 0, 1, 2, ..., 7 and > 7 *Varroa* foundresses) was recorded from brood sampled in the same beehouses as above but in a greater number of colonies. Distributions of mites were sampled in each of 28 drone brood combs from 28 beehives in May and in 16 worker combs from 16 colonies in July. The observed frequency distributions were first compared

with the Poisson distributions (i.e. random distribution) for the same mean infestation rates (MIR), defined as the total number of infesting mites divided by the total number of opened cells (V/C), with the Pearson Chi-square test at the 5% level.

As much of the quantitative analyse on host-parasite relationships have shown that the frequency distributions of parasites can be described by the negative binomial distribution (Crofton, 1971; Anderson & May, 1985) we tested its goodness of fit for *Varroa*. The negative binomial distribution is defined by two parameters i.e. the arithmetic mean of infestation (MIR) and the exponent k (Elliott, 1973). When k approaches 0 the degree of aggregation augments, and k approaches ∞ for a Poisson distribution. We calculated the expected values of the negative binomial distributions corresponding to all our observed frequency distributions and the goodness of fits were tested using χ^2 . The values of the k exponent were estimated by equating the sample mean and variance to the corresponding population values (method 1, Johnson & Kotz, 1969). Since the Pearson Chi-square test is not applicable when an expected value is lower than five, we sometimes had to group the classes. The degree of freedom is equal to the number of classes minus the number of parameters of the theoretical distribution, i.e., one for the Poisson and two for the negative binomial distribution.

Varroa reproductive success in drone versus worker brood

The observed infestation frequency of the cells was combined with the reproductive success of mites according in relation to the level of infestation data (table 3.3.1) to calculate the average reproductive success of all infesting mites on each of the worker and drone combs sampled. The mean reproductive success per *Varroa* mother per comb is provided by:

$$\frac{\sum_{i=0}^{\infty} (p_i \cdot RS_i \cdot i)}{\sum_{i=0}^{\infty} (p_i \cdot i)}$$

Where p_i is the probability for brood cells containing i *Varroa* foundresses and RS_i is the average number of daughters per mother produced in cells with i foundresses. For purposes of comparison, the mean reproductive success was calculated for each comb firstly with the observed frequency distribution and again with its theoretical Poisson frequency distribution for the same mean infestation rate.

Results

Mating

Developing and adult offspring are observed preferentially on the faecal accumulation where 90% of mating events occur ($n=287$). The only preliminary to mating consists of cleaning of the pedipalps and chelicerae by the male. A complete mating can be described as follows. When he encounters a female, the male climbs indiscriminately onto her dorsal shield and reaches the gnathosomal region. Then, he invariably hugs the lateral border of her dorsal shield which is equipped with spines and samples it intensively with his leg pair I. When male encounters the spineless anal region of the female some 5.8 ± 0.8 s (mean $\pm$ SD, $n=16$) he crawls under her venter which the female simultaneously lifts off the surface. The male then undertakes lateral crisscrossings on her sternal shield, and intensively samples the female coxae and sternal shield with his leg pair I and pedipalps, respectively (for 142 ± 43 s, mean $\pm$ SD, $n=16$). Then he stops in the centre of the female's venter and orients his gnathosoma in the direction of his genital opening. His pedipalps and chelicerae execute back and forth movements until a moist, glistening ball appears. Following 110 ± 30 s, the male directs himself to one side of the female to the base of legs III-IV where the sperm induction pore (solenostome) is located and grasps the border of her dorsal shield with his external legs III and IV. He stays immobile in this position for 200 ± 52 s (mean $\pm$ SD, $n=16$) before reaching for the opposite legs of the female where he stays for a short time (17 ± 12 s, mean $\pm$ SD, $n=16$). After some lateral crisscrossings (63 ± 22 s, mean $\pm$ SD, $n=16$), the male leaves the female.

We observed 287 mating events in 247 hr of observation in six cells with adult daughters. The distribution of the mating duration is clearly bimodal with $70.5 \pm 8.4\%$ (mean $\pm$ SD) lasting less than 3 min and $25.8 \pm 8.2\%$ (mean $\pm$ SD) lasting longer than 6 min ($n=6$ males). Since only the latter present the complete mating sequence described above we assume that sperm transfer only occurs in matings which last at least six minutes.

Adult offspring undertake frequent rematings. After the arrival of a newly moulted daughter on the FA ($n=5$), the male no longer makes complete matings with the older females (fig. 3.3.1A). When no additional daughter moults to adulthood, the male continues to complete matings with the sole one present ($n=2$) (fig. 3.3.1B). In cells with adult daughters, only 3.1 % of matings occur with the mother and all were interrupted.

Mating and fertilization

Successive newly-moulted adult females are afforded different durations of time for fertilization before bee emergence. In one brood cell with three daughters the first one was mated nine times within 37 hr, the second 4 times in 12 hr and the third twice in the 4 hr period separating the mite's mobilization after moulting and the bee's imaginal ecdysis (fig. 3.3.1). The round prospermatozoa have migrated to the spermatheca about two days after mating. One day later, they take on a fusiform shape and progressively the ribbon form (0.18-0.23 mm long). With increasing frequency of rematings the number of spermatozoa stored in a female's spermatheca increases (fig. 3.3.2). No female which had been mated only once ($n=5$) had spermatozoa, whereas 9 out of 14 females mated twice stored between 1 to 26 spermatozoa. When mating proceeded *ad libitum* for 48 hr, the spermatheca contained over 24 spermatozoa in 10 of 11 females dissected ($p < 0.0001$, $df=4$, Kruskal-Wallis test). All pairwise comparisons between the different groups were statistically different ($p < 0.03$, $U > 12.5$, $df=1$, Mann-Whitney U-test) except between females where matings proceeded *ad libitum* and those from natural brood cells ($p=0.97$) (fig. 3.3.2, groups C and D).

Reproduction in natural brood cells

Adult female offspring is present in about 60 % of single infested drone and worker cells ($n=183$ and 167 , respectively) but, in multiinfested cells, this proportion rises fast. However, these cells must be grouped in two categories (table 3.3.1): those cells with one or several female daughters but without any adult male, and those named "perfect cells" which contain adult offspring of both sexes. Cells without males account for, respectively, 17% and 23.5% of both single infested drone and worker cells. This category decreases at higher infestation rates, yet, it is still quite astonishing to discover this situation in some drone cells infested by four to six *Varroa* mothers. Perfect cells account for only 46% and 36,6% of the single infested drone and worker cells, respectively, but these proportions rise sharply with multiinfestation. Considering all single infested cells, each invading female produces on average 1.07 daughters in worker cells ($n=167$), but 1.62 daughters in drone cells ($n=183$) (table 3.3.1). By contrast, the number of males per mother is relatively constant for all infestation rates and cell types. In drone brood, the total number of daughters per mother which reach adulthood decreases with rising infestation rate. Counts were too low for worker brood to draw a conclusion. If we consider single infested perfect cells only, we obtain 1.8 and 3.0 daughters per mother in worker ($n=77$) and drone cells ($n=67$), respectively.

Not all young females have the opportunity to mate since in the cells without adult males no matings occur. Only daughters from perfect cells can be considered to determine the fitness or the effective reproductive success. But if the sex ratio in these perfect cells is too low, as for example in multiinfested ones, the male(s) present will not succeed in fertilising the high number of daughters. The mating period begins at some 230 hours post-capping (hpc) and ends at 280 hpc in worker cells (330 hpc in drone cells), and each male executes 0.3 ± 0.07 (mean $\pm$ SD, $n=6$ males) complete matings per hr. In this 50 to 100 hr period a male can thus undertake 15 and 30 complete matings in worker and drone cells, respectively. If we assume that each female must be mated 4 times to acquire an adequate number of spermatozoa (fig. 3.3.2), then a male could fertilize some 3.75 females in worker and 7.5 females in drone cells. From our data on 366 single and multiinfested worker and

drone cells these values were exceeded only once in a double infested drone cell where eight daughters were present for a single male.

Of the 1.62 daughters in single infested drone cells ($n=183$) 1.11 daughters have the opportunity to be fertilised (here named "mated" daughters) and 0.51 don't (table 3.3.1). The fitness of the infesting females at 2.2 (table 3.3.1) exactly corresponds to double the number of the mated daughters because both values are only calculated for perfect cells with an average reproductive success per foundress. Since the proportion of perfect cells clearly increases with multiinfestation, a maximum number of mated daughters and fitness per infesting *Varroa* is reached in cells invaded by two mites. At higher infestation rates the number of mated daughters decreases due to the abrupt diminution in the total number of daughters per mother (table 3.3.1). The global proportion of females daughters which had no opportunity to mate due to the absence of a male was 15.1% ($n=1091$) in the drone brood and 17% ($n=276$) in workers cells.

Infestation pattern

From the foregoing, one could hypothesize that the average reproductive success of all infesting *Varroa* females will depend on their frequency distribution in brood cells. In worker combs on the one hand, the mean infestation rate (MIR) varies from 0.09 to 0.82 *Varroa* per cell (V/C) and only eight of 16 observed frequency distributions differ from the corresponding Poisson distributions for the same MIR (fig 3.3.3A). On the other hand, in drone cells the observed MIR is between 0.1 and 4.4 V/C, and 24 of 28 observed distributions are aggregated and differ significantly from Poisson distributions. Compared to the Poisson distributions, these aggregated distributions are characterized by (i) a prevalence of infestation which is always lower (fig. 3.3.4), and (ii) a more frequent proportion of highly infested cells (fig. 3.3.3).

The expected values of the best-fit negative binomial distributions do not differ from the observed values in 23 out of 24 distributions from drone brood, and in 4 out of 6 distributions in worker brood (for four drone and 10 worker combs the χ^2 test was not applicable). The values of the exponent k increase for higher MIRs,

suggesting a reduction of the degree of aggregation with an increasing *Varroa* population.

Aggregated distributions and reproductive success

Since the distribution of the infesting *Varroa* in the drone cells is not random, we investigated the consequence of this aggregated distribution for the mite's mean reproductive success. In drone combs with MIRs under 1 V/C there is no influence of the MIR on the mean number of daughters/mother and on the mean number of mated daughters/mother (mated daughter = $1.266 - 0.02 \text{ MIR}$, $n = 21$, $r^2 = 0.009$, $p < 0.7$). But when the MIR goes over 1 V/C, the reproductive success decreases (fig. 3.3.5).

Furthermore, when the reproductive success of the observed distributions and those of the equivalent Poisson distributions are compared, the plots show that the observed distributions lead to a higher number of mated daughters/mother when the MIR is lower than 1 V/C (range 1.13 - 1.38, $\text{mean} \pm \text{SEM} = 1.26 \pm 0.01$, $n = 21$) (fig. 3.3.6). The mean reproductive success of the theoretical distributions increases regularly from 1.14 to 1.27 mated daughters per mother with a mean of 1.22 ± 0.04 ($\text{mean} \pm \text{SEM}$, $n=21$) when the MIR is lower than 1 V/C. It is worth noting that the average reproductive success from the observed distributions of 1.26 approaches the maximum of 1.27 mated daughters per mother predicted by Poisson distributions (fig. 3.3.6). When the MIR exceeds 1 V/C, the observed distributions lead to a lower estimated reproductive success than the Poisson distributions.

Discussion

Reproduction in natural brood cells

In this study, a female infesting a cell alone has an average of 1.1 adult daughters in a worker cell and 1.6 daughters in a drone cell. These values are lower than those of Fuchs & Langenbach (1989) and Otten (1991) who obtained 1.4 and 2.2 daughters per mother, respectively. On the other hand, our data are higher for worker brood than those of Ifantidis (1984; 1991) who obtained 0.7-0.9 daughters. But his value for

drone brood (1.7 daughters per mother) is similar to ours. Although these variations could be due to bee genetic variation or climatic conditions, other factors could also influence the estimation of the expected number of adult daughters at bee emergence. Firstly, in the cells containing older pupae it is possible to mistake adult daughters, which have darkened, for their mothers. We tried to avoid this by counting the exuviae. Secondly, not all descendants reach adulthood, such that the higher the age of the analysed brood the lower the expected reproduction rate will be, but the more accurate.

In the studies cited above on *Varroa*'s reproduction the frequency of adult males recorded in cells is more constant and reaches about 0.6 males per infesting female (Fuchs & Langenbach, 1989; Otten, 1991). The rate of mortality at approximately 0.4 must be reduced by the proportion of non reproducing mites, i.e., 0.15. Some causes of the mortality of progeny can be deduced from observations on transparent artificial cells (Donzé & Guerin, 1994), and the risks incurred by male eggs or protonymphs must be analysed separately for drone and worker brood. In drone cells, the male protonymph becomes mobile during the prepupal stage but is rarely observed to feed until the single feeding site is prepared by his mother on the young pupa, some 25 hr later. By contrast, later emerging female protonymphs have access to the prepared feeding site and feed almost immediately. Apart from being starved for 25 hr, should the male happen to be at an unfavourable site during the bee's pupation, the protonymph can be squashed by the pupa's movements or be caught by the prepupal exuvium which is deposited at the cell base. Careful examination of the bee's exuvium led us to discover a dead male nymph in several cells. In worker cells, by contrast, the male is still in the egg at bee pupation. Although this egg is carefully deposited in the protection of the cell apex, some of them are still disturbed by other mites in multiinfested cells or by the emerging appendages of the pupa. Moreover, the male protonymph always hatches in the anterior part of the cell after pupation and has to rejoin the posterior section to access the prepared feeding site (Donzé & Guerin, 1994). Some of these males do not find the only opening between pupa's tarsi II and consequently die. Some *Varroa* males, which are haploid (de Ruijter &

Pappas, 1983; Steiner *et al.*, 1982), probably also die in both male and worker cells because of a lethal genetic mutation (Smith & Shaw, 1980).

Varroa's observed mean reproductive success is surprisingly low compared to its potential reproduction. However, in the perfect cells where adults of both sexes mature, 1.8 daughters per mother are produced in single infested worker cells and 3.0 in drone brood. These results are quite close to the potential reproductive success and even higher than data recorded by other authors who did not exclude cells without males from their estimates (Ifantidis, 1984; Fuchs & Langenbach, 1989). The growth of *Varroa*'s population is thus chiefly limited by the high number of sterile mites and by developmental mortality.

Varroa's mating and fertilization strategy

Since males do not survive outside capped brood, *Varroa* daughters must meet with males within the cell to be fertilized. Though the brood cell is a restricted environment, the available space is subdivided into two parts after pupation, a factor which could prevent encounter of the sexes (Donzé & Guerin, 1994). Arrestment by all stages on the faecal accumulation, outside of when they feed, assures the opportunity for rapid mating once adult. Without this arrestment, each sex would have to search actively for a mate as in other mite species where males search for pharate deutonymphs (Potter *et al.*, 1976; Dimock, 1983). Despite this, the high proportion of interrupted matings could reflect sperm depletion or another incapacity on the part of the male to complete the high number of attempted matings. We never observed aggression between males, but a male can disturb a mating couple and sometimes supplant another male. However, we have no evidence to suggest female guarding.

The mating sequence described here is similar to that described for other Mesostigmata (Wooley 1988). The mode of sperm transfer is termed podospermy because males transfer the sperm with the help of their chelicerae which are modified into tube-like spermadactyls (Krantz & Wernz, 1979; Akimov *et al.*, 1988; Ifantidis & Rosenkranz, 1988). The sperm is injected by the spermadactyls into the

solenostomes which are situated in the arthropodial membrane between the coxae III and IV of the female (Alberti & Hänel, 1986). The pattern of mating encounters follows two patterns. First, as long as no other newly moulted daughter arrives on the FA, matings occur with the female which is present. Second, as soon as a new daughter arrives, mating proceeds almost exclusively with her (we observed only one complete mating with an older daughter in such a circumstance). In doing so, the males assure the transmission of the highest number of spermatozoa to a maximum number of newly moulted females in the limited time available. Several matings are needed to fill the spermatheca, which rarely contains over 35 spermatozoa.

We may ask what advantages rematings provide and whether in themselves they will not reduce the chances of fertilisation of following females. To explain frequent remating two non-exclusive hypotheses are congruent with the biology of *Varroa*. Firstly, that rematings increase the level of fecundity and secondly, the occurrence of several males in multi-infested cells leads to the competition between them. Our results indicate that rematings augment a female's fecundity. Since experimentally transferred females can lay up to thirty eggs during seven cycles (de Ruijter, 1987), the life reproductive success of a female depends on the number of spermatozoa in her spermatheca. However, the reproductive success of a female is also strongly dependent on two factors. First the number of mated daughters can be overestimated in multiinfested cells where a single male is present and where several females can reach adulthood at the same time. Secondly, we cannot ascertain the real fecundity of females as this is strongly dependent on female survival in the beehive: the host defends itself and may kill mites (Rosenkranz et al. 1993; Boecking & Ritter 1994; Büchler 1994). On *A. mellifera* 14 % of marked *Varroa* females were observed to reproduce at least three times (Rosenkranz, 1993). Thus, in accepting a remating, both the male and female can hope to increase their life-time fitness. Furthermore, we show here that *Varroa* can be polyandrous in multiinfested cells. The benefits of polyandry are controversial (Hardy, 1994). On the one hand, Ridley (1993) argued that polyandry could enhance the genotypic diversity of siblings which compete in one patch. On the other, polymating could decrease the effect of temporary sperm depletion in one male and therefore serves females in increasing the probability of

obtaining sperm (Godfray, 1994). Females which accept rematings can expect to be provided with better sperm by yet another male and secondly held to assure reproductive capacity of its descendants by reducing their inbreeding. It is generally assumed that haplo-diploid populations do not suffer from inbreeding depression, for haploid subjects with a lethal mutation die. But, according to Helle (1965), inbreeding in arrhenotokous mites occurs and causes the viability of eggs to deteriorate. In the case of *Varroa*, genes may mingle within the population only in the multiinfested cells. Therefore, to reduce inbreeding (since matings occur exclusively in the capped brood cells), *Varroa* permits the progressive stockage of spermatozoa from different matings and males in multiinfested cells.

Varroa's frequency distribution in cells and reproductive success

The infestation behaviour of *Varroa* on *A. mellifera* was studied by Fuchs (1985; 1992; Fuchs & Müller, 1988) who noted that at a low mean infestation rate (MIR) in worker brood the distribution of mites is approximately random, but not so in drone cells at a high MIR. However, this author did not distinguish between the frequency distributions of infesting *Varroa* in worker and drone brood at similar MIR levels. This he assumed to be equal. In this study we show that even at a low MIR the frequency distributions of mites are aggregated, but in drone cells only. Comparable aggregated distributions have been cited for a wide range of parasitic species (Anderson & May, 1978), such as ticks (Randolph, 1975) and helminths (Guyatt *et al.*, 1990; Maizels *et al.*, 1993). In helminths infesting humans the non-random infestation pattern is influenced by undefined genetic, immunological, ecological, behavioural or host social factors (Schad & Anderson, 1985). In the case of *Varroa*, infestation may be explained by the fact that the behaviour of the mite is influenced by volatile (Le Conte *et al.*, 1989; Rickli *et al.*, 1992) and contact chemostimuli (Rickli *et al.*, 1994) from larvae. Furthermore, the period for the cell invasion by *Varroa* on drone brood (40 hr) is relatively long as compared to worker brood (20 hr) (Ifantidis, 1988; Boot *et al.*, 1992). From this it is easy to see why a higher amount of chemostimuli (Trouiller *et al.*, 1992) added to a longer period for cell invasion will increase the prevalence for drone compared to worker brood (Fuchs, 1990). In addition, we show here that the infestation of drone larvae is not a random process,

which may indicate individual differences between cells in the amount of stimuli triggering mite infestation. Furthermore, we cannot exclude that cells already invaded by mites become more attractive for some reason to other *Varroa*. Considering the small volume of the beehive, this may be the reason why such remarkably biased distributions arise in the relatively short periods of time available for cell invasion.

Although no precise data are available on the distribution of *Varroa* in *A. cerana* brood we do know that the percentage of infested drone cells rarely exceed 60 % (Tewarson *et al.*, 1992; Anderson, 1994). From our data, a prevalence of 60 % corresponds to 1 V/C for when the MIR does not exceed this value the MIR and the percentage of infested drone cells are linearly related ($r^2=0.9$; $y = 0.05 + 0.016 x$). If we assume that the infestation behaviour of *Varroa* is similar on *A. mellifera* as on *A. cerana*, then the data of these other authors indicate that the MIR on *A. cerana* is below 1 V/C.

In *Varroa*, an advantage accruing from the biased distributions may be advanced on the basis that a maximum number of mated daughters is produced when two or three mites simultaneously reproduce in the same cell, but not all cells may be infested by two or three mites. As shown here the strategy adopted by *Varroa* is more successful with an aggregated distribution than with a random one when the MIR stays below 1 V/C. At low MIR levels our data suggest rather predictable frequency distributions of the mites. The aggregation leads to an average reproductive success approaching the optimum predicted by the Poisson distributions. Thus, at the beginning of the brood season it is advantageous for the remaining *Varroa* in a hive to aggregate and increase their reproductive success

An ultimate explanation usually submitted for biased distributions of parasites is that they provide a partial refuge for the host, i.e., aggregated distributions ensure that an unexpectedly large number of hosts escape parasitization. This by-product of the aggregation assures that the parasite has a host population on which to insure survival (Begon & Mortimer, 1986). Since *Varroa* exclusively infests the scarce drone cells in the original Asian host (Tewarson *et al.*, 1992; Anderson, 1994) and such

infested drones produce fewer spermatozoa (Schneider & Drescher, 1988) the partial refuge would permit some drones to escape infestation and thus permit a high quality of reproduction by bees.

When mating is non-panmictic and progeny mate only at their natal site the mating structure involves local mate competition. When the number of foundresses is small the sex ratio is typically female-biased. Recent papers have explored the influence of developmental mortality on optimal sex ratio allocation and show that the risk of female virginity is correlated with the level of developmental mortality (Heimpel, 1994). Nagelkerke and Hardy (1994) stressed that only male mortality influence sex allocation strategy under local mate competition, and that the rate of mortality is more important for small clutch size. These models however are limited to a single foundress per offspring group. We show here that multiinfestation can attenuate the negative effect of developmental mortality. However, clutch size must not lead to overexploitation of resources. Therefore, to understand the evolution of the programmed sex ratio and small clutch size we also have to consider the frequency distribution of foundresses in the brood.

Acknowledgments We thank G. Buehlmann, G. Alberti, P. Fluri, J.-D. Chamière, J. Baumgärtner, and two anonymous referees for discussion and criticism of the manuscript. G. D. has great pleasure in thanking T. Imdorf for the introduction to apiculture and for his motivating support, and J. Moret for invaluable assistance with statistics and programming. The research was supported by the Swiss Federal Research Institute, Liebefeld-Bern, Swiss Apiculture Societies and the Swiss Federal Veterinary Office, Liebefeld. This paper forms a part of the Ph. D. thesis being submitted by G.D. at the University of Neuchâtel.

References

- Akimov, I.A.; Starovir, I.S.; Yastrebtsov, A.V.; Gorgol, V.T. (1988) *Varroa* mite the agent of the bee Varroaosis. Naukova Dumka, Kiev. 117 pp (In russian).
- Alberti, G.; Hänel, H. (1986) Fine structure of the genital system in bee parasite *Varroa jacobsoni* (Gamasida: Dermanyssina) with remarks on spermiogenesis, spermatozoa and capacitation. *Experimental & Applied Acarology*, **2**, 63-104.
- Anderson, D.L. (1994) Non-reproduction of *Varroa jacobsoni* in *Apis mellifera* colonies in Papua New Guinea and Indonesia. *Apidologie*, **25**, 412-421.
- Anderson, R.M.; May, R.M. (1978) Regulation and stability of host-parasite population interactions. 1. Regulatory processes. *Journal of Animal Ecology*, **47**, 219-247.
- Anderson, R.M.; May, R.M. (1985) Helminth infections of humans: Mathematical models, population dynamics, and control. *Advances in Parasitology*, **24**, 1-101.
- Begón, M.; Mortimer, M. (1986) Population ecology. A unified study of animals and plants. Blackwell scientific publications, London, Edinburgh, Boston, Melbourne, Paris, Berlin, Vienna. 220 pp.
- Boecking, O.; Ritter, W. (1994) Current status of behavioral tolerance of the honey bee *Apis mellifera* to the mite *Varroa jacobsoni*. *American Bee Journal*, **134**, 689-694.
- Boot, W.J.; Calis, J.N.M.; Beetsma, J. (1992) Differential periods of *Varroa* mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Experimental & Applied Acarology*, **16**, 295-301.
- Büchler, R. (1994) *Varroa* tolerance in honey bees - occurrence, characters and breeding. *Bee World*, **75**, 54-70.
- Crofton, H.D. (1971) A quantitative approach to parasitism. *Parasitology*, **62**, 179-193.
- de Ruijter, A. (1987) Reproduction of *Varroa jacobsoni* during successive brood cycles of the honeybee. *Apidologie*, **18**, 321-326.
- de Ruijter, A.; Pappas, N. (1983) Karyotype and sex determination of *Varroa jacobsoni* Oud. In: R. Cavalloro (Ed.) *Varroa jacobsoni* Oud. affecting honey bees: present status and needs. Proc. Meeting EC Experts'Group/Wageningen, 1983. A.A. Balkema Publishers/Rotterdam. 41-44.
- Dimock, R.V.Jr (1983) In defense of the harem: intraspecific aggression by male water mites (Acan: Unionicolidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **76**, 463-465.
- Donzé, G. Behavioral attributes of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* during its reproductive phase in the brood of the honeybee *Apis mellifera*. PhD thesis, University of Neuchâtel. 154 pp.
- Donzé, G.; Guerin, P.M. (1994) Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology & Sociobiology*, **34**, 305-319.
- Eguaras, M.; Marcangeli, J.; Fernandez, N.A. (1994) Influence of 'parasitic intensity' on *Varroa jacobsoni* Oud. reproduction. *Journal of Apicultural Research*, **33**, 155-159.
- Elliott, J.M. (1973) Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates. Fresh water biological Association, Scientific publication No 25, Ferry House, 148pp.

- Fries, I.; Camazine, S.; Sneyd, J. (1994) Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: A model and a review. *Bee World*, **75**, 5-28.
- Fuchs, S. (1985) Quantitative diagnosis of the infestation of bee hives by *Varroa jacobsoni* and distribution of the parasitic mite within the hives. *Apidologie*, **16**, 343-368.
- Fuchs, S. (1990) Bevorzugung von Drohnenbrutzellen in Bienenvölkern von *Apis mellifera carnica* durch *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, **21**, 193-200.
- Fuchs, S. (1992) Choice in *Varroa jacobsoni* Oud. between honey bee, drone or workerbrood cells for reproduction. *Behavioral Ecology & Sociobiology*, **31**, 429-435.
- Fuchs, S.; Langenbach, K. (1989) Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood cells and reproduction in *Varroa jacobsoni* OUD. *Apidologie*, **20**, 257-266.
- Fuchs, S.; Müller, K. (1988) Invasion of honeybee brood cells by *Varroa jacobsoni* in relation to the age of the larvae. in: European research on varroaosis control. Proc. of a meeting of the EC Expert's Group / Bad Homburg 1986. ed. Cavalloro R. 77-79.
- Godfray, H.C.J. (1994) Parasitoids. Behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press, New Jersey. 473 pp.
- Guyatt, H.L.; Bundy, D.A.P.; Medley, G.F.; Grenfell, B.T. (1990) The relationship between the frequency distribution of *Ascaris lumbricoides* and the prevalence and intensity of infection in human communities. *Parasitology*, **101**, 139-143.
- Hardy, I.C.W. (1994) Polyandrous parasitoids: multiple mating for variety's sake? *Trends in Ecology & Evolution*, **9**, 202-203.
- Heimpel, G.E. (1994) Virginity and the cost of insurance in highly inbred Hymenoptera. *Ecological Entomology*, **19**, 299-302.
- Helle, W. (1965) Inbreeding depression in an arrhenotokous mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Entomologia Experimentalis & Applicata*, **8**, 299-304.
- Ifantidis, M.D. (1983) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honeybee brood cells. *Journal of Apicultural Research*, **23**, 200-206.
- Ifantidis, M.D. (1984) Parameters of the population dynamics of the *Varroa* mite on honeybees. *Journal of Apicultural Research*, **23**, 227- 233.
- Ifantidis, M.D. (1988) Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honeybee *Apis mellifera* brood cells. *Apidologie*, **19**, 387-396.
- Ifantidis, M.D. (1991) Reexamination of reproduction parameters of the mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. In: Proceedings of the international symposium on recent research on bee pathology. Gent 1990. Ed. by Ritter W., Laere van O., Jacobs F., and Wael de L. Janssen Farmaceutica, Beerse, Belgium., 20-26.
- Ifantidis, M.D.; Rosenkranz, P. (1988) Reproduktion der Bienenmilbe *Varroa jacobsoni* (Acarina: Varroidae). *Entomologia Generalis*, **14**, 111-122.
- Jay, S.C. (1962) Colour changes in honeybee pupae. *Bee World*, **43**, 119-122.

- Johnson, N.L.; Kotz, S. (1969) Discrete distributions. John Wiley & Sons, New-York, Chichester, Brisbane, Toronto.
- Krantz, G.W.; Wernz, J.G. (1979) Sperm transfer in *Glyptotholaspis americana*. *Recent Advances in Acarology*, II, 441- 448.
- Le Conte, Y.; Arnold, G.; Trouiller, J.; Masson, C.; Chappe, B.; Ourisson, G. (1989) Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honey- bees by simple aliphatic esters. *Science*, **245**, 638-639.
- Maizels, R.M.; Bundy, A.P.; Selkirk, M.E.; Smith, D.F.; Anderson, R.M. (1993) Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature*, **365**, 797-805.
- Martin, S.J. (1994) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental & Applied Acarology*, **18**, 87-100.
- Milani, N. (1992) Analytical bibliography on *Varroa jacobsoni* Oud. and related species. *Apicoltura*, **8**, Appendice a, 1-147.
- Moosbäckhofer, R.; Fabsicz, M.; Kohlich, A. (1988) Untersuchungen über die Abhängigkeit der Nachkommensrate von *Varroa jacobsoni* (Oudemans) vom Befallsgrad der Bienenvölker. *Apidologie*, **19**, 181-207.
- Nagelkerke, C.J. Evolution of sex allocation strategies of pseudo-arrhenotokous predatory mites (Acari: Phytoseiidae). Amsterdam University. 227pp.
- Nagelkerke, C.J.; Hardy, I.C.W. (1994) The influence of developmental mortality on optimal sex allocation under local mate competition. *Behavioural Ecology*, **5**, 401-411.
- Nannelli, R. (1986) Caratteri morfologici essenziali per una rapida identificazione dei diversi stadi di *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Apicoltura*, **2**, 95-119.
- Otten, C. (1991) Vergleichende Untersuchungen zum Populationswachstum von *Varroa jacobsoni* Oud. in Völker von *Apis mellifera* L. unterschiedlicher geographischer Herkunft. PhD. Thesis, univ. Frankfurt am Main. 203pp.
- Potter, D.A.; Wrensch, D.L.; Johnston, D.E. (1976) Aggression and mating success in male spider mites. *Science*, **193**, 160- 161.
- Randolph, S.E. (1975) Patterns of distribution of the tick *Ixodes trianguliceps* Birula on its hosts. *Journal of Animal Ecology*, **44**, 451-474.
- Rath, W. (1992) Der Schlüssel für *Varroa*: Die *Apis cerana*- Drohnen und ihr Zelldeckel. *Allgemein deutsche Imkerzeitung*, **26**, 12- 14.
- Rath, W.; Drescher, W. (1990) Response of *Apis cerana* Fabr. towards brood infested with *Varroa jacobsoni* (Oudemans) and infestation rate of colonies in Thailand. *Apidologie*, **21**, 311-321.
- Rehm, S.M. (1988) Fortpflanzung und Populationsdynamik von *Varroa jacobsoni* Oud. in der Arbeiterinnenbrut von *Apis mellifera carnica*, *Apis mellifera ligustica* und *Apis mellifera*-Hybriden. Diplomarbeit, 95pp.

- Rehm, S.M.; Ritter, W. (1989) Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for the calculation of the developmental period. *Apidologie*, **20**, 339-343.
- Rickli, M.; Guerin, P.M.; Diehl, P.A. (1992) Palmitic acid released from honeybee worker larvae attracts the parasitic mite *Varroa jacobsoni* on a servosphere. *Naturwissenschaften*, **79**, 320-322.
- Rickli, M.; Diehl, P.A.; Guerin, P.M. (1994) Cuticle alkanes of honeybee larvae mediate arrestment of the bee parasite *Varroa jacobsoni*. *Journal of Chemical Ecology*, **20**, 2437-2453.
- Ridley, M. (1993) Clutch size and mating frequency in parasitic Hymenoptera. *American Naturalist*, **142**, 893-910.
- Rosenkranz, P. (1993) Anzahl der Reproduktionszyklen von *Varroa*-Milben. *Apidologie*, **24**, 484-487.
- Rosenkranz, P.; Tewarson, N.C.; Singh, A.; Engels, W. (1993) Differential hygienic behavior towards *Varroa jacobsoni* in capped worker brood of *Apis cerana* depends on alien scent adhering to the mites. *Journal of Apicultural Research*, **32**, 89-93.
- Schad, G.A.; Anderson, R.M. (1985) Predisposition to hookworm infection in humans. *Science*, **228**, 1537-1540.
- Schneider, P.; Drescher, W. (1988) Die Folgen eines unterschiedlich hohen *Varroa*-Befalls während der Puppenentwicklung auf die erwachsene Biene. *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung*, **22**, 16-18 / 54-56 / 87-91.
- Schulz, A.E. (1984) Reproduktion und Populationsentwicklung der parasitischen Milbe *Varroa jacobsoni* Oudemans in Abhängigkeit vom Brutzyklus ihres Wirtes *Apis mellifera* L. *Apidologie*, **15**, 401-420.
- Smith, R.H., Shaw, M.R. (1980) Haplodiploid sex ratios and the mutation rate. *Nature*, **287**, 728-729.
- Steiner, J. (1988) Sex discrimination based on external structures in nymphal and adult *Varroa jacobsoni* mites (Acarina: Varroidae). *Entomologia Generalis*, **14**, 133-138.
- Steiner, J.; Pompolo, S.; das Garças; Takahashi, C.S.; Goncalves, L.S. (1982) Cytogenetics of the acarid *Varroa jacobsoni*. *Rev. Brasil. Genet.*, **4**, 841-844.
- Tewarson, N.C.; Singh, A.; Engels, W. (1992) Reproduction of *Varroa jacobsoni* in colonies of *Apis cerana indica* under natural and experimental conditions. *Apidologie*, **23**, 161- 171.
- Trouiller, J.; Arnold, G.; Chappe, B.; Le Conte, Y.; Masson, C. (1992) Semiochemical basis of infestation of honey bee brood by *Varroa jacobsoni*. *Journal of Chemical Ecology*, **18**, 2041-2053.
- Woolley, T.A. (1988) *Acarology: Mites and human welfare*. John Wiley, New-York. 484pp.

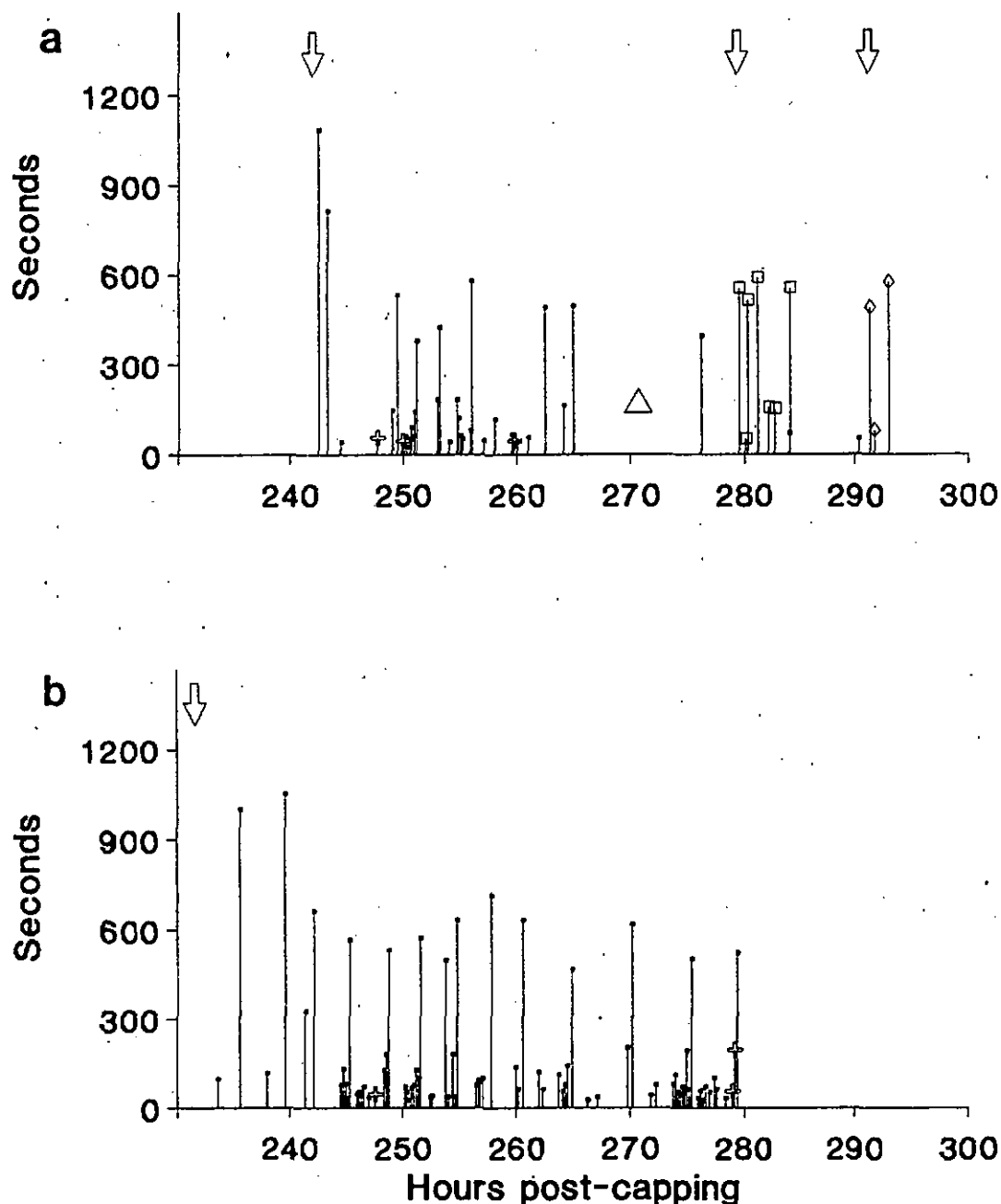


Figure 3.3.1 Frequency and duration of matings between *Varroa* offspring observed in artificial worker cells. (a) Perfect cell where three daughters reached adulthood in succession. The single male reaches adulthood at 222 hours post-capping (hpc). Bee imaginal ecdysis begins at 294.5 hpc. Although frequent mating attempts occur which last less than three minutes, sperm transfer probably only occurs during sexual encounters lasting longer than six minutes (see text). The open arrows indicate imaginal ecdysis of the three successive daughters; ■ indicate matings with the first daughter, □ with the second and ◇ with the third. ⊕ Represent mating attempts with the mother and Δ indicates an eight hr period without observation. (b) Perfect cell in which only a single daughter moulted to adulthood at 231 hpc. In this case 14 complete matings occurred between the male and his sister but none with the mother. Observation was interrupted at 280 hpc.

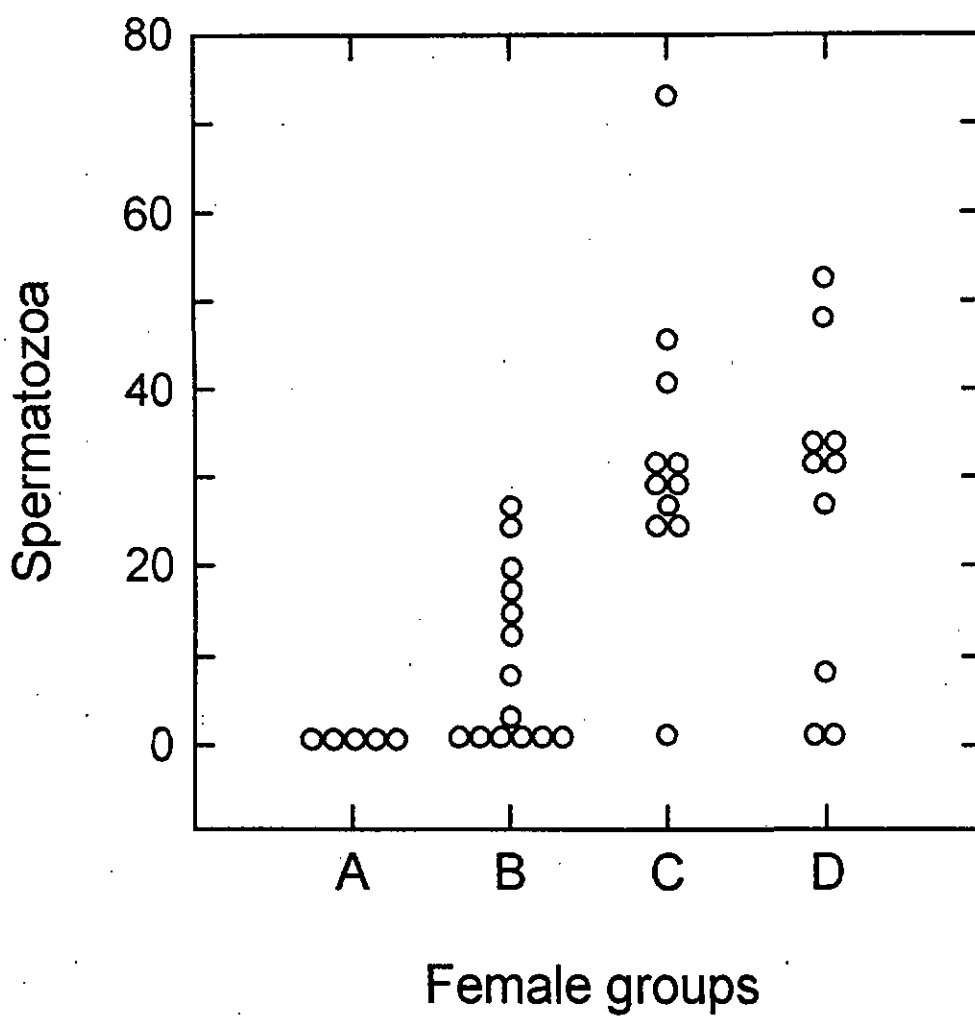


Figure 3.3.2 Number of spermatozoa counted in the spermatheca of young *Varroa* females mated either once (A), twice (B), or *ad libitum* for 48 hours (C) under experimental conditions (see text). Normally reproducing *Varroa* (D) were sampled in natural worker brood cells, some of which may have already reproduced. Each dot represents the number of spermatozoa counted in one female.

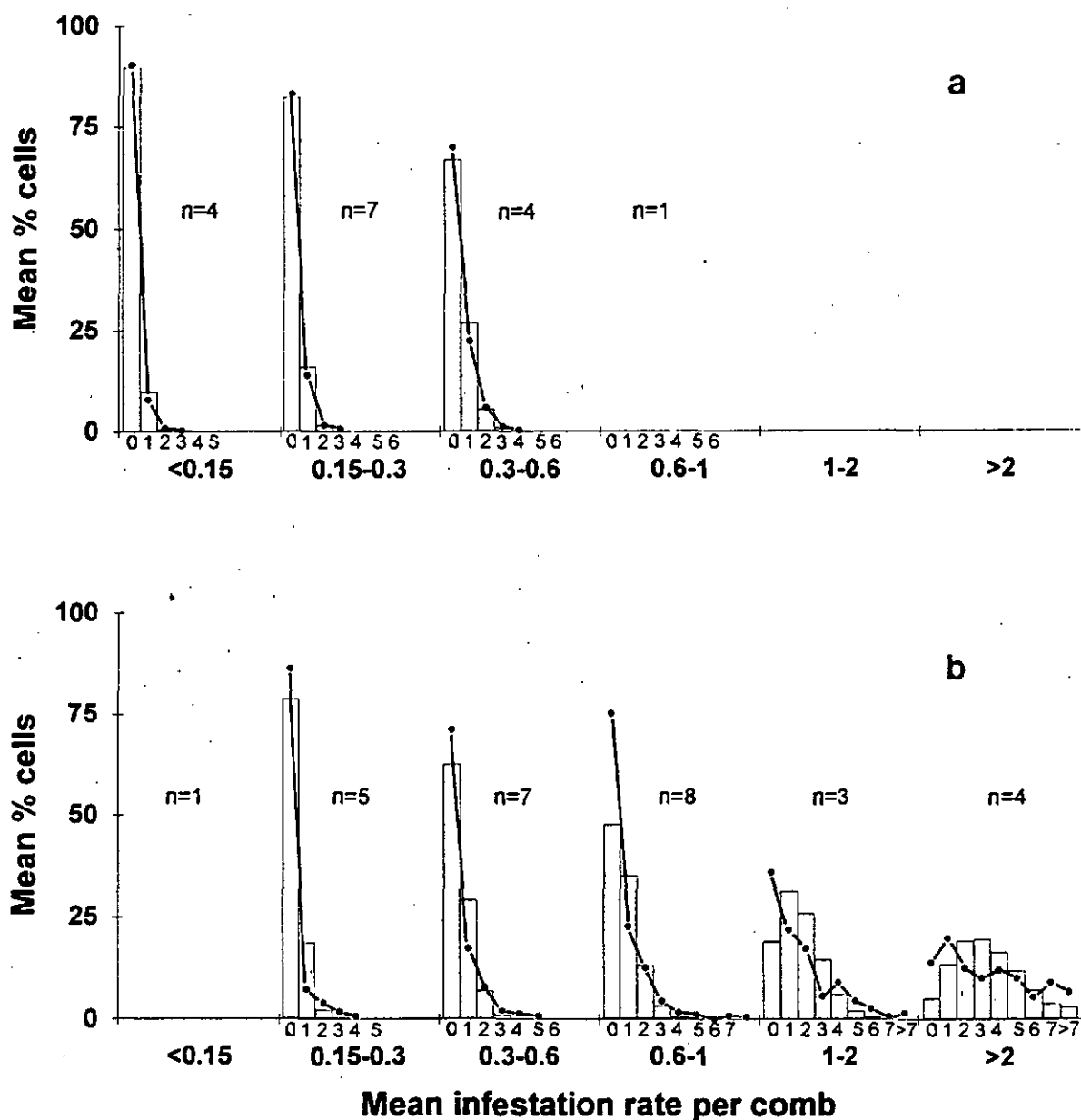


Figure 3.3.3 Frequency distributions of cells infested by 0,1,2,3...7 and >7 *Varroa* mites on worker (a) and drone combs (b) as related to the mean infestation rate (MIR) calculated for each comb by dividing the number of infesting *Varroa* mothers counted by the number of opened cells. Histograms represent mean expected values for Poisson distributions and dots (•) mean observed values for n combs.

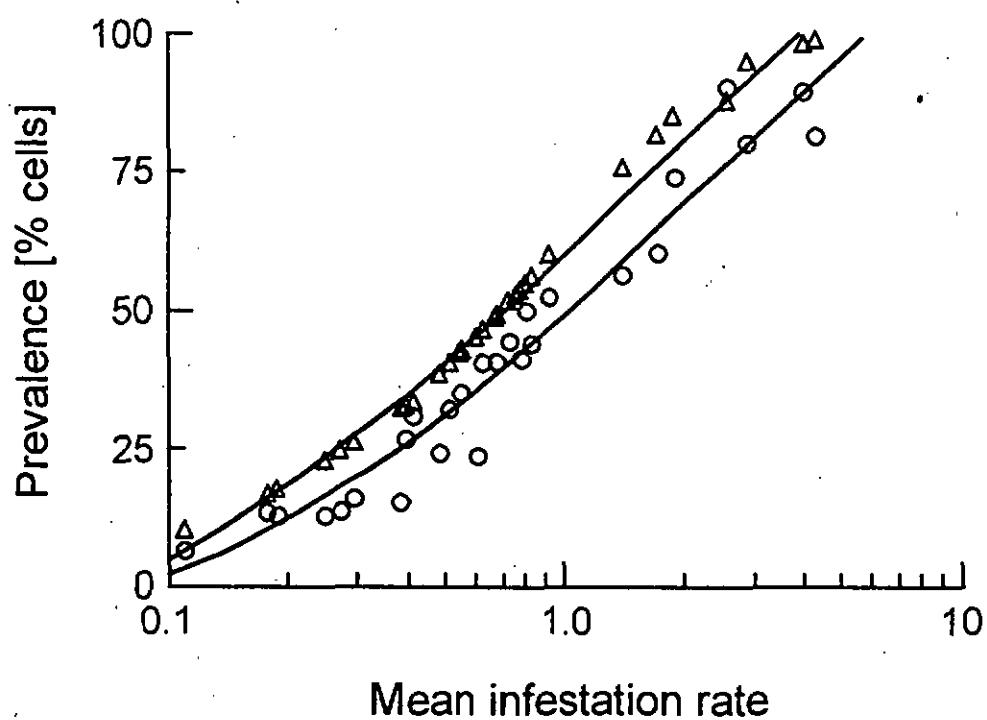


Figure 3.3.4 Prevalence (% of infested cells) of *Varroa* in drone brood as a function of the mean infestation rate (total number infesting *Varroa* mothers counted / number of opened brood cells). Δ represent values predicted by Poisson distributions and the $\circ$ are the observed values for the same mean infestation rate.

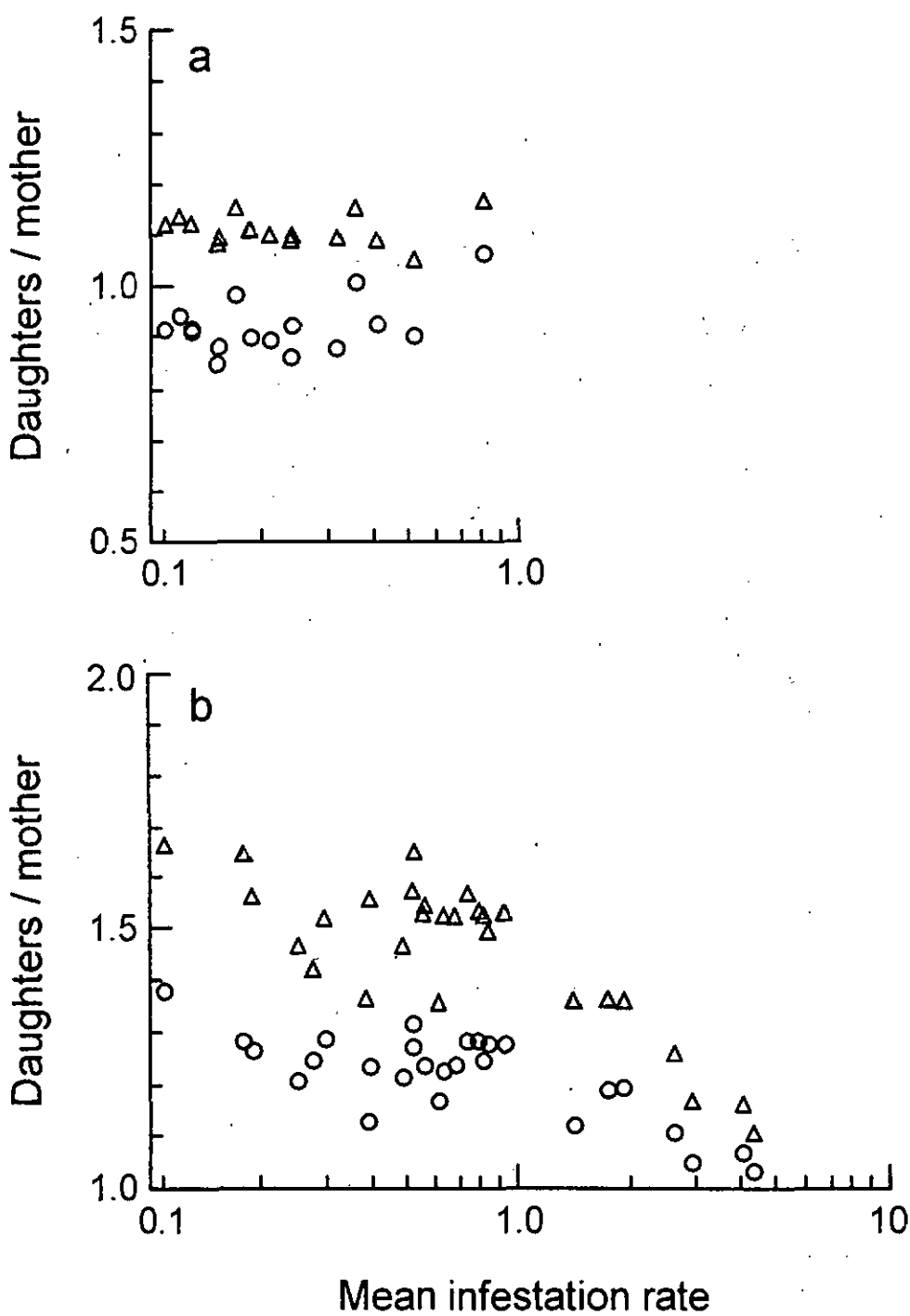


Figure 3.3.5 Average reproductive success (daughters per mother) as a function of the mean infestation rate of the brood cells by *Varroa* on worker (a) and drone combs (b). The reproductive success is calculated for each brood comb from the observed frequency distributions of *Varroa* mothers in brood cells, and the corresponding mean number of daughters and number of mated daughters per mother given in table 3.3.1. Δ Is the mean number of adult daughters per mother per comb and $\circ$ the mean number of mated daughters per mother. Each point represents data from one comb from different bee colonies.

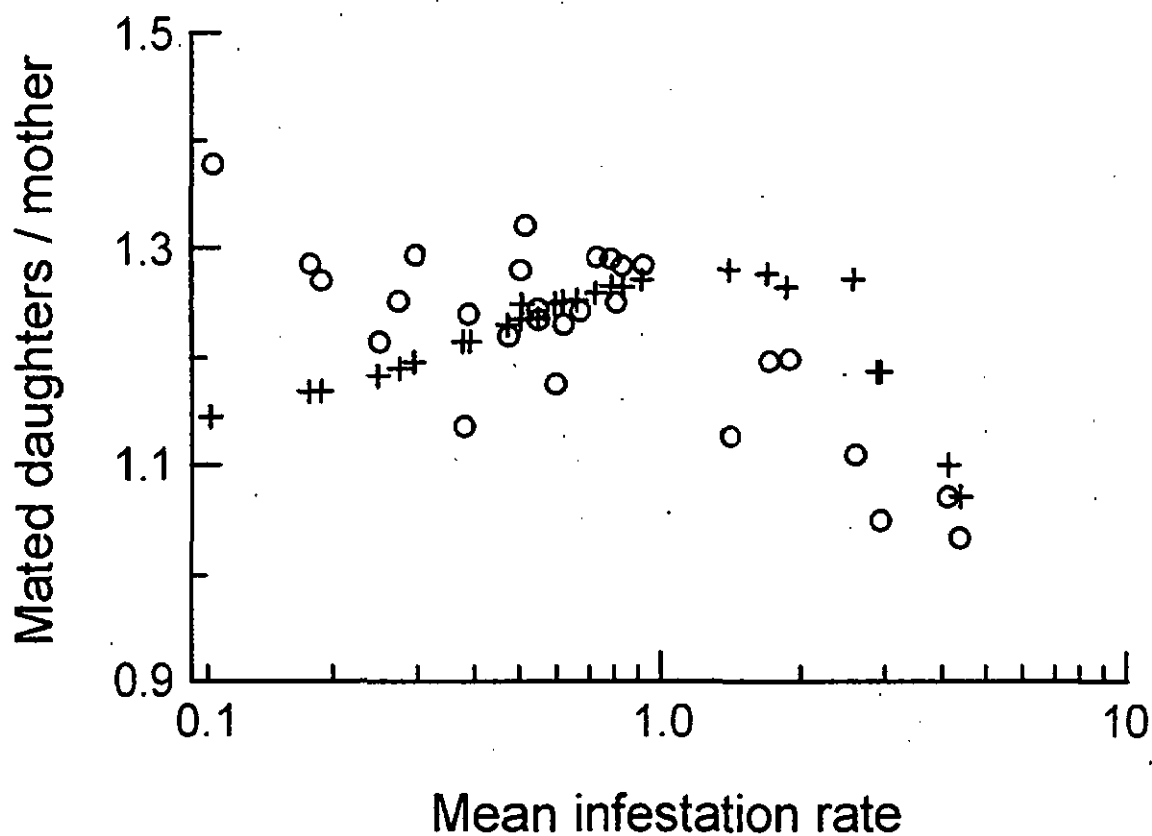


Figure 3.3.6 Average reproductive success (mated daughters per mother) as a function of the mean infestation rate of the drone brood cells by *Varroa*. The reproductive success is calculated for each brood comb from the observed frequency distributions of *Varroa* mothers in drone cells (O) and the corresponding Poisson distribution (+) combined with the mean number of mated daughters per mother given in table 3.3.1. Each dot represents data from one comb from different bee colonies.

Table 3.3.1 Reproductive success of *Varroa* in worker and drone cells according to the rate of infestation, i.e., mothers per cell, percentage of infested cells containing adult daughters only without adult males, and those containing adult offspring of both sexes. Mean number of adult daughters per infesting *Varroa* is a global total for all infested cells, while the mated daughters are those present in cells where adult males were also observed. All data are the number of adult descendants expected at bee emergence. Values followed by the same letter are not significantly different (Student t-test for comparison between worker or drone cells at different infestation rates, $p < 0.005$, significance level corrected for multiple comparisons). Although data was not distributed normally at low levels of infestation, the t-test was used considering the high number of cells counted (central limit theorem).

	WORKER BROOD				DRONE BROOD							
	Infesting female per cell				Infesting female per cell							
	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	>7
n infested cells	167	35	2	2	183	88	35	25	13	7	10	5
% cells with adult daughters only	17.38	8.57	0.00	0.00	23.50	15.91	5.71	16.00	0.00	28.57	0.00	0.00
% cells with males+females =perfect cells	46.11	80.00	100.00	100.00	36.81	75.00	94.29	84.00	100.00	71.43	90.00	100.00
Daughters/mother (mean)	1.07a	1.16a	1.46	0.84	1.62ac	1.67a	1.31ab	1.39ab	1.13ab	1.10bc	0.84b	0.99
"Mated" daughters/mother (mean)	0.83a	1.07a	1.46	0.84	1.11ab	1.46a	1.28ab	1.17ab	1.13ab	0.85ab	0.84b	0.99
Fitness gained per mother	1.66a	2.14a	2.92	1.88	2.20ab	2.93a	2.56ab	2.35ab	2.25ab	1.70ab	1.68b	2.00
Sons/mother (mean)	0.57a	0.54a	0.50	0.38	0.48a	0.53a	0.49a	0.45a	0.49a	0.48a	0.56a	0.22

Can over-occupancy of the feeding site lead to a reduction of the *Varroa* population in one cell ?

Introduction

The reproductive success of *Varroa* is dependent on the number of mites which infest one brood cell (Moosbeckhofer et al. 1988; Fuchs and Langenbach 1989; present study). The reduction in the number of daughters per mother observed in the multiinfested cells could result from several causes. The first, which is the least probable, could be that a part of the fertile mothers will be completely inhibited from reproducing while the others reproduce normally. The second hypothesis was provided by Fuchs and Langenbach (1989) who observed an increased proportion of males among the adult offspring a more females reproduce within a brood cell. From this they concluded that in multiinfested cells all females lay the single male egg but a reduced number of female eggs. Suggesting that females stop earlier to lay. On the one hand if we consider that not all descendants reach adulthood the conclusion of these authors could be a confusion between the sex ratio at laying and that of adult offspring. On the other hand the number of adult descendants is influenced by the survival rate during their development. Therefore, the third explanation may be that each mother lays as many eggs in either single or multiinfested cells, but a lower proportion of offspring will survive when more *Varroa* females reproduce in one cell.

This latter hypothesis stems from our observations on the transparent cells where we observed some of the direct causes of offspring mortality, i.e., bee's movements at pupation, disturbance of eggs by mites, and the incapacity for the protonymphs to join the *Varroa* family in the posterior part of the cell. Furthermore, as presented in chapter Reproductive phase, a high proportion of *Varroa* families cohabiting a cell feed at a single feeding site on the pupa and this situation provokes competitive interactions between the mites in the cell. The feeding site is permanently occupied at certain periods, even in cells with a single *Varroa* family (fig. 6, chapter Reproductive phase). However, feeding site occupancy is

cyclic due to the reappearance of mobile life stages in time lags as a result of the oviposition pattern of the *Varroa* mother.

In this chapter we compare the rate of oviposition per *Varroa* female in cells with different levels of infestation. Then we provide the feeding patterns of each *Varroa* life stage and use these data to simulate occupancy of the single feeding site for an increasing number of mite families in a brood cell.

Material and methods

Oviposition rate

The numbers of infesting mites and offspring were sampled in two drone combs from two strongly infested beehives. The queens were caged on the combs for about 20 hrs so that capping of the cells occurred over a 24 hr period. The combs were frozen at -18°C twelve days after capping. The *Varroa* mites infesting these cells were analysed as in chapter Reproductive success, but great attention was given to all small instars such the non-hatched eggs or dead descendants. This search was extended to the pupal exuvium which was opened in alcohol with fine pincers. The number of descendants per infesting female was compared for all infestation rates.

Feeding pattern

The data on the feeding pattern of all *Varroa* instars is provided from observations on the artificial polystyrol cells containing naturally reared brood which was infested by *Varroa* (see previous chapters). A mite was considered to feed if it was immobile onto the feeding site with its head parts bent against the bee cuticle. The feeding activity of each individual was registered round the clock from time lapse video recordings (three frames per second) and the data were pooled from single and multiinfested worker and drone cells. For practical reasons, i.e., to be able to record all individuals, we only observed cells infested by one or two foundresses and where the mite's family lived between the leg pair III of the pupa (fig. 3.2.6). Most of the families fed on the fifth segment. During the observed

period all the feeding bouts of all individuals were registered and their position and duration noted. The feeding frequency, the hourly mean feeding and the mean duration of the feeding bouts were calculated for each *Varroa* instar from these data. Furthermore, the total amount of time each proto- and deutonymph fed was calculated from hatching or moulting until its immobilisation at the moulting site.

Simulations of feeding site occupancy

Occupancy of the single feeding site in drone cells was independently simulated for one hour intervals from 48 hpc to 330 hpc. Each of the 1000 simulations, calculated at random per hour, were independent of one another to estimate occupancy of the feeding site as a function of the occurrence of the different mobile instars present in the cell at the time and their respective feeding patterns. Occurrence of the feeding individuals and mean development durations are considered as in the chapter Reproductive phase; table 3. All 5 descendants were assumed to develop normally. We used a log distribution of the feeding bout durations based on the feeding patterns for each of the instars and sexes (table 3.4.2). As the feeding pattern of the mothers changes during the course of reproduction, eight log distributions were generated for this instar to cover the period from feeding on the prepupa until imaginal bee ecdysis. Each log distribution has therefore the same mean and standard deviation as the pool of observed individuals of the relevant instar (table 3.4.2) but truncated at 3600 seconds, the duration of the interval. The computer then drew at random to determine if an individual fed or not, based on the frequencies of feeding bouts (data provided in table 3.4.2, column 1). If feeding occurred, a random value from the distribution of feeding durations was added (table 3.4.2, column 3). In multiinfested cells, the first female was always considered to first oviposit at 70.9 hpc, and other females to start oviposition at random following a normal distribution (mean=70.9 $\pm$ SD=3.2 hpc, n=34). The probability that not all individuals present in the cell at a defined time can feed is given by the proportion of simulations which exceed 3600s.

Results

Oviposition rate

The mean number of eggs laid by the infesting *Varroa* females shows only slight variations in cells infested by one to four females and the highest value was obtained in cells with two foundresses (table 3.4.1). The number of descendants per infesting female decreases when more than four females infest a cell, but data is sparse. Other data about reproduction in such cells is included in chapter Reproductive success.

Table 3.4.1 Number of descendants per mother as a function of the number of infesting females per drone brood cell.

Infestation rate	no. cells	no. <i>Varroa</i>	Number of des- cendants / mother
1 <i>Varroa</i> / cell	79	79	3.9
2 <i>Varroa</i> / cell	27	54	4.1
3 <i>Varroa</i> / cell	3	9	3.9
4 <i>Varroa</i> / cell	5	20	3.7
>4 <i>Varroa</i> / cell	3	19	2.8

Feeding pattern

All mobile instars feed regularly on the bee pupa (table 3.4.2). The deutonymph females which show the highest rate of growth feed for longest. Adult males feed regularly but for short periods compared with their developmental stages.

However, the male feeds almost as much as the mothers during the oogenesis period. In the post-oogenesis period, the infesting females feed once about each 10 hours but for relatively long durations.

Table 3.4.2 Feeding behaviour of all Varroa instars and mother (pooled data for single and multiinfested worker and drone cells). In column 1 and 2 the data presented (means±standard deviations) are per individual per hour and in column 3 per feeding bout. Data in column 4 are per individual, calculated from the sum of all the feeding bouts for the instar. The feeding pattern of the infesting female is analysed according to the host's stage of development and oogenesis status of the parasite : pupa I represents the period during Varroa oogenesis i.e. 120-180 hpc in worker cells and 140-180 hpc in drone cells; pupa II represents the post-oogenesis period i.e. >210 hpc for worker and drone cells (hpc=hours post-capping). The acute feeding by the mother on the young pupa is partitioned in five consecutive distributions.

Instar	Sex / period	n	Feeding frequency	Hourly mean	Feeding bout	Total feeding duration
			[bout per hr] mean±SD	[sec. per hr] mean±SD	[sec. per bout] mean±SD	[sec. per instar] mean±SD
Protonymph	male	6	0.38±0.18	399±181	1010± 426	10171±3651
	female	19	0.49±0.09	417±100	876± 321	7577±1556
Deutonymph	male	9	0.63±0.29	368± 49	714± 250	9769±2365
	female	20	0.66±0.11	673±177	1021± 368	17282±4023
Adult offspring	male	7	0.38±0.12	148± 29	359± 146	
	female	4	0.57±0.25	413±154	693± 291	
Mother	prepupa	13	1.10±0.36	173± 46	161± 109	
	pupa I	10	0.34±0.04	173± 51	495± 254	
	pupa II	8	0.12±0.04	84± 18	693± 259	
Mother hours after pupation	0-4 hr	15	0.37±0.12	1159±454	3160±1528	
	4-8 hr	13	0.40±0.12	800±337	1945± 836	
	8-12 hr	7	0.38±0.12	438±249	1197± 793	
	12-16 hr	7	0.43±0.11	463±218	963± 847	
	16-23 hr	7	0.35±0.10	297±145	674± 356	
					n	ind.

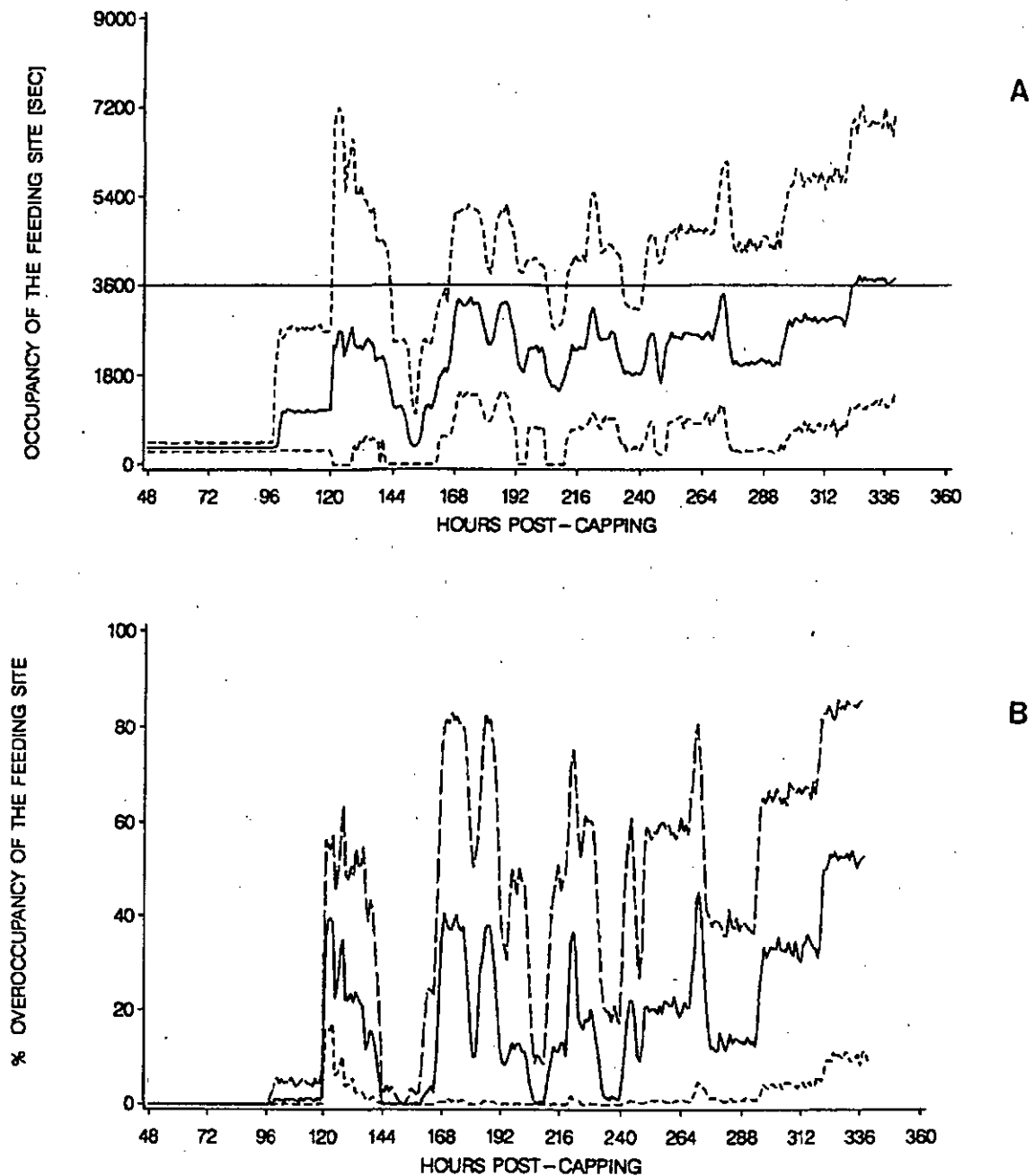


Figure 3.4.1 A, Simulated occupancy of the single feeding site for drone cells with two optimally reproducing *Varroa* families. One thousand simulations of feeding are made for each interval of one hr independent of the previous and following interval. The solid curve represents the median occupancy (50th percentile) and broken curves the 5th and 95th percentiles. B, Percent of simulations predicting overoccupancy of the feeding site in drone cells with 1 (----), 2 (—), and 3 (— — —) normally reproducing *Varroa* families. Overoccupancy of the feeding site is reached by simulations in which feedings exceed the duration of the interval chosen (3600 sec.).

Simulations of feeding site occupancy

The computer simulation shows cyclicity in occupancy of the feeding site thus reflecting the regular reappearance of the mobile stages (chapter Reproductive phase, fig.1). Occupancy of the site tends to increase with time and is highest at the end of the reproduction cycle when the number of young adults is at its maximum (fig. 3.4.1). In single infested cells the simulation only rarely shows overoccupancy of the feeding site, i.e., >3600 seconds (fig. 3.4.1B). With two families the median for the simulations is situated just under the maximum time available (fig. 3.4.1A), and for almost all intervals an important proportion of the simulations is over the 3600s limit. With 3 families it appears clearly that a high overoccupancy of the feeding site occurs as for example from 168-192 hpc when 80% of the simulated occupations overreach the maximum time available at the single feeding site.

Discussion

The number of descendants produced by *Varroa* is stable between one and four mothers/cell. Similar results were obtained by Boecking (pers. comm.). This indicates that the *Varroa* females are unable to alter their egg-laying either in terms of the number of eggs laid or in terms of the sex ratio. The females expect to produce a maximum number of offspring. But in multiinfested cells the families are in danger to overexploiting the host and to provoke their own destruction. Since the results presented in the chapter Reproductive success and those of Fuchs and Langenbach (1989) show that the number of adult descendants per mother decreases with a higher number of foundresses, this suggests a reduction of the offspring survival in multiinfested cells. The simulations presented here show that overoccupancy of a single feeding site already occurs with two *Varroa* families. Thus, the use of a single feeding site may lead to the reduction of the number of offspring reaching adulthood already observed in natural multiinfested cells. This seems all the more true because the limit used here is severe: occupancy of 100 % is unlikely to occur because the unoccupied periods between feedings. The cyclicity shown by our observations (chapter Reproductive phase,

figs. 5 and 6) and by the simulations presented here arises from the egg-laying pattern of *Varroa*, i.e., where one egg is laid each 30 hrs. On the one hand, this egg-laying pattern avoids strong competition at the feeding site since the number of feeding mites at any one time in the cell is only high for short periods, permitting a maximum of offspring to develop in single infested cells. On the other hand, competition occurs in the multiinfested cells between individuals of the same age but from different genetic strains thus favorizing adaptation to these conditions. Of course this egg-laying pattern is not specific to the *Varroa* alone but is characteristic for all Mesostigmata. In my opinion this egg-laying pattern has permitted the use of the single feeding site as a competition factor by *Varroa*.

Our observations on transparent artificial cells clearly indicate that a competition effectively arises between individuals at the feeding site and that protonymphs are most disadvantaged. Remembering that the protonymphs have to spend much time and energy to locate the feeding site, they will be most affected by interruption of their feeding than other instars. The importance of this competition is also illustrated by the number of "waiting" individuals recorded who eventually push the feeding mite or try to slip under it.

Although competition at the single feeding site may lead to a reduction of the number of descendants which reach adulthood, other competition factors must also be considered. An increase in density of mites in one cell could influence the behavioural structuring of the mites in the space available and could provoke the disturbance of eggs or immobile stages. The second factor is the impoverishment of the unfed bee in the capped cell. It has been shown that the volume of haemolymph decreases in the infested pupae, and that the concentration of protein increases in the drone pupa but decreases in the workers exposed to *Varroa* (Schatton-Gademayer and Engels 1988; Weinberg and Madel 1985). Furthermore, the weight of the young workers and drones at emergence is reduced when the rate of infestation is high (de Jong et Gonçalves 1982; Schatton-Gademayer and Engels 1988; Schneider and Drescher 1987). The loss of haemolymph could increase the duration of feeds and therefore serve to render the competition more acute at the feeding site. But, this could also provoke bad nutriment of the mites (e.g. too little water intake) and could lead to laying of non-viable eggs or to the death of descendants. In the same way, when the number of

infesting mites is high, the impoverishment of the host occurs sooner and invading mites could lay less eggs as found in the three cells with more than four foundresses. An interesting observation is the resorption of eggs in the post vitellogenic phase (Steiner and Diehl pers. comm.). This was observed in strongly infested cells reared in weak beehive maintained in a flying room, where beehives do not develop correctly.

In addition we know that the bee shows immunological reactions to infestation by *Varroa* (Dandeu et al. 1991; Wienands and Madel 1988), as well as reactions at the feeding site which melanizes. Nevertheless, the use of additional feeding sites occurs in some cells, and for practical reasons, the observed artificial cells were infested only with three families. We do not know the reactions of infesting mothers in highly infested cells. Since we never observed cannibalism in *Varroa* this type of competition can be excluded.

In conclusion, the reduced number of adult daughters could result from higher mortality during their development in the multiinfested cells. One cause may be competition for the feeding site as indicated by the computer simulations and direct observations. However, further experiments are needed to confirm this and to determine any other factors which may contribute to offspring mortality.

References

Please, see the end of the thesis.

IV Discussion

Alvéoles artificielles

Dans nos colonies d'abeilles, les mesures intérieures des alvéoles naturelles d'ouvrières sont 5.1-5.3 mm de côté par 12 mm de long, ce qui correspond aux données de la littérature à travers le monde, soit 5.1-5.4 mm (voir Erickson et al. 1990; Darchen 1968, p 257). Les alvéoles de faux-bourçons mesurent dans nos ruches entre 6.5-6.8 mm de côté par 14-15 mm de longueur (6.9 mm, Darchen 1968). Lors de l'étude préliminaire, je n'avais à disposition que des cellules de 4.8 mm de diamètre pour le couvain d'ouvrières, mais les *Varroa* ont formé les mêmes structures que dans les cellules de 5.1 mm de diamètre utilisées par la suite.

Toutefois, comme nous allons le voir, le diamètre des alvéoles est un facteur important pour la reproduction de *Varroa*. On sait qu'avant la ponte, la reine mesure la taille de l'alvéole avec ses pattes et détermine ainsi le sexe de l'oeuf à pondre (Koeniger 1970). J'ai parfois utilisé des cellules de 6.2 mm de diamètre, où certaines reines ont pondu du couvain de faux-bourçons, et d'autres du couvain d'ouvrières. Dans le premier cas, *Varroa* s'est reproduit, a formé le paquet de fèces et a écarté les pattes de la pupa. Par contre, si du couvain d'ouvrières se trouvait dans les cellules de 6.2 mm, l'acarien n'a pas toujours formé le paquet de fèces et sa reproduction a été mauvaise. L'importance de la taille des alvéoles est confirmée par les travaux de Milani et Chiesa (1990), qui montrent que la proportion des femelles *Varroa* qui pondent augmente lorsque la taille des cellules diminue de 6.8 à 5.3 mm de diamètre.

Ainsi, nos observations ajoutées à celles de Milani et Chiesa (1990) expliquent pourquoi les différents projets d'élevage des *Varroa* dans des cellules artificielles (Abbas 1989, 1990; Chiesa & Milani 1988; Rath 1991) n'ont pas abouti à la description du paquet de fèces, ni aux comportements stéréotypés de ce parasite. Les causes de l'insuccès de la reproduction de l'acarien dans les cellules trop

grandes ne sont pas connues. Toutefois, les constatations qui précèdent semblent montrer une certaine incapacité de l'acarien à s'adapter à des changements de son environnement. En d'autres termes, le parasite pourrait avoir subi une évolution régressive de ses capacités comportementales.

Adaptations au parasitisme ou régressions ?

Le passage d'un cycle de vie libre à un cycle de vie parasitaire implique ou provoque des modifications morphologiques, biologiques et comportementales chez un grand nombre d'espèces, y compris chez les acariens (Fain 1969, Radovsky 1969).

Comparé au type primitif des mésostigmates, *Varroa* présente un certain nombre de modifications intéressantes. La forme de son corps lui permet de se glisser entre les sternites des abeilles adultes, de pénétrer sous les larves et de vivre dans les alvéoles de couvain operculé. Les ambulacres de *Varroa* ont une fonction de ventouse (Liu et Peng 1990) et de griffes (Ramirez et Malavasi 1991). Elles sont puissantes, ce qui lui permet de rester des heures durant sur le plafond de l'alvéole.

Les pièces buccales de *Varroa* ont subi d'importantes modifications chez la femelle et chez le mâle (Delfinado-Baker 1984; Griffiths 1988; Hirschman 1980; Ifantidis & Rosenkranz 1988; Steiner 1988). Le processus immobile des chélicères a totalement disparu, tandis que le processus mobile a pris la forme d'une lame dentée chez la femelle, et s'est développé en un spermadactyle tubulaire chez le mâle. La prise de nourriture, soit l'hémolymphe de l'abeille, est améliorée chez la femelle, car elle peut directement appliquer son hypostome contre la plaie percée par les chélicères (Griffiths 1988; Strick & Madel 1989). Toutefois, cela n'est valable ni chez le mâle, ni chez les protonymphes qui sont incapables de se nourrir d'eux-mêmes en absence d'un lieu de nutrition préparé par une femelle adulte.

La modification des chélicères des mâles en spermadactyles est observée chez d'autres gamasides et le niveau d'évolution est variable (Krantz 1978; Lee 1974; Young 1968; Wooley 1988). Chez les Macrochelidae, les chélicères du mâle sont en forme de pinces constituées des processus mobile et immobile, à quoi s'ajoute un spermadactyle creux en forme de tube. Pendant l'accouplement, le sperme est

transporté de l'ouverture génitale jusqu'à la base des chélicères par un organe éjaculatoire extrudable. Puis à la base du processus mobile, le sperme pénètre dans un canal qui le conduit dans le spermadactyle tubulaire (Krantz & Wernz 1979).

Les gamasides qui vivent dans les nids des mammifères méritent que l'on s'y arrête, car ils présentent d'étonnantes similitudes avec *Varroa*. Dans le genre *Haemogamasus*, on distingue trois niveaux d'adaptation au parasitisme (Radovsky 1985). Des espèces polyphages, se nourrissant d'arthropodes ou de champignons, qui sont nidicoles facultatives et dont les chélicères sont en forme de pinces chez les deux sexes. D'autres espèces, dont les chélicères sont modifiés, mais qui ne peuvent percer l'épiderme de l'hôte et doivent profiter des plaies pour se nourrir de lymphes et de sang (Furman 1959). Finalement, des parasites obligatoires dont les chélicères sont profondément modifiés chez les deux sexes. Ils refusent de se nourrir d'arthropodes (même broyés) et sont hématophages stricts (Furman 1959, Radovsky 1960, 1985). Chez ces dernières espèces, ni les nymphes ni les mâles ne semblent capables de se nourrir d'eux-mêmes, si bien qu'ils se nourrissent en groupe sur une plaie. Des observations suivies montreraient peut-être que chez ces espèces, comme chez *Varroa*, seules les femelles adultes initient la plaie.

Les parasites facultatifs tels que *Haemolaelaps* peuvent jeûner durant 1-2 mois, ce qui leur permet de résister à l'absence d'hôte. Par contre, *Varroa*, qui est continuellement en contact avec l'hôte, suce très fréquemment et les acariens ne survivent pas plus de 24-36 heures sans hôte.

Cette combinaison d'adaptations évolutives et régressives observées simultanément chez *Varroa* et chez les acariens parasites de vertébrés nidicoles trouve certaines explications dans notre étude. Les chélicères en lame permettent de percer la cuticule de l'abeille et, parce qu'ils provoquent des plaies plus petites que celles effectuées par des chélicères en pinces, diminuent le risque d'hémorragie chez l'hôte. Puisqu'ils ont perdu la faculté de percer la cuticule de l'hôte, les protonymphes et les mâles sont forcés de rejoindre l'emplacement où les femelles adultes ont percé la cuticule de l'hôte. Ceci, évidemment, garantit le développement des acariens et finalement, une fois adultes, la réunion des sexes et la fertilisation.

des jeunes femelles. Cette explication fonctionnelle pourrait aussi s'avérer valable chez les acariens de rongeurs du genre *Haemolaelaps* qui sucent en groupe sur une unique plaie (Furman 1966).

Gestion de l'espace

L'utilisation de l'espace alvéolaire par les acariens présente des particularités bien typées que j'ai décrites et discutées aux chapitres "Reproductive phase" et "Behavioural activity". Certaines zones de la paroi alvéolaire et de l'abeille sont utilisées pour différents comportements ou à différentes périodes de la reproduction et du développement. Il en résulte que les acariens doivent se déplacer d'un lieu à l'autre et donc s'orienter dans l'alvéole. Toutefois, *Varroa* en retire des avantages puisqu'ainsi les acariens évitent de souiller la source de nourriture; évitent que les individus les plus forts bloquent l'accès du lieu de nutrition; facilitent les accouplements et permettent aux nymphes de muer dans des zones où elles ne sont pas bousculées. Nous avons brièvement vu que l'on trouve chez les acariens un crescendo dans l'utilisation structurée de l'espace disponible ou de la morphologie de l'hôte (figure 4.1) (Baker 1991; Delfinado-Baker et al. 1992; Greenberg et Carpenter 1960; Hevers 1978; Radovsky 1985; Saitô 1983, 1986; Skaife 1952; Treat 1958, 1975). Cette utilisation de l'espace atteint un niveau similaire au moins chez les trois espèces *Schizotetranychus celarius*, *Dicrocheles phalanaeodectes* (figure 4.1) et chez *Varroa jacobsoni*. Toutes ces espèces doivent donc s'orienter dans leur habitat pour s'alimenter ou pour aller déféquer. Ce va-et-vient peut être très long dans le cas de *Schizotetranychus* où le nid qui est composite peut atteindre 30 cm et où les fèces sont à l'extérieur du nid (Saitô, comm. pers.).

Depuis cette étude sur le comportement de *Varroa*, j'ai travaillé sur un projet qui consiste à l'identification des substances chimiques qui influencent le comportement des parasites. Des extraits de fèces ont été testés avec un biotest *in vitro* de chimioréception par contact. Les acariens ont émis divers types de réactions mais n'ont pas montré le pivotement que l'on observe dans les alvéoles operculées. Dans d'autres tests j'ai offert aux acariens des parois d'alvéoles infestées (cire, cocon et

paquet de fèces) étalées horizontalement et placées dans des petites boîtes de pétri. Les *Varroa* provenant de ces alvéoles n'ont pas non plus montré le comportement de

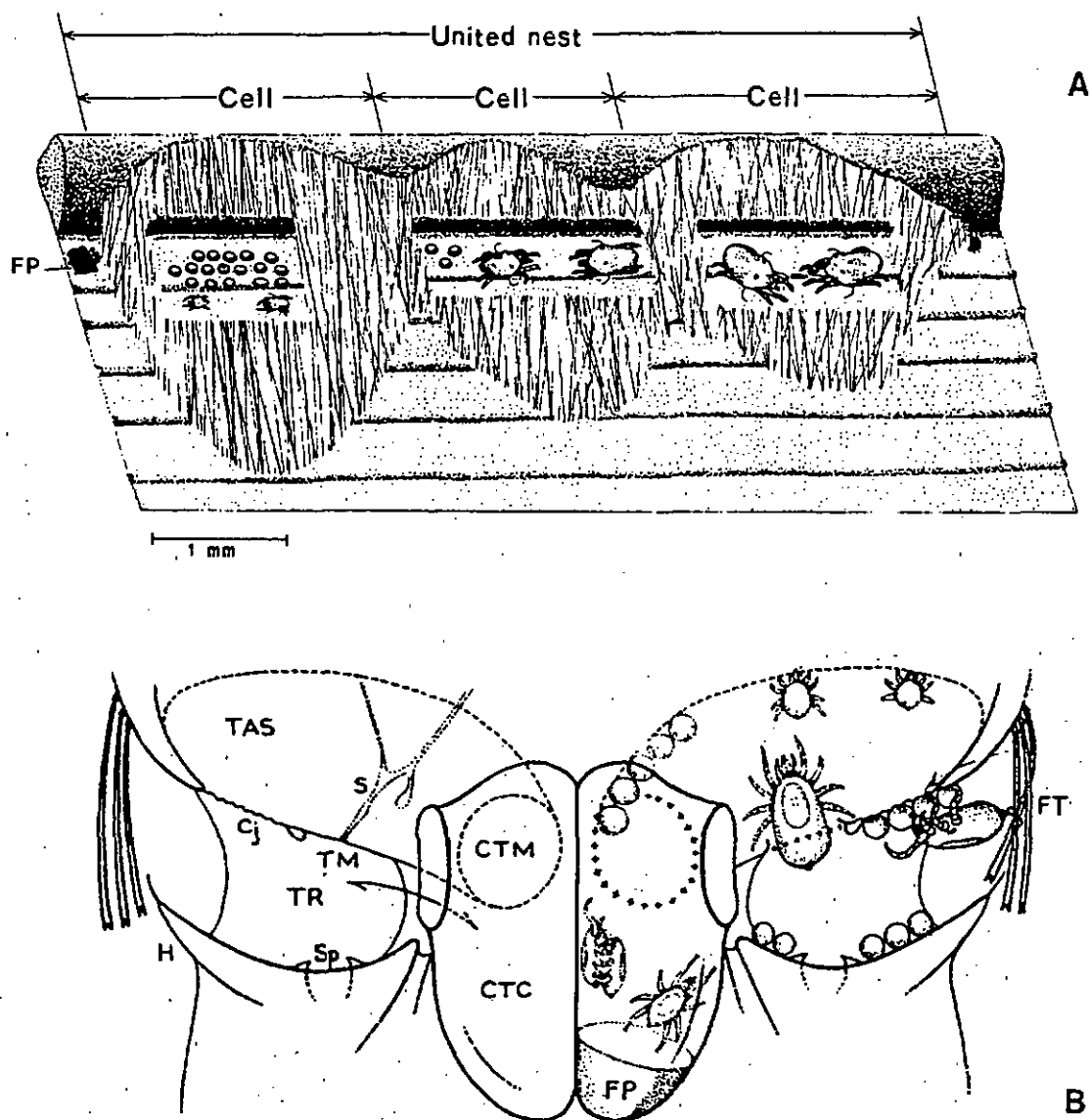


Figure 4.1 Représentation de l'organisation de *Schizotetranychus celarius* (Acari: Tetranychidae) parasite des bambous (A); et de *Dicrocheles phalaenodectes* (Acari: Mesostigmata), parasite des cavités des tympans des noctuides (B). A, De gauche à droite, les cellules présentent des oeufs et des larves; des oeufs, une deutonymphe et un mâle; deux femelles. B, Vue dorsale des organes tympaniques montrant l'infestation qui est toujours unilatérale. Les acariens ont ouvert plusieurs zones d'accès des cavités (cj) conjonctive, (s) sensille scolopariale ouvrant le sac à air tympanique (TAS) où les acariens sucent et pondent les premiers oeufs; (CTM) la membrane menant à la cavité contre-tympanique (CTC) où les acariens défèque, muent et probablement s'accouplent. (FT) poils fermant l'entrée tympanique (TR). (FP) paquet de fèces. Dessins de Y. Saitô (1986) et de A.E. Treat (1975).

pivotement lorsqu'elles passaient sur les paquets de fèces. Il semble donc que la réponse de *Varroa* soit conditionnelle. Bien que sans réponse, on est en droit de se demander quelles conditions physico-chimiques ou quel conditionnement comportemental sont nécessaires à l'apparition du rythme comportemental que j'ai décrit. On sait que chez les arthropodes, les réactions comportementales peuvent être régulées par des facteurs endogènes (Blaney et al 1986; Klowden 1990) ou extérieurs, par exemple la présence de produits chimiques dans leur environnement (Raina et al. 1992).

La phase de reproduction n'est pas la seule période où *Varroa* montre des préférences pour telle partie de son hôte. Le parasite infeste le plus souvent les abeilles adultes d'âge moyen (Le Conte et Arnold 1987; Steiner 1993), qui sont les abeilles nourrices. Celles-ci sont le plus susceptibles de conduire l'acarien vers du couvain et à l'opposé, les moins susceptibles de mourir hors de la ruche ce qui perdrait le parasite. Cette préférence est d'origine chimique puisque des abeilles mortes âgées de 3-10 jours sont, en olfactomètre, préférées aux abeilles âgées de plus de 15 jours (Kraus et al. 1986, 1993) ou à celles de zéro jours (Le Conte 1990).

Si l'on considère que les insectes possèdent une symétrie latérale parfaite, il est très étonnant d'observer que les *Varroa* femelles se fixent préférentiellement sous les sternites gauches de l'abeille. De plus, d'une manière similaire à ce que l'on observe dans l'alvéole, *Varroa* préfère nettement s'insérer sous les tergites latéraux du deuxième segment abdominal (Delfinado-Baker et al. 1992). Ces auteurs expliquent ce comportement par le fait que l'abeille se nettoie principalement sur le thorax (ailes) et le dos de l'abdomen. J'ajouterai que selon mes observations un autre facteur est également évident : cette inter-tergite est la plus spacieuse et il est aisé de l'ouvrir, contrairement à celles plus postérieures. L'interprétation de la position préférentielle des tiques sur les mammifères invoque également la capacité de l'hôte à se nettoyer.

Ces interprétations sont forcément sans fondement dans le cas de la pupa d'abeille qui est immobile (quelques mouvements des appendices apparaissent lorsqu'elle devient jaune-brune). Chez les vertébrés, on sait que les ectoparasites

sélectionnent les zones de succion également selon le critère de l'accessibilité des sources de nourriture, par exemple les oreilles, les mamelles... Il apparaît donc que le choix du lieu de succion et les avantages qu'il procure méritent d'autres recherches. Ici, je ne peux que proposer quelques éléments d'interprétations.

Dans le cas de *Varroa* pendant sa phase de reproduction on constate que les lieux de suctions sur le cinquième segment sont utilisés durant tout le stade de pupes sans qu'il y ait d'hémorragie issue de cet endroit. D'autres avantages peuvent être en cause dans le choix du lieu de succion. La proximité et la disponibilité de l'hémolymph, ou la possibilité d'intervenir sur la physiologie de son hôte.

On sait que l'hémolymph des insectes circule dans un circuit ouvert où baignent les organes; toutefois, certaines structures facilitent sa circulation. C'est le cas du diaphragme ventral qui, selon Heinrich (1976), chez les bourdons se prolonge dans le thorax. Dans la partie antéro-ventrale de l'abdomen, on a donc une forte proportion de l'hémolymph qui vient du thorax qui passe entre le diaphragme et la cuticule et peut être facilement accessible pour *Varroa*.

L'autre possibilité est que *Varroa*, en piquant en avant de l'abdomen, intervienne plus facilement qu'ailleurs sur des fonctions physiologiques de la pupes d'abeille. Selon Gelbe-Swiderek (1989); Gelbe et Madel (1988) les glandes salivaires des femelles *Varroa* peuvent atteindre $220 \times 140 \mu\text{m}$ et leur sécrétions contiennent des lipides, des hydrates de carbone et des protéines. L'injection dans des pupes d'abeille d'homogénats de ces glandes provoque l'atrophie de leur muscles. On sait par exemple que les pupes de coléoptères et de lépidoptères montrent des pulsations périodiques de la pression du système circulatoire. Ces pulsations sont indépendantes des pulsations cardiaques et sont probablement causées par des mouvements musculaires de l'abdomen (Sláma 1976). Chez *Tenebrio molitor*, cette pompe abdominale est indépendante du cerveau. On peut inhiber son activité en cautérisant les insectes à travers la deuxième sternite abdominale, ou en sectionnant la chaîne nerveuse entre le premier et le deuxième segment abdominal (Sláma et al. 1979).

Ponte et développement

Un grand nombre d'études existent sur la reproduction de *Varroa* qui décrivent la ponte, la durée des stades de développement et le succès de reproduction (voir Ifantidis et Rosenkranz 1988; Fries & al. 1994).

Dans les cellules artificielles d'ouvrières, les femelles *Varroa* se libèrent de la gelée larvaire dans les 1-2 heures qui suivent l'operculation en s'agrippant à l'abeille qui mange la gelée restante. Dans les cellules de faux-bourçons elles y restent quelques heures de plus (Ifantidis 1988). Ceci pourrait expliquer que la ponte soit légèrement retardée dans les alvéoles de faux-bourçons (71.8 hpo) par rapport à celles d'ouvrières (69.5 hpo). Ceci confirmerait que l'oogenèse est induite tout au début du cycle de reproduction (Beetsma et Zonneveld 1992; Rosenkranz 1990; Steiner 1992a,b) et plus particulièrement lorsque la *Varroa* fondatrice est en mesure de se nourrir sur la larve.

Pour comparer les durées des stades de développement et les périodes de ponte, je me référerai exclusivement aux études qui ont utilisées des méthodes systématiques. Seuls Ifantidis (1983) et Rehm (1988) ont utilisé une méthode fiable. Ils ont ouvert du couvain operculé par intervalles de quatre heures. Cette méthode donne une image précise des premières apparitions de chaque stade (p. ex. pontes) et des dernières occurrences (p. ex. éclosions). L'avantage de nos données est donc que la durée de développement d'un stade est connue pour chaque individu et ne souffre pas des décalages ayant eu lieu précédemment (période de ponte, durée des stades précédents). Le désavantage de nos résultats est qu'il ont été obtenus en incubateur où les facteurs abiotiques peuvent différer de ceux de la ruche. Par exemple, l'absence d'abeilles qui ventilent à la surface des rayons peut provoquer la diminution de la diffusion des gaz à travers l'opercule des alvéoles.

Dans nos cellules, le premier oeuf est pondu entre 67 et 79 hpo, alors que les autres études ne peuvent mentionner que les premières apparitions dans les alvéoles, c'est-à-dire 60-64 hpo (Ifantidis 1983) et 64-68 hpo (Rehm 1988). Les

pontes se succèdent toutes les 27-28 heures (Rehm 1988), ou toutes les 30 heures (Ifantidis 1983; présente étude).

Pour comparer les durées des stades de développement de la littérature et de nos propres données, il faut se souvenir que les études citées ci-dessus se basaient sur une fausse séquence de ponte des deux sexes. Rehm et Ritter (1989) (confirmé par Ifantidis 1991) ont montré que le mâle est pondu en premier et non en deuxième position comme on le pensait auparavant. Si l'on tient compte de cette erreur, nos données sont assez similaires à celles de la littérature qui ne donnent que des minima et des maxima.

Un certain nombre de descendants ne survivent pas au développement. Au moment de la ponte, il est déjà possible de dire si le descendant est normal ou anormal. S'il est normal, l'oeuf contient une jeune protonympe (Steiner 1992a,b, 1993) dont les pattes sont bien visibles et sont repliées sous la face ventrale (Donzé 1991). Deux types d'oeufs non viables sont observés. Des oeufs de taille normale et déposés selon la séquence comportementale que nous avons décrite, mais dont le contenu est informe et homogène. D'autres oeufs sont de très petite taille et les femelles n'arrivent pas à les expulser. Ils restent coincés plusieurs heures dans l'orifice de ponte puis se rompent. Une deuxième partie est parfois expulsée. En général, les femelles qui pondent ces petits oeufs n'en pondent pas d'autres. Il semblerait que *Varroa* soit capable de résorber la matière nutritive des oeufs en phase post vitellogénèse lorsque les conditions sont défavorables (Steiner et Diehl, comm. pers.), dès lors on peut se demander si les femelles interrompent la ponte lorsque les conditions sont défavorables. Ceci leur permettrait de conserver leur matériel génétique (ovules, spermatozoïdes) et des réserves nutritives pour les cycles de reproduction ultérieurs dans des conditions plus favorables.

Durant le développement, la mortalité des descendants est causée par des facteurs externes tels que destruction durant la pupation de l'hôte ou lorsque les *Varroa* bousculent les oeufs. Cependant, d'autres cas de mortalité dont les causes ne sont pas connues sont également observés. On peut mentionner le cas assez

fréquent des jeunes femelles trouvées mortes après la mue imaginale. Ces femelles n'ont aucun volume et ont la forme d'une coupelle très fine et sont uniquement constituées des deux couches de cuticule.

Induction et arrêt de la ponte

Comparé à l'importance économique des ravages de ce parasite, très peu d'études ont fait l'objet de l'induction et aucune du blocage de l'oogenèse. Bien que l'hormone juvénile n'ait jamais été mise en évidence dans l'ordre des Acarina, des expériences ont montré que cette hormone (ou ses analogues) influence l'oogenèse et la ponte chez les tiques (Connat & al. 1983; Pound et Oliver 1979) et les acariens mésostigmates (Oliver et al. 1985; Thind et Edwards 1990). Hänel (1983, 1986); Hänel et Koeniger (1986) montrent que chez *Varroa* la proportion de femelles fertiles augmente après qu'on ait traité avec l'hormone juvénile III les abeilles adultes où se trouvent les acariens ou les larves d'abeilles que l'on infeste avec l'acarien. Ces expériences n'ont pu être confirmées (Milani et Chiesa 1990) et les taux d'hormone juvénile mesurés chez l'abeille indienne (*A. cerana*), les abeilles européennes et africanisées (*A. mellifera*) montrent de faibles différences (Rosenkranz et al. 1990, 1993). Il est donc peu probable que l'infertilité des *Varroa* observée dans le couvain d'ouvrières africanisées (Moretto et al. 1991; Rosenkranz 1990) et d'*A. cerana* (Tewarson & al. 1992) soit due au manque d'hormone juvénile comme le suggère Hänel. Cela ne prouve toutefois pas que l'hormone juvénile puisse avoir une influence sur la reproduction de *Varroa*. De toutes les études où une hormone juvénile ou des analogues influence l'oogenèse chez des acariens (Acarina), seul *Varroa* est susceptible de réellement rencontrer cette substance dans son régime alimentaire, puisqu'il se nourrit sur un insecte.

Avant de conclure sur le rôle de l'hormone juvénile chez *Varroa*, il faudra une étude complète qui tienne compte des interactions entre l'hôte et le parasite. La complexité de ces interactions est illustrée par nos connaissances sur la physiologie de l'abeille. On sait : a) que le taux d'hormone juvénile est plus élevé chez les abeilles adultes d'été que celles d'hiver (Fluri & al. 1977, 1982); b) qu'en été, les abeilles privées de couvain possèdent un taux d'hormone juvénile plus faible que

celles des ruches qui élèvent du couvain. c) que les différences physiologiques ne se limitent pas au taux d'hormone juvénile (Fluri & al. 1977, 1982).

Ces données concernant l'hôte sont importantes pour le parasite car on sait a) que *Varroa* présente une faible fertilité à la fin de l'hiver (Ifantidis et Rosenkranz 1988; Otten 1991); b) que la fertilité de l'acarien est également très faible en été, après une interruption de couvain dans la ruche (Rosenkranz 1990; Steiner 1991, 1992); c) que la phase de parasitisme de l'acarien sur les abeilles adultes influence la fertilité des *Varroa* (Beetsma & al. 1992; Milani et Chiesa 1990).

On doit encore mentionner que les paramètres physiologiques de l'hôte évoluent non seulement avec les saisons mais également au cours de la vie de l'abeille (polyphénisme), et qu'on a montré leur importance (Robinson et Ratnieks 1987; Robinson 1992) dans la modulation des comportements de l'abeille au cours de sa vie (polyéthisme, Lindauer 1952, Seeley 1982). Si la physiologie des abeilles est importante pour la reproduction des acariens, les *Varroa* qui choisissent des adultes d'un âge déterminé (Kraus 1990, 1993; Kraus et al. 1986; Steiner 1993), le font donc dans le but d'assurer leur maturation.

Comme je l'ai mentionné au début de ce chapitre, aucune étude n'a été entreprise sur l'arrêt de l'oogenèse qui se produit longtemps avant l'émergence de la jeune abeille. Cet arrêt de la ponte me semble très important, car il montre, s'il était nécessaire, que *Varroa* est magnifiquement adapté à son hôte: les descendants qui seraient pondus plus tard n'auraient aucune chance d'atteindre l'âge adulte, ce qui serait un gaspillage de spermatozoïdes, de réserves alimentaires et de plus, ces descendants appauvriraient l'hôte en se nourrissant. D'autre part, un plus grand nombre de descendants augmenterait la compétition entre les acariens et la probabilité que l'hôte meurt. Le nombre d'oeufs pondus par une femelle est dans la majorité des cas 4-5, mais dans les alvéoles de faux-bourdons un sixième est parfois pondu (Ifantidis 1984). Comme le développement des faux-bourdons est plus long que celui des ouvrières, cet oeuf supplémentaire pourrait indiquer que le blocage de la ponte intervient à un stade précis de la métamorphose de l'hôte.

Un autre aspect de la reproduction de *Varroa* est observée avec une grande régularité: on peut se demander grâce à quel mécanisme la femelle pond toujours

l'unique mâle en premier. Chez les acarïens tétranyques, l'apparition préférentielle des oeufs haploïdes en début de ponte a été expliquée par le fait que les spermatozoïdes ne sont pas encore présents dans la spermathèque (Helle 1967). Cela n'est pas le cas chez *Varroa*, puisque cette espèce peut se reproduire lors de plusieurs cycles.

Sexe ratio

Le sexe ratio de *Varroa* dans les cellules de couvain est nettement en faveur des femelles. De plus, le nombre de mâles produit est dans la grande majorité des cas égal à un et la séquence de ponte est très stable.

Selon Fisher (1930), l'équilibre du sexe ratio observé chez la plupart des êtres vivants est obtenu par sélection naturelle de la manière suivante: si un déséquilibre apparaît et que la production de femelles est supérieure à celle de mâles, alors ces derniers pourront féconder beaucoup de femelles et chacun d'eux aura plus de descendants que les femelles. Il en résulte que les parents de ces mâles ont plus de petits-enfants que ceux qui ont produit les femelles. Si le facteur "produire des mâles" est transmis génétiquement, alors il augmente dans la population et l'équilibre se rétablit. Cet état d'équilibre n'est obtenu que si les individus de la population peuvent copuler entre eux au hasard (panmixie), ce qui n'est pas toujours le cas.

Hamilton (1967), a montré que pour un grand nombre d'espèces d'insectes et d'acarïens le sexe ratio se maintient à l'avantage des femelles. En bref, cette situation semble due au fait que les accouplements ne sont possibles qu'au lieu d'émergence des adultes qui est cloisonné (Local Mate Competition = LMC) et donc que les mâles ne peuvent féconder que leur soeurs. Comme la compétition entre mâles n'a lieu qu'entre frères, les femelles mères ont avantage à produire plus de femelles et juste assez de mâles pour féconder toutes leurs soeurs (Green & al. 1982; Hamilton 1967; Hartl 1971; Waage 1982; Wrensch et Ebert 1993).

Chez certaines espèces de guêpes, le sexe ratio dans la descendance d'une femelle varie selon le nombre de femelles mères dans l'enceinte de reproduction (Charnov 1982; Herre 1985, 1989; Wrensch et Ebert 1993). Lorsque plusieurs

femelles se reproduisent simultanément, la proportion de descendants mâles augmente.

Cette modulation peut se fixer dans la population. Ainsi, Herre (1987) montre que les espèces pollinisatrices des figuiers où l'infestation moyenne est faible (moins de femelles infestantes par figue) ont une proportion de mâles plus faible dans leur descendance que les espèces où l'infestation moyenne est forte. Toutefois, le sexe ratio n'est que partiellement fixé dans la population mais se module quelque peu en fonction du nombre de fondatrices présentes simultanément dans une figue (Herre, comm. pers.).

Chez d'autres espèces de guêpes parasites, on observe une forte propension à produire un nombre fixe de mâles (Green et al. 1982). Ces auteurs proposent un modèle qui prédit que cette stratégie a un meilleur succès de reproduction que celle de produire des mâles selon une distribution binomiale (Hartl 1971).

Le sexe ratio chez Varroa est-il adaptatif ?

Le maintien d'un sexe ratio déséquilibré en faveur des femelles est lié aux caractéristiques typiques observées chez les espèces qui se reproduisent dans des environnements cloisonnés (LMC). Hamilton (1967) a synthétisé ces caractéristiques (extreme biofacies), et comme nous le voyons ci-dessous, *Varroa* s'y adapte fidèlement (voir aussi Ramirez 1987) :

a) les femelles sont en surnombre dans la descendance de *Varroa* (spanandrie) (Fuchs et Langenbach 1989; Ifantidis 1983; Rehm et Ritter 1989; présente étude); b) la reproduction est du type arrhénotoque, c'est à dire que les mâles sont haploïdes et les femelles sont diploïdes (de Ruijter et Pappas 1988; Steiner & al. 1982); c) le développement des frères et soeurs est grégaire. Chez *Varroa*, ce comportement est favorisé par le paquet de fèces; d) les mâles adultes muent les premiers (protandrie) et ont une stratégie qui favorise l'insémination d'un grand nombre de femelles filles; e) les accouplements ont lieu juste après la mue imaginale des femelles; f) les mâles sont incapables d'émigrer et ne survivent pas dans la ruche hors des alvéoles, ce qui empêche les fécondations au hasard; g) les femelles filles stockent le sperme dans leur spermathèque. C'est bel et bien le cas chez *Varroa* où, de plus, le nombre de spermatozoïdes augmente avec le nombre d'accouplements, provoquant ainsi une

pression sélective sur les mâles. Ceux-ci auront plus de descendants si leur capacité sexuelle est meilleure; h) il y a au moins un mâle pour chaque groupe de descendants.

J'aimerais discuter plus à fond le dernier point. Si l'on considère le sexe ratio lors de la ponte, *Varroa* produit toujours le nombre minimal de mâle requis pour assurer l'insémination des femelles, soit un. Toutefois, si l'on considère le sexe ratio opérationnel, soit les descendants matures, on constate dans mes résultats et ceux d'autres auteurs que les mâles font souvent défaut, et dès lors, on peut se demander si d'autres alternatives ne seraient pas plus avantageuses pour assurer l'insémination des femelles. Deux alternatives de régulation du sexe ratio peuvent être considérées; soit la production du nombre de mâles selon une loi binomiale (Hartl 1971), soit la production d'un nombre fixe de mâles par ponte, mais supérieur à un.

Dans les deux cas, les avantages seraient qu'un plus grand nombre de cellules contiendraient au moins un mâle et les femelles seraient en moyenne mieux inséminées. De plus, dans les cellules multiinfestées, les femelles ayant produit deux mâles pourraient attendre plus de petits-enfants, car leurs fils auraient une probabilité plus forte de féconder les jeunes femelles des cohabitantes.

Les désavantages d'augmenter le nombre de mâles sont évidents chez *Varroa*. Ils sont liés aux ressources qui sont à la disposition du parasite durant son cycle de reproduction. La durée de la reproduction est limitée par le développement de l'hôte tandis que la nourriture disponible est fixe, puisque l'hôte ne se nourrit pas. Il s'en suit que chaque mâle supplémentaire réduit d'autant le nombre de femelles, ce qui représente une forte diminution du taux de reproduction.

Chez *Varroa*, un unique oeuf haploïde est pondu au début de chaque ponte, et le mâle adulte émerge en premier. D'après nos observations, il faut environ 20 heures pour sa maturation sexuelle, et avant que cette période soit écoulée, un mâle placé avec des femelles ne montre pas de séquence complète d'accouplement. Mais lorsque la première fille émerge, le mâle est sexuellement mature.

La protandrie est fréquente chez les insectes, mais également chez les acariens et un grand nombre d'explications différentes ont été avancées. Une d'entre elles est que l'émergence précoce du mâle est une réponse à la compétition au niveau du sperme. Cette compétition est présente soit chez les espèces où il y a une précédenche de la fécondation (sperm competition), soit chez les espèces où il y a un mélange du sperme (sperm mixing), ou chez les espèces où le premier accouplement d'une femelle féconde une grande proportion des oeufs qu'elle produira (Wedell 1992). La précédenche de la fécondation existe chez les acariens (Radwan 1991; Yasui 1988) mais n'a pas été étudié chez *Varroa*. Toutefois, comme le montre nos résultats, il faut plusieurs accouplements pour assurer la fécondité des femelles, et par conséquent il me semble peu probable qu'il y ait éviction des spermatozoïdes d'un mâle par un autre. Par contre, nos résultats indiquent qu'il y a un mélange de sperme de plusieurs accouplements. Il s'en suit que les mâles qui, dans une alvéole, atteignent les premiers l'âge adulte, vont pouvoir rapidement s'accoupler avec les femelles et ont donc un net avantage sur les mâles qui naîtraient par la suite. En conclusion, le développement de la protandrie a pu être favorisée chez *Varroa* par le fait que la quantité de spermatozoïdes dans la spermathèque est limitée.

Nombre d'oeufs

Varroa, en tant qu'ectoparasite du couvain de l'abeille mellifère, présente plusieurs traits communs avec les insectes parasitoïdes. Afin d'assurer la survie et le développement de leur progéniture ils doivent limiter le nombre d'oeufs pondus en fonction des ressources nutritives que constitue l'hôte. Ainsi l'hôte doit pouvoir nourrir un maximum de descendants. Dans le cas de *Varroa*, cet acarien ne peut quitter lui-même la cellule operculée, il doit donc, en plus, éviter de tuer son hôte afin de le laisser émerger de l'alvéole. Donc la nourriture que *Varroa* peut prélever sans tuer son hôte est faible.

Comme je l'ai déjà mentionné, le nombre d'oeufs pondus chez *Varroa* lors de chaque cycle de reproduction est sans nul doute conditionné par la durée du

développement de l'hôte. Pour augmenter ce nombre, *Varroa* aurait donc dû raccourcir l'espace entre les pontes et diminuer la taille de ses oeufs. On sait que dans le même groupe systématique, le taux d'oviposition varie grandement d'une espèce à l'autre et est souvent plus élevé que chez *Varroa* (Amano et Chant 1978; Camin 1978; Maurer et Baumgärtner 1992; Rapp 1959; Walter et Lindquist 1989). Le deuxième facteur, soit la taille des oeufs (le ratio volume femelle/volume d'un oeuf) varie dans une plus faible proportion (Yastrebtsov 1992). Evidemment, les facteurs abiotiques jouent un rôle dans l'évolution du cycle de reproduction, mais chez *Varroa*, ceux-ci sont sûrement en sa faveur puisque la température du couvain est élevée et que la source de nourriture est présente en permanence.

Malgré ces considérations, *Varroa* au cours de l'évolution s'est fixé sur le comportement de ponte décrit dans mes résultats. Alors, comment interpréter la situation observée chez *Varroa* ? Je considérerai séparément la taille des oeufs et leur nombre.

La taille des oeufs définit les réserves qu'ils contiennent et donc les chances de survie de la protonympe après son éclosion lorsqu'elle doit jeûner. Comme je l'ai montré, les protonymphes sont incapables de percer la cuticule de l'hôte et de plus, certaines doivent chercher longtemps pour rejoindre l'endroit où la femelle mère a préparé le lieu de nutrition. Ces protonymphes sont hyperactives jusqu'à ce qu'elles réussissent, et, en cas d'échec, meurent après approximativement 20 heures.

Si l'on considère le nombre d'oeufs, un élément important est qu'il ne change pratiquement pas lorsque le taux d'infestation varie entre une et quatre fondatrices. Ceci indique que *Varroa* n'est pas capable de modifier la taille de sa ponte en fonction du nombre de femelles présentes dans une alvéole. Il est peu probable que cela soit dû à une incapacité de détecter la présence d'autres femelles. Par contre, si l'on considère que la ponte est parfois plus grande dans les cellules de faux-bourçons que celles d'ouvrières, soit six au lieu de cinq, l'incapacité de *Varroa* de moduler son oviposition pourrait indiquer que l'arrêt de ponte est régulée par des facteurs apparaissant durant le développement de son hôte. Dans ces conditions, la

ponte des femelles doit, au tant que cela se peut, être aussi bien adaptée aux uniinfestations qu'aux multiinfestations.

Un certain nombre d'études théoriques ont été publiées sur le nombre d'oeufs des pontes des parasitoïdes ou des insectes qui pondent dans des environnements (patches) aux ressources limitées. La taille moyenne de la ponte stable en terme d'évolution décroît lorsque le nombre de femelles pondant dans une même zone augmente (Parker et Courtney 1984; Parker et Begon 1986). Mais selon Ives (1989), le nombre d'oeufs pondus peut augmenter si la compétition entre individus a des conséquences bénignes car dans ce cas, les femelles escomptent plus de survivants parmi leurs descendants. Par contre, le nombre d'oeufs doit décroître si les conséquences de la compétition sont sévères. Cette deuxième prédiction s'applique à *Varroa*, puisque la mort de l'hôte fait échouer toute la reproduction et de plus tue les adultes responsables. Il est intéressant de noter qu'une des présuppositions de ces modèles mathématiques est que les femelles produisent le même nombre d'oeufs à toutes les pontes. Comme nous l'avons vu, cette condition est effectivement remplie chez *Varroa*.

Postulons donc qu'avec la taille de la ponte de *Varroa*, la capacité de l'hôte n'est pas totalement utilisée lors des uniinfestations, mais s'inverse lors des multiinfestations. Deux résultats le montrent. Premièrement, nous avons vu que le succès de reproduction était fonction du nombre de femelles infestantes. La balance (trade-off) entre les avantages et les désavantages (entre le sexe ratio et le nombre de survivants) aboutit à un optimum de filles adultes fertilisées lorsque deux femelles ont infesté une alvéole¹. Deuxièmement, *Varroa* favorise la compétition entre ses descendants en ne formant qu'un lieu de succion. Il est surprenant mais significatif de constater qu'avec nos simulations, la saturation du lieu de succion est observée pour deux familles d'acariens. La compétition au trou de succion n'a probablement que très peu de conséquences lors des uniinfestations où le facteur limitant est la mortalité des mâles. Par contre, lorsque le taux d'infestation dépasse deux familles,

¹ J'aimerais mentionner qu'un des aspects de cette balance entre les coûts et les bénéfices des différents taux d'infestations n'a malheureusement pas été étudié. Il s'agit du taux de mortalité de l'hôte. Celui-ci augmente probablement avec le taux d'infestation des alvéoles.

la compétition entre individus est une des causes de la diminution du succès de la reproduction.

Distribution des *Varroa* dans les alvéoles

Nos résultats suggèrent que l'invasion des alvéoles de couvain par les acariens n'est pas aléatoire et que la variation par rapport à une distribution de Poisson est beaucoup plus nette dans le couvain de faux-bourçons. Par rapport à une distribution de Poisson, la distribution des *Varroa* mères dans les alvéoles montre un plus grand nombre de larves non infestées, ainsi qu'un plus grand nombre d'alvéoles fortement infestées. De telles distributions étalées (overdispersed distributions) sont fréquentes chez des parasites appartenant à un très large éventail de groupes systématiques tels que nématodes, trématodes, tiques et acariens qui parasitent des vertébrés comme des invertébrés (Anderson & May 1978; Begon & Mortimer 1986; Guyatt & al. 1990; Maizel & al. 1993; Randolph 1975). Considérant qu'une telle convergence est apparue chez des parasites ayant une biologie si différente, on doit se demander si les mêmes causes produisent les mêmes effets.

Facteurs proximaux

Les mécanismes proximaux qui sont à l'origine de ces distributions non aléatoires doivent être recherchés chez l'hôte comme chez le parasite. Il me paraît peu vraisemblable que les mêmes mécanismes interviennent dans le cas des helminthes ou de *Varroa*. Dans le cas des helminthes, les comportements des individus de l'espèce hôte peuvent favoriser l'infestation. Dans le cas des tiques de petits rongeurs et de musaraignes, la taille du territoire et la distance parcourue par les individus peuvent influencer la fréquence de contact avec les tiques. De plus, les tiques elles-mêmes ne sont pas distribuées au hasard ni dans le temps (saisons) ni dans l'espace (p. ex. nids) (Randolph 1975). Dans le cas des helminthes de l'homme, des facteurs sociaux (profession, situation sociale) s'ajoutent aux facteurs comportementaux (Schad & Anderson 1985). Dans les cas cités ci-dessus et dans de nombreux autres cas, il faut ajouter les réactions immunologiques induites par les infestations antérieures ainsi que des prédispositions génétiques. Dans le cas de

l'invasion des alvéoles de couvain par *Varroa*, la situation est toute différente, car l'hôte est très peu mobile, sa distribution sur un cadre est homogène et les larves n'ont pas été infestées antérieurement.

Voici deux hypothèses non-exclusives pour expliquer l'apparition des distributions agrégées de *Varroa*. La première, est que les larves d'abeilles ne produisent par toutes la même quantité de composés attractifs ou des composés répulsifs pour l'acarien. Ainsi, les larves de reines sont peu attractives pour *Varroa* et produisent une plus grande quantité de oléate de méthyle (Trouiller et al. 1994). Or, cette substance est répulsive pour *Varroa* (Le Conte 1990; Le Conte et al. 1989). Notons qu'une telle situation pourrait être également présente dans le cas des parasites de mammifères dont le cycle passe par un stade infectant actif (p. ex. miracidie) ou un vecteur. La deuxième hypothèse est que les acariens femelles laissent une trace lorsqu'elles pénètrent dans une alvéole et qu'elles se glissent sous la larve d'abeille. Cette trace favoriserait l'infestation de cette alvéole par d'autres femelles. Selon Rickli & al. (1994), l'acarien posé sur un extrait de larve d'abeille augmente sa vitesse de déplacement et, lorsqu'il arrive au bord, retourne sur la zone traitée. Ce comportement, s'il est également émis sur les larves augmenterait la probabilité que les acariens détectent la trace éventuelle laissée par un prédécesseur. Notons toutefois, que ce test *in vitro* ne fournit pas de fente où les femelles *Varroa* pourraient se glisser. Cette fente pourrait à elle seule induire le comportement de se glisser entre la larve et la paroi de l'alvéole.

Dans tous les cas, il est intéressant de rappeler que seules les distributions des *Varroa* dans le cas des faux-bourçons se différencient régulièrement des distributions de Poisson. Hors, chez *A. cerana* on sait que *Varroa* infeste exclusivement le couvain de faux-bourçons. Dans les deux hypothèses ci-dessus, la durée durant laquelle les acariens peuvent infester les alvéoles influence le taux d'agrégation. On sait que les *Varroa* bénéficient de 40 heures pour infester les alvéoles de faux-bourçons, contre seulement 20 heures pour les alvéoles d'ouvrières (Ifantidis 1988; Boot & al. 1992). Dans le couvain de faux-bourçons, cette plus longue période permet l'infestation par un plus grand nombre d'acariens que dans

les alvéoles d'ouvrières. Toutefois, même en considérant le faible volume de la ruche, il est remarquable qu'avec une si courte période d'infestation, un tel biais des distributions puisse apparaître.

Selon Crofton (1971), des facteurs non aléatoires peuvent provoquer de telles distributions. Dans une ruche, les facteurs non homogènes sont assez rares, toutefois, des cycles de couvain apparaissent, et sont liés par exemple à la météorologie, à l'essaimage. Ces cycles aboutissent à ce que les quantités de cellules disponibles pour l'infestation varient et par là même, le taux d'émergence des acariens. De plus, à l'émergence, la population de *Varroa* est composée de femelles d'âges différents. Cela constitue des sous-populations qui vont infester le couvain plus ou moins successivement. Ces constatations sont cohérentes avec le modèle proposé par Fuchs (1985, 1988, 1992); (Crofton 1971) qui dit: les valeurs des distributions observées de *Varroa* peuvent être simulées par l'accumulation d'une série de distributions de Poissons de telle manière que le nombre d'acariens et de cellules soit celui de la distribution observée (Fuchs 1988). Toutefois, cet auteur ne décrit nulle part le critère de choix des distributions de Poisson.

Ainsi, je peux m'imaginer que chaque sous-population de *Varroa* pénètre au hasard dans le couvain disponible, et ceci durant une courte période. Comme la période d'infestation est plus longue dans le couvain de faux-bourçons, plusieurs sous-populations infestent le couvain et donc le biais est plus grand que dans le couvain d'ouvrières.

L'idée des sous-populations d'acariens formant un continuum est partiellement soutenu par le comportement d'infestation d'un unique lot de *Varroa*. Dans chacune des trois ruches qui n'élèvent pas de couvain, on introduit un unique lot d'acariens qui émerge d'un cadre de couvain; puis chaque jour on donne aux ruches du couvain ouvert juste avant l'operculation. 50 % des acariens ont pénétré le couvain d'ouvrières après 2, 4 ou 8 jours et non après une période déterminée. Notons toutefois que dans ces conditions expérimentales, une forte proportion de *Varroa* tarde à infester le couvain (jusqu'à plus de 20 jours) (Boot & al. 1993). Est-ce que le

fait que les ruches n'élèvent pas elles-mêmes du couvain modifie la physiologie des ouvrières adultes et ainsi manque de stimuler les acariens à infester le couvain ?

Facteurs ultimes

Les facteurs ultimes qui favorisent l'évolution de ces distributions non aléatoires n'ont que peu fait l'objet de publications jusqu'à ce jour. Selon Begon & Mortimer (1986), ces distributions à forte agrégation permettent de laisser un pourcentage élevé d'individus non parasités, ce qui crée un refuge partiel pour l'espèce hôte. Ceci est aussi vrai chez *Varroa*, puisque l'écart entre le pourcentage de cellules non parasitées et celui prédit par des distributions de Poisson est toujours positif. Dans le cadre de l'interaction abeille-*Varroa*, cet aspect n'est pas dénué d'intérêt. En effet, chez *A. cerana*, l'acarien ne parasite que le couvain de faux-bourdons, qui est limité en nombre (De Jong 1982; Koeniger & al. 1981; 1988; Rath 1991a,b; Tewarson & al. 1992). Les faux-bourdons qui ont été parasités durant leur développement produisent moins de spermatozoïdes (Schneider & Drescher 1987). Dans ces conditions, l'effet de refuge partiel assure un certain pourcentage de faux-bourdons sains, ce qui permet de maintenir le niveau de reproduction de l'hôte.

Dans la présente étude, je montre que deux autres mécanismes ont pu favoriser le développement de ces distributions non-aléatoires. On a vu que le succès de reproduction (nombre de femelles fécondées) varie en fonction du nombre de mères et qu'il est optimal lorsque deux ou trois femelles infestent une alvéole. De plus, le pourcentage de femelles filles qui peuvent être fécondées augmente dans les cellules multiinfestées; il en résulte moins de *Varroa* stériles. Dans les résultats, j'ai principalement mis l'accent sur le premier aspect, parce qu'il est directement quantifiable pour chaque cycle de reproduction. Toutefois, l'impact des femelles restées stériles n'est pas négligeable, car sans pouvoir se reproduire, ces femelles chargent inutilement l'hôte et augmentent le risque de transfert de maladies secondaires. De plus, lorsqu'elles se trouvent dans des alvéoles avec d'autres femelles fertiles, elles augmentent le risque que les parasites soient détectés par les abeilles et que l'alvéole soit vidée. Aux facteurs déjà mentionnés, il faut ajouter que les cellules multiinfestées présentent l'avantage de réduire le taux de consanguinité de la population, car elles permettent l'échange des gènes entre les familles.

En conclusion

A la lumière des résultats de ce travail, nous pouvons conclure que *Varroa* utilise l'espace de l'alvéole d'une manière très structurée afin de permettre la cohabitation d'une ou plusieurs familles d'acariens et afin d'assurer la rencontre de tous les descendants matures. Chaque *Varroa* femelle produit avec régularité un faible nombre d'oeufs contenant le minimum possible d'oeuf haploïde (un) malgré que sa survie ne soit pas assurée. Une modélisation de la reproduction de *Varroa* qui prendrait en compte tous les différents paramètres et leurs différentes options, devrait permettre de comprendre la stratégie que le parasite a finalement adoptée en fonction des contraintes et des libertés qu'il avait à sa disposition.

Comme nous l'avons vu, le succès de reproduction de *Varroa*, et par là, la pression évolutive qui s'est exercée sur son comportement, sur le sexe ratio de sa descendance, sur la taille de sa ponte et celle de ses oeufs ne se limite pas aux seules données du couvain uniinfesté. En infestant le couvain d'une manière non aléatoire, *Varroa* utilise une stratégie qui combine les avantages cumulés du choix du sexe ratio; du nombre d'oeufs pondus et du stade de développement de la nymphe au moment de la ponte. Cependant, pour tirer avec certitude de telles conclusions évolutives, il faudra entreprendre les quantifications de ces facteurs chez l'hôte d'origine *A. cerana*.

V Références

- Abbas, N. D. (1990) In vitro-Reproduktion der parasitischen Bienenmilbe *Varroa jacobsoni*. Ph.D thesis Eberhard-Karls- Universität Tübingen. 85pp.
- Abbas, N. D.; Engels, W. (1989) Rearing of *Varroa* in artificial cell on drones. In: Proc. EC Experts'group Meeting in Udine 1988. R. Cavalloro (Ed.), Brussels, Luxembourg. 223-228.
- Akimov, I. A.; Pileckaja, I. P.; Yastrebtsov, A. V. (1990) Der Reproduktionszyklus der Milbe *Varroa jacobsoni* und ihre Beziehung zum Wirt. *Vestnik Zool.*, 2, 41-46.
- Akimov, I. A.; Starovir, I. S.; Yastrebtsov, A. V.; Gorgol, V. T. (1988) *Varroa* mite the agent of the bee Varroaosis. *Naukova Dumka*. 117pp (in russian).
- Alberti G.; Hänel H. (1986) Fine structure of the genital system in bee parasite *Varroa jacobsoni* (Gamasida: Dermanyssina) with remarks on spermiogenesis, spermatozoa and capacitation. *Exp. Appl. Acarol.*, 2, 63-104.
- Amano, H.; Chant, D. A. (1978) Mating behaviour and reproductive mechanisms of 2 species of predacious mites, *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot and *Amblyseius andersonii* Chant (Acarina : Phytoseiidae). *Acarologia*, 20, 196-213.
- Anderson, R. M.; May, R. M. (1978) Regulation and stability of host-parasite population interactions. 1. Regulatory processes. *J. Anim. Ecol.*, 47, 219-247.
- Arnold, M. T.; Regnier, F. E. (1975) A developmental study of the cuticular hydrocarbons of *Sarcophaga bullata*. *J. Insect Physiol.*, 21, 1827-1833.
- Arnold, G.; Le Conte, Y.; Trouiller, J.; Hervet, H.; Chappe, B.; Masson, C. (1994) Inhibition of worker honeybee ovaries development by a mixture of fatty acid esters from larvae. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie*, 317, 511-515.
- Athias-Henriot C. (1969) Notes on the external morphology of the gamasid mites (Anactinotrichous acari). *Acarologia*, 11, 610-627.
- Baker, R. A. (1991) Development and life-history strategies in mussel mites (Hydrachnellae: Unionicolidae). In: The Acari. Reproduction, development and life-history strategies. ed. by Schuster, R. and Murphy, P.W., Chapman and Hall, New York. 65-73 (ch. 5).
- Beetsma, J.; Zonneveld, K. (1992) Observations on the initiation and stimulation of oviposition of the *Varroa* mite. *Exp. Appl. Acarol.*, 16, 303-312.
- Begon, M.; Mortimer, M. (1986) Population ecology. A unified study of animals and plants. Blackwell scientific publications, London, Edinburgh, Boston, Melbourne, Paris, Berlin, Vienna. 220 pp.

- Blaney W.M.; Schoonhoven L.M.; Simmonds M.S.J. (1986) Sensitivity variations in insect chemoreceptors; a review. *Experientia*, **42**, 13-19.
- Boecking O.; Drescher W. (1991) Response of *Apis mellifera* L. colonies infested with *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, **22**, 237-241.
- Boecking, O. (1993) Vergleich der Abwehrmechanismen von *Apis cerana* und *Apis mellifera* gegen die Varroamilbe. *allg. dtsh. Imkerztg.*, **27**, 23-27.
- Boecking, O.; Drescher, W. (1992) The removal response of *Apis mellifera* L. colonies to brood in wax and plastic cells after artificial and natural infestation with *Varroa jacobsoni* Oud. and to freeze-killed brood. *Exp. Appl. Acarol.*, **16**, 321-329.
- Boecking, O.; Ritter, W. (1994) Current status of behavioral tolerance of the honey bee *Apis mellifera* to the mite *Varroa jacobsoni*. *Amer. Bee J.*, **134**, 689-694.
- Boot, W. J.; Beetsma, J.; Calis, J. N. M. (1994) Behaviour of *Varroa* mites invading honey bee brood cells. *Exp. Appl. Acarol.*, **18**, 371-379.
- Boot, W. J.; Calis, J. N. M.; Beetsma, J. (1992) Differential periods of *Varroa* mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Exp. Appl. Acarol.*, **16**, 295-301.
- Boot, W. J.; Calis, J. N. M.; Beetsma, J. (1993) Invasion of *Varroa jacobsoni* into honey bee brood cells: A matter of chance or choice? *J. Apicult. Res.*, **32**, 167-174.
- Bradbear, N. (1988) World distribution of major honeybee diseases and pests. *Bee World*, **69**, 15-39.
- Brouwers, E. V. M.; Ebert, R.; Beetsma, J. (1987) Behavioural and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larval food during caste differentiation in the honeybee. *J. Apicult. Res.*, **26**, 11-23.
- Brown, W. V. (1991) Changes in the cuticular hydrocarbon composition during development of the social wasp, *Vespula germanica* (F.) (Hymenoptera: Vespidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, **99B**, 553-562.
- Burgett M.; Akwatanakul P.; Morse R.A (1983) *Tropilaelaps clareae*: A parasite of honeybees in South-East Asia. *Bee World*, **64**, 25-28.
- Burgett, M.; Akwatanakul, P. (1985) *Tropilaelaps clareae*, a little known honey bee brood mite. *Am. Bee J.*, **125**, 112-114.
- Buskirk, R. E. (1981) Sociality in the Arachnida. In: Social insects, vol. II, ed. by Hermann, H.R., Academic Press; New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco. 281-367 (ch. 4).
- Büchler R.; Drescher W. (1990) Variance and heritability of the capped developmental stage in european *Apis mellifera* L. and its correlation with increased *Varroa jacobsoni* Oud: infestation. *J. Apicult. Res.*, **29**, 172-176.
- Büchler, R. (1990) Genetisch bedingte Unterschiede in der Anfälligkeit von Bienenvölkern (*Apis mellifera* L.) gegenüber der Varroa-Milbe (*Varroa jacobsoni* Oud.) als Grundlage einer Zucht auf erhöhte Widerstandsfähigkeit. PhD thesis Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn, 95pp.

- Büchler, R.; Drescher, W.; Tomier, I. (1992) Grooming behaviour of *Apis cerana*, *Apis mellifera* and *Apis dorsata* and its effect on the parasitic mites *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*. *Exp. Appl. Acarol.*, **16**, 313-319.
- Bühler, A.; Lanzrein, B.; Wille, H. (1983) Influence of temperature and carbon dioxide concentration on juvenile hormone titre and dependent parameters of adult worker honeybees, *Apis mellifera* L. *J. Insect Physiol.*, **29**, 885-893.
- Calis, J. N. M.; Boot, W. J.; Beetsma, J. (1991) Transfer from cell to cell. How long do *Varroa* mite stay on adult bees? In: Proc. of the international symposium on recent research on bee pathology. Gent 1990, Ed. by Ritter W., Laere van O., Jacobs F. and Wael de L. 45-46.
- Camin, J. H. (1953) Observations on the life history and sensory behavior of the Snake Mite, *Ophionyssus natricis* (Gervais) (Acarina: Macronyssidae). *Chicago Acad.Sci.spec.Publs.*, **10**, 1-75.
- Charnov, E. L. (1982) The theory of sex allocation. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Chiesa, F.; Milani, N. (1988) Some preliminary observations on the behaviour of *Varroa jacobsoni* Oud. on its natural host under laboratory conditions. In: European research on varroaosis control. R. Cavalloro (Ed.). Proc. Meeting EC Experts'group in Bad Homburg, 1986. A.A.Balkema, Rotherdam, Brookfield. 113-124.
- Connat J.L.; Ducommun J.; Diehl P.A. (1983) Juvenile hormone-like substances can induce vitellogenesis in the tick *Ornithodoros moubata* (Acarina : Argasidae). *J. Inv. Rep.*, 285-294.
- Crofton, H. D. (1971) A quantitative approach to parasitism. *Parasitology*, **62**, 179-193.
- Cross, E. A.; Bohart, G. E. (1992) The biology of *Imparipes apicola* (Acari: Scutacaridae) and its relationships to the Alkali bee, *Nomia melanderi* (Hymenoptera: Halictidae), and to certain fungi in the bee cell ecosystem. *J. Kansas Entomol. Soc.*, **65**, 157-173.
- Dandeu, J. P.; Lux, M.; Colin, M. E.; Rabillon, J.; David, B. (1991) Etude immuno-chimique de l'hémolymph de l'abeille ouvrière adulte *Apis mellifera* L. saine ou infestée par *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, **22**, 37-42.
- Darchen, R. (1968) Le travail de la cire et la construction dans la ruche. In: Le traité de l'abeille. R. Chauvin (Ed.). Vol. II. Masson & Cie, Paris. 241-331.
- de Jong D. (1988) *Varroa jacobsoni* does reproduce in worker cells of *Apis cerana* in South Korea. *Apidologie*, **19**, 241-244.
- de Jong, D.; Jong de, P. H. (1983) Longevity of africanized honeybees (Hymenoptera : Apidae) infested by *Varroa jacobsoni* (Parasitiformes : Varroidae). *J. Econ. Entomol.*, **76**, 766-768.
- de Jong, D.; Jong, de P. H.; Gonçalves, L. S. (1982b) Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *J. Apicult. Res.*, **21**, 165-167.
- de Jong, D.; Morse, R. A.; Eickwort, G. C. (1982a) Mite pests of honeybees. *Ann. Rev. Entomol.*, **27**, 229-252.
- de Ruijter, A. (1987) Reproduction of *Varroa jacobsoni* during successive brood cycles of the honeybee. *Apidologie*, **18**, 321-326.

- de Ruijter, A.; Pappas, N. (1983) Karyotype and sex determination of *Varroa jacobsoni* Oud. In: R. Cavalloro (Ed.) *Varroa jacobsoni* Oud. affecting honey bees: present status and needs. Proc. Meeting EC Experts' Group/Wageningen, 1983. A.A. Balkema Publishers/Rotterdam. 41-44.
- Delfinado-Baker M.; Aggarwal K. (1987) A new *Varroa* (Acari : Varroidae) from the nest of *Apis cerana* (Apidae). *Int. J. Acarol.*, **13**, 233-237.
- Delfinado-Baker M.; Baker E.W.; Phoon A.C.G. (1989) Mites (Acari) associated with bees (Apidae) in Asia, with description of a new species. *Amer. Bee J.*, **129**, 609-613.
- Delfinado-Baker M.D.; Baker E.W. (1974) Varroidae, a new family of mites on honey bees (Mesostigmata: Acarina). *J. Wash. Acad. Sci.*, **64**, 4-10.
- Delfinado-Baker, M. (1987) Morphology and developmental changes of *Euvarroa sinhai* Delfinado & Baker (Acari : Varroidae) from the honeybee *Apis florea* (Hymenoptera : Apidae). *Int. J. Acarol.*, **13**, 203-208.
- Delfinado-Baker, M. (1984) The nymphal stages and male of *Varroa jacobsoni* Oud. a parasite of honey bees. *Int. J. Acarol.*, **10**, 75- 80.
- Delfinado-Baker, M.; Rath, W.; Boecking, O. (1992) Phoretic bee mites and honeybee grooming behavior. *Int. J. Acarol.*, **18**, 315- 322.
- Donzé G. (1991) Eibildung und Larvenablage bei *Varroa jacobsoni*. *Schweiz. Bienenztg.*, **114**, 447-450.
- Eickwort G.C. (1990) Associations of mites with social insects. *Ann. Rev. Entomol.*, **35**, 469-488.
- Erickson E.H.; Lusby D.A.; Hoffman G.D.; Lusby E.W. (1990) On the size of cells speculations on foundation as a colony management tool. *Gleanings in Bee Culture*, 98-101.
- Fain A. (1969) Adaptation to parasitism in mites. *Acarologia*, **11**, 429-449.
- Fisher, R. A. (1930) The genetical theory of natural selection. Dover, New-York.
- Fluri, P.; Wille, H.; Gerig, L.; Lüscher, M. (1977) Juvenile hormone and the determination of winter bee physiology (*Apis mellifera*). *Proc. 8th Int. Congr. IUSSI, Wageningen*, 28-29.
- Fluri P.; Lüscher M.; Wille H.; Gerig L. (1982) Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenil hormone, protein and vitellogenin in worker honeybees. *J. Insect. Physiol.*, **28**, 61-68.
- Frey, D. F.; Pimental, R. A. Principal components analysis and factor analysis. In: Quantitative ethology. Ed. by P.W. Colgan. John Wiley, New York. 219-245.
- Fries, I.; Camazine, S.; Sneyd, J. (1994) Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: A model and a review. *Bee World*, **75**, 5-28.
- Fuchs, S. (1990) Bevorzugung von Drohnenbrutzellen in Bienenvölkern von *Apis mellifera carnica* durch *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, **21**, 193-200.
- Fuchs, S. (1992) Choice in *Varroa jacobsoni* Oud. between honey bee, drone or workerbrood cells for reproduction. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **31**, 429-435.

- Fuchs, S.; Langenbach, K. (1989) Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood cells and reproduction in *Varroa jacobsoni* OUD. *Apidologie*, **20**, 257-266.
- Fuchs S. (1988) The distribution of *Varroa jacobsoni* on honeybee brood combs and within brood cells as a consequence of fluctuation infestation rates. In: European research on varroaosis control. Proc. of a Meeting of the EC Experts' Group / Bad Homburg. 1986. Ed. by Cavalloro R.
- Fuchs S. (1985) Untersuchung zur quantitativen Abschätzung des Befalls von Bienenvölkern mit *Varroa jacobsoni* Oudemans und zur Verteilung des Parasiten im Bienenvolk. *Apidologie*, **16**, 343-368.
- Furman D.P. (1959) Observations on the biology and morphology of *Haemogamasus ambulans* (Thorell) (Acarina: Haemogamasidae). *J. Parasitol.*, **45**, 274-280.
- Furman, D. P. (1966) Biological studies on *Haemolaelaps centrocarpus* Bertese (Acarina: Laelapidae) with observations on its classification. *J. Med. Entomol.*, **2**, 331-335.
- Gelbe, R.; Madel, G. (1988) Histologische, histochemische und Tracer-Untersuchungen an den Speicheldrüsen von *Varroa jacobsoni* (Oudemans, 1904) und mögliche Schädwirkungen ihrer Sekrete auf das Bienengewebe. *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Entomol.*, **6**, 116-120.
- Gelbe-Swiderek, Ruth (1989) Untersuchungen über Bau, Funktion und Bedeutung der Speicheldrüsen von *Varroa jacobsoni* (Oudemans) unter Einbeziehung möglicher Schädwirkungen des Sekretes beim Wirt *Apis mellifera* L.
- Green, R. F.; Gordh, G.; Hawkins, B. A. (1982) Precise sex ratios in highly inbred parasitic wasps. *Amer. Nat.*, **120**, 653-665.
- Greenberg B.; Carpenter P.D. (1960) Factors in phoretic association of a mite and fly. *Science*, **132**, 738-739.
- Griffiths, D. A. (1988) Functional morphology of the mouthparts of *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae* as a basis for the interpretation of their life-styles. Africanized honey bees and bee mites [ed by Needham, G. R.; Page, R. E., Jr.; Delfinado-Baker, M.; Bowman, C. E.]. Ellis Horwood; Maidenhead, Berkshire. 479-486.
- Grobov O.F. (1977) Varroasis in bees. In: Varroasis a honeybee disease. Apimondia Publishing House, Bukarest. 46-70.
- Guyatt, H. L.; Bundy, D. A. P.; Medley, G. F.; Grenfell, B. T. (1990) The relationship between the frequency distribution of *Ascaris lumbricoides* and the prevalence and intensity of infection in human communities. *Parasitology*, **101**, 139-143.
- Hamilton W.D. (1967) Extraordinary sex ratios. A sex ratio theory for sex linkage and inbreeding has new implications in cytogenetics and entomology. *Science*, **156**, 477-488.
- Haragsim O.; Samsinak K. (1986) Developmental stages of the mite *Varroa jacobsoni* Oud., 1904, (Acari, Dermanyssidae). *Vet. Medicina*, **31**, 105-112.
- Hartl, D. L. (1971) Some aspects of natural selection in arrhenotokous populations. *Amer. Zool.*, **11**, 309-325.
- Hänel H. (1983) Effect of juvenile hormone III on the reproduction of *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, **14**, 137-142.

- Hänel H. (1986) Effect of juvenile hormone (III) from the host *Apis mellifera* (Insecta : Hymenoptera) on the neurosecretion of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* (Acari : Mesostigmata). *Exp. Appl. Acarol.*, 257-271.
- Hänel H.; Koeniger N. (1986) Possible regulation of the reproduction of the honeybee mite *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata : Acari) by a host's hormone juvenile hormone III. *J. Insect Physiol.*, 32, 791-798.
- Heinrich B. (1976) Mechanism of heat exchange between thorax and abdomen in bumblebees. *J. Exp. Biol.*, 64, 561-585.
- Helle, W. (1967) Fertilization in the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*: Acari). *Ent. Exp. & Appl.*, 10, 103-110.
- Herre, E. A. (1989) Coevolution of reproductive characteristics in 12 species of New World figs and their pollinator wasps. *Experientia*, 45, 637-647.
- Herre, E. A. (1987) Optimality, plasticity and selective regime in fig wasp sex ratios. *Nature*, 329, 627-629.
- Herre, E. A. (1985) Sex ratio adjustment in fig wasps. *Science*, 228, 896-898.
- Herrmann, M. Einfluss der Anzahl Begattungen auf die Fertilität der parasitischen Bienenmilbe *Varroa jacobsoni*. Interner Bericht, Forsch. Anst. Milchwirt., Liebefeld-Bern.
- Hevers, J. (1978) Interspezifische Beziehungen zwischen *Unionicola*-Larven (Hydrachnellae, Acari) und *Chironomidae* (Diptera, Insecta). (Teil der Dissertation (Hevers, 1975). *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie, Kiel 1977*, 211-217.
- Hirschmann W. (1980) Erstbeschreibung der Protonymphen, Deutonymphen und des Männchens sowie Wiederbeschreibung des Weibchens von *Varroa jacobsoni* Oudemans 1904. *Acarologia*, 27, 60- 66.
- Hunter P.E.; Rosario R.M.T. (1988) Associations of Mesostigmata with other arthropods. *Ann. Rev. Entomol.*, 33, 393-417.
- Ifantidis M.D. (1983) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honeybee brood cells. *J. Apicult. Res.*, 23, 200- 206.
- Ifantidis M.D. (1984) Parameters of the population dynamics of the *Varroa* mite on honeybees. *J. Apicult. Res.*, 23, 227-233.
- Ifantidis M.D. (1991) Reexamination of reproduction parameters of the mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. In: Proc. of the international symposium on recent research on bee pathology. Gent 1990. Ed. by Ritter W., Laere van O., Jacobs F., and Wael de L. Janssen Farmaceutica, Beerse, Belgium. 20-26.
- Ifantidis M.D.; Rosenkranz P. (1988) Reproduktion der Bienenmilbe *Varroa jacobsoni* (Acarina: Varroidae). *Entomol. Gener.*, 14, 111- 122.
- Ifantidis, M. D. (1988) Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honeybee *Apis mellifera* brood cells. *Apidologie*, 19, 387-396.

- Imdorf, A.; Buehlmann, G.; Gerig, L.; Kilchenmann, V.; Wille, H. (1987) Ueberprüfung der Schätzmethode zur Ermittlung der Brutfläche und der Anzahl Arbeiterinnen in freifliegenden Bienenvölker. *Apidologie*, **18**, 137-146.
- Ives, A. R. (1989) The optimal clutch size of insects when many females oviposit per patch. *Amer. Nat.*, **133**, 671-687.
- Jay, S. C. (1964) The cocoon of the honeybee *Apis mellifera* L. *Can. Entomol.*, **96**, 784-792.
- Jay, S. C. (1963) The longitudinal orientation of larval honeybees *Apis mellifera* in their cells. *Can. J. Zool.*, **41**, 717- 723.
- Jay S.C. (1962a) Colour changes in honeybee pupae. *Bee World*, **43**, 119-122.
- Jay S.C. (1962b) Prepupal and pupal ecdyses of the honeybee. *J. Apicult. Res.*, **14**-18.
- Kevan P.G.; Laverty T.M.; Denmark H.A. (1990) Association of *Varroa jacobsoni* with organisms other than honeybees and implications for its dispersal. *Bee World*, **71**, 119-121.
- Klowden M.J. (1990) The endogenous regulation of mosquito reproductive behavior. *Experientia*, **46**, 660-670.
- Koch W.; Ritter W. (1991) Experimental examinations concerning the problem of deformed emerging bees after infestation with *Varroa jacobsoni*. *J. Vet. Med. B*, **38**, 337-344.
- Koeniger N.; Koeniger G.; Wijayagunasekara H.P. (1981) Beobachtung über die Anpassung von *Varroa jacobsoni* an ihren natürlichen Wirt *Apis cerana* in Sri Lanka. *Apidologie*, **12**, 37-40.
- Koeniger, N. (1970) Factors determining the laying of drone and worker eggs by the queen honeybee. *Bee World*, **51**, 166-169.
- Koeniger, N.; Koeniger, G. (1983) Observations on mites of the asian honeybee species *Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea*. *Apidologie*, **14**, 197-204.
- Koeniger, N.; Koeniger, G.; Guzman, Li de; Lekprayoon, C. (1993) Survival of *Euvarroa sinhai* Delfinado and Baker (Acari, Varroidae) on workers of *Apis mellifera* L. in cages. *Apidologie*, **24**, 403-410.
- Krantz G.W (1978) A manual of acarology. 2nd ed. Oregon State University Book Stores, Inc., Corvallis. 509pp.
- Krantz G.W.; Wenz J.G. (1979) Sperm transfer in *Glyptotholaspis americana*. *Recent Adv. in Acarology*, **11**, 441-446.
- Kraus B. (1990) Effects of honey-bee alarm pheromone compounds on the behaviour of *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, **21**, 127-134.
- Kraus B. (1993) Preferences of *Varroa jacobsoni* for honey bees *Apis mellifera* L. of different ages. *J. Apicult. Res.*, **32**, 57- 64.
- Kraus B.; Koeniger N.; Fuchs S. (1986) Unterscheidung zwischen Bienen verschiedenen Alters durch *Varroa jacobsoni* Oudemans; und Bevorzugung von Ammenbienen im Sommervolk. *Apidologie*, **17**, 257- 266.

- Le Conte Y. (1990) Contribution à l'étude des relations abeille- *Varroa*: approches comportementale, chimique et génétique. Thèse, Université de Paris-Sud, France. 199 pp.
- Le Conte Y.; Arnold G.; Trouiller J.; Masson C.; Chappe B.; Ourisson G. (1989) Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honey- bees by simple aliphatic esters. *Science*, **245**, 638-639.
- Le Conte Y.; Arnold G.; Trouiller J.; Masson C.; Chappe B. (1990) Identification of a brood pheromone in honeybees. *Naturwissenschaften*, **77**, 334-336.
- Le Conte Y.; Arnold G. (1987) Influence de l'âge des abeilles *Apis mellifera* L. et de la chaleur sur le comportement de *Varroa jacobson* Oudemans. *Apidologie*, **18**, 305-320.
- Lee D.C. (1974) *Rhodacaridae* (Acari: Mesostigmata) from near Adelaide, Australia 3. Behaviour and development. *Acarologia*, **16**, 21-44.
- Lekprayoon C.; Tangkanasing P. (1991) *Eugarroa wongsiri*, a new species of bee mite from Thailand. *Int. J. Acarol.*, **17**, 255-258.
- Lindauer M. (1953) Division of labour in the honeybee colony. *Bee World*, **34**, 63-73; 85-90.
- Lindauer M. (1952) Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z. vergl. Physiol.*, **34**, 299-345.
- Liu T.P.; Peng Y.S. (1990) Palpal tarsal sensilla of the female mite *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Varroidae). *Can. Entomol.*, **122**, 295-300.
- Maizels, R. M.; Bundy, A. P.; Selkirk, M. E.; Smith, D. F.; Anderson, R. M. (1993) Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature*, **365**, 797-805.
- Marcangeli, J.; Monetti, L.; Fernandez, N. (1992) Malformations produced by *Varroa jacobsoni* on *Apis mellifera* in the province of Buenos Aires, Argentina. *Apidologie*, **23**, 399-402.
- Mateson, A. (1993) World bee health report. *Bee World*, **74**, 176- 212.
- Maurer, V.; Baumgärtner, J. (1992) Temperature influence on life table statistics of the chicken mite *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Exp. Appl. Acarol.*, **15**, 27-40.
- Michener, Ch D. (1974) The social behavior of the bees. A comparative study. Belknap Press, Harvard University Press, Cambridge. 404pp.
- Milani N. (1988) Physical properties and chemical composition of the haemolymph of *Apis mellifera* : a bibliographical review. *Apicoltura*, 1-76.
- Milani N.; Chiesa F. (1990) Some factors affecting the reproduction of *Varroa jacobsoni* Oud. under laboratory conditions. *Apicoltura*, **6**, 33-42.
- Moosbeckhofer R.; Fabsicz M.; Kohlich A. (1988) Untersuchungen über die Abhängigkeit der Nachkommensrate von *Varroa jacobsoni* (Oudemans) vom Befallsgrad der Bienenvölker. *Apidologie*, **19**, 181- 207.
- Moretto G.; Gonçalves L.S.; de Jong D.; Bichuette M.Z. (1991) The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud. in Brazil. *Apidologie*, **22**, 197-203.

- Morin, C. E.; Otis, G. W. (1993) Observations on the morphology and biology of *Euvarroa wongsirii* (Mesostigmata: Varroidae), a parasite of *Apis andreniformis* (Hymenoptera: Apidae). *Internat. J. Acarol.*, **19**, 167-172.
- Moritz, R. F. A.; Jordan, M. (1992) Selection of resistance against *Varroa jacobsoni* across caste and sex in the honeybee (*Apis mellifera* L., Hymenoptera: Apidae). *Exp. Appl. Acarol.*, **16**, 345-353.
- Mossadegh M.S. (1990) Development of *Euvarroa sinhai* (Acarina : Mesostigmata), a parasitic mite of *Apis florea*, on *Apis mellifera* worker brood. *Exp. Appl. Acarol.*, 73-78.
- Nannelli R. (1986) Caratteri morfologici essenziali per una rapida identificazione dei diversi stadi di *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Apicoltura*, **2**, 95-119.
- Nation, J. L.; Sanford, M. T.; Milne, K. (1992) Cuticular hydrocarbons from *Varroa jacobsoni*. *Exp. Appl. Acarol.*, **16**, 331- 344.
- Nguyen Quang Tan (1992) Development time of eggs, open brood and capped brood of *Apis cerana* and *A. mellifera* in south Vietnam. *Proc. Int. Symp. on Asian honey bees and bee mites, Bangkok, 12/ 10/91*, 131-132.
- Noldus L.P.J.J. (1991) The observer: A software system for collection and analysis of observational data. *Behavior Research Methods, Instruments & Computers*, **23**, 415-429.
- Nuzzaci, G.; Lillo de, E.; Porcelli, F. (1992) Functional morphology of mouthpart sensilla in females of *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acar: Varroidae). *Entomologica*, **27**, 41-67.
- OConnor B.M. (1982) Evolutionary ecology of astigmatid mites. *Ann. Rev. Entomol.*, **27**, 385-409.
- Oliver, J. H. Jr.; Pound, J. M.; Severino, E. (1985) Evidence of Juvenile hormone like compound in the reproduction of *Dermanyssus gallinae* (Acar : Dermanyssidae). *J. Med. Entomol.*, **22**, 281-286.
- Otten C. (1991) Vergleichende Untersuchungen zum Populationswachstum von *Varroa jacobsoni* Oud. in Völker von *Apis mellifera* L. unterschiedlicher geographischer Herkunft. PhD. Thesis, Univ. Frankfurt am Main. 203pp.
- Parker, G. A.; Begon, M. (1986) Optimal egg size and clutch size: effects of environment and maternal phenotype. *Amer. Nat.*, **128**, 573-592.
- Parker, G. A.; Courtney, S. P. (1984) Models of clutch size in insect oviposition. *Theor. Pop. Biol.*, **26**, 27-48.
- Peng Y-S.; Fang Y.; Xu Sh.; Ge L. (1987a) The resistance mechanism of the asian honeybee *Apis cerana* Fabr. to an ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *J. Invert. Pathol.*, **49**, 54-60.
- Peng Y-S.; Fang Y.; Xu Sh.; Ge L.; Medhat; Nasr E. (1987b) Response of forster asian honeybee *Apis cerana* colonies to the brood of european honeybee *Apis mellifera* infested with parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *J. Invert. Pathol.*, **49**, 259-264.
- Pound M.J.; Oliver J.H. Jr. (1979) Juvenile hormone : Evidence of its role in the reproduction of ticks. *Science*, **206**, 355-357.
- Rademacher, E. (1990) Die Varroatose der Bienen. Schelzky & Jeep, Berlin.

- Radovsky F.J. (1969) Adaptive radiation in the parasitic mesostigmata. *Acarologia*, **XI**, 450-483.
- Radovsky F.J. (1960) Biological studies on *Haemogamasus liponyssoides* Ewing (Acarina: Haemogamasidae). *J. Parasitol.*, **46**, 410-417.
- Radovsky F.J. (1985) Evolution of mammalian mesostigmatid mites. In: Coevolution of parasitic arthropods and mammals. Ed. by Ke Chung Kim. John Wiley + Sons, New York. 800pp. 441-504.
- Radwan J. (1991) Sperm competition in the mite *Caloglyphus berlesei*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **29**, 291-296.
- Raina, A. K.; Kingan, T. G.; Mattoo, A. K. (1992) Chemical signals from host plant and sexual behavior in a moth. *Science*, **255**, 592-594.
- Ramirez, B. W. (1987) Biological analogies between some fig- wasps (Hymenoptera : Agaonidae and Torymidae : Sycophaginae) and *Varroa jacobsoni* (Acari : Varroidae). *Rev. Biol. Trop.*, **35**, 209- 214.
- Ramirez, W. B.; Malavasi, J. G. (1991) Conformation of the ambulacrum of *Varroa jacobsoni* Oudemans (Mesostigmata: Varroidae): a grasping structure. *Int. J. Acarol.*, **17**, 169-173.
- Randolph, S. E. (1975) Patterns of distribution of the tick *Ixodes trianguliceps* Birula on its hosts. *J. Anim. Ecol.*, **44**, 451-474.
- Rapp, A. (1959) Zur Biologie und Ethologie der Käfermilbe *Parasitus coleoptratorum* L. 1758 (Ein Beitrag zum Phoresie- Problem). *Zool. Jb. Syst.*, **86**, 303-366.
- Rath, W. (1992) Der Schlüssel für *Varroa*: Die *Apis cerana*-Drohnen und ihr Zelldeckel. *Allg. Dtsch. Imkerztg.*, **26**, 12-14.
- Rath W. (1991a) Investigations on the parasitic mites *Varroa jacobsoni* Oud. and *Tropilaelaps clareae* Delfinado & Baker and their hosts *Apis cerana* Fabr., *A. dorsata* Fabr. and *A. mellifera* L.. PhD Thesis, University of Bonn. 148pp.
- Rath W. (1991b) Laboratory culture of the mites *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*. *Exp. Appl. Acarol.*, **10**, 289-293.
- Rath W.; Drescher W. (1990) Response of *Apis cerana* Fabr. towards brood infested with *Varroa jacobsoni* (Oudemans) and infestation rate of colonies in Thailand. *Apidologie*, **21**, 311-321.
- Rehm S.M. (1988) Fortpflanzung und Populationsdynamik von *Varroa jacobsoni* Oud. in der Arbeiterinnenbrut von *Apis mellifera carnica*, *Apis mellifera ligustica* und *Apis mellifera*-Hybriden. Diplomarbeit. 95pp.
- Rehm S.M.; Ritter W. (1989) Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for the calculation of the developmental period. *Apidologie*, **20**, 339- 343.
- Rickli M.; Diehl P.A.; Guerin P.M. (1994) Cuticle alkanes of honeybee larvae mediate arrestment of bee parasite *Varroa jacobsoni*. *J. Chem. Ecol.*, **20**, 2437-2453.
- Rickli M.; Guerin P.M.; Diehl P.A. (1992) Palmitic acid released from honeybee worker larvae attracts the parasitic mite *Varroa jacobsoni* on a servosphere. *Naturwissenschaften*, **79**, 320-322.

- Rickli, M. (1994) Chemostimuli involved in host finding and recognition in *Varroa jacobsoni* Oud., a honeybee parasite. PhD Thesis, Université de Neuchâtel. 86pp.
- Ritter W. (1990) Entwicklung einer Varroatoleranz in Bienenvölkern in Tunesien. *Allg. Dtsch. Imkerztg.*, 6-10.
- Ritter W.; Michel P.; Schwendemann A.; Bartoldi M. (1990) Development of infestation with *Varroa jacobsoni* in bee colonies in Tunisia. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 103, 109-111.
- Ritter, W.; de Jong, D. (1984) Reproduction of *Varroa jacobsoni* Oudemans, in Europe, the middle East and tropical south America. *Z. angew. Entomol.*, 98, 55-57.
- Robaux P. (1986) *Varroa* et Varroatose. ed. Opida. 238 pages.
- Robinson G.E. (1992) Regulation of division of labor in insects societies. *Ann. Rev. Entomol.*, 37, 837-?
- Robinson G.E.; Ratnieks F.L.W. (1987) Introduction of premature honeybee (Hymenoptera : Apidae) flight by juvenile hormone analogs administered orally or topically. *J. Econ. Entomol.*, 80, 784-787.
- Rosenkranz P. (1990) Wirtsfaktoren in der Steuerung der Reproduktion der parasitischen Bienenmilbe *Varroa jacobsoni* in Völker von *Apis mellifera*. PhD Thesis, Univ. Tübingen. 147pp.
- Rosenkranz P.; Rachinsky A.; Strambi A.; Strambi C. (1990) Juvenile hormone titer in capped worker brood of *Apis mellifera* and reproduction in the bee mite *Varroa jacobsoni*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 78, 189-193.
- Rosenkranz P.; Tewarson N.C.; Singh A.; Engels W. (1993b) Differential hygienic behavior towards *Varroa jacobsoni* in capped worker brood of *Apis cerana* depends on alien scent adhering to the mites. *J. Apicult. Res.*, 32, 89-93.
- Rosenkranz, P.; Tewarson, N. C.; Rachinsky, A.; Strambi, A.; Strambi, C.; Engels, W. (1993a) Juvenile hormone titer and reproduction of *Varroa jacobsoni* in capped brood stages of *Apis cerana indica* in comparison to *Apis mellifera ligustica*. *Apidologie*, 24, 375-382.
- Ruttner, F.; Marx, H.; Marx, G. (1984) Beobachtungen über eine mögliche Anpassung von *Varroa jacobsoni* an *Apis mellifera* L. in Uruguay. *Apidologie*, 15, 43-62.
- Saitô, Y. (1986) Biparental defence in a spider mite (Acari: Tetranychidae) infesting *Sasa bamboo*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 18, 377-386.
- Saitô, Y. (1986) Prey kills predator: counter-attack success of a spider mite against its specific phytoseiid predator. *Exp. Appl. Acarol.*, 2, 47-62.
- Saitô Y. (1983) The concept of "life types" in Tetranychinae. An attempt to classify the spinning behaviour of Tetranychinae. *Acarologia*, 24, 377-391.
- Schad, G. A.; Anderson, R. M. (1985) Predisposition to hookworm infection in humans. *Science*, 228, 1537-1540.
- Schatton-Gadelmayer K.; Engels W. (1988) Hämolympheproteine und Körpergewicht frischgeschlüpfter Bienen-Arbeiterinnen nach unterschiedlich starker Parasitierung durch

- Brutmilben (Hymenoptera: Apidae: *Apis mellifera* / Acarina: Varroidae: *Varroa jacobsoni*). *Entomol. Gener.*, **14**, 93-102.
- Scherrer, B. (1984) Biostatistique. Gaëtan Morin; Chicoutimi, Québec, Canada. 850pp.
- Schneider, P.; Drescher, W. (1988) Die Folgen eines unterschiedlich hohen *Varroa*-Befalls während der Puppenentwicklung auf die erwachsene Biene. *Allg. Dtsch. Imkerztg.*, **22**, 16-18 / 54-56 / 87-91.
- Schneider, P.; Drescher, W. (1987) Einfluss der Parasitierung durch die Milbe *Varroa jacobsoni* auf das Schlupfgewicht, die Gewichtsentwicklung, die Entwicklung der Hypopharynxdrüsen und die Lebensdauer von *Apis mellifera*. *Apidologie*, **18**, 101-109.
- Schulz A.E. (1984) Reproduktion und Populationsentwicklung der parasitischen Milbe *Varroa jacobsoni* Oudemans in Abhängigkeit vom Brutzyklus ihres Wirtes *Apis mellifera* L. *Apidologie*, **15**, 401- 420.
- Scott, M. P.; Traniello, J. F. A. (1987) Behavioural cues trigger ovarian development in the burying beetle, *Nicrophorus tomentosus*. *J. Insect Physiol.*, **33**, 693-696.
- Seeley T.D. (1982) Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **11**, 287- 293.
- Skaife, S. H. (1952) The yellow-banded carpenter bee, *Mesotrichia caffra* L., and its symbiotic mite, *Dinogamasus braunsi* Vitzthum. *J. ent. Soc. S. Africa*, **15**, 63-76.
- Sláma, K. (1976) Insect haemolymph pressure and its determination. *Acta Entomol. Bohemoslov.*, **73**, 65-75.
- Sláma, K.; Baudry-Partiaoglou, N.; Provansal-Baudez, A. (1979) Control of extracardiac haemolymph pressure pulses in *Tenebrio molitor*. *J. Insect Physiol.*, **25**, 825-831.
- Snodgrass R.E. (1956) Anatomy of the honey bee. Comstock Publishing Associates, Ithaca, New-York. 334pp.
- Steiner J. (1992b) Die Entwicklung einer *Varroa*-Milbe. *Schweiz. Bienenztg.*, **115**, 591-597.
- Steiner J. (1988) Sex discrimination based on external structures in nymphal and adult *Varroa jacobsoni* mites (Acarina: Varroidae). *Entomol. Gener.*, **14**, 133-138.
- Steiner J. (1993) Verteilung von *Varroa jacobsoni* im drohnenfreien Bienenvolk *Apis mellifera carnica*. *Apidologie*, **24**, 45-50.
- Steiner J.; Pompolo S. das Garças; Takahashi C.S.; Goncalves L.S. (1982) Cytogenetics of the acarid *Varroa jacobsoni*. *Rev. Brasil. Genet.*, **4**, 841-844.
- Steiner, J. (1992c) Quantitative Beziehungen zwischen Parasitierungsgrad und individueller Wirtsschädigung bei der Varroatose der westlichen Honigbiene (*Varroa jacobsoni* auf *Apis mellifera*). 13. Tagung der deutschsprachigen IUSSI-Sektion in Blaubeeren.
- Steiner, J. (1992a) Reproduktion der ektoparasitischen Bienenmilbe *Varroa jacobsoni* in Völkern von *Apis mellifera carnica*. PhD thesis Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 89pp.

- Steiner, J.; Dittman, F.; Rosenkranz, P.; Engels, W. (1994) The first gonocycle of the parasitic mite (*Varroa jacobsoni*) in relation to preimaginal development of its host, the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *Invert. Reprod. Dev.*, **25**, 175-183.
- Strick, H.; Madel, G. (1988) Schadeffekte der hämatophagen Bienenmilbe *Varroa jacobsoni* Oud. *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Entomol.*, **6**, 121-124.
- Tewarson N.C.; Singh A.; Engels W. (1992) Reproduction of *Varroa jacobsoni* in colonies of *Apis cerana indica* under natural and experimental conditions. *Apidologie*, **23**, 161-171.
- Thind B.B.; Edwards J.P. (1990) Stimulation of egg production in the grain mite *Acarus siro* by the juvenile hormone analogue fenoxycarb. *Exp. Appl. Acarol.*, **9**, 1-10.
- Treat, A. E. (1975) Mites of moths and butterflies. Cornell Univ. Press, Ithaca, London 362pp.
- Treat, A. E. (1958) Social organization in the moth ear mite *Dichrocheilus (Myrmonyssus) phalaenodectes*. Proc. 10th Intern. Congress Entomol., Montreal, 1956. Vol.2, 475-480.
- Trouiller J.; Arnold G.; Le Conte Y.; Masson C. (1991) Temporal pheromonal and kairomonal secretion in the brood of honeybees. *Naturwissenschaften*, **78**, 368-370.
- Trouiller, J.; Arnold, G.; Chappe, B.; Le Conte, Y.; Billon, A.; Masson, C. (1994) The kairomonal esters attractive to the *Varroa jacobsoni* mite in the queen brood. *Apidologie*, **25**, 314-321.
- Trouiller, J.; Arnold, G.; Chappe, B.; Le Conte, Y.; Masson, C. (1992) Semiochemical basis of infestation of honey bee brood by *Varroa jacobsoni*. *J. Chem. Ecol.*, **18**, 2041-2053.
- Tukey, J. W. (1977) Exploratory data analysis. Addison-Wesley, Reading, Mass.
- Waage, J. K. (1982) Sib-mating and sex ratio strategies in scelionid wasps. *Ecolog. Entomol.*, **7**, 103-112.
- Walter, D. E.; Lindquist, E. E. (1989) Life history and behavior of mites in the genus *Lasioseius* (Acari: Mesostigmata: Ascidae) from grassland soils in Colorado, with taxonomic notes and description of a new species. *Can. J. Zool.*, **67**, 2797-2813.
- Wedell, N. (1992) Protandry and mate assessment in the wartbiter *Decticus verrucivorus* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **31**, 301-308.
- Weinberg, K. P.; Madel, G. (1985) The influence of the mite *Varroa jacobsoni* Oudemans on the protein concentration and the haemolymph volume of the brood of worker bees and drones of the honeybee *Apis mellifera* L. *Apidologie*, **16**, 421-436.
- Wienands A.; Madel G. (1988) Hämozyten der Honigbiene, *Apis mellifera*, und ihre Veränderungen durch Varroatose. (Hymenoptera: Apidae). *Entomol. Gener.*, **14**, 81-92.
- Wilkinson L. (1990) Sygraph: The system for graphics. Systat Inc, Evanston.
- Wongsiri S.; Tongkanasing P.; Sylvester H.A. (1987) Mites pests and beekeeping with *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Thailand. *Amer. bee J.*, **127**, 500-509.
- Woolley, T. A. (1988) Acarology. Mites and human welfare. John Wiley, New-York. 484pp.

-
- Wrench, D. L.; Ebbert, M. A. (Eds). (1993) Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites. Chapman & Hall, New- York, London.
- Yastrebtsov, A. (1992) Embryonic development of gamasid mites (Parasitiformes: Gamasida). *Int. J. Acarol.*, **18**, 121-141.
- Yasui, Y. (1988) Sperm competition of *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli) (Acarina: Mesostigmata: Macrochelidae), with special reference to to precopulatory mate guarding behavior. *J. Ethol.*, **6**, 83-90.
- Young, J. H. (1968) The morphology of *Haemogamasus ambulans* II. Reproductive system (Acarina: Haemogamasidae). *J. Kansas Entomol. Soc.*, **41**, 532-543.

VI Remerciements

Ce travail a été réalisé à la Section apicole de la Station fédérale de Recherches Laitières. J'ai ainsi profité des connaissances de cet institut ainsi que celles de l'Institut de Zoologie de l'Université de Neuchâtel.

C'est avec grand plaisir que je remercie toutes les personnes qui m'ont accompagné lors de ce travail et qui par leur soutien ont fourni une bonne part de l'énergie qui a permis sa réalisation. Toute ma vive gratitude se dirige vers:

-Boris Bachofen, apiculteur de coeur et incomparable finisseur de figures.

-Peter Alan Diehl, qui en moins d'un après-midi s'est engagé à donner le soutien académique à ce travail et qui n'a jamais défailli à sa décision.

-Peter Fluri, un des initiateurs de ce travail qui m'a été offert à Liebefeld et qui a toujours été confiant. Plusieurs fois par année, il s'est battu contre administration et budgets.

-Patrick Guerin qui s'est passionné pour *Varroa* et qui a donné un souffle enthousiasmé et académique aux résultats récoltés. Sa grande générosité a été une condition *sine qua non* pour qu'il ne reste pas emprisonné dans les noeuds de mon anglais.

-Toni Imdorf qui m'a initié à l'apiculture et qui tout au long de ce travail m'a soutenu par sa motivation et sa grande sagesse.

-Andreas Messerli qui s'est confronté à l'anglais scientifique, compact et abrégé.

-Jacqueline Moret qui a trouvé les astuces pour tester ceci, pour simuler cela (non pas pour masquer, pour modéliser).

-Matthias Rickli avec qui nous avons si souvent échangé nos idées et qui m'a par la suite généreusement initié à la chimie écologique de *Varroa*.

-Les collaborateurs fixes ou de courte durée de la section apicole, Stefan Bogdanov, Georges Bühlmann, Jean-Daniel Charrière, Jacqueline Grosjean, Luzio Gerig, Miriam Herrmann, Verena Kilchenmann, Charles Maquelin, Magdalena Reist, Hansjörg Rüegg, Anna Tschan et Christian Wyttenbach.

Messieurs Johann Baumgärtner et Heinz Richner qui ont accepté d'être les experts de cette thèse.

-Tous les collaborateurs de la FAM qui, à un moment ou un autre, m'ont apporté leur aide. En particulier : M. Chr Steffen, M. A. Röösl, M. B. Graber, M. P. Knecht, M. J. Hättenschwiler, M. J.O. Bosset, M. M. Rüegg, M. E. Baumann, M. M. Collomb, M^{me} M. Fawer, M. P. Günter, M. G. Müller, M. Pichna, M^{me} M. Spahni, les personnes du service technique, et tant d'autres...

-Messieurs les apiculteurs qui m'ont prêté leurs ruchers pour mes premières expériences, M. Grunder, M. Möri, M. Ruchti et M. Schlatter.

Toutes les personnes ci-dessus m'ont aidé sur mon lieu de travail.

J'aimerais également remercier chaleureusement mes parents, Eliane et Laurent ainsi que mes frères et soeurs et leurs conjoints, Claire, Estelle, Gelso, Janine, Marie-Claire, Michel, Pierre, Samuel, Sylvie, Yann qui pour m'encourager m'ont demandé 527 fois

"Alors t'as bientôt fini ?".

Les années de travail qu'ont nécessité cette thèse ont été financées par la Station Fédérale de Recherches Laitières, les Sociétés Suisses d'Apiculture et l'Office Vétérinaire Fédéral. Que les personnes responsables de ces organisations soient vivement remerciées.

VII Summary

1. *Varroa jacobsoni* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasite of the Asian honeybee *Apis cerana*, has been introduced world-wide, and is currently decimating colonies of the European honeybee *Apis mellifera*. *Varroa*'s reproductive cycle is tuned to that of drone brood cells, those mainly parasitized in the original host. However, the parasite can also exploit the smaller worker cells.

2. A new and simple technique with transparent polystyrol cells was developed which allows observations in the capped brood. Artificial transparent worker and drone brood cells infested naturally in beehives were observed round the clock thanks to video recording under standardised conditions in an incubator. At first sight the brood cell would appear to provide an ideal environment but the time and space available are limited by the short duration of bee development, the changes occasioned by cocoon spinning, and pupal metamorphosis. I established how *Varroa* succeeds in parasitizing the developing bee and describe how *Varroa* females structures the living space for its developing family, and compare this organisation with that of other mites species. Soon after the beginning of the bee's prepupal stage, the female forms a fecal accumulation (FA) on the posterior part of the cell wall near the prepupal anus. The tracks made by *Varroa* on the cell wall prior to defecation is studied and with time she shows a typical pivoting behaviour which evidently permits the concentration of the feces on one spot. The FA serves as a rendezvous site for all *Varroa* life stages which arrest on it between their feeding bouts. Finally adult offspring mate on the FA.

3. Shortly after the moult of the prepupa into pupa, the *Varroa* foundress will invest a long time in preparing a single feeding site, preferentially situated on the ventral side of the fifth segment. In most cells a single feeding site is used at the same time by all individuals of one or several families. The investment by the *Varroa* foundresses in establishing the feeding site is critical for her descendants since no protonymphs survive on pupae without a prepared feeding site. Since the behaviour of the mothers not only serves herself, but also her offspring, we conclude that *Varroa* exercises parental care. Furthermore, the sharing of

common structures such as the feeding site by individuals of several families to permit the highest number of descendants to develop, presents aspects of parasociality.

4. The time-activity budget of all developmental stages was also studied. At the outset of the protonymphal stage a behavioural rhythm is acquired and is reinforced thereafter. Once fed, the mite leaves the feeding site and soon returns to the cell wall where it arrests on the FA and usually defecates. When hungry, the mite descends onto the bee and searches for the feeding site. The same path is usually used and the duration of the successive journeys grows shorter. This is true for both the foundress and her descendants which optimize their search efficacy and thus become less sensitive to the effects of competition.

A multifactorial analysis of the behavioural activity of foundresses during the course of the reproduction cycle, and of the offspring during their development, shows a convergence towards the above mentioned behavioural equilibrium. Its principal components are resting on the cell wall, i.e., mostly on or near the FA; and feeding on the pupa. These results lead to the conclusion that *Varroa* compartmentalises its behaviour for the best use the small free space available in the capped brood cell. The main advantages are the avoidance of fouling the food source, the avoidance of crowding of individuals at the feeding site, the easy encounter of mates on the FA and the possibility for individuals to find zones away from the centre of activity for moulting.

5. Nevertheless, use of a single feeding site leads to competition for food when the number of mites increases in the cell. The observations show that the youngest mites are more disadvantaged to compete for the feeding site since they have to wait longer to occupy it, and moreover, they are more often pushed off by bigger stages during their feeding bouts. The data on the feeding pattern of each *Varroa* life stage were used to simulate the occupancy of the single feeding site. The occupancy of the feeding site was cyclic in the observed as well as in the simulations due to the regular reappearance of mobile instars in the cells. In single infested cells the simulations only rarely showed an overoccupancy of the feeding site but with two families per cell the median of the occupancy simulations is situated just under the maximum time available, indicating competition in some

of these cells. This give one explanation for the reduced number of maturing daughters observed in the multiinfested cells compared to single infested ones.

6. Despite this disadvantage, multiinfested cells occur regularly. The frequency distributions of infesting mites per cell are not random in drone cells, but are overdispersed, and approximate with negative binomial distributions. This might suggest that some advantages for the parasite accrue from multiinfestations of cells. Data from natural cells demonstrate that males are scarce in single infested cells but higher in occurrence in multiinfested cells. This increases the proportion of daughters which can be fertilised.

7. Mating of *Varroa* daughters occurs just after ecdysis, as soon as they arrive on the faecal accumulation where the males also are arrested. Such females are remated as long as no other freshly moulted daughter arrives on the faecal accumulation. Dissections showed that the number of spermatozoa stocked in the spermatheca increases with rematings. This provides a strong indication for sperm mixing in this species when brood cells contain more than one *Varroa* foundresses. This allowing outbreeding. The production of mated daughters per mother reaches an optimum in cells infested by two foundresses.

8. I postulate from the above that the observed non-random infestation by *Varroa* of drone brood provides a partial refuge for the host and augments the mite's mean reproductive success through the production of a higher number of mated daughters than the corresponding Poisson distributions would.

VIII Résumé

1. *Varroa jacobsoni* (Acari: mesostigmata) est un ectoparasite de l'abeille mellifère d'Asie *Apis cerana*. Sévissant à l'échelon international, il décime actuellement les colonies d'Europe de l'abeille mellifère *Apis mellifera*. *Varroa* se reproduit principalement dans le couvain de faux bourdons, en particulier chez l'espèce *Apis cerana*; il peut toutefois aussi parasiter le couvain d'ouvrières.

2. Nouvellement mise au point, une méthode utilisant des cellules en polystyrène transparent permet des observations à l'intérieur même du couvain operculé. Des cellules artificielles d'ouvrières et de faux bourdons, infestées naturellement dans des ruches ont été maintenues dans des conditions standardisées en incubateur et observées 24/ 24 heures sur vidéo. A première vue, les cellules de couvain représentent un environnement idéal pour *Varroa*, mais le temps et l'espace disponibles se révèlent limités en raison de la rapidité du développement de l'abeille, des changements dus au tissage du cocon et des métamorphoses subies par la pupe. Grâce à cette étude, il a été possible d'établir comment *Varroa* parasite l'abeille en développement, de décrire la façon dont la femelle *Varroa* structure l'espace en vue d'accueillir sa descendance et de comparer cette organisation avec celle d'autres d'acariens.

Peu après le début de la phase prépupale de l'abeille, la femelle *Varroa* accumule ses fèces sur la paroi de la cellule, près de l'anus de la prépupe. Les trajets effectués par *Varroa* sur la paroi cellulaire avant la défécation ont fait l'objet d'une étude et révèlent une évolution des trajets vers un comportement typique - l'acarien tourne sur lui-même comme autour d'un pivot - qui, selon toute évidence, permet la concentration des fèces en un endroit unique. Ce tas de fèces sert de lieu de rendez-vous pour les *Varroa* de tout âge où ils séjournent entre les repas d'hémolymphe; pour les descendants adultes, il est aussi le lieu des accouplements.

3. Peu après la métamorphose de la prépupe en pupe, la *Varroa* fondatrice prépare un site unique de prélèvement d'hémolymphe, de préférence situé sur la partie ventrale, à la hauteur du 5ème segment de la pupe. Dans la plupart des

alvéoles, un lieu unique de nutrition est utilisé simultanément par tous les individus d'une ou de plusieurs familles. La préparation du site de nutrition par la varroa fondatrice est vitale pour sa descendance: aucune protonympe ne survit sur la pupe sans un site "aménagé". Le comportement des mères n'étant pas à leur seul bénéfice, nous pouvons en conclure que *Varroa* exerce un comportement parental. Par ailleurs, la mise en commun de structures, telle que le site unique de prélèvement d'hémolymph, à l'usage d'individus issus de plusieurs familles, en vue d'assurer la survie du plus grand nombre de descendants, met en évidence le caractère parasocial du comportement de *Varroa*.

4. L'emploi du temps à tous les stades de développement de *Varroa* a aussi fait l'objet d'une étude. Au début du stade protonymphal, *Varroa* acquiert un schéma comportemental qui se consolide au cours de sa croissance. Une fois repus, l'acarien quitte le site de nutrition et retourne sur la paroi cellulaire où il séjourne sur le tas de fèces après y avoir déféqué. S'il est affamé, l'acarien descend sur l'abeille et cherche le trou de prélèvement d'hémolymph. Il effectue généralement le même parcours, diminuant successivement la durée nécessaire à la recherche du lieu de nutrition. Cette diminution de temps est observée tant dans le cas de la mère que de ses descendants, qui accroissent l'efficacité de leurs recherches, car plus celles-ci sont brèves, moins ils ont à souffrir des effets de la concurrence.

L'analyse multi-factorielle des comportements de la mère au cours de son cycle de reproduction et des descendants au cours de leur développement met en évidence une convergence vers l'équilibre comportemental mentionné ci-dessus. Les principaux composants de cet équilibre sont: les séjours répétés sur la paroi cellulaire, en particulier sur ou à proximité du tas de fèces, et le prélèvement d'hémolymph sur la puce. Ces observations permettent de conclure que *Varroa* adapte son comportement au peu d'espace à disposition dans la cellule de couvain operculée afin d'en user le plus rentablement possible. Par un comportement de ce type, *Varroa* évite de souiller sa source de nourriture, empêche l'attroupement sur le site de nutrition, facilite les rencontres entre mâles et femelles sur le tas de fèces et, partant, les accouplements. Par ailleurs, l'activité des *Varroas* étant concentrée entre le tas de fèces et le lieu de nutrition,

les acariens en croissance ont à leur disposition, en d'autres lieux de l'alvéole, des plages de tranquillité où ils peuvent muer paisiblement.

5. Néanmoins, l'utilisation d'un site unique de prélèvement d'hémolymphe conduit à une concurrence vive en cas d'accroissement du nombre d'acariens dans la cellule. Selon mes observations, cette compétition est le plus souvent au désavantage des acariens les plus jeunes: ils doivent d'une part patienter plus longtemps pour accéder au trou de succion et, d'autre part, ils sont très fréquemment chassés du site par leurs aînés. Les données sur le comportement de nutrition à chaque phase de la vie de *Varroa* ont servi à simuler l'occupation du site de prélèvement. Tant dans les observations que lors des simulations, le taux d'occupation varie en fonction du nombre d'individus en phase de nutrition. Dans les cellules uni-infestées, les simulations n'ont que rarement pour résultat une sur-occupation du site. Mais lorsque deux familles cohabitent dans une cellule, la valeur médiane des simulations d'occupation d'un site unique se situe juste en dessous du temps maximum disponible, ce qui indique que dans la quasi-moitié des simulations, tous les individus n'ont pas accès à la source de nourriture. Voilà qui pourrait expliquer le nombre réduit de filles matures relevé dans les cellules multi-infestées, en comparaison des cellules uni-infestées.

6. En dépit de ce désavantage, on trouve fréquemment des cellules infestées par plusieurs familles. La répartition des acariens dans le couvain de faux bourdons n'est pas le fruit du hasard: pour des raisons encore inconnues, *Varroa* est enclin à la cohabitation, ce qui laisse supposer que la multi-infestation présente certains avantages. D'après les données relevées dans des cellules naturellement infestées, la présence de mâles adultes est faible dans les cellules uni-infestées, mais au contraire plus fréquente dans les cellules multi-infestées, accroissant la proportion de *Varroas* filles fertilisées.

7. Les *Varroas* filles s'accouplent juste après l'ecdysis, soit dès leur arrivée sur le tas de fèces où les mâles demeurent. Ces femelles s'accouplent aussi longtemps qu'aucune autre fille fraîchement éclos ne vient séjourner sur le tas de fèces. Les dissections ont montré que le nombre de spermatozoïdes stockés dans la spermathèque augmente en fonction du nombre d'accouplements. Aussi la spermathèque d'une femelle *Varroa* pourrait-elle contenir le sperme de plusieurs

mâles, si l'alvéole comporte plus d'une *Varroa* mère. A noter que le mélange de spermes diminue la consanguinité. Par conséquent, la production de filles accouplées par mère atteint un optimum dans les cellules infestées par deux fondatrices.

8. En conclusion, l'infestation, non aléatoire, du couvain de mâles, garantit - plus que ne le ferait une infestation au hasard (distribution de Poisson) - la survie de l'hôte, (moins de cellules sont infestées), tout en augmentant le succès de reproduction de l'acarien en raison de la production d'un nombre plus élevé de filles susceptibles d'être fertilisées.