

ZUKUNFT BIENE



Zukunft Biene 2

1. Zwischenbericht

Stichtag: 1. September 2018

Forschungsprojekt Nr. 101295

**Zukunft Biene 2 – Grundlagenforschungsprojekt zur Förderung des
Bienenschutzes und der Bienengesundheit
(Kurztitel: Zukunft Biene 2)**

Dieser Zwischenbericht wurde am 31. August 2018 über Dafne (www.dafne.at) zur
Approbation eingereicht.

1. Zwischenbericht

(Stichtag: 1. September 2018)

An der Projektabwicklung und Berichtserstellung beteiligte Einrichtungen:

- Karl-Franzens-Universität Graz
 - o Institut für Biologie

- AGES
 - o Institut für Saat- und Pflanzgut, Pflanzenschutzdienst und Bienen, Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz
 - o Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling
 - o Fachbereich Daten, Statistik, integrative Risikobewertung

- Veterinärmedizinische Universität Wien
 - o Institut für Virologie

Ansprechpartner für Rückfragen:

Projektleiter: Univ. Prof. Dr. Karl Crailsheim, Karl-Franzens-Universität Graz, Institut für Biologie, Tel: 0316 380 5616; karl.crailsheim@uni-graz.at

Dr. Robert Brodschneider, Karl-Franzens-Universität Graz, Institut für Biologie, Tel: 0316 380 5602; robert.brodschneider@uni-graz.at

Dr. Linde Morawetz, AGES, Institut für Saat- und Pflanzgut, Pflanzenschutzdienst und Bienen, Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz Wien, Tel: 050 555 33 120; linde.morawetz@ages.at

Dr. Benjamin Lamp, Veterinärmedizinische Universität Wien, Institut für Virologie, Tel: 01 25077 2709; Benjamin.Lamp@vetmeduni.ac.at

Autoren und Autorinnen des Zwischenberichts:

Vorwort: Karl Crailsheim

Modul (U): Robert Brodschneider, Marlene Karrer

Modul (A): Linde Morawetz, Hemma Köglberger, Adi Steinrigl, Antonia Griesbacher, Irmgard Derakhshifar, Katharina Etter, Sigrid Traeger, Rudolf Moosbeckhofer

Modul (V): Kerstin Seitz, Till Rümenapf, Benjamin Lamp

Finanzierung

Laufzeit: 22.12.2017 – 30.09.2021

Das Projekt wurde im Rahmen der Bund-Bundesländer-Kooperation finanziert durch:

Bundesministerium für Nachhaltigkeit und Tourismus	€ 251.397,00
Biene Österreich	€ 270.000,00
Bundesländer	€ 160.000,00
Eigenmittel Universität Graz	€ 33.347,62
Eigenmittel AGES	€ 74.015,69
Eigenmittel Vetmed	€ 85.262,00

Inhaltsverzeichnis

Autoren und Autorinnen des Zwischenberichts	IV
Finanzierung	V
Vorwort	IX
Danksagung	X
Zusammenfassung	1
Project Summary	3
(U) Wintersterblichkeit	
1.1 Zusammenfassung der Untersuchung der Wintersterblichkeit 2017/18	5
1.2 Einleitung	5
1.3 Methodik und Ergebnisse	10
1.3.1 Datenerhebung	10
1.3.2 Statistik	11
1.4 Ergebnisse	11
1.4.1 Beteiligung	11
1.4.2 Repräsentativität	12
1.4.2.1 Anonyme Teilnahme versus nicht anonyme Teilnahme	12
1.4.2.2 Online-Antworten versus Papierfragebogen-Antworten	12
1.4.2.3 Betriebsgröße	13
1.4.2.4 Geografische Herkunft	13
1.4.2.5 Bienenstandort	14
1.4.3 Verlustrate in Österreich, den Bundesländern und den Bezirken	14
1.4.3.1 Österreich	14
1.4.3.1.1 Populationsdynamik in Österreich	15
1.4.3.2 Bundesländer	16
1.4.3.3 Ausgewählte Bezirke	17
1.4.4 Symptome	23
1.4.5 Verteilung der Völkerverluste	23
1.4.6 Risikoanalyse	24
1.4.6.1 Betriebsgröße	24
1.4.6.2 Stand- versus Wanderimkereien	25
1.4.6.3 Wabenhygiene	25
1.4.6.4 Trachtangebot	26
1.4.6.5 Seehöhe	27
1.4.6.6 Bekämpfung der Varroamilbe	27
1.4.6.6.1 Bestimmung des Varroabefalls	29
1.4.6.6.2 Zeitpunkt und Häufigkeit der Anwendungen	32
1.4.6.6.3 Auswirkungen der Drohnenbrutentnahme auf die Winterverluste	32
1.4.6.6.4 Ameisensäure-Behandlung	35
1.4.6.6.5 Oxalsäure	36
1.4.6.6.6 Hivclean/Bienenwohl/Varromed	38
1.4.6.6.7 Thymol	38
1.4.6.6.8 Hyperthermie	39
1.4.6.6.9 Andere biotechnische Methoden (ohne Hyperthermie/Drohnenbrutentnahme)	40

1.4.6.6.10 Königinnen-Probleme	41
1.4.6.6.11 Im Einwinterungsjahr begattete Königin („junge Königin“)	41
1.4.6.6.12 Verkrüppelte Flügel	
1.4.6.6.13 Betriebsweise 2017/18	42
1.5 Diskussion	44
(A) Virenmonitoring	
2.1 Einleitung	49
2.2 Material und Methoden	50
2.2.1 Zeitablauf	50
2.2.2 Werbung der TeilnehmerInnen	51
2.2.3 Stichprobengröße und Auswahl der TeilnehmerInnen	53
2.2.4 Geplante Durchführung der Probenahme	55
2.2.5 Virusanalytik	56
2.2.5.1 Plasmide und Bienenhomogenate zur Methodenetablierung und Validierung	56
2.2.5.2 Nukleinsäureextraktion aus Bienenhomogenaten	59
2.2.5.3 Methodenetablierung und -validierung zum Nachweis und zur Quantifizierung von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A und SBV (ABCDS)	59
2.2.5.4 CBPV-Ringversuch und Quantifizierung weiterer CBPV Referenzproben	61
2.2.5.5 Methodenetablierung und -validierung zum Nachweis und zur Quantifizierung von IAPV und KBV	61
2.3 Ergebnisse	62
2.3.1 Fortschritt Methodenentwicklung	62
2.3.2 Status TeilnehmerInnenwerbung	62
2.4 Anhang	63
(V) Virendiagnostik und -prophylaxe bei Honigbienen	
3.1 Kurzzusammenfassung des bisherigen Verlaufs der Studie	67
3.2 Einleitung	67
3.3 Methodik	68
3.3.1 Ausgangslage der Studie	69
3.4 Ergebnisse	69
3.4.1 Antikörper	69
3.4.2 Antigene	69
3.4.3 Immunisierungen	70
3.4.4 ELISA-Tests mit definierten Proben	70
3.4.5 ELISA-Tests mit Feldproben	70
3.5 Diskussion	70
Veröffentlichungen und Vortragstätigkeit im Zeitraum der Projektdauer (22. Dezember 2017 bis 31. August 2018)	71
Literaturzitate	73



KARL-FRANZENS-UNIVERSITÄT GRAZ
UNIVERSITY OF GRAZ



Vorwort

Das von 2014 bis 2018 gelaufene Projekt „Zukunft Biene“ hat wertvolle Informationen und Einsichten zur Bienengesundheit in Österreich erbracht. Von den dort untersuchten Forschungsbereichen werden nun zwei im Projekt „Zukunft Biene 2“ weiter behandelt. Es sind dies zum einen die Untersuchung der Wintersterblichkeit, ihrer Ursachen und der Vermeidungsmöglichkeiten – ein Thema das nun seit mehr als einem Jahrzehnt im Blickpunkt der Öffentlichkeit steht. Die Universität Graz, die wieder mit der Gesamtleitung des Projektes beauftragt wurde, hat auch diesmal diesen Part übernommen; die Untersuchungen werden am Institut für Biologie (vormals: Zoologie) durchgeführt. Zum anderen hat sich gezeigt, dass mit dem Dauerproblem des Befalls mit der Varroamilbe dem Aspekt der damit verbundenen Virenerkrankungen eine immer stärkere Bedeutung zukommt. Dem wurde Rechnung getragen und dieser Krankheitsaspekt als neuer Fokus den Forschungsfragen hinzugefügt. Die AGES untersucht die Virenbelastung der Völker in Österreich qualitativ und quantitativ über einen mehrjährigen Zeitraum. Mit der Veterinärmedizinischen Universität wurde eine weitere potente Partnerin ins Boot geholt. Ihre Aufgabe ist es, kostengünstige und einfach durchzuführende Tools zu entwickeln, mit der in Zukunft Virenuntersuchungen im Feld durchgeführt werden können.

Die Untersuchungen der Universität Graz und der AGES werden wieder dem bewährten Konzept der Citizen Science folgend unter intensiver Beteiligung der Österreichischen Imkerschaft durchgeführt. Einen Aufruf zur Teilnahme hat es bereits gegeben.

Während die Untersuchungen zur Wintersterblichkeit kontinuierlich fortgesetzt werden können, wurde bei der Virenthematik Neuland betreten. Dementsprechend gibt es für das erste Themenfeld bereits mehr ausgewertete Resultate als für das zweite. Die Wintersterblichkeit 2017/18 lag mit 11,8% erfreulich niedrig.

Karl Crailsheim, Projektleiter

Graz, am 31.8.2018

Danksagung

Großer Dank gebührt den Geldgebern dieses Projektes, dem Bundesministerium für Nachhaltigkeit und Tourismus, den Bundesländern, der Biene Österreich, und den beteiligten Forschungseinrichtungen (Universität Graz, AGES, Veterinärmedizinische Universität Wien), letzteren auch für die Stellung des wissenschaftlichen Personals.

Der Großteil unserer Untersuchungen wäre nicht möglich, gäbe es nicht eine hervorragende Kooperation zwischen der österreichischen ImkerInnenschaft und den beteiligten WissenschaftlerInnen sowie den technischen MitarbeiterInnen – auch hierfür besonderen Dank.

Karl Crailsheim
Projektleiter *Zukunft Biene 2*

Zusammenfassung

Im Modul U werden die Winterverluste von Bienenvölkern erhoben und auf Risikofaktoren hin untersucht. In Österreich wird diese Untersuchung seit nunmehr elf Jahren durchgeführt. Die Verlustraten der eingewinterter Völker reichen dabei von 8,1% (Winter 2015/16) bis 28,4% (Winter 2014/15). Die 1391 Antworten betreffend 28.373 eingewinterter Bienenvölker der Untersuchung 2018 wurden auf ihre Repräsentativität überprüft und Analysen zur geografischen Verteilung der Verluste, zu den die Winterverluste begleitenden Symptomen, sowie zur Betriebsweise durchgeführt. Ein wichtiger Faktor war außerdem die Analyse der Behandlungsmethoden, welche zur Bekämpfung von *Varroa destructor* eingesetzt wurden und der Einfluss dieser Methoden auf die Wintersterblichkeit.

Die Winterverlustrate für ganz Österreich lag 2017/18 bei 11,8% (95% Konfidenzintervall: 11,1-12,5). Die Unterschiede zwischen den Verlustraten der einzelnen Bundesländer waren mit 7,9% (im Burgenland) und 14,5% (in Kärnten) relativ gering, wie auch die Verluste aller Bundesländer relativ gering ausfielen. Wie in den vorangegangenen Jahren konnte ein signifikanter Einfluss der Betriebsgröße auf die Wintersterblichkeit nachgewiesen werden, mit geringeren Verlusten bei größeren Betrieben. Von höchsten Verlusten betroffen waren Imkereien mit weniger als 20 Völkern. Der Faktor Betriebsgröße ist dabei als Sammelfaktor, der unterschiedliche Parameter wie Professionalität, Erfahrung in der Imkerei etc. beinhaltet, zu diskutieren. Die im Winter 2017/18 erlittenen Winterverluste können als mittel bis niedrig bezeichnet werden und bewirken daher, dass in der weiteren Risikoanalyse kaum signifikante Unterschiede in den Winterverlusten unterschiedlicher Betriebsweisen oder Varroabekämpfungsstrategien zu finden waren. Lediglich die aus mehreren vorangegangenen Untersuchungen schon bekannten negativen Effekte wie im Vergleich zum Vorjahr häufiger auftretende Königinnenprobleme während der Saison, das Vorkommen der Trachtpflanze Mais, sowie die Betriebsgröße konnten als die Winterverluste signifikant steigernde Faktoren identifiziert werden. Dieser Mangel an statistisch belegbaren Unterschieden liegt unter anderem an der generell guten Überwinterung über weite Teile Österreichs, und quer über verschiedene Betriebsweisen. Es sei an dieser Stelle auf die höhere statistische Trennschärfe in Wintern mit hohen Winterverlusten verwiesen und die Analyse mehrerer Untersuchungsjahre.

Im Modul A wird ein österreichweites Monitoring von Bienenviren durchgeführt. Bienenviren gelten gemeinsam mit der Varroamilbe als wichtige Faktoren für das Absterben von Bienenvölkern über den Winter. Aber auch während des Jahres können Virusinfektionen zu Ausfällen und Schwächungen von Bienenvölkern führen. Trotz der Bedeutung der Bienenviren für die Bienengesundheit ist über das Vorkommen von Viren in Österreichs Bienenvölkern bisher nur begrenztes Wissen vorhanden, das keine gesicherten Aussagen zur generellen Prävalenz der untersuchten Bienenviren in Österreich erlaubt.

Im vorliegenden Projekt wird daher für sieben Bienenviren deren Prävalenz auf Bienenstandniveau in Österreich über drei Jahre erhoben. Diese Viren umfassen das Akute Bienenparalyse-Virus (ABPV), das Schwarze Königinnenzellen-Virus (BQCV), das Chronische Bienenparalyse-Virus (CBPV), Flügeldeformationsvirus (DWV), das Israelische Akute Paralyse-Virus (IAPV), Kashmir-Bienenvirus (KBV) und Sackbrutvirus (SBV). Zusätzlich werden die Daten auf Korrelationen zwischen dem Auftreten der Virusarten / der Höhe des Virustiters und den Winterverlusten für den auf die Probenahme folgenden Winter analysiert werden.

Die Probenahme wird in den drei Versuchsjahren 2018-2020 ident ablaufen. Die teilnehmenden 200 ImkerInnen werden die Probenahme im jeweiligen September selber durchführen. Dafür werden sie mit allen notwendigen Materialien zur Durchführung aus IAPV gestattet (ausführliche, bebilderte Arbeitsanleitung, Fragebogen, Plastiketiketten, Königinnenkäfige samt Futterteig, frankiertes Rücksendekuvert). Bei den Probenahmen werden aus den fünf definierten Proben-

völkern jeweils zehn Bienen entnommen. Diese werden mittels Königinnenversandkäfigen – gemeinsam mit dem ausgefüllten Fragebogen – an die AGES versandt und unmittelbar nach der Ankunft auf -20°C gekühlt und damit abgetötet. Pro Bienenstand wird eine Sammelprobe aus den fünf Probenvölkern (insgesamt 50 Bienen) erstellt. Die 200 Sammelproben werden mittels quantitativer RT-qPCR auf die sieben Bienenviren untersucht. Die TeilnehmerInnen werden jedes Jahr voraussichtlich im auf die Probenahme folgenden Februar über die Ergebnisse der Virusanalyse informiert. Im darauffolgenden Frühling werden sie die Überwinterungsergebnisse der Probenvölker sowie des gesamten Probenstandes an die Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz der AGES rückmelden.

Im Frühjahr 2018 wurde unter der Imkerschaft Österreichs nach InteressentInnen für die Teilnahme am Virenmonitoring gesucht. Aus den 297 Meldungen wurden mittels einer stratifizierten Zufallsauswahl 200 ImkerInnen zur Teilnahme ausgewählt. Des Weiteren wurden bisher die Techniken zur Detektion und Quantifizierung von vier der Bienenviren an der AGES, Abteilung Molekularbiologie des Instituts für veterinärmedizinische Untersuchungen (Mödling), vollständig etabliert und validiert. Zur Methodenentwicklung der drei restlichen Bienenviren sind noch weitere Vorarbeiten notwendig, die voraussichtlich mit Ende des Jahres 2018 abgeschlossen werden.

Die zu erwartenden Gesamtergebnisse des Virenmonitorings werden zeigen, welche der untersuchten Bienenviren häufig in Österreich auftreten und welche davon vermehrt bei hohen Winterverlusten auftreten. Damit lässt sich abschätzen, welche der sieben Viren für die Bienengesundheit in Österreich – und damit für den Bienenbestand und die Imkereiwirtschaft – von hoher Relevanz sind.

Im Modul V sollen Antikörper zum Nachweis viraler Genprodukte generiert und „Enzyme linked immuno sorbent assays (ELISA)“ zum schnellen und kostengünstigen diagnostischen Nachweis von Virusinfektionen bei Honigbienen im Labor und im Feld entwickelt werden. Im ersten Schritt müssen geeignete Antigen-Präparationen für die Immunisierungen und Tests produziert werden. Als Projektdauer wurden drei bis vier Jahre veranschlagt, wobei ein planmäßiger Projektbeginn ab Mai 2018 nach Eingang der Finanzierung eingehalten werden konnte. Durch den günstigen Startzeitpunkt konnte die saisonale Brutaktivität der Honigbienen 2018 effizient ausgenutzt werden, um durch Infektionsexperimente authentische Antigene verschiedener Virus-Spezies zu produzieren. In den ersten vier Monaten des Projektes wurden viele verschiedene Virusstämme auf ihre Reinheit untersucht und die Infektionseffizienz der Viruspräparationen getestet. Es gelang, Antigene des Deformed wing virus (DWV-A), Varroa destructor Virus (VDV/DWV-B), Sackbrutvirus (SBV), Virus der chronischen Bienenparalyse (CBPV) sowie des Virus der akuten Bienenparalyse (ABPV) zu produzieren. Durch Ultrazentrifugation wurden Antigen-Konzentrate erzeugt, die in Screening- und Charakterisierungsversuchen eingesetzt werden können. Leider ist 2018 an unseren Versuchsbienenständen ein sehr milbenreiches Jahr, so dass seit Anfang August viele der Versuche durch SBV-Wildstämme kontaminiert wurden. Bis zur nächsten Brutsaison (Anfang April 2019) wird nun untersucht, welche der Strukturprotein-Antigene der Viren in rekombinanten Systemen produziert werden können. Diese Proteine werden dann gereinigt, um daraufhin die Spezifitäten und Affinitäten der zu generierenden Antikörper zu testen (Westernblot und Bio-Layer-Interferometrische Analysen).

Project Summary

In module U, winter losses of bee colonies are monitored and examined for risk factors. So far, this study has been carried out in Austria for eleven years. The loss rates of overwintering colonies range from 8.1% (winter 2015/16) to 28.4% (winter 2014/15). The 1391 answers concerning 28,373 winterized bee colonies of the 2018 study were checked for their representativeness and analyses were carried out on the geographical distribution of the losses, on the symptoms accompanying the winter losses, and on the beekeeping practices. An important factor was also the analysis of treatment methods used to combat *Varroa destructor* and the influence of these methods on winter mortality.

The winter loss rate for the whole of Austria was 11.8% in 2017/18 (95% confidence interval: 11.1-12.5). The differences between the loss rates of the provinces were relatively small at 7.9% (in the Burgenland) and 14.5% (in Carinthia), as were the losses of all provinces relatively small. As in previous years, a significant impact of the size of beekeeping operation on winter mortality could be demonstrated, with lower losses for larger apiaries. Highest losses affected beekeepers with less than 20 colonies. The size of the apiary as a factor is to be discussed as a lumping factor that includes different parameters such as degree of professionalism, experience in beekeeping, etc. The winter losses suffered in winter 2017/18 can be described as medium to low and therefore obscured in the further risk analysis significant differences in winter survival rates under different operating modes or different *Varroa* control strategies. Only the negative effects that were already known from several previous studies, such as queen problems that occurred more frequently during the season than in the previous year, the occurrence of maize as pollen plant and the size of the farm, could be identified as factors that significantly increase winter losses. This lack of statistically verifiable differences is due, among other factors, to the generally good survival rate over the last winter in large parts of Austria and across different operating modes. At this point, we should refer to the higher statistical discriminatory power in winters with high winter losses and to the further analysis of subsequent years of investigation.

In module A, an Austria-wide monitoring of bee viruses will be carried out. Together with the *Varroa* mite, bee viruses are considered important factors for the death of bee colonies over the winter. But also during the year, virus infections can lead to colony losses or colony weakening. Despite the importance of bee viruses for bee health, only limited knowledge is currently available on the occurrence of viruses in Austria's bee colonies, therefore, reliable statements on the general prevalence of the investigated bee viruses in Austria are yet not possible.

In the present project, the prevalence of seven bee viruses found at an apiary level in Austria is measured over three years. These viruses comprise Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), the Black Queen Cell Virus (BQCV), Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV), Deformed Wing Virus (DWV), Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV), Kashmir Bee Virus (KBV) and the Sacbrood Virus (SBV). In addition, the data will be analysed for correlations found in the winter following the sampling between winter losses vs. both the occurrence of virus species and the height of the virus titre.

Sampling will be identical during the observation period from 2018–2020. The 200 participating beekeepers will carry out the sampling themselves each September. For this purpose, they are provided with all necessary materials (detailed and illustrated instructions, questionnaire, plastic labels, queen cages including patty, stamped return envelope). During sampling, ten bees are taken from each of the five defined sample colonies. These are sent to the AGES by means of queen shipping cages – together with the completed questionnaire – and cooled to -20°C immediately upon arrival and thus killed. For each apiary, one aggregate sample is taken from the five sample colonies (a total of 50 bees). The 200 samples are analysed for the seven bee viruses

using quantitative RT-qPCR. Participants are expected to be informed of the results of the virus analysis each year in February following sampling. In the following spring, they will report the wintering results of the sample colonies and the entire apiary to the Department for Apiculture and Bee Protection of the AGES.

In the spring of 2018, the Austrian beekeeping community was searched for interested individuals to participate in virus monitoring. From the 297 applications, 200 beekeepers were selected for participation by means of a stratified random selection. Furthermore, the techniques for detection and quantification of four of the bee viruses have been fully established and validated at AGES, Department Molecular Biology of the Institute for Veterinary Disease Control (Mödling). Further preliminary work is required to develop the necessary methods for the three remaining bee viruses, which is expected to be completed by the end of 2018.

The expected overall results of the virus monitoring will show which of the investigated bee viruses frequently occur in Austria and which of them occur more frequently during high winter losses. This will enable us to assess which of the seven viruses are of high relevance for bee health in Austria – and thus for the bee population and the beekeeping industry.

In module V, antibodies for the detection of viral gene products and "Enzymes linked immunosorbent assays (ELISA)" will be developed for the rapid and cost-effective diagnostic detection of viral infections in honeybees both in laboratories and in the field. In the first step, suitable antigen preparations for immunizations and tests are to be produced. The duration of the project is expected to be three to four years, with a scheduled project start from May 2018 after receipt of financing. Due to the favourable start time, the seasonal breeding activity of honeybees could be efficiently utilized in 2018 in order to produce authentic antigens of different virus species through infection experiments. During the first four months of the project, many different virus strains were examined for their purity and the infection efficiency of the virus preparations was tested. It was possible to produce antigens of the deformed wing virus (DWV-A), Varroa destructor virus (VDV/DWV-B), sacbrood virus (SBV), chronic bee paralysis virus (CBPV) and acute bee paralysis virus (ABPV). Ultracentrifugation has produced antigen concentrates that can be used in screening and characterization experiments. Unfortunately, the year 2018 has been a very mite-rich year at our experimental apiaries, so that many of the experiments have been contaminated by SBC wild strains since the beginning of August. Until the next breeding season (beginning of April 2019), it will be investigated which of the virus' structural protein antigens can be produced in recombinant systems. These proteins are then purified to test the specificities and affinities of the antibodies to be generated (western blot and bio-layer interferometric analyses).

(U) Wintersterblichkeit

1.1 Zusammenfassung der Untersuchung der Wintersterblichkeit 2017/18

Im Modul U werden die Winterverluste von Bienenvölkern erhoben und auf Risikofaktoren hin untersucht. In Österreich wird diese Untersuchung seit nunmehr elf Jahren durchgeführt. Die Verlustraten der eingewinterten Völker reichen dabei von 8,1% (Winter 2015/16) bis 28,4% (Winter 2014/15). Die 1391 Antworten betreffend 28.373 eingewinterte Bienenvölker der Untersuchung 2018 wurden auf ihre Repräsentativität überprüft und Analysen zur geografischen Verteilung der Verluste, zu den die Winterverluste begleitenden Symptomen, sowie zur Betriebsweise durchgeführt. Ein wichtiger Faktor war außerdem die Analyse der Behandlungsmethoden, welche zur Bekämpfung von *Varroa destructor* eingesetzt wurden und der Einfluss dieser Methoden auf die Wintersterblichkeit.

Die Winterverlustrate für ganz Österreich lag 2017/18 bei 11,8% (95% Konfidenzintervall: 11,1-12,5). Die Unterschiede zwischen den Verlustraten der einzelnen Bundesländer waren mit 7,9% (im Burgenland) und 14,5% (in Kärnten) relativ gering, wie auch die Verluste aller Bundesländer relativ gering ausfielen. Wie in den vorangegangenen Jahren konnte ein signifikanter Einfluss der Betriebsgröße auf die Wintersterblichkeit nachgewiesen werden, mit geringeren Verlusten bei größeren Betrieben. Von höchsten Verlusten betroffen waren Imkereien mit weniger als 20 Völkern. Der Faktor Betriebsgröße ist dabei als Sammelfaktor, der unterschiedliche Parameter wie Professionalität, Erfahrung in der Imkerei etc. beinhaltet, zu diskutieren. Die im Winter 2017/18 erlittenen Winterverluste können als mittel bis niedrig bezeichnet werden und bewirken daher, dass in der weiteren Risikoanalyse kaum signifikante Unterschiede in den Überwinterungsraten unterschiedlicher Betriebsweisen oder Varroabekämpfungsstrategien zu finden waren. Lediglich die aus mehreren vorangegangenen Untersuchungen schon bekannten negativen Effekte wie im Vergleich zum Vorjahr häufiger auftretende Königinnenprobleme während der Saison, das Vorkommen der Trachtpflanze Mais, sowie die Betriebsgröße konnten als die Winterverluste signifikant steigernde Faktoren identifiziert werden. Dieser Mangel an statistisch belegbaren Unterschieden liegt unter anderem an der generell guten Überwinterung über weite Teile Österreichs, und quer über verschiedene Betriebsweisen. Es sei an dieser Stelle auf die höhere statistische Trennschärfe in Wintern mit hohen Winterverlusten verwiesen und einer Analyse mehrerer Untersuchungsjahre.

1.2 Einleitung

Die Zahl der natürlichen Bestäuber (Wildbienen, Hummeln, Schmetterlinge, Schwebfliegen) nimmt in Westeuropa zunehmend ab. Vermutet wird, dass dieser Rückgang mit dem Verlust von Habitaten, dem Einsatz von Pestiziden, der Umweltverschmutzung, der Ausbreitung von Parasiten und Pathogenen sowie dem Klimawandel zusammenhängt (Biesmeijer et al., 2006; Cameron et al., 2011; vanEngelsdorp et al., 2011; Cornman et al., 2012; Goulson, 2013; Steinhauer et al., 2014; 2018; van der Zee et al., 2014; Clermont et al., 2015a, 2015b; Woodcock et al., 2016). Für die ökonomisch wie auch ökologisch so wichtige Honigbiene *Apis mellifera* konnte auch der Einfluss des Menschen durch die Betriebsweise (Krankheitsprophylaxe und -bekämpfung) auf Völkerverluste nachgewiesen werden (Jacques et al., 2017). So ist die Honigbiene aufgrund der Stärke ihrer Völker, der Zucht- und Transportmöglichkeiten an den Ort des gewünschten Einsatzes nicht nur ein verlässlicher und gezielt einsetzbarer Bestäuber von Kulturpflanzen, sondern sie übernimmt zunehmend auch die Aufgabe, die Artenvielfalt der Wildpflanzen zu erhalten. Ihre

Bestäubungsleistung wird weltweit jährlich auf einen finanziellen Wert von 153 Milliarden Euro geschätzt (Gallai et al., 2009). Somit ist die Biene nach dem Rind und dem Schwein das dritt-wichtigste Tier für die menschliche Ernährung (Kearns et al., 1998).

Im letzten Jahrzehnt hatten besonders die USA immer wieder mit extremen Winterverlusten von Bienenvölkern zu kämpfen. Mehrere Jahre in Folge haben dort etwa 30% der eingewinterten Völker nicht überlebt (vanEngelsdorp et al., 2007, 2008, 2010, 2011; Steinhauer et al., 2014; Lee et al., 2015). Es häufen sich die Fälle, in denen die eindeutigen Gründe für das Massensterben nicht festgestellt werden können. Die Ursachen für das Bienensterben werden als vielfältig und komplex angenommen und eine Kombination von mehreren Faktoren scheint der Auslöser für dieses Phänomen zu sein (Moritz et al., 2010; Brodschneider & Crailsheim, 2013; Steinhauer et al., 2014). In den USA spricht man von „colony collapse disorder“, kurz CCD (vanEngelsdorp et al., 2009; Williams et al., 2010). Im deutschsprachigen Raum wird CCD auch als „Bienen-Verschwindkrankheit“ bezeichnet (Flügel, 2015). Die Symptome sind: wenige adulte Bienen in den Völkern, verdeckelte Brut kann aber vorhanden sein, es finden sich aber keine toten Bienen in und um die Völker (vanEngelsdorp et al., 2009).

Verluste von Bienenvölkern sind kein Phänomen der letzten Jahre. Schon seit Beginn der Bienenhaltung vor etwa 7000 Jahren in Mesopotamien gibt es Überlieferungen von krankheitsbedingten Völkerverlusten (Flügel, 2015). Die ersten ausführlicheren Schriften über die Haltung der Biene stammen aus Griechenland und dem Römischen Reich. Zu dieser Zeit gab es bereits Anweisungen zur Bienenhaltung und Vorgehensweise bei Erkrankungen. Bis ins 17. Jahrhundert sind im deutschsprachigen Raum keine Aufzeichnungen über Bienenverluste bekannt. Erst der Wunsch von Teilen der Bevölkerung, die Bienenhaltung zu verbessern, sorgte dafür, dass Bienenkrankheiten, wie etwa die Faulbrut oder Ruhr, dokumentiert wurden. Völkerverluste, die nicht auf Pathogene zurückzuführen sind, wurden während der industriellen Revolution durch die Optimierung der Beuten sowie Züchtung der Honigbiene weitestgehend reduziert. Dies, sowie der Fortschritt der Bakteriologie zu Beginn des 20. Jahrhunderts und etwas später die Möglichkeit Viren nachzuweisen, ermöglichte erstmals die Erforschung von Krankheitserregern, welche für hohe Bienenverluste verantwortlich sind. Im Laufe des 20. Jahrhunderts wurde eine Vielzahl von Massensterben von Bienenvölkern verzeichnet, ohne dass jedes Mal die genaue Ursache bekannt war. Als erstes großes Massensterben wurde 1906 jenes auf der englischen Insel Wight („Isle of Wight Disease“) dokumentiert (Neumann & Carreck, 2010; Flügel, 2015).

Ein Massensterben von Honigbienenvölkern im Winter mit Verlusten von bis zu dreißig Prozent über mehrere Jahre in Folge – wie in den USA – ist bislang, mit Ausnahme der Winter 2011/12 und 2014/15, in Österreich nicht aufgetreten. Seit einigen Jahren werden jedoch auch in Europa immer wieder hohe Winterverluste von Bienenvölkern verzeichnet (Chauzat et al. 2016). In Österreich erfolgte die Erhebung der Verluste seit 2008 durch das Institut für Biologie (vormals: Zoologie) der Karl-Franzens-Universität Graz im Rahmen des Forschungsnetzwerkes COLOSS (prevention of honey bee COlony LOSSes). Seit der Überwinterungsperiode 2013/14 erfolgen diese Erhebungen im Rahmen des Projektes „Zukunft Biene“ unter Einhaltung der von COLOSS etablierten und immer weiter angepassten Standards. Diese standardisierte Erhebung der Daten über das Bienensterben im Winter ermöglicht zusätzlich zur Analyse der Winterverluste in Österreich auch internationale Vergleiche (Brodschneider et al. 2016, 2018a).

Die Erhebung der Winterverluste erfolgt anhand des im Rahmen von COLOSS erarbeiteten Fragebogens: ImkerInnen in ganz Österreich werden auf freiwilliger Basis und auf Wunsch anonym zur Zahl ihrer eingewinterten Völker, deren Standort sowie zum Völkerverlust befragt. Zudem werden auch Fragen zur Betriebsweise, Behandlung der Völker gegen die Varroamilbe und zu ökologischen Faktoren (etwa zum Trachtangebot) gestellt. Diese Vorgehensweise, auch als Citizen

Science oder Bürgerbeteiligung bezeichnet, erlaubt die Gewinnung großer Datensätze, und stellt nur eine der im Rahmen von „Zukunft Biene“ getätigten Maßnahmen dar. In weiteren Untersuchungen im Rahmen von „Zukunft Biene“ wurden ausgewählte Völker auch Inspektionen durch geschulte Experten unterzogen und aufwändige Untersuchungen von Probenmaterial durchgeführt (siehe Modul 3 „Ursachenforschung zu Völker- und Bienenverlusten“).

Im internationalen Vergleich waren die Verluste in Österreich in den vergangenen Jahren, mit Ausnahme der Winter 2011/12, 2014/15 und 2016/17, gering bis durchschnittlich (van der Zee et al., 2012, 2014; Brodschneider et al., 2016, 2018a). In den ersten vier Jahren der vom Zoologischen Institut durchgeführten Untersuchungen lagen sie zwischen 9,3% und 16%. Verluste dieser Größenordnung können durch Nachzucht im Sommer kompensiert werden. Im Winter 2011/12 verloren die österreichischen ImkerInnen jedoch 25,9% ihrer eingewinterten Völker (Brodschneider & Crailsheim, 2013) und im Winter 2014/15 sogar 28,4% (Brodschneider et al., 2018b). Als Ursachen für die hohe Wintersterblichkeit werden Parasiten und Pathogene, allen voran die Milbe *Varroa destructor*, durch den Menschen ausgebrachte Pestizide, mangelhafte Ernährung durch ein einseitiges oder zeitlich verkürztes Trachtangebot, sowie die unzureichende Betreuung durch den Menschen, aber auch sozioökonomische Faktoren vermutet (Genersch et al., 2010; Budge et al., 2015a, 2015b; Goulson et al., 2015; Lee et al., 2015; Moritz & Erler, 2016; Tsvetkov et al., 2017; Woodcock et al., 2017; Jacques et al., 2017). Weitere Gründe können außerdem Verluste von Königinnen, Probleme mit Königinnen – etwa aufgrund von Schädigungen durch Neonicotinoide (Williams et al., 2015; Dussaubat et al., 2016; Wu-Smart & Spivak, 2016) – oder schlichtweg das Verhungern von Völkern während des Winters sein. Eine einfache, alleinige Ursache für die Winterverluste ist sehr selten auszumachen. Vielmehr sind die Ursachen auch in Österreich komplex und vielfältig und somit in ihrer Bedeutung schwer einzuschätzen (Brodschneider et al., 2010; Moritz et al., 2010; Potts et al., 2010; Brodschneider & Crailsheim, 2013; Staveley et al., 2014; Döke et al., 2015; Goulson et al., 2015).

Ein Parasit, welcher seit den 1980er Jahren für Völkerverluste in Österreich und Deutschland verantwortlich gemacht wird, ist die aus Asien eingeschleppte, ektoparasitische Milbe *Varroa destructor* (Rosenkranz et al., 2010; Genersch et al., 2010). Die Analyse der von den ImkerInnen durchgeführten Behandlungen gegen diesen Risikofaktor ist daher von großer Bedeutung, um Verluste zu reduzieren. Ursprünglich war nur die östliche Honigbiene *Apis cerana* von diesem Parasiten befallen. Heute ist die Varroamilbe beinahe weltweit – mit Ausnahme einiger Gebiete im Norden Europas und einigen Inseln – verbreitet (Dahle, 2010; Brodschneider & Crailsheim, 2011).

Die Vermehrung von *Varroa destructor* findet in verdeckelten Drohnen- und Arbeiterinnenbrutzellen statt, als Nahrung der Milbe dient die Hämolymphe und der Fettkörper der Larven und adulten Bienen. Nach dem Schlupf der Biene betreibt die Milbe Phoresie. Das bedeutet, dass *Varroa destructor* die adulte Biene als Transportmittel benutzt, um in neue Brutzellen oder gar entfernt liegende Bienenvölker zu gelangen. Die Parasitierung der Brut führt unter anderem zu einem Gewichtsverlust, welcher sich auf den späteren Paarungserfolg von Drohnen auswirkt, außerdem kann sich die Lebensspanne von Arbeiterinnen verkürzen. Der Befall von Sammlerinnen beeinflusst das Lernvermögen und das Heimflug-Verhalten (Kralj & Fuchs, 2006; Kralj et al., 2006; Rosenkranz et al., 2010). Die betroffenen Bienen leiden zudem unter Orientierungsschwierigkeiten, was möglicherweise der Verbreitung der Milbe dient. Zudem wird der Aufbau wichtiger Proteinreserven, die für den Überwinterungserfolg entscheidend sind, erschwert (Amdam et al., 2004). Durch die Parasitierung mit der Varroamilbe wird durch eine Immunsuppression die Vermehrung von Viren bei Sekundärinfektionen erleichtert. Am besten bekannt ist die durch Varroose begünstigte Infektion mit dem Deformed Wing Virus (DWV, Flügeldeformationsvirus), welche sich durch die stark verkümmerten Flügel und verkürzten Abdomina (Hinterleibe) der

Bienen ausgezeichnet (Rosenkranz et al., 2010). Bienenvölker, in denen dieses Virus nachgewiesen wurde, waren schwächer, das heißt sie hatten weniger mit Bienen besetzte Waben und Brut als nichtbefallene Völker (Budge et al., 2015a). Mit DWV infizierte adulte Bienen zeigen eine verkürzte Lebensspanne, ein jüngeres Sammelalter und eine verkürzte Sammelzeitspanne (Benaets et al., 2017). Aber auch die Übertragung anderer Viren steht in Zusammenhang mit der Varroamilbe (Traynor et al., 2016).

Apis mellifera hat mit dem ursprünglichen Wirt, *Apis cerana*, nur aggressives Verhalten als Abwehrstrategie gegenüber dem Parasiten gemein, wenngleich das bei der westlichen Honigbiene *Apis mellifera* geringer ausgeprägt ist. Unterschiede zwischen den beiden Arten zeigen sich etwa im Hygieneverhalten und, bei *Apis cerana*, der weitgehenden Limitierung des Befalls auf Drohnenbrut (Rosenkranz et al., 2010).

Fehlende oder mangelhaft vom Imker durchgeführte Behandlung gegen *Varroa destructor* führt zumeist zu einer Schwächung oder sogar zum Verlust des Volkes innerhalb von zwei bis drei Jahren (Rosenkranz et al., 2010). Die Bekämpfung des Parasiten basiert entweder auf biotechnischen Maßnahmen (zum Beispiel Entnahme von verdeckelter Drohnen- oder Arbeiterinnenbrut, Bannwabenverfahren, Brutunterbrechung), Einsatz zugelassener Tierarzneimittel auf Basis organischer Säuren (Ameisen-, Oxal-, Milchsäure), ätherischer Öle (Thymol, Eucalyptol, Menthol, Kampfer) und Acariziden aus verschiedenen Wirkstoffgruppen. Je nach chemischen Eigenschaften der eingesetzten Stoffe (fett- bzw. wasserlöslicher Wirkstoff) kann es dabei zu einer ungewollten Ansammlung der Stoffe in Honig und Wachs, bis hin zur Beeinflussung der Gesundheit des Volkes kommen (Rosenkranz et al., 2010). Entscheidend für den Erfolg der Behandlung ist der Zustand des Volkes (mit bzw. ohne verdeckelte Brut), die Art und der Zeitpunkt der jeweiligen Varroabehandlung (Brodschneider & Crailsheim, 2013; van der Zee et al., 2014).

Neben der Varroamilbe existieren in Österreich noch andere Schädlinge, die der Gesundheit der Völker zusetzen. Zu erwähnen ist unter anderem das Mikrosporidium *Nosema* spp., das in den Arten *N. ceranae* und *N. apis* in Österreich nachgewiesen wurde. Dieser Einzeller befällt die Epithelzellen des Mitteldarms adulter Tiere und wirkt dort als intrazellulärer Parasit, der Dysenterie, eine Entzündung des Darms mit einhergehender Diarrhö, auslöst. Die durch *Nosema* spp. ausgelöste Krankheit wird als Nosemose bezeichnet. Weitere Bedrohungen sind Bakterien, die Amerikanische Faulbrut (*Paenibacillus larvae*) oder Europäische Faulbrut (*Melissococcus plutonius*) auslösen, Pilze (*Ascosphaera apis*, *Aspergillus flavus*), Amöben (*Malpighamoeba mellificae*), weitere Arthropoden wie die Tracheenmilbe (*Acarapis woodi*) und, in geringem Ausmaß, Innenschädlinge (zum Beispiel die Große und Kleine Wachsmotte oder der Totenkopfschwärmer) (Brodschneider & Crailsheim, 2011).

Der Mensch fördert durch die räumliche Nähe vieler Bienenvölker an einem Bienenstand die horizontale Verbreitung der Krankheitserreger (Seeley & Smith, 2015; DeGrandi-Hoffman et al., 2017). Die Verbreitung von Krankheiten kann aber nicht nur durch eine hohe Völkerdichte an einem Standort, sondern auch durch Handel und Wanderimkerei über weite Entfernungen stattfinden. Internationale Untersuchungen von van der Zee et al. (2012, 2014) sowie Ergebnisse aus den USA (Steinhauer et al., 2014; Lee et al., 2015) zeigen, dass größere Betriebe in manchen Jahren sogar geringere Winterverluste als kleinere Betriebe verzeichneten, was neben der hohen Völkerdichte auch auf andere Faktoren bei der Verbreitung schließen lässt. Auch eine vertikale Erregerübertragung mancher Krankheiten über Ei- oder Samenzellen ist möglich (Peng et al., 2015; Yue et al., 2007).

Untersuchungen von Pettis et al. (2012), Di Prisco et al. (2013) sowie von Alburaki et al. (2016) machen auf die Zusammenhänge zwischen dem subletalen Einfluss von Pestiziden und gestei-

gertem Pathogenbefall bei Honigbienen aufmerksam. Zum Beispiel verursacht das Neonicotinoid Clothianidin eine Schwächung des Immunsystems, und damit eine stärkere Infektion mit dem Flügeldeformationsvirus (Di Prisco et al., 2013). Pettis et al. (2012) stellte zudem eine höhere Anzahl von *Nosema* spp.-Sporen unter dem Einfluss von Imidacloprid fest, ein Hinweis für eine gesteigerte Anfälligkeit für den Darmparasit *Nosema* spp. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Larven, die mit Amerikanischer Faulbrut infiziert und gleichzeitig subletalen Dosen bestimmter Pestizide ausgesetzt waren, eine signifikant höhere Mortalität aufwiesen als Larven die nur einem dieser beiden Stressoren ausgesetzt waren (Hernández López et al., 2017). Somit unterstützen die Ergebnisse dieser Studien die Annahme multifaktorieller Ursachen hoher Winterverlustraten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die Aufsummierung mehrerer Risikofaktoren, wie zum Beispiel Krankheitserreger, Mangelernährung und Pestizidkontamination, stärker als ein Faktor allein, und auch die Summe der einzelnen Schädigungen auf den Überwinterungserfolg auswirken kann (Goulson et al., 2015). Eine gezielte Einleitung von Gegenmaßnahmen wird dadurch erschwert (Brodtschneider & Crailsheim, 2013).

Wir dokumentieren die Winterverluste einerseits wegen der bereits erwähnten ökonomischen aber auch der ökologischen Bedeutung der Honigbiene und andererseits, um die Ursachen zu ergründen und entsprechend darauf reagieren zu können. Dies wird seit 2008 durch das Monitoring des Instituts für Biologie (vormals: Zoologie) der Universität Graz im Rahmen von COLOSS möglich gemacht (Brodtschneider et al., 2010; Brodtschneider & Crailsheim, 2013). Die Umfragen bilden eine wichtige Datenbasis für vertiefende Untersuchungen und sind somit, gemeinsam mit weiteren Untersuchungen (zum Beispiel gezielte Probenahmen im Teilprojekt „Virenmonitoring“), der Grundstock im Kampf gegen hohe Winterverlustraten (van der Zee et al., 2015).

1.3 Methodik und Ergebnisse

1.3.1 Datenerhebung

Die Erhebungen der Winterverluste von Bienenvölkern in Österreich wurden zwischen Februar und Mai 2018 mittels eines von COLOSS festgelegten Fragebogens durchgeführt. Der Fragebogen, der auch Fragen zur Betriebsweise inkludiert, ist so aufgebaut, dass ein breites Spektrum an Informationen mit einem für die ImkerInnen relativ geringen zeitlichen Aufwand abgefragt wird. Es werden außerdem von jeder Imkerei nur einfach festzustellende Fakten abgefragt, die ohne technische Hilfsmittel beantwortet werden können. Aus dem Fragebogen können die Winterverlustrate und mögliche, damit in Zusammenhang stehende, Risikofaktoren ermittelt werden.

Die Teilnahme kann entweder anonym oder nicht-anonym, durch Hinterlassen von Kontaktdaten, erfolgen. Die Papierfragebögen werden per Post an Imkervereine versendet, bei Veranstaltungen verteilt, die Umfrage ist online auf www.bienenstand.at verfügbar sowie, in einer Kurzversion, in der April-Ausgabe der Zeitschrift „Biene Aktuell“ veröffentlicht.

Die im Fragebogen gestellten Fragen beziehen sich auf Standort und Größe der Imkerei, die Anzahl der verlorenen Völker, sowie auch den möglichen Transport der Völker, die Betriebsweise, bestimmte Nahrungsquellen der Bienen und auch die Behandlung gegen die Varroamilbe.

Bei Winterverlusten wurde zwischen Völkerverlusten und Völkern mit Königinnen-Problemen unterschieden. Für die Gesamtverlustrate wurden beide addiert. Des Weiteren wurden auch in Bezug auf die verlorenen Völker leicht erkennbare Symptome abgefragt. Dabei konnten die ImkerInnen berichten, ob sie viele tote Bienen im oder vor dem Volk hatten, ob sie keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk hatten, ob tote Bienen in Zellen gefunden wurden, ob die Bienen kein Futter im Stock hatten (verhungert sind), verhungert sind, obwohl genug Futter im Volk war (Futterabriss), ob sie keines der oben genannten oder unbekannte Symptome hatten und letztlich ob sie, unabhängig vom Schadbild, aufgrund von Elementarschäden (Flut, Vandalismus, Specht, etc.) Völker verloren hatten. Bei der Umfrage 2017/18 wurden die TeilnehmerInnen außerdem zum Auftreten von verkrüppelten Flügeln befragt, einem möglichen Hinweis auf eine Infektion mit dem Flügeldeformationsvirus (DWV).

Da es zwei Versionen von Fragebögen gab, wurden bei der längeren Version noch Fragen zur Erneuerung der Waben und zum Alter der Königinnen gestellt bzw. wollten wir wissen, welche Auswirkungen das nach Einschätzung der ImkerInnen auf die Völkerverluste hatte. Zur Auswahl standen folgende Antwortmöglichkeiten: gleich, besser, schlechter oder weiß nicht. Zusätzliche Fragen bezogen sich auf Trachtquellen und die Varroabehandlung.

Unser Ziel war es, so viele Daten wie möglich zu sammeln und eine gute Repräsentation der Situation in Österreich zu bekommen. Alle beteiligten ImkerInnen haben an der Umfrage freiwillig teilgenommen. Eine Verpflichtung bestand lediglich für jene Imkereien, die (freiwillig) am Österreichischen Bienengesundheitsprogramm (ÖBGP) teilnahmen. Alle Imkereien unabhängig von der Größe ihrer Betriebe konnten mitmachen.

In die Auswertung wurden nur jene Fragebögen aufgenommen, aus denen die Winterverlustrate berechnet werden konnte. Fehlerhafte oder unvollständige Fragebögen wurden nicht ausgewertet. Dazu zählten beispielsweise Fragebögen, wo Angaben zum Standort fehlten und/oder keine Angaben über die Zahl der eingewinterten oder überlebenden Völker gemacht wurden. Wenn eine Kontaktmöglichkeit angegeben wurde, wurde diese zur Nachfrage verwendet um fehlende oder fehlerhafte Daten zu korrigieren. Offensichtliche Duplikate wurden nach eingehender Prüfung ebenfalls entfernt.

1.3.2 Statistik

Alle Antworten wurden in einer Excel-Datenbank zusammengeführt, um die Auswertung der gesamten Daten, das heißt sowohl jener aus den Online-Fragebögen als auch der von den Papierfragebögen, durchführen zu können. Die statistische Analyse wurde mit dem Programm „R“ durchgeführt (R Core Team, 2015). Berechnet wurde die Verlustrate sowie das 95%-Konfidenzintervall, in welchem der Standardfehler aus den Intercept des Null-Modells berücksichtigt wird, nach wissenschaftlich etablierten Methoden (vanEngelsdorp et al., 2013; van der Zee et al., 2013). Das Berechnungswerkzeug wurde auch online zugänglich gemacht: <http://bienenstand.at/uncategorized/confidence/>.

Kommt es beim Vergleich zweier oder mehrerer Gruppen zu keiner Überlappung der Konfidenzintervalle, so unterscheiden sich diese Gruppen signifikant voneinander. Auf weitere grafische Hinweise signifikanter Unterschiede wird in den gezeigten Grafiken aus diesem Grund verzichtet, in der Bildunterschrift wird auf das Vorhandensein oder Fehlen signifikanter Unterschiede hingewiesen.

1.4 Ergebnisse

1.4.1 Beteiligung

Bei der Erhebung der Winterverluste 2017/18 haben wir von 1391 Imkereien Datensätze betreffend 28.373 eingewinterten Bienenvölkern erhalten. Prozentuell betrachtet erreicht die Beteiligung österreichischer Imkereibetriebe dabei einen Wert von 5%. Diese gaben Rückmeldung über 8% aller in Österreich gehaltenen Bienenvölker. In der nachstehenden Tabelle 1.1 werden auch die Rückmeldungen der vorangegangenen Winter dargestellt. Die Grundlage für die Berechnung der Rückmeldungen (in %) bilden die Angaben der „Biene Österreich“ (Tabelle 1.1).

Die Teilnahme war online, mittels Papierfragebogen oder mittels Kurzfragebogen in der Zeitschrift „Biene Aktuell“ möglich. Tabelle 1.2 zeigt, wie viele ImkerInnen sich von 2013/14 bis 2017/18 online, auf Papier oder über die Zeitschrift an unserer Untersuchung beteiligt haben. Von den 2017/18 insgesamt 1391 Imkereien haben 536 anonym teilgenommen und 855 haben eine Kontaktadresse, E-Mail oder Telefonnummer hinterlassen.

Tabelle 1.1: Beteiligungsrate der österreichischen Imkereien an unserer Untersuchung.

Beteiligungsrate Österreich	Anzahl Imkereien*	Anzahl teilnehmende Imkereien	Rückmeldung Imkereien [%]	Anzahl Völker*	Anzahl eingewinterte Völker	Rückmeldung Völker [%]
2013/14	25.492	1023	4,0	382.638	18.794	4,9
2014/15	25.277	1259	5,0	376.121	22.882	6,1
2015/16	26.063	1289	4,9	347.128	23.418	6,7
2016/17	26.609	1656	6,2	354.080	43.852	12,4
2017/18	27.580	1391	5,0	353.267	28.373	8,0

* Die in den Spalten „Anzahl Imkereien“ und „Anzahl Völker“ angeführten Zahlen beruhen auf Angaben der „Biene Österreich“. Diese Zahlen bilden die Grundlage für die Berechnung der Rückmeldungen.

1.4.2 Repräsentativität

1.4.2.1 Anonyme Teilnahme versus nicht anonyme Teilnahme

Im Untersuchungsjahr 2017/18 haben der 61,5% Teilnehmer eine Kontaktmöglichkeit hinterlassen, wo hingegen 38,5% der teilnehmenden Imkereien die Möglichkeit der anonymen Teilnahme an der Umfrage bevorzugt haben. Die Verlustrate zwischen anonymen und nicht-anonymen Teilnehmer wurde auch in diesem Jahr verglichen und es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 1.1).

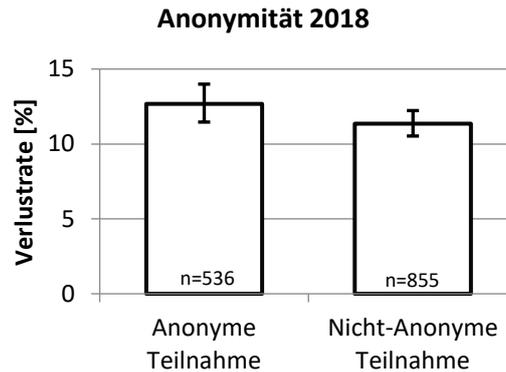


Abbildung 1.1: Höhe der Winterverluste 2017/18 anonymer TeilnehmerInnen und nicht-anonymer TeilnehmerInnen in Prozent ($\pm 95\%CI$). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (anonyme TeilnehmerInnen 12,7%, Konfidenzintervall: 11,5-14,0%; nicht-anonyme TeilnehmerInnen 11,4%, Konfidenzintervall: 10,5-12,2%).

1.4.2.2 Online-Antworten versus Papierfragebogen-Antworten

Wie auch in den vergangenen Jahren, hatten die TeilnehmerInnen die Möglichkeit, sowohl online als auch über Papier (inklusive Zeitschrift) mitzumachen. Die meisten Antworten erreichten uns online (Tabelle 1.2). In diesem Winter, wie in den meisten zuvor, besteht kein signifikanter Unterschied in der Verlustrate zwischen der durch Online-Teilnahme und der Papier-Teilnahme erhobenen Daten (Abbildung 1.2).

Tabelle 1.2: Art der Teilnahme an der Erhebung der Winterverluste von 2013/14 bis 2017/18 (Anzahl TeilnehmerInnen (%)).

	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18
Summe	1023	1259	1289	1656	1391
Papier	318 (31,1%)	249 (19,8%)	290 (22,5%)	332 (20,0%)	238 (17,1%)
Zeitschrift	26 (2,5%)	63 (5,0%)	55 (4,3%)	56 (3,4%)	52 (3,7%)
Internet	679 (66,4%)	947 (75,2%)	944 (73,2%)	1268 (76,6%)	1101 (79,2%)

Online vs. Papier 2018

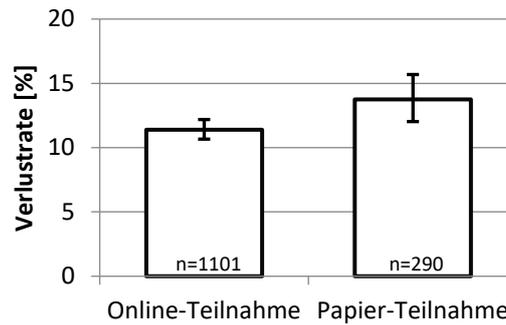


Abbildung 1.2: Höhe der Winterverluste 2017/18 der Online-TeilnehmerInnen und der TeilnehmerInnen per Papierfragebogen in Prozent ($\pm 95\%$ CI). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Online-Teilnahme 11,4%, Konfidenzintervall: 10,7-12,2%; Papier-Teilnahme 13,8%, Konfidenzintervall: 12,0-15,7%).

1.4.2.3 Betriebsgröße

Für das Jahr 2017/18 liegt die durchschnittliche Anzahl der eingewinterten Bienenvölker aller teilnehmenden Imkereien bei 20,4. Zum im Vergleich zum österreichweit erwarteten etwas geringeren Mittelwert trägt die Teilnahme von 14 großen Imkereien mit jeweils über 150 eingewinterten Völkern bei. Der Median der eingewinterten Völkerzahlen liegt jedoch bei 10 eingewinterten Völkern, was der österreichischen Imkerei-Demographie entspricht. Die Verteilung der Größen der teilnehmenden Betriebe ist in Abbildung 1.3 grafisch dargestellt.

Betriebsgröße 2018

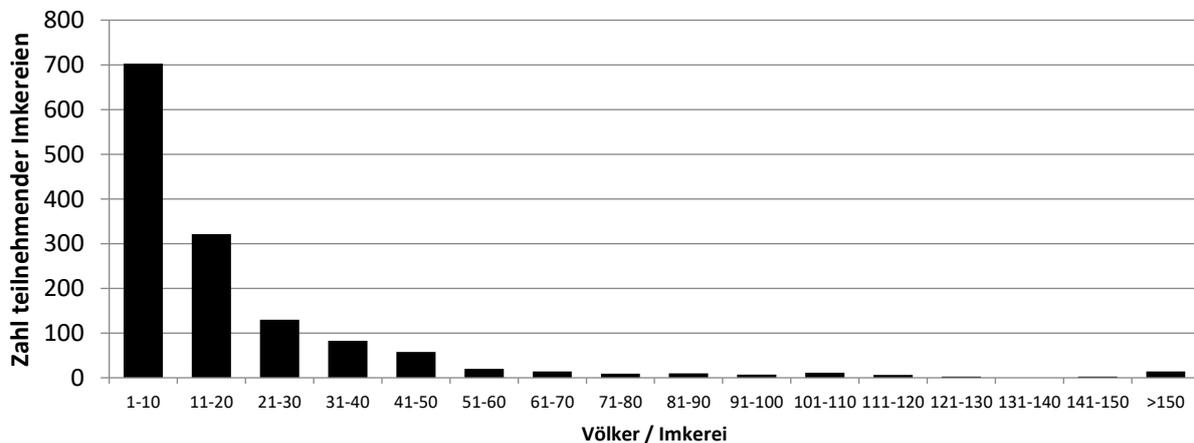


Abbildung 1.3: Betriebsgröße der teilnehmenden Imkereien 2017/18

1.4.2.4 Geografische Herkunft

Abbildung 1.4 zeigt die geografische Herkunft der TeilnehmerInnen unserer Erhebung für den Winter 2017/18. Rückmeldungen mit derselben Postleitzahl sind als je ein Punkt dargestellt.

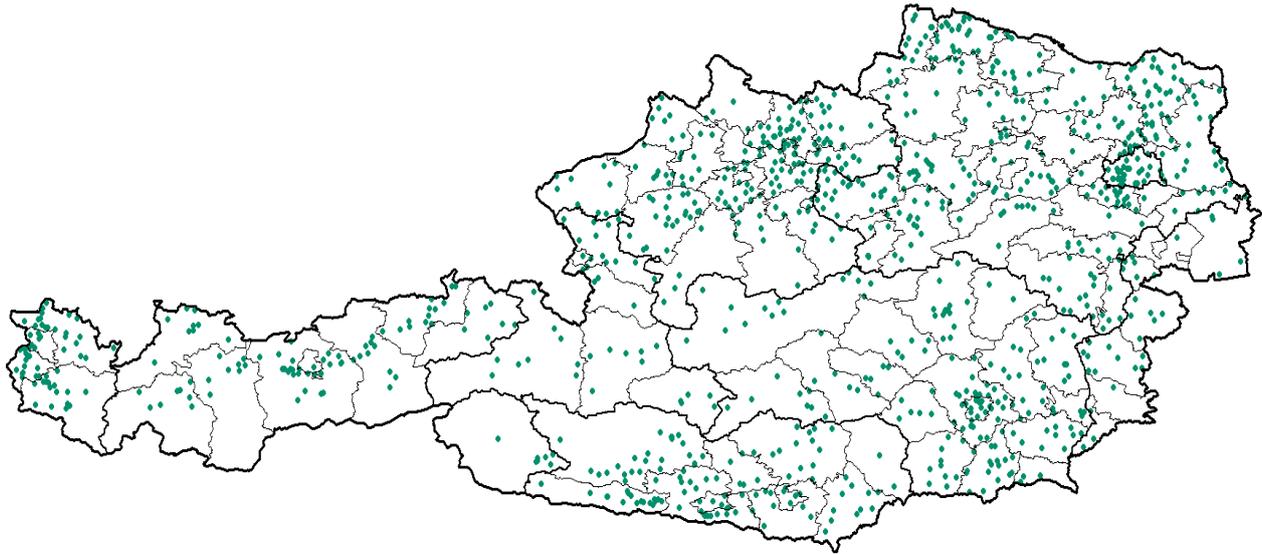


Abbildung 1.4: Geografische Herkunft der an der Untersuchung der Winterverluste teilnehmenden Imkereien 2017/18.

1.4.2.5 Bienenstandort

In unserer Erhebung wurden die TeilnehmerInnen des Weiteren gefragt, ob sich all ihre Bienenvölker innerhalb eines 15 km-Radius zum angegebenen Winterstandort befinden. Diese Information fließt in weitere standortbezogene Auswertungen ein, in denen mögliche Zusammenhänge zwischen den Winterverlusten und dem Wetter, der Landnutzung sowie der Seehöhe näher betrachtet werden können.

In diesem Untersuchungsjahr gaben 87,1% der TeilnehmerInnen an, dass sich all ihre Bienenvölker innerhalb 15 km des angegebenen Winterstandortes befanden. 11,0% gaben an diesen Radius zu überschreiten. Nur 0,5% der eingelangten Antworten entfielen auf die Kategorie unsicher, sowie weitere 1,4% der UntersuchungsteilnehmerInnen enthielten sich dieser Antwort.

1.4.3 Verlustrate in Österreich, den Bundesländern und den Bezirken

1.4.3.1 Österreich

Die teilnehmenden 1391 Imkereien haben im Untersuchungsjahr 2017/18 28.373 Völker eingewintert. Seit Beginn der Erhebung schwanken die Winterverlustraten jährlich. Die Verlustrate aus dem Winter 2015/16 stellt mit 8,1% die niedrigste, jene aus dem Winter 2014/15 mit 28,4% die höchste seit Beginn der Erhebungen von Winterverlusten im Jahr 2007/08 dar. Die Winterverluste von Bienenvölkern über den Winter 2017/18 betragen 11,8%. In Abbildung 1.5 werden, neben der im Untersuchungsjahr 2017/18 gemessenen Verlustrate, auch die zuvor erhobenen Werte zum Vergleich dargestellt.

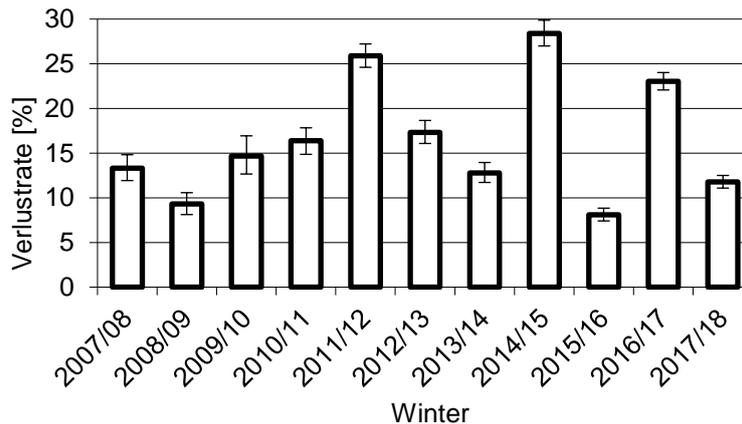


Abbildung 1.5: Höhe der Winterverluste in Österreich von 2007/08 bis 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI).
n = 16.217, 18.141, 7.676, 13.179, 32.471, 19.406, 18.794, 22.882, 23.418, 43.852 und 28.373 eingewinterte Bienenvölker.

1.4.3.1.1 Populationsdynamik in Österreich

Die Berechnungen zur Populationsdynamik basieren auf den Angaben jener Imkereien, die auch die Anzahl ihrer Völker im Frühjahr des Einwinterungsjahres bekannt gegeben haben. Die Imkereien wurden gefragt, wie viele Völker sie zu diesem Zeitpunkt hatten, um die Netto-Änderung bis zum Herbst desselben Jahres berechnen zu können. Die Zahl an Bienenvölkern im Frühjahr des Auswinterungsjahres konnte mittels der Anzahl an eingewinterten und der im Winter verlorenen Völker berechnet werden. Dies berücksichtigt aber nicht etwaige zugekaufte oder verkaufte Völker. Die Informationen zur Anzahl der Völker im Frühjahr, eingewinterten Völkern und zum Völkerverlust über den Winter des jeweiligen Jahres ermöglichten eine grafische Darstellung der Populationsdynamik österreichischer Bienenvölker vom Frühjahr 2013 bis zum Frühjahr 2018 (Abbildung 1.6). Ausgehend von der Völkeranzahl im Frühjahr des Einwinterungsjahres stieg die Zahl an Bienenvölkern durch Vermehrung und Zukäufe bis zum Herbst an (Tabelle 1.3, „Vermehrung über den Sommer [%]“). Die prozentuelle Änderung der Anzahl der Bienenvölker vom Frühjahr des Auswinterungsjahres zum Frühjahr des Einwinterungsjahres ist in Tabelle 1.3 („Vergleich Frühjahr-Frühjahr [%]“) zu finden. Allgemein zeigt sich, dass die Vermehrung im Sommer eine konstante, sogar eine wachsende, Bienenpopulation erlaubt (Abbildung 1.6). Welche Netto-Zuwachsrate erforderlich wäre, um nach dem Winter wieder auf den Stand der Bienenpopulation im Herbst des Einwinterungsjahres zu kommen, ist unter „Frühjahres-Herbst-Schätzung [%]“ ersichtlich. Die tatsächliche Netto-Vermehrung über den Sommer liegt für das Untersuchungsjahr 2017/18 Jahren über der erforderlichen Schätzung.

Tabelle 1.3: Populationsdynamik österreichischer Bienenvölker vom Frühjahr 2013 bis zum Frühjahr 2018. Teilnehmende Imkereien mit vollständigen Angaben; Verlustrate dieser Untergruppe; Anzahl an Bienenvölkern im Frühjahr des Einwinterungsjahres, Herbst und Frühjahr des Auswinterungsjahres; Zuwachsrate über den Sommer; Frühjahrs-Frühjahrs-Vergleich und Frühjahrs-Herbst-Schätzung.

	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18
Imkereien	973	1188	1195	1537	1285
Verlustrate der Untergruppe [%]	12,9	28,6	7,9	22,5	11,6
Frühjahr des Einwinterungsjahres	14.319	17.355	15.102	27.695	18.983
Herbst (Zahl Völker)	17.816	21.616	21.800	40.141	25.670
Frühjahr (Zahl Völker)	15.518	15.437	20.070	31.108	22.695
Vermehrung über den Sommer [%]	24,4	24,6	44,4	44,9	35,2
Vergleich Frühjahr-Frühjahr [%]	8,4	-11,1	32,9	12,3	19,6
Frühjahr-Herbst-Schätzung [%]	14,8	40,0	8,6	29,0	13,1

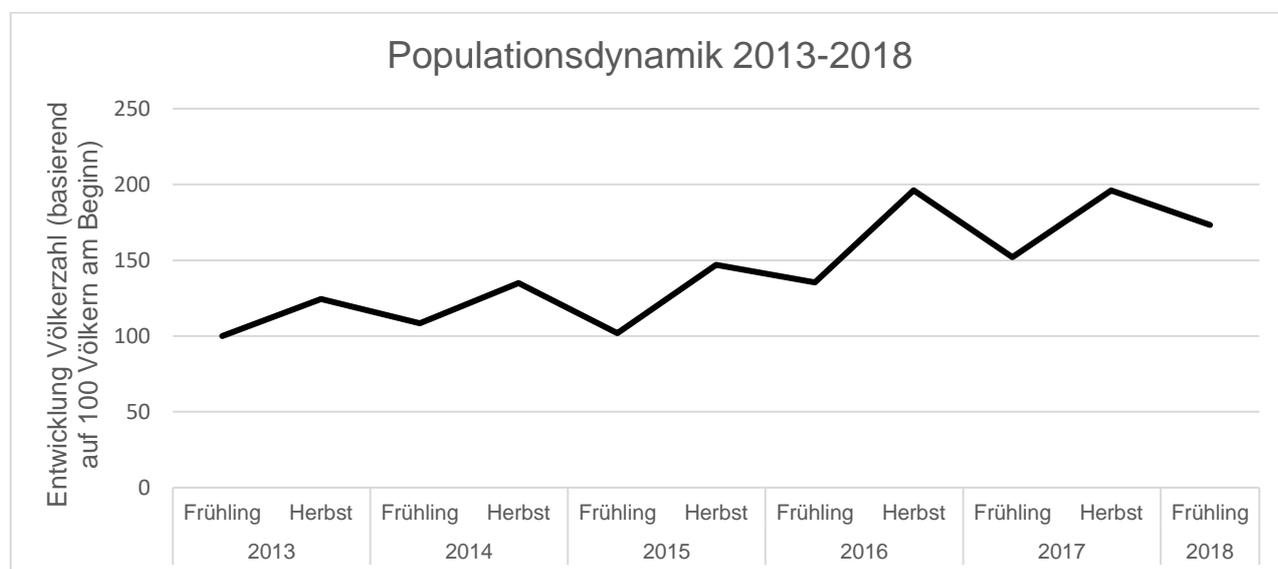


Abbildung 1.6: Veranschaulichte Populationsdynamik von Bienenvölkern in Österreich vom Frühjahr 2013 bis zum Frühjahr 2018 basierend auf Winterverlusten und Vermehrung über den Sommer aus Tabelle 1.3 Die theoretische Entwicklung der Völkeranzahl basiert auf 100 Völkern zu Beginn.

1.4.3.2 Bundesländer

Die Winterverlustrate für ganz Österreich lag 2017/18 bei 11,8%. Unter den Bundesländern sind die Völkerverluste jedoch nicht gleichmäßig verteilt. Die Tabelle 1.4 zeigt die Anzahl der teilnehmenden Betriebe, die Anzahl der eingewinterten Völker, die Anzahl der verlorenen Völker,

Winterverluste aufgrund von Königinnen-Problemen und die Verlustrate in Summe und Prozent (inklusive 95% Konfidenzintervall) für Österreich und die Bundesländer. Einen Überblick über die Winterverluste in ganz Österreich sowie in den Bundesländern für einen Untersuchungszeitraum von 5 Jahren, bietet die Tabelle 1.5. Grafisch dargestellt werden die Verlustraten für Österreich und die Bundesländer in Abbildung 1.7.

Tabelle 1.4: Teilnehmende Imkereibetriebe, eingewinterte Völker und Verlustraten von Bienenvölkern im Winter 2017/18 für Österreich und pro Bundesland. In dieser Tabelle wird der Völkerverlust durch „Elementarschaden (Flut, Vandalismus, etc.)“ nicht berücksichtigt.

Land	Teilnehmende Imkereien	Eingewinterte Völker	Völkerverlust	Völkerverlust (Königinnen-Probleme)	Summe Verlust	Verlust [%]	Konfidenzintervall [%]
Österreich	1391	28373	2441	900	3341	11,8	11,1-12,5
Burgenland	35	864	57	11	68	7,9	4,8-12,6
Kärnten	144	3486	369	138	507	14,5	10,5-15,7
Niederösterreich	409	8406	858	178	1036	12,3	12,5-15,2
Oberösterreich	253	5091	408	94	502	9,9	10,1-13,1
Salzburg	58	1178	92	35	127	10,8	9,1-17,5
Steiermark	207	4525	261	110	371	8,2	7,3-10,3
Tirol	120	2275	204	69	273	12,0	9,0-14,6
Vorarlberg	105	1578	97	62	159	10,1	8,1-12,5
Wien	60	970	95	45	140	14,4	9,3-16,0

1.4.3.3 Ausgewählte Bezirke

Die Verlustraten, Anzahl der teilnehmenden Imkereien und Anzahl der eingewinterten Völker sind in Tabelle 1.6 aufgelistet. Die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungsjahre seien hier zur besseren Übersicht ebenfalls dargestellt. Aus Gründen des Datenschutzes und der Repräsentativität werden nur jene Bezirke aufgelistet, bei denen mindestens Daten von fünf Imkereien zur Verfügung stehen.

Tabelle 1.5: Vergleich der Winterverlustraten ($\pm 95\%$ Konfidenzintervall) von 2013/14 bis 2017/18 für Österreich sowie die einzelnen Bundesländer.

Land	Verlust % (Konfidenzintervall [%])				
	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18
Österreich	12,8 (11,7-14,0)	28,4 (27,0-29,9)	8,1 (7,4-8,8)	23,0 (22,1-24,0)	11,8 (11,1-12,5)
Burgenland	32,9 (15,1-57,5)	40,4 (33,5-47,6)	11,0 (6,7-17,6)	20,2 (15,2-26,4)	7,9 (4,8-12,7)
Kärnten	9,9 (7,8-12,5)	30,6 (27,0-34,5)	6,6 (5,4-7,9)	21,9 (18,6-25,6)	14,5 (10,5-15,7)
Niederösterreich	15,4 (13,6-17,4)	27,8 (25,2-30,6)	11,5 (9,8-13,5)	24,2 (22,8-25,7)	12,3 (12,5-15,2)
Oberösterreich	9,9 (7,6-12,8)	25,2 (21,6-29,2)	6,8 (5,5-8,4)	18,9 (16,7-21,4)	9,9 (10,1-13,1)
Salzburg	18,6 (13,5-25,1)	33,6 (27,3-40,5)	6,1 (4,1-9,1)	16,8 (12,3-22,6)	10,8 (9,1-17,5)
Steiermark	8,5 (6,7-10,7)	22,5 (19,4-25,8)	8,7 (7,0-10,6)	19,3 (17,0-21,9)	8,2 (7,3-10,3)
Tirol	12,9 (9,0-18,1)	26,7 (21,6-32,4)	5,1 (3,7-6,9)	25,1 (20,6-30,3)	12,0 (9,0-14,6)
Vorarlberg	18,1 (12,1-26,2)	28,0 (22,3-34,4)	5,8 (3,7-9,1)	33,8 (29,5-38,3)	10,1 (8,1-12,5)
Wien	19,2 (12,7-27,9)	52,6 (44,9-60,2)	11,5 (7,2-17,8)	24,8 (20,2-30,0)	14,4 (9,3-16,0)

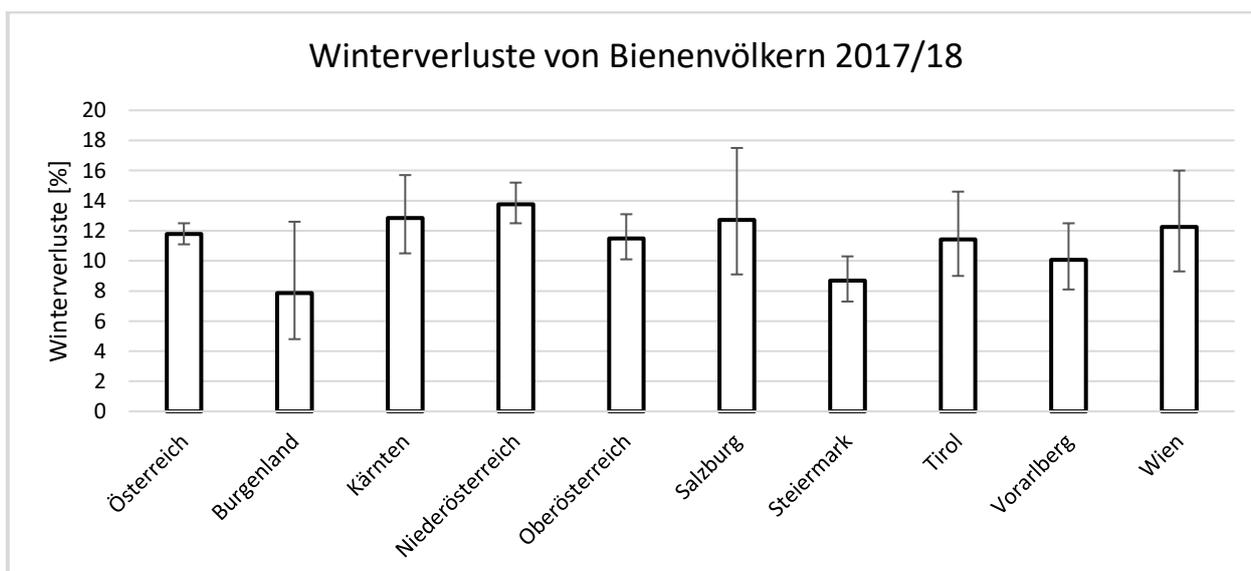


Abbildung 1.7: Höhe der Winterverluste 2017/18 für Österreich und die Bundesländer in Prozent ($\pm 95\%$ CI). Die jeweilige Anzahl der teilnehmenden Imkereien kann aus der Tabelle 1.4 entnommen werden.

Tabelle 1.6: Jahresvergleich der Verlustraten in den Bezirken. Verlustrate in % (TeilnehmerInnen; eingewinterte Völker). -: weniger als fünf TeilnehmerInnen; *: Bezirksfusionen in der Steiermark 2013 (Bruck und Mürzzuschlag → Bruck-Mürzzuschlag, Fürstenfeld und Hartberg → Hartberg-Fürstenfeld, Feldbach und Radkersburg → Südoststeiermark); **: Bezirksauflösung Wien-Umgebung 2017.

Bezirk	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18
Burgenland / Eisenstadt	-	-	-	-	-
Burgenland / Eisenstadt-Umgebung	-	40,30% (6; 67)	-	-	-
Burgenland / Güssing	-	42,24% (13; 161)	-	31,46% (6; 89)	-
Burgenland / Jennersdorf	-	42,71% (8; 96)	23,53% (5; 85)	-	-
Burgenland / Mattersburg	-	-	-	28,93% (9; 121)	9,49% (8; 137)
Burgenland / Neusiedl am See	-	24,72% (7; 178)	3,55% (5; 169)	12,22% (8; 311)	6,45% (5; 62)
Burgenland / Oberpullendorf	-	53,72% (12; 376)	20,51% (7; 78)	20,95% (12; 253)	5,00% (5; 60)
Burgenland / Oberwart	31,82% (5; 88)	30,08% (17; 256)	4,17% (9;144)	27,57% (15; 185)	11,96% (7; 92)
Burgenland / Rust	-	-	-	-	-
Kärnten / Feldkirchen	11,39% (7; 202)	32,46% (6; 191)	3,86% (5;233)	40,11% (7; 187)	13,99% (5; 193)
Kärnten / Hermagor	5,48% (20; 365)	56,41% (11;195)	5,93% (17; 337)	19,95% (19; 436)	14,51% (22; 448)
Kärnten / Klagenfurt am Wörthersee	12,66% (5; 79)	54,55% (10; 77)	12,10% (9; 124)	52,43% (9; 103)	25,79% (8; 159)
Kärnten / Klagenfurt-Land	6,76% (10; 281)	34,55% (18; 330)	4,98% (15; 301)	15,34% (10; 189)	6,16% (9; 276)
Kärnten / Sankt Veit an der Glan	15,32% (15; 385)	26,45% (25; 881)	7,28% (12; 604)	41,05% (16; 592)	20,48% (16; 420)
Kärnten / Spittal an der Drau	7,09% (35; 705)	28,75% (33; 574)	5,81% (56; 1445)	17,34% (67; 1632)	12,11% (35; 950)
Kärnten / Villach	12,32% (14; 138)	25,84% (13; 178)	11,32% (5; 106)	19,05% (5; 63)	12,82% (5; 78)
Kärnten / Villach-Land	-	32,36% (50; 615)	5,60% (30; 393)	20,64% (22; 344)	15,12% (25; 324)
Kärnten / Völkermarkt	7,47% (13; 482)	21,78% (20; 652)	6,60% (12; 303)	11,76% (13; 561)	6,51% (15; 538)
Kärnten / Wolfsberg	-	-	-	8,37% (9; 203)	-
Niederösterreich / Amstetten	15,75% (22; 419)	19,76% (24; 506)	9,35% (38; 631)	37,09% (47; 647)	13,86% (39; 635)
Niederösterreich / Baden	7,92% (8; 101)	31,63% (12; 98)	0,00% (6; 54)	16,36% (6; 55)	-
Niederösterreich / Bruck an der Leitha	-	47,78% (8; 90)	-	8,86% (8; 158)	16,42% (10; 67)
Niederösterreich / Gänserndorf	27,78% (20; 198)	28,33% (23; 300)	16,83% (23; 208)	19,53% (13; 379)	17,48% (25; 286)
Niederösterreich / Gmünd	7,66% (29; 444)	26,32% (6; 133)	14,24% (24; 316)	21,04% (22; 461)	21,45% (18; 275)
Niederösterreich / Hollabrunn	33,46% (7; 254)	31,07% (12; 280)	12,00% (8; 200)	12,05% (8; 83)	5,45% (8; 110)
Niederösterreich / Horn	18,15% (17; 325)	34,38% (17; 349)	8,32% (17; 505)	14,57% (22; 597)	19,07% (19; 708)
Niederösterreich / Korneuburg	14,06% (14; 192)	43,64% (19; 236)	8,42% (17; 95)	21,77% (22; 372)	16,47% (18; 334)
Niederösterreich / Krems a.d. Donau	-	-	-	-	-
Niederösterreich /	-	25,19%	2,13%	13,41%	15,97%

Krems-Land		(9; 135)	(7; 47)	(9; 179)	(12; 119)
Niederösterreich / Lilienfeld	14,89% (5; 47)	10,58% (5; 104)	-	6,13% (15; 212)	10,98% (11; 246)
Niederösterreich / Melk	7,64% (16; 157)	32,53% (26; 332)	15,17% (34; 422)	29,30% (19; 314)	12,29% (21; 301)
Niederösterreich / Mistelbach	17,85% (43; 521)	22,35% (27; 671)	9,47% (29; 581)	26,84% (38; 991)	11,58% (41; 1408)
Niederösterreich / Mödling	16,56% (14; 151)	29,08% (17; 141)	15,15% (9; 66)	25,23% (13; 107)	14,50% (18; 262)
Niederösterreich / Neunkirchen	11,34% (9; 97)	44,83% (14; 145)	29,38% (13; 160)	25,41% (17; 303)	10,19% (14; 157)
Niederösterreich / Scheibbs	7,74% (18; 594)	14,48% (41; 808)	10,46% (29; 526)	44,31% (42; 686)	8,38% (37; 752)
Niederösterreich / St. Pölten	-	-	-	-	-
Niederösterreich / St. Pölten-Land	12,15% (32; 288)	24,62% (21; 260)	-	25,55% (26; 274)	13,38% (25; 284)
Niederösterreich / Tulln	18,71% (9; 465)	12,63% (13; 372)	7,53% (5; 93)	13,07% (20; 153)	13,83% (10; 94)
Niederösterreich / Waidhofen an der Ybbs	-	-	-	-	-
Niederösterreich / Waidhofen an der Thaya	19,61% (20; 311)	-	13,45% (36; 394)	28,21% (34; 560)	21,39% (35; 561)
Niederösterreich / Wiener Neustadt	-	-	-	-	-
Niederösterreich / Wiener Neustadt-Land	10,08% (8; 129)	46,37% (12; 317)	17,93% (9; 184)	13,66% (10; 205)	12,36% (11; 259)
Niederösterreich / Wien-Umgebung	20,63% (14; 160)	31,99% (20; 372)	28,99% (14; 69)	**	**
Niederösterreich / Zwettl	2,17% (7; 138)	20,93% (9; 172)	8,77% (11; 171)	30,96% (15; 239)	16,51% (9; 109)
Oberösterreich / Braunau am Inn	10,31% (11; 151)	13,72% (19; 277)	10,68% (22; 468)	13,21% (24; 613)	7,17% (20; 502)
Oberösterreich / Eferding	-	-	-	19,64% (5; 168)	13,33% (6; 75)
Oberösterreich / Freistadt	3,97% (11; 151)	34,72% (10; 144)	3,79% (13; 211)	27,13% (21; 328)	8,11% (19; 296)
Oberösterreich / Gmunden	5,21% (6; 96)	32,14% (10; 168)	5,88% (7; 85)	16,88% (17; 154)	6,80% (8; 103)
Oberösterreich / Grieskirchen	6,85 (5; 219)	44,79% (8; 96)	5,77% (8; 104)	34,85% (7; 66)	10,30% (9; 165)
Oberösterreich / Kirchdorf an der Krems	-	34,74% (7; 95)	6,94% (10; 620)	18,27% (10; 646)	9,16% (9; 262)
Oberösterreich / Linz	-	-	5,26% (5; 38)	21,93% (12; 114)	11,81% (13; 127)
Oberösterreich / Linz-Land	13,31% (24; 248)	25,37% (12; 205)	8,04% (24; 311)	23,72% (21; 253)	7,56% (26; 344)
Oberösterreich / Perg	7,29% (8; 96)	39,39% (7; 66)	4,75% (14; 316)	15,79% (17; 288)	9,00% (14; 289)
Oberösterreich / Ried im Innkreis	-	21,43% (6; 182)	5,80% (10; 207)	8,99% (11; 278)	7,24% (7; 152)
Oberösterreich / Rohrbach	10,16% (23; 256)	-	8,48% (16; 165)	19,25% (10; 187)	-
Oberösterreich / Schärding	15,84% (13; 202)	26,44% (14; 174)	2,48% (26; 807)	14,95% (15; 388)	14,21% (17; 570)
Oberösterreich / Steyr	-	-	-	-	-
Oberösterreich / Steyr-Land	8,33% (20; 252)	22,56% (15; 266)	7,73% (13; 233)	20,13% (18; 313)	18,22% (14; 236)
Oberösterreich / Urfahr-Umgebung	26,29% (18; 251)	14,70% (16; 279)	5,18% (21; 560)	19,48% (31; 775)	9,88% (46; 688)

Oberösterreich / Vöcklabruck	8,57% (14; 245)	32,67% (23; 300)	5,68% (19; 176)	21,39% (34; 631)	7,14% (25; 350)
Oberösterreich / Wels	-	-	-	-	-
Oberösterreich / Wels-Land	9,47% (8; 190)	45,07% (9; 213)	21,14% (11; 246)	24,10% (8; 83)	19,80% (11; 202)
Salzburg / Hallein	-	55,77% (6; 407)	-	8,01% (6; 287)	10,16% (5; 256)
Salzburg / Salzburg	-	13,64% (5; 44)	-	-	-
Salzburg / Salzburg- Umgebung	24,62% (12; 260)	24,51% (17; 408)	13,52% (16; 244)	32,89% (20; 152)	8,61% (20; 267)
Salzburg / Sankt Johann im Pongau	17,48% (15; 143)	37,80% (12; 127)	6,07% (15; 428)	31,31% (18; 198)	30,26% (9; 228)
Salzburg / Tamsweg	6,35% (5; 63)	24,00% (6; 100)	2,55% (10; 157)	18,64% (7; 118)	9,43% (6; 53)
Salzburg / Zell am See	11,89% (11; 143)	17,46% (18; 252)	2,74% (22; 402)	9,98% (23; 601)	6,09% (15; 345)
Steiermark / Bruck	3,97% (12; 126)	*	*	*	*
Steiermark / Bruck- Mürzzuschlag	*	21,23% (25; 405)	12,93% (21; 263)	24,94% (23; 405)	10,95% (20; 210)
Steiermark / Deutschlandsberg	13,46% (5; 52)	14,15% (9; 205)	9,09% (8; 154)	24,70% (12; 247)	4,99% (13; 341)
Steiermark / Feldbach	7,57% (12; 383)	*	*	*	*
Steiermark / Fürstenfeld	-	*	*	*	*
Steiermark / Graz	23,81% (8; 42)	18,97% (11; 195)	22,41% (11; 58)	20,69% (13; 145)	10,61% (16; 179)
Steiermark / Graz- Umgebung	10,06% (19; 318)	29,59% (22; 365)	6,61% (28; 363)	21,73% (41; 543)	9,47% (32; 486)
Steiermark / Hartberg	10,44% (6; 249)	*	*	*	*
Steiermark / Hartberg- Fürstenfeld	*	43,97% (11; 614)	5,92% (16; 608)	13,51% (13; 259)	8,33% (12; 396)
Steiermark / Leibnitz	10,18% (14; 285)	27,04% (18; 196)	11,28% (23; 390)	17,52% (21; 314)	10,93% (24; 549)
Steiermark / Leoben	-	-	-	26,98% (8; 441)	5,09% (7; 216)
Steiermark / Liezen	16,30% (7; 184)	10,59% (9; 255)	9,41% (18; 372)	16,45% (24; 614)	7,69% (16; 351)
Steiermark / Murau	6,19% (17; 452)	10,36% (8; 193)	5,96% (10; 235)	13,14% (8; 312)	6,50% (9; 323)
Steiermark / Murtal	-	8,40% (10; 119)	6,25% (6; 64)	8,82% (11; 170)	13,07% (11; 176)
Steiermark / Mürzzuschlag	5,48% (6; 73)	*	*	*	*
Steiermark / Radkersburg	-	*	*	*	*
Steiermark / Südoststeiermark	*	19,60% (17; 352)	15,71% (18; 350)	12,95% (23; 448)	8,22% (15; 304)
Steiermark / Voitsberg	-	-	-	38,97% (10; 195)	12,00% (7; 150)
Steiermark / Weiz	7,47% (17; 522)	28,42% (15; 366)	3,89% (13; 386)	13,65% (18; 740)	7,50% (19; 533)
Tirol / Imst	-	-	5,43% (10; 184)	40,58% (9; 313)	9,84% (9; 244)
Tirol / Innsbruck	17,24% (5; 29)	24,53% (7; 53)	5,07% (16; 296)	-	6,29% (7; 159)
Tirol / Innsbruck Land	7,81% (20; 320)	28,07% (17; 171)	6,10% (31; 426)	17,85% (33; 521)	12,27% (35; 481)

Tirol / Kitzbühel	5,76% (9; 243)	24,00% (5;75)	2,88% (14; 208)	10,26% (18; 273)	6,55% (13; 168)
Tirol / Kufstein	22,26% (27; 539)	40,30% (26; 335)	3,85% (14; 260)	31,85% (12; 248)	5,58% (15; 215)
Tirol / Landeck	-	20,62% (7; 97)	5,08% (12; 177)	11,43% (10; 175)	18,87% (8; 106)
Tirol / Lienz	3,05% (7; 262)	19,56% (12; 409)	4,62% (9; 238)	9,42% (12; 276)	15,98% (8; 338)
Tirol / Reutte	-	-	9,56% (20; 272)	23,29% (13; 249)	14,38% (14; 313)
Tirol / Schwaz	21,07% (7; 261)	32,10% (17; 486)	3,80% (22; 526)	46,85% (18; 444)	10,36% (11; 251)
Vorarlberg / Bludenz	9,42% (9; 138)	20,65% (12; 155)	6,80% (16; 147)	30,13% (62; 707)	4,24% (29; 377)
Vorarlberg / Bregenz	16,16% (20; 359)	20,35% (27; 285)	4,86% (14; 288)	22,01% (69; 977)	11,54% (38; 797)
Vorarlberg / Dornbirn	31,52% (6;92)	39,62% (9; 106)	3,39% (8; 59)	61,92% (23; 239)	12,10% (14; 124)
Vorarlberg / Feldkirch	23,44% (14; 128)	40,37% (19; 161)	8,57% (12; 105)	48,07% (52; 491)	12,86% (24; 280)
Wien / Wien	19,18% (32; 318)	51,53% (66; 458)	11,48% (41; 479)	24,76% (70; 832)	12,59% (59; 945)

1.4.4 Symptome

Wichtig für eine Untersuchung der Winterverluste sind die Symptome, die diese begleiten. Imkereien mit Winterverlusten wurden gebeten, die an ihren Völkern beobachteten Symptome zu nennen. Folgende einfach und ohne weitere Hilfsmittel zu beurteilenden Symptome standen zur Auswahl: a) hatten viele tote Bienen im oder vor dem Volk, b) hatten keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk, c) hatten tote Bienen in Zellen, und kein Futter im Stock (verhungert), d) hatten tote Bienen in Zellen, aber genug Futter im Stock (Futter nicht erreicht), e) hatten keines der oben genannten oder unbekannte Symptome.

Abbildung 1.8 zeigt die Häufigkeiten der die Winterverluste 2017/18 begleitenden Symptome anhand drei unterschiedlicher Berechnungsarten. Korrekterweise sollte sich die Angabe der Symptome nur auf die toten oder verlorenen Völker und nicht zusätzlich auch auf Völker mit Königinnen-Problemen beziehen. Der schwarze Balken in Abbildung 1.8 zeigt die Häufigkeit der genannten Symptome der toten oder verlorenen Völker (unter Ausschluss von Völkern, die durch Königinnen-Probleme verloren wurden). In diesem Fall inkludierte die Analyse nur Angaben ohne Mehrfachnennungen, das heißt die Summe der genannten Symptome entspricht exakt der Anzahl der von dieser Teilgruppe (1336 Imkereien) verlorenen Völker (n=2219 verlorene Völker). Die Häufigkeiten wurden anschließend bezogen auf den Gesamtverlust berechnet. Die Gesamtverluste inkludieren die verlorenen Völker und Völker mit Königinnen-Problemen. Zuerst wurden nur jene Antworten ausgewertet, bei denen der Gesamtverlust mit der Anzahl der Symptom-Nennungen übereinstimmt. Diesen Sachverhalt stellt der graue Balken in Abbildung 1.8 für 1348 Imkereien und 2284 Völker dar. Zusätzlich wurden alle Symptom-Nennungen inklusive Mehrfachnennung und unvollständigen Angaben für die Analyse herangezogen. Der weiße Balken in Abbildung 1.8 zeigt somit alle von den 1391 TeilnehmerInnen genannten Symptome (n=2375 Symptomnennungen).

Im Untersuchungsjahr 2017/18 war das häufigste Symptom der verlorenen Völker „keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk“ (b). Am zweithäufigsten wurden „tote Bienen im oder vor dem Volk“ festgestellt (a), gefolgt von (d) tote Bienen in Zellen, aber genug Futter im Stock (Futter nicht erreicht). Klassisches Verhungern durch Futtermangel (c) wurde seltener beobachtet. Nur wenige Schadbilder konnten von den Imkereien keiner Kategorie zugeordnet werden (e).

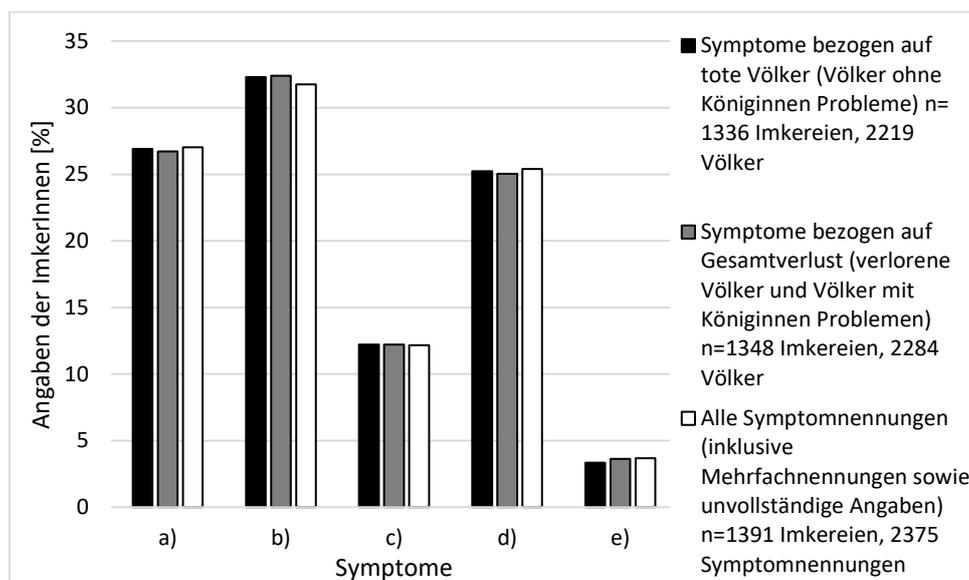


Abbildung 1.8: Häufigkeit der von ImkerInnen berichteten Symptome a) bis e) in Prozent für 2017/18: a) Vviele tote Bienen im oder vor dem Volk, b) keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk, c) tote Bienen in Zellen, kein Futter im Stock, d) tote Bienen in Zellen, aber genug Futter im Stock, e) keines der oben genannten oder unbekannte Symptome.

1.4.5 Verteilung der Völkerverluste

Für die Berechnung wird für jeden einzelnen Imkereibetrieb die Höhe des Gesamtverlustes (d.h. die Summe der toten oder verlorenen Völker und der von Königinnen-Problemen betroffenen Völker) der insgesamt eingewinterten Völker in Prozent berechnet. Grafisch ist die Verteilung der Verluste in Abbildung 1.9 dargestellt. Im Winter 2017/18 lagen mehr als die Hälfte der von Verlusten betroffenen Imkereibetriebe (56,58%) vorwiegend im Bereich zwischen 0% und 10%. Mehr als 20% Verlustrate war bei 22,79% der teilnehmenden Betriebe zu verzeichnen.

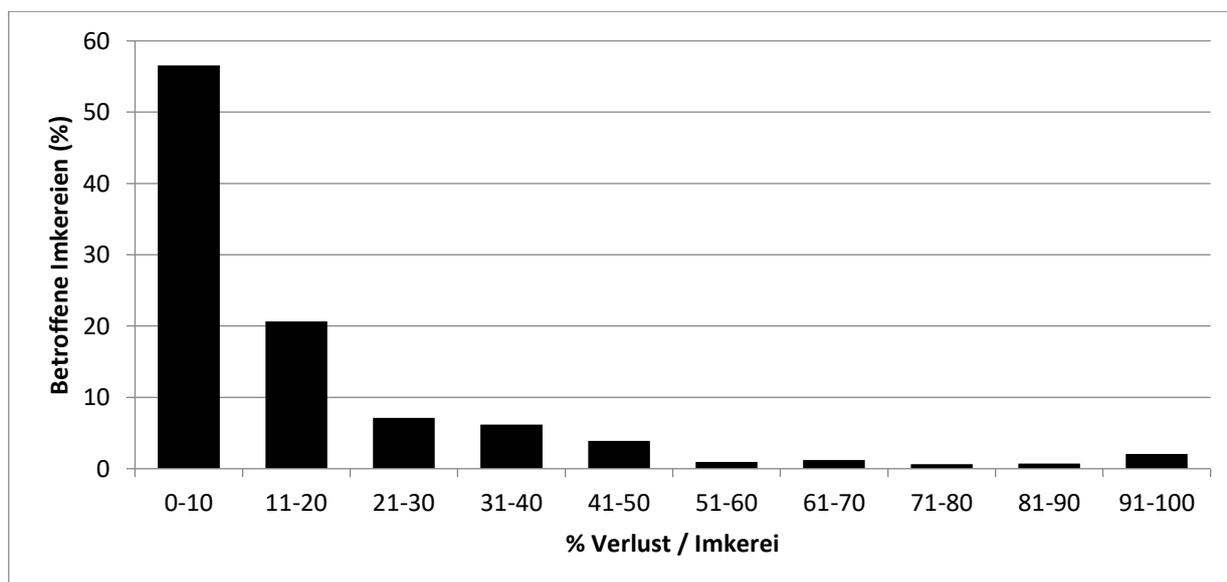


Abbildung 1.9: Verteilung der Völkerverluste 2017/18 in Prozent pro teilnehmender Imkerei.

1.4.6 Risikoanalyse

In der Risikoanalyse werden die Winterverlustraten verschiedener Gruppen von Betriebsweisen miteinander verglichen. Besteht beispielsweise zwischen zwei Gruppen von Betriebsweisen ein signifikanter Unterschied, kann man daraus Schlussfolgerungen über die Bedeutung dieses Risikofaktors für Winterverluste von Bienenvölkern ziehen. Überlappen die Konfidenzintervalle der Verlustraten von zwei oder mehreren Gruppen nicht, kann die untersuchte Betriebsweise, oder andere damit verknüpfte aber nicht erhobene Faktoren, als signifikanter Einflussfaktor auf die Höhe der Winterverluste betrachtet werden.

1.4.6.1 Betriebsgröße

Die Untersuchung der Erhebung 2017/18 hat gezeigt, dass die Betriebsgröße von Imkereien, wie auch in vergangenen Jahren, einen Risikofaktor für Winterverluste darstellt. Kleinere Betriebe mit bis zu 50 Völkern weisen im Winter 2017/18 (12,33%, Konfidenzintervall: 11,49-13,21%) zunächst keine signifikant höheren Verluste als Betriebe mit über 50 Völkern (10,85%, Konfidenzintervall: 9,28-12,65%) auf. In Abbildung 1.10 sind diese zwei Gruppen grafisch dargestellt.

Eine weitere Unterteilung der Betriebsgrößen wurden im nächsten Schritt zur genaueren Betrachtung durchgeführt und die Betriebsgröße in drei Gruppen eingeteilt: in Betriebe mit ein bis 20 Völkern, solche mit 21-50 Völkern und Betriebe mit mehr als 50 Völkern. Es zeigten sich 2017/18 signifikant höhere Verluste bei der Gruppe „1-20“ (14,06%, Konfidenzintervall: 12,92-15,29%) im Vergleich zur Gruppe „21-50“ (10,62%, Konfidenzintervall: 9,40-11,99%) sowie der Gruppe „>50“ (10,85%, Konfidenzintervall: 9,28-12,65%) (Abbildung 1.11).

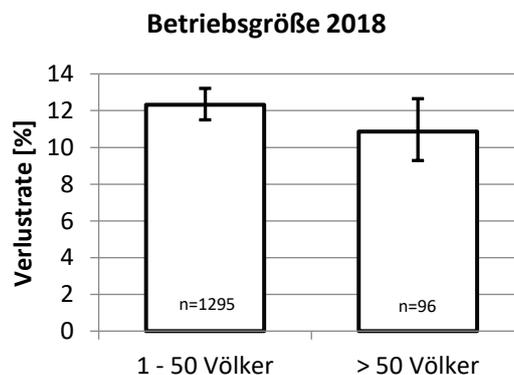


Abbildung 1.10: Höhe der Winterverluste 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Betriebsgröße. Einteilung in 1-50 und >50 Völker. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

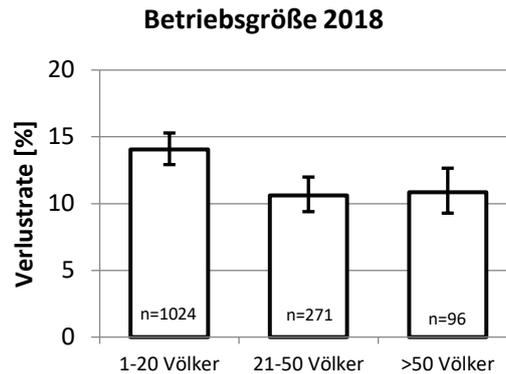


Abbildung 1.11: Höhe der Winterverluste 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Betriebsgröße. Einteilung in 1-20, 21-50 und >50 Völker. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 1-20 zu den Gruppen 21/50 und >50 Völker. Für Details zu den Unterschieden siehe Text.

1.4.6.2 Stand- versus Wanderimkereien

Der Transport von Bienenvölkern kann Stress für die Bienen bedeuten, aber durch den Transport zu Trachtquellen eine verbesserte Nahrungsversorgung ermöglichen. Für den Winter 2017/18 wurde untersucht, ob sich Wanderimkerei auf die Wintersterblichkeit auswirkt. Die an unserer Studie teilnehmenden ImkerInnen wurden gefragt, ob sie ihre Bienen zu Trachtquellen oder Bestäubungseinsätzen transportieren (Verbringungen im Zuge der Zucht oder Ablegerbildung sind damit exkludiert). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Verlustrate zwischen Wander- und Standimkereien festgestellt werden (siehe Abbildung 1.12). Somit hatte das Anwandern von Trachten keinen signifikanten Einfluss auf die Winterverlustrate 2017/18 von Bienenvölkern.

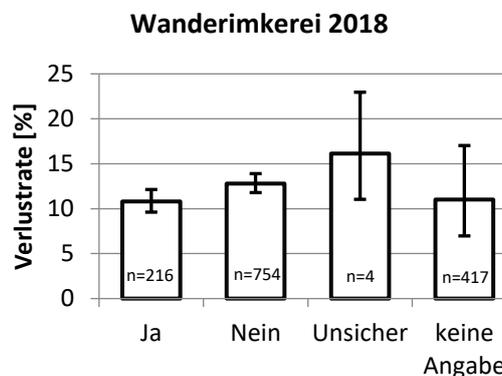


Abbildung 1.12: Höhe der Winterverluste 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) von Wander- und Standimkereien. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

1.4.6.3 Wabenhygiene

Wabenhygiene in Form regelmäßigen Ersetzens alter Brutwaben kann einen positiven Einfluss auf die Gesundheit der Bienen haben und möglicherweise auch das Überleben der Bienen im Winter beeinflussen. Die ImkerInnen wurden gefragt, welchen Anteil ihrer Brutwaben (in Prozent) sie erneuert haben. Bei der Erhebung der Winterverluste 2017/18 konnten keine signifikanten Unterschiede in der Verlustrate aufgrund der Wabenhygiene festgestellt werden (Abbildung 1.13). Die Verlustraten betragen bei keiner Wabenerneuerung 15,46% (Konfidenzintervall: 9,05-25,15%),

bei keiner Angabe zur Wabenerneuerung lag die Verlustrate bei 14,83% (Konfidenzintervall: 11,66-18,68%). Die geringsten Verluste verzeichneten jene ImkerInnen, die zwischen 31% und 50% ihres Wabenbaus erneuerten, die Verlustrate lag hier bei 11,00% (Konfidenzintervall: 9,98-12,11%).

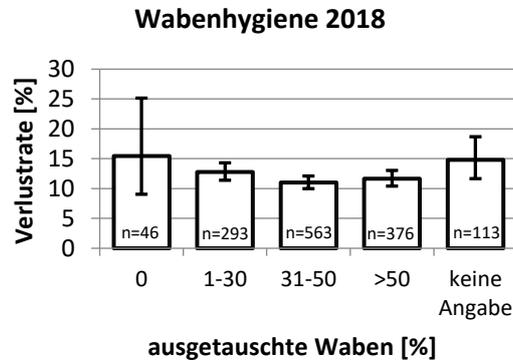


Abbildung 1.13: Höhe der Winterverluste von 2017/18 in Abhängigkeit vom Anteil der im Einwinterungsjahr erneuerten Brutwaben in Prozent ($\pm 95\%$ CI). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

1.4.6.4 Trachtangebot

ImkerInnen wurden nach spezifischen Trachtquellen, die von ihren Bienen befliegen wurden, gefragt, um mögliche Risikotrachtquellen herauszufinden. Zur Auswahl standen für die Untersuchung der Winterverluste 2017/18 Raps, Mais, Sonnenblume, spätblühende Zwischenfrüchte, Waldtracht sowie Waldtracht mit Melezitose. Bei Vorhandensein der Trachtpflanze Mais berichteten Imkereien signifikant höhere Verlustraten als bei Fehlen dieser Trachtpflanze (Abbildung 1.14).

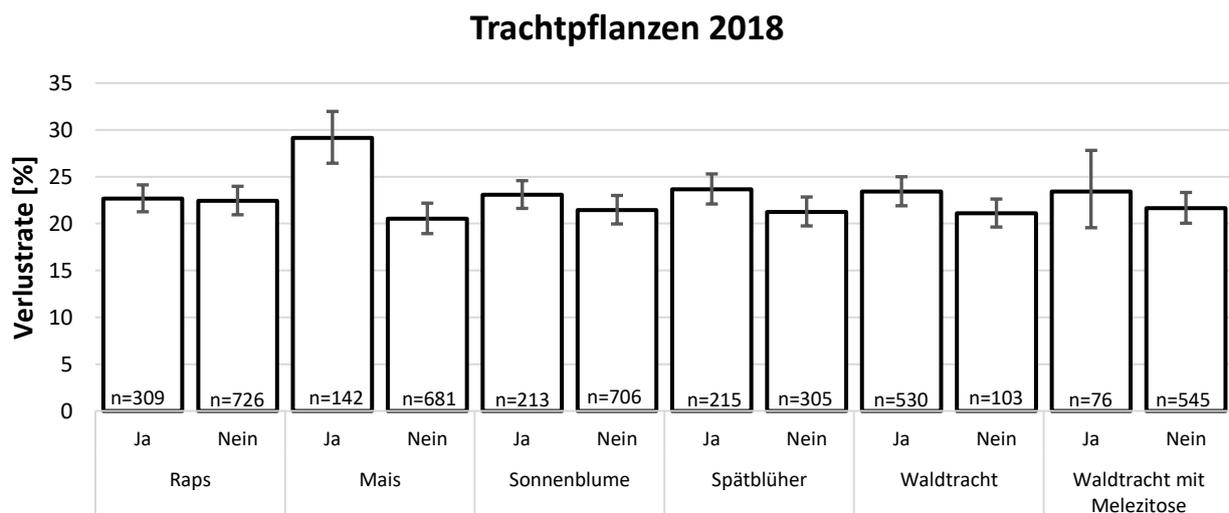


Abbildung 1.14: Höhe der Winterverluste von 2017/18 in Abhängigkeit vom Vorhandensein spezifischer Trachtpflanzen in Prozent ($\pm 95\%$ CI); n = Anzahl der Betriebe. Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Wintersterblichkeit in Abhängigkeit vom Vorhandensein beziehungsweise Fehlen der Trachtpflanze Mais.

1.4.6.5 Seehöhe

Um den Einfluss der Seehöhe auf die Wintersterblichkeit von Bienenvölkern zu untersuchen, wurden die Winterstandorte bezüglich ihrer Seehöhe in fünf Klassen eingeteilt ($\leq 200\text{m}$, 201-400m, 401-600m, 601-800m, $>800\text{m}$). Im Untersuchungsjahr 2017/18 war zwischen diesen Klassen kein signifikanter Unterschied festzustellen. Die Verlustraten verteilen sich wie folgt: die Klasse „ $\leq 200\text{m}$ “ weist eine Verlustrate von 12,44% (Konfidenzintervall 10,28-14,98%) auf; Bienenstandorte auf einer Seehöhe von 201-400m zeigen eine ähnliche Verlustrate von 12,22% (Konfidenzintervall: 10,97-13,10%). Die Verlustrate von Betrieben zwischen 401-600 weist eine Verlustrate von 11,84% (Konfidenzintervall: 10,70-13,10%) auf; für Betriebe zwischen 601-800m liegt die Verlustrate bei 10,23% (Konfidenzintervall: 8,40-12,41%). Für Betriebe, welche über 800m Seehöhe liegen errechnet sich für den Winter 2017/18 eine Verlustrate von 11,94% (Konfidenzintervall: 10,25-13,86%).

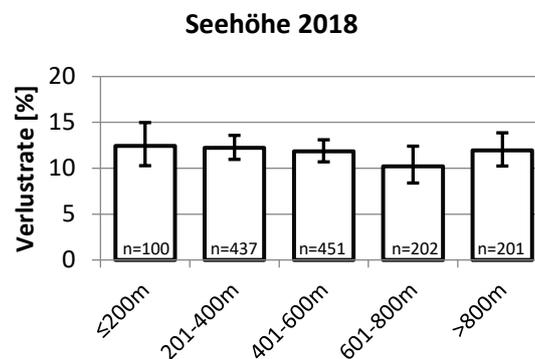


Abbildung 1.15: Höhe der Winterverluste 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Seehöhe der Winterstandorte. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

1.4.6.6 Bekämpfung der Varroamilbe

Ein wichtiger Teil der Untersuchung sind Erhebungen über die Behandlungsmethoden gegen die Varroamilbe und deren Auswirkung auf die Winterverluste. Abbildung 1.16 zeigt die am Fragebogen zur Auswahl gestellten Behandlungsmethoden. Dabei wird aus Gründen der internationalen Vergleichbarkeit, der von COLOSS erarbeitete Katalog von Anwendungen verwendet.

Nachfolgend wird zuerst die Häufigkeit der verwendeten Methoden dargestellt. Anschließend wurden die einzelnen Methoden im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Winterverlustrate betrachtet. Für die detaillierte Risikoanalyse wurden nur jene Behandlungsmethoden berücksichtigt, von denen auch genügend Datensätze vorhanden waren, um eine valide Aussage treffen zu können.

19 In welchen Monaten haben Sie Befallsmessungen oder Bekämpfungen gegen die Varroa-Milbe (bei Wirtschaftsvölkern) durchgeführt oder <u>begonnen</u>?	Bitte nennen Sie bei monatsübergreifenden Behandlungen nur den ersten Monat!												
	2017						2018						
	April	Mai	Juni	Juli	August	September	Oktober	November	Dezember	Jänner	Februar	März	April
Bestimmung Varroa-Befall (Milbenfall o.ä. Methode)													
Drohnenbrutentnahme													
Hyperthermie (Hitzebehandlung)													
Andere biotechnische Methode (Fangwabe, Bannwabe, totale Arbeiterinnen-Brutentnahme etc.)													
Ameisensäure Kurzzeitbehandlung (inkl. MAQS)													
Ameisensäure Langzeitbehandlung													
Milchsäure													
Oxalsäure Träufeln (oder Sprühen)													
Oxalsäure Verdampfen													
Oxalsäuremischungen (Hiveclean/Bienenwohl/Varromed)													
Thymol (Apiguard, Apilife VAR, Thymovar)													
Tau-fluvalinat (Apistan)													
Flumethrin (Bayvarol, Polyvar)													
Amitraz (in Streifen, Apivar, Apitraz)													
Amitraz (Verdampfen)													
Coumaphos (Perizin)													
Coumaphos (Checkmite+)													
Anderes chemisches Produkt (welches?)													
Ander Methode (welche?)													

Aufgrund des internationalen Ansatzes dieser Untersuchung finden Sie in dieser Liste auch in Österreich nicht empfohlene/zugelassene Mittel. Eine Nennung dieser stellt keine Empfehlung dar.

Abbildung 1.16: Im Fragebogen zur Auswahl stehende Behandlungsmethoden gegen die Varroamilbe.

Tabelle 1.7 zeigt die durchgeführten Methoden der Varroabekämpfung von allen Imkereien, die uns Daten im Untersuchungszeitraum von 2017/18 zur Verfügung gestellt haben. 94,2% der Imkereien bestimmten in mindestens einem Monat des abgefragten Zeitraums den Varroabefall ihrer Völker mit einer Methode (zum Beispiel natürlicher Milbenfall mit Stockwindel oder Diagnose mittels Staubzuckermethode). Die häufigste Methode zur Varroabekämpfung ist die Drohnenbrutentnahme, welche von 62,9% der ImkerInnen in zumindest einem Monat durchgeführt wurde. Danach folgten, nach Anwendung der Häufigkeit, Bekämpfungsmaßnahmen mit organischen Säuren (Ameisensäure Kurzzeit oder Langzeit, unterschiedliche Anwendungsformen der Oxalsäure). Insgesamt 84,3% der Imkereien in Österreich führten eine Ameisensäurebehandlung durch (Kurzzeit oder Langzeit, wobei Langzeitbehandlungen mit 53,6% in der Imkerschaft häufiger angewandt werden). Von den unterschiedlichen Anwendungen der Oxalsäure, wird die Verdampfung von 45,2% aller Imkereien angewandt, das Träufeln oder Sprühen von 40,4% und das Träufeln von Oxalsäureprodukten mit weiteren Inhaltsstoffen (Hiveclean/Bienenwohl/Varromed) von 27,6% der Imkereien. Die Kombinationsanwendung der beiden organischen Säuren (Ameisensäure kurz oder lang, sowie eine Restentmilbung mit Oxalsäure) wird von 78,6% der österreichischen Imkereien angewandt.

Thymol, egal ob in alleiniger Anwendung oder in Kombination mit anderen Methoden, wurde von 11,3% der Imkereien als Methode zur Bekämpfung der Varroamilbe verwendet. Biotechnische Methoden abseits der Drohnenbrutentnahme oder Hyperthermie wurden von 20,2% der Imkereien angewandt, dazu zählen etwa die Fangwabe, die Bannwabe oder die komplette Arbeiterinnen-Brutentnahme. Hyperthermie (=Hitzebehandlung) oder Milchsäure wurden von 4,6% bzw. 5,0% der Imkereien angewandt. Synthetische Acarizide zur Bekämpfung der Varroamilbe wurden nur in einem geringen Ausmaß genannt (< 0,3%).

1.4.6.6.1 Bestimmung des Varroabefalls

Um herauszufinden, ob die Bestimmung des Varroabefalls einen möglichen Einfluss auf die Wintersterblichkeit haben könnte, wurden die ImkerInnen gefragt, ob sie den Varroabefall mit einer Methode bestimmt hatten oder nicht. Bei ImkerInnen, die den Varroabefall bestimmt hatten, lag die Verlustrate 2017/18 bei 11,46% (Konfidenzintervall: 10,73-12,23%) und bei jenen die keine Bestimmung des Varroabefalls durchgeführt hatten bei 13,42% (Konfidenzintervall: 10,89-16,43%). Somit hatte die Durchführung einer Bestimmung des Varroabefalls keinen signifikanten Einfluss auf die Winterverlustrate im Untersuchungsjahr 2017/18 (Abbildung 1.17).

Auswirkung einer mehrfachen Varroabestimmung auf die Winterverluste

Auch ein möglicher Effekt der Bestimmungsdauer wurde analysiert, das heißt die Anzahl der Monate, in denen die Bestimmung durchgeführt wurde. Die Bestimmungsdauer wurde in drei Klassen unterteilt: Null Monate (=keine Bestimmung), Bestimmungszeitraum von einem bis drei Monaten und Bestimmungszeitraum über mehr als drei Monate. Für das Untersuchungsjahr 2017/18 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. (Abbildung 1.18).

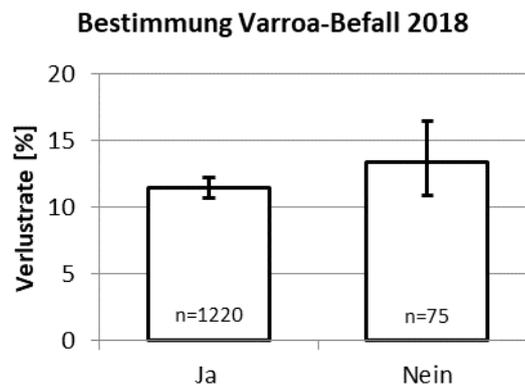


Abbildung 1.17: Höhe der Winterverluste von 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%CI$) in Abhängigkeit von einer durchgeführten Abschätzung des Varroabefalls mit nicht näher abgefragten Methoden. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

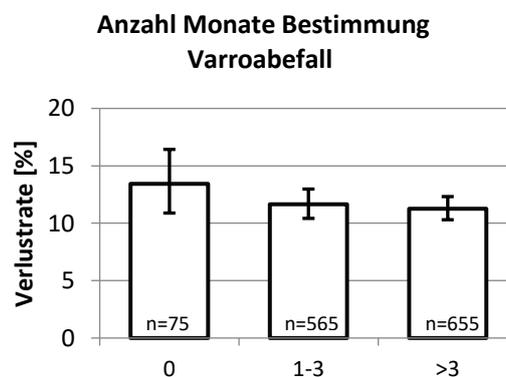


Abbildung 1.18: Höhe der Winterverluste von 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%CI$) in Abhängigkeit von der Dauer der Bestimmung des Varroabefalls. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Betimmung Varroabefall 2018

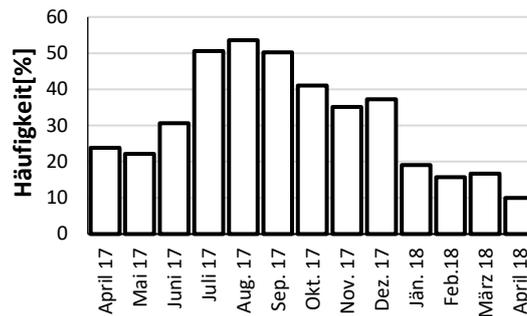


Abbildung 1.19: Häufigkeiten der Bestimmung des Varroabefalls 2017/18 vom April des Einwinterungsjahres bis April des Auswinterungsjahres in Prozent.

Es wurde weiters untersucht, ob der Zeitpunkt der Bestimmung des Varroabefalls einen Einfluss auf den Überwinterungserfolg hat. Abbildung 1.20 zeigt die Winterverlustrate der TeilnehmerInnen, welche eine Bestimmung des Varroabefalls im jeweiligem Monat durchgeführt haben und die Winterverlustrate der TeilnehmerInnen, die keine Bestimmung im jeweiligem Monat durchgeführt haben. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Überwinterungserfolg ausgehend vom Zeitpunkt der Bestimmung des Varroabefalls gefunden werden.

Tabelle 1.7: Anzahl (Prozent) der Imkereien, welche die genannte Methode zur Bekämpfung der Varroamilbe in zumindest einem Monat angewendet haben.

	Anzahl Ja [%]	Anzahl Nein [%]	Summe
Bestimmung Varroabefall (Milbenfall o. ä. Methode)	1220 (94,2%)	75 (5,8%)	1295
Drohnenbrutentnahme	833 (63,9%)	470 (36,1%)	1303
Hyperthermie	60 (4,6%)	1243 (95,4%)	1303
Andere biotechnische Methode (Fangwabe, Bannwabe, Arbeiterinnen-Brutentnahme etc.)	263 (20,2%)	1040 (79,8%)	1303
Ameisensäure Kurzzeitbehandlung (inkl. MAQS)	619 (47,5%)	684 (52,5%)	1303
Ameisensäure Langzeitbehandlung	699 (53,6%)	604 (46,4%)	1303
Milchsäure	64 (5,0%)	1239 (95,0%)	1303
Oxalsäure Träufeln (oder Sprühen)	527 (40,4%)	776 (59,6%)	1303
Oxalsäure Verdampfen	589 (45,2%)	714 (54,8%)	1303
Hiveclean/Bienenwohl/Varromed	360 (27,6%)	943 (72,4%)	1303
Thymol (Apiguard, Apilife VAR, Thymovar)	147 (11,3%)	1156 (88,7%)	1303
Tau-fluvalinat (Apistan)	2 (0,1%)	1301 (99,9%)	1303
Flumethrin (Bayvarol)	4 (0,3%)	1299 (99,6%)	1303
Amitraz (in Streifen, Apivar, Apitraz)	20 (1,5%)	1283 (98,5%)	1303
Amitraz (Verdampfen)	3 (0,2%)	1300 (99,8%)	1303
Coumaphos (Perizin)	0 (0%)	1303 (100%)	1303
Coumaphos (Checkmite+)	0 (0%)	1303 (100%)	1303
Anderes chemisches Produkt	4 (0,3%)	1299 (99,6%)	1303
Andere Methode	263 (20,2%)	1040 (79,8%)	1303
Ameisensäure (Kurzzeit- ODER Langzeitbehandlung)	1099 (84,3%)	204 (15,7%)	1303
Ameisensäure (Kurzzeit- ODER Langzeitbehandlung) und Oxalsäurebehandlung (Träufeln oder Sprühen oder Verdampfen oder Hiveclean/Bienenwohl/Varromed)	1024 (78,6%)	279 (21,4%)	1303

Analog zu den vorangegangenen Untersuchungsjahren wurden die Häufigkeiten der Varroabestimmung für jeden Monat des Zeitraums zwischen April des Einwinterungsjahres und April des Auswinterungsjahres errechnet. Diese sind in Abbildung 1.19 dargestellt. Auch in diesem Untersuchungsjahr wurde die Methode „Varroabestimmung“ vorwiegend in den Monaten Juli bis September, von jeweils über 50% der Imkereien angewandt.

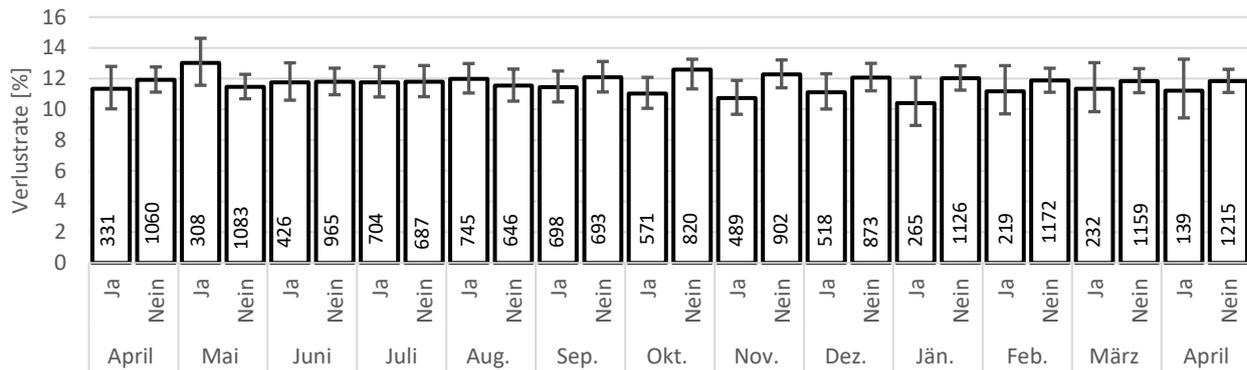


Abbildung 1.20: Höhe der Winterverluste von 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%CI$) in Abhängigkeit von der Bestimmung des Varroa-Befallsgrades im jeweiligen Monat. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den paarweisen Vergleichen eines Monats.

1.4.6.6.2 Zeitpunkt und Häufigkeit der Anwendungen

Die TeilnehmerInnen wurden zu ihren verwendeten Methoden zur Bekämpfung der Varroamilbe gefragt. Aus den erhaltenen Antworten haben wir die Häufigkeiten, mit der die jeweiligen Methoden in den einzelnen Monaten angewendet wurden, bestimmt und in den Abbildungen 1.21a-h dargestellt.

1.4.6.6.3 Auswirkungen der Drohnenbrutentnahme auf die Winterverluste

Die am häufigsten angewandte Methode zur Verringerung des Varroabefalls ist die Drohnenbrutentnahme, da die Varroamilbe vermehrt innerhalb der Drohnenbrut zu finden ist. Von den teilnehmenden Imkereien 2017/18 haben 63,9% diese Methode in zumindest einem Monat angewandt. Wir konnten keinen signifikanten Unterschied in der Verlustrate zwischen Imkereien, die Drohnenbrut entnommen haben und solchen, die dies nicht gemacht haben, feststellen. Die Verlustrate, bei Imkereien welche die Drohnenbrutentnahme durchgeführt hatten lag bei 11,70% (Konfidenzintervall: 10,84-12,63%), bei Verzicht der Drohnenbrutentnahme wurde eine Verlustrate von 11,65% (Konfidenzintervall: 10,53-12,88%) festgestellt (Abbildung 1.22).

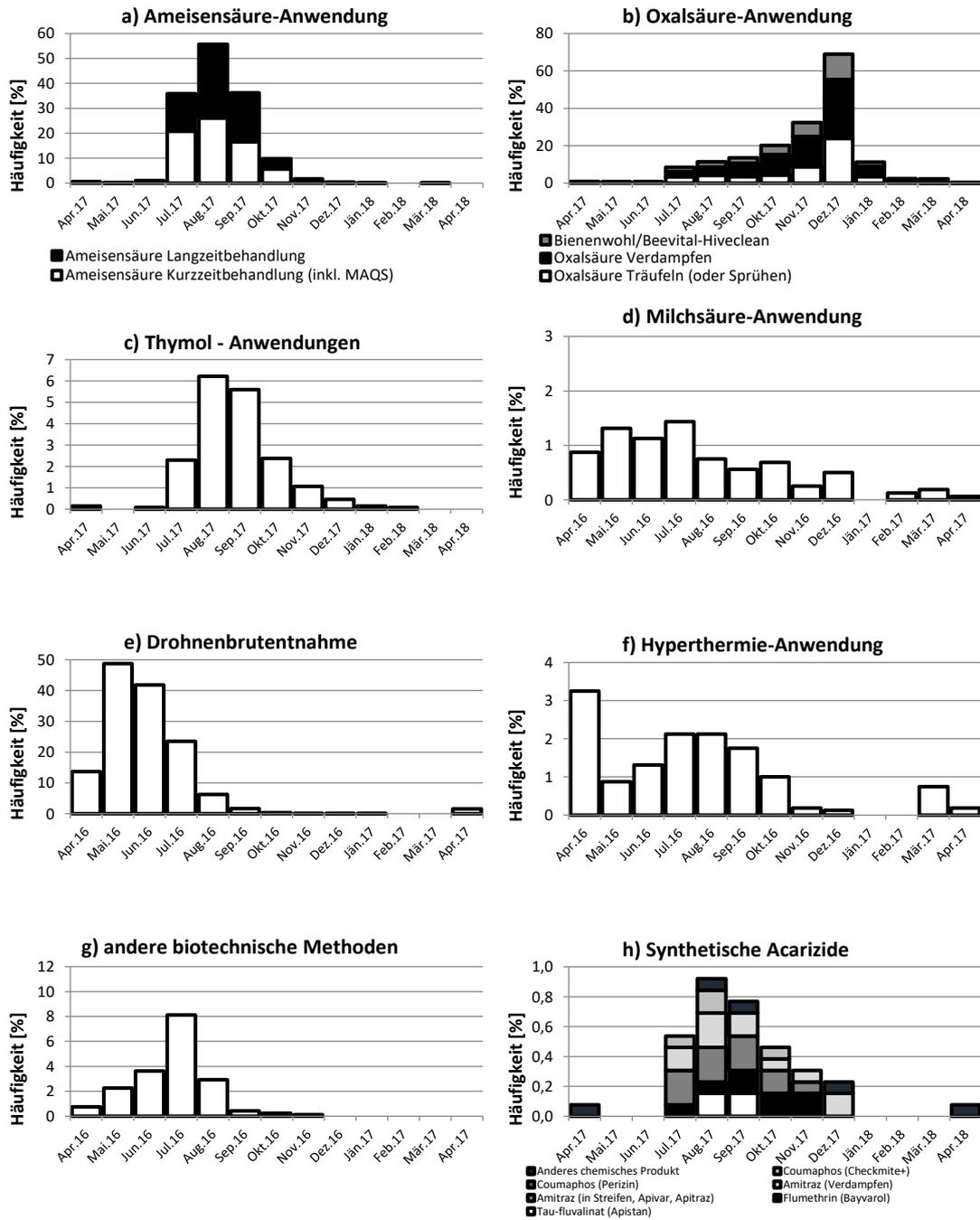


Abbildung 1.21 a-h: Zusammenfassung der zur Bekämpfung der Varroamilbe angewandten Methoden für das Untersuchungsjahr 2017/18.

Drohnenbrutentnahme 2018

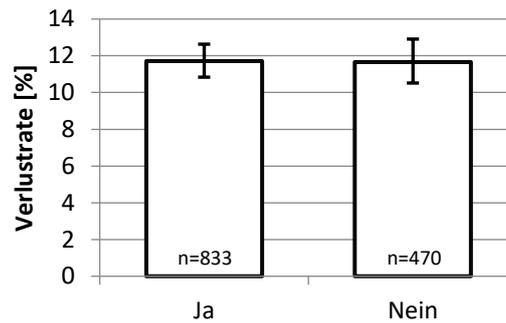


Abbildung 1.22: Höhe der Winterverluste 2017/18 in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Drohnenbrutentnahme“ in Prozent ($\pm 95\%CI$). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Ob der Zeitpunkt der Entnahme von Drohnenbrut einen Einfluss auf die Winterverlustrate hat, wurde durch eine Gegenüberstellung der Verlustraten für die Monate April bis Juli bei Anwendung und Verzicht dieser Methode betrachtet. In Abbildung 1.23 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Es konnte kein Monat identifiziert werden, in dem die Drohnenbrutentnahme statistisch signifikant unterschiedliche Verlustraten bewirkt.

Drohnenbrutentnahme 2018

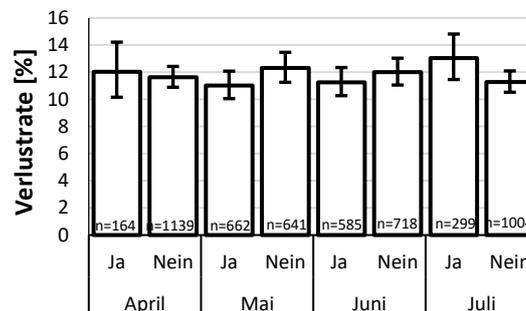


Abbildung 1.23: Höhe der Winterverluste 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%CI$) in Abhängigkeit von der Drohnenbrutentnahme in den Monaten April bis Juli des Einwinterungsjahres. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Auswirkung einer mehrfachen Drohnenbrutentnahme auf die Winterverluste

Es wurde untersucht, ob die Anzahl der Monate, in denen eine Drohnenbrutentnahme durchgeführt wurde, einen Einfluss auf den Überwinterungserfolg hat. Dazu wurden die Verlustraten der Gruppen „0“ (=keine Behandlung), „1-3 Monate“ und „>3 Monate“ verglichen. Auch hierbei konnte kein signifikanter Unterschied aufgrund der Dauer der Behandlung festgestellt werden (Abbildung 1.24).

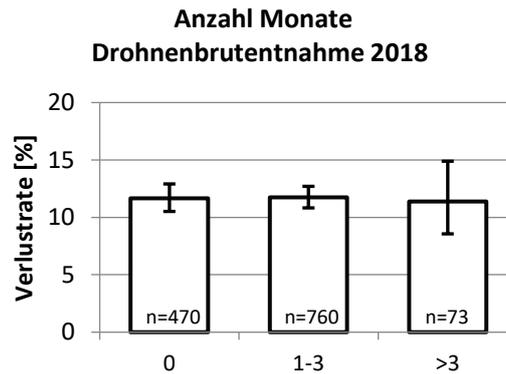


Abbildung 1.24: Höhe der Winterverluste von 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Dauer der Drohnenbrutentnahme. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

1.4.6.6.4 Ameisensäure-Behandlung

Wir haben bei unseren Analysen zwischen Kurzzeit- und Langzeitbehandlung mit Ameisensäure unterschieden und die daraus resultierenden Verlustraten miteinander verglichen. Es ist zu vermerken, dass bei keiner der Methoden die Konzentration der verwendeten Ameisensäure abgefragt wurde.

In Abbildung 1.25 wird die Verlustrate bei Anwendung der Kurzzeitbehandlung (11,81%, Konfidenzintervall: 10,82-12,88%) mit jener bei Nichtanwendung (11,54%, Konfidenzintervall: 10,48-12,47%) dieser Behandlung verglichen und grafisch dargestellt. Die Verlustrate bei Behandlung war nicht höher als bei Nichtbehandlung.

In Abbildung 1.26 wird die Verlustrate bei Anwendung der Langzeitbehandlung jener bei Nichtanwendung dieser Methode gegenübergestellt. Die Verlustrate bei Behandlung (11,17%, Konfidenzintervall: 10,27-12,14%) war nicht signifikant unterschiedlich als bei Nichtbehandlung (12,30%, Konfidenzintervall: 11,24-13,45%).

In Abbildung 1.27 werden die beiden Methoden Kurzzeit- und Langzeitbehandlung gegenübergestellt, und zwar nur für Betriebe, die ausschließlich entweder die eine oder die andere Ameisensäure-Anwendung durchgeführt haben. Die Verlustrate bei ausschließlicher Kurzzeitbehandlung (12,09%, Konfidenzintervall: 10,85-13,45%) war nicht signifikant unterschiedlich zu jener bei ausschließlicher Langzeitbehandlung (11,14%, Konfidenzintervall: 10,07-12,31%).

**Ameisensäure (Kurzzeit-Behandlung)
2018**

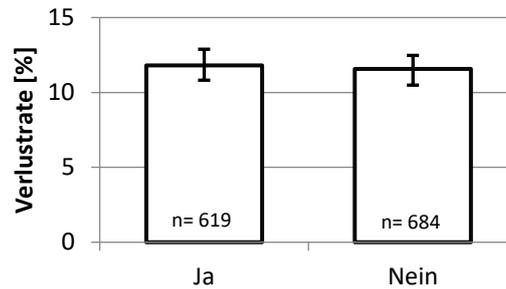


Abbildung 1.25: Höhe der Winterverluste von 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Ameisensäure-Kurzzeitbehandlung“. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

**Ameisensäure (Langzeit-Behandlung)
2018**

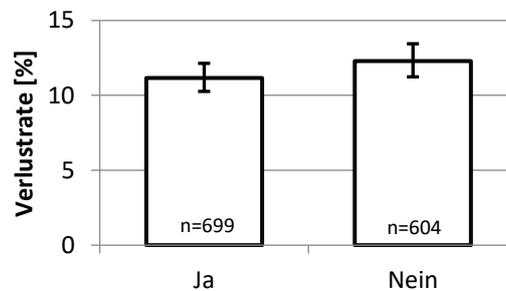


Abbildung 1.26: Höhe der Winterverluste von 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Ameisensäure-Langzeitbehandlung“. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Ameisensäure-Behandlung 2018

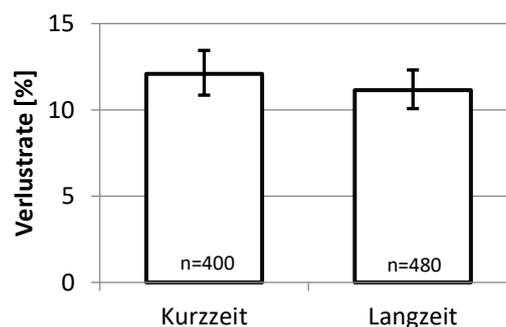


Abbildung 1.27: Höhe der Winterverluste von 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von alleiniger Anwendung einer Ameisensäure-Kurzzeit- oder -Langzeitbehandlung. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

1.4.6.6.5 Oxalsäure

Während der Wintermonate setzen viele ImkerInnen Oxalsäure zur Bekämpfung der Varroamilbe zur sogenannten Restentmilbung ein. In besonderen Situationen kann eine Anwendung auch in

der warmen Jahreszeit erfolgen. Die Anwendung dieser Methode erfordert allerdings, dass die Völker (nahezu) brutfrei sind, da die Oxalsäure nicht in die verdeckelte Brut wirkt. Die Oxalsäure kann entweder durch Träufeln oder durch Verdampfen eingesetzt werden. Hiveclean/Bienenwohl/ Varromed sind kommerziell erhältliche Fertigmischungen aus Oxalsäure, Zucker und anderen Stoffen, die ebenfalls geträufelt werden. Es wurde untersucht, ob sich die Winterverlusten bei ImkerInnen, die eine dieser Methoden eingesetzt haben, von jenen, die diese Methoden nicht angewandt haben, unterscheiden. Wie auch in den vorangegangenen Untersuchungsjahren war die Verlustrate bei Anwendung (12,64%, Konfidenzintervall: 11,55-13,82%) des Träufelns nicht signifikant unterschiedlich zu jener bei Nichtanwendung (10,87%, Konfidenzintervall: 9,98-11,83%). Auch bei Anwendung des Verdampfens (10,78%, Konfidenzintervall: 9,83-11,81%) war kein signifikanter Unterschied zu der Gruppe, welche diese Methode nicht durchgeführt hat (12,50%, Konfidenzintervall: 11,50-13,55%), festzustellen (Abbildung 1.28 und 1.29).

Oxalsäurebehandlung im November und Dezember

Wir haben des weiteren untersucht, ob der Zeitpunkt der Anwendung von Bedeutung ist. Dafür wurden die zwei Monate, in denen die Methode am häufigsten eingesetzt wird, November und Dezember (siehe Abb. 1.21b), unabhängig von der restlichen Anwendungshäufigkeit im Untersuchungszeitraum verglichen. Abbildung 1.30 zeigt die Verlustrate bei Anwendung einer Oxalsäurebehandlung (Träufeln und/oder Verdampfen und/oder Hiveclean/Bienenwohl/ Varromed) im November (10,33%, Konfidenzintervall: 8,17-12,98%) und jene im Dezember (11,03%, Konfidenzintervall: 9,65-12,57%). Bei diesem Vergleich konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

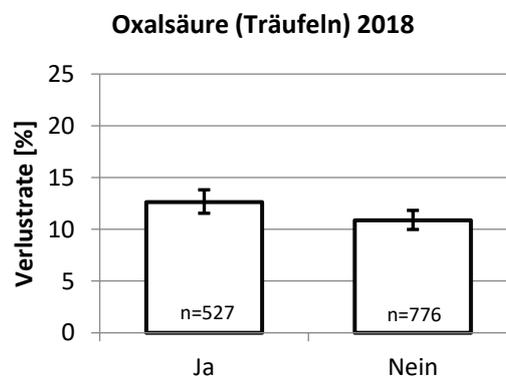


Abbildung 1.28: Höhe der Winterverluste von 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%CI$) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Oxalsäure (Träufeln)“. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

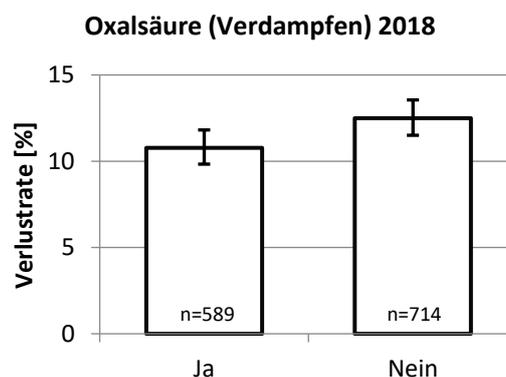


Abbildung 1.29: Höhe der Winterverluste von 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Oxalsäure (Verdampfen)“. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

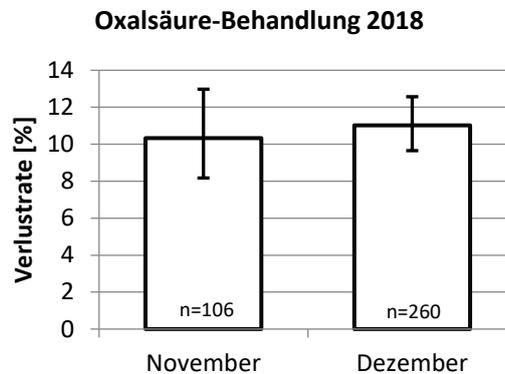


Abbildung 1.30: Höhe der Winterverluste von 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Oxalsäure“ (Träufeln und/oder Verdampfen und/oder Hiveclean/Bienenwohl/ Varromed) im November und im Dezember. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

1.4.6.6.6 Hiveclean/Bienenwohl/Varromed

Bienenwohl mit dem Wirkstoff Oxalsäure (und weiteren Hilfsstoffen) wird für einen optimalen Behandlungserfolg im brutfreien Volk eingesetzt. Im Untersuchungsjahr 2017/18 setzten 27,6% aller befragten ImkerInnen das Produkt Bienenwohl zur Bekämpfung der Varroa-Milbe ein. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Verlustrate beobachtet werden, wenn Bienenwohl zur Bekämpfung der Varroamilbe verwendet wurde verglichen mit Nichtanwendung (Abbildung 1.31). Die Verlustraten bei Anwendung (12,33%, Konfidenzintervall: 11,10-13,67%) und Nichtanwendung ergaben keinen signifikanten Unterschied (11,04%, Konfidenzintervall: 10,57-12,30%).

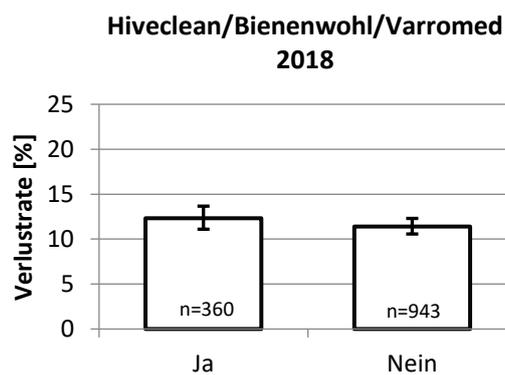


Abbildung 1.31: Höhe der Winterverluste von 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Varroa-bekämpfung mit einer Oxalsäure Fertigmischung (Hiveclean/Bienenwohl/ Varromed). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

1.4.6.6.7 Thymol

Von 11,28% aller befragten ImkerInnen wurde angegeben, eine Behandlung mit Thymol durchgeführt zu haben. Wie auch in den vorangegangenen Untersuchungsjahren, zeigte sich auch

für 2017/18 kein signifikanter Unterschied in der Verlustrate, wenn Thymol zur Bekämpfung der Varroamilbe verwendet wurde bzw. nicht verwendet wurde (Abbildung 1.32).

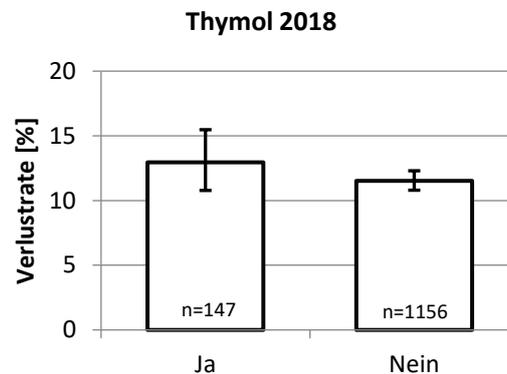


Abbildung 1.32: Höhe der Winterverluste von 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%CI$) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Thymol“. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Auswirkung einer mehrfachen Thymolbehandlung auf die Winterverluste

Es wurde analog zu den vorangehenden Beobachtungsjahren untersucht, ob sich eine mehrfache Behandlung der Völker mit Thymol auf die Winterverlustrate auswirkt. Die Einteilung dazu wurde mit den Gruppen „0“ (keine Behandlung), „1“ (Behandlung in einem Monat) und „>1“ (Behandlung in mehr als einem Monat) festgelegt. Auch bei dieser genaueren Betrachtung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Anwendung bzw. Nichtanwendung von Thymol festgestellt werden (Abbildung 1.33).

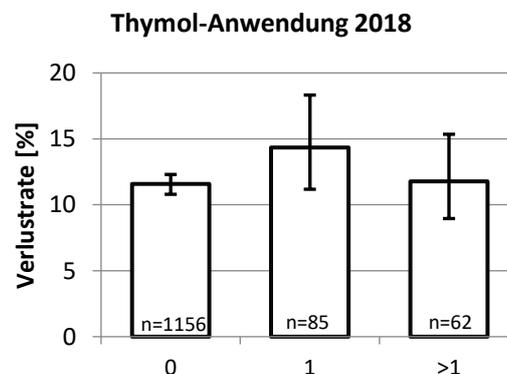


Abbildung 1.33: Höhe der Winterverluste 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%CI$) in Abhängigkeit von der Anzahl der Anwendungen von Produkten auf Thymolbasis. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen.

1.4.6.6.8 Hyperthermie

Eine Alternative zur chemischen Behandlung der Völker gegen die Varroamilbe stellt die Hitzebehandlung (=Hyperthermie) dar. Sie beruht auf der unterschiedlichen Wärmetoleranz von Bienen und Milben. 4,6% der ImkerInnen, die sich an der Erhebung der Winterverluste beteiligt haben, wendeten diese nicht-chemische Behandlung in zumindest einem Monat an. Es wurde nicht zwischen den verschiedenen am Markt erhältlichen Systemen zur Hitzebehandlung unterschieden.

Hinsichtlich der Verlustrate fanden wir keine signifikanten Unterschiede zwischen Völkern, die mit Hyperthermie behandelt wurden und jenen, bei denen diese Methode nicht angewandt wurde (Abbildung 1.34).

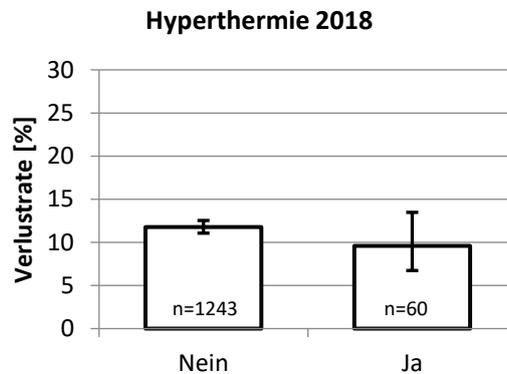


Abbildung 1.34: Höhe der Winterverluste 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Hyperthermie“. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

1.4.6.6.9 Andere biotechnische Methoden (ohne Hyperthermie und ohne Drohnenbrutentnahme)

Andere biotechnische Methoden, mit Ausnahme von Hyperthermie und Drohnenbrutentnahme, wurden zusammengefasst abgefragt. 20,2% der befragten ImkerInnen gaben an eine andere biotechnische Methode angewendet zu haben. Dazu zählen die Verwendung von Fangwaben oder Bannwaben oder die komplette Arbeiterinnenbrutentnahme. Im Untersuchungsjahr 2017/18 lag die Verlustrate bei Anwendung solcher Methoden bei 11,21% (Konfidenzintervall: 9,95-12,60%) und jene die keine dieser biotechnischen Methoden verwendeten bei 11,92% (Konfidenzintervall: 11,08-12,80%) (Abbildung 1.35).

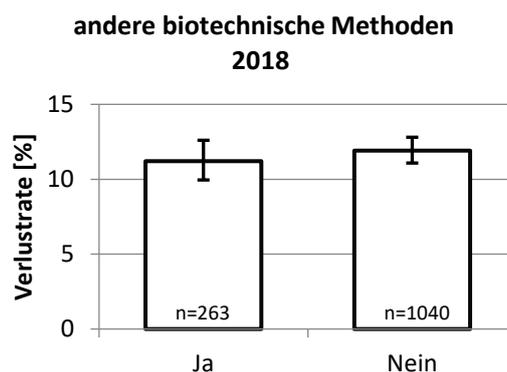


Abbildung 1.35: Höhe der Winterverluste 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „andere biotechnische Methoden“. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

1.4.6.6.10 Königinnen-Probleme

Die Überlebenschance der Völker hängt in großem Maße auch von der Gesundheit der Königin ab. Die Imkereien wurden deshalb auch über das Auftreten von Königinnen-Problemen befragt und konnten zwischen den vier Antworten „Häufiger“, „Normal“, „Seltener“ und „Weiß nicht“ (im Vergleich zu den Vorjahren) entscheiden. Tabelle 1.8 zeigt die Angaben der TeilnehmerInnen von 2013/14 bis 2017/18. Bei der Erfassung der Winterverluste 2017/18 konnten signifikant höhere Verluste bei der Angabe von „Häufiger“ (17,01%, Konfidenzintervall: 14,33-20,08%) im Vergleich zu „Normal“ (10,45%, Konfidenzintervall: 9,51-11,48%) und „Seltener“ (11,15%, Konfidenzintervall: 9,84-12,83%) festgestellt werden (Abbildung 1.36).

Tabelle 1.8: Häufigkeit der Königinnen-Probleme im Vergleich zum Vorjahr. Vergleich mehrerer Winter, Angaben in Prozent. n=Anzahl der Betriebe.

Königinnen-Probleme [%]	2013/14 (n=953)	2014/15 (n=1166)	2015/16 (n=1206)	2016/17 (n=1570)	2017/18 (n=1096)
Häufiger	8,0	16,6	5,2	10,2	6,6
Normal	48,1	44,0	40,7	47,4	48,4
Seltener	22,2	15,5	33,1	25,2	30,3
Weiß nicht	21,7	23,9	21,0	17,3	14,8

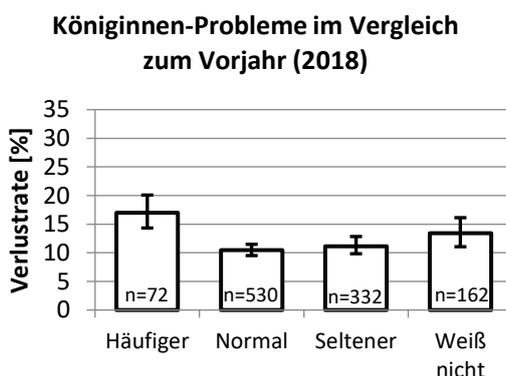


Abbildung 1.36: Höhe der Winterverluste 2017/18 im Zusammenhang mit den beobachteten Königinnen-Problemen in Prozent ($\pm 95\%$ CI). Imkereien die „häufiger“ Königinnenprobleme berichteten, hatten höhere Winterverluste als solche die Königinnenprobleme als „normal“ oder „seltener“ bewertet haben.

1.4.6.6.11 Im Einwinterungsjahr begattete Königin („junge Königin“)

Die ImkerInnen wurden über ihre Beobachtungen zu den Überlebenschancen von Völkern mit einer jungen, das heißt im Jahr 2017 begatteten Königin, im Vergleich zu Völkern mit einer älteren Königin befragt.

Hinsichtlich der Verlustraten konnten keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom Zusetzen einer jungen Königin gefunden werden (Abbildung 1.37). Die Verlustraten lagen bei Völkern mit jungen Wirtschaftsköniginnen bei 11,79% (Konfidenzintervall: 11,07-12,54%) und bei Völkern mit ein- bis mehrjährigen Königinnen bei 13,11% (Konfidenzintervall: 8,19-20,32%).

Überleben mit junger Königin 2018

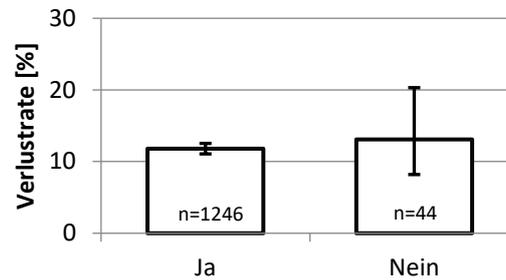


Abbildung 1.37: Höhe der Winterverluste 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit vom Alter der Königin. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

1.4.6.6.12 Verkrüppelte Flügel

In der Erhebung 2017/18 wurde nach dem Auftreten von Arbeitsbienen mit verkrüppelten Flügeln während der Sammelsaison 2017 gefragt. Nur 1,2% der Imkereien beobachteten diese häufig. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Verlustrate und der Häufigkeit des Auftretens festgestellt werden.

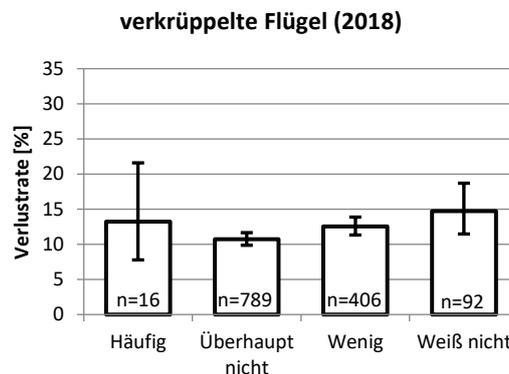


Abbildung 1.37: Höhe der Winterverluste 2017/18 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit vom Auftreten verkrüppelter Flügel bei Arbeiterinnen. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

1.4.6.6.13 Betriebsweise 2017/18

Seit 2016/17 werden die ImkerInnen, auch auf eigenen Wunsch, zu weiteren Details ihrer Betriebsweise befragt. Dabei konnten Angaben zu den Beuten gemacht und festgestellt werden, ob der Betrieb eine zertifizierte Bio-Imkerei ist, auf Varroa-Toleranz züchtet oder Wachs zukaufte. Über die Hälfte der TeilnehmerInnen haben angegeben, im Winter einen offenen Gitterboden in ihren Beuten zu haben oder Wachs von außerhalb des Betriebes zuzukaufen. Wie auch in der vorjährigen Befragung gab nur ein kleiner Anteil an Betrieben (7,2%) an, Naturwabenbau ohne Mittelwand zu verwenden. Als per Gütesiegel zertifizierte Bio-Imkerei nahmen 136 Betriebe an der Befragung teil. Einen Überblick über die Häufigkeit der verschiedenen Betriebsweisen (Angaben „Ja“, „Nein“ und „Unsicher“) bietet die Abbildung 1.39. Abbildung 1.40 zeigt den Einfluss der verschiedenen Betriebsweisen auf die Winterverlustrate. Kleine Brutzellen ($\leq 5,1\text{mm}$) stehen wie im Vorjahr im Zusammenhang mit einer höheren Verlustrate (13,76%, Konfidenzintervall: 10,95-

17,14%), allerdings war dieser Unterschied im Gegensatz zum Vorjahr nicht statistisch signifikant. Es konnte daher also für den Winter 2017/18 von den untersuchten Betriebsweisen keine sich statistisch eindeutig positiv oder negativ auswirkende identifiziert werden.

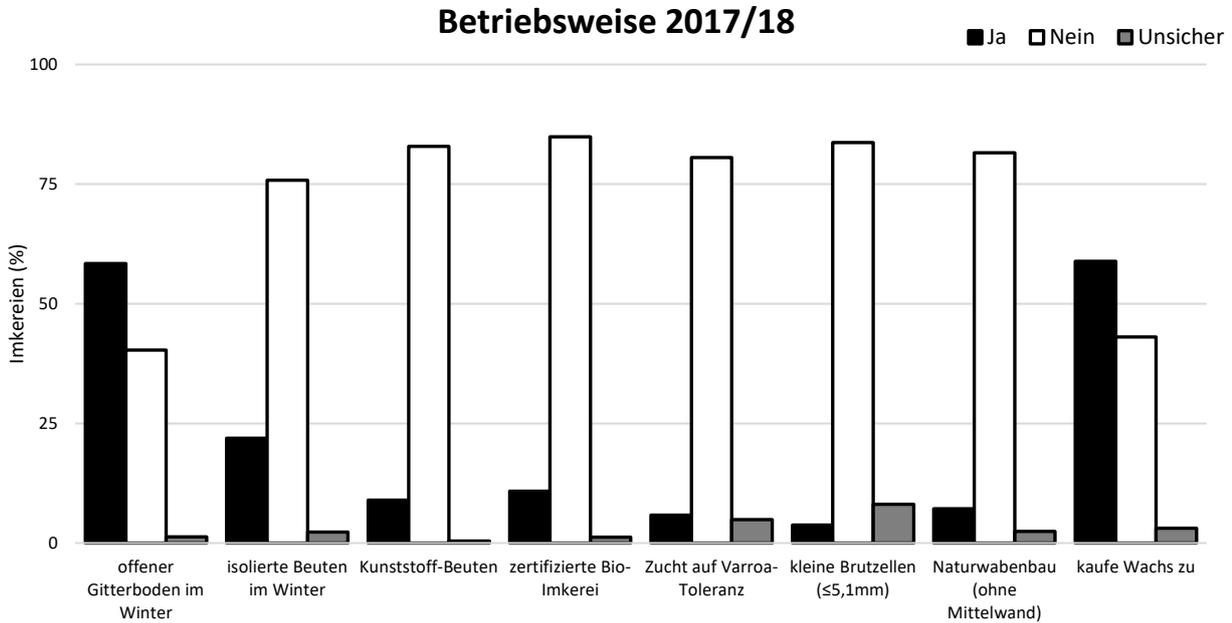


Abbildung 1.39: Häufigkeit der Betriebsweisen 2017/18 in Prozent.

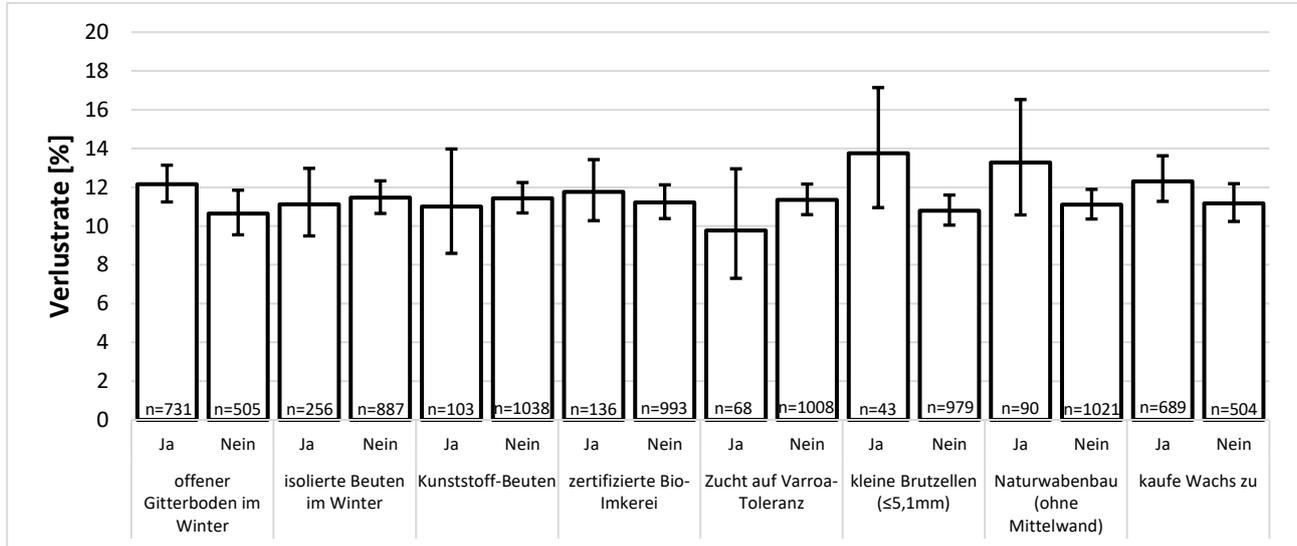


Abbildung 1.40: Höhe der Winterverluste 2017/18 in Prozent (±95%CI) in Abhängigkeit von der Betriebsweise der TeilnehmerInnen.

1.5 Diskussion

Seit 2008 wird die Untersuchung der Winterverluste von Bienenvölkern vom Institut für Biologie (vormals: Zoologie) der Universität Graz nun durchgeführt, wobei dieser Bericht die Ergebnisse der Untersuchung betreffend den Winter 2017/18 zusammenfasst, und teilweise mit denen der Vorjahre verglichen wird. Die dabei erhobene Verlustrate im Winter 2017/18 betrug 11,8% für Österreich, bei einer Beteiligung von 1391 Imkereien, die insgesamt Information über 28.373 eingewinterte Bienenvölker zur Verfügung gestellt haben. Die Verlustrate liegt, verglichen mit den bisherigen Ergebnissen, im unteren Bereich. Die bisher niedrigste in dieser Erhebung gemessene Verlustrate lag bei 8,1% (2015/16) und die bisher höchste gemessene Verlustrate bei 28,4% im Winter 2014/15. Diese großen Schwankungen in den Verlustraten, deren genaue Ursachen noch größtenteils unverstanden sind, machen die große Bedeutung eines Bienenmonitorings und der anschließenden Ursachenforschung deutlich. Eine internationale Vergleichbarkeit der erhobenen Daten wird durch die vom Forschungsnetzwerk COLOSS festgelegten Fragen ermöglicht (van der Zee et al., 2013; Brodschneider et al., 2016; Brodschneider et al., 2018a). Diese Art der Untersuchung ist nur eine Möglichkeit, den Ursachen hoher Winterverluste auf den Grund zu gehen, daher sollen die durch Umfragen erlangten Erkenntnisse zusätzlich durch gezielte Probenentnahmen ergänzt werden (van der Zee et al., 2015).

Die hier präsentierten Ergebnisse beruhen auf den Angaben der österreichischen ImkerInnen. Um eindeutige Antworten zu erhalten, wurde versucht die Fragen bewusst einfach zu gestalten. Um eine möglichst große Beteiligung der ImkerInnen zu erreichen, wurde sowohl online, in der Fachzeitschrift Bienen Aktuell, bei Veranstaltungen als auch über bereits bestehende Kontakte zu einer Teilnahme bei unserer Untersuchung aufgerufen. Diese über Jahre etablierten Kontakte helfen, eine nahezu vollständige Abdeckung der Rückmeldung von einzelnen Gemeinden oder Imkervereinen zu bekommen. Unsere Untersuchung 2018 deckte 5,0% der österreichischen Imkereien und 8,0% der Bienenvölker ab. Den Großteil der Antworten, annähernd 80%, haben wir online erhalten, wohingegen der Anteil derer, die den Fragebogen aus der Zeitschrift Bienen Aktuell retournieren über die Jahre immer geringer geworden ist, und 2018 bei 3,7% lag. Wir können die Ergebnisse unserer Untersuchung hinsichtlich des Erfassungsmodus als repräsentativ erachten: Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Verlustraten zwischen anonymer und nicht-anonymer Teilnahme festgestellt werden, auch hinsichtlich Online-Teilnahme versus Papierfragebogen-Teilnahme konnten keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Winterverluste festgestellt werden. 61,5% Teilnehmer haben 2018 freiwillig eine Kontaktmöglichkeit genannt, die zum einen von Vertrauen in die Untersuchung zeugt, uns aber auch die Möglichkeit gibt bei Unklarheiten nachzufragen.

Die durchschnittliche Völkeranzahl der an dieser Erhebung teilnehmenden Imkereien lag 2017/18 bei 20,4 eingewinterten Völkern. Zum im Vergleich zum österreichweit erwarteten etwas geringeren Mittelwert trägt die Teilnahme von 14 großen Imkereien mit jeweils über 150 eingewinterten Völkern bei. Der Median der eingewinterten Völkerzahlen liegt jedoch bei 10 eingewinterten Völkern, was der erwarteten österreichischen Imkerei-Demographie durchaus entspricht. Auch daraus folgern wir, dass die dieser Auswertung zugrundeliegenden Daten einer durchmischten und annähernd repräsentativen Gruppe der österreichischen Imkereien entstammen.

Die Winterverluste sind österreichweit nicht gleich verteilt, es sind Unterschiede in den Verlustraten der Bundesländer zu erkennen (siehe Abschnitt 1.4.3.2, Tabelle 1.4). Die Verluste reichen von 7,9% im Burgenland bis 14,5% in Kärnten. Damit liegen die höchsten Völkerverluste eines Bundeslandes im Winter 2017/18 unter den niedrigsten eines Bundeslandes im Winter 2016/17 (Brodschneider et al., 2018b). Die österreichweit Gesamtverlustrate 2017/18 ist mittel bis niedrig und spiegelt sich auch in den Bezirksergebnissen wider. So finden sich nur 5 Bezirke mit mehr als 5 teilnehmenden Imkereien, in denen Verluste von mehr als 20% zu verzeichnen waren: Sankt Johann im Pongau (S), Klagenfurt am Wörthersee (K), Gmünd (NÖ), Waidhofen an der Thaya

(NÖ) und Sankt Veit an der Glan (K). Im Gegensatz dazu betrug die Verlustrate in 32 Bezirken mit mehr als je 5 teilnehmenden Imkereien weniger als 10%. Die niedrigsten Verluste wurden mit 4,2% aus dem Bezirk Bludenz (V) von immerhin 29 Imkereien berichtet, einem Bezirk der im Vorjahr sehr hohe Verluste erlitten hat (Brodtschneider et al., 2018b).

Wir erhalten in dieser Untersuchung die bestmögliche Information über die Symptome der in Österreich verstorbenen Bienenvölker. Dadurch können die Ursachen für Winterverluste, wenn schon nicht klar einer einzelnen Ursache zugeordnet, so zumindest doch eingegrenzt werden. Der Symptomkatalog wurde dabei bewusst einfach gewählt, um den ImkerInnen eine eindeutige Zuordnung ohne Hilfsmittel wie Laboruntersuchungen zu erleichtern. Auch bei demselben Schadbild können noch immer unterschiedliche Gründe hinter dem Völkerverlust stecken. Außerdem gilt es zu berücksichtigen, dass zwischen dem Auftreten des Verlusts und der Symptombeschreibung durch ImkerInnen ein beträchtlicher Zeitraum liegen kann, in dem Spuren, wie tote Bienen vor dem Volk, verwischen und daher nicht mehr eindeutig zugeordnet werden können. Für im Winter 2017/18 verlorene Bienenvölker wurde am häufigsten angegeben, „keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk“ beobachtet zu haben. Dieses Symptom ist relativ unspezifisch, und kann unterschiedlichste Ursachen haben. Dieses Schadbild wurde auch als charakteristisch für CCD beschrieben und in den USA aber auch in Europa (Dainat et al., 2012a) in den letzten Jahren häufig beobachtet (VanEngelsdorp et al., 2009; Williams et al., 2010; Steinhauer et al., 2014). Auch in Österreich wird dieses Schadbild Jahr für Jahr am häufigsten berichtet (Brodtschneider et al., 2018b).

Eines der wenigen relativ eindeutig einer Ursache zuordenbaren Symptome ist das Vorhandensein von toten Bienen, die mit dem Kopf voran in Zellen stecken. Bei gleichzeitigem Mangel an Futter im Volk kann dieses Schadbild relativ sicher als Verhungern gedeutet werden. Dabei gilt es zwei unterschiedliche Formen zu unterscheiden: Zum einen der bereits erwähnte Futtermangel, zum anderen aber auch noch verbliebene Futterreserven, wobei die Bienen aus der Wintertraube durch widrige Umstände diese aber nicht erreicht haben. Dieser auch als Futterabriss bezeichnete Winterverlust trat 2017/18 häufiger auf als das Verhungern.

Unsere Untersuchung hat gezeigt, dass Winterverluste mit zunehmender Betriebsgröße abnehmen. Der Faktor Betriebsgröße ist dabei als Sammelfaktor zu verstehen, der unterschiedlichste, im Detail nicht näher abgefragte, Parameter wie Professionalität, Erfahrung in der Imkerei etc. beinhaltet. Wir konnten signifikante Unterschiede zwischen Imkereien, die ein bis 20 Völker und Imkereien, die mehr als 20 Völker betreuten, verzeichnen, es waren vor allem Betriebe mit weniger als 20 Völkern von erhöhten Winterverlusten betroffen. Dieses Ergebnis, als auch jene Resultate, die wir während der Projektlaufzeit von „Zukunft Biene“ (Brodtschneider et al., 2018b) gefunden haben, werden durch internationale Untersuchungen, die mehrere europäische Länder umfassen, bestätigt (van der Zee et al., 2014; Brodtschneider et al., 2016; Brodtschneider et al., 2018a). Auch in den USA sind in bestimmten, aber nicht allen Untersuchungsjahren bei steigender Betriebsgröße geringere Winterverluste festgestellt worden. Die an der Untersuchung teilnehmenden ImkerInnen wurden dort anhand der Anzahl ihrer Völker in drei Kategorien eingeteilt: „backyard beekeepers“ (<50 Völker), „sideline beekeepers“ (51-500 Völker) und „commercial beekeepers“ (>500 Völker). Als Ursache für die Unterschiede in den Verlustraten werden mehrere Faktoren diskutiert. Es wird zum Beispiel ein Einfluss der Betriebsgröße auf die Betreuungsqualität der Völker angenommen: „Commercial beekeepers“ zeigen oft mehr technisches Wissen in der Schädlingsbekämpfung – insbesondere bei der Bekämpfung der Varroamilbe – als „backyard beekeepers“, welche die Bienenhaltung nicht gewerbsmäßig betreiben (Lee et al., 2015). Auch die Wahl der Methode und die Qualität der verwendeten Bekämpfungsmaßnahmen könnte in Abhängigkeit von der Betriebsgröße eine andere sein. Diese Argumente lassen sich möglicherweise eingeschränkt auch auf die österreichischen Imkereien übertragen, auch wenn hier Betriebe mit über 500 Völkern die Ausnahme bilden.

Wir konnten für die Verluste 2017/18, wie schon in den Jahren zuvor, keinen Unterschied in den Verlustraten von Wander- und Standimkereien feststellen.

Die Annahme, dass eine Erneuerung des Wabenmaterials zu geringeren Winterverlusten führe, wurde für den Winter 2017/18 nicht bestätigt. Ansammlungen von Pestizidrückständen, wie auch von Krankheitserregern im Wachs, könnten die Überlebensrate von Bienenvölkern vermindern. Eine vollständige Rückstandsfreiheit des neuen Wabenmaterials kann in unserer Untersuchung mangels Überprüfung allerdings nicht als gegeben angenommen werden. Da auch keine negativen Auswirkungen auf die Überwinterung festgestellt werden konnten, spricht nichts gegen diese Maßnahme einer guten imkerlichen Praxis.

Wie in den Vorjahren, wurden signifikant höhere Winterverluste in Zusammenhang mit Mais als Trachtpflanze berichtet. Die Ursachen dafür sind nicht näher bekannt, diskutiert wird der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln und einseitige Ernährung (Brodtschneider & Crailsheim, 2013), es kommen aber auch andere, bisher nicht näher identifizierte Faktoren in Frage. Rundlöf et al. (2015) zeigen in ihrer Studie aus Schweden negative Effekte von mit Pestiziden behandelten Kulturen auf Wildbienen (solitäre Bienen, Hummeln), die Untersuchung konnte aber keinen signifikanten Einfluss auf die Überwinterung von Honigbienenvölkern nachweisen. Dieser wurde von Woodcock et al. (2017) in einer groß angelegten Feldstudie teilweise erbracht. Als weitere Ursache für hohe Winterverluste im Zusammenhang mit Trachtpflanzen wird eine einseitige Ernährung durch mangelndes Trachtangebot, welches durch Monokulturen zustande kommt, angenommen (Brodtschneider & Crailsheim, 2013). Aus epidemiologischer Sicht können wir also einen signifikanten Zusammenhang mit bestimmten vorhandenen Trachtquellen festhalten, wobei diese Trachtquellen auch stellvertretend für andere (nicht abgefragte oder bisher unbekannt) abträgliche Standortverhältnisse stehen können. Es können keine kausalen Gründe für die erhöhten Verluste beim Vorhandensein bestimmter Trachtpflanzen genannt werden, diese Trachtpflanzen können aber als Indikator von für Bienenvölker nicht idealen Standorten gesehen werden, wie auch in der Untersuchung zum Einfluß der Landnutzung auf die Wintersterblichkeit des Vorläuferprojekts diskutiert wird (Kuchling et al., 2018). 2018 haben wir, in Anlehnung an COLOSS, neue Trachten in den Katalog aufgenommen, die zwar immer wieder als Einflußfaktoren diskutiert werden, die aber noch nicht empirisch untersucht wurden. Dazu zählen die Waldtracht, Waldtracht mit Melezitose (sogenannter Zementhonig) und spätblühende Zwischenfrüchte. Im untersuchten Winter konnte keine dieser Trachten als signifikanter Risikofaktor identifiziert werden, da aber zum Beispiel Melezitose von den Witterungsbedingungen abhängig ist, werden wir diese Fragestellungen in den nächsten Jahren beibehalten.

Für die Seehöhe konnte im Winter 2017/18 erstmals kein statistisch signifikanter Einfluß festgestellt werden. Dies könnte an den generell geringen Verlusten, besonderen Wetterbedingungen oder unbekanntem Gründen liegen.

Auch die erst das zweite Mal untersuchten unterschiedlichen Betriebsweisen, im Vorwinter mit deutlich höheren Verlusten noch in einigen Punkten statistisch aussagekräftig (zum Beispiel, Bio-Imkerei, kleine Brutzellen, Beutenisolierung) zeigten in diesem Winter 2017/18 keine signifikanten Unterschiede.

Im Kampf gegen hohe Winterverluste spielt die Behandlung der Völker gegen die Varroamilbe eine wichtige, wenn nicht sogar die zentrale Rolle. Der Parasit hat einen großen Einfluss auf den Überwinterungserfolg von Bienenvölkern (Dahle, 2010), insbesondere auch dadurch, dass die Milbe als Vektor für andere Pathogene, wie Viren, dient (Rosenkranz et al., 2010). Deshalb waren die Häufigkeit und der Zeitpunkt der Behandlungsmethoden wichtiger Bestandteil unserer Untersuchungen.

Der vorherrschenden Lehrmeinung folgend, wenden 78,6% aller österreichischen Imkereien sowohl Ameisensäure als auch Oxalsäure zur Bekämpfung der Varroamilbe an. Die Nicht-

anwendung sowohl der einen als auch der anderen Säure führte jedoch zu keinen signifikant unterschiedlichen Überwinterungsergebnissen. Wir schließen daher, dass auch die angewandten Alternativen (zum Beispiel Thymolprodukte anstelle der Ameisensäure) fachgerecht angewandt ähnlich gut zur erfolgreichen Überwinterung verwendet werden können. Betriebsweisen, die auf Ameisensäure verzichten, und zum Beispiel mit biotechnischen Methoden und Oxalsäure die Hauptentmilbung durchführen, erleiden keine signifikant höheren Winterverluste. In zwei vergangenen Wintern mit sehr hohen Winterverlusten erwiesen sich solche biotechnischen Methoden sogar als besser (Brodschneider et al., 2018b).

An dieser Stelle sei auf die oftmalige Verwendung mehrerer unterschiedlicher Bekämpfungsmaßnahmen in Kombination hingewiesen. Es war nicht das Ziel dieser Untersuchung, den Überwinterungserfolg von Betrieben mit einer ausschließlichen Varroabekämpfungsstrategie mit Betrieben die ausschließlich eine andere Strategie verfolgen zu vergleichen. Vielmehr haben wir die in Österreich tatsächlich angewandten Strategien dargestellt und diese auf die daraus erfolgte Überwinterung hin untersucht. Zusammenfassend lässt sich für den Winter 2017/18 feststellen, dass keine besonders erfolgreiche oder erfolglose Strategie in der Varroabekämpfung identifiziert werden konnte, was vermuten lässt, dass die Varroamilbe in diesem Jahr eine mäßige Gefahr dargestellt hat.

Die Art und Weise der Winterbehandlung mit Oxalsäure hat keinen Einfluss auf die Sterblichkeit im aktuellen Winter. Unsere Untersuchung hat gezeigt, dass ein Großteil der teilnehmenden ImkerInnen eine Form der Oxalsäurebehandlung im Winter zur Bekämpfung der Varroamilbe eingesetzt haben. Dabei kann die Oxalsäure verdampft, geträufelt, gesprüht oder als Fertigmischung (Hive-clean/Bienenwohl/Varromed) eingesetzt werden. Bei Betrachtung von Art und Zeitpunkt (Winterbehandlung im November oder Dezember) der Oxalsäurebehandlung zeigen sich keine Unterschiede in den Verlustaten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Oxalsäurebehandlung fast flächendeckend stattfand und dadurch fast immer eine solche Behandlung angewandt wurde. Es gibt also keine verlässliche Kontrollgruppe von Imkereien, die nicht mit Oxalsäure arbeitet. Das unterstreicht die Bedeutung der Oxalsäure und die Alternativlosigkeit in der Winterbehandlung. Außerdem wirken Behandlungen mit Oxalsäure auf die an Bienen ansitzenden Varroamilben, und damit ausschließlich bei Brutfreiheit der Völker (Rosenkranz et al., 2010). Über das tatsächliche Vorherrschen von Brutfreiheit bei Anwendung der Oxalsäure kann im Rahmen dieser Untersuchung keine Aussage getroffen werden. Die Behandlung mit Oxalsäure zielt dabei auf eine Reduktion der Milbenpopulation im Folgejahr ab.

Die Bestimmung des Varroabefalls der Völker mit einer Methode wurde nach Angaben der Imker von 94,2% durchgeführt. Wir konnten keinen signifikanten Unterschied im Überwinterungserfolg zwischen den Imkereien die dies taten, und den Imkereien die dies nicht taten feststellen. Hierzu sei angemerkt, dass als Methode auch der natürliche (Tot-)Milbenfall im Gemüll gewertet wurde, der tatsächlich sehr häufig angewandt wird, aber methodisch doch recht ungenau ist.

Ein weiterer wichtiger Faktor im Überleben von Bienenvölkern ist die Vitalität der Königin. Eine internationale Untersuchung von van der Zee et al. (2014) dazu ergab, dass Imkereien, die angaben, mehr Königinnen-Probleme als im Vorjahr beobachtet zu haben, auch höhere Winterverluste hatten. Diese Beobachtung von häufigeren Königinnen-Problemen mit einer signifikant höheren Winterverlustrate deckt sich mit den hier vorliegenden Ergebnissen für den Winter 2017/18 in Österreich. Die Beurteilung der Königinnen durch die ImkerInnen fiel mit nur 6,6% Angaben „häufiger“ auftretender Königinnenprobleme, auch im Vergleich der letzten Jahre (Tab. 1.8), gut aus.

Bienenviren stehen im Fokus des Projektes „Zukunft Biene 2“. Wir haben deshalb nach einem Prädiktor gefragt, der mit dem Flügeldeformationsvirus in Zusammenhang steht (siehe Modul A). Das Auftreten von Arbeitsbienen mit verkrüppelten Flügeln wurde abgefragt. Zur Auswahl standen „Häufig“, „Wenig“, „Überhaupt nicht“ und „Weiß nicht“. Nur 16 Imkereien haben angegeben, solche

verkrüppelten Flügel während der Bienensaison 2017 „Häufig“ beobachtet zu haben. Dementsprechend konnten keine signifikanten Ergebnisse dieses Prädiktors auf die Wintersterblichkeit gefunden werden. Die Frage wird aber in Hinblick auf die Untersuchung im Modul A für die nächsten Jahre beibehalten.

Wir haben aus den Winterverlusten und dem Völkerstand im Frühjahr davor eine hypothetische Populationsdynamik der Bienenvölker vom Frühjahr 2013 bis zum Frühjahr 2018 modelliert (siehe Abschnitt 1.4.3.1.1., Abbildung 1.6). Dabei zeigt sich, dass eine Vermehrung über den Sommer, etwa durch eigene Nachschaffung oder Zukäufe, eine konstante, sogar steigende, Bienenpopulation in Österreich erlaubt. In Jahren mit geringen Völkerverlusten, wie etwa im Winter 2015/16, aber auch im hier vorliegenden Untersuchungswinter 2017/18, sind die ImkerInnen in der Lage, diese Verluste im Sommer auszugleichen und eine größere Anzahl an Bienenvölkern im folgenden Herbst einzuwintern. Unser Modell ist aber nur begrenzt gültig – je nach Höhe der Winterverluste sind von den ImkerInnen dementsprechend Zeit und Geld zu investieren, um eine Population vergleichbar mit dem Vorjahr aufzubauen beziehungsweise zu erhalten. Die Arbeit und Kosten für die Nachschaffung werden dabei vorwiegend von Kleinimkereien, welche den Großteil der Bienenpopulation in Österreich betreuen, getragen. Ökonomische Abschätzungen dieser Leistungen zum Erhalt einer starken Bienenpopulation sollten für eine nachhaltige Entwicklung des Imkereisektors berücksichtigt werden.

Die Winterverlustrate ist nicht nur von einzelnen Betriebsweisen oder Methoden der Varroabekämpfung abhängig, sondern von vielen Entscheidungen, die im Laufe eines Bienenjahres von den ImkerInnen getroffen werden. Im Winter 2017/18 konnte mit 11,8% eine Winterverlustrate erfasst werden die mittel bis niedrig ist. Diese führt auch dazu, dass in der Risikoanalyse kaum signifikante Unterschiede in den Überwinterungsraten unterschiedlicher Betriebsweisen oder Varroabekämpfungsstrategien gefunden werden. Lediglich die aus mehreren vorangegangenen Untersuchungen (Brodschneider et al., 2018b) schon bekannten negativen Effekte wie im Vergleich zum Vorjahr häufiger auftretende Königinnenprobleme während der Saison, das Vorkommen der Trachtpflanze Mais, sowie die Betriebsgröße konnten als die Winterverluste signifikant steigernde Faktoren identifiziert werden. Dieser Mangel an statistisch belegbaren Unterschieden liegt unter anderem an der generell guten Überwinterung über weite Teile Österreichs, und quer über verschiedene Betriebsweisen. Es sei an dieser Stelle auf die höhere statistische Trennschärfe in Wintern mit hohen Winterverlusten verwiesen (Brodschneider et al., 2018b).

Weiterhin nicht vollständig geklärt bleibt die Frage, warum in manchen Jahren sehr viele und in anderen Jahren sehr wenige Bienenvölker den Winter nicht überleben. In Ansätzen scheinen betriebsweisenunabhängige Faktoren wie das Wetter (Switanek et al., 2017) oder, eingeschränkt, weil weniger stark schwankend, die Landnutzung (Kuchling et al., 2018) für diesen Effekt verantwortlich zu sein. Die Belastung der Bienenvölker variiert von Jahr zu Jahr, und in manchen Jahren ist es schwieriger, die Völker erfolgreich zu überwintern als in anderen Jahren. Gerade aus Wintern mit hohen Verlusten können wir also wissenschaftlich belegte Empfehlungen über Anpassungen der Betriebsweise (inklusive Varroabekämpfungsstrategie) ablesen, wohingegen uns ein Winter mit geringen Verlusten wenig Gelegenheit bietet, die Spreu vom Weizen der Betriebsweisen zu trennen. Ein weiteres Argument bei der Interpretation stark schwankender Verlusten ist der mögliche Einfluss von betrieblich bis überregional auftretenden Mehrjahresdynamiken, der noch weiterer Untersuchungen bedarf.

(A) Virenmonitoring

2.1 Einleitung

Bienenviren gelten gemeinsam mit der Varroamilbe (*Varroa destructor*) als wichtige Faktoren für das Absterben von Bienenvölkern über den Winter (=Winterverluste; Carreck et al., 2010; Genersch et al., 2010; Dainat et al., 2012b). Vor allem die Viren ABPV (Akute Bienenparalyse-Virus), DWV (Flügeldeformationsvirus) und IAPV (Israelisches Akute Paralyse-Virus) stehen im Verdacht, Winterverluste zu verursachen (Cox-Foster et al., 2007; Berthoud et al., 2010; Genersch et al., 2010). Schwere Infektionen mit ABPV oder DWV gehen meist mit einem schweren Befall mit der Varroamilbe einher. Diese fungiert als Vektor und überträgt die Viren auf Bienen und Bienenbrut (Bowen-Walker et al., 1999; Chen et al., 2004). Dadurch werden die Bienen doppelt geschädigt; sowohl direkt durch die Saugtätigkeit und den Nährstoffentzug durch die Milbe und ihre Nachkommen als auch durch die Funktion als Virusvektor (Amdam et al., 2004; Highfield et al., 2009). Auch während des Jahres können Virusinfektionen zu Ausfällen und Schwächungen von Bienenvölkern führen. In diesem Zusammenhang sind vor allem CBPV (Chronische Bienenparalyse-Virus), BQCV (Schwarzes Königinnenzellen-Virus) oder SBV (Sackbrutvirus) zu nennen (Chen & Siede, 2007; Ribière et al., 2010; Roy et al., 2015).

Zahlreiche internationale Studien zeigen, dass es bezüglich der Prävalenz von Bienenviren zwischen den Regionen und den Erhebungsjahren beträchtliche Unterschiede gibt (Tentcheva et al., 2004; Genersch et al., 2010; Traynor et al., 2016). Es sind daher entsprechende eigene Untersuchungen erforderlich, um Informationen zur Situation in Österreich zu erhalten.

Trotz der Bedeutung der Bienenviren für die Bienengesundheit ist über das Vorkommen von Viren in Österreichs Bienenvölkern bisher nur begrenztes Wissen vorhanden. Dieses stammt aus Vorläuferprojekten; meist von Bienen- und Brutproben aus abgestorbenen, kranken und zusammenbrechenden Völkern und von Völkern mit Vergiftungssymptomen (Berényi et al., 2006; Köglberger et al., 2009; Girsch & Moosbeckhofer, 2012; Moosbeckhofer & Mayr, 2014). In toten, geschwächten und erkrankten Völkern ist jedoch mit einem anderen Virenspektrum zu rechnen als in gesunden Völkern (Amiri et al., 2015; Morawetz et al., 2018). Die Ergebnisse der Vorprojekte erlauben somit keine gesicherten Aussagen zur generellen Prävalenz der untersuchten Bienenviren in Österreich. Auch kann mit den vorhandenen Daten nicht unterschieden werden, welche Viren allgemein häufig in Bienenvölkern auftreten und welche tendenziell bei Völkern mit Problemen zu finden sind.

Im vorliegenden Projekt wird daher die Prävalenz von sieben Bienenviren in Österreich über mehrere Jahre erhoben (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV [Kashmir-Bienenvirus], SBV). Alle sieben Viren wurden bereits in österreichischen Bienenvölkern nachgewiesen (Berényi et al., 2006; Girsch & Moosbeckhofer, 2012; Köglberger et al., 2009, Morawetz et al., 2018), wobei IAPV und KBV nur in wenigen Einzelvölkern aufgetreten sind (Girsch & Moosbeckhofer, 2012).

Das Virenmonitoring im Projekt „Zukunft Biene 2“ soll folgende Fragen bezüglich der Virenprävalenz klären:

- Wie hoch ist die Prävalenz der sieben genannten Bienenviren in Österreich?
- Gibt es Schwankungen in der Virusprävalenz zwischen den drei Untersuchungsjahren?

Das sekundäre Ziel ist es, den möglichen Einfluss der in den Bienenvölkern nachgewiesenen Viren in Bezug auf Winterverluste zu untersuchen. Dabei können mit dem zu erwartenden Datensatz folgende Fragen behandelt werden:

- Gibt es eine Korrelation zwischen dem Auftreten von einzelnen Bienenviren vor der Einwinterung und den Winterverlusten der Probenvölker/des Probenstandes im darauffolgenden Winter?
- Gibt es eine Korrelation zwischen der Höhe des Virustiters der unterschiedlichen Bienenviren vor der Einwinterung und den Winterverlusten der Probenvölker/des beprobten Bienenstandes im darauffolgenden Winter?

Die zu erwartenden Gesamtergebnisse werden es möglich machen abzuschätzen, welche der untersuchten Bienenviren für die Bienengesundheit – und damit für den Bienenbestand und die Imkereiwirtschaft in Österreich – von hoher Relevanz sind. Gleichzeitig werden Viren identifiziert, die im Untersuchungszeitraum einen negativen Einfluss auf die Überwinterung der Bienenvölker haben.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Zeitablauf

Im Modul A – „Virenmonitoring“ wird die Prävalenz von sieben Bienenviren im September in drei aufeinander folgenden Jahren erhoben (2018-2020). Der September wurde als Beprobungsmonat gewählt, weil die meisten Viren zu dem Zeitpunkt die höchste Prävalenz aufweisen (De Miranda et al., 2013). Die dreijährige Laufzeit erlaubt es, die Prävalenz der Viren zwischen den Jahren zu vergleichen.

Vor Beginn des ersten Versuchsjahres wurden interessierte ImkerInnen für eine Teilnahme gewonnen (Februar - Mai 2018, Kapitel 2.2.2). Aus diesen wurden mittels einer stratifizierten Zufallsauswahl die 200 TeilnehmerInnen für die Studie ausgesucht und ihre Teilnahme fixiert (Abbildung 2.1, Kapitel 2.2.3). Es ist geplant, dass diese über den gesamten Zeitraum an dem Projekt teilnehmen. Eventuelle Ausfälle werden im Frühsommer des jeweiligen Jahres durch InteressentInnen von der Warteliste ersetzt.

Das Virenmonitoring wird in allen drei Jahren ident ablaufen (Abbildung 2.1). Ende August werden die Materialien zur Durchführung der Probenahme von der Abteilung Bienenkunde und Bienen-schutz (BIEN) an die TeilnehmerInnen verschickt. Dieser Arbeitsschritt ist für das erste Versuchsjahr 2018 schon abgeschlossen. In den ersten Septemberwochen werden die TeilnehmerInnen die Probenahme gemäß der beigelegten Arbeitsanleitung durchführen (siehe Kapitel 2.2.4) und die Bienen danach lebend in Königinnenversandkäfigen an die Abteilung BIEN verschicken. Sofort nach Eintreffen werden die Proben bei -20°C tiefgekühlt und gelagert. Im Verlauf des nächsten Monats werden die Proben dann für die Virusanalytik vorbereitet.

Die Probenanalyse auf die sieben zu untersuchenden Bienenviren wird von der AGES, Abteilung Molekularbiologie (MOBI) des Instituts für veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling (IVet-Mödling), mittels quantitativer real-time RT-PCR im jeweils darauffolgenden Winter durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5). Die TeilnehmerInnen werden jedes Jahr voraussichtlich im auf die Probenahme folgenden Februar über die Ergebnisse der Virusanalyse informiert. Im darauffolgenden Frühling werden die teilnehmenden ImkerInnen die Überwinterungsergebnisse der Probenvölker sowie des gesamten Probenstandes an die Abteilung BIEN rückmelden. Dies wird es erlauben, mögliche Zusammenhänge zwischen der Virusprävalenz / der Höhe der Virusbelastung und Winterausfällen festzustellen.

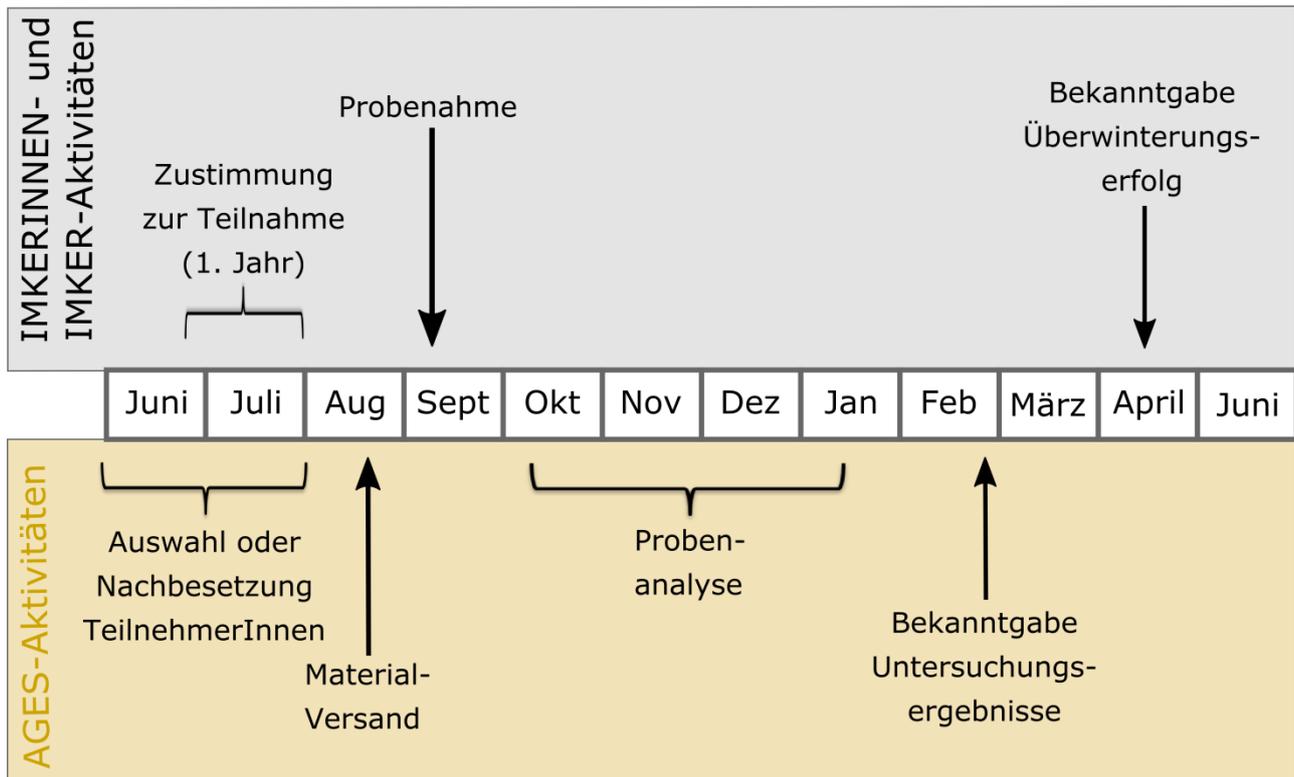


Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf des Virenmonitorings pro Versuchsjahr.

2.2.2 Werbung der TeilnehmerInnen

Eine Stichprobe sollte repräsentativ für die Grundgesamtheit sein, damit ihre Ergebnisse deren Eigenschaften wahrheitsgemäß wiedergeben. Eine repräsentative Stichprobe lässt sich unter anderem dadurch erstellen, dass die Elemente der Stichprobe zufällig aus der Grundgesamtheit ausgewählt werden (van der Zee et al., 2013). Dies hieße im Falle des Virenmonitorings, dass die teilnehmenden Bienenstände zufällig aus einer Liste aller in Österreich vorhandenen Bienenstände gezogen werden. Ein solches Bienenstandregister liegt in Österreich seit dem Jahr 2017 im Rahmen des Veterinärinformationssystems (VIS) vor. Diese VIS-Aufzeichnungen dürfen jedoch ausschließlich zum Zwecke der Überwachung und Bekämpfung von Tierseuchen und der Überwachung der Lebensmittelsicherheit verwendet werden (TSG § 8 Abs. 6). Daher war es nicht möglich, diese Daten zur Auswahl der TeilnehmerInnen des Virenmonitorings heranzuziehen und es wurde stattdessen in der Imkerschaft für die Teilnahme am „Virenmonitoring“ geworben.



Abbildung 2.2: Beispiele für die Werbung für das Virenmonitoring auf Facebook und Twitter.

Bei der Teilnehmerwerbung wurde eine Vielzahl an Informationskanälen verwendet, um eine möglichst breite Auswahl an ImkerInnen zu erreichen und einen systematischen Auswahlfehler zu vermeiden. Wir informierten die ImkerInnen über die Möglichkeit zur Teilnahme sowohl über die Verbandstrukturen (Werbung auf Jahreshauptversammlungen, E-Mail-Aufruf an die Landesverbände, etc.) und die österreichische Imkerzeitschrift „Bienen aktuell“ als auch über alternative Kanäle wie den AGES Facebook- und Twitter-Account (Tabelle 2.1, Abbildung 2.2). Außerdem wurden TeilnehmerInnen aus der Beobachtungsstudie und der COLOSS-Studie von Zukunft Biene, die einer weiteren Kontaktaufnahme zugestimmt hatten, gezielt angeschrieben. Die Anmeldung zur Teilnahme erfolgte sowohl über ein Online-Formular als auch per Papierformular, das in „Bienen aktuell“ abgedruckt war, sowie auf Imkerveranstaltungen ausgelegt wurde.

Tabelle 2.1: Werbemaßnahmen zur TeilnehmerInnenwerbung für das Virenmonitoring im Zeitraum Februar bis Mai 2018.

Art der Werbung	Datum	Maßnahme
Internet	Februar 2018	Aufruf auf „www.zukunft-biene.at“
	Februar 2018	Aufruf auf „www.imkerbund.at“
	Februar 2018	Aufruf auf „www.biene-oesterreich.at“
Artikel	Mai 2018	Facebook und Twitter Kampagne (6 Postings)
	März 2018	Artikel in „Bienen aktuell“
Vortrag/Werbung auf Imkereitagenen	Mai 2018	Erinnerung in „Bienen aktuell“
	27.Jänner 2018	Jahreshauptversammlung des Imkervereins Oberes Feistritztal - Waldheimat
	17.Februar 2018	Jahreshauptversammlung des Wiener Landesverbandes für Bienenzucht
	24. Februar 2018	Österreichische Erwerbsimkertagung
	24. März 2018	Jahreshauptversammlung des NÖ Landesverbandes für Bienenzucht
	21. April 2018	Bundesversammlung des österreichischen Imkerbundes
	25. April 2018	Gesundheitsreferententagung
Individuelle Email-Aufrufe	März, April 2018	E-Mail-Aufrufe an die Landesverbände mit der Bitte auf den Generalversammlungen für die Teilnahme zu werben (sofern nicht ohnehin ein „Zukunft Biene“ Vortrag auf der Versammlung stattfand)
	Februar 2018	91 TeilnehmerInnen der Beobachtungsstudie von „Zukunft Biene“, die einer weiteren Kontaktaufnahme zugestimmt haben
	29. März 2018	ca. 1500 ImkerInnen der COLOSS-Studie, die einer weiteren Kontaktaufnahme zugestimmt haben
	April, Mai 2018	Zweiter Email-Aufruf mit der Bitte um TeilnehmerInnen-Werbung an die Landesverbände der Bundesländer Kärnten, Salzburg, Oberösterreich, Vorarlberg aufgrund unterdurchschnittlicher Meldungsfrequenz in diesen Bundesländern

2.2.3 Stichprobengröße und Auswahl der TeilnehmerInnen

Als Stichprobe für das Virenmonitoring wurde die Anzahl von 200 Ständen gewählt. Bei einer Stichprobe dieser Höhe können wir davon ausgehen, dass die Prävalenz eines Virusaufkommens innerhalb eines 95%igen Konfidenzintervalls von $\pm 7\%$ angegeben werden kann (Abbildung 2.3). Dies heißt, dass Prävalenzunterschiede von 14% zwischen den Versuchsjahren bei einer Stichprobengröße von 200 als signifikant erkannt werden können. Um die Sensitivität des Monitorings auf 5% zu senken (Unterschiede von 10% Krankheitsprävalenz), müsste die Stichprobengröße auf fast das Doppelte erhöht werden (Abbildung 2.3) und wäre daher mit einem unverhältnismäßigen Aufwand an Kosten verbunden. Im vorliegenden Monitoring wird pro Stand eine Sammelprobe von fünf Völkern ausgewertet. Das erhöht die Wahrscheinlichkeit des Nachweises einer Krankheit, da nur eines von fünf Völkern infiziert sein muss, um ein positives Ergebnis zu erhalten. Es ist daher zu erwarten, dass auf Standniveau tendenziell höhere Prävalenzen auftreten werden.

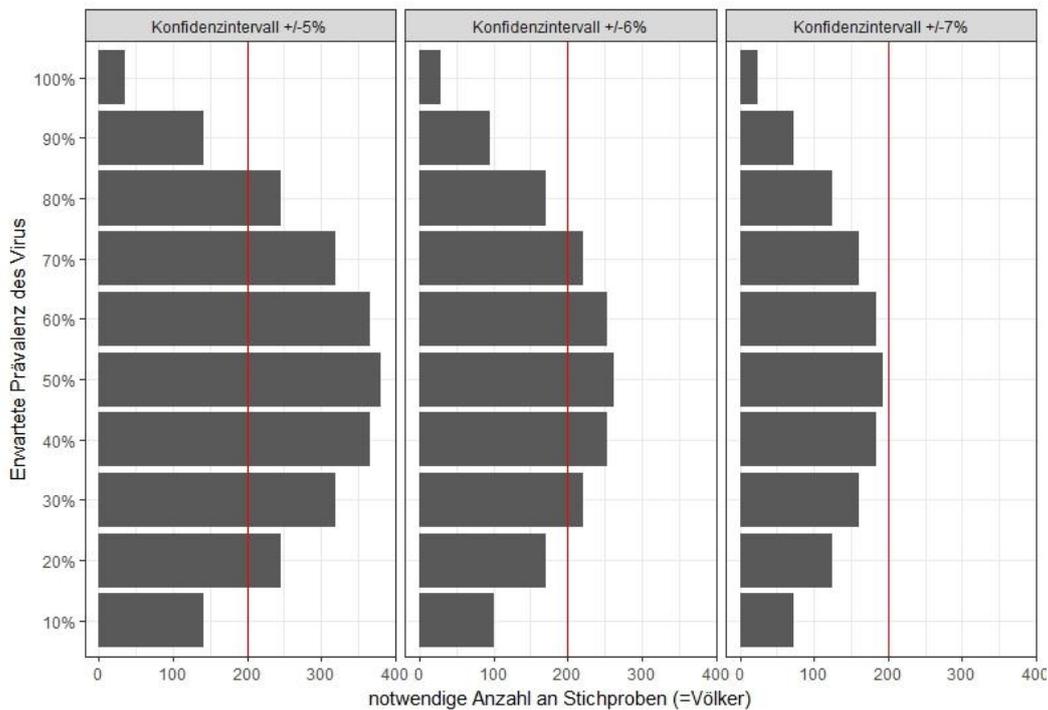


Abbildung 2.3: Berechnung der notwendigen Stichprobengröße, um bei einer binomialen Verteilung der unterschiedlichen zu erwartenden Prävalenzen ein 95%iges Konfidenzintervall von $\pm 5\%$, $\pm 6\%$ und $\pm 7\%$ zu erreichen. Basis der Berechnung ist das Wilson-Konfidenzintervall, Berechnung durchgeführt in R mit der Version 3.4.1 (R Development Core Team, 2017) mit dem package „binomSamSize“ (Höhle, 2017). Die gewählte Stichprobengröße von 200 ist als rote Linie eingezeichnet.

Vor Durchführung der Auswahl wurde der InteressentInnen-Datensatz von Mehrfachmeldungen bereinigt (insgesamt 297 InteressentInnen meldeten 339 Standorte). Dies gewährleistete, dass ImkerInnen mit Einfachmeldungen eine gleich große Chance hatten ausgewählt zu werden, wie jene, die mit mehreren Standorten im Datensatz vertreten waren. Die Auswahl der Teilnehmer erfolgte nach einer stratifizierten Zufallsauswahl. Die Stratifizierung betraf die geografische Verteilung der ausgewählten Bienenstände über Österreich. Das heißt jedes Bundesland war anteilig in dem Ausmaß vertreten, der dem Anteil der im VIS gemeldeten Bienenstände des Bundeslandes an der Gesamtanzahl der österreichischen Bienenstände entsprach (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: VIS-Angaben zur Verteilung der Bienenstände und Imkereibetriebe über die österreichischen Bundesländer (auf Anfrage vom BMASGK übermittelt, Stichtag: 31.10.2017) sowie Angaben zur Anzahl der Meldungen und bestätigten TeilnehmerInnen des Virenmonitorings. Für die Berechnungen anhand der VIS-Daten wurde nur auf Imkereibetriebe und Bienenstände zurückgegriffen, die mit mindestens einem Volk im VIS registriert waren.

Bundesländer	VIS Angaben		Monitoring 2018 Auswahl	
	Verteilung Imkereibetriebe	Verteilung Bienenstände	Anzahl Meldungen von InteressentInnen	Anzahl (Verteilung) teilnehmende Bienenstände
Burgenland	3%	3%	13	6 (3%)
Kärnten	12%	11%	38	23 (11%)
Niederösterreich	17%	20%	64	40 (20%)
Oberösterreich	25%	22%	60	43 (22%)
Salzburg	9%	7%	21	14 (7%)
Steiermark	15%	18%	37	36 (18%)
Tirol	12%	10%	30	21 (10%)
Vorarlberg	5%	6%	16	11 (6%)
Wien	2%	3%	18	6 (3%)
Gesamt	100%	100%	297	200 (100%)

2.2.4 Geplante Durchführung der Probenahme

Die Probenahme wird jeweils im September der drei Versuchsjahre von den ImkerInnen selber durchgeführt (Abbildung 2.4, Kapitel 2.4). Dafür werden sie von der Abteilung BIEN per Post mit allen notwendigen Materialien zur Durchführung ausgestattet (eine ausführliche bebilderte Arbeitsanleitung, Fragebogen, Plastiketiketten, Königinnenkäfige samt Futterteig, frankiertes Rücksendekuvert). Die Arbeitsanleitung zur Probenahme ist im Anhang (Kapitel 2.4) zu finden.

Im ersten Versuchsjahr wählen die ImkerInnen die fünf Versuchsvölker nach einem vorgegebenen Schema aus und markieren sie mit Plastiketiketten. Sie werden angewiesen, diese Etiketten die ganze Versuchsdauer an den jeweiligen Völkern zu belassen, um die Völker zweifelsfrei während der gesamten Studiendauer identifizieren zu können. Sollte im Laufe der drei Studienjahre ein Volk ausfallen, wird es durch ein anderes Volk des Bienenstandes ersetzt.

Die Bienenproben werden aus jener Zarge entnommen, in der sich die Brut befindet oder in der Zarge des Bienensitzes, falls keine Brut vorhanden ist. Sie wird auf jener brutfreien Wabe genommen werden, die an die äußerste Brutwabe anschließt (Abbildung 2.4a). Falls keine Brut vorhanden ist, wird die Probe von einer äußeren Wabe des Bienensitzes genommen. Pro Probenvolk wird ein Königinnenversandkäfig mit zehn Bienen gefüllt (Abbildung 2.4b). Als optionale Zusatzaufgabe bitten wir die ImkerInnen ihre Völker auf fünf Krankheitssymptome durchzusehen, die mit Virenbefall in Verbindung stehen können (erhöhter Bientotenfall vor dem Volk, Varroamilben auf Bienen, Bienen mit verkrüppelten Flügeln, schwarz glänzende Bienen, Sackbrutsymptome in der Brut). Diese Aufgaben sind optional, da zur Durchführung die bienenbesetzten Waben des gesamten Bienenvolks überprüft werden müssen, was sehr zeitaufwendig ist.



Abbildung 2.4a-c: Ablauf der Probenahme. Die teilnehmenden ImkerInnen (a) identifizieren die Wabe zur Probenahme (hier: Wabe angrenzend an das Brutnest) und (b) füllen einen Königinnenversandkäfig mit zehn Bienen. (c) Käfig und Fragebogen werden in ein vorfrankiertes und adressiertes Kuvert gefüllt und schnellstmöglich an die AGES geschickt. Fotos aus der bebilderten Arbeitsanleitung (siehe auch Kapitel 2.4).

Nach der Probenahme werden die TeilnehmerInnen ersucht, den beigelegten, kurzen Fragebogen aus zehn Fragen zu beantworten. Dieser enthält allgemeine Fragen zu Imkerbetrieb und Bienenstand, sowie Fragen zu Hygienemaßnahmen und Volksgesundheit. Zusätzlich wird abgefragt, bei wie vielen der Probenvölker die definierten Krankheitssymptome beobachtet wurden (optional).

Die fünf gefüllten Königinnenversandkäfige werden gemeinsam mit dem ausgefüllten Fragebogen in das vorfrankierte Rücksendekuvert gegeben (Abbildung 2.4c). Das Kuvert ist entsprechend dem PRIO-Tarif der österreichischen Post für Päckchen frankiert, der einen raschen Versand mit Zustellung am nächsten Tag verspricht (Tarif ab 1.7.2018). Das Kuvert wird noch am selben oder am nächsten Tag bei der Post aufgegeben. Wir ersuchen die ImkerInnen, das Kuvert zwischen Montag und Mittwoch aufzugeben, um zu verhindern, dass der Bienenversand über das Wochenende abläuft und damit unnötig verlängert wird. Sofort nach Eintreffen der Kuverts in der AGES werden diese auf -20°C gekühlt und die Bienen somit schnell abgetötet.

2.2.5 Virusanalytik

Die Bienenproben werden an der AGES, Abteilung MOBI des Instituts für veterinärmedizinische Untersuchungen (Mödling), mittels quantitativer real-time RT-PCR auf sieben Bienenviren untersucht (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV, SBV). Für DWV wird bei der Analyse zwischen den beiden Typen DWV-A und DWV-B unterschieden.

Für die Analyse werden die Bienen aller fünf Bienenproben eines Standes zu einer Sammelprobe vereint. Dies hat den Vorteil, dass mittels einer einzigen Probe kostengünstig ein Überblick über die vorkommenden Viren und die Virusbelastung am Bienenstand möglich ist. Allerdings ist als Folge der Sammelprobenbildung eine statistische Prüfung auf mögliche Korrelationen mit Winterverlusten ausschließlich auf der Ebene der Sammelprobe und nicht auf der Ebene des Einzelvolks möglich.

2.2.5.1 Plasmide und Bienenhomogenate zur Methodenetablierung und Validierung

Vom EU-Referenzlabor (EU-RL) für Bienengesundheit in Frankreich (Anses Sophia Antipolis) wurden die in der Tabelle 2.3 aufgelisteten Plasmide (ABCDS als Abkürzung für die fünf Viren ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, SBV) als Standards zur Methodenetablierung und zur absoluten Quantifizierung der entsprechenden Bienenviren zur Verfügung gestellt. Alle Plasmide standen nur in sehr begrenzter Menge zur Verfügung, jeweils $12\ \mu\text{l}$ der G9 Verdünnung ($0,2 \times 10^9$ Kopien/ μl).

Zudem wurden sechzehn Bienenhomogenate vom EU-RL zur Methodenetablierung, sowie im Rahmen eines Ringversuches für CBPV, zur Verfügung gestellt (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.3: Vom EU-RL im Jahr 2017 zu Etablierungs- und Validierungszwecken von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A und SBV zur Verfügung gestellte Plasmide.

Virus	Plasmid, Bezeichnung EU-RL	Größe in Basenpaaren (bp)
ABPV	pB2	4371
BQCV	pNC14	3716
CBPV	pAb1	3815
DWV-A	pC1	4393
SBV	pD1	4442

Tabelle 2.4: Vom EU-RL zu Validierungs- und Ringversuchszwecken von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A und SBV zur Verfügung gestellte Bienenhomogenate.

Probennummer MOBI (Jahr des Probeneingangs)	Probenbezeichnung EU-RL	Virus
3155-5 (2017)	ABCDS Method adoption sample	ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, SBV
3155-6 (2017)	ABCDS Method adoption sample	ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, SBV
3156-1 bis -10 (2017) (n=10)	ILPT (CBPV) samples	CBPV
913-1 (2018)	CBPV-5.58	CBPV
913-2 (2018)	CBPV-6.79	CBPV
913-3 (2018)	CBPV-8.02	CBPV
913-4 (2018)	CBPV-9.24	CBPV

Von der Abteilung BIEN wurden zehn Proben (Bienenhomogenate, Nukleinsäureextrakte, cDNA bzw. Plasmide) für die Etablierung der Reverse Transkriptase quantitative PCR (RT-qPCR) für IAPV und KBV zur Verfügung gestellt (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Von der Abteilung BIEN zu Etablierungs- Validierungszwecken von IAPV und KBV zur Verfügung gestellte Proben. Zitate geben über die Arbeiten Auskunft, im Rahmen derer die jeweiligen Proben gewonnen worden waren.

Probennummer MOBI (Jahr des Probeneingangs)	Bezeichnung BIEN	Probenart	Virus (Nachweis mittels qualitativer RT-PCR, BIEN)
856-1 (2018)	IT-1/730	RNA-Extrakt (verdünnt 1:30), 20 µl	SBV, IAPV
856-2 (2018)	IT-2/730	Bienenhomogenat, 500 µl	SBV, IAPV
856-3 (2018)	IT-3/733	Bienenhomogenat, 500 µl	BQCV, DWV, SBV, IAPV
856-4 (2018)	IT-4/IAPV-Plasmid	Plasmidischer Klon pTB-47 der publizierten Sequenz EF219380 aus Israel; ca. 2 ml	IAPV
856-5 (2018)	IT-5/ IAPV-Plasmid	Plasmidischer Klon A5 (Blanchard et al., 2008), ca. 100 µl	IAPV
856-6 (2018)	IT- IAPV- cDNA	cDNA aus Isolat 57-2, (Blanchard et al., 2008), ca. 40 µl	IAPV
856-7 (2018)	KT-1/1125	RNA-Extrakt, 20 µl	BQCV, SBV, KBV
856-8 (2018)	KT-2/1125	Bienenhomogenat, 500 µl	BQCV, SBV, KBV
856-9 (2018)	KT-3/1126	Bienenhomogenat, 500 µl	BQCV, SBV, KBV
856-10 (2018)	KT-4/KBV-cDNA	cDNA (Siede et al., 2005) aus Deutschland, ca. 100 µl	KBV

Da die vom EU-RL bereitgestellten ABCDS Plasmide nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung standen, wurden diese nach Rücksprache mit dem EU-RL vermehrt. Dazu wurden Verdünnungen (1:10 in Wasser) dieser Plasmide in chemisch kompetente *Escherichia coli* Bakterien transformiert (MAX Efficiency® DH5α™ Competent Cells; Invitrogen), auf Agarplatten mit Ampicillin (imMedia™ Growth Medium, agar, ampicillin, X-gal/IPTG; ThermoFisher) ausplattiert und entsprechende Kolonien selektiert und in Liquid Broth plus Ampicillin (50µg/ml) kultiviert. Aus diesen Flüssigkulturen wurden danach die in *E. coli* vermehrten Plasmide mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher) herausgereinigt und deren Reinheit und Menge mithilfe eines Photometers (SmartSpec™ 3000 Spectrophotometer, BIORAD) bestimmt. Zusätzlich wurde die DNA-Menge noch mit Fluorimetrie (Qubit 3 Fluorometer und Qubit dsDNA BR Assay Kit; ThermoFisher) bestimmt. Sämtliche Plasmide zeigten eine hohe Reinheit (OD260/280 Ratio >1,7). Die beiden Quantifizierungsmethoden stimmten sehr gut überein (maximale Abweichung 22%). Die Kopienanzahl wurde aus der bekannten Plasmidgröße (Tabelle 2.3) und der mittels Fluorimetrie bestimmten DNA-Konzentration der Plasmidlösung (c_{Plasmidlösung}) mit folgender Formel berechnet:

$$c_{\text{Plasmidlösung}} = \frac{\text{DNA - Konzentration}}{\text{Molekulargewicht des Plasmids}}$$

$$\frac{\text{Anzahl Kopien}}{\mu\text{l}} = c_{\text{Plasmidlösung}} \times 6,02 \times 10^{23}$$

Entsprechende Verdünnungsreihen im Konzentrationsbereich von 10¹ – 10⁸ Kopien/5µl wurden für alle fünf Plasmide in nukleasefreiem Wasser unter Zusatz von 30ng/µl tRNA angefertigt. Eine qPCR Quantifizierung der in der Abteilung MOBI propagierten Plasmide mithilfe der vom EU-RL bereitgestellten Plasmide zeigte eine hohe Übereinstimmung der erwarteten mit den tatsächlich gemessenen Plasmidkonzentrationen. Zudem ergab eine vergleichende Quantifizierung der EU-

RL ABCDS-Referenzproben sowohl mit den vom EU-RL bereitgestellten Standardplasmiden als auch den an der Abteilung MOBI propagierten Plasmiden übereinstimmende Werte für alle fünf Bienenviren. Dementsprechend können die neu hergestellten Plasmide, die nun in ausreichender Menge vorliegen, für die Quantifizierung von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A und SBV im Rahmen dieses Projektes verwendet werden.

2.2.5.2 Nukleinsäureextraktion aus Bienenhomogenaten

Die Nukleinsäureextraktion aus Bienenhomogenat-Proben erfolgte semi-automatisiert mit dem LSI MagVet™ Universal Isolation Kit mit dem Protokoll „RNA purification from total blood & serum“ auf dem KingFisher™ Flex (beides ThermoFisher). Die Extraktion erfolgte aus 100 µl Homogenat und die gereinigte Nukleinsäure wurde in 80 µl Puffer eluiert und bis zur Analyse bei -20°C (Langzeitlagerung bei -80°C) gelagert. Zu Vergleichszwecken wurden ausgewählte Bienenhomogenatproben manuell mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), sowie automatisiert mit dem NucleoSpin® 96 Virus Core Kit (Macherey-Nagel) auf der Freedom EVO® 150 Plattform (Tecan) extrahiert. Die Extraktion erfolgte im Fall des QIAamp Viral RNA Mini Kit aus 140 µl Homogenat und die gereinigte Nukleinsäure wurde in 60 µl Puffer eluiert. Beim NucleoSpin® 96 Virus Core Kit erfolgte die Extraktion aus 100 µl Homogenat und die Elution in 100 µl Puffer. Diese unterschiedlichen Verhältnisse im Proben- zu Eluatvolumen wurden bei der Berechnung der Viruskopienanzahl/ml berücksichtigt.

2.2.5.3 Methodenetablierung und -validierung zum Nachweis und zur Quantifizierung von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A und SBV (ABCDS)

Für den Nachweis und die Quantifizierung von ABPV, BQCV, DWV-A und SBV mittels RT-qPCR existiert eine Standard operating procedure (SOP), die vom EU-Referenzlabor (EU-RL) für Bienengesundheit in Frankreich (Anses Sophia Antipolis) zur Verfügung gestellt wurde. Die in der SOP beschriebene ABPV RT-qPCR basiert auf der Quantifizierung der Kapsidprotein-Gensequenz (Jamnikar-Ciglencič & Toplak, 2012); die BQCV RT-qPCR auf dem C-terminalen Bereich der Polyprotein Gen-Sequenz (Chantawannakul et al., 2006); die DWV-A RT-qPCR Methode auf der Quantifizierung der VP3-Kodiersequenz (Schurr et al., in Vorbereitung) und der SBV-Nachweis auf der Quantifizierung des N-terminalen Bereich der Polyprotein Gensequenz (Blanchard et al., 2014). Für den Nachweis und die Quantifizierung von CBPV stand eine weitere SOP zur Verfügung. Die Methode beruht auf der Quantifizierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Rd-Rp) Gensequenz des CBPV-Genoms (Blanchard et al. 2007). Sämtliche Primer- und Sondensequenzen wurden anhand der oben zitierten Literatur bestellt (ThermoFisher bzw. Eurofins), mit der Ausnahme, dass die Sonden für ABPV, BQCV, DWV-A und CBPV – anstelle vom in den SOPs empfohlenen TAMRA – mit dem Black Hole Quencher 1 (BHQ-1) versehen wurden.

In den beiden oben genannten SOPs erfolgt die Detektion und Quantifizierung der Bienenvirus RNAs als two-step RT-qPCR mit getrennter Reverser Transkription (RT) und darauffolgender qPCR Amplifikation der im RT-Schritt erzeugten cDNA. Demgegenüber erfolgt die RT-qPCR im Rahmen dieses Arbeitspaketes als one-step RT-qPCR, wobei RT und qPCR hintereinander im selben Reaktionsgefäß stattfinden. Hauptvorteil der one-step RT-qPCR ist, dass die Anzahl an Pipettierschritten und damit mögliche Fehlerquellen reduziert werden. Zudem wird weniger Zeit für das Probenhandling benötigt, was die one-step RT-qPCR besonders für einen höheren Probenumsatz, wie er in diesem Arbeitspaket gegeben ist, attraktiv macht.

Die 25 µl Reaktionsmixes für die ABCDS one-step RT-qPCRs bestanden aus 12,5 µl 2x RT-PCR buffer, 1 µl 25x RT-PCR enzyme mix (AgPath-ID One-step RT-PCR kit, ThermoFisher), 5 µl Nukleinsäureextrakt und den jeweils spezifischen Primern und fluoreszenzmarkierten TaqMan-Sonden, sowie nukleasefreiem Wasser. Die Konzentrationen der verwendeten Primer und Sonden

entsprachen den in den beiden EU-RL SOPs angegebenen Werten. Demnach wurden für die ABPV RT-qPCR die Primer ABPV1 und ABPVRn (je 800 nM), sowie die Sonde ABPVnTaq (100 nM) verwendet (Jamnikar-Ciglenc̃ki & Toplak, 2012). Für die BQCV RT-qPCR wurden die Primer BQV8195F und BQV8265R (je 320 nM), sowie die Sonde BQCV8217T (200 nM) eingesetzt (Chantawannakul et al., 2006). Für die CBPV RT-qPCR wurden die Primer qCBPV 9 und qCBPV 10 (je 500 nM), sowie die Sonde CBPV 2 probe (200 nM) verwendet (Blanchard et al., 2007). Für die DWV-A RT-qPCR wurden die Primer F-DWV_4250 und R-DWV_4321 (je 400 nM), sowie die Sonde Pr-DWV_4293 (100 nM) (Schurr et al., in Vorbereitung). Für die SBV RT-qPCR wurden die Primer SBV-F434 und SBV-R503 (je 320 nM), sowie die Sonde SBV-P460 (200 nM) eingesetzt (Blanchard et al., 2014).

Zum Nachweis der erfolgreichen Nukleinsäureextraktion aus den Bienenhomogenaten, respektive zum Nachweis der Abwesenheit PCR-inhibitorischer Substanzen, wurde – wie schon im vorhergehenden Projekt – die Apis-Actin mRNA in den Bienenhomogenatproben semiquantitativ (d.h. ohne entsprechender Eichkurve) bestimmt (Morawetz et al., 2018). Für die Apis-Actin RT-qPCR wurden die Primer Apis- β -actin-F und Apis- β -actin-R (je 400 nM), sowie die Sonde Apis- β -actin-Probe (200 nM) verwendet (Chen et al., 2005).

Das Temperaturprofil für die ABCDS-, sowie die Apis-Actin RT-qPCRs bestand aus einem RT-Schritt bei 45°C/10 min, gefolgt von 95°C/10 min zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase und Aktivierung der Taq-Polymerase und 42 Zyklen mit jeweils Denaturierung bei 95°C/10 sec und Annealing/Extension bei 60°C/1 min. Die RT-qPCRs wurden auf dem 7500Fast Real-time PCR System (ThermoFisher) oder auf dem Mx3005P (Agilent) durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit der 7500 Software v2.3 (ThermoFisher), bzw. mit der MxPro – Mx3005P v4.10 Software (Agilent).

Die eigentliche Methodenetablierung lief in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt wurden die RT-qPCR Parameter, wie Limit of detection (LOD_{PCR}), Linearität der Quantifizierung, PCR-Effizienz und Limit of quantification (LOQ_{PCR}), erhoben. Im zweiten Schritt wurde die komplette Methode von der Nukleinsäureextraktion bis zur RNA-Quantifizierung anhand der Erhebung von LOD_{Method} und LOQ_{Method} evaluiert. Für beide Schritte hatte das EU-RL Referenzwerte definiert, anhand derer die Konformität der Methode mit den EU-RL Standards überprüft werden konnte.

LOD_{PCR} , Linearität, PCR-Effizienz und LOQ_{PCR} waren bei allen fünf Bienenviren konform mit den EU-RL Standards: die G2-Verdünnungsstufe (100 Kopien/Reaktion) wurde mit allen fünf Tests positiv detektiert, die PCR-Effizienz war bei allen fünf Tests im Bereich von 95-104%, die Linearität der Quantifizierung wurde bei allen Tests im Bereich von 10^2 - 10^8 Kopien/Reaktion bestätigt.

Bei der Überprüfung der kompletten Methode von der Nukleinsäureextraktion bis zur RNA-Quantifizierung waren alle fünf Methoden im Hinblick auf das LOD_{Method} ebenfalls konform mit den EU-RL Standards. Beim LOQ_{Method} schreibt das EU-RL eine maximale Abweichung der erhobenen Viruslast von einer \log_{10} -Stufe zum Erreichen der Konformität mit dem EU-RL Standard vor. Diese Konformität wurde für CBPV, DWV-A und SBV erreicht. Bei ABPV und BQCV lagen die Viruslasten/Biene aber um einen Faktor von $4,68 \times 10^1$ - $2,88 \times 10^2$ (ABPV) bzw. $1,32 \times 10^2$ - $2,45 \times 10^2$ (BQCV) über den EU-RL Referenzwerten. Diese Überschätzung der Viruslast bei den beiden genannten Bienenviren zeigte sich bei beiden verwendeten Extraktionsmethoden (zwei Methoden wurden hier anhand derselben Proben verglichen), war jedoch bei Verwendung der semiautomatisierten Extraktion mit dem KingFisher™ Flex etwas niedriger, sodass diese Methodik hier bevorzugt wird. Bezüglich der Überschätzung der ABPV und BQCV Viruslasten wird noch Rücksprache mit dem EU-RL gehalten werden, ob hier ein Korrekturfaktor in die Berechnung einbezogen werden sollte.

2.2.5.4 CBPV-Ringversuch und Quantifizierung weiterer CBPV Referenzproben

Im Dezember 2017 nahm MOBI an einem Ringversuch des EU-RL für Bienengesundheit teil. Alle zehn Ringversuchsproben wurden qualitativ richtig erkannt. Bei der quantitativen Analyse der drei CBPV-positiven Ringtestproben wurden vergleichsweise niedrige Viruslasten erzielt (im Bereich von 6,31 bis 63,1-fach unter dem robusten Mittelwert/der robusten Standardabweichung aller Teilnehmer), jedoch waren die Ergebnisse im Hinblick auf Sensitivität, Spezifität, Präzision und Richtigkeit konform mit dem EU-RL Standard. Der Ringversuch wurde somit erfolgreich absolviert.

Vier weitere CBPV-Referenzproben (913-1 bis 913-4, Tabelle 2.4) mit unterschiedlicher CBPV-Last wurden ebenfalls vom EU-RL bezogen und mit der beschriebenen Methodik quantifiziert. Bei Verwendung der Extraktion mit dem KingFisher™ Flex wurden alle vier Proben mit einer Abweichung von unter einer log₁₀ Stufe richtig quantifiziert.

2.2.5.5 Methodenetablierung und -validierung zum Nachweis und zur Quantifizierung von IAPV und KBV

Für diese beiden RNA-Bienenviren standen keine Empfehlungen oder SOPs vom EU-RL für Bienengesundheit zur Verfügung. Die Methodenauswahl wurde daher anhand verfügbarer Literaturstellen (Chantawannakul et al., 2006; Cox-Foster et al., 2007; de Miranda et al., 2010; Maori et al., 2007; Palacios et al., 2008; Stoltz et al., 1995) oder von in der Abteilung BIEN vorhandenen Erfahrungen getroffen. Basierend auf de Miranda et al. (2010) wurden verschiedene IAPV und KBV-spezifische Primer und Sonden *in silico* evaluiert. Dazu wurden mithilfe des Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Sequenzen mit entsprechender Homologie zu den von den jeweiligen Primern amplifizierten Genabschnitten gesucht und in der Folge mithilfe der Software BioEdit (Hall, 1999) die Anzahl an nicht-passenden Basenpaarungen zwischen den Primern und den entsprechenden Zielsequenzen analysiert. Basierend auf dieser Analyse erschienen die Primer KBV 6639F/6801R und IAPV 6627F/6792R (de Miranda et al., 2010) als am vielversprechendsten. Daher wurden diese Primer für eine SYBR-Green RT-qPCR synthetisiert (ThermoFisher). Zusätzlich wurden auch die Primer KBV 5425F/5800R (Stoltz et al., 1995) und IAPV 8880F/9336R (Maori et al., 2007) synthetisiert, da diese bereits in der Abt. BIEN verwendet worden waren und die Hintergrundinformation in Tabelle 2.5 teilweise auf der Verwendung dieser beiden Primersysteme basiert.

In Vorversuchen zeigte sich, dass die KBV und IAPV Primer nach de Miranda et al. (2010) jedoch lediglich bei den Proben 856-5 und 856-10 (Tabelle 2.5) ein positives Ergebnis erbrachten, sodass das in Österreich vorkommende IAPV und KBV damit möglicherweise nicht erfasst würde. Im Gegensatz wurden in konventionellen RT-PCRs mit den KBV und IAPV Primern nach Stoltz et al. (1995) und Maori et al. (2007) auch in den österreichischen Bienenproben (Tabelle 2.5) Amplifikate in den erwarteten Größen erhalten, die sich bei Sequenzierung (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit und 3130xl Genetic Analyzer; Thermo Fisher) und anschließender BLAST-Analyse als IAPV und KBV bestätigen ließen. Daher wurde beschlossen, mit den KBV und IAPV Primern nach Stoltz et al. (1995) und Maori et al. (2007) weiterzuarbeiten. Wir werden versuchen, diese auf ein SYBR-Green basierendes RT-qPCR Protokoll umzustellen, sodass damit auch eine quantitative Analyse inklusive einer Schmelzkurvenanalyse zur eventuellen Speziesdifferenzierung möglich wird. Dazu wurden zwei aus österreichischen Bienenproben stammende IAPV- und KBV-Amplifikate (aus den Proben 856-2 und 856-8; Tabelle 2.5) mithilfe des TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) in ein Plasmid-Backbone inseriert und mit der in Kapitel 2.2.5.1 bereits beschriebenen Methodik in *E. coli* vermehrt, die Plasmid-DNA daraus präpariert und quantifiziert. Zusätzlich wurde das Vorhandensein des IAPV- bzw. KBV Amplifikates in der gereinigten Plasmid-DNA mittels Sequenzierung bestätigt.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Fortschritt Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung zur Detektion und Quantifizierung der Bienenviren ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A und SBV ist bereits abgeschlossen. Bezüglich der Detektion und Quantifizierung der Bienenviren IAPV und KBV sind noch weitere Vorarbeiten hinsichtlich der Findung der optimalen Primerkonzentration und der Spezifität der Tests nötig. Diese sollten voraussichtlich bis zum Eintreffen der von BIEN aufgearbeiteten/vorbereiteten Feldproben im Oktober 2018 abgeschlossen sein. Zusätzlich zu DWV-A wird in den nächsten Monaten die Methode zur Detektion und Quantifizierung von DWV-B gemäß der EU-RL SOP bearbeitet. Danach werden die EU-RL Methoden mit der im Vorgängerprojekt angewandten Methode nach Highfield et al. (2009) verglichen und die am besten geeignete Methode ausgewählt. Die Methodenetablierung ist voraussichtlich Ende des Jahres abgeschlossen. Daher können die Analysen der Proben von September 2018 wie geplant bis Februar 2019 durchgeführt und die StudienteilnehmerInnen zeitnah informiert werden.

2.3.2 Status TeilnehmerInnenwerbung

Zwischen 15. Februar und 31. Mai 2018 meldeten sich 297 InteressentInnen aus allen neun Bundesländern für das Virenmonitoring. Davon wurden 200 ImkerInnen zufällig ausgesucht (Tabelle 2.2) und nochmals um eine Bestätigung der Teilnahme gebeten. Sieben ImkerInnen sagten zu diesem Zeitpunkt aus terminlichen Gründen oder aufgrund von Völkerverlusten ab. Diese wurden umgehend nachbesetzt. Mit Stichtag 21.08.2018 liegen 200 Teilnahmebestätigungen von ImkerInnen vor, an die Ende August die notwendigen Materialien zur Probenahme verschickt werden.

2.4 Anhang

Auf den folgenden Seiten finden Sie eine detaillierte Anleitung, wie Sie die Probenahme der Bienen durchführen werden. Bei Unklarheiten und Fragen können Sie sich jederzeit an uns wenden (Kontaktdaten auf der letzten Seite).

Wir bedanken uns bei Ihnen für die Zusammenarbeit und hoffen, gemeinsam einen weiteren Schritt in der Erforschung der Bienengesundheit in Österreich zu gehen!

Der zeitliche Ablauf im Überblick:

Probenahme: zwischen 1. und 16. September 2018 (möglichst Sonntag bis Mittwoch)

Abschicken per Post: Am Tag oder Folgetag der Probenahme (möglichst Montag bis Mittwoch)

Sie erhalten die Ergebnisse der Virentests voraussichtlich im März 2019

Meldung der Winterverluste: Frühjahr 2019

Weitere Probenahmeterminen: Herbst 2019 und Herbst 2020

Arbeitsanleitung

Arbeitsschritte für die Probenahme 2018:

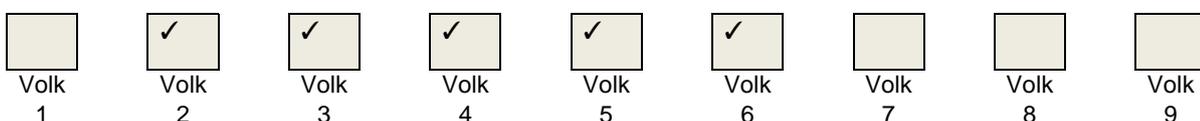
1. Auswahl und Markierung der Probenvölker
2. Probenahme
3. [Optional, falls es Ihnen möglich ist: Völkerdurchsicht und Kontrolle auf Krankheitssymptome, Ausfüllen des Fragebogens – „optionaler Teil“](#)
4. Ausfüllen des Fragebogens – „Pflichtteil“
5. Befüllen der Versandtasche und Versand

1. Auswahl und Markierung der Probenvölker:

Es werden insgesamt 5 Völker eines einzigen Standes beprobt (=Probenvölker). Wählen Sie diese bitte nach folgendem Schema aus:

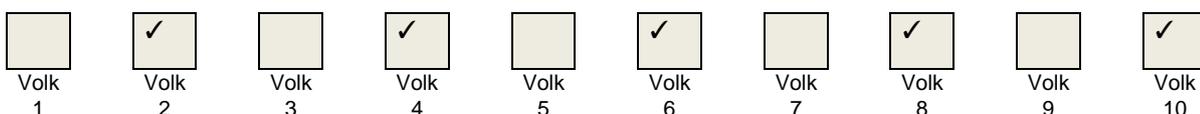
- **bei 5 Völkern** am Stand: alle Völker beproben.
- **bei 6 bis 9 Völkern** am Stand: das erste Volk auslassen und ab dem 2. Volk die nächsten 5 Völker auswählen.

Bsp.:



- **bei 10 oder mehr Völkern** am Stand: das erste Volk auslassen und dann jedes zweite Volk auswählen bis 5 Völker ausgewählt sind.

Bsp.:



Die ausgewählten Probenvölker mit den beigelegten **Plastiketiquetten** markieren. Die Plastiketiketten mit Reißnägeln oder ähnlichem auf dem Beutenteil, der in der Regel beim Volk bleibt

(Beutenboden oder Zarge), befestigen. Wenn Sie die Zarge oder den Boden, auf dem das Etikett befestigt ist, austauschen, das Etikett ebenfalls umhängen.

Damit sollen die Probenvölker zweifelsfrei für den weiteren Versuchsverlauf über 3 Jahre identifizierbar bleiben. Bei Ausfall eines Volkes in den nächsten beiden Jahren wählen Sie bitte ein Ersatzvolk aus und teilen Sie uns dies bei der nächsten Beprobung mit.

2. Probenahme:

Bitte führen Sie die Probenahme folgendermaßen durch:

Wabe zur Probenahme identifizieren:

Die Bienenprobe soll aus jener Zarge entnommen werden, in der sich die Brut befindet bzw. dort, wo die Bienen sitzen, falls keine Brut vorhanden ist.

Die Bienenprobe soll auf jener brutfreien Wabe genommen werden, die an die äußerste Brutwabe anschließt.

Wenn keine Brut vorhanden ist, die Probe von einer äußeren Wabe des Bienensitzes nehmen.



Die Probe auf der ausgewählten brutfreien Wabe nehmen:

Bitte entnehmen Sie die Probe durch Auflegen der offenen Seite des Käfigs auf die Wabe (offenen Käfig auf kleine Bienengruppe legen) und vorsichtiges Zuschieben des Deckels.



Im Käfig sollten sich 10 Bienen befinden, etwas mehr ist im Zweifelsfall in Ordnung.



3. Optional: Völkerdurchsicht, Feststellen der Symptome und Ausfüllen des Fragebogens – „optionaler Teil“

Falls es Ihnen möglich ist, bei den Probenvölkern eine Völkerdurchsicht durchzuführen, könnten Sie das Projekt mit wertvoller Information unterstützen. Dazu ist es nötig, **alle bienenbesetzten Waben** der Probenvölker, sowie den Bereich vor den Probenvölkern zu inspizieren. Im Fragebogen – „optionaler Teil“ ist anzugeben, bei wie vielen der Probenvölker Sie die angeführten Symptome beobachtet haben. Da diese abgefragten Symptome Hinweise auf eine akute Virusinfektion geben können, helfen uns Ihre Beobachtungen, die Ergebnisse der Virusuntersuchung besser zu interpretieren. In der Beilage „Arbeitsanleitung zur optionalen Völkerdurchsicht“ finden Sie die genauen Informationen, wie dabei vorzugehen ist.

4. Ausfüllen des Fragebogens – „Pflichtteil“

Bitte füllen Sie den Pflichtteil des Fragebogens aus.

5. Befüllen der Versandtasche und Absenden

Bitte die vorfrankierte und adressierte Versandtasche wie folgt befüllen:

Den ausgefüllten Fragebogen in das graue Briefkuvert stecken. Dieses Kuvert einmal zusammenfalten und in die braune Versandtasche schieben.



Die 5 Käfige flach darauflegen und flach hineinschieben (geht sich knapp aus).



Die Versandtasche mit der beigelegten Klammer verschließen (Falz 2 mal falten) oder mit einer Klammermaschine zuklammern.



Die Versandtasche am Wochenbeginn (Montag bis Mittwoch) bei einer Poststelle aufgeben oder in einen Postkasten werfen, der noch am selben Tag ausgehoben wird. Dies soll eine kurze Transportdauer gewährleisten, um die Bienen zu schonen. Da der Versand rasch nach der Probenahme erfolgen sollte, ist eine Probenahme im Zeitraum von Sonntag bis Mittwoch ideal.

Kontakt

Falls Sie Fragen haben, können Sie uns erreichen unter:

Dr. Linde Morawetz:	050 555-33120	linde.morawetz@ages.at
DI Hemma Köglberger	050 555-33127	hemma.koeglberger@ages.at

Im Probenahmezeitraum (1. bis 16. September 2018) können Sie uns jederzeit (auch am Wochenende) erreichen unter:

Handy Bienenkunde: *****_*****

Ausblick

Die Untersuchungen auf sieben Bienenviren werden im Winter stattfinden. Sobald die Ergebnisse vorliegen, werden Sie diese erhalten.

Im Frühling 2019 werden wir die Winterverluste am betreffenden Stand und bei den fünf Probevölkern abfragen.

Gutes Gelingen! – und Danke für Ihre Teilnahme 
**ZUKUNFT
BIENE**

(V) Virendiagnostik und –prophylaxe bei Honigbienen

3.1 Kurzzusammenfassung des bisherigen Verlaufs der Studie

Im Modul V sollen Antikörper zum Nachweis viraler Genprodukte generiert und „Enzyme linked immuno sorbent assays (ELISA)“ zum schnellen und kostengünstigen diagnostischen Nachweis von Virusinfektionen bei Honigbienen im Labor und im Feld entwickelt werden. Im ersten Schritt müssen geeignete Antigen-Präparationen für die Immunisierungen und Tests produziert werden. Als Projektdauer wurden drei bis vier Jahre veranschlagt, wobei ein planmäßiger Projektbeginn ab Mai 2018 nach Eingang der Finanzierung eingehalten werden konnte. Durch den günstigen Startzeitpunkt konnte die saisonale Brutaktivität der Honigbienen 2018 effizient ausgenutzt werden, um durch Infektionsexperimente authentische Antigene verschiedener Virus-Spezies zu produzieren. In den ersten vier Monaten des Projektes wurden viele verschiedene Virusstämme auf ihre Reinheit untersucht und die Infektionseffizienz der Viruspräparationen getestet. Es gelang, Antigene des Deformed wing virus (DWV-A), Varroa destructor Virus (VDV/DWV-B), Sackbrutvirus (SBV), Virus der chronischen Bienenparalyse (CBPV) sowie des Virus der akuten Bienenparalyse (ABPV) zu produzieren. Durch Ultrazentrifugation wurden Antigen-Konzentrate erzeugt, die in Screening- und Charakterisierungsversuchen eingesetzt werden können. Leider herrscht 2018 an unseren Versuchsbienenständen ein sehr milbenreiches Jahr, so dass seit Anfang August viele der Versuche durch SBV-Wildstämme kontaminiert wurden. Bis zur nächsten Brutsaison (Anfang April 2019) wird nun untersucht, welche der Strukturprotein-Antigene der Viren in rekombinanten Systemen produziert werden können. Diese Proteine werden dann gereinigt, um daraufhin die Spezifitäten und Affinitäten der zu generierenden Antikörper zu testen (Westernblot und Bio-Layer-Interferometrische Analysen).

3.2 Einleitung

Durch dieses Projekt soll die Diagnostik von Virusinfektionen bei Honigbienen vereinfacht werden. Die ektoparasitische Varroamilbe (*Varroa destructor*) und virale Krankheitserreger werden für einen Großteil der Kolonieverluste vor (Dainat et al., 2012a) und während der Überwinterung verantwortlich gemacht (Kielmanowicz et al., 2012). Untersuchungen aus verschiedenen Ländern belegen einen direkten Einfluss von I flaviren (SBV, DWV) und Dicistroviren (ABPV) auf die Vitalität von Bienenvölkern. Die viralen Erreger der Bienen sind den Picornaviren ähnlich, untereinander phylogenetisch nah verwandt, aber in der Nukleinsäure-Sequenz sehr variabel. Im Gegensatz zu hochspezifischen RT-PCR-Protokollen, die in den meisten Fällen nur bestimmte Varianten bzw. Virusspezies detektieren können und sehr teuer sind, sind serologische Assays häufig in der Lage, größere Erregergruppen diagnostisch zu erfassen. In diesem Projekt sollen bereits vorhandene serologische Reagenzien gegen das Flügeldeformationsvirus (DWV) zur Etablierung von Hochdurchsatz-Tests im Labor sowie „Point of care“ Tests am Bienenstock genutzt werden. Gleichzeitig sollen neue Reagenzien gegen Sackbrutvirus (SBV) und Dicistroviren (Virus der akuten Bienenparalyse) produziert werden, um auch diese Pathogengruppen abdecken zu können.

Viele frühe wissenschaftliche Studien zu Viruserkrankungen der Honigbienen nutzten zum Nachweis der Erreger serologische Reagenzien (Anderson et al., 1984). Serologische Nachweisverfahren wurden früher auch erfolgreich zur Diagnostik von Feldinfektionen eingesetzt. In allen Studien wurden polyvalente Seren verwendet, die durch Immunisierung von Versuchstieren mit

Virusextrakten gewonnen wurden und eine komplexe Mixtur aus unterschiedlichen Immunglobulinen darstellten. Da es für Honigbienen weder Zellkultursysteme noch klonale Virusstämme gab, war die Spezifität der Antiseren beschränkt. Neben Hintergrundreaktionen mit Bienenproteinen aus der Virusproduktion waren auch unerwünschte Reaktionen mit kontaminierenden Viren nie auszuschließen. Obwohl man Reinigungsprotokolle für diese Reagenzien entwickelte (z.B. Adsorption der Seren gegen Bienenlysate), wurden die etablierten ELISA-Systeme in der Diagnostik wegen der limitierten Verfügbarkeit der Reagenzien bald durch RT-PCR Protokolle ersetzt. In jüngster Vergangenheit sollte im Programm „Bees in Europe and the Decline Of honeybee Colonies (BEE DOC)“ im europäischen „Research Framework 7“ ein Bienenviren-ELISA entwickelt werden. Das Problem der unspezifischen Reaktionen mit Bienenproteinen sollte dabei durch Immunisierungen mit synthetischen viralen Peptiden umgangen werden. Die Immunisierungen mit Peptiden verliefen aber nicht erfolgreich, so dass kein Assay entwickelt werden konnte. Monoklonale Antikörper können dagegen durch Immunisierung mit authentischen Proteinen generiert werden, wobei durch Isolierung einzelner B-Zellen und damit IgGs eine hohe Spezifität und Sensitivität der Reagenzien gewährleistet werden kann. Durch den Einsatz monoklonaler Antikörper könnten die Nachteile der etablierten serologischen Nachweissysteme, wie mangelhafte Spezifität und begrenzte Verfügbarkeit der verwendeten Reagenzien, aufgehoben werden und kostengünstige, quantifizierende Testsysteme etabliert werden (Usuda et al., 1999).

Die Spezifität und Sensitivität der ELISA wird vorrangig durch die verwendeten serologischen Reagenzien bestimmt. In diesem Projekt werden monoklonale Antikörper verwendet bzw. generiert, die nach Charakterisierung der Reaktivität in unbeschränkter Menge zur Verfügung stehen. Die neuen Testverfahren sollen eine kostengünstige Diagnostik von Virusinfektionen bei Honigbienen in Österreich ermöglichen. ELISA Systeme geben schnell ein zuverlässiges quantitatives Ergebnis und können vor Ort durchgeführt werden („On-site-Tests“). Mit Platten-basierten ELISAs können in Laboratorien kostengünstige Massentests („high throughput systeme“) durchgeführt werden, während Lateral-Flow-Tests (bekannt aus Schwangerschaftstests) zu einem etwas höheren Preis direkt vor Ort angewendet werden können. Ein Lateral-Flow-Test zum Nachweis der Amerikanischen Faulbrut wurde bereits für die Imkerei entwickelt und wird weltweit vertrieben (Vita Europe Ltd.).

3.3 Methodik

Antikörper sind die Schlüsselreagenzien für die Etablierung der ELISA. Während die Reagenzien für DWV bereits vorhanden sind, müssen geeignete Antikörper gegen andere Bienenviren erst erzeugt werden. Nach Viruskultur in Bienenpuppen und Präparation der Virionen können die Strukturproteine von ABPV und SBV gereinigt werden. Nach Immunisierung von Mäusen mit diesen bzw. rekombinanten Antigenen sollen neue Hybridomzellklone generiert, monoklonale Antikörper produziert und charakterisiert werden. Hochspezifische Antikörper gegen ABPV und SBV werden dann in Virusneutralisations-Experimenten, Westernblot und Immunfluoreszenztests validiert und in der Kreuzkompetition getestet. Durch rekombinante Expression werden außerdem geeignete Boost-Antigene und Positivkontrollen generiert. Geeignete Antikörper werden in großen Mengen produziert, gereinigt und untersucht, ob sie zur Anwendung in Sandwich-ELISA geeignet sind. Gleichzeitig werden die Antikörper sequenziert, um als chimäre Moleküle für breite ELISA-Anwendungen zur Verfügung zu stehen. Zur Generierung der Antikörper sind im Modul V Tierversuche erforderlich. In diesen Versuchen werden Mäuse mit gereinigten Antigenen immunisiert („Impfung“) und der Erfolg der Immunisierung anhand der Serokonversion geprüft (Blutentnahme). Die Versuchstiere werden nach erfolgreicher Immunisierung euthanasiert und B-Lymphozyten aus ihrer Milz gewonnen. Die Tierversuche werden im Rahmen eines genehmigten Antrages zur Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen Bienenviren durchgeführt werden (BMWF-68.205/0107-II/3b/2013). Die neu generierten Reagenzien und bereits charakterisierte

Antikörper gegen DWV werden zur Etablierung diagnostischer ELISA genutzt. Dabei werden Probenlysis (Puffer, Zerkleinerung, Probenmaterial) und verschiedene ELISA-Systeme untersucht. Mit Hilfe von Feldproben, die vom Kooperationspartner AGES (Modul A) bereitgestellt werden sollen, werden die Verfahren optimiert und validiert.

3.3.1 Ausgangslage der Studie

In den letzten Jahren wurden substantielle Vorarbeiten zur serologischen Diagnostik von Bienenviren an der Vetmeduni geleistet. Das Institut für Virologie der Vetmeduni hat langjährige Erfahrung in der Diagnostik von Virusinfektionen. Es wurden bereits rekombinante Antigene und serologische Reagenzien gegen Bienenviren hergestellt und serologische Nachweisverfahren für den Einsatz in der Forschung etabliert. Neben dem ersten molekularen Klon des Flügeldeformationsvirus wurden auch die ersten monoklonalen Antikörper gegen Strukturproteine von DWV präsentiert (Lamp et al., 2016). Ein Forschungsschwerpunkt ist die molekulare Pathologie von Virusinfektionen bei Honigbienen.

Die vorhandenen monoklonalen Antikörper gegen DWV VP1 und 3c-Protease wurden bereits charakterisiert, die Bindung an die viralen Proteine untersucht und eine orientierende Epitopbestimmung durchgeführt. Im hier vorgestellten Projekt wird die praktische Anwendung dieser Antikörper in der Diagnostik untersucht, um belastbare Assays zum Nachweis von DWV zu entwickeln. Zur rekombinanten Expression von ABPV Strukturproteinen und der Produktion von ABPV wurden bereits Vorarbeiten geleistet, so dass bakteriell exprimierbare Proteinkonstrukte und definierte Virusstocks vorliegen.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Antikörper

Eine Testung und Produktion der vielversprechendsten anti-DWV Immunglobuline wurde gestartet. Die entsprechenden Hybridome wurden in Kultur genommen und es wurde begonnen, serumfreie Zellkulturen dieser Hybridome zu etablieren. Zur Reinigung der betreffenden IgG1 Antikörper der Maus mittels Protein-G-Affinitätschromatographie ist eine serumfreie Kultur Voraussetzung, da ansonsten kontaminierende IgGs aus dem Kälberserum mit gereinigt werden. Gleichzeitig wurden die Nukleotid-Sequenzen der Immunglobuline zweier Hybridome (DWV-VP1A1 und DWV-VP1B1) bestimmt, um eine rekombinante Expression der Antikörper und eine Manipulation der Moleküle zu ermöglichen. Zur Etablierung der gewünschten Sandwich-ELISA sollen rekombinante Moleküle mit anderen FC-Regionen erzeugt werden, um kostengünstige, kommerziell erhältliche Sekundärantikörper verwenden zu können. Erste bakterielle Plasmide, die chimäre Immunglobuline kodieren, wurden bereits generiert. Ergebnisse zur Reaktivität der chimären Antikörper liegen allerdings noch nicht vor.

3.4.2 Antigene

Bislang wurden ausschließlich reine Virusstocks von DWV, SBV, ABPV und CBPV produziert, um die saisonale Bruttätigkeit der Honigbienen möglichst gut auszunutzen. Im nächsten Schritt werden rekombinante Proteine der verwendeten SBV, ABPV und CBPV-Stämme in bakteriellen Expressionssystemen generiert.

3.4.3 Immunisierungen

Es wurden noch keine Immunisierungen im Projekt durchgeführt.

3.4.4 ELISA-Tests mit definierten Proben

Es wurden noch keine ELISA-Tests mit im Labor erzeugten Proben durchgeführt.

3.4.5 ELISA-Tests mit Feldproben

Es wurden noch keine ELISA-Tests mit Feldproben durchgeführt.

3.5 Diskussion

Nach Stand der Forschung sind neben der Varroabelastung hohe Virustiter von DWV, SBV und ABPV verantwortlich für die epidemisch auftretenden Völkerverluste im Herbst und Winter bei Honigbienen in Europa und Nordamerika (Genersch et al., 2010; Martin et al., 2012; Nazzi et al., 2012; Ryabov et al., 2014; McMahon et al., 2016; McMenamin et al., 2016; Locke et al., 2017; Annoscia et al., 2018). Die Belastung der Völker mit diesen Varroa-assoziierten Viren ist dabei auch ein prädiktiver Marker für die Wahrscheinlichkeit eines Zusammenbruchs des Bienenvolkes. Die Virusdiagnostik basiert auf qRT-PCR Protokollen, bei denen Laborkosten von mindestens 20 € für die Nukleinsäure-Extraktion und 15-20 € je Virusnachweis entstehen (je nach Sensitivität), so dass eine Untersuchung auf die drei Viren mindestens 65 bis 80 € kostet. Trotz des vergleichsweise hohen Wertes eines Bienenvolkes von mehr als 200 € bei starken Kolonien mit Reinzuchtkönigin ist eine Untersuchung der Virenbelastung daher unwirtschaftlich. In Massentests zur Diagnostik in der Humanmedizin und auch zur Tierseuchenbekämpfung werden meist serologische Verfahren genutzt, da sie unempfindlich gegenüber der Probenlagerung, sehr sensitiv und wesentlich kostengünstiger sind. In dem hier vorgestellten Projekt werden bereits vorhandene Reagenzien gegen Struktur- und Nichtstrukturproteine von DWV genutzt und neue Reagenzien gegen SBV, ABPV und CBPV generiert, um serologische Testverfahren zu etablieren. Ziel des Projektes ist die Entwicklung plattenbasierter Hochdurchsatztests, die im Massentest Analysen zu einem Preis zwischen 5 und 10 € ermöglichen. Die Entwicklung handelsüblicher „On-site“ Tests im Lateral-Flow-Format (z.B. Schwangerschaftstest) soll dem Imker die Möglichkeit eröffnen, die Kolonien im Verdachtsfall vor Ort zu testen. Da bei der Diagnostik am Stock Versand- und Transportaufwand entfallen und der Imker unmittelbar vor Ort handeln kann, werden solche Testverfahren trotz höherer Assaykosten (ca. 20-30 € pro Schnelltest) sehr hilfreich sein. Erste Versuche mit den bereits vorhandenen Reagenzien gegen DWV ergaben, dass einige der Antikörper in Immunfluoreszenz-Markierungen und Westernblot-Applikationen die viralen Antigene hochspezifisch binden (Lamp et al., 2016). Die neuen Reagenzien und Testverfahren sollen helfen, die Verluste der Imkereien einzudämmen, da positive Untersuchungsergebnisse im Spätsommer eine Sanierung der Völker (z. B. Kunstschwarmbildung mit neuer Königin) ermöglichen, bevor sichtbare Schäden auftreten.

Veröffentlichungen und Vortragstätigkeit im Zeitraum 22.12.2017–31.8.2018

Projektbezogene Publikationen

Kuchling S, Kopacka I, Kalcher-Sommersguter E, Schwarz M, Crailsheim K, Brodschneider R. (2018) Investigating the role of landscape composition on honey bee colony winter mortality: A long-term analysis. *Scientific Reports* **8**, 12263.

Brodschneider R, Gray A, Adjlane N, Ballis A, Brusbardis V, Charrière J.D., Chlebo R, Coffey MF, Dahle B, de Graaf DC, Dražić MM, Evans G, Fedoriak M, Forsythe I, Gregorc A, Grzeda U, Hetzroni A, Kauko L, Kristiansen P, Martikkala M, Martin-Hernandez R, Medina-Flores CA, Mutinelli F, Raudmets A, Ryzhikov VA, Simon-Delso N, Stevanovic J, Uzunov A, Vejsnaes F, Wohl S, Zammit-Mangion M, Danihlik J. (2018). Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. *Journal of Apicultural Research* **57**(3), 452-457.

Projektbezogene Kongressbeiträge (Poster und Vorträge)

Seitz K, Rebel-Bauder B, Url A, Škubník K, Plevka P, Buczolic K, Fink D, Riedel C, Mandl S, Rümenapf T, Lamp B. In vivo infection dynamics of deformed wing virus (DWV) in honeybees. Vortrag: International Congress for Veterinary Virology, Vienna 2018

Projektbezogene Vorträge Science to Stakeholders

Moosbeckhofer R „Zukunft Biene 2 – Grundlagenforschungsprojekt zur Förderung des Bienenschutzes und der Bienengesundheit“. Gesundheitsreferententagung des Österreichischen Imkerbundes, AGES, Wien, 25.04.2018

Projektbezogene Beiträge in den Medien

Morawetz L, Brodschneider R, Lamp Benjamin, Crailsheim K (2018) „Zukunft Biene 2“ – ein Projekt über Bienenviren und Bienengesundheit in Österreich. *Bienen Aktuell*, Jahrgang 12, März: 21-23.

Morawetz L, Moosbeckhofer R (2018) „Jetzt noch rasch zur Teilnahme am Virenmonitoring des Projektes „Zukunft Biene 2“ anmelden! *Bienen Aktuell*, Jahrgang 12, Mai: 11.

Brodschneider R, Moosbeckhofer R, Crailsheim K (2018) Winterverluste 2016/17: Vergleich der Überwinterung mit unterschiedlichen Betriebsweisen. *Bienen Aktuell*, Jahrgang 12, April: 20-23.

Crailsheim K, Moosbeckhofer R, Morawetz L, Schühly W, Brodschneider R (2018) Zukunft Biene 2014-2017 – Ein Forschungsprojekt zur Gesundheit der Biene. *Land & Raum*, 1: 14-15.

Projektbezogene Nennungen in den Medien

derstandard.at. 15.04.2018. Köstinger für EU-Verbot des "Bienenkillers" Neonicotinoide.

<https://derstandard.at/2000077970084/NeonicotinoideKoestinger-will-EU-Verbot-der-Bienenkiller-zustimmen>

Der Standard. 16.04.2018. EU will „Bienenkiller“ von Feldern verbannen.

Kleine Zeitung. 17.04.2018. Der lange Kampf gegen das Bienensterben.

uni.on. 25.06.2018. Guter Bienen-Winter. <https://on.uni-graz.at/de/detail/article/guter-bienen-winter/>

Kurier. 25.06.2018. Bienen trotzten Winter besser.

orf.at. 25.06.2018. Guter Winter für die Bienen.

tt.com. 25.06.2018. Zoologen meldeten geringere Winterverluste bei Bienen in Österreich.

<http://www.tt.com/panorama/natur/14516486-91/zoologen-meldeten-geringere-winterverluste-bei-bienen.csp>

kleinezeitung.at. 25.06.2018. Bienen überstanden den Winter diesmal gut.

https://www.kleinezeitung.at/steiermark/5453013/Geringe-Verluste_Bienen-ueberstanden-den-Winter-diesmal-gut

science.apa.at. 25.06.2018. Zoologen meldeten geringere Winterverluste bei Bienen in Österreich.

https://science.apa.at/site/bildung/detail?key=SCI_20180625_SCI39391351443029838

krone.at. 25.06.2018. Steirische Bienen haben den Winter gut überstanden. <https://www.krone.at/1729230>

wienerzeitung.at. 25.06.2018. Zoologen meldeten geringere Winterverluste bei Bienen.

https://www.wienerzeitung.at/themen_channel/wissen/natur/973077_Zoologen-meldeten-geringere-Winterverluste-bei-Bienen.html

krone.at. 25.06.2018. Nur 12% der Bienenvölker überlebten Winter nicht. <https://www.krone.at/1729251>

aiz.info. 25.06.2018. Guter Winter für heimische Honigbienenvölker. <https://aiz.info/?+Guter-Winter-fuer-heimische-Honigbienenvoelker+&id=2500,,,2028,,Y2lkPTEeNTEzMDk>

arf.at. 25.06.2018. Honigbienenvölker, und der Winter. <http://www.arf.at/?p=290018>

Kronen Zeitung. 26.06.2018. Unsere „Sumsis“ im Höhenflug: Fast alle überlebten den Winter.

derstandard.at. 26.06.2018. Geringere Winterverluste bei Bienen in Österreich.

<https://derstandard.at/2000082218798/Geringere-Winterverluste-bei-Bienen-in-Oesterreich>

Neues Volksblatt. 26.06.2018. Gute Nachricht.

Kronen Zeitung. 26.06.2018. Gutes Bienenjahr: Kaum Verluste.

Land & Leute. 26.06.2018. Bienen: Heuer weniger Verluste.

nachrichten.at. 26.06.2018. Bienen: Heuer weniger Verluste.

bauernzeitung.at. 26.06.2018. Guter Winter für heimische Honigbienenvölker.

<http://www.bauernzeitung.at/guter-winter-fuer-heimische-honigbienenvoelker/>

topagrar.at. 26.06.2018. Guter Winter für heimisch Honigbienenvölker.

Tiroler Tageszeitung. 26.06.2018. Mehr Bienen überlebten Winter.

wien.orf.at. 27.06.2018. Rekorde bei Honigernte. <https://wien.orf.at/news/stories/2921129/>

blickinsland.at. 27.06.2018. Wintersterblichkeit bei Honigbienen ging zurück.

<https://blickinsland.at/wintersterblichkeit-bei-honigbienen-ging-zurueck/>

Kurier. 03.07.2018. Ein mageres Jahr für die Bienen.

Literaturzitate

- Alburaki M, Cheaib B, Quesnel L, Mercier P-L, Chagnon M, Derome N. (2016) Performance of honeybee colonies located in neonicotinoid-treated and untreated cornfields in Quebec. *J. of Applied Entomology*. **141**, 112–121, Doi: 10.1111/jen.12336.
- Amdam FV, Hartfelder K, Norberg K, Hagen A, Omholt SW. (2004) Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *J. of Economic Entomology* **97**, 741–747.
- Amiri E, Meixner M, Nielsen SL, Kryger P. (2015) Four Categories of Viral Infection Describe the Health Status of Honey Bee Colonies. *PLOS ONE* **10**(10), e0140272.
- Anderson DL. (1984) A comparison of serological techniques for detecting and identifying honeybee viruses. *J. of Invertebrate Pathology* **44**, 233–243.
- Annoscia D, Brown S, Di Prisco G, De Paoli E, Del Fabbro S, Zanni V, Galbraith D, Caprio E, Grozinger CM, Pennacchio F, et al. (2018) Haemolymph removal by the parasite *Varroa destructor* can trigger the proliferation of the deformed wing virus in mite infested bees (*Apis mellifera*), contributing to enhanced pathogen virulence. *bioRxiv*, 257667.
- Benaets K, Van Geystelen A, Cardoen D, De Smet L, de Graaf DC, Schoofs L, Larmuseau MHD, Brettell LE, Martin SJ, Wenseleers T. (2017) Covert deformed wing virus infections have long-term deleterious effects on honeybee foraging and survival. *Proceedings of the Royal Society B* **284**, 20162149.
- Berényi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Köglberger H, Nowotny N. (2006) Occurrence of Six Honeybee Viruses in Diseased Austrian Apiaries. *Applied & Environmental Microbiology* **72**(4), 2414–2420.
- Berthoud H, Imdorf A, Haueter M, Radloff S, Neumann P. (2010) Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). *J. of Apicultural Research* **49**(1), 60–65.
- Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, Ohlemüller R., Edwards M, Peeters T, Schaffers AP, Poots SG, Kleukers R, Thomas CD, Settele J, Kunin WE. (2006) Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* **313**, 351–354.
- Blanchard P, Ribière M, Celle O, Lallemand P, Schurr F, Olivier V, Iscache AL, Faucon JP. (2007) Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. *J. of Virological Methods* **141**(1), 7–13.
- Blanchard P, Schurr F, Celle O, Cougoule N, Drajnudel P, Thiéry R, Faucon JP, Ribière M. (2008) First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *J. of Invertebrate Pathology* **99**(3), 348–50
- Blanchard P, Guillot S, Antúñez K, Köglberger H, Kryger P, de Miranda JR, Franco S, Chauzat M-P, Thiéry R, Ribière M. (2014) Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan® assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies. *J. of Virological Methods* **197**, 7–13.
- Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A. (1999) The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera* L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni*. *J. of Invertebrate Pathology* **73**(1), 101-106.
- Brodtschneider R, Crailsheim K. (2011) Völkerverluste der Honigbiene: Risikofaktoren für die Bestäubungssicherheit in Österreich. *Entomologica Austriaca* **18**, 73-86.
- Brodtschneider R, Crailsheim K. (2013) Fünf Jahre Untersuchung des Bienensterbens in Österreich. *Entomologica Austriaca* **20**, 195–205.

Brodschneider R, Gray A, Adjlane N, Ballis A, Brusbardis V, Charrière J.D., Chlebo R, Coffey MF, Dahle B, de Graaf DC, Dražić MM, Evans G, Fedoriak M, Forsythe I, Gregorc A, Grzeda U, Hetzroni A, Kauko L, Kristiansen P, Martikkala M, Martín-Hernández R, Medina-Flores CA, Mutinelli F, Raudmets A, Ryzhikov VA, Simon-Delso N, Stevanovic J, Uzunov A, Vejsnaes F, Wohl S, Zammit-Mangion M, Danihlik J. (2018a) Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. *J. of Apicultural Research* **57**(3), 452–457.

Brodschneider R, Gray A, van der Zee R, Adjlane N, Brusbardis V, Charrière J-D, Chlebo R, Coffey MF, Crailsheim K, Dahle B, Danihlik J, Danneels E, de Graaf DC, Dražić MM, Fedoriak M, Forsythe I, Golubovski M, Gregorc A, Grzeda U, Hubbuck I, İvgin Tunca R, Kauko L, Kilpinen O, Kretavicius J, Kristiansen P, Martikkala M, Martín-Hernández R, Mutinelli F, Peterson M, Otten C, Ozkirim A, Raudmets A, Simon-Delso N, Soroker V, Topolska G, Vallon J, Vejsnæs F & Woehl. S (2016) Preliminary analysis of loss rates of honey bee colonies during winter 2015/16 from the COLOSS survey, *J. of Apicultural Research*, **55**, 5, 375–378, DOI: 10.1080/00218839.2016.1260240.

Brodschneider R, Kalcher-Sommersguter E, Klinger S. (2018b) Wintersterblichkeit. In: Zukunft Biene: Grundlagenforschungsprojekt zur Förderung des Bienenschutzes und der Bienengesundheit. Endbericht. <http://www.zukunft-biene.at>.

Brodschneider R, Moosbeckhofer R, Crailsheim K. (2010) Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol. *J. of Apicultural Research* **49**(1), 23–30.

Budge GE, Garthwaite D, Crowe A, Boatman ND, Delaplane KS, Brown MA, Thygesen HH, Pietravalle S. (2015a) Evidence for pollinator cost and farming benefits of neonicotinoid seed coatings on oilseed rape. *Scientific Reports* **5**, 12574.

Budge GE, Pietravalle S, Brown M, Laurenson L, Jones B, Tomkies V, Delaplane KS. (2015b) Pathogens as predictors of honey bee colony strength in England and Wales. *PLOS One* **10**, e0133228.

Cameron SA, Lozier JD, Strange JP, Koch JB, Cordes N, Solter LF, Griswold TL. (2011) Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *PNAS* **108**, 662–667.

Carreck NL, Ball BV, Martin SJ. (2010) Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. *J. of Apicultural Research* **49**(1), 93–94.

Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M. (2006) A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in varroa mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *J. of Invertebrate Pathology* **91**, 69–73.

Chauzat M-P, Jacques A, EPILOBEE Consortium, Laurent M, Bougeard S, Hendrikx P, Ribière-Chabert M. (2016) Risk indicators affecting honeybee colony survival in Europe: one year of surveillance. *Apidologie* **47**, 348–378.

Chen YP, Pettis JS, Evans JD, Matthew K, Feldlaufer MF. (2004) Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie* **35**, 441–448.

Chen YP, Higgins JA, Feldlaufer MF (2005) Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Applied & Environmental Microbiology* **71**(1), 436–441.

Chen YP, Siede R. (2007) Honey Bee Viruses. *Advances in Virus Research* **70**, 33–80.

Clermont A, Eickermann M, Kraus F, Hoffmann L, Beyer M. (2015a): Correlations between land covers and honey bee colony losses in a country with industrialized and rural regions. *Science of the Total Environment* **532**, 1–13.

Clermont A, Pasquali M, Eickermann M, Kraus F, Hoffmann L, Beyer M. (2015b) Virus status, *Varroa* levels, and survival of 20 managed honey bee colonies monitored in Luxembourg between the summer of 2011 and the spring of 2013. *J. of Apicultural Science* **59**, DOI: 10.1515/jas -2015-0005.

Cornman RS, Tarpay DR, Chen Y, Jeffreys L, Lopez D, Pettis JS, vanEngelsdorp D, Evans JD. (2012) Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLOS One* **7**(8): e43562. doi:10.1371/journal.pone.0043562.

Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan P-L, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI. (2007) A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science* **318**(5848), 283–287.

Dahle B. (2010) The role of *Varroa destructor* for honey bee colony losses in Norway. *J. of Apicultural Research* **49**, 124–125.

Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P. (2012a) Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. *PLOS ONE* **7**(2), e32151.

Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P. (2012b) Dead or Alive: Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* Reduce the Life Span of Winter Honeybees. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(4), 981–987.

DeGrandi-Hoffman G, Ahumada F, Graham H. (2017) Are Dispersal Mechanisms Changing the Host–Parasite Relationship and Increasing the Virulence of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Managed Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies? *Environmental Entomology*, **46**, 737–746.

De Miranda JR, Cordon G, Budge G. (2010) The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J. of Invertebrate Pathology* **103**, Supplement, S30–S47.

De Miranda JR, Bailey L, Ball BV, Philippe B, Budge GE, Chejanovsky N, Chen YP, Gauthier L, Genersch E, De Graaf D, Ribière M, Ryabov E, De Smet L, Van der Steen JJM. (2013) Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. In V Dietemann, Ellis JD, Neumann P (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. *J. of Apicultural Research* **52**(4).

Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, Gargiulo G, Pennacchio F. (2013) Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and retards replication of a viral pathogen in honey bees. *PNAS* **110**, 18466–18471.

Döke MA, Frazier M, Grozinger CM. (2015) Overwintering honey bees: biology and management. *Current Opinion in Insect Science* **10**, 185–193.

Dussaubat C, Maisonnasse A, Crauser D, Tchamitchian S, Bonnet M, Cousin M, Kretzschmar A, Brunet J-L, Le Conte Y. (2016) Combined neonicotinoid pesticide and parasite stress alter honeybee queens' physiology and survival. *Scientific Reports* **6**, 31430. DOI: 10.1038/srep31430

Flügel H-J (2015) Von COLUMELLA bis CCD – das Bienensterben im Wandel der Zeit (Hymenoptera: Apidae). *Entomologische Zeitschrift* **125**, 27–40.

Gallai N., Salles J-M, Settele J, Vaissière BE. (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* **68**, 810–821.

Genersch E, von der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, Berg S, Ritter W, Mühlen W, Gisder S, Meixner M, Liebig G, Rosenkranz P. (2010) The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* **41**(3), 332–352.

Girsch L, Moosbeckhofer R. (2012) Untersuchungen zum Auftreten von Bienenverlusten in Mais- und Rapsanbaugeländen Österreichs und möglicher Zusammenhänge mit Bienenkrankheiten und dem Einsatz

von Pflanzenschutzmitteln. Abschlussbericht („MELISSA“; Dafne Proj. Nr. 100472);
https://www.dafne.at/dafne_plus_homepage/download.php?t=ProjectReportAttachment&k=2661

Goulson D. (2013) An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. of Applied Ecology* **50**(4), 977–987.

Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. (2015) Combined stress from parasites, pesticides and lack of flowers drives bee declines. *Science* **347** (6229).

Hall TA. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98.

Hernández López J, Krainer S, Engert A, Schuehly W, Riessberger-Gallé U, Crailsheim K. (2017) Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae. *Scientific Reports* **7**, 40853.

Highfield AC, Nagar AE, Mackinder LCM, Noel LM-LJ, Hall MJ, Martin SJ, Schroeder DC. (2009) Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(22), 7212–7220.

Höhle M. (2017) binomSamSize: Confidence Intervals and Sample Size Determination for a Binomial Proportion under Simple Random Sampling and Pooled Sampling. R package version 0.1-5.

Jacques A, Laurent M, EPILOBEE Consortium, Ribière-Chabert M, Saussac M, Bougeard S, et al., (2017) A pan-European epidemiological study reveals honey bee colony survival depends on beekeeper education and disease control. *PLOS ONE* **12**(3), e0172591. doi:10.1371/journal.pone.0172591

Jamnikar-Ciglencéki U, Toplak I. (2012) Development of a real-time RT-PCR assay with TaqMan probe for specific detection of acute bee paralysis virus. *J. of Virological Methods* **184**(1-2), 63–68.

Kearns CA, Inouye DW, Waser NM. (1998) Endangered mutualism: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**, 83-112.

Kielmanowicz MG, Inberg A, Lerner IM, Golani Y, Brown N, Turner CL, et al. (2015) Prospective Large-Scale Field Study Generates Predictive Model Identifying Major Contributors to Colony Losses. *PLOS Pathogens* **11**(4), e1004816.

Köglberger H, Narath SH, Stüger HP, Derakhshifar I, Moosbeckhofer R. (2009) Das Auftreten von Viren und anderen Krankheitserregern der Honigbiene im Jahresverlauf. *Bienenaktuell* **3**(11), 15–19.

Kralj J, Fuchs S. (2006) Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie* **37**, 577–587.

Kralj J, Brockmann A, Fuchs S, Tautz J. (2006) The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *J. of Comparative Physiology A* **193**(3), 363–70.

Kuchling S, Kopacka I, Kalcher-Sommersguter E, Schwarz M, Crailsheim K, Brodschneider R. (2018) Investigating the role of landscape composition on honey bee colony winter mortality: A long-term analysis. *Scientific Reports* **8**, 12263.

Lamp B, Riedel C, Roman-Sosa G, Heimann M, Jacobi S, Becher P, Thiel H, Rümenapf T. (2011) Biosynthesis of classical swine fever virus nonstructural proteins. *J. of Virology* **85**, 3607–3620.

Lamp B, Url A, Seitz K, Eichhorn J, Riedel C, Sinn L, Indik S, Köglberger H, Rümenapf T. (2016) Construction and rescue of a molecular clone of Deformed wing virus (DWV). *PLOS ONE* **11**(11), e0164639.

- Lee KV, Steinhauer N, Rennich K, Wilson ME, Tarpay DR, Caron DM, Rose R, Delaplane KS, Baylis K, Lengerich EJ, Pettis J, Skinner JA, Wilkes JT, Sagili R, D. vanEngelsdorp D. (2015) A national survey of managed honey bee 2013-2014 annual colony losses in the USA. *J. of Apicultural Research* **46**, 292–305.
- Locke B, Semberg E, Forsgren E, de Miranda JR. (2017) Persistence of subclinical deformed wing virus infections in honeybees following Varroa mite removal and a bee population turnover. *PLOS ONE* **12**(7), e0180910.
- Maori E, Tanne E, Sela I. (2007) Reciprocal sequence exchange between non-retroviruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. *Virology* **362**, 342–349.
- Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, Nikaido S, Schroeder DC. (2012) Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* **336**, 1304–1306.
- McMahon DP, Natsopoulou ME, Doublet V, Fürst M, Weging S, Brown MJF, Gogol-Döring A, Paxton RJ. (2016) Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. *Proceedings of the Royal Society B* **283**(1833), 20160811.
- McMenamin AJ, Brutscher LM, Glenny W, Flenniken ML. (2016) Abiotic and biotic factors affecting the replication and pathogenicity of bee viruses. *Current Opinion in Insect Science* **16**, 14–21.
- Moosbeckhofer R, Mayr J. (2014) Untersuchungen zur Identifizierung einer möglichen Exposition von Honigbienen gegenüber den Wirkstoffen Clothianidin, Thiamethoxam, Imidacloprid und Fipronil unter Feldbedingungen. Abschlussbericht http://www.ages.at/fileadmin/_migrated/content_uploads/Bienen-Expositionsmonitoring_2013_MO-Gesundheitsreferententagung_2014-vHP.pdf
- Morawetz L, Griesbacher A, Köglberger H, Revilla-Fernández S, Derakhshifar I, Mayr J, Etter K, Steinrigl A, Reisp K, Moosbeckhofer R. (2018) Ursachenforschung zur Wintersterblichkeit durch Posthoc Untersuchungen ausgewählter Proben auf Bienengesundheit und eine vorangegangene Exposition. In: Zukunft Biene: Grundlagenforschungsprojekt zur Förderung des Bienenschutzes und der Bienengesundheit. Endbericht. <http://www.zukunft-biene.at>.
- Moritz RFA, Eler S. (2016) Lost colonies found in a data mine: Global honey trade but not pests or pesticides as a major cause of regional honeybee colony declines. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **216**, 44–50.
- Moritz RFA, De Miranda J, Fries I, Le Conte Y, Neumann P, Paxton RJ. (2010) Research strategies to improve honeybee health in Europa. *Apidologie* **41**, 227–242.
- Nazzi F, Brown SP, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P, Della Vedova G, Cattonaro F, Caprio E, Pennacchio F. (2012) Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLOS Pathogens* **8**, e1002735.
- Neumann P, Carreck NL. (2010) Honey bee colony losses. *J. of Apicultural Research* **49**, 1–6.
- Palacios G, Hui J, Quan PL, Kalkstein A, Honkavuori KS, Bussetti AV, Conlan S, Evans J, Chen YP, vanEngelsdorp D, Efrat H, Pettis J, Cox-Foster D, Holmes EC, Briese T, Lipkin WI. (2008) Genetic analysis of Israel Acute Paralysis Virus: distinct clusters are circulating in the United States. *J. of Virology* **82**, 6209–6217.
- Peng Y, Baer-Imhoof B, Millar AH, Baer B. (2015) Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. *Scientific Reports* **5**, 10565. DOI: 10.1038/srep10565.
- Pettis JS, vanEngelsdorp D, Johnson J, Dively G. (2012) Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* **99**, 153–158.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE. (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution* **25**(6), 345–353.

- R Development Core Team. (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Ribière M, Olivier V, Blanchard P. (2010) Chronic bee paralysis: A disease and a virus like no other? *J. of Invertebrate Pathology* **103**, Supplement, S120–S131.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *J. of Invertebrate Pathology* **103**, Supplement (0), S96–S119.
- Roy C, Vidal-Naquet N, Provost B. (2015) A severe sacbrood virus outbreak in a honeybee (*Apis mellifera* L.) colony: a case report. *Veterinari Medicina* **60**(6), 330–335.
- Rundlöf M, Andersson GKS, Bommarco R, Fries I, Hederström V, Herbertsson L, Jonsson O, Klatt BK, Pedersen TR, Yourstone J, Smith HG. (2015) Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature* **521**, 77–80.
- Ryabov EV, Wood GR, Fannon JM, Moore JD, Bull JC, Chandler D, Mead A, Burroughs N, Evans DJ. (2014) A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or in vitro, transmission. *PLOS Pathogens* **10**, e1004230.
- Seeley TD, Smith ML. (2015) Crowding honeybee colonies in apiaries can increase their vulnerability to the deadly ectoparasite *Varroa destructor*. *Apidologie* **46**(6), 716–727.
- Siede R, Derakhshifar I, Otten C, Berényi O, Bakonyi T, Köglberger H, Büchler R. (2005) Prevalence of Kashmir bee virus in central Europe. *J. of Apicultural Research* **44**(3), 129.
- Staveley JP, Law SA, Fairbrother A, Menzie CA. (2014) A causal analysis of observed declines in managed honey bees (*Apis mellifera*). *Human and Ecological Risk Assessment* **20**, 566–591.
- Steinhauer N, Kulhanek K, Antúnez K, Human H, Chantawannakul P, Chauzat MP. (2018) Drivers of colony losses. *Current Opinion in Insect Science* **26**, 142–148
- Steinhauer NA, Rennich K, Wilson ME, Caron DM, Lengerich EJ, Pettis JS, Rose R, Skinner JA, Tarpay DR, Wilkes JT, vanEngelsdorp D. (2014) A national survey of managed honey bee 2012–2013 annual colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *J. of Apicultural Research* **53**(1), 1–18.
- Stoltz D, Shen XR, Boggis C, Sisson G. (1995) Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *J. of Apicultural Research* **34**, 153–160.
- Switaneck M, Crailsheim K, Truhetz H, Brodschneider R. (2016): Modelling seasonal effects of temperature and precipitation on honey bee winter mortality in a temperate climate. *Science of the Total Environment* **567**, 1581–1587. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.178>
- Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M. (2004) Prevalence and Seasonal Variations of Six Bee Viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* Mite Populations in France. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(12), 7185–7191.
- Traynor KS, Rennich K, Forsgren E, Rose R, Pettis J, Kunkel G, Madella S, Evans J, Lopez D, vanEngelsdorp D. (2016). Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie* **47**(3), 325–347.
- Tsvetkov N, Samson-Robert O, Sood K, Patel HS, Malena DA, Gajiwala PH, et al. (2017). Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science*, **356**(6345), 1395–1397.
- Usuda S, Okamoto H, Iwanari H, Baba K, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. (1999) Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product. *J. of Virological Methods* **80**(1), 97–112.

- van der Zee R, Gray A, Pisa L, De Rijk T. (2015) An Observational Study of Honey Bee Colony Winter Losses and Their Association with *Varroa destructor*, Neonicotinoids and Other Risk Factors. *PLOS ONE* **10**, e0131611. doi:10.1371/journal.pone.0131611.
- van der Zee R, Brodschneider R, Brusbardis V, Charrière J-D, Chlebo R, Coffey MF, Dahle B, Drazic MM, Kauko L, Kretavicius J, Kristiansen P, Mutinelli F, Otten C, Peterson M, Raudmets A, Santrac V, Seppälä A, Soroker V, Topolska G, Vejsnæs F, Gray A. (2014) Results of international standardised beekeeper surveys of colony losses for winter 2012-2013: analysis of winter loss rates and mixed effects modelling of risk factors for winter loss. *J. of Apicultural Research* **53**(1), 19–34.
- van der Zee R, Gray A, Holzmann C, Pisa L, Brodschneider R, Chlebo R, Coffey MF, Kence A, Kristiansen P, Mutinelli F, Nguyen BK, Adjlane N, Peterson M, Soroker V, Topolska G, Vejsnæs F, Wilkins S. (2013) Standard survey methods for estimating colony losses and explanatory risk factors in *Apis mellifera*. In V Diemann; J D Ellis; P Neumann. (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: Standard methods for *Apis mellifera* research. *J. of Apicultural Research* **52**(4), 1–36.
- van der Zee R, Pisa L, Andonov S, Brodschneider R, Charrière J-D, Chlebo R, Coffey MF, Crailsheim K, Dahle B, Gajda A, Gray A, Drazic MM, Higes M, Kauko L, Kence A, Kence M, Kezic N, Kiprijanovska H, Kralj J, Kristiansen P, Martin Hernandez R, Mutinelli F, Nguyen BK, Otten C, Özkirim A, Pernal SF, Peterson M, Ramsay G, Santrac V, Soroker V, Topolska G, Uzunov A, Vejsnæs F, Wei S, Wilkins S. (2012) Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008-9 and 2009-10. *J. of Apicultural Research* **51**(1), 100–114.
- vanEngelsdorp D, Underwood R, Caron D, Hayes JJR. (2007) An estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *American Bee Journal* **147**, 599–603.
- vanEngelsdorp D, Hayes JJR, Underwood RM, Pettis JS. (2008) A survey of honey bee colony losses in the US, fall 2007 to spring 2008. *PLOS ONE* **3**, e4071.
- vanEngelsdorp D, Hayes JJR, Underwood RM, Pettis JS. (2010) A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2008 to spring 2009. *J. of Apicultural Research* **49**, 7–14.
- vanEngelsdorp D, Hayes J, Underwood RM, Caron D, Pettis J. (2011) A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *J. of Apicultural Research* **50**, 1–10.
- vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpay DR, Pettis JS. (2009) Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLOS ONE* **4**, DOI: 10.1371/journal.pone.0006481
- vanEngelsdorp D, Lengerich E, Spleen A, Dainat B, Cresswell J, Baylis K, Nguyen BK, Soroker V, Underwood R, Human H, Le Conte Y, Saegerman C. (2013) Standard epidemiological methods to understand and improve *Apis mellifera* health. *J. of Apicultural Research* **52**, 1–16.
- Williams GR, Tarpay DR, vanEngelsdorp D, Chauzat M-P, Cox-Foster DL, Delaplane KS, Neumann P, Pettis JS, Rogers REL, Shutler D. (2010) Colony Collapse Disorder in context. *Bioessays* **32**, 845–846.
- Williams GR, Troxler A, Retschnig G, Roth K, Yanez O, Shutler D, Neumann P, Gauthier L. (2015) Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. *Scientific Reports* **5**, 14621.
- Woodcock BA, Isaac NJB, Bullock JM, Roy DB, Garthwaite DG, Crowe A, Pywell RF. (2016). Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England. *Nature Communications* **7**, 12459. DOI: 10.1038/ncomms12459
- Woodcock BA, Bullock JM, Shore RF, Heard MS, Pereira MG, Redhead J, Ridding L, Dean H, Sleep D, Henrys P, Peyton J, Hulmes S, Hulmes L, Sárospataki M, Saure C, Edwards M, Genersch E, Knäbe S, Pywell RF. (2017) Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science* **356**, 1393–1395.

Wu-Smart J, Spivak M. (2016) Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Scientific Reports* **6**, 32108.

Yue C, Schröder M, Gisder S, Genersch E. (2007) Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *J. of General Virology*, **88**, 2329–2336.