



NOTA

Prevalence of *Varroa destructor* and first report of *Nosema* sp. in *Apis mellifera* drone congregation areas

Prevalencia de *Varroa destructor* y primer reporte de *Nosema* sp. en áreas de congregación de zánganos de *Apis mellifera*

Escalante K.^{1,3,5*}; Quintana M.G.^{2,3}; Scannapieco A.^{3,4}; Geria M.¹; Galindo-Cardona, A.^{3,5}

¹ Facultad de Ciencias Naturales e IML, UNT.

² Instituto Nacional de Medicina Tropical (Sede Tucumán), ANLIS, Malbran, MSN / CONICET Instituto Superior de Entomología, FCN e IML, UNT.

³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET.

⁴ Instituto de Genética "E. A. Favret", Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) – Grupo vinculado al Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO-CONICET), Buenos Aires, Argentina.

⁵ Instituto de Ecología Regional, IER, UNT.

* Autor de correspondencia: <karen.kmde@gmail.com>

ABSTRACT

Varroosis and nosemosis are diseases that affect honey bees (*Apis mellifera*) and therefore have a great impact on beekeeping worldwide. These parasites can be dispersed by drones and, in the case of *Varroa destructor* (etiological agent of varroosis), its presence has been reported in areas of natural fertilization of *A. mellifera*, known as Drone Congregation Areas (DCA). Previously, several DCAs were identified in Argentina and progress was made in their topographic and genetic characterization, and sanitary studies were also initiated. In this study, three DCA and one apiary located in the province of Tucumán were monitored for four years, and the presence of *V. destructor* and *Nosema* sp. was evaluated. The results indicated the presence of *V. destructor* in the drone samples of the DCA throughout the study. Although a trend of decreasing parasitization over time was observed, no statistically significant differences were found between years or among the considered DCAs. The presence of *Nosema* sp. was detected for the first time in the DCA, with samples exhibiting high spore load. The results support the role of drones in the dynamics and disper-

► Ref. bibliográfica: Escalante, K.; Quintana, M. G.; Scannapieco, A.; Geria, M.; Galindo-Cardona, A. 2023. "Prevalence of *Varroa destructor* and first report of *Nosema* sp. in *Apis mellifera* drone congregation areas". *Acta zoológica lilloana* 67 (2): 369-377. DOI: <https://doi.org/10.30550/j.azl/1821>

► Recibido: 7 de julio 2023 – Aceptado: 24 de agosto 2023.

► URL de la revista: <http://actazoolologica.lillo.org.ar>



► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

sal of diseases and allow us to conclude that the analysis of DCAs represents a key tool for monitoring the health of bee populations, complementary to the analyses carried out in apiaries.

Keywords — Varroosis, nosemosis, monitoring, bee health, Argentina.

RESUMEN

La varroosis y la nosemosis son enfermedades que afectan a las abejas melíferas (*Apis mellifera*) y por lo tanto tienen un gran impacto en la apicultura a nivel mundial. Estos parásitos pueden ser dispersados por los zánganos y, en el caso de *Varroa destructor* se ha reportado su presencia en áreas de fecundación natural de *A. mellifera*, conocidas como Áreas de Congregación de Zánganos (ACZ). Previamente, se identificaron varias ACZ en Argentina y se avanzó en su caracterización topográfica y genética. En este trabajo se monitorearon a lo largo de 4 años tres ACZ y un apiario establecido en la provincia de Tucumán, y se evaluó la presencia de *V. destructor* y *Nosema* sp. Los resultados indicaron la presencia de *V. destructor* en los zánganos recolectados en las ACZ en todos los años. Si bien se observó una tendencia a la disminución de la parasitación con el tiempo, no se encontraron diferencias significativas entre los años ni entre las ACZ consideradas. Se detectó por primera vez la presencia de esporas de *Nosema* sp. en las ACZ. Los resultados obtenidos apoyan el rol de los zánganos en la dinámica y dispersión de enfermedades y permiten concluir que el análisis de las ACZ representa una herramienta clave de monitoreo sanitario de las poblaciones de abejas, complementaria a los análisis realizados en apiarios.

Palabras clave — Varroosis, nosemosis, monitoreo, sanidad apícola, Argentina.

Varroosis is the disease with the biggest impact for beekeeping worldwide, since it is associated with the massive loss of *A. mellifera* colonies registered in the last years (Dynes, Berry, Delaplane, Brosi, de Roode, 2019). The mite *Varroa destructor*, agent of varroosis, feeds on the fat bodies of larvae and adult bees (Ramsey et al., 2019), negatively impacting their nutritional and immunologic status and acting as a mechanical and biological vector for many viruses that compromise the colony survival (Le Conte, Ellis, Ritter, 2010; Traynor et al., 2020). Nosemosis is another bee disease; caused by *Nosema* sp., a microsporidium that parasitizes the ventricular epithelial cells of worker bees. This disease is transmitted through the ingestion of spores by trophallaxis, grooming or contact with infected bees (Bailey, 1955). Both parasites can be dispersed by drones, since they can get inside any colony, both managed and wild (Neumann, Moritz, Mautz, 2000; Paar, Oldroyd, Huettinger, Kastberger, 2002; Traver and Fell, 2011). Also, drones tend to interact with each other in the Drone Congregation Areas (DCA), where they meet with virgin queens from up to 200 bee colonies during the mating season (Zmarlicki and Morse, 1963; Ruttner, 1966). Recently, the presence of *V. destructor* in DCA drones was reported for the United States (Mortensen, Jack, Ellis, 2018) and Argentina (Galindo-Cardona et al., 2020).

The DCA are located in open spaces, delimited by spatial cues such as contrasting vegetation borders (Ruttner and Ruttner, 1972). They are also characterized by their persistence through time both in the northern and southern hemisphere (Zmarlicki and Morse, 1963; Strang, 1970; Litvinoff et al., 2023). In Argentina, the identification and the topographical and genetic characterization of many DCA were carried out (Galindo-Cardona, Quiroga, Ayup, 2017; Galindo-Cardona et al., 2020). As a part of a sanitarian characterization of these areas, our objective was to evaluate the temporal persistence of *V. destructor* and the presence of *Nosema* sp. in three DCA and one apiary, located in the Yungas Pedemonte of Tucuman, Argentina.

In order to determine the level of *V. destructor* infestation, samples were taken from a reference apiary and three DCAs ($26^{\circ}47'28.6''S$; $65^{\circ}19'33.9''W$; Fig. 1) for four years, since 2018 to 2023. From the apiary, 30% of the hives, those that showed appropriate population strength (category 1 or 2 REDLAC) were sampled. Approximately 200-300 workers of each colony were collected following the alcohol washing method (Fries, Aarhus, Hansen, Korpela, 1991). For sampling of the DCAs, a quadcopter equipped with a synthetic pheromone as an attractant was used. The quadcopter was elevated and descended many times until 300 drone were captured, using an entomology net. The phoretic infestation was calculated as the number of mites

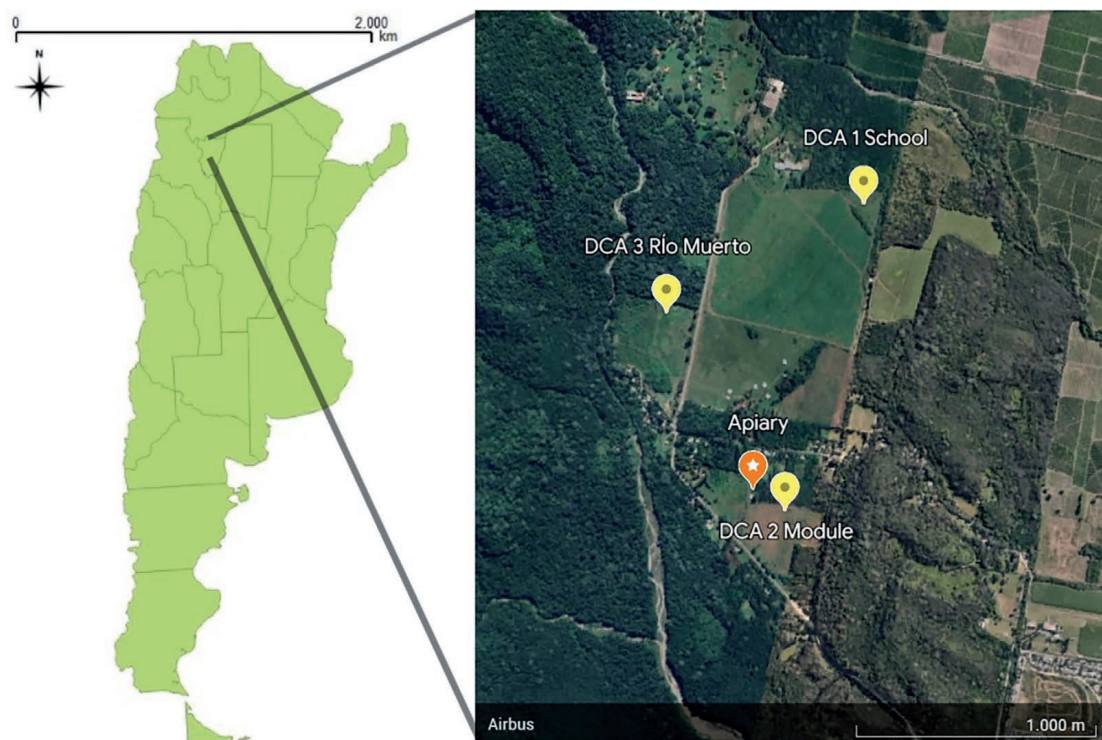


Fig. 1. Study area. Argentina-Tucumán-Yerba Buena. Image on the left the map of Argentina. On the right, the site that contains the three Drone Congregation Areas (DCA 1 School, DCA 2 Module, DCA 3 Río Muerto), marked with yellow tags and the experimental Apiary in orange. Located in the year 2018-19 in the spring reproductive season.

Fig. 1. Área de estudio. Argentina-Tucumán-Yerba Buena. Imagen de la izquierda el mapa de Argentina. A la derecha, el sitio que contiene las tres Áreas de Congregación de Zánganos (Escuela DCA 1, Módulo DCA 2, DCA 3 Río Muerto), marcados con etiquetas amarillas y el Apiario experimental en naranja. Ubicada en el año 2018-19 en la temporada reproductiva de primavera.

divided by the total number of bees sampled (either workers or drones), following the methodology of De Jong, Morse, Eickwort (1982) and Dietemann et al. (2013). The monitoring was performed during the reproductive season (spring-summer) of each surveyed year (2018-2023). The sampling time was established between 15:30 to 17:00 pm, where the highest drone activity was detected according to Galindo-Car-dona et al. (2017) and Ayup et al. (2021).

To determine the presence of *Nosema* sp. in sampled drones, six individuals from two DCAs were selected. To detect the infection, the protocol of the World Organization for Animal Health was used (World Organisation for Animal Health [OIE] 2018), using a hemocytometer or Neubauer chamber and an optical microscope to determine the presence or absence of spores.

All statistical analyses were performed with the program R Studio R 4.3.0 2023.

V. destructor was found to be present in all of the DCAs during the sampling period, with an apparent decreasing trend in infestation over time (F-statistic: 0.6947, df: 3.27, p: 0.5633; Fig. 2). However, there were not significant differences in the proportion of *V. destructor* (phoretic *Varroa*, PV) between the years of the study (p: 0.5633) (Fig. 2). Regarding the comparison between the reference apiary and the DCAs) not significant differences in PV were observed (F-statistic: 0.6666, df: 1.29, p-value: 0.4209); however *t* differences in this parameter between DCAs were detected (p: 0.00188). Regarding *Nosema* sp. detection, all analyzed samples were positive for the parasite.

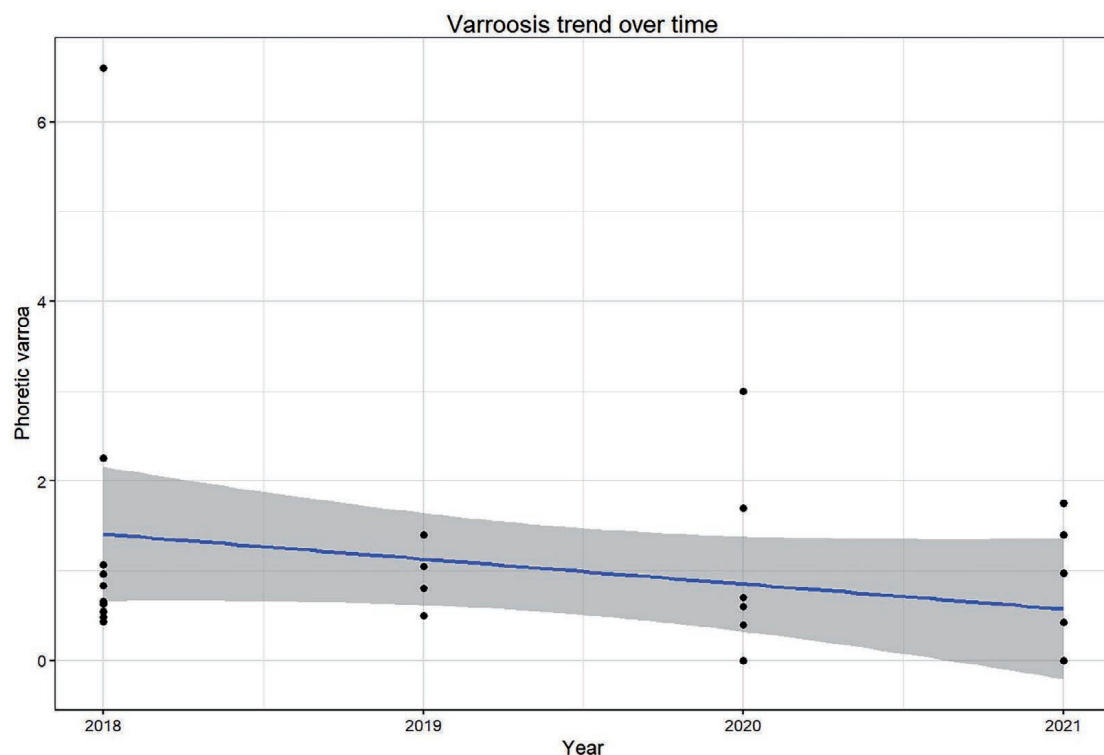


Fig. 2. Percentage of infestation with *Varroa destructor* (phoretic varroa) in the DCAs analyzed during the four years of sampling.

Fig. 2. Porcentaje de infestación por *Varroa destructor* (varroa forética) en las ACZ analizadas durante los cuatro años de muestreo.

Present results could be explained by the DCAs being visited by drones from migrating apiaries. In Tucuman, apiaries migration is very significant during the spring months, most of them arriving from the center and south of the country to take advantage of the flowering. Even though this practice is fairly common increase the possibility of transmission of parasites and pathogen between colonies from distant regions (Martínez-López, Ruiz, De la Rúa, 2022). In addition, the apparent temporal variation in the parasitic loads of the DCAs could be due to modifications in the landscape (Galindo-Cardona et al., 2020). We have observed in one of the DCAs, a reduction of the PV value to zero, which coincides with a significant modification of the landscape in that area as a consequence of the land-use change in the Pedemonte jungle (Galindo-Cardona, personal observation). Such landscape alterations could disorient the drones and decrease its arrival and staying at the DCAs.

Our findings demonstrate for the first time the presence of *Nosema* sp. in drones for and support the key role of drones in the dynamics and dispersion of diseases. In this sense, the analysis of the DCAs represents key tools for health monitoring of honey bee populations. Future analyses, including more samples from each analyzed DCA and from other DCAs in the area, will allow us to continue exploring the dynamics of these diseases on unanalyzed regions.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the School of Agriculture and Sacarotecnia (EAS) of the National University of Tucumán (UNT) for allowing us to work on their property. This study is the product of the final experiment of Karen Escalante's Thesis to obtain the degree of Bachelor of Biological Sciences from the Faculty of Natural Sciences and IML of the UNT.

FINANCING

This project was financed in part by PIP-2015-2018-GI.

PARTICIPATION

EK, QMG, SAC and GCA participated in all the research processes and in the writing of the article. GM participated in the gathering of data on the field.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors do not declare any possible conflict of interest.

REFERENCES

- Ayup, M. M., Gärtner, P., Agosto-Rivera, J. L., Marendy, P., de Souza, P., Galindo-Cardona, A. (2021). Analysis of honeybee drone activity during the mating season in Northwestern Argentina. *Insects*, 12, 566. <https://doi.org/10.3390/insects12060566>
- Bailey, L. (1955). The epidemiology and control of *Nosema disease* of the honey-bee. *Annals of Applied Biology*, 43, 379–89. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1955.tb02488.x>
- Bing, H., Harper, D.A.T., Hammer, Ø. (2013). Introduction to Past: a comprehensive statistics software package for paleontological data analysis. *Acta Palaeontologica Sinica*, 161-181. ISSN 0001-6616. 52
- De Jong, D., Morse, R. A. Eickwort, G. C. (1982). Mite pests of honey bees. *Annual Review of Entomology*, 27, 229-252.
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S. J., Anderson, D. L., Locke, B., Delaplane, K. S., Rosenkranz, P. (2013). Standard methods for varroa research. *Journal of apicultural research*, 52, 1-54.
- Dynes, T. L., Berry, J. A., Delaplane, K. S., Brosi, B. J. y de Roode, J. C. (2019). Reduced density and visually complex apiaries reduce parasite load and promote honey production and overwintering survival in honey bees. *PloS ONE*, 14, e0216286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216286>
- Fries, I., Aarhus, A., Hansen, H., Korpela, S. (1991). Comparison of diagnostic methods for detection of low infestation levels of *Varroa jacobsoni* in honey-bee (*Apis mellifera*) colonies. *Experimental and Applied Acarology*, 10, 279–287. <https://doi.org/10.1007/BF01198656>
- Galindo-Cardona, A., Quiroga, O. B. and Ayup, M. M. (2017). Primer reporte de un Área de Congregación de Zánganos de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) de Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 76, 50-53.
- Galindo-Cardona, A., Scannapieco, A. C., Russo, R., Escalante, K., Geria, M., Lepori, N., Giray, T. (2020). *Varroa destructor* Parasitism and Genetic Variability at Honey Bee (*Apis mellifera*) Drone Congregation Areas and Their Associations With Environmental Variables in Argentina. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 394.
- Le Conte, Y., Ellis, M. Ritter, W. (2010). Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses?. *Apidologie*, 41, 353-363. <https://doi.org/10.1051/apido/2010017>
- Litvinoff, L., Menescardi, F., Porrini, L., Russo, R., Liendo, M.C., Nucci, A., Lusarreta, E., Ventura, R., Espasadin, L., Monmany-Garzia, A.C., Scannapieco, A.C., Galindo-Cardona, A. (2023). Morphometric and genetic characterization as tools for selection of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) stocks in an area of natural hybridization in Argentina. *Frontiers in Insect Science*, 2, 1073999. <https://doi.org/10.3389/finsec.2022.1073999>
- Martínez-López, V., Ruiz, C., De la Rúa, P. (2022). Migratory beekeeping and its influence on the prevalence and dispersal of pathogens to managed and wild bees *International Journal for Parasitology*, 18, 184-193. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.05.004>

- Mortensen, A. N., Jack, C. J., Ellis, J. D. (2018). The discovery of *Varroa destructor* on drone honey bees, *Apis mellifera*, at drone congregation areas. *Parasitology Research*, 117, 3337-3339. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6035-z>
- Neumann, P., Moritz, R. F., Mautz, D. (2000). Colony evaluation is not affected by drifting of drone and worker honeybees (*Apis mellifera* L.) at a performance testing apiary. *Apidologie*, 31, 67-79.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2018). Nosemosis de las abejas melíferas. https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.02.04_NOSEMOSIS_FINAL.pdf, acces 30/08/2023
- Paar, J., Oldroyd, B.P., Huettinger, E., Kastberger, G. (2002). Drifting of workers in nest aggregation of the giant honeybee *Apis dorsata*. *Apidologie*, 33, 553-561.
- Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A. y Hawthorne, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 1792-1801.
- R Development Core Team. 2023. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>
- Red para el desarrollo de la agricultura familiar de Latinoamérica y el Caribe (RED-LAC). Abejas sanas y bien pobladas. <https://www.redlac-af.org/inicioprimavera>, acces 31/08/2023
- Ruttner, F. (1966). The life and flight activity of drones. *Bee World*, 47, 93-100.
- Ruttner, F., Ruttner, H. (1972) Untersuchungen über die Flugaktivität und das Paarungsverhalten der Drohnen. V. Drohnen-Sammelplätze und Paarungsdistanz. *Apidologie*, 3, 203-232.
- Strang, G.E. (1970). A Study of Honey Bee Drone Attraction in the mating response. *Journal of Economic Entomology*, 63, 641-645. <https://doi.org/10.1093/jee/63.2.641>
- Traynor, K.S., Mondet, F., R. de Miranda, J., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M., Chantawannakul, P. y McAfee, A. (2020). *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. *Trends in Parasitology*, 36, 592-606. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>
- Traver, B. E. y Fell, R. D. (2011). *Nosema ceranae* in drone honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology*, 107, 234-236.
- Zmarlicki, C. y Morse, R. A. (1963). Drone congregation areas. *Journal of Apicultural Research*, 2, 64-66.

MATERIAL SUPLEMENTARIO / TEXTO EN ESPAÑOL

Prevalencia de *Varroa destructor* y primer reporte de *Nosema* sp. en áreas de congregación de zánganos de *Apis mellifera*

La varroosis es la enfermedad de mayor impacto para la apicultura a nivel mundial, ya que está asociada con la pérdida masiva de colonias de *A. mellifera* registrada en los últimos años (Dynes, Berry, Delaplane, Brosi, de Roode, 2019). El ácaro *Varroa destructor*, agente de la varroosis, se alimenta de los cuerpos grasos de las crías y adultos de las abejas (Ramsey et al., 2019), impactando en su estatus nutricional y también inmunológico, ya que se desempeña como vector mecánico y biológico de numerosos virus que enferman las colonias y comprometen su supervivencia (Le Conte, Ellis, Ritter, 2010; Traynor et al., 2020). La nosemosis es otra enfermedad apícola, generada por *Nosema* sp., microsporidio que parasita las células epiteliales del ventrículo de las abejas obreras. Dicha enfermedad se transmite mediante la ingestión de esporas por trofalaxis, acicalamiento o por contacto con abejas muertas infectadas (Bailey, 1955). Ambos parásitos son dispersados por los zánganos a través de la deriva, ya que éstos pueden ingresar a cualquier colonia, tanto manejadas como silvestres (Neumann, Moritz, Mautz, 2000; Paar, Oldroyd, Huettinger, Kastberger, 2002; Traver y Fell, 2011). Además, los machos interactúan entre sí en las Áreas de Congregación de Zánganos (ACZ), donde se encuentran con reinas vírgenes de hasta 200 colonias durante la temporada de apareamiento (Zmarlicki y Morse, 1963; Ruttner, 1966). Recientemente, se reportó la presencia de *V. destructor* en zánganos de ACZ en Estados Unidos (Mortensen, Jack, Ellis, 2018) y en Argentina (Galindo-Cardona et al., 2020).

Las ACZ se forman en sitios abiertos, delimitados por señales espaciales como bordes contrastantes de vegetación (Ruttner y Ruttner, 1972), y se caracterizan por su persistencia en el tiempo tanto en el hemisferio norte como en el sur (Zmarlicki y Morse, 1963; Strang, 1970; Litvinoff et al., 2023). En nuestro país, se realizó recientemente la identificación y caracterización topográfica y genética de numerosas ACZ (Galindo-Cardona, Quiroga, Ayup, 2017; Galindo-Cardona et al., 2020). Como parte de la caracterización sanitaria de estas áreas, nuestro objetivo fue evaluar la prevalencia temporal de *V. destructor* y presencia de *Nosema* sp. en tres ACZ y un apiario, ubicados en el pedemonte de las Yungas, Tucumán, Argentina .

Para determinar el nivel de infestación por *V. destructor*, se tomaron muestras de un apiario de referencia y tres ACZ (26°47'28.6"S; 65°19'33.9"O; Fig.1) durante cuatro años de muestreo, desde 2018 al 2021. Se muestreó el 30% de las colmenas del apiario que mostraran apropiada fortaleza poblacional (categoría 1 ó 2; REDLAC). Se recolectaron aprox. 200-300 obreras según el método de lavado con alcohol (Fries, Aarhus, Hansen, Korpela, 1991). En el muestreo de las ACZ, se utilizó un cuadricóptero equipado con una feromona sintética como cebo atrayente. El cuadricóptero fue elevado y descendido varias veces para capturar aproximadamente 300 machos, utilizando una red entomológica. La infestación en fase forética se calculó como el

número de ácaros dividido por el número total de abejas muestreadas (ya sea obreras o zánganos), siguiendo la metodología descrita por De Jong, Morse, Eickwort (1982) y Dietemann et al. (2013). El monitoreo se llevó a cabo durante la temporada reproductiva (primavera-verano) a partir del año 2018. El horario de muestreo se programó entre las 15:00 a 17:30 horas, que es el periodo de mayor actividad de los zánganos según estudios realizados por Galindo-Cardona et al. (2017) y Ayup et al. (2021).

Para determinar la presencia de *Nosema* sp. en los zánganos colectados, se seleccionaron seis individuos de dos ACZs. Se utilizó el protocolo de (Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE] 2018) para detectar la infección, empleando un hemocitómetro o cámara de Neubauer y un microscopio óptico para identificar la presencia o ausencia de esporas. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa R Studio R 4.3.0, 2023.

Se encontró que *V. destructor* estuvo presente en todas las ACZ durante el periodo de muestreo, con una aparente tendencia decreciente en la infestación a lo largo del tiempo (F-statistic: 0.6947, df: 3.27, p: 0.5633). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la proporción de *V. destructor* (Varroa forética, VF) entre los años analizados (p: 0.5633) (Fig. 2). En cuanto a los lugares (Apiario y ACZ) y el porcentaje de varroasis, no se observaron diferencias significativas (F-statistic: 0.6666 on 1 and 29 DF, p-value: 0.4209), pero si entre las ACZ (p: 0.00188). Con respecto a *Nosema* sp. al analizar las muestras fueron positivas para este parásito, constatando así su presencia en las ACZ.

Estos valores podrían deberse a que las ACZ reciben zánganos de apiarios trashumantes, que migran desde el sur en busca de floraciones tempranas en el norte. En Tucumán, por ejemplo, la trashumancia es significativa en los meses de primavera donde arriban desde las provincias del centro y sur del país para aprovechar la floración, esta actividad de mover las colmenas de un lugar a otro es una práctica común que tiene consecuencias como la transmisión de parásitos y patógenos de las abejas a nuevos lugares (Martínez-López, Ruiz, De la Rúa, 2022). Además la aparente variación temporal en las cargas parasitarias en las ACZ podría deberse a modificaciones en el paisaje (Galindo-Cardona et al., 2020). Nosotros observamos en unas de las ACZ, una disminución de valores de VF a 0%, coincidentemente con la modificación significativa del paisaje en esta área como consecuencia del cambio de uso de suelo en la Selva Pedemontana, la cuál duplicó su tamaño (Galindo-Cardona, observación personal). Dichas alteraciones del paisaje podrían generar desorientación en los zánganos y disminuir su llegada y permanencia en las ACZ. Los resultados obtenidos demuestran por primera vez la presencia de *Nosema* sp. en los zánganos de las ACZ.

Nuestros hallazgos apoyan el rol clave de los zánganos en la dinámica y dispersión de enfermedades y permiten concluir que el análisis de las ACZ representan una herramienta clave de monitoreo sanitario de las poblaciones de abejas. Próximos análisis, que incluyan una mayor cantidad de muestras de cada ACZ y de más ACZ en la zona de estudio, permitirán continuar explorando la dinámica de estas enfermedades apícolas a una escala previamente no analizada, que involucra tanto apiarios como ACZ cercanas.