



PCAA

Programme canadien d'adaptation agricole

Rapport final

Optimisation de la sélection et de la production des faux-bourçons
d'abeilles mellifères (*Apis mellifera* L.)
#6730

Fédération des apiculteurs du Québec

Supervision scientifique

Pierre Giovenazzo PhD

Rédaction

Marie Odile Benoit Biancamano

Pierre Giovenazzo

Apreutese Radu-Ionut

Andrée Rousseau

31 janvier 2014

Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC) s'est engagé à travailler avec des partenaires de l'industrie. Les opinions exprimées dans le présent document sont celles du demandeur et ne sont pas nécessairement partagées par AAC et le CDAQ.

Table des matières

Table des matières	2
Avant-propos	4
Objectifs	5
1. Objectif général	5
2. Objectifs spécifiques	5
Résultats, analyses et discussions	6
1. Introduction	6
2. Résultats obtenus et analyse	8
Objectifs 1, 2 et 3 : Production et qualité du sperme de faux-bourdon durant la saison de production des reines de l'abeille domestique (<i>Apis mellifera</i> L.) au Québec / Factors influencing drone (<i>Apis mellifera</i> L.) sperm quality during queen bee production season in southeastern Canada	8
Résumé	8
Abstract	9
Introduction	9
Materials and methods	10
Results	12
Discussion	14
Acknowledgments	17
Objectif 4 : Optimisation de la fertilité des faux-bourdons avec des suppléments alimentaires au printemps /Optimizing drone fertility with nutritional supplements to colonies during spring	25
Résumé	25
Abstract	25
Methodology	26
Results	29
Discussion	30
Objectif 5 : Impact d'une dose sublethale d'imidaclopride, d'un traitement anti varroa à l'acide formique et leur effet synergique sur le développement et fertilité des faux-bourdons / Drone development and fertility in relation to a Varroa formic acid treatment, a sublethal imidacloprid dose and their synergetic effect	42
Summary	42
Introduction	42
Methodology	43
Results	47
Discussion	49
References	65

Objectif 6 : Fertilité et la présence de produits phytosanitaires chez les faux-bourçons capturés au site de fécondation et les reines fécondées des éleveurs de reines québécois et ontariens / Fertility and pesticide contamination of drones captured in queen mating yards from Quebec and Ontario	67
Résumé	67
Méthodologie	67
Résultats.....	71
Discussion	73
Bibliographie.....	88
Diffusion des résultats	89
Tableau : diffusion des résultats.....	90
SOMMAIRE / CONCLUSIONS.....	91
1. Importance du projet	91
2. But du projet.....	92
3. Activités réalisées	92
4. Retombées prévues à court terme, moyen terme et à long terme sur le secteur.....	92
5. Les recommandations découlant des résultats.....	93
6. Pérennité du projet (collaboration, mise en œuvre et adoption par le secteur, etc.).....	95
7. Suites possibles au projet	96
SUMMARY/CONCLUSIONS.....	97
1. Importance of project	97
2. Project goal	97
3. Activities carried out.....	98
4. Expected benefits in the short term , medium term and long term	98
5. Recommendations following results.....	99
6. Sustainability of the project (collaboration, adoption by industry, etc.).....	101
7. Future projects	102
Plan de financement et conciliation des dépenses	103

Avant-propos

Ce projet fut réalisé avec la collaboration de plusieurs partenaires. L'idée originale du projet est de notre équipe en sciences apicoles du Centre de recherche en sciences animales de Deschambault (CRSAD). On avait beaucoup de problèmes d'insémination instrumentale de nos reines abeilles et on observait plusieurs mâles infertiles lors du prélèvement de sperme. Cette problématique a été soumise au conseil d'administration de La fédération des apiculteurs du Québec (FAQ) et nous avons convenu de l'importance de faire une demande de financement auprès du Conseil pour le développement de l'agriculture du Québec (CDAQ) pour réaliser un projet de recherche appliquée sur la fertilité des faux-bourçons.

Ce projet a profité de la collaboration de deux autres professeures/chercheuses séniors, madame Valérie Fournier Ph.D. de la faculté d'agriculture de l'université Laval et Madame Marie-Odile Benoit-Biancamano Ph.D. DMV de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Montréal. Madame Fournier a collaboré aux travaux des trois premiers objectifs et madame Benoit-Biancamano a collaboré à l'objectif cinq. L'équipe CRSAD a supervisé la réalisation de tous les objectifs et réalisé les objectifs quatre et six. L'objectif six a nécessité la collaboration de 4 éleveurs de reines du Québec (Les Reines Moreau, ApiCulture, Château de Cyr, Rustique Apiculture) et deux éleveurs de reines de l'Ontario (Tuckamore Bee Company, Highlands Honey), ils ont été très généreux en fournissant des échantillons de faux-bourçons et de reines. Nous les remercions pour leur participation et valorisons leur désir d'acquérir de nouvelles connaissances en sciences apicoles et de faire avancer l'apiculture au Canada.

L'équipe apicole du CRSAD a fait un travail magistral durant ce projet. Madame Andrée Rousseau (étudiante graduée M.Sc. et chargée de projet) a exécuté les objectifs de ce projet avec professionnalisme et grande efficacité. Elle est, en grande partie, responsable du succès de ce projet et l'atteinte des objectifs. Elle a travaillé avec l'assistance de madame Marilène Paillard (Étudiante B.Sc.), une jeune scientifique dynamique et maintenant jeune passionnée des abeilles. Elles ont fait de nombreuses heures supplémentaires sans hésitation. Ce projet a également profité d'un suivi technique sans faille des autres membres de l'équipe apicole : Georges Martin (M.Sc. chargé de projet en charge des opérations apicoles), Émile Houle (technicien apicole) et Michaël Benoit (ouvrier apicole). Ces spécialistes forment une équipe dévouée à la réussite des projets de recherches en apiculture au Québec. Finalement nous voulons remercier madame Hassina Yacini directrice adjointe, Pierre Baril directeur, pour leur gentillesse, leur attention et leur support. À toutes ces personnes un gros Merci.

Pierre Giovenazzo

Objectifs

1. Objectif général

Ce projet vise à optimiser les qualités reproductives des faux-bourdons utilisés pour la fécondation des reines abeilles (*Apis mellifera* L) produites commercialement au Canada.

2. Objectifs spécifiques

1. Déterminer l'âge où la fertilité des faux bourdons est optimale (abondance, viabilité, motilité et morphologie des spermatozoïdes).
2. Déterminer le moment de la saison apicole où la fertilité des faux bourdons est optimale (abondance, viabilité, motilité et morphologie des spermatozoïdes).
3. Vérifier l'importance de la lignée génétique sur la fertilité des faux bourdons (abondance, viabilité, motilité et morphologie des spermatozoïdes).
4. Vérifier si l'ajout d'un nourrissage au sucrose et supplément protéique au début de la saison apicole améliore le développement et la fertilité des faux bourdons (abondance, viabilité, motilité et morphologie des spermatozoïdes).
5. Mesurer développement et fertilité des faux-bourdons en relation avec l'utilisation du varroacide Mite-Away Quick Strips™, l'administration de l'imidacloprid en dosage sous létal dans un sirop nourrisseur et l'effet synergique de ces deux produits.
6. Mesurer la fertilité des faux-bourdons capturés aux sites de fécondations et vérifier la présence de pesticides dans leurs tissus.

Résultats, analyses et discussions

Dans cette section nous présentons une brève introduction suivie des résultats, analyses et discussions de quatre manuscrits scientifiques issus de ce travail. En se référant aux objectifs de la section précédente, le premier manuscrit regroupe les objectifs 1, 2 et 3 et fait l'objet du projet de maîtrise de Madame Andrée Pelletier-Rousseau (dépôt du mémoire 26 janvier 2014, manuscrit scientifique soumis au journal : *The Canadian Entomologist*). Les trois autres manuscrits correspondent à chacun des trois autres objectifs et ils seront soumis pour publication au cours des prochains mois.

1. Introduction

Au Québec, 16 866 reines ont été vendues en 2010 dont la majorité (15 884) provenait d'élevages québécois. Le commerce des reines représente une valeur de 367 200\$ (Institut de la statistique du Québec, 2010). Derrière cette valeur économique du commerce des reines se cache une valeur agroalimentaire beaucoup plus importante. La reine est la seule femelle fertile et elle est responsable de la ponte des œufs et donc du développement d'une colonie. Son importance est évidemment primordiale pour la production de miel et les services de pollinisation. Depuis une dizaine d'années on rapporte une augmentation du nombre de jeunes reines défailtantes (ponte faible ou absente) en provenance des élevages commerciaux de reines au Canada et ailleurs dans le monde. L'hypothèse de l'existence d'un problème au niveau du processus de fécondation en élevage commercial est souvent soulevée (un nombre insuffisant de faux bourdons ou une qualité inadéquate du sperme). L'apparition d'une reine défailtante durant la saison apicole entraîne d'importants coûts de production pour l'apiculteur. L'arrêt de la ponte associé au changement de reine provoque un déclin de la population d'abeilles ouvrières et en conséquence une diminution de la capacité de pollinisation et de récolte de nectar/pollen par la colonie. Le résultat est une diminution du rendement de la ruche et aussi une diminution de la capacité de l'industrie apicole de fournir des services de pollinisation adéquats. Puisque la copulation et l'insémination sont limitées à une seule période tôt dans la vie de la reine (vol nuptial), il est très important d'avoir un nombre suffisant de faux-bourdons matures et fertiles aux sites de fécondation des jeunes reines. Cela assure une fécondation optimale de la reine avec de nombreux mâles (près de 20 mâles) qui lui donneront des millions de spermatozoïdes viables et fertiles afin de maintenir une colonie forte pendant plus d'une saison.

L'élevage et la production des mâles dans une colonie ont été fortement affectés depuis l'arrivée de la varroase (Burley 1987, Collins and Pettis 2001, Fell and Tignor 2001, Rinderer et al. 1998). L'impact de la

varroase sur les faux-bourçons survient lors du développement du couvain de mâles infesté par les varroas et aussi lors des traitements varroacides. L'utilisation de ces acaricides hors des périodes de développement de la colonie (tôt le printemps et en automne après la saison apicole) minimise leur contact avec les mâles. Par contre, l'homologation récente (2012, Agence de réglementation pour la lutte antiparasitaire du Canada) du traitement acaride à base d'acide formique Mite-Away Quick Strips™ (Nod apiaries Inc.) nous semble problématique. Ce nouveau traitement est autorisé en tout temps et pourrait avoir un impact négatif sur le développement larvaire des faux-bourçons et affecter leurs qualités reproductives. De plus, il faut ajouter que des travaux de recherches récents suggèrent que les mâles vivant dans l'environnement d'une agriculture intensive possèdent une fertilité réduite (Boes 2010, Johnson et al. 2010). Les auteurs suggèrent que l'utilisation des différents produits phytosanitaires agirait sur la spermatogenèse des faux bourçons (qui se produit durant le développement larvaire). Pour ces raisons, il devient important d'acquérir plus de connaissances sur le développement des faux-bourçons et l'impact de différents facteurs abiotiques et biotiques sur leurs qualités reproductives. Ces informations seront très utiles pour les producteurs de reines. Ils permettront d'optimiser la fécondation des jeunes reines au cours de la saison et ainsi offrir aux apiculteurs des reines de qualité et maximiser la force et la production des colonies.

À notre connaissance, il n'y a pas eu de projet de recherche sur les faux-bourçons au Canada depuis les travaux de Robert W Currie de l'Alberta (Currie RW, 1987. The biology and behaviour of drones. *Bee World*, 68, 129-143; Currie RW and SC Jay, 1988. Factors affecting the acceptance of foreign drones into honey bee (*Apis mellifera*) colonies, *Apidologie*, 19 (3), 321-240). Notre projet apportera des informations nouvelles et originales sur le développement et la fertilité des faux-bourçons en fonction de la lignée génétique, l'âge et la période de la saison. D'autres informations originales s'ajoutent et se résument en trois points : 1) Impact du varroacide Mite-Away Quick Strips™, du pesticide imidacloprid en dosage sous létale et de leur action synergique sur le développement et la fertilité des faux-bourçons; 2) Fertilité des faux-bourçons aux sites de fécondation et la présence/absence de produits phytosanitaires dans leurs tissus; 3) Impact de suppléments de sucrose et de protéines sur le développement et la fertilité des faux-bourçons.

Avec ces nouvelles connaissances, les éleveurs de reines du Québec, de l'Ontario et des autres provinces canadiennes optimiseront la virilité des faux-bourçons. Le résultat prévu est une augmentation de la disponibilité de reines de grande qualité issues des élevages commerciaux et des programmes de sélection nationaux. Ce projet permettra également de développer une expertise en évaluation du développement du système reproducteur chez les larves de faux bourçons mise en relation avec les produits phytosanitaires, expertise non encore exploitée par le Complexe de diagnostic et d'épidémiosurveillance vétérinaires. Nous croyons que cette nouvelle expertise servirait de base scientifique dans le développement potentiel de l'utilisation des faux-bourçons comme bio marqueurs environnementaux.

2. Résultats obtenus et analyse

Objectifs 1, 2 et 3 : Production et qualité du sperme de faux-bourdon durant la saison de production des reines de l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) au Québec / Factors influencing drone (*Apis mellifera* L.) sperm quality during queen bee production season in southeastern Canada

Ce manuscrit a été soumis au périodique *The Canadian Entomologist* pour révision par les pairs et publication (26 janvier 2014). L'auteure principale est Andrée Rousseau. Les coauteurs sont Valérie Fournier, Ph.D., (Centre de recherche en horticulture, Université Laval) et Pierre Giovenazzo, Ph.D., (Centre de recherche en sciences animales de Deschambault).

Résumé

La durée de vie de la reine abeille (*Apis mellifera* L.) est fortement dépendante du nombre de spermatozoïdes qu'elle acquiert durant les vols nuptiaux où elle s'accouple avec plusieurs faux-bourdons. Des cas de remplacement inexplicables de reines par la colonie, ainsi que de jeunes reines ayant épuisé leurs réserves de spermatozoïdes, sont rapportés en Amérique du Nord. Des problèmes de fertilité chez les faux-bourdons sont suspectés. Cette étude a été entreprise afin d'évaluer les qualités reproductives du faux-bourdon durant la saison de production des reines abeilles de mai à août. Pour ce faire, des faux-bourdons de deux lignées différentes ont été élevés à six reprises au cours de la saison apicole 2012 au Centre de recherche en sciences animales de Deschambault, Qc (Canada). Le volume de sperme, le nombre de spermatozoïdes et leur viabilité ont ensuite été évalués aux âges de 14, 21 et 35 jours de vie des faux-bourdons. Les résultats montrent que 1) le volume de sperme augmente avec l'âge des faux-bourdons testés; 2) le volume de sperme augmente également à mesure que la saison apicole progresse dans le temps; et 3) le nombre de spermatozoïdes/individu et la viabilité des gamètes ne semblent pas être influencés par la lignée génétique, l'âge ou le moment de l'élevage dans la saison apicole. Cette étude permettra une meilleure optimisation de l'élevage des faux-bourdons afin d'obtenir des reines abeilles adéquatement fécondées et ce, dans les conditions présentes au Québec.

Abstract

A honeybee queen's life expectancy is strongly dependent on the number of sperm she obtains by mating with drones during nuptial flights. Unexplained replacements of queens by the colony and young queens showing sperm depletions have been reported in North America, and drone fertility has been a suspected cause. The aim of this study was to evaluate drone reproductive qualities during the queen's rearing season, from May to August. Drones from two different genetic lines were reared six times during the 2012 beekeeping season at our research center in Quebec (Canada). Semen volume as well as sperm number and viability were assessed at the age of 14, 21 and 35 days. Results showed 1) a greater proportion of older drones with semen at the tip of the genitalia after eversion; 2) an increase in semen production during the sampling period; and 3) no influence of drone genetic line, age or time of breeding on sperm viability. These results highlight the necessity of better understanding drone rearing and how it can be optimized to ensure optimum honey bee queen mating.

Introduction

The polyandrous mating system of the European honey bee, *Apis mellifera* L., is unique among domesticated animals (Tarpy and Page, 2000; Koeniger, 1990). Young queens make 1 to 3 nuptial flights to a drone congregation area (Schluns et al., 2005; Tarpy and Page, 2000), where thousands of drones from more than 200 colonies are active (Baudry et al., 1998). An average of 14 drones will mate with the queen and die afterwards (Estoup et al., 1995). Once mated, a queen will return to the hive with approximately 80-90 million spermatozoa in her lateral oviducts (Woyke, 1960). An average of 4 to 7 million spermatozoa reaches the spermatheca, where they are stored until used by the queen (Roberts and Mackensen, 1951; Woyke, 1960).

In recent years, high numbers of deficient queens, i.e. with incidence of early supersedure, unexplained death, premature drone egg laying or interruption of egg laying, have been reported worldwide (Camazine et al., 1998; Rhodes, 2008; vanEngelsdorp and Meisner, 2010). Epidemiological surveys from the United States and Canada have identified poor queen quality as one of the main concerns for the honey bee industry (vanEngelsdorp et al., 2010 et 2011; vanEngelsdorp and Meisner, 2010). In their queen mating health study, Tarpy et al., (2012) found that commercially produced queens in the USA show significant variations in viable sperm, with some queens as low as 20% in spermatheca. This phenomenon has also been observed in southeastern Australia (Rhodes et al., 2004). Rhodes et al. (2010) observed a low number of drones of mature drones at the congregation area and suggested drone reproductive quality was the most probable cause.

The mating success of queens has been linked to drone quantity and their sperm quality at the drone congregation area (Cobey, 2007; Nur et al. 2012). Several studies show that drone age, season and genetic origin affect semen properties (Woyke and Jasinski, 1978; Locke and Peng, 1993; Zaitoun et al. 2009). Woyke and Jasinski (1978) showed that the number of spermatozoa entering the spermatheca of inseminated queens tends to decrease as drone age increases; 4,097 million spermatozoa were found in queens' spermatheca inseminated with semen from 2-week old drones compared to 3,175 million for queens inseminated with semen from 9-week old drones. Zaitoun et al. (2009) found that drones produced in the Jordan during May showed significantly more sperm in seminal vesicles than those produced during the rest of the drone production season (from February to August in Jordan). Drone genetics seems to influence most aspects of sperm production and properties (Rhodes et al., 2010), including semen volume and number of sperm produced by each drone.

In eastern Canada, beekeeping is characterized by a long overwintering period followed by one of the shortest active seasons for the honeybee (May to September) around the world and races commonly bred have been selected for several features essential for high survival in this climate. To our knowledge, no information on drone reproductive quality in eastern Canada exists, despite the particularities of these climatic conditions. The aim of this study was to evaluate semen quality of drones with different genetic origins, at different ages and at different seasonal breeding periods.

Materials and methods

Drone rearing and maintenance

This study was conducted at the Centre de Recherche en Sciences Animales de Deschambault (CRSAD, Deschambault, N 46°40.27', W 10°71.50'), Quebec, Canada. Mature drones were obtained from honey bee colonies with open-mated queens belonging to two different lines: hybrid Italian stock N=4 colonies (Rustique Apiculture, Québec, Canada) and Buckfast stock N=4 colonies (Keld Branstrup, Denmark). All colonies were fed sucrose syrup 1:1 and protein supplement patties (Global Patties Inc., standard 15% pollen patty) during April before the beginning of drone rearing.

Six successive batches of drones were bred during the 2012 beekeeping season (May 1, May 14, June 12, June 20 and July 18). Drones were obtained by isolating each queen for 48 hours within a queen exclusion cage consisting of a metal queen excluder that allowed nurse bees to feed the queen freely. Each cage held a drone brood cell frame placed in the centre of the brood chamber. After this period, queens were freed from

the excluder cage and drone broods were removed and replaced in the centre of the brood chamber. Upon emergence, 300 young drones were marked with a water-based Posca® pen on their upper thorax and returned to their respective colonies. Different colours were used to distinguish different drone cohorts within each colony. Marked drones were confined in the honey super above the brood box using a queen excluder.

Semen analysis

Thirty marked drones were collected at 14, 21 and 35 days after emergence for semen analysis. When captured, drones were kept alive in a flight cage with young nurse bees and a small incandescent light. In this cage, drones were able to fly and defecate, which helps initiate semen ejaculation (Collins, 2004).

Semen volume

Semen collection was accomplished by manual eversion of sexual organs as described by Woyke (2008). An initial vertical pressure on the head of the drone with the thumb and index finger produced partial eversion of the endophallus. Subsequent horizontal pressure from the anterior to the posterior of the abdomen resulted in full eversion of the genitals. In mature drones, semen is cream-colored and found at the tip of the genitalia on a bed of white mucus. Using a Harbo Large Capacity Syringe (GS 1100, Fisher Scientific), semen was collected from five drones in each colony for each combination of drone breeding date and age. Semen was collected only from drones producing at least 0.2 µl (the minimum amount required for the syringe) and volume was recorded to the nearest 0.1 µl. Care was taken to avoid mucus collection. Semen from each drone was stored in a separate glass capillary tube until sperm quality analysis could be performed later on the same day, i.e. within 12 hours of collection.

Sperm count

Sperm count was conducted using a Neubauer Improved Haemocytometer, BS.748 (depth 0.1 mm, 1/400 mm²). A semen volume of 0.2 µl was diluted in 1.5 ml Tris buffer in a sterile Eppendorf and gently mixed by inversion (Dilution factor = 7500). Sperm were counted in 5 squares (0.1 mm³ = 0.1 µl). Counts were repeated 3 times under a light microscope at 400x magnification for a total of sperm in 15 squares of the haemocytometer. To obtain sperm numbers per drone, the following formula was applied:

$$\text{Sperm numbers per drone} = \text{sperm counted in 15 squares} \times \text{dilution factor} \times \text{semen volume} / 1.5$$

Sperm viability

Sperm viability was assessed the day of semen collection using a Live/Dead Sperm Viability Kit (L-7011, Molecular Probes) and a modified version of the method used by Collins and Donoghue (1998). Semen collected from each drone was placed in an individual Eppendorf containing 40 μ l Tris Buffer and mixed gently. After allowing SYBR-14 and propidium iodide to thaw and come to room temperature, 1.5 μ l of SYBR-14 was added to the semen dilution, mixed and allowed to stain 10 minutes. An additional 1.5 μ l was added, mixed and allowed to stain 10 more minutes. In a separate analysis, for each individual semen sample, 1.5 μ l of stained semen solution was diluted in 1.5 μ l Tris Buffer and mixed gently. A drop of this solution was placed on a slide preparation and sperm viability was assessed using a Zeiss Observer Z1 microscope equipped with fluorescence filters. For each slide, five different fields of view were observed (200x), photographed and saved. Five slides of coloured semen were made. Spermatozoids were scored as either alive (green), or dead (red). For each drone, the mean viability percentage was obtained from the five slides.

Statistical analysis

The probabilities of semen presence after manual eversion were compared across drone genetic lines, breeding dates and drone ages using a mixed logit model with repeated measures. Measurements were taken through different drones over breeding dates and drone ages on each colony, the later being the experimental units for drone genetic lines. Values of semen volume, sperm count and sperm viability were analysed using a mixed Ancova model with the same repeated measurements. For each response variable, the best transformation was chosen among the Box-Cox family to meet the assumptions of the model. In the particular case of sperm viability, the angular transformation was chosen as it is the recommended transformation for percentage variables (Sokal and Rohlf 1995).

Following a significant effect in any analyses, multiple comparisons were done using the protected Fisher's LSD method. The normality assumption was tested using the Shapiro-Wilk's statistic, while the homogeneity of variances was verified using the traditional residuals plots. All analyses were performed at the 0.05 level of significance and models were adjusted to data using SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC, release 9.4) via the Glimmix and Mixed procedures.

Results

Drone rearing

Drones were bred in six batches for each colony between May 1 and July 28, 2012. Drones from the July 28 cohort were excluded from statistical analyses because of low drone rearing success. Also, a colony in the hybrid alian stock (Québec line) died at the beginning of the experiment. The experiment had 105 treatment combinations (7 colonies x 5 breeding dates x 3 drone ages). Observations were available for only 72 treatment combinations due to poor rearing success within some colonies. There were also several variance components of the model that were estimated to 0. Those components were removed from the model. Because of the missing data pattern and problems with estimation of some variance components, degrees of freedom were estimated using the Kenward-Roger method (1997).

Manual eversion

We sampled and manually everted 472 marked drones from May to August 2012. Of these drones, 55.3% produced a sufficient amount of semen to be collected with the Gilmont syringe (0.2 μ l, Table 3). Statistical analysis showed that the proportion of drones releasing semen after manual eversion was dependent on drone age ($F_{2,450} = 3.94$; $p = 0.0202$; Figure 8). The interaction between drone age effect and breeding date effect was also marginally significant ($F_{8,450} = 1.93$; $p = 0.0535$; Figure 9).

Multiple comparisons made over the significant effect of drone age showed that fewer 14-day old drones produced semen ($63.5 \pm 8.5\%$) than 35-day old drones ($87.8 \pm 6.2\%$). For the marginal effect of the interaction between breeding date and drone age, multiple comparisons showed that proportion of drones with semen seems to varied across drone ages only for May 14 and June 20 ($F_{2,450} = 3.45$; $p = 0.0326$ and $F_{2,450} = 6.56$; $p = 0.0016$ respectively).

Semen volume

For drones that released semen after manual eversion ($N=261$), the mean semen volume was $1.01 \pm 0.03 \mu$ l (range 0.1-2.4). Results showed that semen volume was influenced by the combined effect of drone age and breeding date ($F_{8,15.7} = 2.97$; $p = 0.0313$; Figure 10). At 14 and 35 days old, there was no difference in semen volume throughout the drone rearing season ($F_{4,21} = 0.44$; $p = 0.7758$ and $F_{4,15.1} = 2.25$; $p = 0.1120$ respectively), but semen volume was more variable at 21 days old ($F_{4,15.5} = 8.69$; $p = 0.0007$). A significant combined effect of genetic line and age was also detected ($F_{2,15} = 4.13$; $p = 0.0371$, Figure 11). Contrasts showed a significant effect of drone age for Quebec line only ($F_{2,15.4} = 6.28$; $p = 0.0102$). The semen volume seems to be smaller at 35 days old ($0.85 \pm 0.08 \mu$ l) than for 14 days old ($1.23 \pm 0.08 \mu$ l) and for 21 days old ($1.11 \pm 0.07 \mu$ l).

Sperm count

Out of the total number of drones with semen after eversion (N=261), 177 produced at least 0.2 μ l of semen. These drones had an average total sperm count of 1.80 ± 1.65 million (range 0.008 – 7.77) spermatozoa. There was no significant effect of any sources of variation on sperm count (Table 4.).

Sperm viability

The mean viability of sperm collected is shown in Table 4. The mean percentage of sperm viability was 64.2 ± 1.07 % (range 36.79 – 86.66). There was no observable effect of drone line (F1,128=0.49; p = 0.4850), of breeding date (F4,128 = 0.43; p = 0.7883), or drone age (F2,128 =0.31; p = 0.7364) on sperm viability.

Discussion

The purpose of this study was to assess the drone semen quality of different genetic lines, at different ages and reared at several periods during the beekeeping season in Quebec, Canada. Our data showed that genetic line, age, and rearing date had an impact on semen volume but not on sperm count or viability. Two key findings, first, that a great proportion of mature drones failed to release semen by manual eversion and second, that sperm count was highly variable among drones, confirmed important information about drone rearing observed in previous studies (Rhodes et al. 2010).

Drone breeding

As previously observed by Rhodes et al., (2010), only a small proportion of marked drones survived to 35 days old in confined hives (from 0 to 2.82%). Under field conditions, estimated life span of *Apis mellifera* drone is 20 to 40 days (Page and Peng, 2001). In this study, drone confinement ensured a sufficient number would be available for semen analysis. However, this practice could have reduced drone survival through flight deprivation and absence of defecation (Laidlaw, 1979). Due to the cumulative effect of these disturbances, only a few of the 35-day old drones were available for semen analysis.

Manual eversion

We found that only a low proportion of drones, 53%, produced the required 0.2 μ l of collectable semen. Rhodes et al. (2010) found a similarly low proportion of drones (40.6%) aged 14 to 35 days had sufficient semen production for analysis (Collin and Pettis, 2001 and Andersen, 2004 had comparable findings). These authors expressed doubts about the capability of these drones to mate with a queen in nature. In our study, drones that did not release semen after manual eversion could have been classified into two categories: those

with full eversion of the endophallus but no semen at the tip of the genitalia, and those arrested at the partly everted stage as described by Woyke (2008). Woyke suggested that the pressure inside the partly everted endophallus was probably too weak to provoke further eversion and release of semen. This phenomenon requires further investigation to determine whether drones in this state are able to mate with the queen and if so, whether semen is transferred into the oviducts.

Sexual maturation of drones is defined as the age at which sperm has completed migration from the testes to seminal vesicles and mucus glands are fully developed (Rhodes, 2008). In our study, the higher proportion of 35-day old drones (87%) compared to 14-day old drones (64%) with semen after manual eversion suggests that not all 14-day old drones have reached sexual maturity. According to several authors, drones aged 10-21 days are mature, and semen properties are most suitable for queen insemination (Harbo and Williams, 1987; Woyke and Jasinsky, 1978). Nevertheless, our findings indicate that a large proportion of young drones are not suitable for semen collection based on the manual eversion technique. It would be interesting to pursue this investigation in commercial queen breeding open-mated areas where there is a greater natural variety of drones. Information about the influence of restricting drones to the hive on semen expulsion also needs investigation.

Semen volume

Based on our study, the proportion of drones with semen after manual eversion seems to fluctuate during the beekeeping season in eastern Canada. This type of variation in drone fertility has also been observed in Australia (Rhodes et al., 2004) and in Jordan (Zaitoun et al., 2009). We found lower proportions of drones with semen in early May and mid-June (respectively 43% and 72%). Interestingly, semen volume was also lowest at these two breeding dates. We speculate that changes occurring in the active season of semen production might be explained by the same factors affecting drone production. A honeybee colony regulates male production throughout the growing season according to environmental factors such as colony size and food availability (Lee and Winston, 1987; McNally and Schneider, 1994; Boes, 2010). Because drones are more costly for the colony to produce than workers (Hrassnigg and Crailsheim, 2005; Seeley, 2002), colonies reduce drone production during times of a dearth of resources (Rowland and McLellan, 1987). In this regard, it is important to note that we encountered great difficulty rearing drones in early spring and late summer. Apparently, even if drone production is forced by caging a queen in a drone frame, workers will not rear drones when there is a shortage of resources, especially pollen, which can lead workers to cannibalize the brood (Schmickl and Crailsheim, 2001), a phenomenon we observed with drones from the last breeding date (July 28). The volume of semen was also influenced by the genetic line and drone age. The influence of genetics on semen production in the honeybee was examined by Rhodes et al., (2010), and they, too, found

differences in semen volume produced between lines and were even able to identify a line of drones producing higher volumes of semen. Our results also suggest that semen production can be a selectable trait for drone mother colonies to maximise semen production for further queen inseminations.

Sperm count

As previously reported in several studies, sperm count of sexually mature drones is highly variable (Gençer and Kahya, 2011; Koeniger et al., 2005). Because of this variance, a higher number of sampled drones and a second year of data could have given us more accurate information on the influence of drone age and sampling dates on sperm number. The mean sperm count (1.80 ± 1.65 million) obtained was quite low compared to the mean number of sperm per drone obtained by several authors, from 5.7 to 10 million (Gençer and Kahya, 2011, Rinderer et al., 1985; Schluns et al. 2003, Woyke, 1960), but is in the range obtained in other studies, from 1.47 to 3.63 million (Andersen 2004; Nur et al., 2012, Rhodes et al., 2010).

Sperm viability

Results obtained for sperm viability are of concern due to the generally poor viability found for drone sperm (mean $64.2 \pm 1.07\%$) throughout the active season. Previous studies on drone sperm viability have shown means ranging between 70 and 90% (Rhodes, 2008; Nur et al., 2012; Locke et Peng, 1993). According to Collins (2000), queens inseminated with semen with 42.5% viability resulted in large worker broods. Drone semen is sensitive to bacterial infection (Andere et al., 2011) and contamination can significantly reduce its viability (Locke and Peng, 1993). There is a need for a better understanding of the possible factors contributing to] reduction in sperm viability, aside from contamination during manipulation. The possible impact of the generalized poor sperm viability observed here on queen fertility problems identified by the industry also requires closer investigation.

This study clearly demonstrated that semen production of drone honeybees in eastern Canada fluctuates during the short beekeeping season. It would thus be appropriate for queen breeders to routinely test drones for semen quality, to ensure mating with the highest possible reproduction levels at commercial queen bee mating apiaries.

Acknowledgments

This project was funded by Agriculture and Agri-Food Canada via the Canadian Agricultural Adaptation Program (PCAA). We would like to thank the entire beekeeping staff of the Centre de recherche en sciences animales de Deschambault: Michaël Benoit, Émile Houle, Georges Martin and Sylvain Gingras. We would also like to thank Segolène Maucourt for her field and laboratory assistance and Gaétan Daigle for his help with statistical analyses.

Table 1 : Number of drones marked at emergence and proportion of drones with semen after manual eversion at various ages.

Rearing date	Number of drones marked at emergence	Proportion of drones with semen after manual eversion			Number of marked drones surviving 35 days
		14 days	21 days	35 days	
May 1	830	21/85 (24.7%)	25/84 (29.8%)	5/9 (55.6%)	9/830 (1.08%)
May 14	597	21/23 (91.2%)	19/29 (65.5%)	13/14 (92.9%)	14/597 (2.35%)
June 12	900	22/38 (57.9%)	17/27 (63.0%)	19/24 (79.2%)	24/900 (2.67%)
June 20	972	26/51 (51.0%)	33/38 (86.8%)	10/12 (83.3%)	12/972 (1.23%)
July 18	355	10/15 (66.7%)	11/13 (84.6%)	9/10 (90.0%)	10/355 (2.82%)
		Total of drones with semen after manual eversion : 261/472			
					(55.3%)

Table 2 : Results of the single factor Anova with repeated measurements for proportion of drones with semen, volume of semen, sperm count per drone and sperm viability.

<i>Effect</i>	Proportion of drones with semen			Volume of semen			Number of sperm			Sperm viability		
	Df	F	P	Df	F	P	Df	F	P	Df	F	P
<i>Drone Line</i>	1, 9.4	0.10	0.7595	1, 23.5	0.13	0.7197	1, 5.8	0.30	0.6060	1, 128	0.49	0.4850
<i>Rearing date</i>	4, 8.4	1.71	0.2359	4, 18.1	3.80	0.0206	4, 73.6	1.24	0.3010	4, 128	0.43	0.7883
<i>Drone line* Rearing date</i>	4, 7.1	0.24	0.9041	4, 18.2	1.49	0.2467	4, 55.4	0.46	0.7659	4, 128	1.18	0.3217
<i>Drone Age</i>	2, 450	3.94	0.0202	2, 16.5	2.89	0.0839	2, 153	0.64	0.5275	2, 128	0.31	0.7364
<i>Drone line* Drone age</i>	2, 450	0.73	0.4835	2, 15	4.13	0.0371	2, 152	0.67	0.5128	2, 128	0.59	0.5567
<i>Rearing date* Drone age</i>	8, 450	1.93	0.0535	8, 15.7	2.97	0.0313	8, 152	1.76	0.1814	6, 128	0.89	0.5059

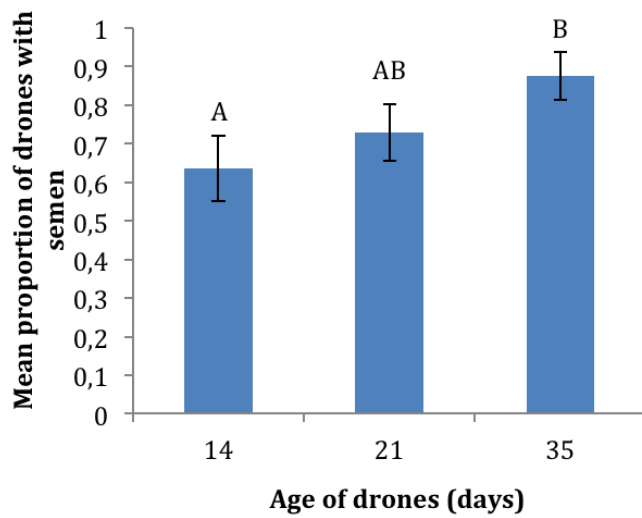


Figure 1 : Mean proportion of drones with semen at the tip of the endophallus after manual eversion for the 3 ages (in days) (\pm se). Different letters indicate significant difference ($F_{2,450} = 3.94$; $p = 0.0202$).

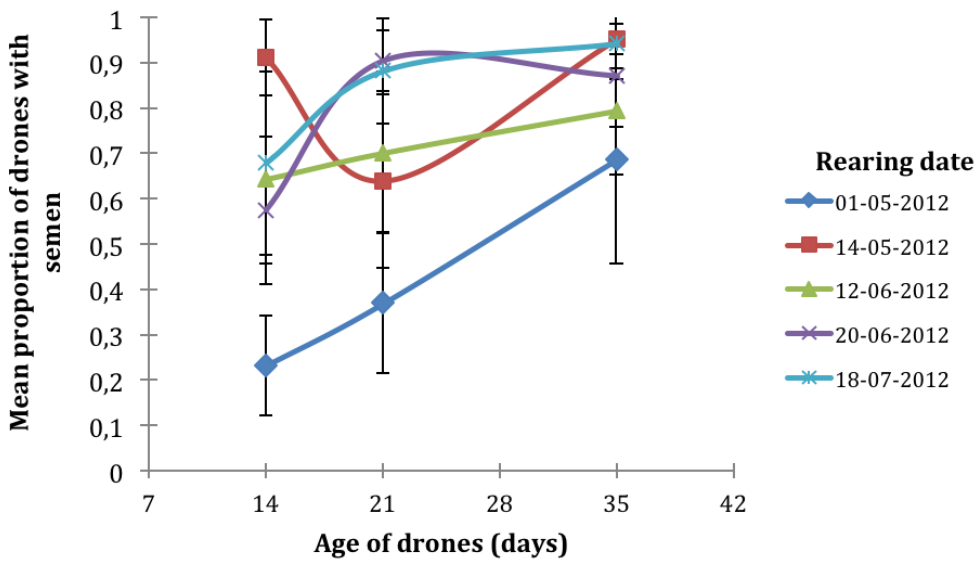


Figure 2 : Mean proportion of drones with semen at the tip of the endophallus after manual eversion for the five rearing date and for the three ages (\pm se) ($F_{8,450} = 1.93$; $p = 0.0535$).

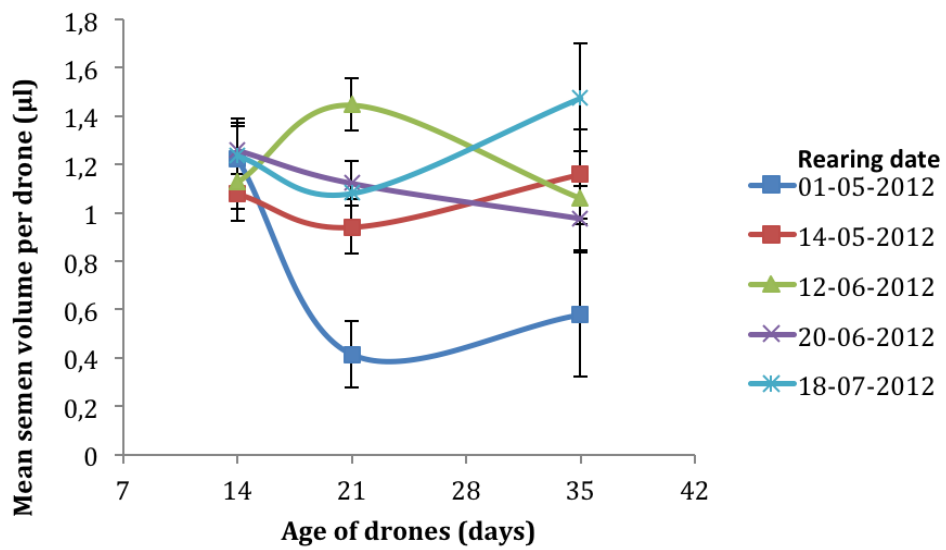


Figure 3 : Mean semen volume per drone (μl) for the three different ages (in days) and five rearing dates (\pm se) ($F_{8,15.7} = 2.97$; $p = 0.0313$).

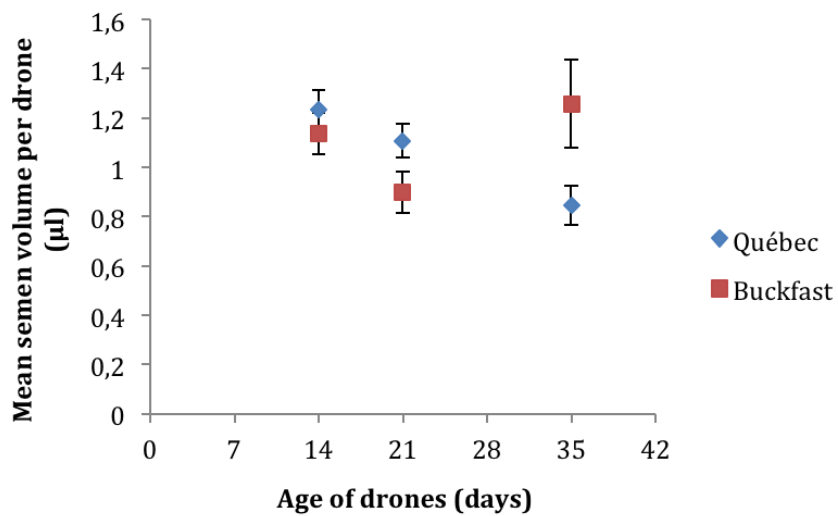


Figure 4 : Mean semen volume per drone (µl) for the three different ages (in days) and the two genetic lines, Québec and Buckfast (± se) ($F_{2,15} = 4.13$; $p = 0.0371$).

Objectif 4 : Optimisation de la fertilité des faux-bourçons avec des suppléments alimentaires au printemps /Optimizing drone fertility with nutritional supplements to colonies during spring

Résumé

La supplémentation alimentaire des colonies de l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) suite à la période de restriction nutritionnelle que représente l'hiver est cruciale à la survie et au bon développement du cheptel apicole québécois. L'alimentation des mâles de la colonie d'abeille ainsi que l'impact de la supplémentation alimentaire sur la production et la qualité du sperme des faux-bourçons sont relativement peu étudiés. Dans cette étude, des faux-bourçons ont été produits dans des colonies ayant soit accès à un supplément de pollen (N=5), à un supplément en sirop de sucre (N=5), à la combinaison des deux types de suppléments (N=5) ou aucune supplémentation alimentaire (N=5). Les faux-bourçons ont ensuite été évalués pour 1) les mesures morphométriques, 2) la production de sperme et 3) la qualité du sperme produit. Des faux-bourçons significativement plus lourds ont été obtenus dans les groupes nourris avec la combinaison des 2 types de suppléments (243 mg) et un indice abdominal plus faible pour les faux-bourçons non alimentés (42.49).

Des faux-bourçons significativement plus lourds et plus gros (index abdominal et longueur du thorax) ont été obtenus dans les groupes nourris une combinaison de suppléments protéique et glucidique. Les faux-bourçons du groupe témoin sans supplément alimentaire ont produit un volume moyen de sperme significativement plus bas que les faux-bourçons des groupes nourris (glucides, protéines ou les deux) et la viabilité des spermatozoïdes du groupe témoin était significativement plus faible (80%) du groupe alimenté avec la combinaison de pollen et de sirop (83%). Il n'y a pas de différence du comptage spermatique entre les groupes (près de 3×10^6 spermatozoïdes par faux-bourdon). Ces résultats suggèrent la nécessité de nourrir les colonies élèveuses de faux-bourçons pour optimiser leurs qualités reproductives et ainsi optimiser la fécondation des reines dans les élevages du Québec.

Abstract

Spring honey bee colony feeding is essential for colony build up in northern apicultural regions. Knowledge on the impact of this feeding on drone production and quality of their sperm production is not well documented and could result in poor fecundation of early bred queens. In this study we measure the impact of sucrose sirup and/or protein

supplement feeding to colonies in early spring. Our results show significant increase of drone weight and higher sperm viability when fed sucrose and protein supplement. Colonies without any additional nourishment had significantly less sperm volume per drone and lower per drone sperm viability. Our work shows that spring honey bee colony feeding with sucrose syrup and protein supplement are important for the production of fertile young drones and this will have an impact on young spring queen fecundation.

Methodology

Experimental design

To meet this objective, sister queen bees were imported from New Zealand (N=20) as packaged bees in April 2013. Bee packages were established in a 10-frame Langstroth beehive. Colonies were randomly divided into four experimental groups:

Group	Description
1- control (C)	No nutritional supplement
2- Sucrose syrup (S)	Fed sucrose syrup (1 :1) by Bowman feeder at a dose of 2 litres per week
3- Protein supplement (P)	Provided with protein supplement in the form of 15% pollen patties (Global Patties Inc.)
4- Protein supplement and sucrose syrup (PS) (PS)	Provided with sucrose syrup (1 :1) by Bowman dropper at a dose of 2 litres per week and pollen supplement in the form of 15% pollen patties (Global Patties Inc.)

Experimental treatments were begun on May 3, 2013. Colonies receiving sucrose supplements (1:1) were fed sucrose syrup (1 kg sugar / 1litre water) at a dose of 1 litre twice a week. Colonies receiving a protein supplement were provided a moist paste containing 15% natural pollen (Global Patties Inc.) in a soya flour base ad libitum throughout the experiment.

One week after the beginning of the experimental treatments, one worker brood frame was replaced by a drone frame with an unbuilt beeswax sheet placed in the middle of the colony brood chamber. The construction of drone cells and drone egg-laying were evaluated and noted regularly in order to establish the approximate date of emergence. A drone brood laid outside the drone frame was destroyed, to avoid confusion regarding the provenance and age of the bees at the time of sampling.

Two to three days before expected emergence of the drones, the frames were placed in a cage (Figure 1) to monitor emergence. The number of drones emerging during the five days following the beginning of emergence was noted for each colony.

Protocol for evaluating sperm production and quality

Drone sperm quality was evaluated at an age of 20 days, when they have reached maturity (Rousseau et al, 2013). For this procedure, approximately 50 drones per colony were selected at random, brought in a transport cage along with young nurse bees to the laboratory, where they were transferred to an evaluation cage (Figure 2).

Morphometric measurement

The following measurements were taken for each drone: wet weight, thorax width, abdomen width and length, the latter using a digital measuring caliper (vernier with 1mm precision). An abdominal index was then established by multiplying the length and width of the abdomen.

Manual eversion and sperm volume

The manual eversion technique was used to achieve eversion of the endophallus (genital organ of the drone) and, subsequently, the expulsion of sperm (Figure 3). Sperm was collected and measured using an insemination syringe (Gilmont, $\pm 0.2\mu\text{l}$). The volume collected was noted individually for each drone, and each syringe capillary tube held the sperm of five drones. For each colony, a total of seven tubes, each containing the sperm of five drones, was analyzed for sperm quality (N=35 drones evaluated per colony).

Spermatozoa viability

Sperm was transferred from each of the capillary tubes into a sterile 2.0 ml Eppendorf tube. To estimate the number of spermatozoa, $1\mu\text{l}$ of sperm was diluted in a second sterile Eppendorf tube containing 1.5 ml modified Kiev solution (dilution = 1500). This second tube of diluted sperm was used subsequently to evaluate the number of spermatozoa (2.2.4.). Another $500\mu\text{l}$ of Kiev solution was immediately added to the sperm remaining in the first Eppendorf to

evaluate the viability of the spermatozoa. The stains from the spermatozoa viability evaluation kit (Live/Dead Sperm Viability Kit) were allowed to come to room temperature and isolated from any light source. The SYBR-14 stain was then diluted 50 times (1ul of SYBR in 49 µl of modified Kiev solution) in a sterile Eppendorf. Once at room temperature, 10 µl of SYBR-14 was added to the sperm dilution, then incubated at 36°C for 10 minutes. Subsequently, 5 µl of propidium iodide was added, and the resulting solution was incubated at 36°C for another 10 minutes. Under a microscope equipped with a fluorescent light, 4 slides of 10 µl of diluted sperm were observed at 400x. For each slide, a count of live (stained green) and dead (stained red) spermatozoa was performed on a total of 200 spermatozoa per slide. The average percent viability was then calculated.

Number of spermatozoa

The Eppendorf tube containing 1ul of sperm diluted in 1.5ml modified Kiev solution was homogenized using a vortex. Each of the two chambers of a Cell-vu® hemacytometer was filled with approximately 4 µl of the homogenized diluted sperm solution. Two Cell-vu® hemacytometer slides were evaluated for each capillary tube of sperm, for a total of four counts of the number of spermatozoa per tube. Under a phase contrast microscope, the number of spermatozoa present in the 100 squares of the hemacytometer chamber was counted at 100x magnification. Subsequently, a mathematical average of the four spermatozoa counts was computed, and the following formula was used to obtain the number of spermatozoa per ml:

$$\text{Number of spermatozoa/ml} = \text{average number of spermatozoa in 100 squares} \times 50\,000 \times \text{dilution (1500)}$$

The following formulae was then applied to obtain the average number of spermatozoa per drone :

$$\text{Number of spermatozoa/male} = (\text{Number of spermatozoa/ml} \times \text{average volume of sperm per male}) / 1000$$

Statistical analyses

Analysis of variance was performed using SAS 9.3 software. Estimates of homogeneity of variance and normal distribution were verified and, when necessary, transformed. The effect of treatments on drone morphometric measurements (weight, thorax width, abdomen width and length) and on sperm production and quality (sperm volume, number and viability of spermatozoa) was evaluated using a generalized linear model (GLM). Analysis of variance was performed on individual data for drone morphometric measurements.

Results

Morphometric measurements

In total, 926 drones were evaluated. Analysis of variance was performed to verify the influence of nutritional supplements on drone morphometric measurements, on the weight, abdomen width, abdomen length and thorax width. The results of this analysis are shown in Table 1, and the average morphometric measurements for each treatment in Table 2.

According to results, there were significant differences of drone weight according to treatment ($F(3,913) = 2.71$, $p = 0.0441$; Figure 1). In fact, comparison of the average drone weight for each group by a Least Significant Differences test (LSD) showed that PS group colonies had a significantly higher weight than the group fed with pollen alone (Table 2).

Analysis of variance also showed that there were significant differences between groups in terms of drone abdominal measurements ($F(3,904) = 9.48$, $p = p \leq 0.001$; Table 1). When the LSD test was performed, the C group was significantly different from the others (Table 2). In fact, the C group drones had a lower average abdominal index than drones in the three other groups. However, the C group drones had a significantly wider thorax measurement than the drones in other groups ($F(3,909) = 11.81$, $p \leq 0.001$); the drones of the PS group also had a thorax larger than drones in the S and P groups.

Sperm production and quality

Analysis of variance was performed to evaluate the influence of the treatments on sperm production and quality (average sperm volume, average number of spermatozoa/ml, average number of spermatozoa/male and average viability of spermatozoa). Results showed that average sperm volume differed amongst treatments ($F(3,120) = 5.40$, $p = 0.0016$), as did the average viability of spermatozoa ($F(3,120) = 2.96$, $p = 0.0349$) (Table 2).

A simple comparisons test on the average sperm volume produced under each treatment (LSD) showed that the C group drones performed significantly on this measure than drones of the three other treatments ($F(3,120) = 5.40$, $p = 0.0016$), Figure 4).

A simple comparisons test on the average percentages of spermatozoa viability under each treatment (LSD) showed that the viability of the C group spermatozoa was significantly different from that of the PS group ($F(3,120) = 2.96$, $p = 0.0349$, Figure 5).

The average number of spermatozoa per ml and the average number of spermatozoa per male did not seem to have been influenced by the treatments ($p=0.5663$ and $p=0.9928$ respectively, Table 3). However, we know that the number of spermatozoa is highly variable from one drone to another (Gençert and Kahya, 2011; Koeniger et al., 2005). Consequently, analysis of the correlation between the different variables associated with sperm production and quality (Table 5) show significant correlations of the number of spermatozoa per male vs the volume of sperm produced ($r=0.4509$; $p<0.001$) and number of spermatozoa per male vs number of spermatozoa per ml of sperm ($r=0.9431$, $p<0.0001$). No significant correlations were measured between other variable ($p>0,05$).

Discussion

Morphometric measurements

The experimental design used in this work made it possible to determine that nutritional supplements have an impact on drone weight and size. With regard to weight, drones from group 4, who received supplements of pollen and syrup, had the highest average weight, 243 mg (± 1). For the abdominal index, drones from the control group, with no nutritional supplement, had the lowest average (42.49 ± 0.26). On average, this group also had a larger thorax ($5.45 \text{ mm } 0.014$) compared to the groups that received supplements.

Sperm production and quality

Within this project objective, it was also possible to determine the influence of supplementary feeding on drone sperm production and quality. Analyses showed that feeding affected both the sperm volume produced by the male and the viability of the spermatozoa in the ejaculate. In fact, both the average volume collected from control group drones ($1.09 \mu\text{l} \pm 0.03$) and the viability of their spermatozoa were lower ($79.73\% \pm 0.95$). Highest viability was found in group 4 drones, who had received pollen and syrup supplements ($82.93\% \pm 0.45$). The increased viability of spermatozoa with pollen protein intake was previously observed by Mindt (1962).



Figure 1. Photo of an exclusion cage used to force queen to lay drone eggs in the drone frame. One queen is placed inside cage for a 24 hour laying period.



Figure 2. Flight cage were drones are placed prior to sperm collection. Cage contains water, clear honey and young workers that insure drone weelbeing. An small incandescent light placed over cage promotes drones flight and defecation and helps sperm collection.



Figure 3. Eversion of drone endophallus and expulsion of sperm. Sperm is on top of a white mucus and distinguishable by its brownish color.

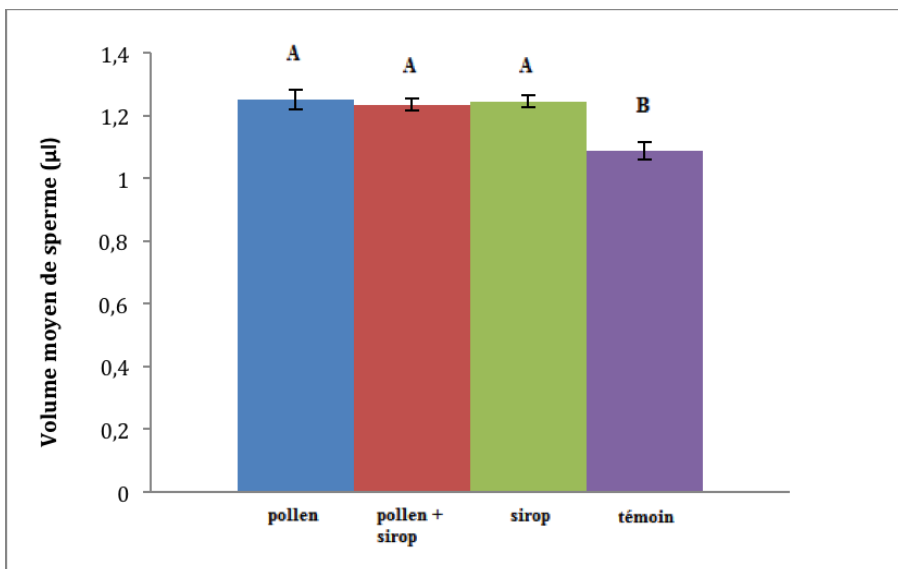


Figure 4. Average drone sperm volume ($\mu\text{l} \pm \text{S.E.}$) measured amongst various experimental groups. Different letters above bars indicate a significant difference ($F_{(3,120)} = 5.40$, $p = 0.0016$, LSD test).

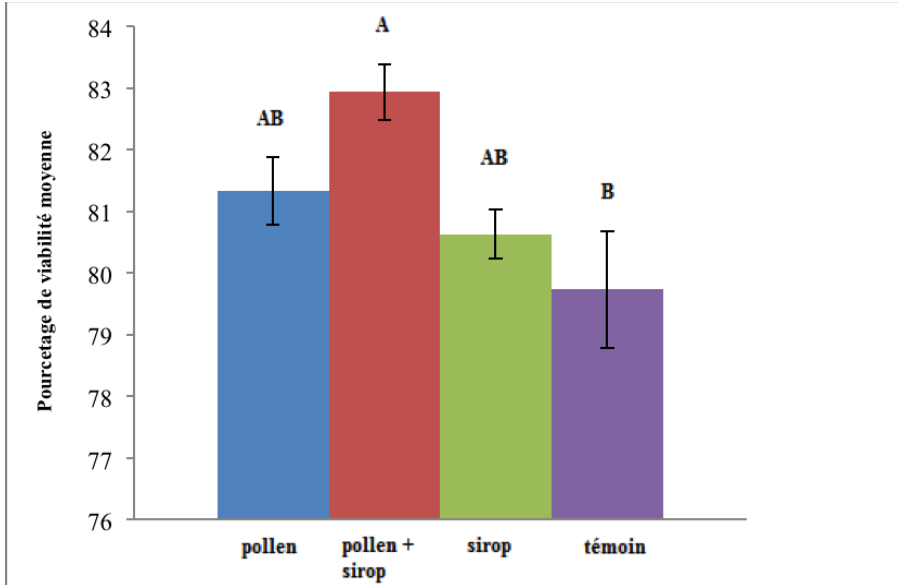


Figure 5. Average drone sperm viability (% ± S.E.) measured amongst various experimental groups. Different letters above bars indicate a significant difference ($F_{(3,120)} = 2.96, p = 0.0349$, LSD test).

Tableau 1 : Anova table statistics for various morphometric measurements and experimental groups.

	Weight			Abdominal index			Thorax length		
	d.l.	F	Pr > F	d.l.	F	Pr > F	d.l.	F	Pr > F
Traitement	(3, 913)	2.71	0.0441*	(3,904)	9.48	<0.0001**	(3,909)	11.81	<0.0001**

Tableau 2 : Morphometric measurements in different experimental groups. Different lettres between lines values in each colomn indicate significant differences between groups ($p < 0.05$, LSD test).

Group	Weight (mg) \pm S.E	Abdominl index \pm S.E.	Thorax lenght (mm) \pm S.E.
Control (C)	240 \pm 1 (ab)	42.49 \pm 0.26 (a)	5.45 \pm 0.014 (a)
Sucrose sirup (S)	241 \pm 1 (ab)	44.17 \pm 0.24 (b)	5.32 \pm 0.011 (b)
Protein supplement (PS)	238 \pm 1 (a)	43.82 \pm 0.26 (b)	5.29 \pm 0.021 (b)
Protein supplement and sucrose (PS)	243 \pm 1 (b)	43.89 \pm 0.23 (b)	5.39 \pm 0.010 (c)

Tableau 3 : Anova table statistics for various sperm evaluation variables and experimental groups.

	d.l.	Sperm volume/drone		Sperm count/ml of sperm/drone		Sperm count/drone		Sperm viability/drone	
		F	Pr > F	F	Pr > F	F	Pr > F	F	Pr > F
		Traitment	(3/120)	5.40	0.0016*	0.68	0.5663	0.03	0.9928

Tableau 4 : Values of sperm evaluation variables for experimental groups. Different lettres between lines values in each column indicate significant differences between groups ($p < 0.05$, LSD test).

Groups	Average sperm volume (μ l) \pm S.E.	Average sperm count/ μ l/drone \pm S.E.	Average sperm count/drone \pm S.E.	Average sperm viability/drone \pm S.E.
Control (C)	1.09 \pm 0.03 (b)	2.77 \pm 0.20 $\times 10^9$	3.05 \pm 0.25 $\times 10^6$	79.73 \pm 0.95 (b)
Sucrose sirup (S)	1.25 \pm 0.02 (a)	2.55 \pm 0.16 $\times 10^9$	3.16 \pm 0.23 $\times 10^6$	80.63 \pm 0.40 (ab)
Protein supplement (PS)	1.25 \pm 0.03 (a)	2.31 \pm 0.32 $\times 10^9$	3.05 \pm 0.48 $\times 10^6$	81.33 \pm 0.55 (ab)
Protein supplement and sucrose (PS)	1.23 \pm 0.02 (a)	2.48 \pm 0.25 $\times 10^9$	3.11 \pm 0.35 $\times 10^6$	82.93 \pm 0.45 (a)

Tableau 5. Pearson correlation indexes for various combinations of sperm evaluation variables (*p< 0.01; **p<0.0001).

	Sperm volume/drone	Sperm count/ μl/drone	Sperm count/drone	Sperm viability/drone
Sperm volume/drone	1.00			
Sperm count/ μl/drone	0.1666	1.00		
Sperm count/drone	0.4509*	0.9431**	1.00	
Sperm viability/drone	-0.0749	-0.0521	-0.0733	1.00

Objectif 5 : Impact d'une dose sublethale d'imidaclopride, d'un traitement anti varroa à l'acide formique et leur effet synergique sur le développement et fertilité des faux-bourçons / Drone development and fertility in relation to a Varroa formic acid treatment, a sublethal imidacloprid dose and their synergetic effect.

Summary

One of the keys to protecting honey bee colonies from parasites (e.g.: varroaosis) and other diseases is the ability to identify and respond to such threats rapidly when the first signs appear. At the same time, for the past 20 years, the effects of pesticide toxicity have been the subject of an increasing number of studies. The aim of the present study was to determine the impact and potential synergistic effect of administering the varroacide Mite-Away Quick Strips™, followed by a sub-lethal dose of imidacloprid on the development and fertility of drone.

The first step in our investigation was to describe the histomorphological changes that occur in developing drone (*Apis mellifera* L.) testes from the larval to pupal stages and the second step was to verify if there is an impact on drone morphometrics and sperm quality.

We observed that the structural units of testes (testioles) had already formed in the third instar larval stage, and spermiogenesis occurred during the pupal stage, when the testes attain their maximal development. During the prepupal stage, there were obvious signs of testes degeneration (apoptosis), without any significant inflammation. These degenerative changes followed a peripheral and segmental pattern. In this study, we failed to detect any chemical-related effect on testicular development and we believe that the testicular degeneration observed was an incidental finding. Furthermore, results do not show any impact of various experimental treatments on drone sperm quality. The varroa MAQS treatment resulted in reduced levels of mites when compared to groups without MAQS.

Introduction

The honey bee mite *Varroa destructor*, an ectoparasite of honey bees that causes serious economic losses to apiculture annually, has attained epidemic levels in most beekeeping countries, contributing to the severe decline of the beekeeping industry by feeding on larval and adult *Apis mellifera* L., transmitting entomopathogens (Liu and

Ritter, 1988), lowering brood survivorship (Yang and Cox-Foster, 2006), and damaging hives by defecating in the wax-comb cells (Erickson, 1996).

The survival of the honeybee colony depends on successful mating of the queen, which in turn depends on the viability of the sperm produced by drones. Although many studies show that miticides reduce varroa populations, it has been suggested that exposure to anti-parasitic drugs could produce undesirable effects in honey bees including decreased weight of both drones and their reproductive organs as well as reduced sperm production and drone survival (Rinderer et al., 1999).

This study sought to establish a dose-response relationship regarding the histomorphological aspect of the testes when larval to pupal drones are exposed to a sub-lethal dose of two miticides (Mite-Away Quick Strips™ and imidacloprid) and their synergic effect. We also measured the impact of these treatments on drone morphometrics and sperm quality.

Methodology

Experimental protocol

Twenty honey bee colonies, 10-frame Langstroth hives, started from New-Zealand imported package bees were used for this experiment. These colonies were of similar strength and had similar varroa infestation levels at the start of the trials. Colonies were randomly divided into four experimental groups:

Group	Description
1- Control	No treatment, fed sucrose syrup (1 :1, by Bowman feeder).
2- MAQS	MAQS® Varroa treatment used as directed on the label.
3- IMIDA	Fed sucrose syrup (1:1, by Bowman feeder) with a sub-lethal concentration of imidacloprid (10 ppb) ad libitum.
4- MAQS x IMIDA	MAQS® Varroa treatment as directed on the label and fed sucrose syrup (1 :1, by Bowman feeder) with a sub-lethal concentration of imidacloprid (10 ppb) ad libitum.

The experimental treatments were begun on July 11, 2013. The control group received sucrose syrup (1:1) through a Boardman feeder, at a dose of 3 litres per week for a total of 2 weeks. Groups 2 and 4 received the varroacide Mite-Away Quick Strips™ according to the dose recommended by the manufacturer, e.g. a full dose placed on the upper brood chamber. Colonies 3 and 4 received imidacloprid diluted in a 1:1 sucrose solution at a sub-lethal concentration of 10 ppb per 3 litres of solution per week for a total duration of 2 weeks. At the time of the first experimental feeding, the queen of each of the 20 colonies was placed in an exclusion cage (Figure 1, Objective 4) containing a built drone frame for 24 hours. Once this period of time had elapsed, the cage was removed from each hive/colony, the drone egg frame was replaced at the center, and each of the queens was freed.

Histopathology of drone reproductive tissues

To obtain the drones, the queen was isolated for 48h in an exclusion cage located in the center of the brood nest. Subsequently, the queen was released and a half-range of alveoli was placed in the center of the brood nest, where the drones would follow their normal development.

Twenty-five drone larvae per colony of different ages (6, 12 and 18 days old) were collected and placed in Bouin fixative. After 24h of fixation, the tissues were transferred into ethyl alcohol 70% and processed for dehydration using ascending grades of butyl alcohol. Based on a previously published technique, after dehydration, the tissues were infiltrated with and embedded in paraffin (Paraplast®) prior to sectioning and staining as follows:

The tissues were dehydrated in a graded series of ETOH to tertiary-butyl alcohol:

- 1) 80% ETOH, 2h
- 2) 95% ETOH, 2h
- 3) 100% ETOH, 1h
- 4) 100% ETOH, 1h
- 5) Absolute ETOH:butanol (1:1), 2h

Steps 6-8 were performed at a temperature of $\geq 25.5^{\circ}\text{C}$, this precise temperature being essential because it is the melting point of t-butyl alcohol:

- 6) 100% butanol, 2h
- 7) 100% butanol, 2h
- 8) 100% butanol, 2h

Steps 9-11 were performed in an oven at 60°C :

- 9) Butanol:paraffin (1:1), 2h
- 10) 100% paraffin, 2h
- 11) 100% paraffin, under vacuum, 2h.

The thin sections (4µm) were deparaffinized using descending grades of alcohol and stained with haematoxylin and counter-stained with eosin for light microscopic observation.

Protocol for evaluating sperm production and quality

When the drones reached an age of approximately 15-20 days, sperm production and quality were evaluated using the same method as for the drones studied in Objective 4. Thus, about 50 drones per colony were collected at random and brought to the laboratory in a transport cage with young nurse bees, then, once on site, transferred to an evaluation cage. At the beginning of the experimental protocol, the queen of group 3 (IMIDA) was crushed, and consequently we have no data on the drones of this colony. Furthermore, drone rearing was unsuccessful for 2 other colonies – one colony from group 1 (control) and one from group 2 (MAQS). In total, 17 colonies were evaluated for this objective.

Morphometric measurements

The following measurements were taken for each drone in the study: wet weight, thorax width, abdomen width and length (digital measuring caliper, 1mm precision). An abdominal index was then established by multiplying the length and width of the abdomen.

Manual eversion and sperm volume

The manual eversion technique was used to achieve eversion of the endophallus (genital organ of the drone) and, subsequently, the expulsion of sperm (Figure 3). Sperm was collected and measured using an insemination syringe (Gilmont, ± 0.2µl). The volume collected was noted individually for each drone, and each syringe capillary tube held the sperm of 5 drones. For each colony, a total of 7 tubes, each containing the sperm of 5 drones, was analyzed for sperm quality (N=35 drones evaluated per colony).

Spermatozoa viability

Sperm was extracted from each of the capillary tubes into a sterile 2.0 ml Eppendorf tube. To estimate the number of spermatozoa, 1µl of sperm was diluted in a second sterile Eppendorf tube containing 1.5 ml modified Kiev solution (dilution = 1500). This second tube of diluted sperm was used subsequently to evaluate the number of spermatozoa

(2.2.4.). Another 500µl of Kiel solution was immediately added to the sperm remaining in the first Eppendorf to evaluate the viability of the spermatozoa. The stains from the spermatozoa viability evaluation kit (Live/Dead Sperm Viability Kit) were used at room temperature and isolated from any light source. A SYBR-14 stain was then diluted 50 times (1ul of SYBR in 49 µl of modified Kiev solution) in a sterile Eppendorf. Once at room temperature, 10 µl of SYBR-14 was added to the sperm dilution, then incubated at 36°C for 10 minutes. Subsequently, 5 µl of propidium iodide was added, and the resulting solution was incubated at 36°C for another 10 minutes. Under a microscope equipped with a fluorescent light, 4 slides of 10 µl of diluted sperm were observed at 400x. For each slide, a count of live (stained green) and dead (stained red) spermatozoa was performed on a total of 200 spermatozoa per slide. The average percent viability was then calculated.

Number of spermatozoa

The Eppendorf tube containing 1ul of sperm diluted in 1.5ml modified Kiev solution was homogenized using a vortex. Each of the two chambers of a Cell-vu® hemacytometer was filled with approximately 4 µl of the homogenized diluted sperm solution. Two Cell-vu® hemacytometer slides were evaluated for each capillary tube of sperm, for a total of 4 counts of the number of spermatozoa per tube. Under a phase contrast microscope, the number of spermatozoa present in 100 squares of hemacytometer chamber was counted at 100x magnification. Subsequently, a mathematical average of the 4 spermatozoa counts was computed, and the following formula was used to obtain the number of spermatozoa per ml:

$$\text{Number of spermatozoa/ml} = \text{average number of spermatozoa in 100 squares} \times 50\,000 \times \text{dilution } 1500$$

The following formulae was then applied to obtain the average number of spermatozoa per drone:

$$\text{Number of spermatozoa/male} = (\text{Number of spermatozoa/ml} \times \text{average volume of sperm per male}) / 1000$$

Varroa destructor infestation rates

Initial percentage of varroa infestation was first evaluated on July 11, 2013, using the alcohol wash method (Boucher, 2004). Approximately 80 ml of bees was collected from the brood frames of each colony and mixed with 250 ml of ethyl alcohol to separate varroa from bees. The percentage of infestation was calculated for each colony (number of varroa/100 bees, Table 1).

In order to evaluate the efficacy of the varroacide treatment with Mite-Away Quick Strips™ on the varroa population of each colony, the natural drop of varroa was calculated using full-length sticky boards placed on the bottom of each hive. Sticky boards were changed each week during a period of 6 weeks following application of the treatments (Table 1).

Statistical analysis

Analysis of variance was performed using SAS 9.3 software. Assumptions of homogeneity of variance and normal distribution were verified and, when necessary, transformed. The effect of treatments on drone morphometric measurements (weight, thorax width, abdomen width and length) and on sperm production and quality (sperm volume, number and viability of spermatozoa) was evaluated using a generalized linear model (GLM). Analysis of variance was performed on individual data for drone morphometric measurements, but on the averages for sperm production and quality in the case of each colony.

Results

Histopathology of drone reproductive tissues

The differentiation of the reproductive system in honey bee drones based on histological studies of testes development and spermatogenesis during the larval and pupal stages was studied. The male reproductive system of drones consists of a pair of testes, two *vas deferens*, a pair of seminal vesicles, a pair of mucus glands, and a penis with an ejaculatory duct

The testes, which occupy a large portion of the abdomen, lie dorsal, lateral and ventral to the alimentary tract and the heart (Fig. 1). In the third instar larval stage, the testes become evident and are composed of numerous developing testioles (tubules), ovoid or tubular, completely separated by a thin follicular membrane, radially arranged and covered by a thin layer of peritoneal connective sheath. The testioles, covered by myoepithelial cells, are separated from one another by interstitial tissue that contains individual yet undifferentiated cells of ellipsoidal shape, 15µ in diameter, similar to interstitial cells in mammalian species (Fig. 2).

During the pre-pupal stage, multiple dramatic organizational changes can be noted on the testes. At this point, cell degeneration is the predominant picture and most conspicuous lesions occur in the peripheral region of the testes (Fig. 3). Upon examination of the cross sections under a light microscope, the tubules were found to exhibit extensive cell death. The lesion was composed of foci of cellular degeneration (cells with clear cytoplasm and eosinophilic, pale

nucleus, Fig. 4a) or necrosis (smaller cells with contracted, intensely eosinophilic cytoplasm and shrunken, angular or fragmented nucleus, Fig. 4b), following a partial to global pattern and replacing a variable part of the normal testes architecture. This type of lesion, manifest to a variable degree, was observed in the control group of drones as well as in the treated colonies. These findings could be considered alarming in the present context, because previous studies found that testicular functions as well as spermatogenesis were negatively influenced by pesticide treatments (Johnson et al., 2013).

We failed to observe significant differences in histomorphological changes between the control group and the treated colonies, and we believe that the lesions were more likely incidental or age-related. We have confidence in this hypothesis because, in the pre-pupal stage, the entire insect body is subject to consistent changes that manifest mainly as apoptosis and degeneration. For example, near the degenerating testes, the intestines are already difficult to recognize, as are the fat bodies (Fig. 5). We rarely identified regenerative cells next to the degenerating muscle layer (Fig. 6). On the other hand, at this stage, the testes showed signs of degeneration, characterized by accumulation of necrotic cells in the lumen, without any significant differences between the control and treated groups (Fig. 7). This is additional evidence that the degeneration we observed is related to normal morphological changes occurring in the insects during their normal anatomo-functional development.

Later in their evolution, in the white-eyed pupal stage, testicular development was shown to take a quite different route. Each tubule containing primary spermatogonia (psg) subsequently divided into a group of secondary spermatogonia (spg), and the latter became encapsulated in a thin-walled cyst, within which they would develop into spermatocytes (sp) (fig. 8a), conferring the "starry sky appearance" of the histological sections (Fig. 8b).

The testes completed development in the pupa; between the fifth and sixth day of the pupal period, spermatogenesis was completed and the spermatozoa began to be released (9a). By the seventh day, the testes occupied a large space in the posterior part of the abdomen (fig.9b).

Morphometric measurements

In total, 878 drones were evaluated for Objective 5. In order to verify the influence of using pesticides in the bee colony on drone morphometric measurements, analysis of variance was performed on the weight, abdominal index and thorax width. The results of this analysis are shown in Table 2, and the average morphometric measurements for each treatment in Table 3. Analysis of variance showed significant differences between groups for all morphometric variables. Significant differences were evident for drone weight ($F_{(3,868)} = 18.04$, $p < 0.0001$; Table 2). When we compared the mean weight of the experimental groups and performed a test of Least Significant Differences (LSD),

results for the mixed group MAQS+IMIDA were distinct from those of the three other groups. The drones of this group had a significantly higher average weight than drones in other groups, 262 ± 2 mg.

Analysis of variance also showed significant differences in abdominal index ($F_{(3,852)} = 42.74, p < 0.0001$; Table 2). An LSD test on average abdominal indices showed that the mixed group MAQS+IMIDA differed from the others (Table 3). In fact, this group had the highest abdominal index, 47.09 ± 0.26 mm.

Finally, analysis showed significant differences in drone thorax width ($F_{(3,865)} = 33.13, p < 0.0001$; Table 2). An LSD test again confirmed that the MAQS+IMIDA group differed from the others, with its drones having the highest average thorax width, 5.39 ± 0.02 mm (Table 3). Furthermore, analysis showed that the drones in the MAQS group also had a thorax width superior to those of the control and IMIDA groups.

Sperm production and quality

One of the main goals of this project was to determine whether using MAQS and applying imidacloprid in sub-lethal doses affected sperm production and quality. Analysis showed that the use of these products did not seem to affect either sperm production or quality in drones. In fact, Table 4 shows the results of variance analysis of the effect of treatments of the variables sperm production and quality. The four groups of drones did not differ in terms of average [?]volume of sperm produced ($F_{(3,106)} = 0.68, p = 0.5648$), average number of spermatozoa per ml of sperm ($F_{(3,106)} = 1.23, p = 0.3035$), average number of spermatozoa per drone ($F_{(3,106)} = 0.71, p = 0.5480$), ($F_{(3,106)} = 0.51, p = 0.6738$) or average viability of spermatozoa.

Varroa destructor infestation rates

The table shows the level of initial infestation per colony for each experimental group, as well as the average number of varroa found each week on the sticky cardboard. During the first 2 weeks following treatment, significant levels of varroa were found among groups 2 and 4, treated with the varroacide (37.8 and 48 for week 1; 14.6 and 25 for week 2) compared to groups 1 and 3, not treated with this product (11 and 7.5 for week 1; 7.4 and 5 for week 2). Less and less varroa were found subsequently in the groups treated with varroacide, up to the 6th week (an average of 11 and 9.8 per week for groups 2 and 4). In the colonies not treated with varroacide, however, mite fall increased steadily throughout the sampling period, up to 26.0 and 25.0 on average per week for groups 1 and 3.

Discussion

Histopathology of drone reproductive tissues

The histomorphological development of the male reproductive system was investigated in this study in relation to the administration of pesticides.

The well individualized, ovoid or tubular, radially arranged, testicular tubes in drones of *Apis mellifera* become visible in third larval instar and are covered by myoepithelial cells. They appear to be completely separated from other organs by a thin layer of peritoneal connective sheath and are separated from one another by moderately cellular interstitial tissues. In white-eyed pupal stage, the testioles contain primary spermatogonia that subsequently divide into a group of secondary spermatogonia, and the latter become encapsulated in thin-walled cysts named spermatocytes, that confer a "starry sky appearance" to the histological sections.

During the pre-pupal stage, the testioles exhibit signs of extensive cell death. Following a peripheral, partial to global pattern and replacing a variable portion of the normal architecture the testes, the lesion is characterized by foci of cellular degeneration and necrosis.

Although previous studies put forth a consistent morpho-functional influence of pesticides treatments on the male reproductive system (Johnson et al., 2013) we failed to confirm those findings by light microscopic investigations. This discrepancy is likely explained by differences in dose exposure to pesticides. The degenerative findings that we observed in both treated and untreated (control) bees were considered incidental or related to the normal development of the insect. These degenerative changes are not surprising considering that, in pre-pupal stages, the whole insect body is subject to remarkable changes characterized mainly by apoptosis and degeneration. These background testicular lesions were observed only in pre-pupal stages, without any differences between the control group and the treated colonies.

Morphometric measurements

Carrying out the experimental protocol made it possible to determine: that the synergetic effects of the simultaneous/cotemporaneous application of the varroacide Mite-Away Quick Strips™ and the neonicotinoid imidacloprid at doses sub-lethal to the bees were indeed evident in the size and weight of the drones in these colonies. In fact, weight, as well as dimensions of the abdomen and thorax, were superior in group 3 which benefited from the combined treatments, compared to the measurements of drones in the three other experimental groups. To our knowledge, no other study has reported these findings.

Sperm production and quality

The results of this study showed no impact of administering pesticides to the drones produced and raised in these colonies on their sperm production or quality. In fact, sperm volume and number as well as viability of spermatozoa of the four experimental groups were similar.

Efficacy of the varroacide Mite-Away Quick Strips™

Follow-up of varroa drop inside the colonies following application of the treatments made it possible to evaluate the efficacy of the varroacide Mite-Away Quick Strips™. Results showed that the varroacide reduced the load of mites for a minimum of 6 weeks after application. On the other hand, in colonies that did not receive treatment for mites, load increased over the same period.

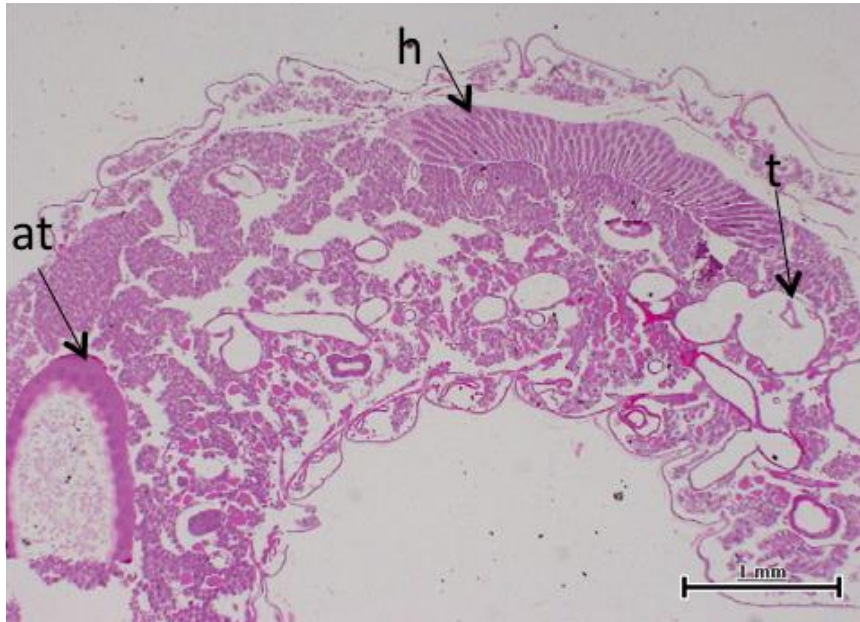


Fig. 1. Light microscope image of a sagittal section of the third instar larval stage (L3) of a drone (control group).
Note the presence of testes (t) lying dorsal and lateral to the alimentary tract (at) and the heart (h)(col. HEx10).

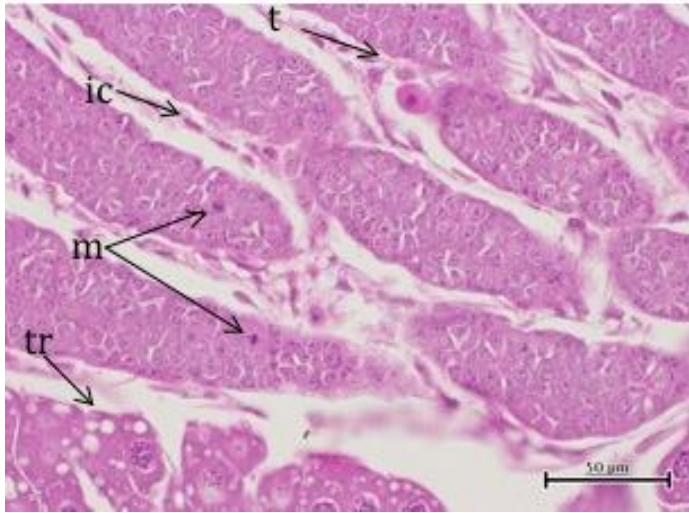


Fig. 2. Histological aspect of a cross-section of the testicules in L4 drones (control group). The as yet undifferentiated interstitial cells (ic) separate and surround the forming tubules (t). Few trophocytes(tr) (fat body cells) and rare mitoses (m) can be seen as well (col. HEx40).

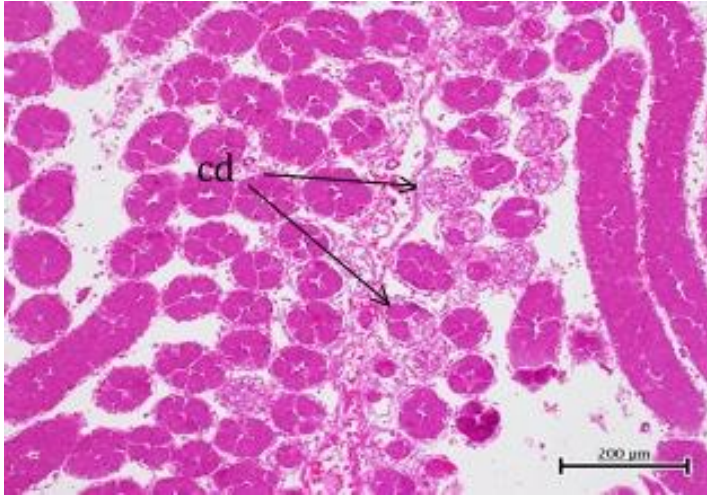


Fig. 3. Histological aspect of a cross-section of the testicles in the prepupal stage of drones (control group).
The tubules exhibit signs of extensive cell death (cd) following a peripheral and generally segmental pattern (col. HEx4).

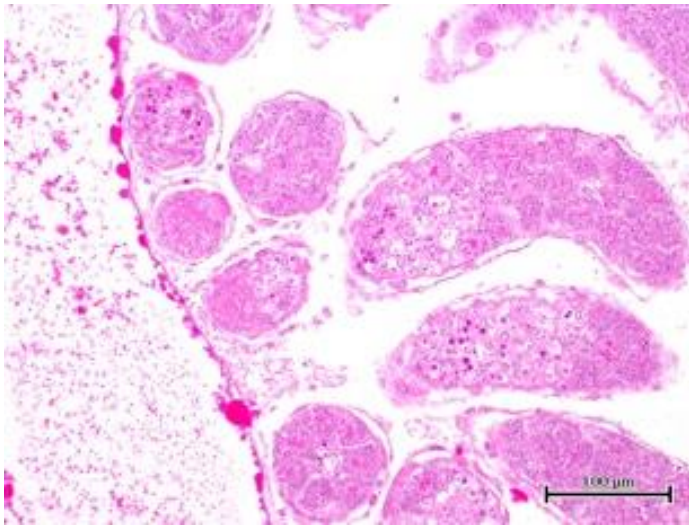
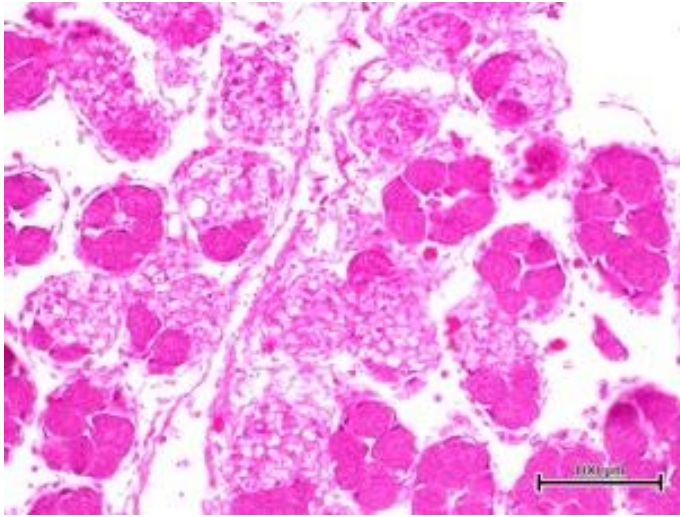


Fig. 4. Light microscope image of drone (control group) testicular cross sections at the pre-pupal stage .
The testicular architecture has been highly modified, exhibiting extensive areas of cellular degeneration (a) or necrosis(b) (col. HEX10)

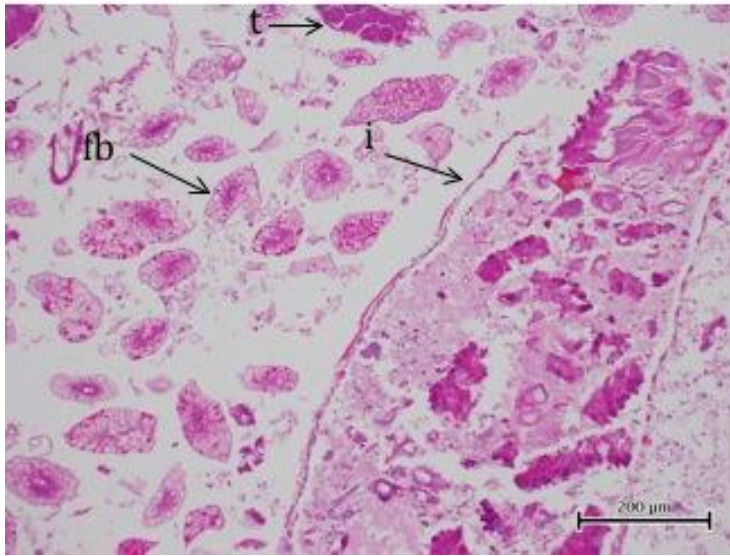


Fig. 5. Histological aspect of the transforming pre-pupal stage in drones (group 2 colony 578)
Note that, near the degenerating testes (t) both the intestine portion (i) and fat bodies (fb) are barely recognizable(col. HEx10)

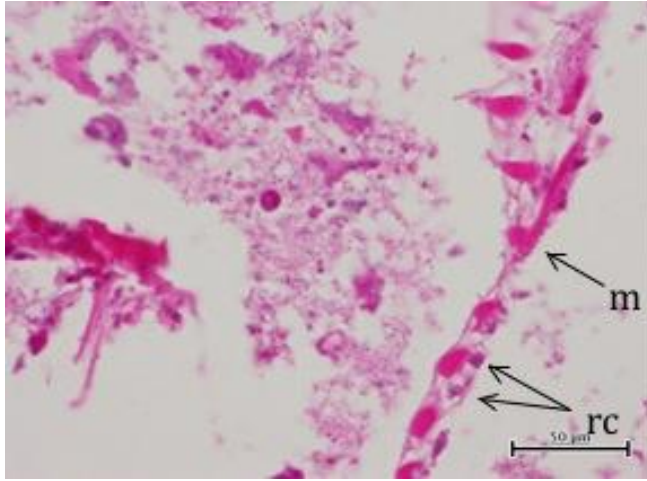


Fig. 6. Light microscope image of a longitudinal section of the transforming alimentary tract in the drone pre-pupal stage (group 2 colony 578). The epithelium has completely disappeared, and the regenerative cells (rc) and few muscle fibres (m) are difficult to identify (col. HEx40).

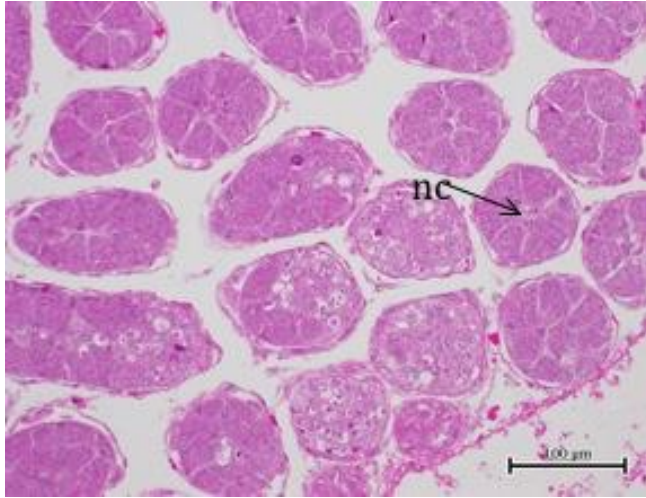


Fig. 7. Light microscope image of a testicular cross section in the drone pre-pupal stage (group 2 colony 578).
Note the presence of necrotic cells in the lumen of testioles as well as the partial to global necrosis of the tubules (col. HEx20)

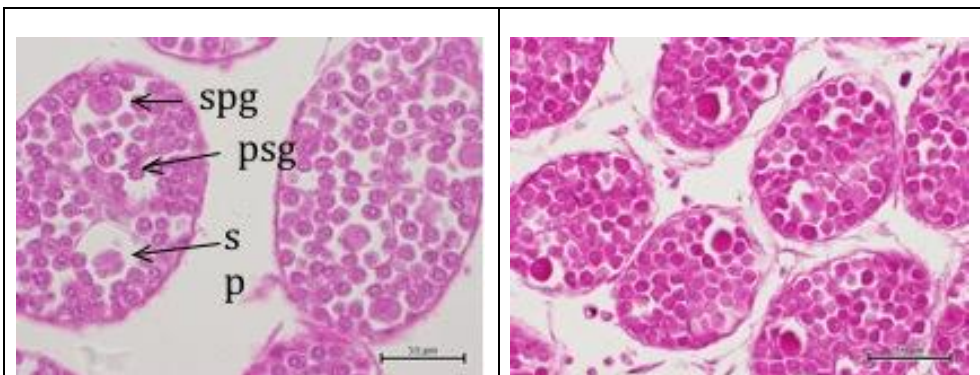


Fig. 8. Light microscope image of drone testes in white-eyed pupae (control group)
 Note the presence of the few secondary spermatogonia (spg)[in ?] thin-walled cysts within which they would develop into spermatocytes (sp) (col. HEx40), conferring the "starry sky appearance" of the histological sections.

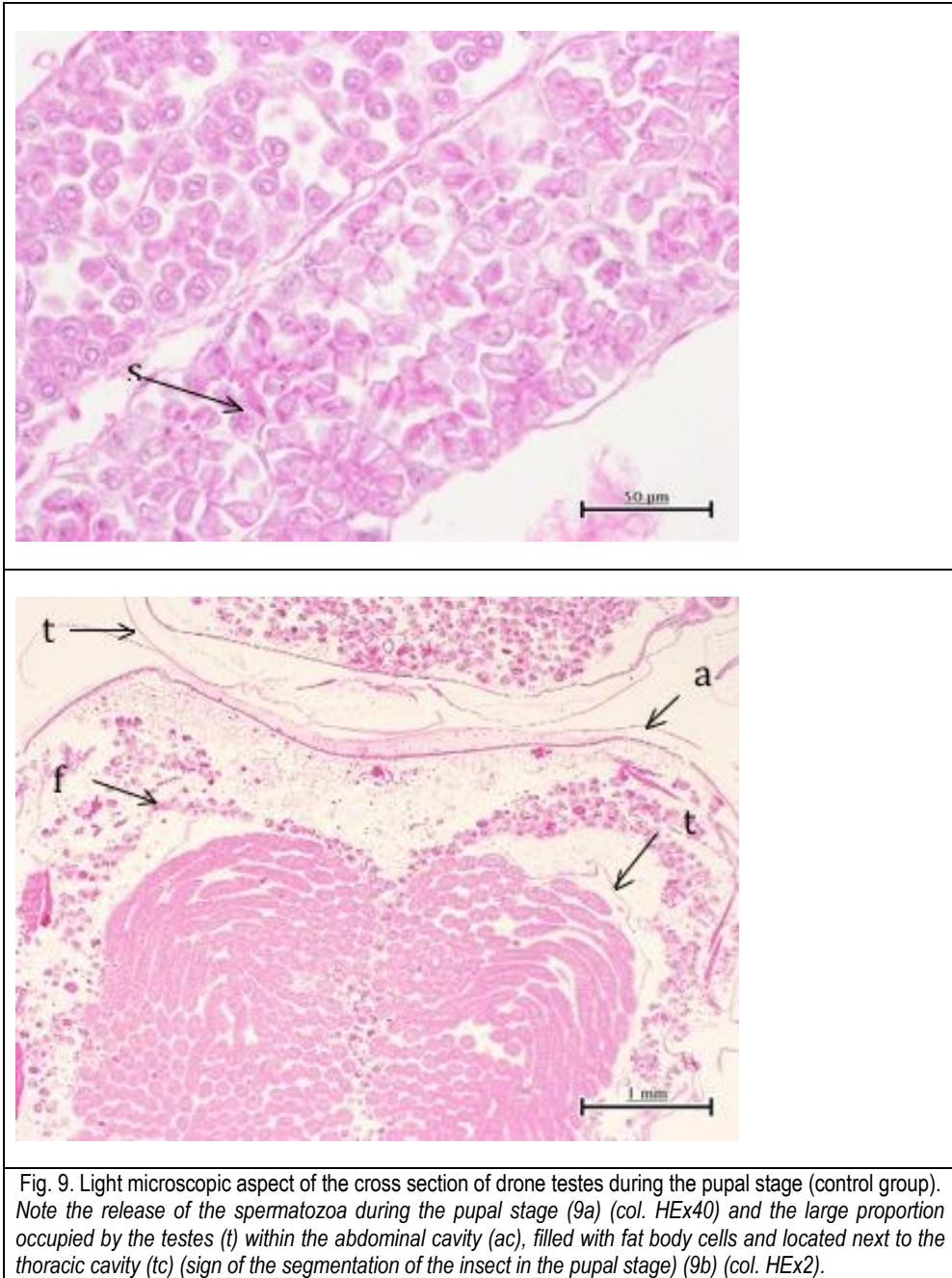


Fig. 9. Light microscopic aspect of the cross section of drone testes during the pupal stage (control group). Note the release of the spermatozoa during the pupal stage (9a) (col. HEx40) and the large proportion occupied by the testes (t) within the abdominal cavity (ac), filled with fat body cells and located next to the thoracic cavity (tc) (sign of the segmentation of the insect in the pupal stage) (9b) (col. HEx2).

Table 1: Infestation Varroa rates/levels of colonies in various experimental groups. Initial % infestation was measured July 11, 2013 for each colony in various groups using the alcohol wash method. For the six following weeks varroa drop per day was used.

<i>Treatment</i>	<i>% initial infestation per colony</i>	<i>Average number of daily varroa drop/colony</i>					
		<i>Week 1</i>	<i>Week 2</i>	<i>Week 3</i>	<i>Week 4</i>	<i>Week 5</i>	<i>Week 6</i>
<i>Control</i>	0.20%	11	7.4	9.2	16.8	20.4	25.8
<i>MAQS</i>	0.20%	37.8	14.6	4	3	8	11
<i>IMIDA</i>	0.00%	7.5	5	10	11.5	15.75	24.75
<i>MAQS + IMIDA</i>	0.40%	48	25	5.4	6	7	9.8

Table 2: Anova table statistics for drone morphometric measurements of various experimental groups.

<i>Effect</i>	<i>Weight</i>			<i>Abdominal index</i>			<i>Thorax width</i>		
	<i>d.l.</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>	<i>d.l.</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>	<i>d.l.</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Treatment	(3, 868)	18.04	<0.0001**	(3,852)	42.74	<0.0001**	(3,865)	33.13	<0.0001**

Table 3: Average of the morphometric measurements of drones in each experimental group. Different lettres between lines values in each column indicate significant differences beetween groups ($p < 0.05$, LSD test).

Treatment	Weight (mg) \pm S.E.	Abdominal index \pm S.E.	Thorax width (mm) \pm S.E.
Control	248 \pm 2 (a)	43.12 \pm 0.27 (a)	5.16 \pm 0.02 (a)
MAQS	250 \pm 2 (a)	43.89 \pm 0.30 (a)	5.26 \pm 0.02 (b)
IMIDA	251 \pm 2 (a)	43.97 \pm 0.33 (a)	5.18 \pm 0.02 (a)
MAQS + IMIDA	262 \pm 2 (b)	47.09 \pm 0.26 (b)	5.39 \pm 0.02 (c)

Table 4: Anova table statistics for various sperm evaluation variables and experimental groups.

Effect	DF	Average sperm volume		Average number of spermatozoa/ml		Average number of spermatozoa/male		Average viability	
		F	Pr > F	F	Pr > F	F	Pr > F	F	Pr > F
Treatment	(3/106)	0.68	0.5648	1.23	0.3035	0.71	0.5480	0.51	0.6738

References

Aljedani, D. M., Al-Ghamdi, A. A. and Almeahadi, R. M. (2010)-Comparative study in midgut histological structure of queen and worker Yemeni honey bees *Apis mellifera Jemenatica* (Hymenoptera: Apidae) in pupae and adult stages under natural nutrition Ass. Univ. Bull. Environ. Res. Vol. 13(2): 63-76.

Becnel, J. (2012) - Complementary techniques: preparations of entomopathogens and diseased specimens for detailed study using microscopy pp: 450-469. In: Biological Techniques Series : Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (2nd Edition) , New York, NY, USA: Academic Press.

Chauzat, M.P., Martel, Anne-Claire, Cougoule, N., Porta, P., Lachaize Julie, Zeggane Sarah, Aubert, M., Carpentier, P., and Faucon, J.P. (2011) - An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 30 (1): 103–111.

Cicero¹, J. M. and Diana Sammataro (2010) - The salivary glands of adult female *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), an ectoparasite of the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), *International Journal of Acarology*, Vol. 36 (5): 377-386.

Erickson, E. H. (1996). Fecal accumulations deposited by varroa can be used as a simple field diagnostic for infestations of this honey bee parasite. *American Bee Journal* 136(1): 63–64.

Fries, I, Marie-Pierre Chauzat, Chen, Y.P., Doublet, V, Genersch. E., Gisder, S., Mariano Higes, McMahon, D. P., Martín-Hernández, R, Natsopoulou, M, Paxton, R.J., Gina Tanner, Webster, T.C. and Williams, G.R. (2013) - REVIEW ARTICLE: Standard methods for *Nosema* research, *Journal of Apicultural Research* 52(1): 1-28.

Johnson, R.M., Lizette Dahlgren, Siegfried B. D., and Ellis, M. D (2013) - Effect of in-hive miticides on drone honey bee survival and sperm viability, *Journal of Apicultural Research*, Vol. 52 (2), 88-95.

Liu, T.P. and Ritter, W (1988) - Morphology of some microorganisms associated with the female mite *Varroa jacobsoni*: a survey by electron microscopy. pp. 467–474. In: Needham, G. R., R. E. Page, M. Delfinado-Baker and C. E. Bowman (Eds.). *Africanized Honey Bees and Bee Mites*. John Wiley & Sons, New York, NY.

Rinderer, T.E., De Guzman, L.I., Lancaster, V. A., Dalatte, G.T., and Stelzer, J. A. (1999) - Varroa in the mating yard: I. The effects of Varroa jacobsoni and Apistan R on drone honey bees, American Bee Journal, Vol. 139 (2): 134-139.

Vivekananthan T., Selvisabhanayakam and Mathivannan, V (2011) - Light and scanning electron microscopy studies on testicular structure of adultmale blister beetle Mylabris indica (Thunberg) (Coleoptera: Meloidae), J. Exp. Zool. India, Vol. 14 (1): 87-92.

Yang, X. and D. Cox-Foster (2006) - Effects of parasitization by Varroa destructor on survivorship and physiological traits of Apis mellifera in correlation with viral incidence and microbial challenge. Parasitologia 134: 405–412.

Objectif 6 : Fertilité et la présence de produits phytosanitaires chez les faux-bourdons capturés au site de fécondation et les reines fécondées des éleveurs de reines québécois et ontariens / Fertility and pesticide contamination of drones captured in queen mating yards from Quebec and Ontario

Résumé

Au Canada, la saison de production des reines de l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) est de courte durée et les éleveurs font face à une demande en reines fécondes très tôt au printemps. Afin de s'assurer de la qualité des faux-bourdons et des reines produits tout au long de la saison apicole, cette étude a été entreprise. Des éleveurs de reines québécois (N=4) et ontariens (N=2) ont participé à ce projet en fournissant plusieurs échantillonnages de faux-bourdons matures et de reines sœurs fécondes qui ont été évalués pour les mesures morphologiques ainsi que les différentes mesures de fertilité (volume de sperme, nombre de spermatozoïdes chez le mâle et dans la spermathèque de la reine et viabilité des spermatozoïdes). La présence de près de 300 pesticides a également été vérifiée pour chacun des échantillons de faux-bourdons et de reines. Au total 778 faux-bourdons et 50 reines ont été évalués. Les résultats de l'étude montrent que les faux-bourdons et les reines produits par les différents éleveurs ne présentent pas de problème de fécondité et qu'il n'existe pas de grande variabilité dans la fertilité des mâles et des reines entre les éleveurs. Les analyses chimiques montrent la présence de 8 types de fongicides et 4 types d'insecticides dont le coumaphos, le diméthoate et le mévinphos dans les tissus des faux-bourdons évalués. Pour les reines, 5 types de fongicides et 2 types d'insecticides ont été décelés. Le coumaphos, le diméthoate et le mévinphos sont des insecticides considérés comme ayant des effets toxiques sur l'abeille mais les doses retrouvées dans tous les échantillons sont inférieures aux DL50 déterminées.

Méthodologie

Quatre éleveurs de reines du Québec (Les Reines Moreau, APiCulture, Château de Cyr, Rustique Apiculture) et deux éleveurs de reines de l'Ontario (Tuckamore Bee Company, Highlands Honey) ont participé à cet objectif. Chaque éleveur de reine a fait parvenir au Centre de recherche en sciences animales de Deschambaults jusqu'à trois échantillonnages de faux-bourdons et trois échantillonnages de reines selon le calendrier présenté au tableau 1. L'échantillonnage des faux-bourdons était selon le protocole suivant : entre 60 et 100 faux-bourdons étaient capturés à l'intérieur des ruchettes de fécondation pour chacun des échantillonnages par chaque éleveur. Les faux-

bourdons étaient introduits dans une cagette de reine (Jz-Bz, figure 1) à raison de 5 par cagette et accompagnés de 5 abeilles ouvrières et d'un mélange de sucre en poudre et de sirop de maïs. Les cagettes étaient placées dans un boîtier Jz-Bz permettant l'expédition d'abeilles vivantes et ce, le jour même de l'échantillonnage. Les faux-bourdons des éleveurs québécois étaient habituellement reçus le lendemain de l'expédition alors que ceux des éleveurs ontariens passaient souvent un jour de plus en transport.

Protocole d'évaluation des faux-bourdons

Dès la réception des faux-bourdons au centre de recherche, ceux-ci sont transférés dans la cage d'évaluation afin de favoriser le vol et la défécation. Les faux-bourdons sont alors mesurés et évalués pour la production et la qualité du sperme. Les faux-bourdons sont évalués de façon individuelle pour les différentes mesures morphométriques alors que le sperme de cinq faux-bourdons est combiné afin d'évaluer la production et la qualité du sperme en corrigeant pour la grande variabilité qui existe entre les faux-bourdons d'une même colonie. Pour chaque échantillonnage de faux-bourdons envoyé par l'éleveur, sept combinaisons ou «pools» du sperme de cinq faux-bourdons sont évalués pour un total de 35 faux-bourdons évalués au maximum pour la production et la qualité du sperme. De plus, pour chaque échantillonnage, les mesures morphométriques sont prises sur le nombre de faux-bourdons nécessaires afin d'obtenir 35 faux-bourdons produisant du sperme pour l'évaluation subséquente.

Mesures morphométriques

Pour chaque faux-bourdon les mesures suivantes sont prises : le poids humide, la largeur du thorax, la largeur ainsi que la longueur de l'abdomen à l'aide d'un pied à coulisse digital (vernier avec une précision de 1mm). Par la suite, un indice abdominal est créé en multipliant la longueur et la largeur de l'abdomen.

Éversion manuelle et volume de sperme

La technique d'éversion manuelle est utilisée afin d'obtenir l'éversion de l'endophallus (organe génital du faux-bourdon) ainsi que le sperme qui est expulsé suite à l'éversion (figure 3). Le sperme peut ensuite être prélevé à l'aide d'une seringue d'insémination (Gilmont, $\pm 0,2\mu\text{l}$) qui donne une lecture du volume de sperme. Le volume prélevé pour chaque faux-bourdon est noté et le sperme de 5 faux-bourdons est collecté à l'intérieur d'un même capillaire. Pour chaque colonie, un total de 7 capillaires contenant chacun le sperme de 5 faux-bourdons sont analysés pour la qualité du sperme (N=35 faux-bourdons évalués par colonie).

Nombre de spermatozoïdes par faux-bourdon

L'éppendorf contenant 1µl de sperme dilué dans 1.5ml de solution de Kiev modifiée est homogénéisé à l'aide d'un vortex. Chacune des 2 chambres de l'hémacytomètre Cell-vu® est remplie avec approximativement 4 µl de la solution de sperme diluée homogénéisée. Au total, 2 lames d'hémacytomètre Cell-vu sont évaluées pour chaque capillaire de sperme pour un total de 4 comptes du nombre de spermatozoïdes par capillaire. Au microscope à contraste de phase, le nombre de spermatozoïdes présents dans les 100 carrés de la chambre de l'hémacytomètre sont comptés à un grossissement de 100x. Par la suite, une moyenne arithmétique des 4 comptes de spermatozoïdes est calculée et la formule suivante est utilisée pour obtenir le nombre de spermatozoïdes par ml :

$$\text{Nombre zoïdes/ml} = \text{nombre moyen de zoïdes dans 100 carrés} \times 50\,000 \times \text{dilution (1500)}$$

Par la suite, une règle de trois est appliquée afin d'obtenir le nombre de spermatozoïdes moyen par faux-bourdon :

$$\text{Nombre zoïdes/mâle} = \text{Nombre zoïdes/ml} \times \text{volume moyen de sperme par mâle} \times 1000$$

Viabilité des spermatozoïdes

Pour chacun des capillaires contenant le sperme de 5 faux-bourbons, le sperme est expulsé dans un eppendorf stérile de 2.0 ml. Pour l'évaluation du nombre de spermatozoïdes, 1µl de sperme est dilué dans un second eppendorf stérile contenant 1.5ml de solution de Kiev modifiée (dilution = 1500). Ce second eppendorf de sperme dilué est utilisé ultérieurement pour l'évaluation du nombre de spermatozoïdes (2.2.4.). 500µl de solution de Kiev modifiée est également immédiatement ajouté au reste du sperme dans le premier eppendorf pour l'évaluation de la viabilité des spermatozoïdes. Les colorants de l'ensemble d'évaluation de la viabilité des spermatozoïdes (Live/Dead Sperm Viability Kit) sont amenés à température pièce et isolés de toute source lumineuse. Le colorant SYBR-14 est ensuite dilué de 50 fois (1µl de SYBR dans 49 µl de Kiev modifiée) dans un eppendorf stérile. Une fois à température pièce, 10 µl de SYBR-14 est ajoutée à la dilution de sperme puis incubée à 36 degrés pour 10 minutes. 5 µl d'iodure de propidium est ensuite ajouté puis incubé à 36°C pour 10 autres minutes. Au microscope équipé d'une lampe à fluorescence, 4 lames de 10 µl de sperme dilué sont observées à 400x. Pour chaque lame, le compte des spermatozoïdes vivants (colorés en vert) et morts (colorés en rouge) est effectués en utilisant au total 200 spermatozoïdes par lame. Le pourcentage moyen de viabilité est ensuite calculé.

Échantillonnage des reines

Des reines ont été échantillonnées pour trois des éleveurs de reines (Qc1, Qc3 et Ont1) aux dates présentées au tableau 2. Pour chaque échantillonnage, environ 10 reines sœurs déjà fécondées étaient prélevées dans les ruchettes de fécondation. Chaque reine était placée dans une cagette avec 5 abeilles ouvrières ainsi que le mélange sucre en poudre et sirop de maïs pour l'expédition.

Mesures morphométriques des reines

Pour chaque reine les mesures suivantes sont prises : le poids humide, la largeur du thorax, la largeur de la tête entre les deux yeux, la largeur ainsi que la longueur de l'abdomen à l'aide d'un pied à coulisse digital (vernier avec une précision de 1mm). Par la suite, un indice abdominal est créé en multipliant la longueur et la largeur de l'abdomen.

Contenu de la spermathèque des reines

Les reines sont placées dans une chambre saturée en acétate d'éthyle pendant 10 à 15 minutes afin de les euthanasier avant la dissection. Une fois euthanasiées, l'abdomen des reines est disséqué de façon à obtenir la spermathèque se situant dans les derniers segments de l'abdomen. La spermathèque de la reine peut être retirée à l'aide d'une pince en prenant soin de ne pas la percer. Une fois la spermathèque isolée, le tissu trachéal recouvrant la spermathèque peut être retiré en roulant délicatement cette dernière entre le pouce et l'index. Chaque spermathèque est ensuite placée à l'intérieur d'un tube à centrifuger contenant 500 µl de solution de Kiev modifiée. La spermathèque est écrasée contre la paroi du tube à l'aide de la pince afin de libérer les spermatozoïdes dans la solution. Le tube est refermé puis inversé à quelques reprises afin de répartir uniformément les spermatozoïdes dans le diluant.

Viabilité des spermatozoïdes dans spermathèque des reines

Les colorants de l'ensemble d'évaluation de la viabilité des spermatozoïdes (Live/Dead Sperm Viability Kit) sont amenés à température pièce et isolés de toute source lumineuse. Le colorant SYBR-14 est ensuite dilué de 50 fois (1µl de SYBR dans 49 µl de Kiev modifiée) dans un eppendorf stérile. Une fois à température pièce, 10 µl de SYBR-14 est ajoutée au tube contenant puis incubée à 36 degrés pour 10 minutes. 5 µl d'iodure de propidium est ensuite ajouté puis incubé à 36°C pour 10 autres minutes. Au microscope équipé d'une lampe à fluorescence, 4 lames de 10 µl de sperme dilué sont observées à 400x. Pour chaque lame, le compte des spermatozoïdes vivants (colorés en vert) et morts (colorés en rouge) est effectué en utilisant au total 200 spermatozoïdes par lame. Le pourcentage moyen de viabilité est ensuite calculé.

Évaluation de la présence de pesticides chez les faux-bourçons et reines des éleveurs québécois et ontariens

Pour chacun des échantillonnages acheminés par les éleveurs au centre de recherche, les corps des faux-bourçons et des reines évalués étaient disposés dans un tube à centrifuger identifié et immédiatement congelés. À la fin de la saison apicole 2013, ces tubes ont été acheminés à la direction du laboratoire d'expertises du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ). Les échantillons de faux bourçons ont été analysés pour la présence de près de 400 pesticides par le Laboratoire d'Expertises et d'Analyses Alimentaires du MAPAQ en utilisant une méthodologie de Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masses en tandem (LC-MSMS) adaptée de <Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. (M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, J. AOAC International 86 (2003) 412 >.

Résultats

Chaque éleveur de reines devait faire parvenir des faux-bourçons et des reines aux dates prédéterminées par le protocole, soit trois échantillonnages d'environ 100 faux-bourçons ainsi que trois échantillonnages de 10 reines. Tous les éleveurs ont fourni les trois échantillonnages de faux-bourçons mis à part les éleveurs Qc4 et Ont1 pour lesquels respectivement un et deux échantillonnages de faux-bourçons ont été évalués (tableau 1). Seulement trois des éleveurs de reines ont pu fournir des reines fécondes pour l'évaluation; les éleveurs Qc1, Qc3 et Ont1 ont fourni respectivement 30, 10 et 10 reines au centre de recherche (tableau 2).

Mesures morphométriques des faux-bourçons

Le tableau 3 présente les mesures moyennes obtenues pour l'ensemble des faux-bourçons évalués pour chacun des 6 éleveurs de reines. Au total, 778 faux-bourçons ont été évalués pour les mesures morphométriques au cours de la saison apicole 2013. Les variables morphométriques semblent constantes entre les éleveurs.

Production et qualité du sperme des faux-bourçons

Le tableau 4 présente les différentes mesures de production et de qualité de sperme obtenues pour les 6 éleveurs de reines. Au total, 92 groupes de 5 faux-bourçons ont été évalués pour la production et la qualité du sperme.

Mesures morphométriques des reines

Le tableau 5 présente les mesures morphométriques moyennes pour les 50 reines provenant de 2 éleveurs de reines québécois (Qc1 et Qc3) et d'un éleveur ontarien (Ont1). Le tableau présente également les valeurs moyennes des mesures morphométriques des reines.

Mesures de fertilité des reines

La fertilité des reines envoyées par les trois éleveurs de reines a été évaluée avec les indices de qualité suivants : le nombre de spermatozoïdes par ml, le nombre de spermatozoïdes total par spermathèque ainsi que le pourcentage de viabilité moyen des spermatozoïdes de la spermathèque. Le tableau 6 présente les moyennes trouvées pour les reines de chaque éleveur ainsi que la moyenne globale pour les 50 reines évaluées.

Présence de produits phytosanitaires chez les faux-bourçons et les reines des éleveurs québécois et ontariens

Le tableau 7 présente le résultat des analyses de pesticides dans les tissus des faux-bourçons envoyés par les 6 éleveurs de reines participants. Au total, 12 types de pesticides ont été retrouvés dans les échantillons de pesticides.

Les analyses montrent que plusieurs pesticides sont présents en faibles quantité (quantité minimale détectée : <0.001 mg/kg) alors que d'autres sont présents en quantité plus importantes (quantité maximale détectée dans les échantillons : 0.018 mg/kg de diméthoate chez l'éleveur Qc4). Les résultats montrent également que deux pesticides sont présents dans les échantillonnages de faux-bourçons de tous les éleveurs : le boscalide et le butoxyde de pipéronyle.

La plupart des pesticides retrouvés chez les faux-bourçons sont des fongicides, soient 8 pesticides sur 12 : boscalide, fludioxonil, myclobutanil, dyphénylamine, carbendazime, thiabendazole, thiophanate-méthyl et le fenhexamide. Les quatre autres pesticides retrouvés chez les faux-bourçons sont des insecticides soient le coumaphos, le diméthoate, le butoxyde de pipéronyl ainsi que le mévinphos. Le butoxyde de pipéronyl est un composé organique présent chez plusieurs insecticides alors que les trois insecticides font partis de la famille chimique des organophosphatés.

Les pesticides retrouvés chez les reines sont également majoritairement des fongicides : l'azoxystrobine, boscalide, le butoxyde de pypéronil, le carbendazime ainsi que le fenhexamide. Comme chez les faux-bourçons, on retrouve les insecticides coumaphos et diméthoate.

Le tableau 8 présente les résultats des analyses de pesticides pour les échantillons de reines des 3 éleveurs participant à cette partie du projet. En tout, sept types de pesticide ont été retrouvés chez les reines comparativement aux types de pesticide retrouvés dans les échantillons de faux-bourçons.

Discussion

Mesures morphométriques et mesures de qualité du sperme des faux-bourçons récoltés au site de fécondation

778 faux-bourçons ont été utilisés afin d'évaluer les différentes mesures morphométriques des mâles retrouvés au site de fécondation pour chacun des éleveurs. La largeur moyenne de l'abdomen des faux-bourçons évalués est de 5.29 ± 0.02 mm, la longueur de l'abdomen de 7.90 ± 0.03 mm et l'indice abdominal résultant de la multiplication des deux premiers paramètres, de 42.02 ± 0.17 . La largeur moyenne du thorax des faux-bourçons évalués est de 5.10 ± 0.02 mm et le poids moyen de 225 ± 0.9 g.

Afin d'évaluer la production et la qualité du sperme des faux-bourçons retrouvés au site de fécondation chez 6 éleveurs de reines, des groupes ou «pools» de 5 faux-bourçons ont été utilisés. Au total 92 pools ont été réalisés au cours de la saison apicole 2013. Le volume moyen de sperme prélevé durant l'évaluation a été de 1.08 ± 0.02 µl par faux-bourçon. De sperme prélevé a pu être évalué le nombre de spermatozoïdes moyen par millilitre, soit $3.04 \pm 0.29 \times 10^9$ ainsi que le nombre moyen de spermatozoïdes par faux-bourçon, soit $3.35 \pm 0.31 \times 10^6$. Le pourcentage moyen de viabilité des spermatozoïdes a été évalué par fluorescence et est égal à $79.43 \pm 0.49\%$.

Mesures morphométriques et mesures de fertilité des reines récoltées au site de fécondation.

Trois des 6 éleveurs nous ont fait parvenir des reines pour l'évaluation des mesures morphométriques et des mesures de fertilité. Au total, cinquante reines ont été évaluées pour ces paramètres. La largeur et la longueur moyenne de l'abdomen de ces reines est respectivement de 4.79 ± 0.05 et 10.58 ± 0.11 mm et l'indice abdominal moyen de 50.79 ± 0.86 . La largeur moyenne du thorax des 50 reines évaluées est de 4.62 ± 0.05 mm et celle de la tête de 3.69 ± 0.03 mm. Finalement, le poids moyen des reines est de 205.1 ± 3.1 mg.

Les reines ont également été évaluées pour les différents indices de fertilité. En moyenne, les reines possédaient $6.58 \pm 0.42 \times 10^6$ spermatozoïdes par ml et $3.48 \pm 0.21 \times 10^6$ spermatozoïdes au total dans la spermathèque. Le pourcentage moyen de viabilité des spermatozoïdes a été évalué à $76.53 \pm 2.27\%$.

Analyse de pesticides dans les tissus des faux-bourçons et des reines des éleveurs québécois et ontariens

Les analyses de pesticides ont montré la présence du boscalide et du butoxyde de pypéronile dans les échantillons de faux-bourçons et de reines de tous les éleveurs ayant participé à l'étude. Le boscalide est un fongicide de la famille des carboxamides (nicotinamides) et est pratiquement non toxique pour l'abeille puisque sa DL50 par voie orale est supérieure à 166 µg/abeille et par contact est supérieure à 200 µg/abeille (SagePesticides). Le butoxyde de pypéronile (PBO) est quant à lui un pesticide retrouvé dans la composition de plusieurs insecticides et agit de façon synergétique afin d'accroître la toxicité des ingrédients actifs de l'insecticide. Il est également considéré comme faiblement toxique pour l'abeille (SagePesticides).

La plupart des pesticides retrouvés dans les tissus des faux-bourçons et des reines sont des fongicides considérés comme non toxiques ou pratiquement non toxiques chez l'abeille. C'est le cas du boscalide, du fludioxonil, du dyphénylamine, du carbendazime, du thiophanate-méthyl, du fenhexamide et de l'azoxystrobine. Le myclobutanil et le thiabendazole sont les deux seuls fongicides détectés chez les faux-bourçons qui sont considérés comme faiblement toxique pour l'abeille avec des DL50 respectives de >50 µg/abeille et 50 µg/abeille. Les quantités maximales détectées dans les échantillons (0.001 mg/kg) sont de beaucoup inférieures à ces DL50.

Certains pesticides retrouvés chez les faux-bourçons et les reines des éleveurs participants sont des insecticides. C'est le cas du coumaphos et du diméthoate retrouvés chez les faux-bourçons et les reines ainsi que le mévinphos retrouvé uniquement chez les faux-bourçons de l'éleveur Ont1. Ces trois insecticides appartiennent à la famille chimique des organophosphatés. Le coumaphos et le mévinphos sont considérés comme toxiques pour l'abeille alors que le diméthoate est considéré comme hautement toxique pour l'abeille (SagePesticides).

Le diméthoate est un insecticide et un acaricide qui agit sur le système nerveux des insectes en inhibant l'enzyme acétylcholinestérase, avec interruption de la transmission de l'influx nerveux (SagePesticides). Il est considéré comme hautement toxique chez l'abeille avec une DL50 de contact de 0.05 µg/abeille. Si l'on prend la plus grande quantité de diméthoate retrouvée dans les échantillons de faux-bourçons et de reines, soit 0.018 mg/kg de faux-bourçon (Qc4, tableau 7) et que l'on ajuste cette concentration pour le poids moyen des faux-bourçons de l'étude (225 mg, tableau 3), cela nous donne une quantité de diméthoate de 0.004 µg/faux-bourçon ce qui est inférieur à la DL50 de contact.

Le coumaphos est également un insecticide de la famille des organophosphatés agissant comme inhibiteur de l'acétylcholinestérase. Selon le MAPAQ, la DL50 de contact de ce pesticide serait de 35 µg/g d'abeille. Si l'on s'attarde encore une fois à la plus grande concentration de coumaphos retrouvée dans les échantillons, soit 0.014 mg/kg de faux-bourçon (Qc3, tableau 7) et que l'on ajuste cette concentration pour le poids moyen des faux-

bourdons de l'étude (225 mg, tableau 3), cela nous donne une quantité de coumaphos de 0.014 µg/g d'abeille, ce qui est encore une fois inférieur à la DL50 définie par le MAPAQ.

Le mévinphos a été identifié seulement dans l'échantillon de faux-bourdons de l'éleveur Ont1 en concentration égale à 0.001 mg/kg. Cet insecticide appartient également à la famille des organophosphatés et agit sur le système nerveux des insectes de la même façon que les deux autres insecticides. La LD50 de contact de ce pesticide est de 0.305 µg/abeille (Chauzat et al. 2006). La dose trouvée correspond à une concentration de 2.25×10^{-4} µg/faux-bourdon lorsque l'on ajuste pour le poids moyen d'un faux-bourdon, ce qui est bien en deçà de la LD50 du mévinphos chez l'abeille.

En tout, 12 types de pesticide ont été retrouvés dans les échantillons de faux-bourdons alors que 7 types de pesticide ont été retrouvés dans les échantillons de reines. Il est possible de conclure que de ces pesticides, seulement trois sont considérés comme ayant un effet toxique sur l'abeille domestique. De plus, les concentrations de ces insecticides retrouvés chez les faux-bourdons et les reines des éleveurs étaient inférieures aux DL50 déterminées pour chacun de ces organophosphatés.

Il est intéressant de souligner que l'azoxystrobine est le seul pesticide identifié uniquement dans les échantillons de reines. L'azoxystrobine est également un fongicide considéré non toxique chez les abeilles avec une DL50 supérieure à 25 µg/abeille. Bien que non toxique pour l'abeille, il est intéressant de constater que malgré le fait qu'il soit présent dans les échantillons de reines de deux éleveurs (Qc1 et Ont1), les faux-bourdons de ces mêmes éleveurs ne semblent pas avoir été en contact avec ce pesticide.

Tableau 1. Cédule d'échantillonnage des faux-bourçons et codes des échantillons

Éleveur	12 juin	17 juin	24 juin	25 juin	26 juin	8 juillet	9 juillet	17 juillet	22 juillet	25 juillet	29 juillet	5 aout
Qc1		Qc1-1			Qc1-2					Qc1-3		
Qc2	Qc2-1						Qc2-2					Qc2-3
Qc3				Qc3-1				Qc3-2				Qc3-3
Qc4								Qc4-1				
Ont1						Ont1-1					Ont1-2	
Ont2			Ont2-1			Ont2-2			Ont2-3			

Tableau 2 : Dates d'envoi des différents échantillonnages de reines chez les 3 éleveurs de reines participants au cours de la saison apicole 2013.

Éleveur	17 juin	1er juillet	25 juillet	29 juillet	5 août
Qc1	Qc1-1	Qc1-2	Qc1-3		
Qc3					Qc3-3
Ont1				Ont1-1	



Figure 1 : Cagettes de reines et boîtier JZ-Bz utilisés pour le transport des reines et des faux-bourçons

Tableau 3 : Moyenne des mesures morphométriques pour l'ensemble des faux-bourçons évalués pour chacun des 6 éleveurs québécois et ontariens durant la saison apicole 2013.

Éleveurs	Nombre de faux-bourçons	Largeur abdomen (mm)	Longueur abdomen (mm)	Indice abdominal	Largeur thorax (mm)	Poids (mg)
Qc1	177	5.32 ± 0.02	7.84 ± 0.04	41.08 ± 0.27	5.17 ± 0.02	215 ± 1.8
Qc2	142	5.43 ± 0.03	7.82 ± 0.05	42.53 ± 0.39	5.23 ± 0.04	220 ± 1.6
Qc3	164	5.17 ± 0.03	7.91 ± 0.05	40.44 ± 0.51	4.99 ± 0.03	222 ± 2.1
Qc4	47	5.39 ± 0.04	7.94 ± 0.09	42.87 ± 0.72	5.06 ± 0.04	232 ± 4.2
Ont1	79	5.23 ± 0.05	7.90 ± 0.08	41.30 ± 0.50	4.84 ± 0.07	232 ± 3.1
Ont2	169	5.40 ± 0.03	8.06 ± 0.07	43.78 ± 0.36	5.22 ± 0.02	237 ± 1.9
moyenne	778	5.29 ± 0.02	7.90 ± 0.03	42.02 ± 0.17	5.10 ± 0.02	225 ± 0.9

Tableau 4 : Moyenne des mesures de qualité de sperme pour l'ensemble des faux-bourçons évalués pour chacun des 6 éleveurs québécois et ontariens durant la saison apicole 2013.

Éleveurs	Nombre de faux-bourçons évalués	Volume moyen de sperme (μ l)	Nbre de spermatozoïdes moyen par ml ($\times 10^9$)	Nbre de spermatozoïdes moyen par faux-bourçon ($\times 10^6$)	% moyen de viabilité
Qc1	21 pools de 7 mâles	1.15 \pm 0.05	3.29 \pm 0.36	3.90 \pm 0.55	77.97 \pm 0.91
Qc2	17 pools de 7 mâles	1.08 \pm 0.06	4.32 \pm 1.22	4.58 \pm 1.16	81.94 \pm 0.91
Qc3	21 pools de 7 mâles	1.02 \pm 0.03	2.57 \pm 0.42	2.68 \pm 0.51	78.90 \pm 1.05
Qc4	6 pools de 7 mâles	1.15 \pm 0.06	3.01 \pm 0.45	3.45 \pm 0.53	76.56 \pm 1.64
Ont1	6 pools de 7 mâles	0.96 \pm 0.05	1.46 \pm 0.43	1.47 \pm 0.48	77.31 \pm 2.38
Ont2	21 pools de 7 mâles	1.08 \pm 0.04	2.54 \pm 0.30	2.77 \pm 0.35	80.81 \pm 1.02
moyenne	92 pools de 7 mâles	1.08 \pm 0.02	3.04 \pm 0.29	3.35 \pm 0.31	79.43 \pm 0.49

Tableau 5 : Moyenne des mesures morphométriques des reines provenant de 3 éleveurs de reines québécois et ontariens durant la saison apicole 2013.

Éleveurs	Nombre de reines évaluées	Largeur abdomen (mm)	Longueur abdomen (mm)	Indice abdominal	Largeur thorax (mm)	Largeur de la tête (mm)	Poids (mg)
Qc1	30	4.71 ± 0.06	10.70 ± 0.16	50.49 ± 1.18	4.57 ± 0.06	3.70 ± 0.04	207 ± 4.2
Qc3	10	4.77 ± 0.10	10.32 ± 0.22	49.26 ± 1.67	4.45 ± 0.12	3.61 ± 0.05	196 ± 5.3
Ont1	10	5.07 ± 0.10	10.47 ± 0.19	53.21 ± 1.79	4.96 ± 0.08	3.71 ± 0.02	208 ± 6.8
moyenne	50	4.79 ± 0.05	10.58 ± 0.11	4.62 ± 0.05	4.62 ± 0.05	3.69 ± 0.03	205.1 ± 3.1

Tableau 6 : Moyenne des mesures de fertilité des reines fécondes provenant de 3 éleveurs de reines québécois et ontariens durant la saison apicole 2013.

Éleveurs	Nombre de reines évaluées	Nombre de spermatozoïdes moyen/ml ($\times 10^6$)	Nombre de spermatozoïdes moyen/spermathèque ($\times 10^6$)	% moyen de viabilité
Qc1	30	6.2 \pm 0.58	3.42 \pm 0.3	76.24 \pm 2.50
Qc3	10	6.67 \pm 0.57	3.33 \pm 0.29	78.10 \pm 5.60
Ont1	10	7.61 \pm 0.92	3.80 \pm 0.46	75.95 \pm 6.72
moyenne	50	6.58 \pm 0.42	3.48 \pm 0.21	76.53 \pm 2.27

Tableau 7 : Résultats des analyses de pesticides dans les tissus des faux-bourçons envoyés par chaque éleveur de reines. * Nombre d'échantillonnages de faux-bourçons utilisés pour les analyses de pesticides. Dans le cas où le pesticide est retrouvé dans plus d'un échantillonnage, la quantité la plus élevée est inscrite dans ce tableau.

Pesticides	Qc1 (2*) mg/kg	Qc2 (2*) mg/kg	Qc3 (3*) mg/kg	Qc4 (1*) mg/kg	Ont1 (2*) mg/kg	Ont2 (3*) mg/kg
Boscalide	0.002	0.002	0.001	<0.001	<0.001	0.004
Fludioxonil	0.001	---	---	---	---	0.001
Myclobutanil	0.001	0.001	---	0.001	0.001	---
Coumaphos	<0.001	0.002	0.014	---	---	---
Diméthoate	---	---	0.002	0.018	0.003	0.002
Diphenylamine	---	---	---	---	---	0.007
Butoxyde de pipéronyle	0.009	0.007	0.004	0.001	0.001	0.003
Carbendazime	0.001	0.001	<0.001	---	---	---
Thiabendazole	0.001	0.001	0.001	---	---	0.001
Thiophanate methyl	0.001	---	---	---	---	---
Fenhexamid	0.004	0.001	---	---	---	0.006
Mévinphos	---	---	---	---	0.001	---

Tableau 8 : Présence de pesticides dans les tissus des échantillons de Faux-bourdons des apiculteurs québécois (ppm = milligramme par kilogramme) . Les analyses ont été faite sur un homogénat issu d'environ 30 faux-bourdons pour chaque échantillon.

Pesticide	Type	MRL Canada (ppm)	DL50 abeilles (ug/ab) orale/contact	DL50 abeilles (ppm) (mâles \cong 0,2g) orale/contact	Quantité mesurée (ppm)		% apiculteurs (N=4)	% échantillons (N=9)
					Min	Max		
Boscalide	Fongicide	0.1-60	166 / 200	830 / 1000	<0.001	0.002	100%	88.89%
Butoxyde pipéronyle	Insecticide	0.1-20			0.001	0.009	100%	100.00%
Carbendazime	Fongicide	0.1-10	? / 50	/ 250	<0.001	0.001	75%	55.56%
Coumaphos	Insecticide	0.02*-1**	144 / 2-15	720 / 10 -75	<0.001	0.014	75 %	55.56%
Diméthoate	Insecticide acaricide	0.1-2	0,05 / 0,5	0.25 / 2.5	0.002	0.018	50%	44.44%
Diphénylamine	Fongicide	5	?		0	0	0%	0%
Fenhexamide	Fongicide	0.02-23	? / 200	/ 1000	0.001	0.004	50%	33.33%
Fludioxonil	Fongicide	0.01-65	100 / 100	500 / 500	0.001	0.001	25%	11.11%
!!! Mévinphos	Insecticide	0.2-0.25	/ 0.001-1.99	/ 0.005 – 9.95	0	0	0%	0%
Myclobutanil	Fongicide	0.02-10	> 164 / 362	>820 / 1810	0.001	0.001	75.00%	55.56%
Thiabendazole	Fongicide	0.01-10	? / 50	/ 250	0.001	0.001	75.00%	66.67%
Thiophanate methyl	Fongicide	0.1-10	50 / >100	250 / >500	0.001	0.001	25.00%	11.11%

Commentaire [AR1]: Andersen et Atkins 1968
Anderson, L. D., & Atkins Jr, E. L. (1968). Pesticide usage in relation to beekeeping. *Annual Review of Entomology*, 13(1), 213-238.

Commentaire [AR2]: Andersen et Atkins 1968

Commentaire [AR3]: msdssearch.dow.com

Commentaire [AR4]: http://utaarmorte.ch.com/sites/default/files/TMI_2020_XL_MSDS.pdf

*MRL pour le miel

**MRL pour la cire d'abeille

!!! interdit depuis plus de 10 ans au Canada

Tableau 9 : Présence de pesticides dans les tissus des échantillons de Faux-bourdons des apiculteurs québécois (ppm = milligramme par kilogramme) . Les analyses ont été faite sur un homogénat issu d'environ 30 faux-bourdons pour chaque échantillon.

Pesticide	Type	MRL Canada (ppm)	DL50 abeilles (ug/ab) orale/contact	DL50 abeilles (ppm) (mâles \cong 0,2g) orale/contact	Quantité mesurée (ppm)		% apiculteurs (N=2)	% échantillons (N=5)
					Min	Max		
Boscalide	Fongicide	0.1-60	166 / 200	830 / 1000	<0.001	0.004	100%	100%
Butoxyde pipéronyle	Insecticide	0.1-20			0.001	0.003	100%	100%
Carbendazime	Fongicide	0.1-10	? / 50	/ 250	0	0	0%	0%
Coumaphos	Insecticide	0.02*-1**	144 / 2-15	720 / 10 -75	0	0	0%	0%
Diméthoate	Insecticide acaricide	0.1-2	0,05 / 0,5	0.25 / 2.5	0.002	0.003	100%	100%
Diphénylamine	Fongicide	5	?		0.007	0.007	50%	20%
Fenhexamide	Fongicide	0.02-23	? / 200	/ 1000	0.006	0.006	50%	20%
Fludioxonil	Fongicide	0.01-65	100 / 100	500 / 500	0.001	0.001	50%	20%
!!! Mévinphos	Insecticide	0.2-0.25	/ 0.001-1.99	/ 0.005 – 9.95	0.001	0.001	50%	20%
Myclobutanil	Fongicide	0.02-10	> 164 / 362	>820 / 1810	0.001	0.001	50%	20%
Thiabendazole	Fongicide	0.01-10	? / 50	/ 250	0.001	0.001	50%	20%
Thiophanate methyl	Fongicide	0.1-10	50 / >100	250 / >500	0	0	0%	0%

Commentaire [AR5]: Andersen et Atkins 1968
Anderson, L. D., & Atkins Jr, E. L. (1968). Pesticide usage in relation to beekeeping. *Annual Review of Entomology*, 13(1), 213-238.

Commentaire [AR6]: Andersen et Atkins 1968

Commentaire [AR7]: mdssearch.dow.com

Commentaire [AR8]: http://utaarmortech.com/sites/default/files/TMI_2020_XL_MSDS.pdf

*MRL pour le miel

**MRL pour la cire d'abeille

!!! interdit depuis plus de 10 ans au Canada

Tableau 10 : Résultats des analyses de pesticides dans les tissus des reines envoyées par les éleveurs de reines Qc1, Qc2 et Ont1. * Nombre d'échantillonnages de reines utilisés pour les analyses de pesticides. Dans le cas où le pesticide est retrouvé dans plus d'un échantillonnage, la quantité la plus élevée est inscrite dans ce tableau.

Pesticides	Qc1 (3*)	Qc3 (1*)	Ont1 (1*)
	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Azoxystrobine	0.001	---	0.001
Boscalide	0.001	<0.001	<0.001
Coumaphos	0.001	---	---
Diméthoate	---	0.002	<0.001
Butoxyde de pypéronile	0.006	0.001	0.001
Carbendazime	<0.001	---	---
Fenhexamid	0.001	---	---

Bibliographie

Chauzat M-P., Faucon J-P., Martel A-C., Lachaize J., Cougoule N. et M. Aubert (2006). Les pesticides, le pollen et les abeilles. *Phytoma* **594** : 443-455.

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec. Détermination multirésiduelle des pesticides dans les abeilles. URL : <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Laboratoire/08-M-029.pdf> Consulté le 27 janvier 2014.

SagePesticides. Effets toxiques des matières actives. URL : <http://www.sagepesticides.qc.ca/Recherche/RechercheMateries.aspx> Consulté le 27 janvier 2014.

Diffusion des résultats

Le Tableau de la page suivante résume les activités de diffusion associées au projet.

Nous avons fait 2 présentations dans 2 congrès d'associations apicoles régionales (Québec), congrès Nationaux et Internationaux et 5 conférences dans des congrès/journées d'études de nature académique. En tout nous avons diffusé les informations de ce projet à près de 700 apiculteurs et professionnels apicoles canadiens et près de 300 apiculteurs d'autres pays.

Il y a eu un article dans la revue apicole du Québec (L'Abeille) et un article dans un cahier de conférence (Apimondia Québec 2012).

Tableau : diffusion des résultats

Activités prévues de l'ANNEXE A	Activités réalisées	Description (thème, titre, endroit, etc.)	Date de réalisation	Nombre de personnes rejointes	Visibilité accordée au PCAA (logo, mention)
Article dans revue spécialisée	Article dans le journal «L'Abeille» – Mensuel de la Fédération des apiculteurs du Québec	Production et qualité du sperme des mâles de l'abeille mellifère, <i>Apis mellifera</i> , durant la saison apicole au Québec	hiver 2012	Membres de la FAQ	mention
Colloques et Conférences	Conférence Société d'entomologie du Québec	Production et qualité du sperme des mâles de l'abeille mellifère, <i>Apis mellifera</i> , durant la saison apicole au Québec (Montréal et Trois-Rivières)	oct 2011 et nov 2012	100 prof/étud	Logo
	Conférence Union des syndicats apicoles du Québec	Notre-Dame-du Mont Carmel	nov 2012	50 membres	Logo
	Conférence Journée du Centre de recherche en horticulture	Honey bee drone semen quality in Québec	mai 2013	50 membres	Logo
	Symposium Apimondia 2012	Québec	nov 2012	300 pers	Logo
	Assemblée générale du CRSAD	Deschambault	juin 2012	50 employés	Logo
	Séminaire de fin de maîtrise	Québec	nov 2013	30 prof/étud	Logo
	Journée annuelle de L'ANERCEA	Belgique, Louvain la Neuve	nov 2013	200 pers	Logo

SOMMAIRE / CONCLUSIONS

1. Importance du projet

L'industrie de l'apiculture québécoise est en croissance. En 2012, on estime que les apiculteurs du Québec avaient 49 708 colonies productives, soit 8 301 colonies de plus qu'en 2011 (Institut de la statistique du Québec). La valeur des ventes de miel a connu une progression de 20.1 % par rapport à 2011, et s'est chiffrée à 12.3 millions de dollars (M\$), pour un troisième sommet consécutif en dix ans. De plus, en 2012, pour une cinquième année consécutive, le nombre de colonies louées pour la pollinisation des cultures (38 306), le prix moyen de location (107.37 \$/colonie) ainsi que le revenu total (4.1 M\$) sont en progression.

Cette croissance s'accompagne malheureusement d'une forte mortalité annuelle (moyenne canadienne près de 25%, rapport annuel de la CAPA) et d'une plus grande dépendance envers l'importation de paquets d'abeilles et de reines en provenance de la Californie, d'Hawaï, d'Australie, de la Nouvelle Zélande et du Chili. Ces importations comblent nos besoins à court terme mais obligent les apiculteurs canadiens à utiliser des lignées d'abeilles mésadaptées aux conditions apicoles du Canada et augmentent notre dépendance envers d'autres pays pour notre approvisionnement en abeilles. Pour mieux servir notre industrie, il y a maintenant plusieurs programmes de sélection qui s'implantent au pays dont celui du CRSAD au Québec. Ils ont pour but d'augmenter notre autosuffisance et d'améliorer les performances du cheptel apicole canadien en dirigeant les critères de sélection vers nos besoins. Depuis une dizaine d'années on rapporte une augmentation du nombre de jeunes reines défailantes (ponte faible ou absente) en provenance des élevages commerciaux de reines au Canada et ailleurs dans le monde. L'hypothèse de l'existence d'un problème lors de la fécondation des jeunes reines est souvent soulevée (un nombre insuffisant de mâles ou une qualité inadéquate du sperme). Nous avons donc vu important d'acquérir plus de connaissances sur le développement et la maturation des faux-bourçons (mâles abeilles) et d'étudier l'impact de différents facteurs abiotiques et biotiques sur leurs qualités reproductives. Ces informations seraient très utiles pour les producteurs de reines afin d'optimiser la fécondation des jeunes reines et ainsi maximiser la force et la production des colonies.

2. But du projet

Ce projet avait pour but optimiser les qualités reproductives des faux-bourçons utilisés pour la fécondation des reines abeilles (*Apis mellifera* L) produites commercialement au Canada.

3. Activités réalisées

À l'issue de ce projet, nous avons réalisé les six objectifs spécifiques proposés au départ. Les trois premiers objectifs ont été réalisés dans le cadre d'une étude M.Sc. de madame Andrée Pelletier-Rousseau intitulée <Production et qualité du sperme de faux-bourçon durant la saison de production des reines de l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) au Québec>, département de phytologie, faculté de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval. Les trois autres objectifs ont été réalisés séparément et seront soumis pour publication dans des revues scientifiques spécialisées en sciences apicoles : (1) Optimisation de la fertilité des faux-bourçons avec des suppléments alimentaires au printemps; (2) Impact d'une dose sublethale d'imidaclopride, d'un traitement anti varroa à l'acide formique et leur effet synergique sur le développement et fertilité des faux-bourçons; (3) Étude sur la fertilité et la présence de produits phytosanitaires chez les faux-bourçons capturés au site de fécondation.

4. Retombées prévues à court terme, moyen terme et à long terme sur le secteur.

La réalisation de ce projet a permis de souligner l'importance d'un élevage rigoureux des faux-bourçons. Les retombées de ce projet sont nombreuses. Premièrement, il faut mentionner que ce projet a permis aux professionnels du CRSAD et de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Montréal de développer une expertise unique au Canada sur la manipulation des faux-bourçons et l'évaluation de plusieurs aspects de leur physiologie reproductrice. Nous avons maintenant l'équipement (microscopie en fluorescence) pour faire une évaluation complète de la fertilité des faux-bourçons (comptage spermatique et évaluation de la viabilité des spermatozoïdes). Ces outils sont essentiels pour réaliser l'insémination instrumentale des jeunes reines dans un programme avancé de sélection génétique de l'abeille tel que celui que nous menons au CRSAD. Deuxièmement, le projet a permis de réaliser plusieurs protocoles expérimentaux sur la fertilité des faux-bourçons durant une saison apicole (de mai à septembre) et de préciser les impacts des suppléments alimentaires, d'un acaricide et d'un pesticide sur leur développement, leur maturation et leurs qualités reproductrices. De plus, nous avons fait une étude exploratoire sur la fertilité des faux-bourçons chez quatre éleveurs de reines du Québec et deux éleveurs de reines

de l'Ontario. À notre connaissance, jamais de telles informations ont été disponibles pour l'industrie apicole du Canada.

Les impacts à courts et moyens termes, outre ceux du développement d'une expertise dans deux centres de recherches, sont d'avoir souligné l'importance des faux bourdons dans une colonie d'abeilles. Les faux-bourdons sont souvent considérés comme la caste inférieure, inutile et même nuisible au rendement économique d'une colonie. Pourtant, les faux-bourdons sont essentiels, car ils assurent la transmission des gènes à la descendance et l'accouplement multi-males contribue à une biodiversité génomique dans la colonie. Le contrôle du développement de ce caste assure une sélection rigoureuse de la descendance (amélioration des performances) et une fertilisation optimale des jeunes reines. Sans contrôle de ce caste, la performance de la progéniture se normalise (dérive génétique) et la durée de la ponte des reines raccourcie (mauvaise fécondation).

À long terme, les résultats des travaux de recherches permettent à l'industrie apicole de progresser en tant qu'industrie agroalimentaire au Canada. Nous avons ajouté une expertise supplémentaire qui amène l'industrie apicole aux portes d'un programme scientifique de sélection de l'abeille mellifère. C'est un outil agronomique essentiel pour assurer le progrès zootechnique, l'autosuffisance en abeille et un avenir rentable aux apiculteurs.

5. Les recommandations découlant des résultats

Production et qualité du sperme de faux-bourdon durant la saison de production des reines de l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) au Québec

Deux principaux résultats, d'abord, une proportion importante de faux-bourdons matures n'ont pas de sperme à récolter après éversion manuelle de leur endophallus et d'autre part, le nombre de spermatozoïdes par faux-bourdons (comptage spermatique) était très variable entre les faux-bourdons. Ces résultats confirment ceux de Rhodes et al. (2010) obtenus dans les élevages de reines en Australie.

Les résultats montrent également que : 1) le volume de sperme augmente avec l'âge des faux-bourdons (60% à 14 jours et 85% à 35 jours); 2) le volume de sperme augmente durant la saison apicole (de juin à août); 3) le comptage spermatique et la viabilité des spermatozoïdes ne sont pas influencés par la lignée génétique, l'âge ou le moment de l'élevage durant la saison apicole.

Ces informations indiquent qu'une intervention dans la régie doit être faite pour assurer une qualité homogène des qualités reproductrices des faux-bourdon pendant la saison apicole. Une amélioration de leur alimentation est une solution envisagée.

Optimisation de la fertilité des faux-bourdon avec des suppléments alimentaires au printemps

Les résultats de ce travail montrent que : 1) les faux-bourdon des groupes expérimentaux nourris avec une combinaison de suppléments protéique et glucidique sont significativement plus lourds et plus gros (index abdominal et longueur du thorax); 2) les faux-bourdon du groupe témoin sans supplément alimentaire ont un volume moyen de sperme significativement plus bas que les faux-bourdon des groupes nourris (glucides, protéines ou les deux); 3) la viabilité des spermatozo ides du groupe témoin est significativement plus faible que celle mesurée dans le groupe alimenté avec une combinaison de pollen et de sirop (80% versus 83%); 3) il n'y a pas de différence du comptage spermatique entre les groupes expérimentaux (en moyenne il y a près de 3×10^6 spermatozo ides par faux-bourdon).

Ces résultats démontrent un effet positif de l'amélioration de l'alimentation sur la fertilité des faux-bourdon. Les éleveurs de reines ont avantage d'introduire dans leur régie l'ajout de suppléments alimentaires (protéines et glucides) dans les colonies éleveuses de faux-bourdon afin d'optimiser leurs qualités reproductives et la fécondation des reines.

Impact d'une dose sublethale d'imidaclopride, d'un traitement anti varroa à l'acide formique et leur effet synergique sur le développement et fertilité des faux-bourdon

Les résultats de ce travail montrent que: 1) les unités structurales de testicules (testioles) sont déjà formées au troisième stade larvaire des faux-bourdon ; 2) la spermiogénèse (dernier stade du développement des spermatozo ides) a lieu pendant du stade pupal et c'est à ce moment que les testicules atteignent leur développement maximal ; 3) pendant la phase pr pupale, il y a une dégénérescence des testioles (apoptose) sans inflammation significative mais avec une tendance périphérique et segmentaire ; 4) les différents traitements (imidaclopride et acide formique) n'ont pas eu d'impact tissulaire dans les testioles ; 5) il n'y a pas de différence significative entre les groupes pour le volume de sperme, le comptage spermatique et la viabilité spermatique ; 6) le traitement contre la varroase MAQS (Mite Away Quick Strips®) abouti à des niveaux réduits d'acariens par rapport à des groupes sans MAQS.

Nous croyons que la dégénérescence des testioles observée est une découverte fortuite associée à une évolution normale de ces tissus. De plus, ces observations histologiques sont confirmées par les analyses du

sperme chez les faux bourdons matures qui ne montrent pas d'effet des traitements. Notre travail confirme qu'un traitement antivarroa MAQS réduit le taux d'infestation dans les colonies au cours de l'été.

Étude sur la fertilité et la présence de produits phytosanitaires chez les faux-bourdons capturés au site de fécondation et les reines fécondées des éleveurs de reines québécois et ontariens

Les résultats de ce travail montrent que : 1) les mesures morphométriques sont similaires entre les faux-bourdons des différents éleveurs de l'Ontario et du Québec; 2) le volume de sperme par faux-bourdon et la viabilité des spermatozoïdes est similaire entre les producteurs; 3) le comptage spermatique est différent entre les producteurs, il est plus bas pour les faux-bourdons d'un éleveur de l'Ontario ($1.5 \pm 0.5 \times 10^6$ spermatozoïdes) et plus élevé pour les fauxbourdons d'un éleveur du Québec ($4.6 \pm 1.2 \times 10^6$ spermatozoïdes); 4) il y a huit types de fongicides et quatre types d'insecticides dans les tissus des faux-bourdons évalués; 5) les concentrations de tous les contaminenats sont sous les LD50 abeilles; 6) le pipéronyl de butoxyde a été retrouvé dans tous les échantillons de tous les apiculteurs et le boscalide a été retrouvé chez tous les apiculteurs dans 13 échantillons sur 14; 7) la plus grande proportion de contaminants est retrouvée chez deux éleveurs du Québec (région de l'estrie avec 9 contaminants, région de la montérégie avec 7 contaminants) et un éleveur de l'Ontario (région de <Eastern Ontario>); 7) le mévinphos, interdit d'utilisation au Canada depuis 2004, a été trouvé dans un échantillon de faux-bourdons en Ontario; 8) le coumaphos, pesticide utilisé en apiculture, a été trouvé dans cinq échantillons au Québec chez trois apiculteurs sur quatre;

La présence de ces contaminants dans les tissus des faux-bourdons indique une pollution environnementale provenant des activités agricoles des régions où sont situés les ruchers échantillonnés. Malgré les faibles quantités mesurées, il serait fort intéressant de vérifier si il y a une amplification synergique de leurs effets sur les abeilles. Ce travail indique que les faux-bourdons peuvent être utilisés comme biomarqueurs environnementaux.

6. Pérennité du projet (collaboration, mise en œuvre et adoption par le secteur, etc.).

Une collaboration entre l'équipe technique CRSAD et les apiculteurs de l'Ontario se poursuivra au cours des prochaines années. Cette collaboration est appuyée par l'équipe techique apicole de l'Ontario (Tech Transfer Team) Nos équipes collaborent depuis 2009 dans le cadre de la problématique de l'invasion du petit coléoptère de la ruche et maintenant sur l'évaluation de la fertilité des faux bourdons et l'élevage de reines. Nous comptons intensifier ces

collaborations de recherches appliquées et y ajouter une collaboration dans le cadre d'un programme de sélection génétique et d'insémination instrumentale des reines. Ce serait un atout important pour l'apiculture de nos provinces.

Les résultats de ce travail indiquent aux éleveurs de reines l'importance de la qualité des faux-bourçons. Des ajustements pourront être faits dès cette année dans la région des éleveurs de reines afin d'améliorer l'alimentation des colonies éleveuses de faux-bourçons. L'impact de cette modification se fera ressentir sur la qualité des reines durant les prochaines années.

Ce projet a permis à l'équipe technique du CRSAD de développer une expertise dans la manipulation des faux-bourçons et le prélèvement du sperme. Cette expertise sera utilisée dès l'été prochain dans le cadre du programme de sélection de l'abeille afin d'améliorer l'insémination instrumentale des jeunes reines.

La présence de pesticides/produits phytosanitaires dans les tissus des faux-bourçons est un signal non négligeable. La diffusion de cette information offre aux intervenants du milieu agroalimentaire l'occasion de réfléchir sur l'omniprésence des pesticides/produits phytosanitaires dans notre environnement. Ce projet montre également que les faux-bourçons peuvent être utilisés comme biomarqueurs environnementaux.

7. Suites possibles au projet

- 1) Nous réalisons actuellement au CRSAD un projet sur la conservation des spermatozoïdes de faux-bourçons dans différentes solutions isotoniques.
- 2) L'expertise acquise dans le cadre de ce projet sera utilisée dans le cadre du programme provincial de sélection du CRSAD afin d'optimiser l'insémination instrumentale des reines.
- 3) Nous voulons pousser plus loin cette recherche et tester d'autres suppléments alimentaires (autres mélanges de protéines et probiotiques) sur le développement printanier des faux-bourçons.
- 4) Nous voulons poursuivre avec un projet de recherche sur l'utilisation des faux-bourçons comme biomarqueurs environnementaux, c'est à dire vérifier l'impact de la pollution environnementale sur le comptage spermatique et la viabilité des spermatozoïdes.

SUMMARY/CONCLUSIONS

1. Pimportance of project implications

The beekeeping industry in Quebec is experiencing a dramatic expansion. It is estimated that Quebec beekeepers managed 49,708 productive colonies in 2012, 8 301 (20%) more than in 2011 (Institut de la statistique du Québec). The value of honey sales increased for a third consecutive year (20.1% over 2011) and has attained a record high in a decade, totalling \$12.3 million (\$ M) in 2012. In addition, in 2012, for the fifth consecutive year, the number of colonies leased for crop pollination (38 306), average rental price (\$ 107.37 / colony) and total income settlements (\$4.1 M) all increased.

This growth is unfortunately accompanied by a high annual bee mortality rate, all across Canada (25% on average nationally, CAPA statistics) and a greater dependence on package bees and queens imported from California, Hawaii, Australia, New Zealand and Chile. These imports meet short-term needs but require Canadian beekeepers to use bee stock poorly adapted to our northern environmental conditions and increase dependence on other countries for bee supply. To better serve our industry, several Canadian breeding programs now exist, including our own (CRSAD). These programs aim to increase our self-sufficiency, improve the performance of Canadian honey bee colonies and steer selection criteria toward domestic beekeeping needs.

For the last ten years, beekeepers have noted an increase in the number of young queens exhibiting reduced impaired egg laying, both among those obtained from commercial queen breeders in Canada and from abroad. The hypothesis of a problem during fertilization of young queens has often been raised (insufficient number of males or inadequate sperm quality). We therefore found it essential to gain more detailed knowledge on the development and maturation of drone (male bees), and study the impact of various abiotic and biotic factors on their reproductive qualities. This information will guide queen breeders in optimizing the fertilization of young queens and maximizing the strength and production of bee colonies.

2. Project goal

This project aimed to identify techniques for optimizing reproductive qualities of drones used for fertilization of honeybee queens (*Apis mellifera* L.) produced commercially in Canada.

3. Project activities completed

This project has now been completed, and we achieved all six objectives proposed initially. The first three objectives were achieved through the research conducted by Andrée Pelletier-Rousseau for her M.Sc. thesis, entitled "Factors influencing drone (*Apis mellifera* L.) sperm quality during queen bee production season in southeastern Canada", submitted to the Department of Plant Sciences, Laval University, Québec for evaluation in January 2014. The three other objectives were accomplished separately, and manuscripts will be submitted for publication in various apicultural science journals on: (1) Optimizing drone fertility with nutritional supplements to colonies during spring; (2) Drone development and fertility in relation to a Varroa formic acid treatment, a sublethal imidacloprid dose and their synergetic effect; and on a (3) Study on fertility and the presence of pesticides in drones captured in queen mating yards from Quebec and Ontario.

4. Expected benefits in the short term, medium term and long term

The realization of this project has highlighted the importance of a drone breeding program to optimize their fertility. First, this project has enabled professionals from the CRSAD and the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal to gain uniquely Canadian expertise on handling honey bee drones and evaluate many aspects of their reproductive physiology. We now have both the specialized knowledge required to conduct a thorough evaluation of drone fertility (sperm count and sperm viability) and the necessary equipment (fluorescence microscope). These tools are essential for the success of advanced queen breeding programs in the face of increasing problems with bee fertility and reproduction, and, on a practical level, for achieving instrumental insemination of young queens. This type of program is now in operation at our CRSAD research station. A second benefit of the project for the beekeeping industry are the several experimental protocols we developed: on drone fertility during honey bee season (May to September), on the impact of dietary supplements (protein and sucrose) and on the impact of an acaricide and a pesticide on drone development, maturation and reproductive qualities. Of additional benefit, is an exploratory study we were able to conduct on drone fertility while sampling in queen mating yards of four Quebec and two Ontario queen breeders. To our knowledge, such data has never been made available to the Canadian beekeeping industry before.

This project has several impacts in the short and medium term. This project will benefit the Canadian beekeeping industry in a number of ways, both directly and indirectly. In addition to developing expertise on drone fertility at two

Quebec research centers, we have highlighted the essential role drones have in a bee colony. Drones are often the neglected caste, considered unnecessary and even detrimental to the economic performance of a colony. In fact, they provide half of the honey bee genome and contribute to the colony's genomic biodiversity through the multi-male mating system. Controlling the development of this caste ensures selection of progeny (performance improvement) and optimal fertilization of young queens. Without control of drone breeding, the performance of progeny is offset (genetic drift), and the lifespan of laying queens is shortened (poor mating and poor fertilization).

In the long term, the results of this research will assist expansion of the beekeeping industry in Canada by providing additional expertise that brings both scientists and beekeepers closer to the development of scientific Canadian honey bee breeding programs. Ultimately, such an approach will be essential for ensuring livestock improvement, self-sufficiency and a profitable future for all Canadian beekeepers.

5. Recommendations based upon our findings

Factors influencing drone (*Apis mellifera* L.) sperm quality during queen bee production season in southeastern Canada

Two key findings confirmed observations made previously in an Australian study, which represent extremely important information for beekeepers (Rhodes et al. 2010). First, we found that a high proportion of mature drones failed to release semen after manual eversion. Second, sperm count was highly variable among drones.

Our results also showed that: 1) the volume of sperm increased with drone age (60% at 14 days and 85% at 35 days); 2) semen volume increased during the beekeeping season (June to August); and 3) sperm count and sperm viability were not influenced by genetic line, age or time of breeding during the beekeeping season.

Recommendation: Based on these results, queen-breeding beekeepers should manage their drone rearing colonies to ensure consistent drone quality. Improving their diet is a proposed solution.

Optimizing drone fertility with nutritional supplements to colonies during spring

The results of this work showed that : 1) drones from experimental groups fed with a combination of protein and sucrose supplements were significantly heavier and larger (abdominal index and length of the thorax); 2) the average semen volume of drones in the control group without supplements was significantly lower than

that of drones in groups with supplements (carbohydrates, protein or both); 3) sperm viability in the control group was significantly lower when compared to the group fed with the combination of pollen and syrup (80 % versus 83%); and 4) there was no difference in sperm count between the various groups; the average sperm count in all groups was about 3×10^6 spermatozoa per drone. These findings illustrate the positive effect of feeding protein and sucrose supplements to drone rearing colonies on the development and fertility of the drones.

Recommendation: Queen breeding beekeepers should provide additional dietary supplements (proteins and carbohydrates) to their drone breeding colonies in order to optimize drone reproductive qualities, queen mating and queen fertilization.

Drone development and fertility in relation to a Varroa formic acid treatment, a sublethal imidacloprid dose and their synergetic effect.

The results of this work showed that: 1) the structural units of drone testes (testioles) have already formed in the third instar larvae; 2) spermiogenesis (last stage of sperm development) takes place when testes reach their maximum development during the pupal stage; 3) testiole degeneration (apoptosis) occurs during the prepupal stage, without significant inflammation but with a peripheral and segmental pattern; 4) different treatments in experimental groups (imidacloprid and/or formic acid) had no chemical-related effect on testicular development; 5) drone fertility measurements (volume of semen, sperm count and sperm viability) were similar between groups; and 6) Varroa treatment with MAQS (MiteAwayQuickStrips®) reduced mite infestation rates when compared to untreated groups.

We believe that tissue degeneration observed in testioles is an incidental finding associated with normal development of these tissues, and is not the result of either imidacloprid or formic acid exposure. These histological observations concur with the similar sperm fertility measurements we found in drones from various experimental groups. Our work confirms that a mid-summer Varroa treatment with MAQS reduces varroa infestation rates in colonies.

Recommendation: Beekeepers can prevent or reduce varroa infestation with a mid-summer application of MAQS.

Fertility and pesticide contamination of drones captured in queen mating yards from Quebec and Ontario

The results of this work showed that: 1) drone morphometric measurements are similar between drone samples from Québec and Ontario queen breeding beekeepers; 2) drone semen volume and sperm viability is

similar in colonies belonging to Québec and Ontario queen breeding beekeepers; 3) sperm count is different in drones from Québec and Ontario queen breeding beekeepers; it is lower for drones from an Ontario queen breeder ($1.5 \pm 0.5 \times 10^6$ sperm) and higher for those from a Quebec queen breeder ($4.6 \pm 1.2 \times 10^6$ sperm); 4) drone samples had eight different fungicides and four different insecticides in organ tissues; 5) concentrations of all contaminants were under the LD50 for bees; 6) greater proportions of contaminants were found in drones from two Quebec queen breeders (Eastern Townships with 9 contaminants, Montérégie with 7 contaminants) and one from Ontario (Eastern Ontario with 7 contaminants); 7) piperonyl butoxide was found in all drone samples from all beekeepers, and boscalid was found in 13 of 14 samples representing all beekeepers; 8) mevinphos, an insecticide banned in Canada since 2004, was found in a drone sample from Ontario; and 9) coumaphos, a pesticide/acaricide used in beekeeping, was found in 5 samples from Quebec among colonies of 3 beekeepers.

Avenues for future research: While no specific recommendations for beekeepers resulted from this study, several issues that warrant further study should be noted (see “Future projects”, below). The presence of contaminants in drone tissues indicates a certain level of environmental pollution associated with agricultural activities in areas where apiaries were sampled for drones. Despite the low levels measured, it would be important to investigate whether there is a synergistic enhancement effect of all these products on honey bee health. These findings also indicate that drones could be used as environmental biomarkers.

6. Sustainability of the project (collaboration, adoption by industry, etc.)

Collaboration between the CRSAD technical team and Ontario Beekeepers will continue over the coming years. This collaboration is supported by the Ontario beekeeping Tech Transfer Team. Since 2009, both of our teams have been involved in research on the invasion by the Small hive beetle and, more recently, on the evaluation of drone fertility. Based on the quantity of specific data and its applicability to beekeeping, we consider it essential that this collaboration be extended to other applied research topics. Our teams both believe strongly that we should collaborate on the development of a framework for a Canadian breeding program using instrumental queen insemination, which would be a great asset to our beekeeping industry.

The results of this work highlight the critical impact of drone reproductive qualities and careful management of drone rearing colonies, and these findings will be applied immediately. Adjustments will be made this year by many of the queen breeding beekeepers that participated in this project. Others will surely follow, once our findings are publicized

through meetings and publications. Once the technological transfer from laboratory analysis to actual breeding programs begins, results will be measurable in the quality of queens over the coming years.

This project has enabled the CRSAD technical team to develop an expertise in handling drones and collecting semen. This knowledge will be used next summer in our breeding program, to improve instrumental queen insemination.

The presence of pesticides/fungicides in drone organ tissues is an important signal. This information provides industry stakeholders the opportunity to consider and reflect on the ubiquity of pesticides/fungicides in our environment.

7. Future projects

- 1) A project on drone sperm conservation in different isotonic solutions is now underway at our research station (CRSAD). Experiments will test sperm fertility following various lengths of conservation.
- 2) The expertise gained from this project will be used in our provincial honey bee breeding program to optimize instrumental queen insemination. This is essential to produce honeybee inbred lines with specific performance criteria.
- 3) In this research we have tested one type of supplement and is now important to test other food supplements (other mixtures of proteins, sucrose and probiotics) on spring development of drones and their reproductive qualities. We strongly believe that this will lead to the development of a food supplement for optimum drone production.
- 4) This project's findings showed that drone tissue samples contain various contaminants. We wish to test the efficacy of using drones as environmental biomarkers, and measure the impact of environmental pollution on sperm count and sperm viability.

Plan de financement et conciliation des dépenses

Remplir et transmettre le Plan de financement et conciliation des dépenses (relié à l'Annexe B de la convention de contribution financière) dont vous avez reçu une copie électronique en format MS Excel.

Vous devez y joindre toutes les copies de factures relatives aux postes budgétaires. Les contributions du demandeur et des partenaires doivent également être justifiées. **Aucun versement ne sera effectué sans que les pièces justificatives acquittées ne soient déposées.**

Référez-vous aux instructions disponibles dans la première feuille du chiffrier Excel intitulé **Plan de financement et conciliation des dépenses**.

Tout projet peut faire l'objet d'un audit.

Conformément à l'entente de contribution, vous êtes tenu de tenir le CDAQ informé des modifications au projet et au plan de financement.

Dernière mise à jour du formulaire par le CDAQ : 17 mars 2010