

Aus dem Institut für
Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig–Maximilians–Universität München

Vorstand: Prof. Dr. K. Pfister

Angefertigt unter der Leitung von
Dr. Dr. F. Just

Zur Epidemiologie arthropodenübertragener Viroser der Honigbiene, *Apis mellifera*, in Bayern

Inaugural–Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig–Maximilians–Universität München

von
Dalia Zohni

aus
Berlin–Wedding

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Univ.-Prof. Dr. K. Pfister
1. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Köstlin
2. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Peters
3. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
4. Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. A. Neubauer

Tag der Promotion: 28. Juli 2006

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Aufgabenstellung	1
2. Einführung (Schrifttum)	3
2.1 Grundlagen der Biologie der Honigbiene	3
2.2 Bienenpathogene Viren	7
2.2.1 Übersicht und Systematik	7
2.2.2 RNA-Viren	9
2.2.2.1 Die Gattung <i>Iflavirus</i>	10
2.2.2.1.1 <i>Sacbrood virus</i> (SBV).....	11
2.2.2.2 Die Familie <i>Dicistroviridae</i>	13
2.2.2.2.1 <i>Black queen cell virus</i> (BQCV)	15
2.2.2.2.2 <i>Acute bee paralysis virus</i> (ABPV)	16
2.2.2.3 RNA-Viren mit unklarem taxonomischen Status („unassigned species“)	17
2.2.2.3.1 Chronic bee paralysis virus (CBPV)	17
2.2.2.3.2 Deformed wing virus (DWV)	18
2.2.2.3.3 Kashmir bee virus (KBV)	20
2.2.3 DNA-Viren	22
2.2.3.1 Apis-iridescent virus (AIV)	22
2.2.3.2 Filamentous virus (FV)	22
2.3 <i>Varroa destructor</i> ANDERSON & TRUEMAN, 2000	23
2.3.1 Spezies innerhalb der Gattung <i>Varroa</i>	23
2.3.2 Morphologie	25
2.3.3 Entwicklung	26
2.3.4 Epidemiologie und Vorkommen	28
2.3.5 Pathogenese	29
2.3.6 Diagnose	30
2.3.7 Therapie	33
2.4 <i>Nosema apis</i> ZANDER, 1909	37
2.4.1 Morphologie	37
2.4.2 Entwicklung	38
2.4.3 Epidemiologie und Vorkommen	40
2.4.4 Pathogenese	41
2.4.5 Diagnose	42
2.4.6 Therapie	43
3. Material und Methoden	45
3.1 Probenmaterial	45
3.2 Virusnachweis	47
3.2.1 RNA-Isolierung	47
3.2.1.1 RNA-Isolierung aus Bienen	47
3.2.1.2 RNA-Isolierung aus Milben	47
3.2.2 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	48
3.2.2.1 Reaktionsansätze und Kontrollen	48

3.2.2.2 Primer und RT-PCR-Konditionen	48
3.2.2.2.1 BQCV	48
3.2.2.2.2 KBV	49
3.2.2.2.3 DWV	50
3.2.3 Gelelektrophorese und Sequenzierung von PCR-Produkten	51
3.3 Nachweis von <i>Nosema apis</i> und <i>Nosema ceranae</i>	52
3.3.1 Mikroskopischer Nachweis von Mikrosporidien-Sporen	52
3.3.2 Mikrosporidien-PCR	52
3.3.2.1 Methoden der DNA-Isolierung	52
3.3.2.2 Primer und PCR-Konditionen	53
3.3.2.2.1 Spezies-spezifische Mikrosporidien-PCR	53
3.3.2.2.2 Universelle Mikrosporidien-PCR	54
3.4 Statistische Methoden	54
4. Ergebnisse	55
4.1 Virusnachweis	55
4.1.1 Virusnachweis in Bienen	55
4.1.1.1 Nachweis des <i>Black queen cell virus</i> (BQCV)	55
4.1.1.2 Nachweis des Deformed wing virus (DWV)	59
4.1.1.3 Nachweis des Kashmir bee virus (KBV)	62
4.1.1.4 Mehrfachinfektionen	63
4.1.2 Virusnachweis in Milben	64
4.1.2.1 Nachweis des <i>Black queen cell virus</i> (BQCV)	64
4.1.2.2 Nachweis des Deformed wing virus (DWV)	64
4.1.2.3 Nachweis des Kashmir bee virus (KBV)	64
4.1.2.4 Mehrfachinfektionen	69
4.2 Mikrosporidiennachweis	70
4.2.1 Mikroskopischer Nachweis von Mikrosporidien-Sporen	70
4.2.2 Mikrosporidien-PCR	71
4.2.2.1 <i>Nosema apis</i> -spezifische PCR	71
4.2.2.2 Universelle Mikrosporidien-PCR	73
5. Diskussion	74
6. Zusammenfassung	82
7. Summary	83
8. Literaturverzeichnis	84
9. Anhang	97
9.1 Abbildungsnachweise	97
9.2 Aufruf zur Einsendung von Bienenproben	98
9.3 Merkblatt über die Einsendung von Bienenproben	99
9.4 Untersuchungsantrag	100
9.5 Rohdaten	102

Danksagungen

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Seit einigen Jahren beklagen Imker im gesamten deutschen Bundesgebiet periodisch auftretende, teils massive Völkerverluste. Nach Ausfällen von über 30% im Jahr 1997/1998 (Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, 2003) brachen im Winter 2002/2003 erneut 29% aller Bienenvölker zusammen (Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, 2003a). Verschiedenste Ursachen für „das Sterben der Bienen“ wurden in Medien und Öffentlichkeit kontrovers und teilweise sehr emotional diskutiert. Ein Hauptverdacht richtet sich gegen die in der Landwirtschaft angewendeten Pflanzenschutzmittel wie das Pestizid Gaucho® und seinen Wirkstoff Imidacloprid. Daneben sind der mittlerweile überall auftretende und schwer zu bekämpfende Bienenparasit *Varroa destructor* und die mit ihm in Zusammenhang gebrachten Krankheitserreger wichtige Kandidaten. Weitere mögliche Ursachen sind schlechte Witterungsverhältnisse in den entsprechenden Jahren, ein mangelndes Nahrungsangebot, insbesondere eine unzureichende Versorgung der Bienenbrut mit Pollen, sowie eine nicht optimale Betriebsweise des Imkers.

Bislang ist es nicht gelungen, die Bedeutung der einzelnen Faktoren für das Bienensterben aufzuklären. Aus veterinärmedizinischer Sicht ist unser Wissen über Bienenkrankheiten verursachende Krankheitserreger wie Viren, Mikrosporidien und eukaryontische Bienenparasiten sehr begrenzt und deshalb von wachsendem Interesse. Insgesamt 18 verschiedene Virenspezies wurden seit den frühen 1960er Jahren bei der Honigbiene identifiziert, aber Daten über ihre Verbreitung in Deutschland und die Pathogenität einheimischer Virusisolate sind unzureichend bekannt.

Eine sinkende Bienendichte birgt immense Folgen für Wirtschaft und Umwelt in sich. Die wirtschaftliche Bedeutung, die der deutschen Imkerschaft durch die Vermarktung von Honig, Wachs, Propolis, Pollen, Gelée royale und Bienengift zukommt, ist beachtenswert. So erbringt der jährliche Honigertrag von 30 000 t in der BRD einen Gewinn von 200 bis 250 Mio. € (Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, 2004). Unbezahlbar ist darüber hinaus die Bestäubungsleistung der Honigbiene und ihre Bedeutung für unsere einheimischen Kultur- und Wildpflanzen. In den gemäßigten Klimazonen stellen Bienen die Hauptbestäuber von Blütenpflanzen dar und leisten einen unverzichtbaren Beitrag für die Produktion von Obst und Gemüse, sowie zur Erhaltung der Artenvielfalt in unserer einheimischen Natur.

Bedauerlicherweise spielt der „Patient“ Honigbiene im Studium der Tiermedizin noch immer eine untergeordnete Rolle und wird nur am Rande behandelt. Dabei gebührt der Biene aus veterinärmedizinischer Sicht entschieden mehr Aufmerksamkeit. Sie gehört laut §1, Abs. 2 Nr. 2 des Tierseuchengesetzes vom 22. Juni 2004 zu den Haustieren und zählt als Produzentin des Honigs zu den Lebensmittel liefernden Tieren. Folglich sollte der Tierarzt – nicht nur der beamtete – mit der Haltung von Bienen und der Diagnose, Therapie und Prophylaxe von Bienenkrankheiten, dem Bienenseuchengesetz sowie den Einfuhrbestimmungen für Bienen vertraut sein.

Das geringe Wissen um die Verbreitung von Bienenviren und ihre Bedeutung für die Bienengesundheit gaben den Anstoß zu dieser epidemiologischen Studie. Untersuchungen zur Prävalenz von Bienenviren in Bayern liegen derzeit nicht vor. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es daher, heimische Bienenvölker und Varroamilben auf eine Infektion mit drei exemplarisch ausgewählten Viren, dem *Black queen cell virus* (BQCV), dem Deformed wing virus (DWV) und dem Kashmir bee virus (KBV) zu untersuchen und die Prävalenzen dieser Viren für Bayern und seine Landkreise mit molekularbiologischen Methoden abzuschätzen. Des Weiteren sollten Bienenvölker auf eine Infektion mit den Mikrosporidien *Nosema apis* und *N. ceranae* untersucht und eine mögliche Korrelation zwischen Mikrosporidien- und Virusinfektionen bestimmt werden.

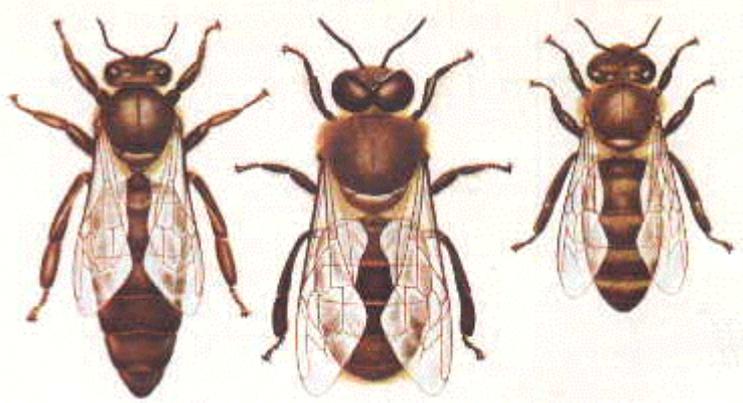
2. Einführung (Schrifttum)

2.1 Grundlagen der Biologie der Honigbiene

Eine umfassende Darstellung der Biologie der Honigbiene würde den Rahmen der hier vorliegenden veterinärmedizinischen Arbeit sprengen, so dass auf einschlägige Monographien und Lehrbücher der Entomologie verwiesen werden muss (v. Frisch, 1959; Kästner, 1973; Siewing, 1980; Zander und Böttcher, 1989). Für ein leichteres Verständnis der in der Folge dargestellten Krankheitsprozesse, sowie der imkerlichen und tierärztlichen Maßnahmen im Zusammenhang mit Infektionskrankheiten der Honigbiene, wird an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die Organisation eines Bienenvolkes sowie die Entwicklung und das Arbeitsleben einer Einzelbiene gegeben.

Die Honigbiene, *Apis mellifera*, ist seit Generationen ein Lehrbeispiel für das Phänomen staatenbildender Insekten. Innerhalb eines Volkes sind drei morphologisch unterscheidbare Kasten anzutreffen, die unterschiedliche Aufgaben im Bienenstaat erfüllen (vgl. Abb. 1). An der Spitze des Volkes steht eine einzelne Bienenkönigin (Weisel), die während ihrer (natürlichen) Lebenszeit von bis zu vier Jahren die gesamte Nachkommenschaft des Volkes erzeugt. Vom zeitigen Frühjahr an werden 1500 bis 2000 Brutzellen pro Tag mit einem Ei belegt. Die Biomasse der täglich zu produzierenden Eier überschreitet in der Phase der stärksten Volksentwicklung das Eigengewicht der Königin. Sie nimmt deshalb außer der Legetätigkeit keine weiteren Aufgaben wahr und ist auf die ständige Nahrungszufuhr und Pflege durch Arbeiterinnen angewiesen. Die Kaste der Arbeiterinnen besteht aus 40 – 70 000 (100 000) Individuen, die sämtliche Arbeiten innerhalb und außerhalb des Bienenstockes (Beute), wie die Pflege und Aufzucht von Larven, den Nestbau, die Feindabwehr und das Einbringen und die Einlagerung von Wasser und Nahrung (Nektar und Pollen), ausführt. Die natürliche Lebenserwartung einer Arbeiterin beträgt im Sommer ca. sechs Wochen. Mit dem Übergang der einheimischen Pflanzen von der Blühphase in die Samenphase (August/September) lässt das natürliche Nahrungsangebot für die Bienen und die Legetätigkeit der Königin nach und versiegt schließlich ganz (Oktober). Die spät im Jahr (Spätsommer und Herbst) aufgezogenen Arbeiterinnen überwintern mit der Königin bei reduziertem Stoffwechsel in der sog. „Wintertraube“ und haben hierdurch eine verlängerte Lebenserwartung von vier bis sieben Monaten. Sie sichern das Überleben der Königin während des Winters und ziehen vor ihrem eigenen Tod die

erste Brut des zeitigen Frühlings auf. Die Zahl und Gesundheit der Winterbienen ist entscheidend für das Fortbestehen und die Stärke eines Bienenvolkes in der nächsten Vegetationsperiode. Die dritte Kaste eines Bienenvolkes – die Drohnen – besteht aus 500 - 2000 Einzeltieren und wird nur zur Zeit der Königinnennachzucht (April – Juli) im Stock angetroffen. Die Drohnen sind (ebenso wie die Königin) nur auf die Reproduktion spezialisiert und übernehmen keine anderen Funktionen. Sie sind darauf angewiesen von Arbeiterinnen gefüttert und im Stock geduldet zu werden. Die Begattung der Jungköniginnen erfolgt außerhalb des Stockes auf sog. Hochzeitsflügen von denen die Masse der Drohnen nicht zurückkehrt. Im Stock verbliebene oder später schlüpfende Drohnen werden von den Arbeiterinnen ausgehungert und in der sog. Drohnenschlacht aus dem Stock gejagt (Kästner, 1973).



Königin (Weisel)

Drohn

Arbeiterin

Abbildung 1: Kasten der Honigbiene *Apis mellifera*

Die Determination der Kasten erfolgt genetisch und trophogen, wobei zahlreiche Schlüsselreize und Instinkthandlungen eine Rolle spielen. Arbeiterinnen und Jungköniginnen entwickeln sich aus befruchteten Eiern, während Drohnen aus unbefruchteten Eiern hervorgehen. Die „Entscheidung“ über eine Befruchtung obliegt der Königin, die bei der Eiablage über ein Receptaculum seminis selektiv Sperma zugeben kann. Ihre „Entscheidung“ ist jedoch im Sinne einer Instinkthandlung eine Reaktion auf die Art der vorgefundenen Brutzelle. Die Brutzellen für Drohnen haben größere Durchmesser als die für Arbeiterinnen. Ebenso sind Königinnenzellen (syn: Weiselzellen) am Rande normaler Waben angebracht, bautechnisch besonders auffällige Gebilde von besonderer Größe. Die Art der Brutzelle stellt einen

Schlüsselreiz für das jeweilige Eiablageverhalten der Königin dar und die Vorgabe bestimmter vorgefertigter Waben durch den Imker kann so zur Beeinflussung der Neststruktur genutzt werden (vgl. auch Kap. 2.3.7).

Für die weitere Entwicklung der nach drei Tagen aus den Eiern schlüpfenden Larven ist die Ernährung der ausschlaggebende Faktor. Sog. Ammenbienen füttern die Larven in unterschiedlichen Brutzellen nach einem von zwei verschiedenen „Programmen“. Arbeiterinnen- und Drohnenlarven erhalten drei Tage lang ein energiereiches Gemisch aus Sekreten der Futtersaft- und Mandibeldrüsen („Gelée royale“). Ab dem vierten Tag werden fast ausschließlich Pollen (Bienenbrot) und Honig gegeben, bis die Larven ihr Größenwachstum am sechsten Entwicklungstag beendet haben und sich zu ihrer Metamorphose verpuppen (vgl. Abb. 2). Königinnenlarven werden über den vierten Tag hinaus und 10x häufiger mit Gelée royale versorgt als andere Larven und erhalten damit ungleich mehr Energie, was ihre Entwicklung beschleunigt.

Einen Überblick über die Entwicklungsstadien bei den verschiedenen Kasten gibt Abb. 2. Allen Kasten gemeinsam ist eine Larvalentwicklung von drei Tagen. Das 1,3 bis 1,8 mm lange, stiftförmige Ei steht zunächst senkrecht auf dem Grund des Zellenbodens und neigt sich allmählich. Aus ihm schlüpft am vierten Tag eine Made, die aufgrund ihrer zunächst gekrümmten Haltung als Rundmade bezeichnet wird. Sie häutet sich insgesamt viermal, bevor die Brutzelle am 8. (Königin), 9. (Arbeiterin) bzw. 10. Tag (Drohne) von den Ammenbienen mit einem Wachsdeckel verschlossen wird. Die nun stark gewachsene Made streckt sich in ihrer Zelle aus (Streckmade) und wird zur Vorpuppe. Nach der letzten (5.) Häutung entwickelt sich die Puppe, die eine Metamorphose zur Imago vollzieht. Nach insgesamt 16 Tagen (Königin), 21 Tagen (Arbeiterin) bzw. 24 Tagen (Drohne) ist die Entwicklung mit dem Schlupf aus den Brutzellen abgeschlossen.

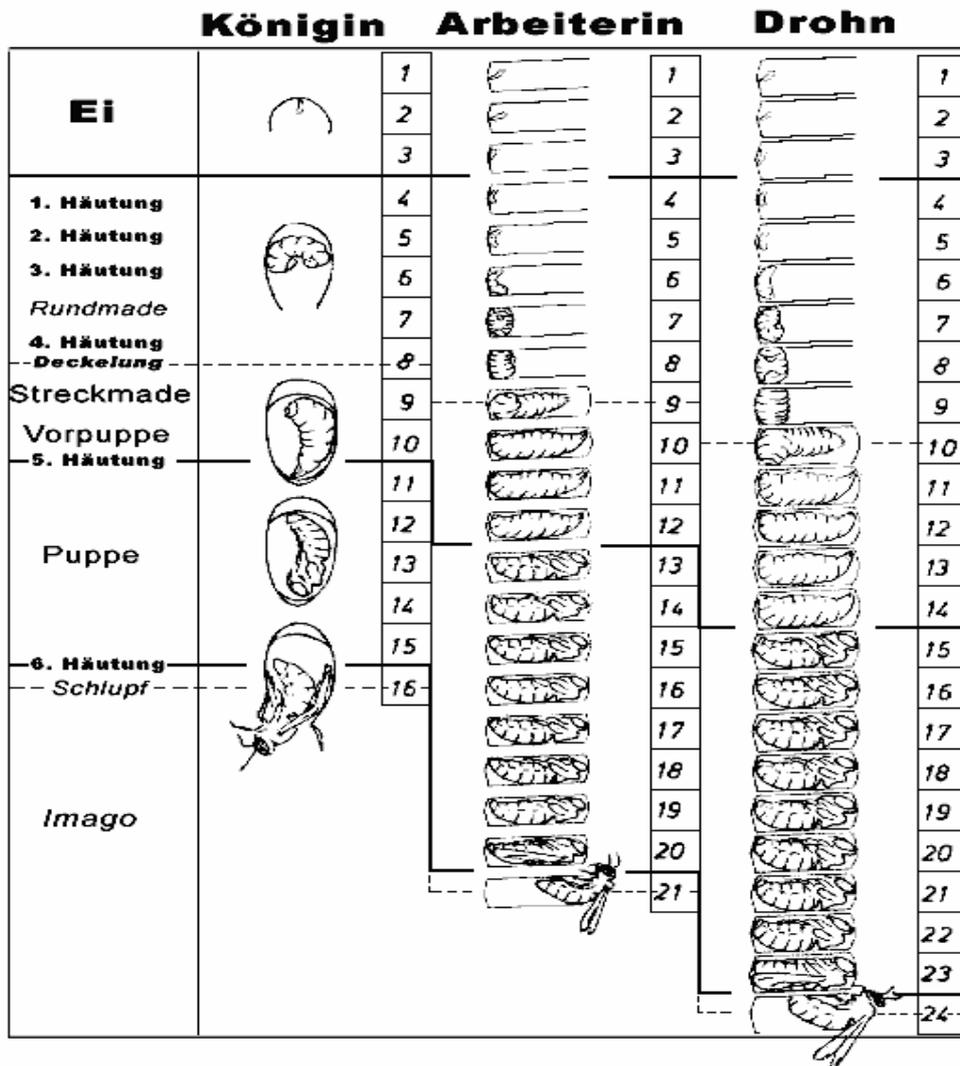


Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf der Entwicklung der Honigbienenkasten

Das kurze Leben einer Arbeiterin (Sommerbiene) ist gekennzeichnet durch Polyethismus, einer zeitlichen Abfolge auswechselbarer Spezialisierungen in ihrem Verhalten (Siewing, 1980). Während ihrer ersten drei Arbeitstage fungiert sie als Putzbiene. Sie reinigt leere Brutzellen und kleidet sie mit Speicheldrüsensekreten aus um sie für die nächste Aufnahme einer Larve vorzubereiten. In der Folge (3.-11. Tag) sind ihre Futtersaftdrüsen (Hypopharynxdrüsen) maximal entwickelt und sie widmet sich als Ammenbiene der Fütterung junger Bienenlarven. Mit der allmählichen Rückbildung der Futtersaftdrüsen intensiviert sich die Tätigkeit ihrer Wachsdrüsen. Etwa vom 12. bis 18. Tag sammeln sich Bienen dieser Altersklasse in sog. Bautrauben innerhalb des Stockes und „schwitzen“ (bei intensiver Wärmeproduktion) an der Unterseite ihres Abomens Wachsplättchen aus, die mit Hilfe der Mundwerkzeuge geknetet und zum Wabenbau verwendet werden. Etwa mit dem Beginn ihrer vierten

Lebenswoche beenden die Arbeiterinnen diese Tätigkeit, schließen sich den Flugbienen an und gehen außerhalb des Nestes auf Nahrungssuche.

2.2 Bienenpathogene Viren

2.2.1 Übersicht und Systematik

Seit der Erstbeschreibung zweier für Bienen pathogener Viren im Jahr 1963 (Bailey *et al.*) wurden bis heute 18 Bienenviren identifiziert und aufgrund unvollständiger Charakterisierung vorläufig klassifiziert (Fauquet *et al.*, 2005). Während die in vitro Kultivierung mangels geeigneter Zellkultursysteme bisher in keinem Fall gelang (Allen und Ball, 1996; Grabensteiner und Nowotny, 2001), konnte in neuerer Zeit mit Hilfe moderner molekularbiologischer Techniken das Genom von sechs dieser Viren entschlüsselt werden. Vollständige Einträge in international zugänglichen Datenbanken liegen für das *Akute Paralyse Virus* (ABPV; Govan *et al.*, 2000; GenBank No.: NC 002548), *Black queen cell virus* (BQCV; Leat *et al.*, 2000; GenBank No.: NC 003784), *Deformed wing virus* (DWV; Lanzi und Rossi, unpublished; GenBank No.: NC 004830), *Kakugo Virus* (KV; Fujiyuki *et al.*, 2004; GenBank No.: NC 005876), *Kaschmir Bienenvirus* (KBV; De Miranda *et al.*, 2004; GenBank No.: NC 004807) und *Sackbrutvirus* (SBV; Ghosh *et al.*, 1999; GenBank No.: NC 002066) vor. Der taxonomische Status vieler Bienenviren ist jedoch bis heute nicht gesichert und Gegenstand kontroverser Diskussion. International anerkannt ist die von dem „International Committee on Taxonomy of Viruses“ (ICTV) vorgenommene Benennung und Klassifizierung der Viren, die in Form regelmäßig aktualisierter Berichte veröffentlicht wird. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die derzeit gültige Systematik der Bienenviren (Fauquet *et al.*, 2005). Nur 15 von den 18 in der Literatur beschriebenen Viren werden im aktuellen Bericht berücksichtigt. 5 Viren werden Virusfamilien zugeordnet, während die Datenlage zu den verbleibenden 10 Viren hierzu bislang nicht ausreicht.

Tabelle 1: Viren der Honigbiene und deren Klassifizierung nach dem 8. Report des International Committee on Taxonomy of Viruses. Definierte Virusspezies und -familien sind kursiv geschrieben

VIRUS	NUKLEIN-SÄURETYP	GRÖSSE (nm)	VIRUS-FAMILIE	REFERENZ
Ägyptisches Bienenvirus (Egypt bee virus; EBV)	RNA	30	unassigned	Bailey <i>et al.</i> , 1979
<i>Akute Paralyse Virus</i> (Acute bee paralysis virus; ABPV)	RNA	30	<i>Dicistroviridae</i> (unassigned species)	Bailey <i>et al.</i> , 1963
Apis-Irideszenz-Virus (Apis iridescent virus; AIV)	DNA	150	<i>Iridoviridae</i>	Bailey <i>et al.</i> , 1976
Arkansas Bienenvirus (Arkansas bee virus; ABV)	RNA	30	unassigned	Bailey und Woods, 1974
Berkeley bee virus (BBV)	RNA	30 (?)	unassigned	Lommel <i>et al.</i> , 1985
Bienenvirus X (Bee virus X; BVX)	RNA	35	unassigned	Bailey und Woods, 1974
Bienenvirus Y (Bee virus Y; BVY)	RNA	35	unassigned	Bailey <i>et al.</i> , 1980b
<i>Black queen cell virus</i> (BQCV)	RNA	30	<i>Dicistroviridae</i>	Bailey und Woods, 1977
Chronische Paralyse Virus (Chronic bee paralysis virus; CBPV)	RNA	20x30-60	unassigned	Bailey <i>et al.</i> , 1963
Cloudy wing virus (CWV)	RNA	17	unassigned	Bailey <i>et al.</i> , 1980a
Chronic bee-paralysis satellite virus (Chronic bee-paralysis virus associate; CBPVA)	RNA	17	unassigned (Satellite virus)	Bailey, 1976
Deformed wing virus (DWV)	RNA	30	unassigned	?
Filamentous virus (FV)	DNA	150 x 450	-	Clark, 1978
Kakugo Virus (KV)	RNA	30	-	Fujiyuki <i>et al.</i> , 2004
Kaschmir Bienenvirus (Kashmir bee virus; KBV)	RNA	30	unassigned	Bailey und Woods, 1977
<i>Sackbrutvirus</i> (<i>Sacbrood virus</i> ; SBV)	RNA	28	Unassigned (G: <i>Iflavirus</i>)	Bailey <i>et al.</i> , 1964
Slow bee paralysis virus (SBPV)	RNA	30	unassigned	Bailey und Woods, 1974
Thai-Sackbrutvirus (Thai sacbrood virus; TSBV)	RNA	30	-	Bailey <i>et al.</i> , 1982

Nur drei Bienenviren, *Acute bee paralysis virus* (ABPV), *Black queen cell virus* (BQCV) und *Sacbrood virus* (SBV) haben den taxonomischen Status einer Virusspezies und werden nach international gültigen Regeln kursiv geschrieben. Zwei Viren, *Apis iridescent virus* (AIV) und *Filamentous virus* (FV), sind DNA Viren, alle anderen bislang entdeckten Bienenviren sind RNA-Viren (Allen und Ball, 1996). Im Folgenden werden die wichtigsten Literaturdaten zu ausgewählten Viren zusammengefasst dargestellt.

2.2.2 RNA-Viren

Mit Ausnahme des Chronic bee-paralysis satellite virus handelt es sich bei allen RNA-Viren der Biene um etwa 17-35 nm große, isometrische und unbehüllte Partikel mit einsträngiger RNA von positiver Polarität ([+]ssRNA). Ähnliche Viren sind von zahlreichen anderen Tierspezies und Pflanzen bekannt und in Ermangelung ausreichender Charakterisierung werden sie in der Literatur unter dem Begriff der „Picorna-like Viruses“ zusammengefasst. Die Gruppierung enthält die Virusfamilien: *Picornaviridae*, *Comoviridae*, *Iflaviridae*, *Dicistroviridae*, *Potyviridae* und *Sequiviridae* (Christian *et al.*, 2005). Die Vertreter dieser Familien besitzen Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer Morphologie (s.o.) und ihres Genomaufbaus. So zeigt die [+]ssRNA u.a. keine überlappenden offenen Leseraster [ORFs] und eine einheitliche Reihenfolge der Gene von Replikationsproteinen: Hel-Pro-RdRP (Helikase, Protease, RNAabhängigeReplikase). Das Genom ist entweder mono- oder dicistronisch angelegt, kodiert also für eine einzelne bzw. zwei Polypeptidketten. Die monocistronischen Viren der Biene werden in der Gattung *Iflavirus* zusammengefasst. Die dicistronischen Bienenviren werden den *Dicistroviridae* mit der einzigen Gattung *Cripavirus* zugeordnet (Mayo, 2002; Fauquet *et al.*, 2005).

Zum heutigen Zeitpunkt sind bei Insekten noch etwa 20 weitere „Picorna-like Viruses“ bekannt, die aufgrund ihrer bisher nur unzureichenden Charakterisierung in keine der oben genannten Virusfamilien eindeutig eingruppiert werden konnten. Sie werden vom ICTV als „unassigned species“ bezeichnet (Christian *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass mehr als die Hälfte der bekannten Bienenviren unter eben diesen „unassigned species“ geführt werden (vgl. Tab. 1), spiegelt den Forschungsbedarf in diesem Bereich der Virologie und Bienenpathologie wider.

2.2.2.1 Die Gattung *Iflavirus*

Die Virionen der Iflaviren sind annähernd kugelförmig, unbehüllt und besitzen einen Durchmesser von etwa 30 nm. Die lineare [+]ssRNA weist eine Gesamtlänge von etwa 8.800-9.700 nt auf. In der Regel besitzen Iflaviren drei Hauptstrukturproteine - VP1, VP2 und VP3. Ausnahmen bilden das *Infectious flacherie virus* (IFV) und das *Perina nuda virus* (PnV), die beide ein viertes, kleineres Strukturprotein (VP4), aufweisen. Das IFV besitzt am 5'-Ende außerdem ein kovalent gebundenes Protein (VPg). Das Genom der Iflaviren (s. Abb. 3) besteht am 5'-Ende aus einem 156-473 nt langen, nicht kodierenden Abschnitt (UTR = untranslated region), dem sich ein großes (8.400-9.500 nt) offenes Leseraster (ORF) anschließt. Am polyadenylierten 3'-Ende des Genoms befindet sich ein weiterer nicht kodierender Abschnitt (UTR) von 45-239 nt Länge. Die Strukturproteine werden von der 5'-Region und die für die Replikation benötigten Proteine (Helikase, Protease, Replikase) von der 3'-Region des Genoms kodiert. Dem Bereich, der für die Strukturproteine kodiert, ist eine Sequenz (L) unbekannter Funktion vorangestellt (s. Abb. 3).

Typspezies der Gattung ist das *Infectious flacherie virus* (IFV) des Seidenspinners (*Bombyx mori*). Zwei weitere Virusarten wurden dieser Gattung sicher zugeordnet: das *Sackbrutvirus* der Honigbienen (SBV) (Ghosh *et al.*, 1999) und das *Perina nuda virus* (PnV) (Wu *et al.*, 2002). Das Deformed wing virus (DWV), das in dieser Arbeit untersucht wird, das Kakugo virus (KV) (Fujiyuki *et al.*, 2004), sowie das Varroa destructor virus 1 (VDV-1; Ongus *et al.*, 2004) besitzen Merkmale der Iflaviren. Ein weiterer möglicher Vertreter der Iflaviren ist das Ectropis obliqua picorna-like virus (EoPV) der Motte *Ectropis obliqua* (Wang *et al.*, 2004).

Alle Iflaviren besitzen ein sehr begrenztes Wirtsspektrum. Das IFV ist bisher nur bei den Schmetterlingen *Bombyx mori* und *Glyphodes pyloalis*, das SBV nur bei der Europäischen Honigbiene (*Apis mellifera*) und das PnV nur bei dem Schmetterling *Perina nuda* nachgewiesen worden. Zur Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung wird nach den Regeln des ICTV das natürliche Wirtsspektrum sowie die Sequenz der hochkonservierten Capsid-Protein-Gene herangezogen.

Iflaviren besitzen Merkmale sowohl der *Picornaviridae* als auch der *Dicistroviridae*. Wie bei Picornaviren ist nur ein ORF angelegt und die Gene der Strukturproteine liegen am 5'-Ende des Genoms. Die Lage des bei einigen Vertretern auftretenden VP4-Gens entspricht dagegen den Verhältnissen bei Dicistroviren (vgl. Abb. 3).

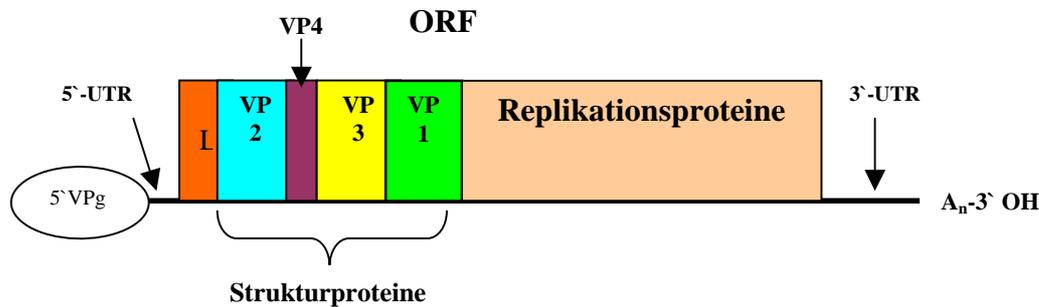
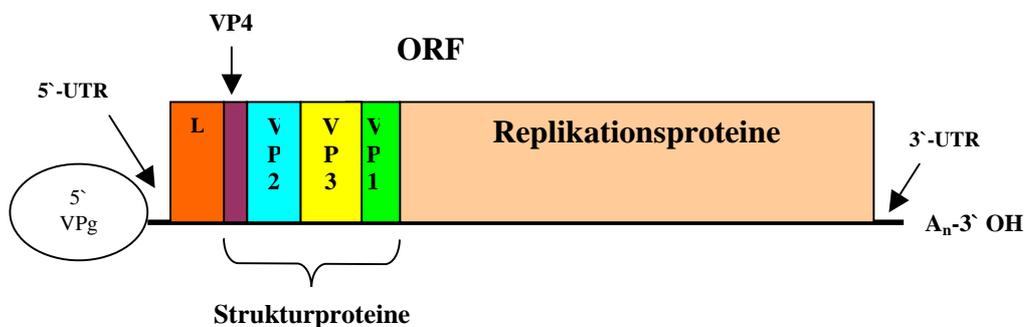
Iflavirus (Invertebrata)**Picornaviridae (Vertebrata)**

Abbildung 3: Vergleichende Schematische Darstellung des Genomaufbaus der „Picorna-like Viruses“ der Gattung *Iflavirus* (Invertebraten) am Beispiel des *Infectious flacherie virus* [IFV] und der *Picornaviridae* (Vertebraten). A_n: poly-A-tail; ORF: open reading frame; UTR: untranslated region; VP1-4: Strukturproteingene; VPg: kovalent gebundenes Protein; L: Region unbekannter Funktion

2.2.2.1.1 *Sacbrood virus* (SBV)

Erste Untersuchungen zur als „Sackbrut“ bezeichneten Erkrankung der Bienenbrut wurden bereits 1913 und 1917 von WHITE durchgeführt. Erst 1964 wurde ein Virus als ursächliches Agens erkannt und teilweise charakterisiert (Bailey *et al.*, 1964; Bailey, 1976). Mit dem SBV infizierte Larven sind nicht in der Lage, sich normal zu verpuppen und sterben im Stadium der Streckmade in bereits verdeckelten Zellen ab (Bailey *et al.*, 1964). Das Virus reichert sich in der Exuvialflüssigkeit um das Integument der Larve an. Während sich der abgestorbene Larvenkörper zersetzt, bildet sich zwischen der Streckmadenhaut und der Puppenhaut eine klare Flüssigkeit, die sich zunehmend bräunlich verfärbt (vgl. Abb.4). Die Larven nehmen zunächst eine sackförmige Gestalt an und trocknen schließlich zu einem dunklen, schiffchenförmigen Schorf ein (Bailey, 1976; Ritter, 1996). Für den Imker und den behandelnden Tierarzt ist die sackförmige

Gestalt der abgestorbenen und von Flüssigkeit umgebenen Larve charakteristisches Indiz einer Erkrankung mit SBV.

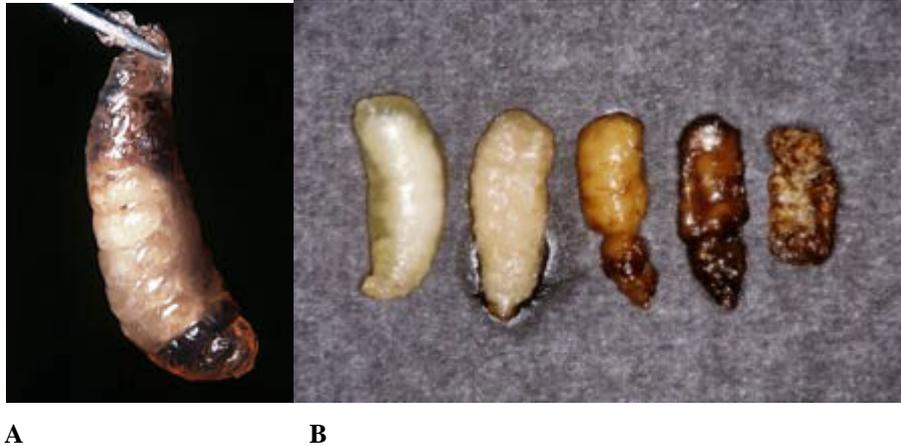


Abbildung 4: Charakteristische Symptome der Sackbrut. A: sackförmige Gestalt einer erkrankten Larve; B: aufeinanderfolgende Verfallsstadien SBV-infizierter Larven

Adulte Bienen werden mit SBV infiziert ohne Krankheitsanzeichen zu zeigen (Bailey, 1969; Anderson und Gibbs, 1989). Meist weisen sie jedoch eine verkürzte Lebenserwartung auf (Bailey, 1969; Bailey und Fernando, 1972). Da Brutpflegende Bienen infizierte Larven erkennen und entfernen, können sie sich beim Ausräumen von Brutzellen mit SBV infizieren (Bailey *et al.*, 1964). Das Virus vermehrt sich bei Ammenbienen besonders im Gehirn und den Hypopharynxdrüsen, mit deren Sekret sie andere Larven bei der Fütterung infizieren (Bailey, 1976). SHEN *et al.* (2005) wiesen das SBV außerdem in Varroamilben, in Königinnen und in Bieneneiern nach. Demnach ist sowohl eine horizontale Übertragung durch Ammenbienen und ektoparasitische Milben, als auch eine vertikale Übertragung von der Königin auf ihre Eier möglich.

Die Sackbrut tritt gehäuft zu Beginn der Brutsaison im Frühjahr auf, wenn die Zahl der empfänglichen Larven und Brutpflegenden Bienen besonders hoch ist (Bailey, 1969). Unter natürlichen Bedingungen klingt sie für gewöhnlich spontan während des Sommers ab, was mit der schnellen Eliminierung der infizierten Brut durch Ammenbienen erklärt wird (Bailey, 1976). Dieses Verhalten kann durch verschiedene Faktoren, wie dem Vorliegen weiterer Infektionserreger (Viren und Mikrosporidien) oder mangelndem Trachtangebot (Mangelernährung) gestört sein. Unter diesen Bedingungen kommt es zu stärkerer Ausbreitung von SBV in der Bienenbrut und zu einer starken Schwächung oder dem Verlust des Bienenvolkes (Ritter, 1996).

2.2.2.2 Die Familie *Dicistroviridae*

Die Virionen von Dicistroviren sind - analog den Iflaviren - unbehüllte, annähernd kugelförmige Icosaeder mit etwa 30 nm Durchmesser. Sie bestehen aus 60 identischen Protomeren, die von je einem Molekül der Hauptstrukturproteine VP1, VP2 und VP3 gebildet werden (s. Abb. 5). Einige Vertreter besitzen zusätzlich noch ein weiteres, kleineres Strukturprotein VP4 (Christian *et al.*, 2005).

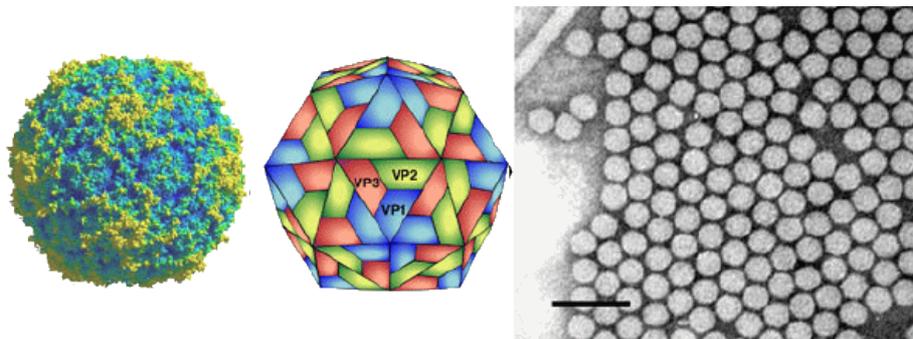


Abbildung 5: Morphologie des *Cricket paralysis virus* (CrPV)

Die [+]ssRNA besitzt eine Gesamtlänge von etwa 9.000-10.000 nt auf der sich zwei ORF befinden (vgl. Abb. 6). Am 5'-Ende des Genoms befindet sich ein 500-800 nt langer nicht kodierender Bereich (5'-UTR), dem sich ein 5.500 nt großes ORF1, das für die Replikationsproteine kodiert, anschließt. Zwischen diesem ORF und dem 2.600 nt langen ORF2, das für die Strukturproteine kodiert, befindet sich eine etwa 190 nt lange nicht kodierende Region. Diese sog. intergenetic region (IGR) fungiert ebenso wie die 5'-UTR als interne Ribosomen-Bindungsstelle (IRES = internal ribosom entry site) (Christian *et al.*, 2005). Das 3'-Ende des Genoms ist polyadenyliert und am 5'-Ende besitzen die Dicistroviren in der Regel ein kovalent gebundenes Protein (VPg).

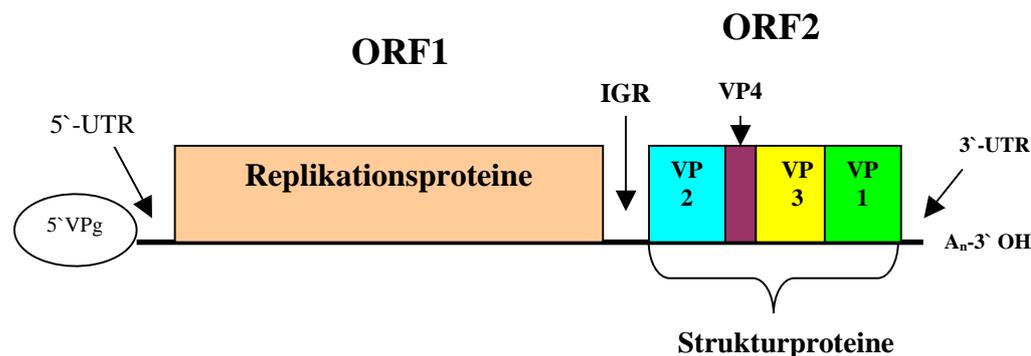
Dicistroviridae (Invertebrata)

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Genomaufbaus der *Dicistroviridae* (hier: *Cricket paralysis virus* [CrPV]); A_n: poly-A-tail; ORF: open reading frame; UTR: untranslated region; VP1-4: Strukturproteingene; VPg: kovalent gebundenes Protein

Die Vertreter der Familie *Dicistroviridae* haben nach bisheriger Auffassung ausschließlich Invertebratenwirte. Typspezies der einzigen Gattung *Cripavirus* ist das ***Cricket paralysis virus*** (*CrPV*) (Wilson *et al.*, 2000) das aus zahlreichen Insekten verschiedener Ordnungen, wie Geradflüglern (Orthoptera), Hautflüglern (Hymenoptera), Schmetterlingen (Lepidoptera), Wanzen (Hemiptera) und Zweiflüglern (Diptera) isoliert werden konnte. Zu den *Dicistroviridae* zählen neben dem CrPV das *Aphid lethal paralysis virus* der Blattläuse (ALPV; van Munster *et al.*, 2002), das in dieser Arbeit untersuchte *Black queen cell virus* der Honigbiene (*Apis mellifera*) (BQCV; Leat *et al.*, 2000), das *Drosophila C virus* (DCV; Johnson und Christian, 1998), *Himetobi P virus* (HiPV; Nakashima *et al.*, 1999), das *Plautia stali intestine virus* (PSIV; Sasaki *et al.*, 1998), das *Rhopalosiphum padi virus* (RhPV; Moon *et al.*, 1998) und das *Triatoma virus* (TrV; Czibener *et al.*, 2000). Die vier letztgenannten Viren wurden aus Hemipteren isoliert.

Das *Akute Paralyse Virus* (*Acute bee paralysis virus*; ABPV) der Honigbiene und das *Taura syndrome virus* der Shrimps (TSV; Mari *et al.*, 2002) zählen in dieser Familie zu den sog. „unassigned species“, also zu den nur vorläufig zugeordneten Spezies mit unsicherem taxonomischen Status (Christian *et al.*, 2005). Tabelle 2 gibt die Vertreter der *Dicistroviridae* in übersichtlicher Form wieder.

Nach den Regeln des ICTV werden zur Differenzierung der Spezies innerhalb der Gattung das natürliche Wirtsspektrum, sowie die Sequenz der Capsid-Proteine-Gene herangezogen.

Tabelle 2 : Übersicht über die Virusfamilie *Dicistroviridae*

Familie <i>Dicistroviridae</i> Genus <i>Cripavirus</i>	
Spezies	Wirt
<i>Aphid lethal paralysis virus</i> (ALPV)	Blattlaus
<i>Black queen cell virus</i> (BQCV)	Honigbiene (<i>Apis mellifera</i>)
<i>Cricket paralysis virus</i> (CrPV)	Orthoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Hemiptera, Diptera
<i>Drosophila C virus</i> (DCV)	Diptera
<i>Himetobi P virus</i> (HiPV)	Hemiptera
<i>Plautia stali intestine virus</i> (PSIV)	Hemiptera
<i>Rhopalosiphum padi virus</i> (RhPV)	Hemiptera
<i>Triatoma virus</i> (TrV)	Hemiptera
Virusisolate mit unsicherem taxonomischen Status	Wirt
<i>Acute bee paralysis virus</i> (ABPV)	Honigbiene (<i>Apis mellifera</i>)
Taura syndrome virus (TSV)	Shrimps

2.2.2.2.1 *Black queen cell virus* (BQCV)

Das BQCV wurde erstmals 1977 von BAILEY und WOODS gemeinsam mit dem „Kashmir bee virus“ (KBV) beschrieben. Sie isolierten es aus toten Königinnenvorpuppen und -puppen, und aus toten Arbeiterinnenpuppen (Bailey und Woods, 1977). Die Symptome der untersuchten Königinnenbrut ähnelten denen der Sackbrut: die Puppen waren teilweise zersetzt und dunkel gefärbt, zusätzlich aber färbten sich die Wände der Zellen, die diese toten Puppen enthielten, stellenweise schwarz (Bailey und Woods, 1977).

Im Experiment vermehrt sich BQCV nach einer Injektion in Bienenpuppen, nicht jedoch in adulten Bienen (Bailey und Woods, 1977). Infizierte Bienenpuppen werden in ihrer weiteren Entwicklung gehemmt. Adulte Bienen beherbergen das Virus nach bisherigen Untersuchungen nur in ihrem Verdauungstrakt. Daher ist eine Übertragung durch Hämolymphe-saugende Ektoparasiten wie Varroamilben unwahrscheinlich (Ball und Allen, 1988). Höhere Verluste in Verbindung mit dem BQCV sind erst bei einer

gleichzeitig vorliegenden Infektion mit dem Einzeller *Nosema apis* zu erwarten (Bailey *et al.*, 1983).

Das Virus gilt als weit verbreitet (Bailey und Woods, 1977; Bailey *et al.*, 1983; Allen und Ball, 1996). Arbeiterinnen nehmen bei der Pflege infizierter Königinnenbrut Virus-haltiges Material auf und übertragen es mit dem Futter auf gesunde Brut (Allen und Ball, 1996). Im Jahre 2001 wurden im hessischen Odenwaldkreis erstmals auch in Drohnenbrut pathologische Veränderungen beobachtet und eine BQCV-Infektion nachgewiesen (Siede und Büchler, 2003).

Das BQCV ist bisher das einzige Bienenvirus, bei dem die RNA-Transkription in-vitro und Manipulationen am Genom gelangen (Benjeddou *et al.*, 2002a; b; Davison *et al.*, 2003).

2.2.2.2 Acute bee paralysis virus (ABPV)

ABPV wurde zusammen mit dem Chronic bee paralysis virus (CBPV) in Großbritannien entdeckt (BAILEY *et al.*, 1963). Ebenso wie bei CBPV-Infektionen zeigen mit ABPV infizierte Tiere ein abnormes Zittern der Flügel und des gesamten Körpers. Viele infizierte Bienen verlieren ihre Flugfähigkeit (Bailey *et al.*, 1963). Im Gegensatz zu CBPV-Infektionen verläuft eine Infektion mit ABPV schnell tödlich. Bereits zwei bis vier Tage p. i. werden Paralyseerscheinungen offensichtlich und innerhalb eines weiteren Tages gehen die erkrankten Bienen zugrunde (Bailey *et al.*, 1963). Das Virus reichert sich in verschiedenen Geweben, insbesondere im Fettkörper, im Gehirn und in den Hypopharynxdrüsen an (Bailey, 1976). Ebenso lässt es sich im Kot der Bienen nachweisen (Bailey und Gibbs, 1964).

BAILEY und GIBBS (1964) entdeckten histo-pathologische Veränderungen in Form dichter, basophiler Ablagerungen im Lumen des Ventriculus, sowie basophiler Neuronen des sog. „Pilzkörpers“, einem Teil des Gehirns der Insekten, der mit Funktionen von Lernen und Gedächtnis in Verbindung gebracht wird. Die motorischen Ausfälle infizierter Bienen werden auf diese neuro-pathologischen Veränderungen zurückgeführt (Bailey und Gibbs, 1964).

In Bienenvölkern, die stark von der Varroamilbe befallen sind, ist ABPV häufig die Ursache erhöhter Sterblichkeit adulter Bienen und Bienenlarven (Ball und Allen, 1988). Die Varroamilbe dient offenbar sowohl als Vektor als auch als Aktivator von ABPV (Ball und Allen, 1988). BRØDSGAARD *et al.* (2000) wiesen in in-vitro aufgezogenen Bienenlarven und -puppen, die mit ABPV infizierten Varroamilben infestiert waren,

eine Mortalitätsrate von 55 % nach. Nicht-infizierte Milben hingegen verursachten eine Sterblichkeitsrate von „nur“ 25 %.

Eine Infektion kann sowohl über infizierte Ammenbienen, die das Virus mit dem Sekret ihrer Hypopharynxdrüsen auf die Brut übertragen (Ball und Allen, 1988), als auch über Kotkontaminationen im Nest, wie sie besonders während der Winterzeit bei gleichzeitiger Infektion mit *Nosema apis* vorzufinden sind (Bailey und Gibbs, 1964), erfolgen.

Die für den Ausbruch einer Erkrankung benötigte Virusmenge hängt im Wesentlichen vom Übertragungsweg und der Temperatur ab. Findet die Infektion über eine Injektion in die Hämolymphe - beispielsweise durch die Varroamilbe - statt, sind 10^2 Viruspartikel nötig. Erfolgt sie über den Verdauungstrakt, steigt die für eine erfolgreiche Infektion benötigte Viruskonzentration auf mindestens 10^{11} Partikel an (Bailey *et al.*, 1963; Bailey und Gibbs, 1964). Experimentell konnte eine Virusvermehrung durch Injektion von Fremdproteinen (Bailey und Gibbs, 1964) und durch Injektion von Kaliumphosphatpuffer (Hung *et al.*, 1996) induziert werden. Ebenso stehen die von der Varroamilbe abgegebenen Verdauungssekrete im Verdacht, die Vermehrung des Virus zu forcieren (Ball und Allen, 1988).

Nicht nur Bienen, sondern auch Hummeln erwiesen sich im Versuch als für das ABPV empfänglich (Bailey und Gibbs, 1964).

2.2.2.3 RNA-Viren mit unklarem taxonomischen Status („unassigned species“)

2.2.2.3.1 Chronic bee paralysis virus (CBPV)

Das CBPV wurde zusammen mit dem *Acute bee paralysis virus* (ABPV) von BAILEY *et al.* (1963) entdeckt. Adulte Bienen infizieren sich über das Futter oder über Wunden, wobei die für eine manifeste Erkrankung benötigte Virusmenge vom Infektionsweg abhängig ist. Gelangt das Virus mit dem Futter in den Organismus, müssen für eine erfolgreiche Infektion mehr als 10^{10} Viruspartikel aufgenommen werden, gelangt es über Verletzungen direkt in die Hämolymphe, reichen hingegen schon 10^2 Partikel aus (Bailey, 1976; Ritter, 1996). Der Honigmagen infizierter Bienen kann bis zu 10^{11} Viruspartikel enthalten, außerdem lässt sich das Virus in verschiedenen Drüsen, unter anderem in den Hypopharynxdrüsen nachweisen. Infizierte Ammenbienen übertragen folglich das Virus mit dem Futtersaft auf Larven, Königin und auf Flugbienen. Mit dem Sekret der Drüsen und dem Inhalt des Honigmagens wird gleichfalls im Stock

eingelagerter Pollen, der zur Versorgung älterer Larven dient, kontaminiert (Bailey, 1975; 1976). Eine Infektion mit dem CBPV bleibt oftmals unerkannt, da es selbst in schwer erkrankten Völkern häufig zu spontanen Selbstheilungen kommt. Darüber hinaus sterben infizierte Bienen meist während ihrer Flüge außerhalb des Stocks (Bailey, 1975; 1976).

Die Symptome oder Syndrome der Chronischen Paralyse können in zwei Formen in Erscheinung treten. Beide Formen können gleichzeitig in einem Volk beobachtet werden, für gewöhnlich dominiert jedoch eine Form. Erkrankte Bienen, die Symptome vom Typ 1 zeigen, fallen durch ein abnormes Zittern der Flügel und des gesamten Körpers, sowie durch ihre Flugunfähigkeit auf. Symptome, die bei einer Infektion mit dem bereits beschriebenen ABPV ebenfalls zu beobachten sind. Oftmals drängen die infizierten Bienen sich zu Tausenden zusammen. Das Abdomen erscheint aufgrund eines stark gefüllten Honigmagens angeschwollen und betroffene Individuen erkranken oftmals zusätzlich an Dysenterie. Ferner kann ein asymmetrisches Spreizen der Flügel beobachtet werden. Der Tod tritt in der Regel innerhalb weniger Tage ein (Bailey, 1975; 1976).

Der Symptomkomplex vom Typ 2 umfasst eine nahezu komplette Haarlosigkeit der betroffenen Bienen, und dadurch eine glänzend schwarze Färbung ihres Körpers. Aufgrund des veränderten Aussehens werden sie bei ihrer Rückkehr von Sammelflügen am Stockeingang von Wächterbienen abgewehrt. Innerhalb weniger Tage kommt es ebenfalls zu einem Verlust der Flugfähigkeit, die Bienen fangen an zu zittern und sterben. Die Erscheinung der Haarlosigkeit ist in Europa auch unter „Schwarzsucht“ oder „mal noir“ bekannt (Bailey, 1975; 1976).

Rein äußerlich kann diese sog. „ansteckende Schwarzsucht“ nicht von der „nicht ansteckenden Schwarzsucht“, die nach einseitigen Waldtrachten auftreten kann, unterschieden werden (Grabensteiner und Nowotny, 2001).

2.2.2.3.2 Deformed wing virus (DWV)

Dieses Virus ist serologisch entfernt verwandt mit dem Ägyptischen Bienenvirus (Egypt bee virus; EBV). Es kann besonders häufig in varroabefallenen Bienenvölkern nachgewiesen werden und verursacht den frühzeitigen Tod adulter Bienen und der Brut. In Puppen injiziert, ruft es eine Fehlentwicklung der Flügel hervor (s. Abb. 7). Diese Symptome wurden ursprünglich in erster Linie der Parasitierung durch *Varroa destructor* und dem durch den Hämolymphtzug verursachten Energieverlust

zugeschrieben (Allen und Ball, 1996). Nach Ansicht von CHEN *et al.* (2005) könnten die beobachteten Flügeldeformationen aus einer Kombination von Virusinfektion und anderen Faktoren, welche die Virusreplikation forcieren, resultieren. Solche Faktoren können Mangelernährung, schlechtes Klima oder direkte Folgen des Varroabefalls, wie Energieverlust oder Sekundärinfektionen sein.



Abbildung 7: DWV-infizierte Bienen mit deformierten Flügeln.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Varroamilbe als Vektor für das DWV fungiert (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Tentcheva *et al.*, 2004a; b; Chen *et al.*, 2005; Yue und Genersch, 2005). BOWEN-WALKER *et al.* (1999) gehen sogar davon aus, dass das Virus in der Lage ist, sich in der Milbe zu replizieren. Vor kurzem konnte das Virus sowohl im Brutfutter (Bienenbrot) (Yue und Genersch, 2005) als auch in Bieneneiern (Chen *et al.*, 2005) nachgewiesen werden. Demnach ist neben der horizontalen Übertragung durch die Milbe auch eine vertikale Übertragung des DWV möglich. Die Tatsache, dass das Virus auch in Völkern, die nicht von der Varroamilbe betroffen waren, nachgewiesen werden konnte, spricht gleichfalls für einen von der Milbe unabhängigen und damit alternativen Übertragungsweg (Allen und Ball, 1996; Bowen-Walker *et al.*, 1999).

Offensichtlich können Bienen eine hohe Konzentration an DWV tolerieren ohne Symptome zu zeigen (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Tentcheva *et al.*, 2004a). Verschiedene Studien belegen eine weite Verbreitung des DWV innerhalb Europas (Allen und Ball, 1996; Martin *et al.*, 1998; Nordström *et al.*, 1999; Tentcheva *et al.*,

2004a; b). TENTCHEVA *et al.* (2004b) untersuchten in Frankreich insgesamt 360 Bienenvölker von 36 Bienenständen, die über das ganze Land verteilt waren. 97% der adulten Bienen und 94% der Bienenpuppen wiesen eine Infektion mit dem Virus auf. Aus 22 Bienenständen wurden zusätzlich Varroamilben entnommen und ebenfalls untersucht. 98% der Milbenproben wurden positiv getestet. Außerhalb Europas konnte es in den USA (Chen *et al.*, 2005), in Afrika, Asien und dem Mittleren Osten nachgewiesen werden. In Nepal und Pakistan wurde es in Völkern der Europäischen Honigbiene (*A. mellifera*) entdeckt, die mit der bisher nur in Südostasien vorkommenden Milbe *Tropilaelaps clareae* befallen waren. Ob es sich hierbei um einen Zufallsbefund handelt oder ob diese Milbenart in diesen Regionen dem Virus als Vektor dient, ist unbekannt (Allen und Ball, 1996). In jüngster Zeit wurde der Nachweis erbracht, dass DWV auch bei einheimischen Hummeln Flügeldeformationen hervorrufen kann (Genersch *et al.*, 2006).

2.2.2.3.3 Kashmir bee virus (KBV)

Während ihrer Untersuchungen zum Apis-Irideszenz-Virus (AIV) (1976) beobachteten BAILEY *et al.* erstmals Partikel des KBV. Sie isolierten dieses Virus aus adulten Europäischen Honigbienen (*A. mellifera*), denen Extrakte Indischer Honigbienen (*A. cerana*) aus Kaschmir injiziert wurden (Bailey und Woods, 1977). Da das Virus bei *A. mellifera* nie zuvor beschrieben wurde, gingen die Autoren davon aus, dass die Viruspartikel von den Indischen Honigbienen stammten. Diese Vermutung wurde dadurch bekräftigt, dass das Virus kurze Zeit später abermals in *A. cerana* aus Mahableshwar, Indien, nachgewiesen wurde (Bailey und Woods, 1977; Bailey *et al.*, 1979).

Unter den bekannten Bienenviren besitzt das KBV, nach Ansicht von ALLEN und BALL (1995), die höchste Virulenz. Bereits wenige Viruspartikel können nach Injektion in die Hämolymphe zum Tod innerhalb weniger Tage führen (Bailey und Woods, 1977; Bailey *et al.*, 1979). Eine orale Aufnahme hingegen führt lediglich zu inapparent infizierten Bienen (Bailey und Woods, 1977; Anderson und Gibbs, 1989).

Nachgewiesen wurde das KBV bisher in Australien, anderen Ländern des australasiatischen Raumes, in Neuseeland und auf weiteren Inseln des Pazifischen Ozeans, sowie in Kanada, den USA und Spanien (Allen und Ball, 1996). Außerdem existiert in der Datenbank der Nationalen Gesundheitsinstitute der USA (NIH), GenBank, ein Eintrag eines russischen Isolates (AF197908). Die ersten dokumentierten Funde in

Mitteleuropa stammen aus Hessen, Baden–Württemberg und Niedersachsen. (Büchler, 2003; Siede und Büchler, 2004). Wie weit das Virus in Mitteleuropa verbreitet ist, ist nicht bekannt (Siede und Büchler, 2004). Im Internet existiert eine Meldung, wonach das KBV im Jahr 2004 auch in England nachgewiesen wurde (www.csl.gov.uk/science/organ/environ/bee/rnd/documents/1013-KashmirBeeVirussurveyusingTaqMantechnology.pdf). In Australien und Neuseeland gilt das Virus als weit verbreitet und relativ harmlos. Verluste sind hier dann zu erwarten, wenn eine gleichzeitige Infektion mit *Melissococcus pluton*, dem Erreger der Europäischen (Gutartigen) Faulbrut oder *Nosema apis* vorliegt. Das Virus gelangt dann über das geschädigte Darmepithel in den Organismus und kann sich schnell vermehren (Anderson, 1991).

KBV kann sowohl horizontal als auch vertikal übertragen werden. Eine horizontale Übertragung durch die Varroamilbe konnte mehrfach belegt werden (Hung und Shimanuki, 1999; Hung *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005). HUNG (2000) konnte das Virus im Kot von Königinnen und Arbeiterinnen nachweisen. SHEN *et al.* (2005) wiesen das Virus zudem in Bieneneiern, in Honig, Pollen, Gelée royale und im Brutfutter (Bienenbrot) nach. Eine von der Milbe unabhängige, horizontale Übertragung ist somit denkbar.

Eine zwischenzeitlich erfolgte Analyse des kompletten Genoms zeigte, dass das KBV neben dem BQCV und dem ABPV, zu dem es eine sehr hohe genetische Ähnlichkeit aufweist, der Familie der *Dicistroviridae* (Gattung *Cripavirus*) zugeordnet werden kann (De Miranda *et al.*, 2004). Im aktuellen Bericht des ICTV wird dieses Virus allerdings noch unter den „unassigned viruses“ geführt (Fauquet *et al.*, 2005).

2.2.3 DNA-Viren

2.2.3.1 Apis iridescent virus (AIV)

Die Familie der *Iridoviridae* umfasst die fünf Gattungen *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* und *Megalocystivirus*. Vertreter der Gattungen *Iridovirus* und *Chloriridovirus* sind unbehüllte DNA-Viren der Invertebraten - vor allem der Dipteren - während die Viren der drei anderen Gattungen eine äußere Lipidmembran besitzen und ausschließlich wechselwarme Wirbeltiere infizieren (Fauquet *et al.*, 2005). AIV ist bislang das einzige bei Hymenopteren (Hautflügler) bekannte Iridovirus und der Erreger der sog. „Clustering Disease“ (Bailey *et al.*, 1976; Bailey und Ball, 1978; Grabensteiner und Nowotny, 2001). Das Virus wurde Ende der 1970er Jahre erstmals in Kaschmir und dem nördlichen Indien aus sterbenden und toten Honigbienen (*Apis cerana*) isoliert (Bailey *et al.*, 1976; Bailey und Ball, 1978). Erkrankte Bienen sind inaktiv, flugunfähig und bilden Gruppen von „Krabblern“ vor dem Bienenstock. Nach dem Auftreten erster klinischer Symptome können selbst starke Völker innerhalb von zwei Monaten absterben (Bailey und Ball, 1978), der Krankheitsverlauf ist im Einzelnen jedoch wenig untersucht.

Obwohl eine Vermehrung des AIV in der Europäischen Honigbiene unter experimentellen Bedingungen gelang (Bailey *et al.*, 1976), wurde die „Clustering Disease“ bei unseren einheimischen Bienen noch nicht beobachtet und das natürliche Vorkommen von AIV scheint auf die Verbreitungsgebiete der Indischen Honigbiene - Indien, Südostasien und Japan - begrenzt zu sein (Allen und Ball, 1996).

2.2.3.2 Filamentous virus (FV)

Vor seiner Identifizierung durch CLARK (1978) wurden die durch das Filamentous Virus verursachten Veränderungen bei Bienen zunächst von WILLE auf eine Infektion mit Rickettsien zurückgeführt (Ritter, 1996). Die 450 x 150 nm großen, ellipsoiden Viruspartikel besitzen eine doppelsträngige DNA, die von einer dreischichtigen Hülle umgeben wird (Clark, 1978; Bailey *et al.*, 1981). Die Virusvermehrung vollzieht sich im Fettkörper und in den Ovarien adulter Bienen, deren Hämolymphe sich milchig-weiß verfärbt (Ritter, 1996). Die Farbänderung der Hämolymphe ist das einzige bisher beobachtete Symptom einer Infektion (Ministry of Agriculture and Forestry [MAF], New Zealand, 2003). Untersuchungen in Großbritannien legten die Vermutung nahe, dass das FV ein sehr weit verbreitetes, allerdings auch ein für Bienen wenig pathogenes Virus ist (Bailey und Milne, 1978; Bailey *et al.*, 1983). Ebenso wie das BQCV und das

Bienenvirus Y (BVY) ist das FV eng mit dem Microsporidium *Nosema apis* vergesellschaftet (Bailey *et al.*, 1983; Ritter, 1996). Seine Bedeutung bei möglicherweise multifaktoriell bedingten Erkrankungen der Biene ist bislang nicht untersucht.

2.3 Varroa destructor ANDERSON & TRUEMAN, 2000

2.3.1 Spezies innerhalb der Gattung Varroa

Ursprünglich waren bei den staatenbildenden Honigbienen der Gattung *Apis* drei Spezies der Gattung *Varroa* bekannt, die sich als obligate Ektoparasiten von der Hämolymphe ihres Wirtes ernähren. Die Spezies *Varroa jacobsoni* wurde erstmals 1904 von Oudemans bei der Indischen Honigbiene *Apis cerana* auf Sumatra beschrieben (De Jong, *et al.*, 1982b). Die in Nepal verbreitete Spezies *V. underwoodi* befällt ebenfalls *A. cerana* (Delfinado-Baker und Aggarwal, 1987), während die Spezies *V. rindereri* ein Ektoparasit von *A. koschevnikovi* in Borneo ist (De Guzman und Delfinado-Baker, 1996) (vgl. Tabelle 3).

Bis vor einigen Jahren galt *V. jacobsoni* (Oudemans, 1904) als Erreger der Varroose der Europäischen Honigbiene. Doch ANDERSON und TRUEMAN (2000) bewiesen, dass es Variationen innerhalb dieser Spezies hinsichtlich Genotyp und Phänotyp gibt, die eine Aufspaltung der Spezies in mehrere Arten notwendig macht. Die Autoren sequenzierten eine Region des Cytochromoxidase-I - codierenden Gens der mitochondrialen DNA, verglichen Körpergröße und -form der Milben, sowie die Abhängigkeit des Reproduktionserfolges von den jeweiligen Bienen- und Brutzellarten. Die Untersuchung von adulten *V. jacobsoni*-Weibchen, die von Völkern der Indischen Honigbiene (*Apis cerana*) aus ganz Asien gesammelt wurden, ergaben Hinweise darauf, dass die ursprünglich definierte Art *V. jacobsoni* einen Komplex aus mindestens zwei Spezies darstellt. Daraufhin wurden die Untersuchungen auf adulte Varroa-Weibchen aus Völkern der Europäischen Honigbiene (*Apis mellifera*) aus der ganzen Welt ausgedehnt. Die Autoren postulierten schließlich, dass innerhalb der Spezies *V. jacobsoni* der Indischen Honigbiene achtzehn Haplotypen existierten (vgl. Tabelle 4). Diese achtzehn Haplotypen wurden daraufhin in zwei Gruppen eingeteilt, *Varroa jacobsoni* und *Varroa destructor*. Zu *V. jacobsoni* zählen neun dieser Haplotypen, die in Indonesien und Malaysia verbreitet sind, unter *V. destructor* werden sechs Haplotypen

zusammengefasst, die auf dem asiatischen Festland vorkommen. Drei der achtzehn Haplotypen sind auf den Philippinen verbreitet und konnten nicht sicher zugeordnet werden.

Nur zwei Haplotypen sind in der Lage, sich in der Brut der Europäischen Honigbiene *A. mellifera* zu vermehren. Sie gehören beide zu der neu definierten Spezies *V. destructor*. Am weitesten verbreitet ist der sehr virulente Korea-Haplotyp, der in Europa, im Mittleren Osten, Afrika, Asien und Amerika identifiziert wurde. Der zweite bei der Europäischen Biene vorkommende, weniger virulente und weniger verbreitete Haplotyp ist der Japanisch/Thailändische, der in Japan, Thailand und Amerika nachgewiesen wurde. Korea- und Japan/Thailand-Typ können sich bei *A. cerana* ausschließlich in Drohnenbrut vermehren. In Völkern der Europäischen Honigbiene befallen sie jedoch sowohl Drohnen- als auch Arbeiterinnenbrut (Anderson und Trueman, 2000).

Tabelle 3: Übersicht über die Spezies innerhalb der Gattung *Varroa*

Spezies	Wirt	Vorkommen
<i>Varroa underwoodi</i>	<i>Apis cerana</i>	Nepal
<i>Varroa rindereri</i>	<i>Apis koschevnikovi</i>	Borneo
<i>Varroa jacobsoni</i>	<i>Apis cerana</i>	Asien
<i>Varroa destructor</i>	<i>Apis cerana</i> , <i>Apis mellifera</i>	Asien, Europa, Afrika, Amerika, Mittlerer Osten

Tabelle 4: Übersicht über die Haplotypen von *Varroa jacobsoni* und *Varroa destructor*.

<i>V. jacobsoni</i>	Haplotypen	<i>V. destructor</i>	Haplotypen
	Flores (Indonesien)		Sri Lanka
	Sumbawa (Indonesien)		Japan / Thailand
	Lombok (Indonesien)		Nepal
	Sumatra (Indonesien)		Korea
	Malaiische Halbinsel		China
	Borneo (Malaysia)		Vietnam
	Ambon (Indonesien)		
	Bali (Indonesien)		
	Java (Indonesien /		
	Papua-Neuguinea)		

2.3.2 Morphologie

V. destructor-Weibchen lassen sich morphologisch durch ihre Größe und ihre Form von *V. jacobsoni*-Weibchen unterscheiden (Anderson und Trueman, 2000; vgl. Abb. 8). Adulte *V. destructor*-Weibchen sind 1,1–1,3 mm lang und 1,3–1,6 mm breit. Sie besitzen eine querovale Körperform und eine braune Färbung. Der Rücken wird von einem nach oben gewölbten, mit vielen kurzen Borsten besetzten Schild vollständig bedeckt. Die acht kurzen, kräftigen und mit tarsalen Sauglappen versehenen Beine ragen aufgrund ihrer meist gekrümmten Stellung nur wenig unter dem breiten Rückenschild hervor (Eckert *et al.*, 2005).

Da *V. destructor*-Männchen unmittelbar nach der Begattung der Weibchen sterben (De Jong *et al.*, 1982b; Rommel *et al.*, 2000; Sammataro *et al.*, 2000; Eckert *et al.*, 2005), sind sie eher selten zu beobachten (Eckert *et al.*, 2005). Sie besitzen aufgrund der fehlenden Sklerotisierung ihrer Cuticula eine weißliche Färbung und sind mit einer Länge von 0,9 mm und einer Breite von 0,8 mm vergleichsweise klein. Die Körperform ist im Gegensatz zu den Weibchen rundoval (Sammataro *et al.*, 2000; Eckert *et al.*, 2005). Varroa-Männchen saugen keine Hämolymphe. Ihre Mundwerkzeuge (Cheliceren) dienen der Begattung (De Jong *et al.*, 1982b; Rommel *et al.*, 2000; Sammataro *et al.*, 2000; Eckert *et al.*, 2005).

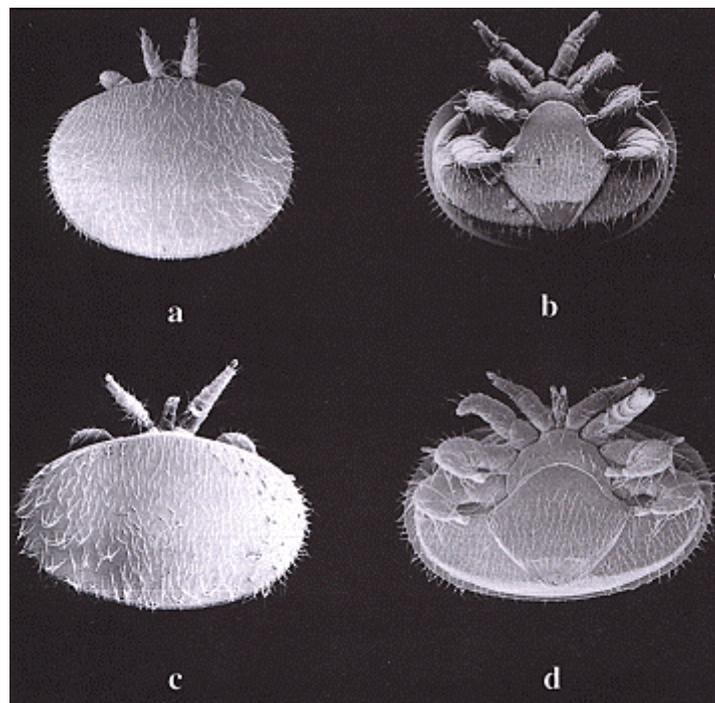


Abbildung 8: Morphologie der *Varroa*-Milben ♀

a + b: *V. jacobsoni* (Java-Haplotyp); c + d: *V. destructor* (Korea-Haplotyp)

2.3.3 Entwicklung

Die Varroamilbe hat ihre parasitische Lebensweise eng an die Entwicklung ihres Wirtes angepasst. In der verdeckelten Bienenbrut vollzieht sich die Reproduktions- und Entwicklungsphase der Milbe, außerhalb der Brutzellen infestieren adulte Varroaweibchen Bienen und verbreiten sich mit deren Hilfe (phoretische Phase). Die Vermehrung der Varroamilbe findet bei *A. mellifera* sowohl in der Drohnen- als auch in der Arbeiterinnenbrut statt (De Jong *et al.*, 1982b; Boot *et al.*, 1997). Königinnenzellen sind sehr selten das Ziel der Varroamilbe (Harizanis, 1991). CALDERONE *et al.* (2002) führen dies auf eine abstoßende Wirkung des Futtersaftes der Königin zurück. Andere Autoren postulieren, dass die kurze Verdeckelungszeit der Weiselzellen (8 Tage) für eine erfolgreiche Reproduktion der Milbe nicht ausreicht und Königinnenzellen deshalb von Varroaweibchen gemieden werden (Rehm und Ritter, 1989; Trouiller *et al.*, 1994). Drohnenbrut wird von der Milbe ungefähr achtmal häufiger befallen als Arbeiterinnenbrut (Schulz, 1984; Fuchs, 1990). Da die Verdeckelungszeit der Drohnenbrut mit 14 Tagen länger ist als die der Arbeiterinnenbrut mit nur 12 Tagen, können sich in der Drohnenbrut mehr Nachkommen zu reifen Milben entwickeln. Die erhöhte Attraktivität der Drohnenzellen scheint das Resultat verschiedener Faktoren zu sein. Hierzu gehören sowohl chemische Bestandteile der Larvenkutikula (Le Conte *et al.*, 1989; Trouiller *et al.*, 1994; Aumeier und Rosenkranz, 1995; Calderone *et al.*, 2002) und der Larvennahrung (Nazzi *et al.*, 2001; Nazzi *et al.*, 2004), die von Drohnenlarven in höheren Konzentrationen abgegeben werden bzw. in Drohnenzellen in höheren Konzentrationen vorliegen, als auch nicht-chemische Faktoren, wie die bereits erwähnten unterschiedlichen Verdeckelungszeiten der verschiedenen Brutzelltypen. Der Reproduktionserfolg, also die Anzahl der lebensfähigen weiblichen Nachkommen pro Varroaweibchen und Reproduktionszyklus, ist in Drohnenbrut mit 2,2-2,6 annähernd doppelt so hoch als in der Arbeiterinnenbrut mit 1,3-1,4 (Schulz, 1984; Fuchs und Langenbach, 1989). Einige Autoren postulieren, dass die unterschiedlichen Bauweisen der verschiedenen Brutzelltypen ebenfalls das Auswahlverhalten der Milbe beeinflussen (De Jong und Morse, 1988; De Ruijter und Calis, 1988; Goetz und Koeniger, 1993; Boot *et al.*, 1995; Kuenen und Calderone, 2000; Calderone und Kuenen, 2001). Dazu gehören beispielsweise der Abstand der Larve vom Zellrand (Goetz und Koeniger, 1993; Boot *et al.*, 1995) oder die unterschiedlichen Ausrichtungen der Zellen (Calderone *et al.*, 2002).

Der Entwicklungszyklus der Varromilbe ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt. Zur Vermehrung dringt das adulte Varroaweißchen 15-20 Stunden vor Verdeckelung der Arbeiterinnenbrut bzw. 40-50 Stunden vor Verdeckelung der Drohnenbrut in die Zelle ein (Boot *et al.*, 1992). In dieser Brutzelle befindet sich bereits eine etwa fünf Tage alte Bienenlarve, von der sich die Milbe anfangs ernährt. Sie bewegt sich jedoch bald unter der Bienenlarve hindurch zum Zellboden, wird dort von der Futterreserve der Larve umschlossen und ernährt sich in der folgenden Zeit auch von dieser. Verbraucht die Bienenlarve ihre Futterreserve, setzt sie dadurch die Milbe frei. Von nun an ernährt sich das Milbenweibchen von der Hämolymphe der Bienenlarve und später der -puppe (De Jong *et al.*, 1982b). Etwa 60 Stunden nach erfolgter Zellverdeckelung beginnt das Varroaweißchen mit der Eiablage. Das erste Ei ist männlich, die folgenden 4-5 (selten 6) Eier, die jeweils in Intervallen von 26-32 Stunden abgelegt werden, weiblich determiniert (Rehm und Ritter, 1989; Martin, 1994). Im Ei entwickelt sich innerhalb von 24 Stunden eine Larve, aus der 48 Stunden nach Eiablage eine Protonympe schlüpft, die sich nach einigen Tagen zur Deutonympe und letztlich zur adulten Milbe häutet. Protonympe und Deutonympe ernähren sich ebenfalls von der Hämolymphe der Bienenpuppe (De Jong *et al.*, 1982b). Die durchschnittliche Entwicklungszeit der männlichen Milbe beträgt 154 Stunden, die der weiblichen Milbe durchschnittlich 134 Stunden (Martin, 1994). Die Verpaarung findet noch in der Zelle statt. Während die begatteten reifen Milbenweibchen mit der schlüpfenden Jungbiene die Zelle verlassen, verbleiben sowohl die Milbenmännchen als auch unreife Milbenstadien in der Zelle und sterben. In der phoretischen Phase klammern die adulten Milbenweibchen sich meist am Abdomen zwischen den Sterniten oder zwischen Abdomen und Thorax an ihrem Wirt fest und ernähren sich nach Anritzen des Intersegmentalhäutchens mit ihren Cheliceren von austretender Hämolymphe (De Jong *et al.*, 1982b; Ritter, 1996).

78% aller weiblichen Milben gehen einmal, 22% zweimal in Reproduktion (Schulz, 1984). Zwar konnte experimentell gezeigt werden, dass die Varroamilbe physiologisch in der Lage ist, mehrmals in Eiablage zu gehen, jedoch wird sie unter natürlichen Bedingungen während der phoretischen Phase, die 2-22 Tage dauern kann, mit verschiedenen Gefahren konfrontiert, die ihre Lebenserwartung verkürzen können (Ritter, 1996).

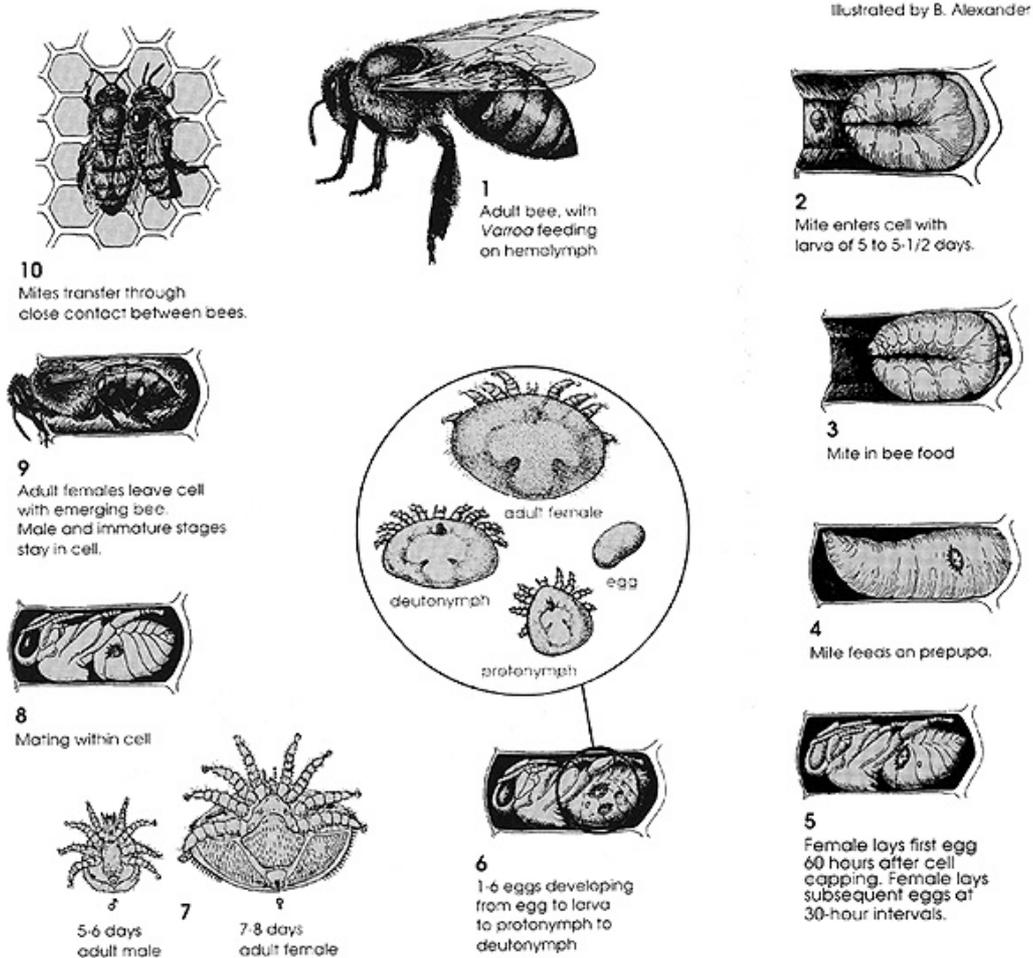


Abbildung 9: Lebens- und Entwicklungszyklus der Varroamilbe.

2.3.4 Epidemiologie und Vorkommen

Das natürliche Vorkommen der Varroamilbe entsprach ursprünglich dem Verbreitungsgebiet der Indischen Honigbiene (*A. cerana*) in Südostasien (Sammataro *et al.*, 2000). Bei *A. cerana* verursacht eine Infestation durch die Milbe keine nennenswerten Schäden. Indische Honigbienen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, befallene Brut rasch zu entdecken und zu entfernen. Zudem zeigen sie ein sehr ausgeprägtes Putzverhalten („grooming“). Dadurch wird die Milbenpopulation auf natürliche Weise auf einem tolerierbaren Niveau gehalten (Peng *et al.*, 1987; Rath, 1999).

A. mellifera-Völker zeichnen sich durch eine ertragreiche Honigproduktion sowie durch die Bildung großer Völker aus. *A. cerana*-Völker hingegen gelten als besonders robust, aber weniger ertragreich. Um sich die Vorteile beider Arten zu Nutze zu machen, wurde nach dem Zweiten Weltkrieg die europäische Art in das Verbreitungsgebiet der indischen Art verbracht. Hierdurch bekam die Varroamilbe Kontakt zu einem neuen

Wirt, der den Parasiten nicht als Schädling erkannte. Die Milbe konnte sich ungehindert vermehren und durch den weltweiten Bienenhandel weiter verbreiten. Die ersten befallenen *A. mellifera*-Völker wurden in den frühen 1960er Jahren auf den Philippinen und 1965 in West-Russland entdeckt. Berichte zur Ausbreitung der Milbe folgten aus Bulgarien (1967), Paraguay (1971) Rumänien (1975), Libyen (1976), Deutschland (1977) und Tunesien (1978). Von Paraguay aus konnte sich die Milbe über ganz Südamerika ausbreiten (De Jong *et al.*, 1982b). In Nordamerika ist die Varroamilbe seit 1987 bekannt, in Afrika seit 1975 (Eckert *et al.*, 2005) und in Neuseeland seit 2000 (Zhang, 2000). Mit Ausnahme von Australien und Hawaii hat sich *V. destructor* bis heute weltweit verbreitet und gilt als Hauptschädling von *A. mellifera* (Sammataro *et al.*, 2000).

In den ersten Jahren einer Infestation ist die Milbenpopulation in betroffenen Bienenvölkern noch relativ klein, so dass zunächst keine erkennbaren Schäden zu verzeichnen sind. Verluste treten erst innerhalb von 2-6 Jahren nach der Primärinfestation auf (De Jong *et al.*, 1982b). Im Frühjahr ist die Milbenanzahl innerhalb eines Bienenvolkes am geringsten (vgl. Abb.10). Sie nimmt mit der Bruttätigkeit der Bienen und der Aufzucht der Drohnen im April beständig zu. Stark parasitierte Völker können im Spätsommer nach der Tracht, nach der Wintereinfütterung im Frühherbst oder während der Überwinterung zusammenbrechen (Eckert *et al.*, 2005).

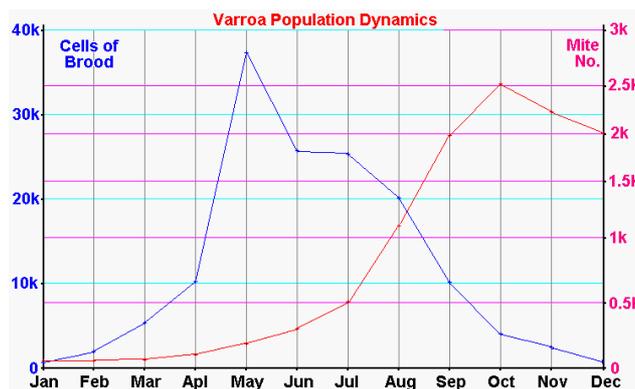


Abbildung. 10: Jahreszeitlicher Verlauf der Individuenzahl von Bienen und Milben in einem Bienenvolk

2.3.5 Pathogenese

Wird Bienenbrut von einer hohen Anzahl an Milben befallen, resultieren daraus Bienen mit vermindertem Schlupfgewicht und verkürzter Lebensdauer. Der Gewichtsverlust der Bienen verhält sich direkt proportional zur Anzahl der sie befallenen Milben (De

Jong *et al.*, 1982a; b; Schneider und Drescher, 1987; Duay *et al.*, 2003). DE JONG *et al.* (1982a) ermittelten ein um 6,3-25% reduziertes Schlupfgewicht bei Arbeiterinnen, die während der Pupalphase mit 1-9 Milben befallen waren. Auf vergleichbare Ergebnisse kamen SCHNEIDER und DRESCHER (1987). Bei Drohnen, die während der Entwicklungszeit von nur einer Milbe infestiert waren, konnten DUAY *et al.* (2003) einen Gewichtsverlust von bereits 10% feststellen.

Als Ausdruck der gestörten Ontogenese können betroffene Bienen deformierte Flügel, verkürzte Abdomen (De Jong *et al.*, 1982a, b; Marcangeli *et al.*, 1992) und unterentwickelte Hypopharynxdrüsen (Schneider und Drescher, 1987) aufweisen. Unvollständig ausgebildete Hypopharynxdrüsen wurden auch bei frisch geschlüpften Bienen beobachtet, die während der Entwicklung keinen Kontakt zu Milben hatten und erst nach dem Schlupf künstlich mit der Milbe infiziert wurden. Dies spricht dafür, dass die Milbe auch Jungbienen Nährstoffe und Energie entzieht und ihre weitere Entwicklung negativ beeinflusst (Schneider und Drescher, 1987). GAREDEW *et al.* (2004) konnten zeigen, dass die Milbe den Bienenpuppen bis zu 25% der während des Larvenstadiums im Gewebe gespeicherten Nahrungsreserven entzieht. Da die Puppen keine Nahrung aufnehmen sind sie von diesen Reserven abhängig und nicht in der Lage, die Verluste zu kompensieren. So weist die Hämolymphe varroabefallener Bienen einen geringeren Proteinanteil und ein geringeres Volumen auf (Glinski und Jarosz, 1984; Weinberg und Madel, 1985).

Neben den direkten Schadwirkungen spielt die Varroamilbe im Bienenvolk auch eine Rolle als Überträger von Bakterien, Pilzen und Viren, sowie als Aktivator latenter Virusinfektionen (Ball, 1983; 1996; Glinski und Jarosz, 1990; 1992).

2.3.6 Diagnose

Der Nachweis eines Varroabefalls kann anhand der Untersuchung von Gemülle, Bienenbrut oder adulten Bienen erfolgen. Für die Gewinnung von **Gemülle** wird in den Boden des Bienenstocks eine sogenannte „Windel“, ein einschiebbares Bodenbrett über das eine Gaze mit einer Maschenweite von einigen Millimetern befestigt ist, eingebracht (s. Abb. 11).

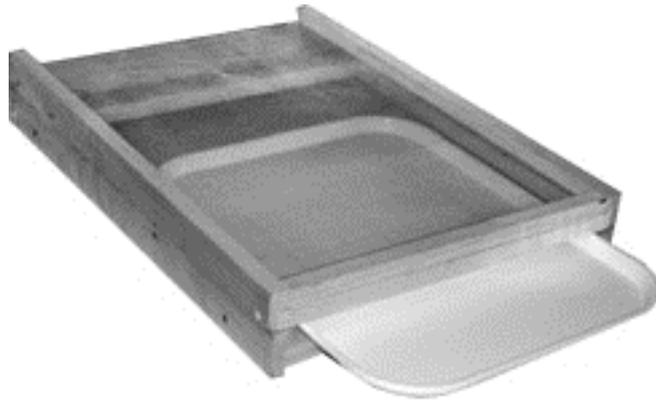


Abbildung 11: Zur Beurteilung des Milbenbefalls in den Bienenstock eingebrachte Windel.

Auf der Windel sammeln sich herabfallende Milben, die entweder eines natürlichen Todes sterben oder nach einer diagnostischen bzw. therapeutischen Behandlung mit einem Akarizid abgetötet werden (s.u.). Die angebrachte Gaze verhindert das Entfernen toter Milben durch Arbeitsbienen. Die Bodeneinlage verbleibt für etwa sieben Tage im Stock. Danach wird die Milbenbelastung durch Auszählung der herabgefallenen Milben beurteilt (vgl. Abb. 12).



Abbildung 12: Ansammlung von Varroamilben im Gemüll(e)

Nach Empfehlungen des Landesverbandes Bayerischer Imker e.V. (LVBI) sollte eine Behandlung eines Bienenvolks erfolgen, wenn bereits im Juli mehr als fünf bis zehn

Milben pro Tag nach der oben beschriebenen Methode feststellbar sind. Im Spätherbst (Oktober/November) sollte der tägliche Milbenabfall unter 0,5 liegen.

Zur Untersuchung von **Bienenbrut** dient 18 Tage alte Drohnen- bzw. 13 Tage alte Arbeiterinnenbrut (Ritter, 1996). Nach Entdeckungelung der Zellen erkennt man die verschiedenen Milbenstadien als braune oder weißliche Tupfen auf der weißen Bienenpuppe. Bei starker Parasitierung ist der weißliche Milbenkot an den Zellwänden ebenfalls zu erkennen (s. Abb. 13) (Sammataro *et al.*, 2000).



A



B

C

Abbildung 13: A: unreife Milbenstadien in einer Brutzelle.; B: reife Milbenstadien auf einer Bienenpuppe; C: unreife Milbenstadien und Milbenkot in einer Brutzelle

Zum Milbennachweis anhand **adulter Bienen** können 50-100 mit Ether betäubte Jungbienen in einem mit Pflanzenöl beschichteten Glasbehälter geschüttelt werden. Nach dieser Behandlung kann die Milbenbelastung anhand der an der Wand des Behälters anhaftenden Milben eingeschätzt werden. Zum Nachweis eines geringen Milbenbefalls werden alternativ 200-300 Bienen bei -20°C abgetötet, in einem

Erlenmeyerkolben mit Benzin oder Alkohol bedeckt und mindestens 10 Minuten geschüttelt. Die Milben finden sich nach Entfernung der Bienen mit einem Sieb am Wannenboden (Ritter, 1996).

2.3.7 Therapie

Gemäß der Bienenseuchen-Verordnung vom 3. November 2004 unterliegt die Varroose der Behandlungspflicht. Nach §15 Abs. 1 müssen sämtliche Bienenvölker eines befallenen Bestandes jährlich behandelt werden. Die Behandlungsmethoden können von der zuständigen Behörde bestimmt werden (§15 Abs. 2). Nach §3 kann von der zuständigen Behörde eine amtliche Untersuchung sämtlicher Bienenvölker eines Gebietes angeordnet werden, falls der Verdacht besteht, dass die Varroose sich ausbreitet oder bereits ausgebreitet hat.

Eine vollständige Tilgung der Varroamilben ist bisher mit keinem der von zahlreichen Bieneninstituten erprobten und empfohlenen Verfahren möglich. Zur Behandlung der Varroose wird derzeit von der *Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V.* eine Kombination aus pflegerischen (biotechnischen) und chemischen Behandlungsmethoden empfohlen, die in einem Drei-Stufenplan während eines Jahres durchgeführt wird:

1. während der Tracht: aus lebensmittelrechtlichen Gründen kein Einsatz von Chemotherapeutika. Reduktion des Milbenbefalls durch biotechnische Verfahren wie Bannwabenverfahren, Drohnenbrutentnahme, u.a.
2. nach der Honigernte: Behandlung von Bienenvölkern mit Brut. Reduktion des Milbenbefalls durch den Einsatz organischer Säuren
3. in brutfreien Bienenvölkern im Winter: Einsatz von Chemotherapeutika

Biotechnische Behandlungsmethoden während der Trachtperiode (Auswahl)

Bannwabenverfahren:

Hierbei wird die Königin mit Hilfe eines Absperrgitters gezielt auf bestimmten Waben gehalten, so dass sich die Milbe ausschließlich in der auf diesen Waben gebildeten Brut vermehren kann (s. Abb. 14). Nach Überführung der Königin auf neue Waben wird die befallene Brut vernichtet.

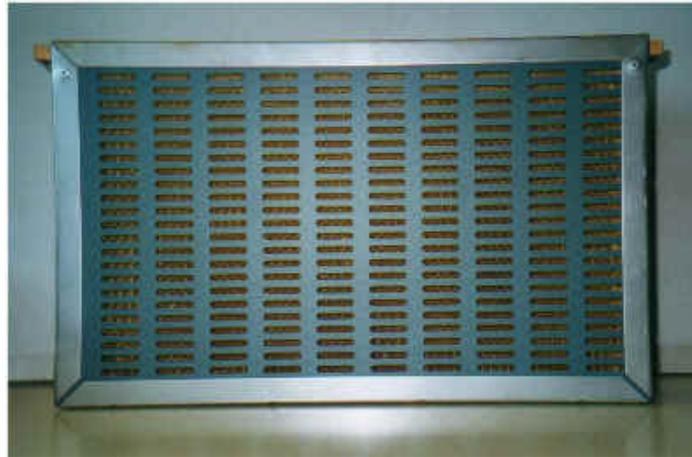


Abbildung 14: Bannwabenverfahren. Wabe mit Absperrgitter.

Drohnenbrutentnahme:

Dieses Verfahren eignet sich während der Aufzucht von Drohnenbrut (April bis Juli). Da die Milben Drohnenbrut bevorzugen, lässt sich mit dem Ausschneiden und Vernichten (Einschmelzen) von Drohnenbrut eine Reduzierung der Befallsstärke erzielen. Die Drohnenbrut wird dabei zu einem Zeitpunkt entnommen, in dem die Brut noch nicht vollständig verdeckelt ist. Diese Methode ist mit dem Bannwabenverfahren kombinierbar, indem die Königin für einige Tage auf reinen Drohnenbrutwaben gehalten wird.

Anwendung organischer Säuren nach der Honigernte

Beim Einsatz synthetischer Akarizide zur Varroabekämpfung besteht die Gefahr unerwünschter Rückstände in Bienenprodukten. Ebenso wird durch deren Anwendung die Entwicklung resistenter Milbenstämme gefördert. Inzwischen sind in Deutschland und anderen europäischen Ländern Milbenstämme bekannt, die gegen synthetische Pyrethroide in handelsüblichen Akariziden (Bayvarol®, Perizin®) resistent sind. Organische Säuren haben sich zur chemischen Behandlung der Varroose bewährt. Ameisen-, Milch- und Oxalsäure stellen natürliche Bestandteile des Honigs dar und sind bei korrekter Anwendung durch den Imker hinsichtlich Rückstands- und Resistenzproblematik unbedenklich. Arzneimittelrechtlich ist der Einsatz aller drei Säuren zugelassen bzw. im Falle der Oxalsäure zumindest toleriert. Arzneimittel zur Varroose-Bekämpfung, die bis zu 65% Ameisensäure bzw. bis zu 15% Milchsäure enthalten, sind seit dem 25.12.2003 freiverkäuflich (Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, 2003b). Die Oxalsäure darf seit dem

23.12.2005 in der Applikationsform Träufeln legal eingesetzt werden, eine offizielle Zulassung ist allerdings erst im ersten Halbjahr 2006 zu erwarten (Rademacher, 2006). Für die Oxalsäure (Oxalsäuredihydrat-Lösung) besteht Apothekenpflicht und die Anwendung ist in einem Bestandsbuch zu vermerken. Die erwähnten Säuren werden in folgenden Darreichungsformen appliziert:

Verdunstungsmittel:

Die zu applizierenden organischen Säuren, werden entweder auf ein Trägermaterial mit großer Oberfläche aufgebracht (z.B. Illertissener-Milbenplatte/Krämerplatte; Schwammtuch) oder flüssig in einem kleinen Behälter gespeichert und über einen Docht verdunstet (vgl. Abb. 15). Alternativ sind technisch aufwändige Verdampfer verschiedener Hersteller im Gebrauch. Die verdampften organischen Säuren wirken in verdeckelte Brut hinein und sind dadurch für die Sommerbehandlung von Bienenvölkern nach der Honigernte geeignet.



Abbildung 15: Dispenser mit Schwammtuch zum Verdunsten von Ameisensäure.

Sprühmittel:

Jede Wabe eines Bienenstocks wird einzeln herausgenommen und mittels handelsüblicher Sprühflaschen besprüht (vgl. Abb. 16). Für die Sommerbehandlung von Völkern ohne verdeckelte Brut sowie für die Winterbehandlung bei Außentemperaturen über dem Nullpunkt wird 15%-ige Milchsäure eingesetzt.



Abbildung 16: Sprühbehandlung mit Milchsäure.

Aufträufeln:

Nach Aufträufeln wässriger Lösungen auf Bienen und Wabengassen wird der Wirkstoff oral aufgenommen und gelangt in die Hämolymphe der Bienen. Milben nehmen während des Saugaktes das Akarizid auf und gehen daran zugrunde. Schnell und einfach durchführbar ist eine Träufelbehandlung mit Oxalsäure, die meist im Spätherbst oder Winter im brutfreien Volk durchgeführt wird. Mit Hilfe einer Einwegspritze oder einer Träufelflasche wird eine Oxalsäure-Zuckerlösung appliziert (s. Abb. 17). Eine einmalige Anwendung ist ausreichend.



Abbildung 17: Träufelbehandlung mit Oxalsäure.

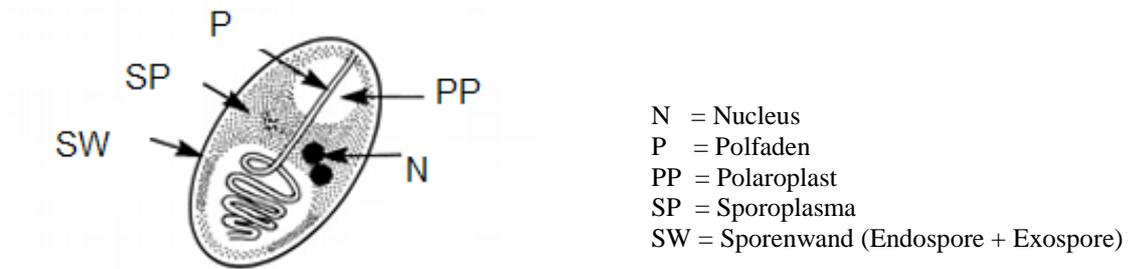
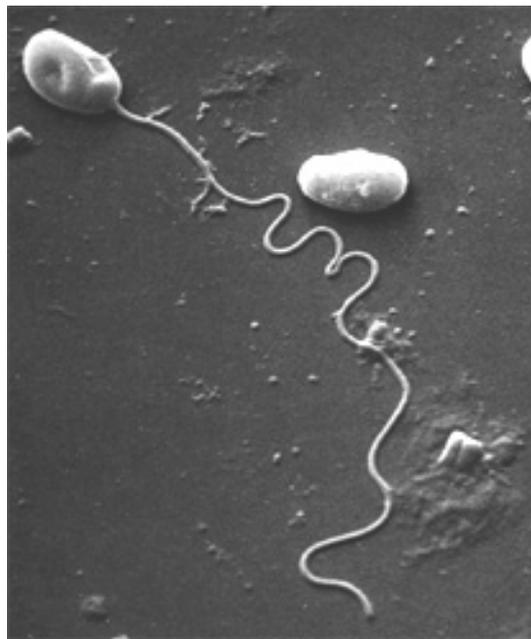
Einsatz von Chemotherapeutika in brutfreien Völkern*Coumaphos-Behandlung:*

Mittels einer Einwegspritze oder eines Dosiersets wird eine wässrige Coumaphos-Lösung (Perizin®) auf die in den Wabengassen befindlichen Bienen geträufelt. Nach oraler Aufnahme des Akarizids durch die Bienen wird der Wirkstoff über die Hämolymphe des Wirts mit dem Saugakt aufgenommen. Die Anwendung erfolgt einmalig im Spätherbst in brutfreien Völkern. Erste Resistenzen gegen den Wirkstoff sind aus einzelnen europäischen Ländern bekannt, so dass eine Kontrolle des Behandlungserfolges anzuraten ist.

2.4. *Nosema apis* ZANDER, 19092.4.1 Morphologie

Nosema apis ist ein sporenbildender, einzelliger Parasit aus der Ordnung der Microsporida. Sein Entwicklungszyklus verläuft dimorph, unter Ausbildung von zwei verschiedenen Sporentypen. Ein Sporentyp ist besonders widerstandsfähig und in der Lage, außerhalb eines Wirtes zu existieren. Er besitzt eine Gesamtgröße von 4-8 x 2-4 µm. In die Sporenwand, die aus einer Endospore (innere Wandschicht) und einer Exospore (äußere Wandschicht) besteht, ist Chitin eingelagert. Die Endospore besitzt eine Dicke von 278–379 nm. Im Sporoplasma befinden sich zwei Kerne, die sich zum sog. Diplokaryon anordnen. Im Inneren der Spore liegt ein in 27–32 Windungen aufgewickelter, tubulärer Polfaden, der - wie in Abbildung 19 dargestellt - bei Kontakt mit einer Wirtszelle ausgestülpt wird und eine Gesamtlänge von 200–450 µm aufweist (De Graaf *et al.*, 1994a; Mehlhorn und Piekarski, 2002).

Der zweite Sporentyp, der zu einem früheren Zeitpunkt der Infektion innerhalb des Wirtes gebildet wird, weist im Vergleich zum oben beschriebenen Typ eine mit 82-143 nm weitaus dünnere Endospore und einen kürzeren Polfaden auf. Diese Sporen keimen bereits intrazellulär aus und bewirken eine Ausbreitung des Parasiten innerhalb des befallenen Darmepithels (De Graaf *et al.*, 1994a).

Abbildung 18: Schematische Darstellung einer Spore von *Nosema apis*.Abbildung 19: *Nosema apis*-Spore mit ausgestülptem Polfaden

2.4.2 Entwicklung

Nosema apis ist im Gegensatz zu einigen anderen *Nosema* spp. streng gewebs- und zellspezifisch, eine Entwicklung kann ausschließlich in Epithelzellen des Ventriculus von Honigbienen stattfinden (Liu, 1984).

Innerhalb von weniger als zehn Minuten gelangen die Sporen nach oraler Aufnahme über den Pharynx in den Honigmagen und über den Proventriculus in den Ventriculus

(Ritter, 1996). Dort keimen sie innerhalb von 30 Minuten aus. Welcher Stimulus die Auskeimung initiiert ist unklar (Bailey, 1955).

Darüber, wie das Sporoplasma zu Beginn des Vermehrungszyklus in die Wirtszelle gelangt, existieren in der Literatur verschiedene Ansichten. Mikrosporidien befallen eine Wirtszelle indem sie mit Hilfe ihres ausgestülpten Polfadens das Plasmalemma der Wirtszelle penetrieren und ihr Sporoplasma direkt in das Cytoplasma der Wirtszelle freisetzen. Dass das Sporoplasma direkt in das Cytoplasma injiziert wird, konnte von ISHIHARA (1968) im Falle von *Nosema bombycis*, einem Protozoon des Seidenspinners (*Bombyx mori*), elektronenmikroskopisch aufgezeigt werden. STECHE und HELD (1981) jedoch gehen aufgrund ihrer rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen davon aus, dass dies bei *Nosema apis* nicht der Fall ist. Sie postulieren, dass der Polfaden nur die peritrophische Membran des Darmes durchdringt und bereits primäre Teilungsstadien freigesetzt werden, die aktiv in das Flimmerepithel und die Darmzellwand eindringen. Innerhalb der Wirtszelle finden zwei aufeinanderfolgende Vermehrungsphasen, eine Merogonie und eine Sporogonie statt. Während der ersten Phase der Vermehrung, der Merogonie, reift das Sporoplasma der Spore in der Wirtszelle zum zweikernigen Meronten heran. Dessen Zellkerne teilen sich wiederholt, so dass mehrere, ebenfalls zweikernige, Merozyten entstehen. Diese wandeln sich in der zweiten Phase, der Sporogonie, zu Sporonten um. Durch Zweiteilung entstehen aus den Sporonten die Sporoblasten, die im Cytoplasma der Wirtszelle zu Sporen heranreifen. In der Ausbildung des tubulären Polfadens sowie der Exospore findet die Entwicklung ihren Abschluss. Platzt die Wirtszelle auf, werden die Sporen freigesetzt (Mehlhorn und Piekarski, 2002; Ritter, 1996). So kommt es entweder zur Autoinfektion, d. h. zum Befall benachbarter Wirtszellen, oder zur Ausscheidung der Sporen mit dem Bienekot (Eckert *et al.*, 2005). Ausgehend von einem begrenzten Bereich im hinteren Abschnitt des Ventriculus breitet sich die Infektion innerhalb von zwei Wochen über den gesamten Mitteldarm aus (Fries, 1988; De Graaf *et al.*, 1994b). Als mittlere Infektionsdosis ermittelte FRIES (1988) eine Konzentration von 94,3 Sporen pro Biene. Die ersten, in einer Wirtszelle gebildeten Sporen, sind in der Lage, bereits in der Zelle auszukeimen und benachbarte Zellen zu infizieren (Autoinfektion). Erst zu einem späteren Zeitpunkt entstehen Dauersporen, die in der Lage sind, außerhalb des Wirtes zu existieren (Fries *et al.*, 1992; De Graaf *et al.*, 1994a). Über die Präpatenz von *N. apis*-Infektionen, werden in der Literatur verschiedene Angaben gemacht. Sie wird von

FRIES *et al.* (1992) mit 36 Stunden, von ROMMEL *et al.* (2000) mit 48–60 Stunden und von MEHLHORN und PIEKARSKI (2002) mit 4–7 Tagen angegeben.

2.4.3 Epidemiologie und Vorkommen

N. apis ist in nahezu allen Ländern, in denen die Europäische Honigbiene gehalten wird, verbreitet (Eckert *et al.*, 2005). Ein Problem stellt die Nosemose allerdings eher in den kühlen und gemäßigten Klimazonen dar. Hier gilt sie als ubiquitär verbreitet und als häufigste Ursache für Bienen- und Völkerverluste. Die weit verbreiteten latenten Mikrosporidieninfektionen können durch ungünstige Haltungs- und Witterungsbedingungen leicht in akute Formen übergehen und eine hohe Sterblichkeit von Bienen hervorrufen (Ritter, 1996).

Die Ausbreitung der Infektion innerhalb eines Bienenvolkes erfolgt durch den sporenhaltigen Kot erkrankter Bienen. Über kontaminiertes Futter und Tränken sowie bei der Reinigung des Bienenstocks infizieren sich Bienen oral (Ritter, 1996). Einen weiteren Ansteckungsweg stellt das gegenseitige Füttern (Trophallaxis) dar. Arbeiterinnen und Königin können mit dem Kropfinhalt von Bienen infiziert werden, wenn diese kurz zuvor Sporen aufgenommen haben (Webster, 1993). Über den gleichen Weg wird auch Honig mit Sporen kontaminiert (Eckert *et al.*, 2005). Bei der Analyse des Honigs lassen sich diese mikroskopisch nachweisen.

Gesunde Völker können sich einerseits durch direkten Kontakt mit erkrankten Völkern anstecken (beispielsweise durch Räuberei), andererseits kann eine Ansteckung auch durch imkerliche Maßnahmen, wie Verfüttern von sporenhaltigem Honig oder die Vereinigung von schwachen mit gesunden Bienenvölkern, erfolgen (Ritter, 1996; Rommel *et al.*, 2000).

Junge Arbeiterinnen, die den Stock reinigen, sind stärker infiziert als Drohnen oder Königinnen. Eine Ansteckung der Königin tritt meist erst dann auf, wenn das gesamte Volk stark infiziert ist (Ritter, 1996). Grundsätzlich aber ist die Königin ebenso empfänglich für *Nosema apis*-Sporen wie Arbeiterinnen (Webster *et al.*, 2004). Da die Königin grundsätzlich im Stock abkottet und Ammenbienen diesen Kot entfernen, stellt die Königin eine bedeutende Infektionsquelle für das gesamte Volk dar (Czakońska, 2000).

Während der Aufzucht der Brut (Februar bis Oktober) herrscht im Bienenstock eine für *Nosema apis* optimale Vermehrungstemperatur von 30–34°C. Bei einer Temperatur von 20°C, wie sie in der Wintertraube vorliegt, ist die Vermehrung äußerst gering und

sistiert unter experimentellen Bedingungen unterhalb von 10°C völlig (Ritter, 1996). Die Sporen können im Bienenkot bis zu 2 Jahre (Rommel *et al.*, 2000), in sauberem Wasser (4°C) sogar mehr als 7 Jahre (Eckert *et al.*, 2005) infektiös bleiben. Negativ auf ihre Lebensfähigkeit wirken sich allerdings bakterienhaltiges Wasser und Trockenheit aus (Eckert *et al.*, 2005). Während die vegetativen Stadien von *Nosema apis* bereits bei Temperaturen über 37°C abgetötet werden, ist dies bei Sporen erst ab einer Temperatur von 60°C der Fall (Ritter, 1996).

2.4.4 Pathogenese

Die Nosemose bewirkt eine Zerstörung des Darmepithels, das in gesundem Zustand unter anderem eine natürliche Barriere für Krankheitserreger darstellt. Der Kot wird dünnflüssiger, es kommt zu einem erhöhten Kotstau und die Bienen koten besonders bei ungünstigen Witterungsverhältnissen, nicht wie üblich im Flug, sondern bereits im Stock ab (Ritter, 1996). Dadurch wird eine schnelle Ausbreitung der Infektion im gesamten Volk begünstigt. Die in den Darmepithelzellen beobachtete verminderte RNA-Synthese (Hartwig und Przełęcka, 1971), sowie die durch verminderte Aktivität proteolytischer Enzyme gestörte Proteinverwertung (Malone und Gatehouse, 1998) führen zur Beeinträchtigung der Entwicklung und Funktion zahlreicher Organe und zu einer allgemeinen Schwächung, die sich in Flügelzittern und krampfartigen Bewegungen äußert (Ritter, 1996). Der gestörte Stoffwechsel bewirkt einen mangelnden Aufbau des Fettkörpers, sowie einen schnelleren Abbau der in ihm gespeicherten Proteine. Dadurch verkürzt sich die Lebensdauer der Bienen (Ritter, 1996). Um den Proteinmangel auszugleichen, nehmen die erkrankten Bienen vermehrt Futter auf, Mittel- und Enddarm nehmen dadurch an Größe zu und drücken auf die Luftsäcke. Die erkrankten Bienen werden zu flugunfähigen Krabblern (Ritter, 1996).

Gesunde Arbeiterinnen besitzen bereits im Alter von 5–10 Tagen voll funktionsfähige Hypopharynxdrüsen, die den Futtersaft für die Brut und die Königin sezernieren. Eine *Nosema apis*-Infektion bei jungen Arbeiterinnen führt aufgrund des Proteindefizits zu unterentwickelten und pathologisch veränderten Hypopharynxdrüsen, die ihre Aufgabe nur noch teilweise oder gar nicht mehr erfüllen (Wang und Moeller, 1971). Eine verminderte Fütterung der Königin sowie eine reduzierte Aufzucht der Brut ist die Folge.

Besonders gravierend sind die Folgen einer Infektion bei Königinnen: Ovarien und Oocyten weisen Degenerationserscheinungen auf, Oocyten werden resorbiert und die

Ovariolen (Eiröhren) nehmen ein runzeliges Aussehen an (Fyg, 1964; Liu, 1992). Diese Veränderungen können zur Unfruchtbarkeit von Königinnen führen.

Die Nosemose hat darüber hinaus einen bedeutenden Einfluss auf die Arbeitsverteilung im Bienenstock. So sind infizierte Bienen „physiologisch älter“ als gesunde Vergleichsbienen. Während gesunde Arbeiterinnen in den ersten Tagen ihres Lebens vor allem die Pflege und das Füttern der Brut und der Königin übernehmen, tun dies nur wenige infizierte Arbeiterinnen gleichen Alters aufgrund unterentwickelter Hypopharynxdrüsen. Infizierte Arbeiterinnen beginnen stattdessen eher mit den nachfolgenden Aufgaben (Wang und Moeller, 1970). Ist das gesamte Bienenvolk erkrankt, sinkt der Pollenertrag (Anderson und Giaccon, 1992), die Honigproduktion (Farrar, 1947) und in gemäßigten Klimazonen die Auswinterungsrate (Farrar, 1947).

2.4.5 Diagnose

Makroskopische Untersuchung:

Aus toten Bienen wird nach Abtrennung des Kopfes der Darmtrakt zusammen mit der Spitze des Hinterleibes aus dem Körper herausgezogen und makroskopisch unter der Stereolupe beurteilt. Ein gesunder Bienendarm erscheint transparent und braun. Bei einem Befall mit *Nosema apis* nimmt er hingegen ein trübes bis milchig-weißes Aussehen an (Eckert *et al.*, 2005; vgl. Abb. 20).

Mikroskopische Untersuchung:

2–3 ml Wasser werden mit etwa 20 Bienenabdomen oder präparierten Därmen im Mörser zerrieben und wenige Tropfen dieser Zerreibung auf einen Objektträger überführt und direkt bzw. nach vorausgehender Filtration bei 400facher Vergrößerung mikroskopiert. Bei starken Infektionen sind Sporenzahlen von >100/Gesichtsfeld nachweisbar.

Für eine exaktere Beurteilung der Befallsstärke eignet sich die mikroskopische Untersuchung einzelner Därme. Ein Darm wird dabei mit einigen Tropfen Wasser zerrieben und die Aufschwemmung auf 3 ml aufgefüllt. Ein Tropfen dieser Zerreibung wird mit einer Zählkammer nach Metz mikroskopiert und der Mittelwert des Befalls nach Auszählung von zehn Quadraten ermittelt.

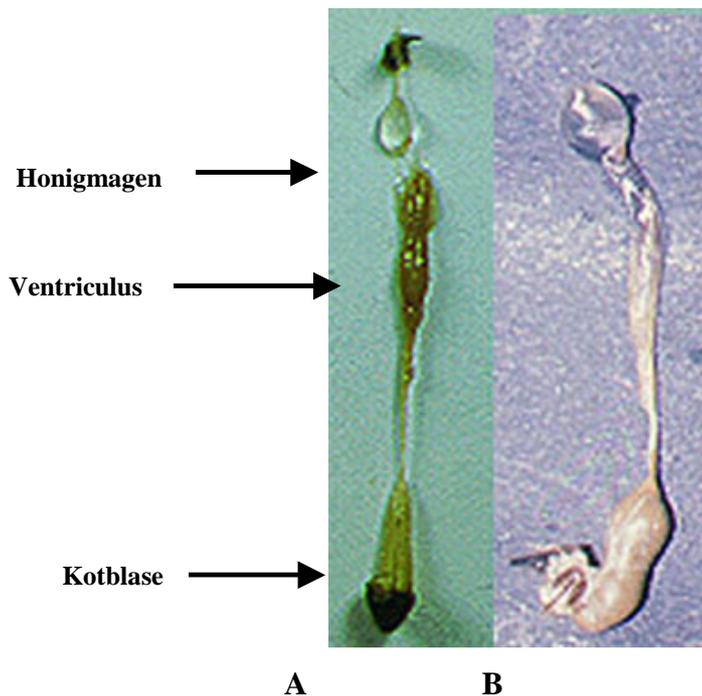


Abbildung 20: A: gesunder Darm einer Honigbiene; B: *Nosema*-geschädigter Darm

Molekularbiologischer Nachweis:

In neuerer Zeit wurden Methoden zum Nachweis von *N. apis*-DNA mittels PCR entwickelt (WEBSTER *et al.*; 2004) auf die in Kapitel 3.3.2 näher eingegangen wird.

2.4.6 Therapie

Die Nosemose stellt eine typische Faktorenkrankheit dar. Imkerliche Maßnahmen, die den Hygienestatus eines Bienenvolkes erhöhen, können im günstigen Fall zu Selbstheilungen führen. Zu diesen Maßnahmen zählt der Austausch kontaminierter Bienenbeuten gegen dekontaminierte mittels dem Kunstschwarmverfahren oder der Ersatz infizierter Winterbienen durch gesunde Jungbienen nicht infizierter Völker (Ritter, 1996; Eckert *et al.*, 2005).

Zur medikamentösen Therapie gegen die vegetativen Stadien von *N. apis* hat sich der Wirkstoff Fumagillin (Fumidil®) bewährt (Hartwig und Przelečka, 1971). Allerdings sind entsprechende Präparate aus lebensmittelrechtlichen Gründen in Deutschland nicht zugelassen. Zur Entseuchung der Beuten und Waben eignet sich die Desinfektion mit 60%-iger technischer Essigsäure oder eine thermische Behandlung (49°C, 24 Std.). Da

diese Methoden keine ausreichende Wirkung auf eventuell im Futter enthaltene Sporen haben, müssen die Futterwaben ausgeschleudert und Bienenfutter erhitzt (60°C, 10 min.) oder kurz gekocht werden (Ritter, 1996). Schwer erkrankte Völker sollten wegen der sehr geringen Aussicht auf Heilung abgetötet werden (Ritter, 1996).

3. Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Im Februar 2004 wurden bayerische Imker in der Zeitschrift „Imkerfreund“ (Ausgabe 03/2004) sowie auf der Homepage des Landesverbandes Bayerischer Imker e.V. (www.lvbi.de) auf die Studie zur Verbreitung von Bienenviren in Bayern aufmerksam gemacht und zur Teilnahme aufgerufen (vgl. Anhang 9.2). Zwischen März 2004 und April 2005 nahmen insgesamt 35 interessierte Imker aus 19 bayerischen Landkreisen durch die Einsendung von Probenmaterial teil. Sofort nach Erhalt wurden die Proben protokolliert und wie folgt bearbeitet:

Für den molekularbiologischen Nachweis von Bienenviren wurden jeweils 2 x 20

Tabelle 5: Absoluter (n) und prozentualer Anteil der Landkreise am Probenmaterial dieser Studie

Landkreis	Bienenvölker (n)	Bienenvölker (%)
Amberg-Sulzbach (AS)	5	3,6
Augsburg (A)	1	0,7
Bad Tölz-Wolfratshausen (TÖL)	10	7,3
Cham (CHA)	10	7,3
Dingolfing/Landau (DGF)	4	2,9
Erding (ED)	2	1,5
Fürth (FÜ)	1	0,7
Hassberge (HAS)	6	4,4
Landshut (LA)	7	5,1
Main-Spessart (MSP)	14	10,2
Miltenberg (MIL)	1	0,7
Mühlendorf a. Inn (MÜ)	7	5,1
München (M)	1	0,7
Neustadt a. d. Waldnaab (NEW)	4	2,9
Oberallgäu (OA)	13	9,5
Regen (RG)	1	0,7
Rhön-Grabfeld (NES [Bad Neustadt a. d. Saale])	1	0,7
Rosenheim (RO)	35	25,5
Straubing-Bogen (SR)	14	10,2
Gesamt	137	100

Bienen von evtl. anhaftenden Milben befreit und als A- und B-Probe in Scintillationsgefäßen verpackt. Isolierte Varroamilben wurden registriert und in eigenen Gefäßen gelagert. Für die Untersuchung auf *N. apis* wurde ebenfalls eine Probe von 20 Tieren entnommen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sämtliche Proben bei -20°C gelagert. Tabelle 5 und Abbildung 21 geben einen Überblick über die geographische Lage der untersuchten Landkreise und die Zahl der aus den jeweiligen Landkreisen untersuchten Bienenproben.



A	= Augsburg	MSP	= Main-Spessart
AS	= Amberg-Sulzbach	MÜ	= Mühldorf a. Inn
CHA	= Cham	NES	= Rhön-Grabfeld (Bad Neustadt a. d. Saale)
DGF	= Dingolfing/Landau	NEW	= Neustadt a. d. Waldnaab
ED	= Erding	OA	= Oberallgäu
FÜ	= Fürth	REG	= Regen
HAS	= Hassberge	RO	= Rosenheim
LA	= Landshut	SR	= Straubing
M	= München	TÖL	= Bad Tölz-Wolfratshausen
MIL	= Miltenberg		

Abbildung 21: Geographische Lage der in die Studie einbezogenen bayerischen Landkreise

3.2. Virusnachweis

3.2.1. RNA-Isolierung

3.2.1.1. RNA-Isolierung aus Bienen

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus toten Bienen erfolgte mit Hilfe des RNeasy mini kits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Je Bienenvolk wurden dazu fünf gefrorene Bienen in einem bei -20°C vorgekühlten, sterilen Porzellanmörser mit einer Spatelspitze sterilem Seesand in flüssigem Stickstoff zügig zu einem feinen Pulver zerrieben.

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCR clean, LoBind tube, Eppendorf, Hamburg) wurden 600 μl des im Extraktionskit enthaltenen Lysispuffers RLT sowie 6 μl β -Mercaptoethanol vorgelegt und 30 mg der Verreibung (entspricht etwa dem Gewicht einer Biene) zugegeben. In einer auf 4°C vorgekühlten Mikrozentrifuge (5417 R, Eppendorf, Hamburg) wurde der Ansatz bei 14 000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Den Anleitungen des „animal tissues“-Protokolls folgend, schloss sich die RNA-Isolierung aus dem Überstand an. Die isolierte RNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung auf -20°C gehalten.

Als Negativkontrolle wurde als jeweils letzte Probe eines Isolierungsansatzes von mehreren Bienenproben eine aus dem Futtertierhandel (Dehner, München) bezogene Hausgrille (*Acheta domesticus* L.) unter identischen Bedingungen aufbereitet und in der RT-PCR mitgeführt.

3.2.1.2. RNA-Isolierung aus Milben

Da nicht aus allen beprobten Bienenvölkern ausreichend *Varroa*-Milben zur Verfügung standen, variierte die für die RNA-Extraktion eingesetzte Individuenzahl zwischen einer und zehn Milben (vgl. Tab. 6 Anhang 9.5). Der Aufschluss des Milbengewebes erfolgte in einem TissueLyser (Qiagen, Hilden, Deutschland). Hierfür wurden 600 μl Lysispuffers RLT, 6 μl β -Mercaptoethanol und eine Stahlkugel (\varnothing 5 mm) in einem 2 ml Reaktionsgefäß (PCR clean, LoBind tube, Eppendorf, Hamburg) vorgelegt, die Milben auf Eis zugesetzt und für 2 x 2 min bei 30 Hz geschüttelt. Der Ansatz wurde daraufhin eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Extraktion aus dem Überstand wurde ebenfalls nach dem „animal tissues“-Protokoll des RNeasy mini kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die extrahierte RNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.2. Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Amplifikation von Virus-RNA erfolgte mit Hilfe des OneStep RT-PCR Kit der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland). Der Reaktionsansatz ist so zusammengesetzt, dass alle Enzyme, die für die Reverse Transkription und die nachfolgende PCR benötigt werden bereits zu Beginn der Reaktion vorliegen (OneStep).

3.2.2.1. Reaktionsansätze und Kontrollen

Der Nachweis der drei RNA-Viren *Black queen cell virus* (BQCV), Deformed wing virus (DWV) und Kashmir bee virus (KBV) erfolgte jeweils in separaten RT-PCR-Ansätzen. Bei jeder durchgeführten RT-PCR wurden neben den Proben eine Negativkontrolle des PCR Mastermix (RNase-freies Wasser) sowie eine Positivkontrolle mitgeführt. Die für den Nachweis der drei Viren eingesetzten Positivkontrollen wurden freundlicherweise von Dr. Reinhold Siede (Hessisches Dienstleistungszentrum für Landwirtschaft, Gartenbau und Naturschutz, Bieneninstitut Kirchhain) in Form von positiven Bienen (BQCV; DWV) bzw. isolierter RNA (KBV) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung des Mastermix und die verwendeten Cycler-Programme wurden – um die Methode zu standardisieren – nach dem im Bieneninstitut Kirchhain benutzten Protokoll durchgeführt (R. Siede, pers. Mitteilung). Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis. Die Reaktionsansätze von 20 µl/Probe bestanden aus 11,8µl RNase freiem Wasser, 4µl 5x OneStep RT-PCR Puffer (12,5 mM MgCl₂), 400 µM dNTPs, 0,4µM Primer, 0,8µl RT-PCR enzyme mix und 1µl template RNA-Lösung. Die Amplifizierung fand in 0,2 ml PCR tubes (Eppendorf, Hamburg) in einem Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg) statt. Die verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

3.2.2.2. Primer und RT-PCR Konditionen

3.2.2.2.1 BQCV

Der Nachweis von BQCV-RNA erfolgte in Anlehnung an die von BENJEDDOU *et al.* (2001) entwickelte Methode. Das verwendete spezifische Primerpaar BQCV1/2 amplifiziert ein 700 bp langes Fragment am 3'-Ende des BQCV-Genoms (GenBank No.: AF183905). Der Primer BQCV1 (5'- TGG TCA GCT CCC ACT ACC TTA AAC -3') bindet an die Nukleotide 7850-7874 im Bereich des ORF2, welches für die Strukturproteine kodiert. BQCV2 (5'-GCA ACA AGA AGA AAC GTA AAC CAC-3') bindet an die Nukleotidpositionen 8526-8550 innerhalb der nicht kodierenden Region am 3'-Ende (3'-UTR) des Virusgenoms (vgl. Abb. 6; 22).

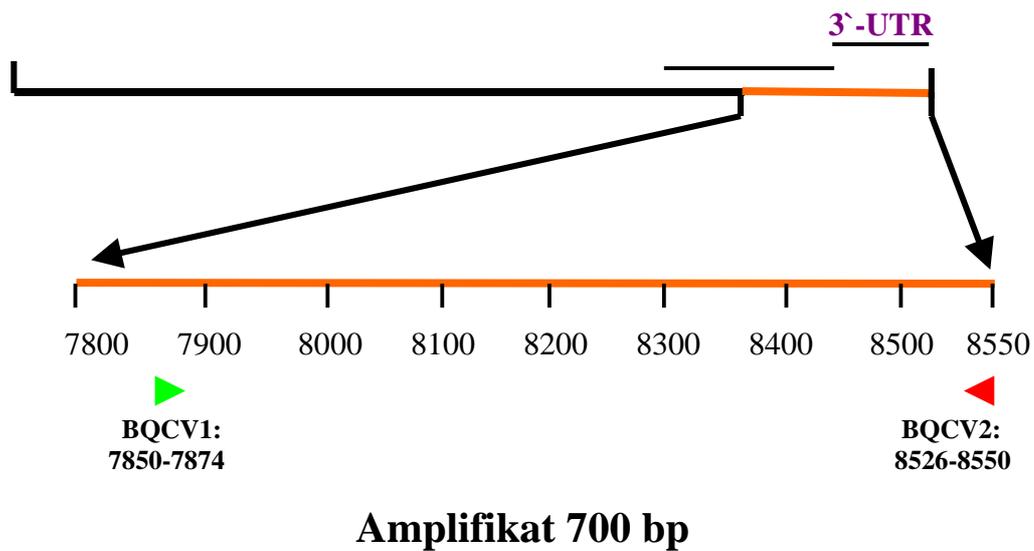
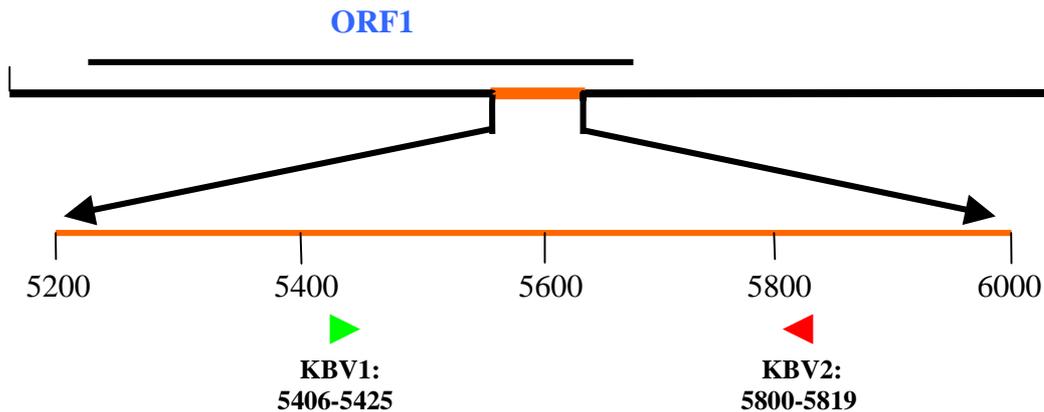


Abbildung 22: Lage der Bindungsstellen für die Primer BQCV1/2 innerhalb des Virusgenoms. ORF2: open reading frame 2; 3'-UTR: untranslated region

Das Temperatur-Profil der RT-PCR bestand aus einer Reversen Transkription bei 50°C für 30 min, einer initialen Denaturierung bei 95°C für 15 min und 40 Amplifizierungs-Zyklen mit 94°C, 58°C und 72°C für jeweils 1 min. Ein letzter Elongationsschritt für 10 min bei 72°C schloss die DNA-Synthese ab.

3.2.2.2.2 KBV

Der Nachweis von KBV-RNA erfolgte in einem ersten Schritt durch Amplifizierung eines 414 bp langen Teilstückes des RNA-Polymerasegens innerhalb des ORF1 des KBV-Genoms (GenBank No.: AY275710). Die von STOLTZ *et al.* (1995) beschriebenen Primer KBV-1 (5'- GAT GAA CGT CGA CCT ATT GA -3') und KBV-2 (5'- TGT GGG TTG GCT ATG AGT CA -3') binden an die Nukleotidpositionen 5406-5425 bzw. 5800-5819 (vgl. Abb. 6; 23). Das Amplifizierungs-Programm für diese RT-PCR war identisch mit dem unter 3.2.2.2.1 beschriebenen Programm.



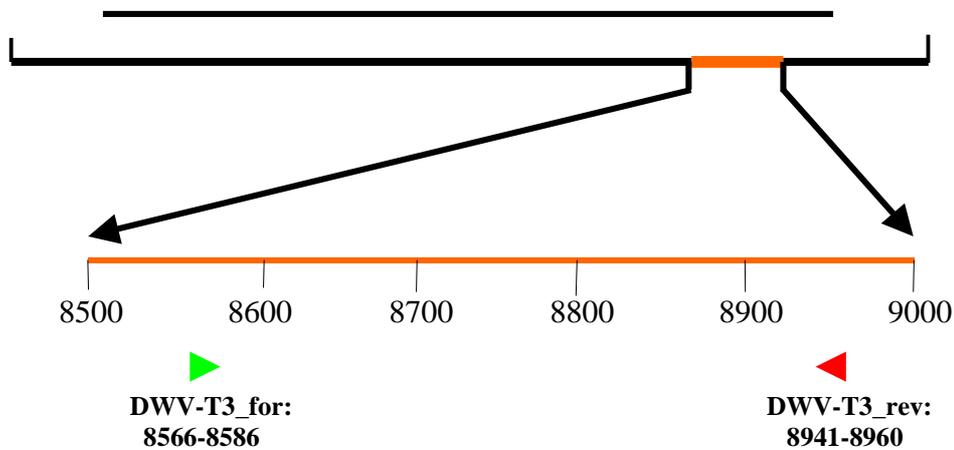
Amplifikat 414 bp

Abbildung 23: Lage der Bindungsstellen für die Primer KBV1/2 innerhalb des Virusgenoms.

Die Sequenzierung von PCR-Produkten, die mit dieser Methode erzeugt wurden, ergab in einigen Fällen Hinweise auf eine mangelnde Spezifität der Primer und schwache Kreuzreaktivität mit ABPV-positiven Proben (vgl. Kapitel 4.1.2.3 S. 64). Aus diesem Grund wurden alle mit dieser RT-PCR positiv getesteten Proben mit dem Verfahren nach EVANS *et al.* (2001) überprüft und die erhaltenen Produkte ebenfalls sequenziert. Das nach EVANS *et al.* (2001) verwendete Primerpaar CAPIS (5′- GGC GAG CCA CTA TGT GCT AT-3′) und CAPIA (5′- ATC TTC AGC CCA CTT-3′) amplifiziert ein 401 bp langes Fragment eines Capsidproteingens von KBV und ABPV. Die Primer binden an den Nukleotidpositionen 8164–8183 und 8610–8624 von KBV (GenBank No.: AY275710) bzw. 8108–8127 und 8508–8494 von ABPV (GenBank No.: AF486072). Das Amplifizierungs-Programm für diese RT-PCR war bis auf die Annealing-Temperatur (50°C) mit dem unter 3.2.2.2.1 beschriebenen Programm identisch.

3.2.2.2.3 DWV

Der Nachweis von DWV-RNA erfolgte mit Hilfe des von TENTCHEVA *et al.*, (2004a) entwickelten Verfahrens. Das hierzu verwendete Primerpaar DWV-T3_for (5′- TTT GCA AGA TGC TGT ATG TGG –3′) und DWV-T3_rev (5′- GTC GTG CAG CTC GAT AGG AT –3′) amplifiziert ein 395 bp langes Teilstück des DWV Polyproteingens gp1 im Bereich der Nukleotidpositionen 8566–8960 (GenBank No.: AJ489744) (vgl. Abb. 24).



Amplifikat 395 bp

Abbildung 24: Lage der Bindungsstellen für die Primer DWV-T3_for/rev innerhalb des Virusgenoms. DWVgp1: Deformed wing virus polyprotein gene 1

Das Temperatur-Profil der DWV-RT-PCR bestand aus einer Reversen Transkription bei 50°C für 30 min, einer initialen Denaturierung bei 95°C für 15 min, 35 Amplifizierungs-Zyklen mit 94°C für 30 sec, 55°C für 30 sec, 72°C für 1 min und einem letzten Elongationsschritt für 7 min bei 72°C.

3.2.3. Gelelektrophorese und Sequenzierung von PCR-Produkten

Der Nachweis von PCR-Produkten erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese mit 1.5-3%igen Agarosegelen in 1x TAE-Puffer (NEEO-Qualität, ROTH, Karlsruhe, Deutschland) nach Ethidiumbromid-Färbung (Sambrook and Russell, 2001). Die Dokumentation und Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe eines INFINITY® Video-Dokumentationssystems (PeqLab, Erlangen, Deutschland). Ausgewählte PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAGEN PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) oder des INVITROGEN PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) nach den Angaben der Hersteller aufgereinigt und die Nukleinsäurekonzentrationen photometrisch bestimmt (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, PeqLab, Erlangen, Deutschland).

Die Sequenzierung von PCR-Produkten wurde von der Firma MWGBiotech (Martinsried, Deutschland) durchgeführt und die erhaltenen Sequenzierungsdaten über

eine BLAST-Recherche (National Center for Biotechnology Information, NCBI) mit GenBank-Einträgen abgeglichen (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

3.3. Nachweis von *Nosema apis* und *Nosema ceranae*

3.3.1. Mikroskopischer Nachweis von Mikrosporidien-Sporen

Zum mikroskopischen Nachweis von Mikrosporidien-Sporen wurde die von Ritter (1996) beschriebene Methode angewendet. Hierzu wurden jeweils 20 Bienen mit 3 ml PBS-Puffer (pH 7,4) in einem sterilen Porzellanmörser zu einer feinen Suspension zerrieben. 2-3 Tropfen der Flüssigkeit wurden auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und bei 400facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop betrachtet (ZEISS Axioskop, Carl ZEISS, Oberkochen, Deutschland). Anhand der mittleren Sporenzahl in 20 Gesichtsfeldern wurde die Befallsintensität nach dem von Ritter (1996) festgelegten Schema ermittelt:

- < 20 Sporen / Gesichtsfeld: leichter Befall
- 20 – 100 Sporen / Gesichtsfeld: mittelgradiger Befall
- > 100 Sporen / Gesichtsfeld: starker Befall

3.3.2. Mikrosporidien-PCR

3.3.2.1. Methoden der DNA-Isolierung

Zur Extraktion der DNA aus Sporen von *Nosema* spp. wurden drei verschiedene Methoden erprobt und verglichen.

Methodenach Webster et al. (2004), abgewandelt:

In Abwandlung des Originalverfahrens wurden an Stelle von isolierten Ventriculi 10 Bienenabdomen in einem sterilen Porzellanmörser mit etwa 0,5 ml Aqua dest. zerrieben. Die entstandene Masse wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCRclean, LoBind tube, Eppendorf, Hamburg) überführt und DNA mit Hilfe des Wizard Genomic DNA Purification Kit der Firma Promega (Madison, WI, USA) extrahiert. Hierzu wurden 200 µl der im Kit enthaltenen Nuclei Lysis Solution (NLS) zugesetzt, gevortext und der Ansatz für eine Stunde bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl RNase (4 mg/ml) schloss sich eine weitere Inkubation bei 37°C für 15 Minuten an. Es folgten die Zugabe von 67 µl Proteinfällungslösung (Protein Precipitation Solution), Mischen und eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 10 000 rpm. Der Überstand wurde mit

250 µl Isopropanol versetzt, gemischt und bei 14 000 rpm für weitere fünf Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit 200 µl 70% bzw. 95% Ethanol gewaschen, und bei 14 000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Luftgetrocknete DNA wurde in 150 µl DNA Rehydration Solution (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA) aufgenommen, 1h bei 65°C und über Nacht bei 4°C gelöst.

Methode nach Müller et al. (1999):

In einem sterilen Porzellanmörser wurden 10 Bienenabdomen mit 1 ml Aqua dest. zerrieben und die Verreibung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 8 000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und abermals bei 14 000 rpm für sieben Minuten zentrifugiert. Dem Pellet wurden 180 µl ATL-Puffer (Qiap® DNA mini kit, QIAGEN, Hilden, Deutschland), 20 µl Proteinase K, 0.4U Chitinase (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,5 mm Glaskugeln zugegeben. Nach 2 h Inkubation bei 55°C unter Schütteln (für je 1 min in 15minütigen Abständen) wurde DNA nach dem Gewebeprotokoll des Qiamp® DNA mini kit isoliert.

Methode nach Freeman et al. (2004):

10 Bienenabdomen wurden mit 1 ml Aqua dest. in einem sterilen Porzellanmörser verrieben, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für eine Minute bei 14 000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl TNES-Harnstoff-Puffer (10mM TRIS/HCl, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5 % SDS, 4 M Harnstoff, pH 8.0), 20 µl Proteinase K sowie 0,5 mm Glaskugeln versetzt und für 20 Sekunden gevortext. Nach einer Inkubation über Nacht bei 56°C wurde die DNA nach dem Gewebeprotokoll des Qiamp® DNA mini kit isoliert.

3.3.2.2. Primer und PCR-Konditionen

3.3.2.2.1 Spezies-spezifische Mikrosporidien-PCR

Die von WEBSTER *et al.* (2004) entwickelten *N.apis*-spezifischen Primer NosA-F (5'-CCG ACG ATG TGA TAT GAG ATG -3') und NosA-R (5'-CAC TAT TAT CAT CCT CAG ATC ATA -3') amplifizieren einen 209 bp langen Abschnitt des 16S small subunit ribosomal RNA-Gens (ssUrRNA; GenBank No.: DQ 235446). Die Reaktionsansätze mit 25µl pro Probe beinhalteten je 0.2mM dNTPs (PeqLab, Erlangen, Deutschland), je 0.2µM Primer, 1.25U HotMaster Taq DNA Polymerase (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und 2,5 µl template DNA-Lösung. Die PCR wurde mit einem

Eppendorf Mastercycler gradient in 200µl Eppendorf PCR-Gefäßen durchgeführt. Das Temperaturprogramm bestand aus einer initialen Denaturierung bei 94°C für 5 min, 40 Zyklen mit 94°C 1 min, 62°C 1 min und 72°C 2min, sowie einem abschließenden Schritt bei 72°C für 10 min. Nachweis, Dokumentation und Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgte nach den unter Punkt 3.2.3 beschriebenen Bedingungen.

3.3.2.2.2 Universelle Mikrosporidien-PCR

Zum molekularbiologischen Nachweis von *N. ceranae* (Visvesvara *et al.*, 1995; Fries *et al.*, 1996) wurde mit Hilfe der universellen Primer MICRO-F (5'-CAC CAG GTT GAT TCT GCC TGA-3') und MICRO-R (5'-TAA TGA TCC TGC TAA TGG TTC TCC AAC-3') ein ca. 1300bp großes Teilstück des 16S ssUrRNA-Gens von Mikrosporidien amplifiziert und die erzeugten PCR-Produkte durch Sequenzierung differenziert. Die Primer binden an die Nukleotidpositionen 1-21 und 1258-1234 des GenBank-Eintrages DQ078785 für *N. ceranae*. Die Reaktionsansätze mit 100µl pro Probe beinhalteten je 0.2mM dNTPs (PeqLab, Erlangen, Deutschland), je 0.2µM Primer, 1.25U HotMaster Taq DNA Polymerase (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und 10 µl template DNA-Lösung. Das Temperaturprogramm für die DNA-Amplifizierung mit einem Eppendorf Mastercycler gradient bestand aus einer initialen Denaturierung bei 94°C für 2 min, 45 Zyklen mit 94°C 30 sec, 65°C 30 sec, 72°C 90 sec und einem abschließenden Schritt mit 72°C für 9 min.

3.4 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test nach PEARSON mit Hilfe der Datenanalyse Software SPSS 13.0 für WINDOWS® (SPSS Inc., Chicago, USA). Die ermittelten Werte wurden wie folgt interpretiert:

- p > 0.05 nicht signifikanter Unterschied
- p ≤ 0.05 signifikanter Unterschied
- p < 0.01 hoch signifikanter Unterschied

4. Ergebnisse

4.1 Virusnachweis

4.1.1. Virusnachweis in Bienen

Insgesamt wurden 137 Bienenvölker von 35 Imkern aus 19 bayerischen Landkreisen mittels RT-PCR auf eine Infektion mit dem *Black queen cell virus* (BQCV), dem Deformed wing virus (DWV) und dem Kaschmir Bienenvirus (KBV) untersucht. Nach den von den einsendenden Imkern auf den Untersuchungsanträgen (s. Anhang 9.4) gemachten Angaben ließ sich das Probenmaterial in zwei Gruppen aufteilen. Die erste Gruppe von Völkern - im Folgenden als „klinisch auffällige Gruppe“ bezeichnet - zeichnete sich durch eine erhöhte Sterblichkeit bis hin zum Totalausfall, Totalausfall mit bienenleerem Stock oder durch das Auftreten von flugunfähigen Bienen („Krabbler“) aus. Die zweite Gruppe wird im Folgenden – nach den Beobachtungen des jeweiligen Imkers – als „symptomlos“ bezeichnet.

In insgesamt 90,5% der Proben (124) konnte mindestens eines der drei Viren nachgewiesen werden. Hochsignifikant häufiger ($p < 0.01$) wurde Virus-RNA in den als „klinisch auffällig“ bezeichneten Bienenvölkern gefunden: 96% ($n = 102$) dieser Völker wiesen mindestens ein Virus auf, während in nur 74,3% ($n = 35$) der symptomlosen Völker ein Virusnachweis gelang.

4.1.1.1 Nachweis des *Black queen cell virus* (BQCV)

Bei 66,4% (91) aller Bienenproben konnte mittels RT-PCR ein Amplifikat in der erwarteten Größenordnung von 700 bp erzeugt werden, wobei 69,6% (71) der auffälligen und 57,1% (20) der symptomlosen Bienenvölker BQCV-positiv waren. Abbildung 25 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer RT-PCR an 9 Bienenproben. Die Häufigkeit BQCV-positiver Proben variierte im jahreszeitlichen Verlauf: 90,5% ($n = 22$) der während der Winterruhe (Oktober bis Februar) und 62% ($n = 116$) der während der Flugzeit (März bis September) aus Bienenstöcken entnommenen Proben waren positiv.

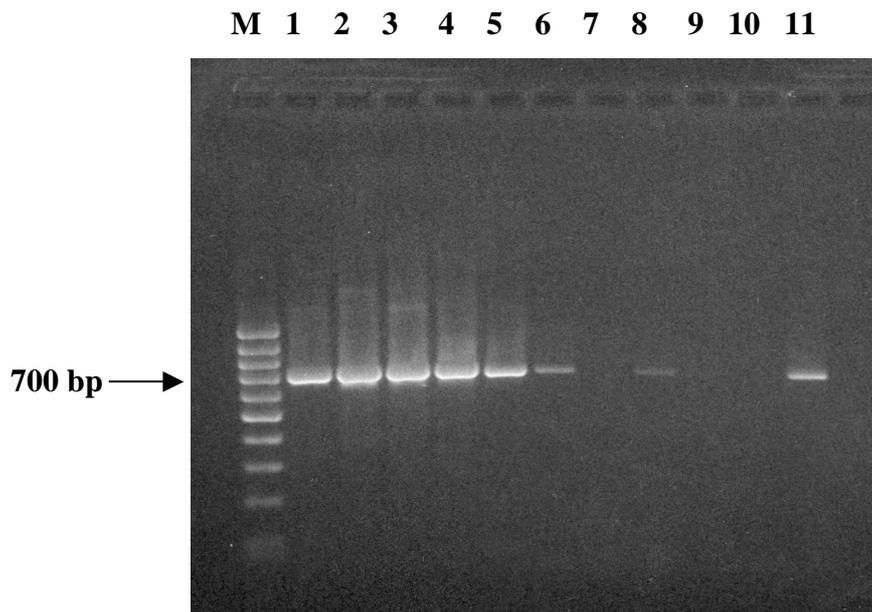


Abbildung 25: Beispiel für eine Gel-Elektrophorese von PCR-Produkten aus einer BQCV RT-PCR (2% Agarose); M: 100 bp Marker (PeqLab); 1-8: Bienenproben; 9+10: Negativkontrollen (*Acheta domesticus* bzw. a. d.); 11: Positivkontrolle (Bieneninstitut Kirchhain). Die Proben 1 bis 6 und 8 zeigen, entsprechend der Positivkontrolle, eine einzelne Bande in der erwarteten Größenordnung von 700 bp

In allen 19 untersuchten Landkreisen konnten BQCV-positive Völker identifiziert werden. Aus 14 Landkreisen wurde jeweils ein PCR-Produkt zur Verifizierung der Ergebnisse und zum Zweck des Vergleichs von Isolaten unterschiedlicher geographischer Herkunft sequenziert und mittels BLASTsearch einem GenBank-Sequenzabgleich unterzogen. Alle Sequenzen zeigten eine etwa 98%ige Übereinstimmung mit dem GenBank-Eintrag AY 626246.1, einer Teilsequenz des Struktur-Polyprotein-Gens von BQCV. Abb. 26 zeigt ein mit Hilfe des Programms ClustalW erzeugtes alignment dieser 14 erhaltenen Sequenzen. Die erhaltenen PCR-Produkte ließen nur eine geringe genetischen Variabilität erkennen.

AY626246.1	AGTTGTTACTGAGAAGGGTGTGGATTTTCGTCAGAGCTACCGTTAGTCCTCAACAGACTTA	60
ChamA.....T.....	60
HaßbergeA.....T.....	60
MühlendorfT.....	60
RhönT.....	60
Rosenheim	60
Main-Spessart	-----	55
Straubing	60
Miltenberg	-----	58
Bad Tölz	-----	53
Neustadt/W.	-----A.....T.....	58
Dingolfing	-----	58
Landshut	-----A.....	58
München	-----	58
Erding	-----	58
	***** **	
AY626246.1	TGGCAGTGAAGTCGCTCCTACTACTCATATCAGTACTCCTTTGGCAATAGAACAAATACC	120
Cham	C.....T.....	120
HaßbergeT.....	120
Mühlendorf	C..T....T.....C.....	120
Rhön	..T....T.....C.....	120
RosenheimT.....	120
Main-SpessartT.....	115
StraubingT.....	120
Miltenberg	118
Bad TölzT.....	113
Neustadt/W.	..T....T.....C..C.....	118
Dingolfing	..T....T.....	118
Landshut	..T....T.....C.....	118
München	..T....T.....C.....	118
Erding	..T....T.....	118
	** ***** ** ** ** *	
AY626246.1	TATAAAGGGAGTCGCAGAGTTCCAAATACCGTACTATGCTCCATGTTTGTTCATCTTCGTT	180
Cham	180
Haßberge	180
Mühlendorf	180
Rhön	180
Rosenheim	180
Main-Spessart	175
Straubing	180
Miltenberg	178
Bad Tölz	173
Neustadt/W.	A.....	178
Dingolfing	178
Landshut	178
MünchenG.....	178
Erding	178
	***** **	
AY626246.1	TAGAGCGAATTCGGAAACATTTTACTATAGTTCAGGTCGGAATAATCTCGATATATCCAC	240
ChamG....	240
HaßbergeG....	240
MühlendorfG....	240
RhönC.....G....	240
RosenheimC.....G....	240
Main-Spessart	235
Straubing	240
Miltenberg	238
Bad Tölz	233
Neustadt/W.A.....G....	238
Dingolfing	238
LandshutA.....	238
MünchenA.....	238
ErdingA.....	238
	***** **	

Abbildung 26, fortgesetzt

AY626246.1	TTCACCTCCATCCATCAATCGCTATTATGCGGTAGGTGCGGGAGATGATATGGACTTTTC	300
ChamT.....C.....	300
HaßbergeT.....	300
MühlendorfT.....	300
RhönT.....C.....	300
RosenheimC.....C.....	300
Main-Spessart	295
Straubing	300
MiltenbergT.....T.....	298
Bad Tölz	293
Neustadt/W.G..T.....T..T.....	298
Dingolfing	298
LandshutTA..G.....A..T..C.....T.....	298
MünchenTA..G.....A..T..C.....	298
ErdingTA..G.....A..T..C.....T.....	298
	***** * ***** ** ** ***** ***** *****	
AY626246.1	CATCTTTATCGGTACGCCGCCCTGTATTTCATGCATCTCAGACGGCCAGTTTACCAAAT	360
Cham	360
Haßberge	360
MühlendorfA.....	360
RhönT.....	360
Rosenheim	360
Main-Spessart	355
Straubing	360
Miltenberg	358
Bad Tölz	353
Neustadt/W.G..	358
Dingolfing	358
LandshutT.....	358
MünchenT.....	358
ErdingT.....	358
	***** ***** **	
AY626246.1	AAAACAAGGTAAAGTGTATGATTTGAGGTATGATCAGTATGACCCCTTCAGGGAAGTCCA	420
ChamC.....T.....	420
HaßbergeT.....	420
MühlendorfC.....	420
RhönT.....	420
RosenheimT.....	420
Main-Spessart	415
Straubing	420
Miltenberg	418
Bad Tölz	413
Neustadt/W.T..T.....	418
Dingolfing	418
LandshutC.....	418
MünchenC.....	418
ErdingC.....	418
	***** ***** ** *****	
AY626246.1	GGACGGTACGGCGTTCCCTCAATGCTCGTAGTATTGAGGATAGCGATTGTGTGAGCTCC	480
Cham	480
Haßberge	480
Mühlendorf	480
Rhön	480
RosenheimT.....	480
Main-Spessart	475
Straubing	480
Miltenberg	478
Bad Tölz	473
Neustadt/W.	478
DingolfingT.....	478
LandshutT..T.....A.....C.....	478
MünchenT..T.....A.....C.....	478
ErdingT..T.....A.....C.....	478
	***** ** ***** ***** *****	

Abbildung 26, fortgesetzt

AY626246.1	TTTAGAGGGAGGGCTCACTTTATCTATTGCTTAAATCGGTAAGCCACAAATTTTCTAAG	540
ChamA.....	540
Haßberge	540
Mühlendorf	540
Rhön	540
Rosenheim	540
Main-Spessart	-----	508
Straubing	540
Miltenberg	538
Bad Tölz---	530
Neustadt/W.	538
Dingolfing	537
Landshut	537
München	537
Erding	537

AY626246.1	TGTCATGAGTTTCTTCTCG-----	559
ChamGTTCTTCTCATGATTACTAATCGAACCGTGTGTAGAGTCAG	600
HaßbergeGTTCTTCTCATGATTACTAATCGAACCGTGTGTAGAGTCAG	600
MühlendorfGTTCTTCTCATGATTACTAATCGAACCGTGTGTAGAGTCAG	600
RhönGTTCTTCTCATGATTACTAATCGAACCGTGTGTAGAGTCAG	600
RosenheimGTTCTTCTCATGATTACTAATCGAACCGTGTGTAGAGTCAG	600
Main-Spessart	-----	
Straubing	559
MiltenbergG-----	558
Bad Tölz	-----	
Neustadt/W.GTTCTTCTCATGATTACTAATCGAACCGTGTGTAGAGTCAG	598
Dingolfing	.A.....GTTCTTCTCATGATTACTAATCGAACCGTGTGTAGAGTCAG	597
Landshut	.A.....GTTCTTCTCATGATTACTAATCGAACCGTGTGTAGAGTCAG	597
München	.A.....GTTCTTCTCATGATTACTAATCGAACCGTGTGTAGAGTCAG	597
Erding	.A.....GTTCTTCTCATGATTACTAATCGAACCGTGTGTAGAGTCAG	597
AY626246.1	-----	
Cham	AATGTTGTGGTTTACG	616
Haßberge	AATGTTGTGGTTTACG	616
Mühlendorf	AATGTTGTGGTTTA--	614
Rhön	AATGTTGTGGTTT---	613
Rosenheim	AATGTTGTGGTTTACG	616
Main-Spessart	-----	
Straubing	-----	
Miltenberg	-----	
Bad Tölz	-----	
Neustadt/W.	AATGTTGTGGTTTACG	614
Dingolfing	AATGTTGTGGTTTACG	613
Landshut	AATGTTGTGGTTT---	610
München	AATGTTGTGGTTTACG	613
Erding	AATGTTGTGGTTTACG	613

Abbildung 26: Alignment der Sequenzen von PCR-Produkten aus BQCV-positiven Bienenproben verschiedener Landkreise und dem BQCV-GenBank-Eintrag AY626246.1; „.“: Übereinstimmung mit Vergleichssequenz AY626246.1; „-“: fehlendes Nukleotid; „*“: Übereinstimmung in allen verglichenen Sequenzen

4.1.1.2 Nachweis des Deformed wing virus (DWV)

66,4% aller Bienenproben (91) ergaben in der DWV-RT-PCR ein Amplifikat mit der erwarteten Länge von 395 bp. In auffälligen Bienenvölkern war das DWV hochsignifikant häufiger nachweisbar als in unauffälligen Beständen: 74,5% (n =102) der auffälligen Völker und 42,9% (n = 35) der unauffälligen Völker waren positiv. Ein typisches Beispiel für ein Ergebnis einer DWV-RT-PCR gibt Abbildung 28B.

Ebenso wie das BQCV konnte das DWV in den Bienenproben, die während der Winterruhe entnommen wurden, signifikant häufiger (90,5% Positive; n = 22) nachgewiesen werden als in den Proben, die während der Flugzeit entnommen wurden (61,2% Positive; n = 116).

In 16 von 19 Landkreisen wurden DWV-positive Proben gefunden; lediglich das Probenmaterial der Landkreise Miltenberg (n = 1), München (n = 1) und Rhön-Grabfeld (n = 1) ergab keinen positiven Befund. In Analogie zur Vorgehensweise in Kapitel 4.1.1.1 wurde aus 15 Landkreisen jeweils ein PCR-Produkt sequenziert und mittels BLASTsearch ein Sequenzvergleich mit GenBank-Einträgen durchgeführt. Die Sequenzen der PCR-Produkte stimmten zu 98 bis 100% mit dem GenBank-Eintrag AY669852.1 – einer Teilsequenz aus dem Bereich der DWV Replikationsprotein-Gene – überein. Ein ClustalW-alignment aller erhaltenen Sequenzen mit dem GenBank-Eintrag AY 669852.1 zeigt Abbildung 27.

AY669852.1	ACTTATACTAAATATTCTAGTCTTACCAGGTATTCTACATTTTTC AACAGGCAAACAAGT	60
Landshut	-.....	59
Straubing	--.....	58
Dingolfing	-----	27
Mühlendorf	-.....	59
Neustadt/W.	-.....G.....G..	59
Main-Spessart	-.....	59
Regen	-.....	59
Augsburg	60
Oberallgäu	60
Fürth	--.....	58
Rosenheim	--.....	58
Haßberge	--.....	58
Cham	60
Erding	60
AmbergC.....	60
	*** ** ***** **	
AY669852.1	ATCTTTCAAACAATCCGTGAATATAGTGTGAGGTTTTATTCCCTTTTTCCTCATTAACTG	120
Landshut	119
Straubing	118
Dingolfing	87
MühlendorfT.....	119
Neustadt/W.T.....	119
Main-Spessart	119
RegenC.....	119
Augsburg	120
Oberallgäu	120
Fürth	118
RosenheimC.....	118
Haßberge	118
Cham	120
Erding	120
Amberg	120
	***** ** ** *****	

AY669852.1	TGTCGTTGATAAATTGAATCTCAAGTTCGGGACGCATTCACGCAGGAGATAACATCCCGA	180
LandshutA.....	179
StraubingA.....	178
DingolfingA.....	147
Mühlendorf	179
Neustadt/W.	179
Main-Spessart	179
Regen	179
Augsburg	180
Oberallgäu	180
Fürth	178
Rosenheim	178
Haßberge	178
ChamA.....	180
ErdingA.....	180
Amberg	...A.....A.....	180
	*** *****	

AY669852.1	GTCTTGTAGCTCAATGTCAACAACCATCGCTTACCTGATGTTCCAGGTGGCTTTAATGA	240
LandshutA.....T.....	239
StraubingA.....T.....	238
Dingolfing	207
MühlendorfA.....C.....	239
Neustadt/W.A.....	239
Main-Spessart	239
Regen	239
Augsburg	240
Oberallgäu	240
Fürth	238
RosenheimC.....	238
Haßberge	238
Cham	240
Erding	240
Amberg	A.....T.....	240
	***** *****	

AY669852.1	AGACAAAGGAAAACCAGCACTAGTATTCCAAGATATCGAATCAAACCCATCTAAACCAGG	300
Landshut	299
Straubing	298
Dingolfing	267
MühlendorfG.....	299
Neustadt/W.	299
Main-Spessart	299
Regen	299
Augsburg	300
Oberallgäu	300
Fürth	298
Rosenheim	298
Haßberge	298
Cham	300
Erding	300
Amberg	...T.....	300
	*** ** *****	

AY669852.1	CACACCACATACA-----	313
Landshut-----	310
StraubingG-----	312
Dingolfing-----	278
Mühlendorf-----	312
Neustadt/W.-----	311
Main-Spessart-----	311
Regen-----	312
Augsburg-----	313
Oberallgäu-----	313
Fürth-----	311
RosenheimG-----	312
Haßberge-----	311
ChamGCATCTTGC	322
Erding-----	313
Amberg-----	312

Abbildung 27: Alignment der Sequenzen von PCR-Produkten aus DWV-positiven Bienenproben verschiedener Landkreise und dem DWV-GenBank-Eintrag AY669852.1;

„“: Übereinstimmung mit Vergleichssequenz AY626246.1; „-“: fehlendes Nukleotid; „*“: Übereinstimmung in allen verglichenen Sequenzen

4.1.1.3 Nachweis des Kashmir bee virus (KBV)

In keiner der insgesamt 137 Bienenproben konnte KBV-RNA mittels der von STOLTZ *et al.* (1995) beschriebenen RT-PCR nachgewiesen werden. Ein Beispiel für ein Ergebnis einer KBV-RT-PCR gibt Abbildung 28A.

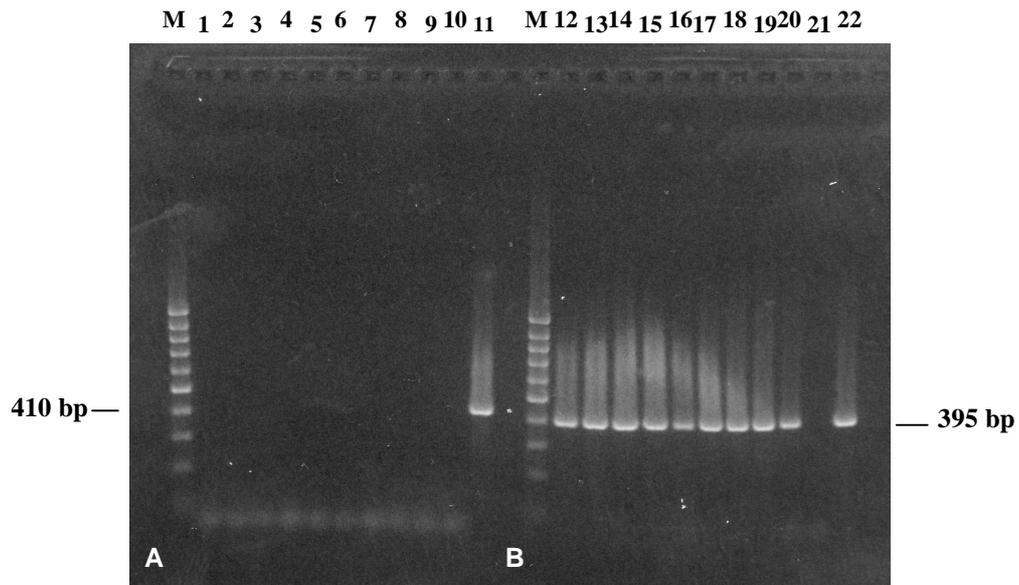


Abbildung 28: 2% Agarose-Gel-Elektrophorese von PCR-Produkten aus einer KBV RT-PCR (A) und einer DWV RT-PCR (B); M: 100 bp Marker (PeqLab); 1-9 bzw. 12-20: Bienenproben; 10 bzw. 21: Negativkontrolle (a. d.); 11: Positivkontrolle KBV (Bieneninstitut Kirchhain); 22: Positivkontrolle DWV (Bieneninstitut Kirchhain). Die Proben 12 bis 20 zeigen, entsprechend der DWV-Positivkontrolle, eine einzelne Bande in der erwarteten Größenordnung von 395 bp

4.1.1.4 Mehrfachinfektionen

Von den 124 Bienenvölkern, in denen mindestens ein Virus detektiert wurde, wiesen 26,6% (33) eine Monoinfektion mit dem BQCV und ebenfalls 26,6% eine Monoinfektion mit dem DWV auf (vgl. Abb. 29). Bei 46,8% der virus-positiven Völker (58) konnte eine Doppelinfektion mit beiden Viren nachgewiesen werden. 84,5% dieser Völker (49) waren vorberichtlich klinisch auffällig.

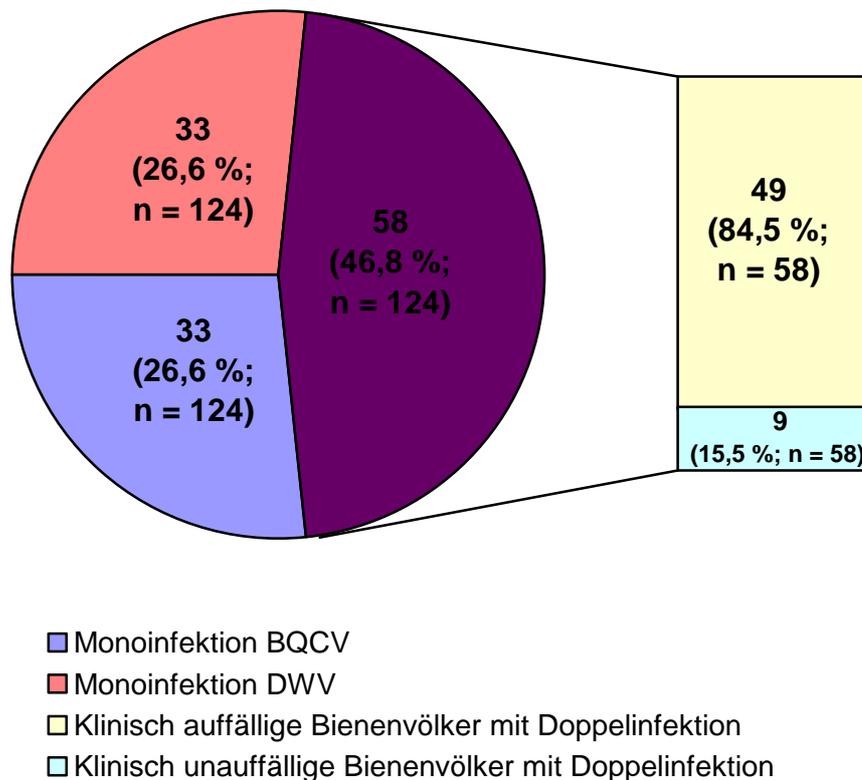


Abbildung 29: Verhältnis von monoinfizierten zu doppelinfizierten Bienenproben

4.1.2. Virusnachweis in Milben

Von 70 eingesandten Bienenvölkern konnten im Labor Varroamilben gewonnen werden. Sie wurden getrennt von den Bienenproben virologisch untersucht.

4.1.2.1 Nachweis des *Black queen cell virus* (BQCV)

In 20 % (14) der untersuchten Milbenproben konnte RNA des BQCV nachgewiesen werden. Die positiven Milben stammten ausnahmslos aus BQCV-positiven Bienenvölkern.

4.1.2.2 Nachweis des Deformed wing virus (DWV)

Das DWV konnte in 94.3 % (66) der Milbenproben nachgewiesen werden. 15 % (10) der DWV-positiven Milbenproben stammten aus DWV-negativen Bienenvölkern, 85 % (56) aus DWV-positiven Bienenvölkern.

4.1.2.3 Nachweis des Kashmir bee virus (KBV)

Mit der RT-PCR nach STOLTZ *et al.* (1995) erbrachten zunächst 31.4 % (22) der 70 untersuchten Milbenproben ein Amplifikat in der erwarteten Größenordnung von 410 bp. Teilweise wurden jedoch nur sehr schwache Banden in der Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen, die bei Wiederholung der Experimente in mehreren Fällen schlecht reproduzierbar waren. Eine Erhöhung der Zyklenzahl und Variationen des Temperaturprofils der RT-PCR (Gradienten-PCR) erbrachte keine höheren Produktausbeuten. Die Aufreinigung und Sequenzierung von PCR-Produkten mit dafür genügender Qualität und Konzentration ergab sowohl Hinweise für einen Nachweis von KBV-RNA, als auch von ABPV-RNA. Daraufhin wurden alle Proben, bei denen mit den Primern KBV-1 und KBV-2 Amplifikate beobachtet wurden, mit dem Primerpaar CAPIS und CAPIA nach EVANS *et al.* (2001) erneut untersucht. Dieses Primerpaar amplifiziert einen ca. 401 bp langen Abschnitt des Capsidprotein-Gens beider Viren (Evans *et al.*, 2001). Abbildung 30 zeigt einen Vergleich von Ergebnissen aus beiden PCR-Experimenten mit Milben- und Bienenproben. Auch mit dem zweiten Primerpaar konnten nicht bei allen der zunächst positiv beurteilten Milbenproben eindeutig reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Einige Proben zeigten in der Agarose-Gel-Elektrophorese nur schwache Banden in der erwarteten Größenordnung von 400 bp. Daneben wurden vereinzelt weitere Banden mit 600 und 800 bp Länge beobachtet. Eine Probe zeigte nur eine dieser unerwarteten Banden mit ca. 600 bp, die nicht weiter differenziert werden konnte (vgl. Abb. 30 A Spur 10). Während sich bei einigen Proben mit beiden Primerpaaren in der Gel-Elektrophorese starke Banden ergaben (vgl. Abb. 30 A, B Spur 13 und 14), zeigten die meisten Proben ein unterschiedliches Verhalten in

den beiden Experimenten. Proben, bei denen mit einem Primerpaar nur schwache Amplifikate erzeugt wurden, zeigten in der RT-PCR mit dem jeweils anderen Primerpaar stärkere Banden (vgl. Abb. 30 A, B Spur 4-9, 11-12, 15-16, 20-21).

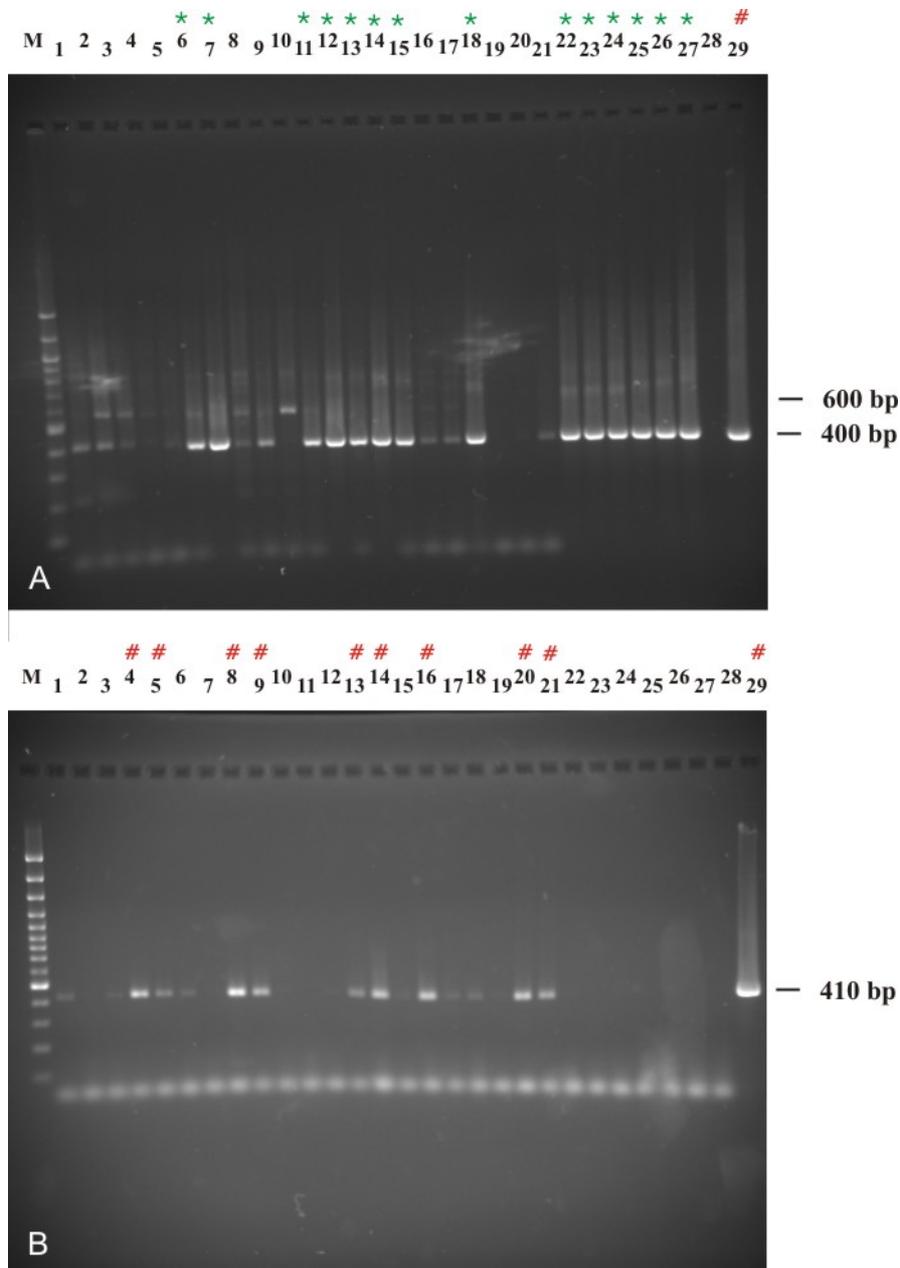


Abbildung 30: Experimente zum Nachweis des KBV in *Varroa destructor* und *Apis mellifera*; A: RT-PCR nach EVANS *et al.*, (2001); B: RT-PCR nach STOLTZ *et al.* (1995). 2 % Agarosegel; M: 100 bp DNA-Marker (NewEnglandBioLabs), 1-21; 23; 25; 27: Milbenproben; 22, 24, 26: zu den Milbenproben 23, 25 und 27 gehörende Bienenproben; 28: Negativkontrolle (a. d.); 29: Positivkontrolle KBV (Bieneninstitut Kirchhain); „*“: PCR-Produkt sequenziert, Ergebnis: ABPV; „#“: PCR-Produkt sequenziert, Ergebnis: KBV

Die Differenzierung zwischen KBV- und ABPV-positiven Proben nach einer RT-PCR mit dem Primerpaar CAPIS/CAPIA (Evans *et al.*, 2001) kann nach SIEDE & BÜCHLER (2004) durch den Verdau von PCR-Produkten mit der Restriktions-Endonuklease *AluI* (Erkennungssequenz AGCT) erfolgen. In gleicher Weise können PCR-Produkte, die mit dem Primerpaar KBV-1/KBV-2 (Stoltz *et al.*, 1995) erzeugt wurden durch Verdau mit dem Enzym *BpmI* (Erkennungssequenz CTGGAG) unterschieden werden (Siede und Büchler, 2004). Hierzu durchgeführte Experimente an wenigen aus den Milbenproben amplifizierten Produkten erbrachten jedoch ebenfalls keine eindeutigen Nachweise von KBV-positiven Proben, sondern sprachen für das Vorliegen von Mischinfektionen (Daten nicht gezeigt). Zur weiteren Charakterisierung der erhaltenen PCR-Produkte wurde deshalb eine Sequenzierung durchgeführt.

Von 22 ursprünglich mittels RT-PCR nach STOLTZ *et al.* (1995) positiven Milbenproben konnte in 10 Fällen ein PCR-Produkt sequenziert werden. Die erhaltenen ca. 330 Basen langen Sequenzen wurden mit Hilfe von BLASTsearch einem GenBank-Abgleich unterzogen und ergaben in allen Fällen eine 100 %-ige Übereinstimmung mit dem KBV-Eintrag AY787143.1 („Kashmir bee virus from Germany RNA polymerase gene“). Ein mit dem Programm ClustalW erzeugtes alignment der Sequenzen ist in Abb. 31 dargestellt.

Von den mit Hilfe der PCR nach EVANS *et al.* (2004) gewonnenen Produkten wurden 11 Amplifikate sequenziert, die nach Datenbankabgleich zwischen 94 und 96% Übereinstimmungen mit den ABPV-Einträgen AF486073.2 (ABPV-Isolat Polen) bzw. AY053368.1 (ABPV-Isolat Germany2) aufwiesen. Keines dieser Amplifikate wies ähnlich hohe Übereinstimmungen mit KBV-GenBank-Einträgen auf.

Insgesamt konnten von 19 der 22 ursprünglich KBV-„verdächtigen“ Milbenproben Sequenzierungsdaten von PCR-Produkten gewonnen werden. Bei zwei Milbenproben konnte sowohl KBV- als auch ABPV-RNA durch Sequenzierung nachgewiesen werden (vgl. Abb. 30, Spur 13 und 14). Bei acht Milbenproben wurde nur KBV-RNA und bei neun Proben nur ABPV-RNA nachgewiesen.

Die in den Experimenten mitgeführte KBV-Positivkontrolle (Bieneninstitut Kirchhain) ergab mit beiden Primerpaaren ein Amplifikat von ca. 400 bp (vgl. Abb. 30 A, B Spur 29). Die Sequenzierung des jeweiligen Produkts und ein GenBankAbgleich der erhaltenen Sequenzen ergab in beiden Fällen ebenfalls eine 100%-ige Übereinstimmung mit dem KBV-Eintrag AY787143.1.

AY787143.1	GAACGTCGACCTATTGAAAAAGTTAATCAATTGAAAACACGAGTGTCTCAAATGGACCA	60
Amberg 1	-----	
Amberg 2	-----	
Erding	-----	
Landshut 1	60
Landshut 2	-----	
Mühlendorf 1	-----	
Mühlendorf 2	-----	
Oberallgäu 1	-----	
Oberallgäu 2	-----	
Rosenheim 1	-----	
KBV+	-----	
AY787143.1	ATGGACTTCTCAATTGCTTTTCGAATGTATTATTTGGGCTTTATAGCTCATTGATGGAA	120
Amberg 1	-----	45
Amberg 2	-----	45
Erding	-----	45
Landshut 1	120
Landshut 2	-----	44
Mühlendorf 1	-----	45
Mühlendorf 2	-----	45
Oberallgäu 1	-----	45
Oberallgäu 2	-----	45
Rosenheim 1	-----	46
KBV+	--GGACTTCTC-.....	57

AY787143.1	AATCGAATTACAAATGAAGTGTCTATTGGAACGAACGTTTACTCACAGACTGGAGTAAA	180
Amberg 1	105
Amberg 2	105
Erding	105
Landshut 1	180
Landshut 2	102
Mühlendorf 1	105
Mühlendorf 2	105
Oberallgäu 1	105
Oberallgäu 2	105
Rosenheim 1	106
KBV+	117

AY787143.1	ACTGTTAGAAAATTAACCAAATTTGGAAATAAAGTAATTGCTGGTGATTTTTCAACTTTT	240
Amberg 1	165
Amberg 2	165
Erding	165
Landshut 1	240
Landshut 2	162
Mühlendorf 1	165
Mühlendorf 2	165
Oberallgäu 1	165
Oberallgäu 2	165
Rosenheim 1	166
KBV+	177

AY787143.1	GATGGATCANTAAACGTTTGCATTATGGAAAAATTCGCAGATTTAGCTAATGATTTTTTAC	300
Amberg 1C.....	225
Amberg 2C.....	225
ErdingC.....	225
Landshut 1C.....	300
Landshut 2C.....	222
Mühlendorf 1C.....	225
Mühlendorf 2C.....	225
Oberallgäu 1C.....	225
Oberallgäu 2C.....	225
Rosenheim 1C.....	226
KBV+C.....	237

```

AY787143.1  GATGACGGACCGGAAAATGCTTTGATACGTCATGTTTTGCTGATGGATGTGTATAATTCT 360
Amberg 1    ..... 285
Amberg 2    ..... 285
Erding      ..... 285
Landshut 1  ..... 360
Landshut 2  ..... 282
Mühldorf 1  ..... 285
Mühldorf 2  ..... 285
Oberallgäu 1 ..... 285
Oberallgäu 2 ..... 285
Rosenheim 1 ..... 286
KBV+        ..... 297
*****

AY787143.1  GTGCACATCTGTAATGATTGATTAGTATACATGATGACTCATAGCCAACCC- 408
Amberg 1    .....- 333
Amberg 2    .....-- 332
Erding      .....- 333
Landshut 1  .....- 408
Landshut 2  .....- 330
Mühldorf 1  .....A 334
Mühldorf 2  .....- 333
Oberallgäu 1 .....- 333
Oberallgäu 2 .....----- 324
Rosenheim 1 .....A 335
KBV+        .....----- 336
*****

```

Abbildung 31: Alignment der Sequenzen von PCR-Produkten aus KBV-positiven Milbenproben verschiedener Landkreise und dem KBV-GenBank-Eintrag AY787143.1; KBV+: Positivkontrolle KBV (Bieneninstitut Kirchhain); „.“: Übereinstimmung mit Vergleichssequenz AY626246.1; „-“: fehlendes Nukleotid; „*“: Übereinstimmung in allen verglichenen Sequenzen

Die zehn KBV-positiven Milbenproben stammen aus den Landkreisen Amberg (2), Erding (1), Landshut (2), Mühldorf (2), Oberallgäu (2) und Rosenheim (1) (vgl. Abb. 21) und gehen auf die Einsendungen von 6 Imkern zurück. Alle Milbenproben stammten aus Bienenvölkern mit überdurchschnittlich hohen Verlusten.

4.1.2.4 Mehrfachinfektionen

94,3 % (66) der Milbenproben wiesen mindestens ein Virus auf, 22,8 % (16) zeigten eine Doppelinfektion und 5,7 % (4) eine Dreifachinfektion. Abbildung 32 gibt einen Überblick über die Verteilung von Virusnachweisen in dem untersuchten Probenmaterial.

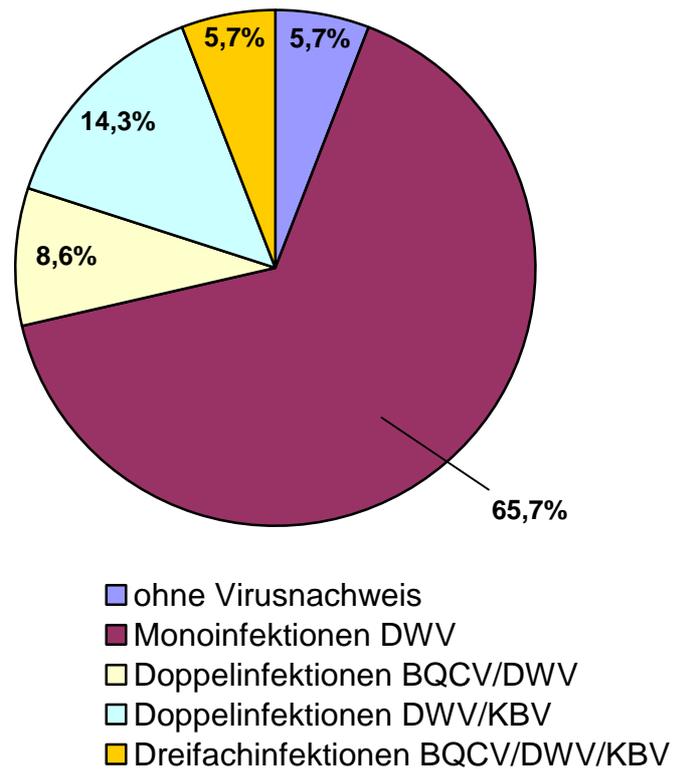


Abbildung 32: Verteilung von Virusnachweisen in Varroamilben

4.2 Mikrosporidiennachweis

131 der insgesamt 137 getesteten Bienenvölker wurden nach erfolgtem Virusnachweis mikroskopisch auf *Nosema*-Sporen untersucht. Von den übrigen sechs Völkern stand hierfür zu wenig Probenmaterial zur Verfügung. 56 Völker wurden zusätzlich mittels einer *Nosema apis*-spezifischen PCR, sowie einer universellen Mikrosporidien-PCR nachuntersucht.

4.2.1. Mikroskopischer Nachweis von Mikrosporidien-Sporen

Bei 14,5 % (19) der Bienenproben waren Sporen lichtmikroskopisch nachweisbar. Der Befallsgrad ließ sich nach dem unter Punkt 3.3.1 beschriebenen Schema bei 2,3 % (3) der Proben als „leicht“, bei 4,6 % (6) als „mittelgradig“ und bei 7,6 % (10) als „schwer“ beurteilen. Eine graphische Darstellung der Daten gibt Abbildung 33.

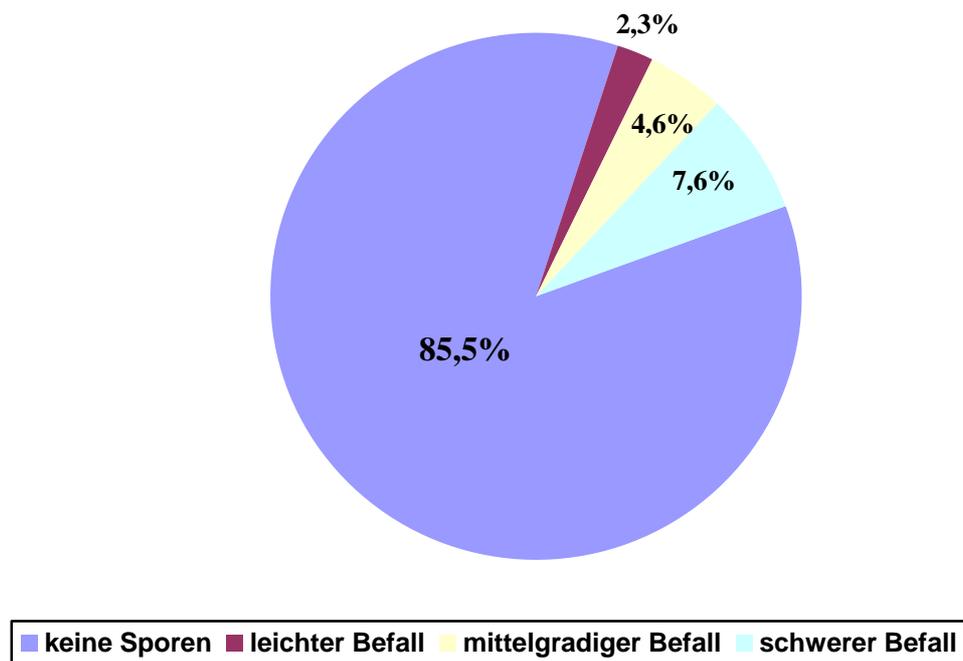


Abbildung 33: Befallsgrad von Bienenproben mit Mikrosporidien-Sporen

4.2.2. Microsporidien-PCR

4.2.2.1. *Nosema apis*-spezifische PCR

Zur Etablierung und Überprüfung der Methode wurde aus einer der stark mit Sporen belasteten Bienenproben DNA nach drei verschiedenen Methoden extrahiert. Die mit den Verfahren nach WEBSTER *et al.* (2004), MÜLLER *et al.* (1999) und FREEMAN *et al.* (2004) gewonnenen Extrakte wurden einer *N. apis*-spezifischen PCR unterzogen (Webster *et al.*, 2004; vgl. 3.3.2.2.1) und die Qualität und Menge erzeugter Amplifikate auf Agarosegelen vergleichend beurteilt. Abbildung 34 illustriert das Ergebnis einer Agarose-Gel-Elektrophorese. Während mit den Verfahren nach MÜLLER *et al.* (1999) und FREEMAN *et al.* (2004) deutliche Banden in der erwarteten Größenordnung von 210 bp beobachtet werden konnten (Abb. 34, Spur 2 und 3), erwies sich die DNA-Isolationsmethode nach WEBSTER *et al.* (2004) als ungeeignet (Abb. 34, Spur 1). Die stärkste Bande wurde mit der Methode nach FREEMAN *et al.* (2004) erzeugt. Sie wurde daher im Folgenden für den Nachweis von Microsporidien-DNA in Bienenproben gewählt.

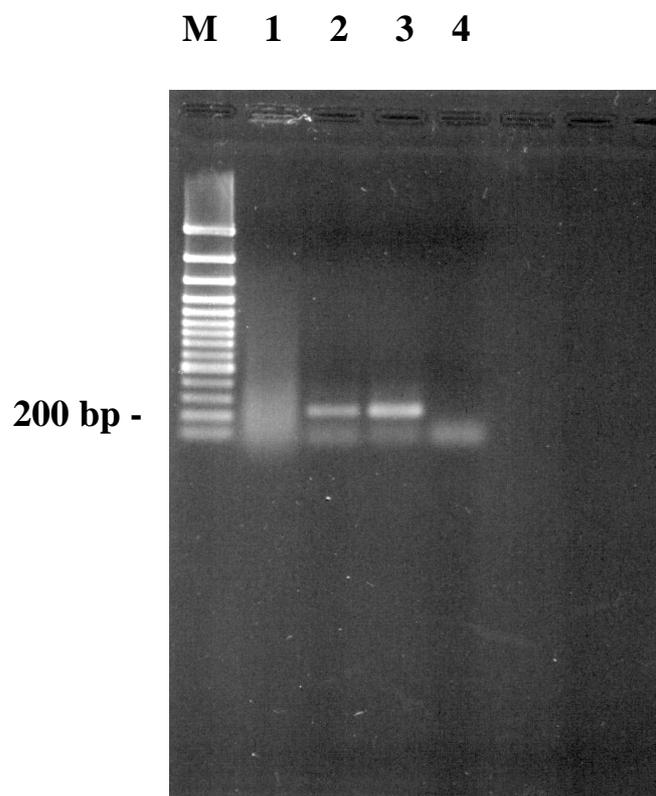


Abbildung 34: Vergleich von DNA-Extraktionsmethoden aus Microsporidien sporen; 1.5% Agarosegel; M: 100 bp Marker (NewEnglandBioLabs); 1: Methode nach WEBSTER *et al.* (2004); 2: Methode nach MÜLLER *et al.* (1999); 3: Methode nach FREEMAN *et al.* (2004); 5: Negativkontrolle (a.d.)

Mit Hilfe der *Nosema apis*-spezifischen PCR nach WEBSTER *et al.* (2004) wurden alle Bienenproben in denen lichtmikroskopisch Mikrosporidiensporen nachgewiesen wurden (19), sowie eine zufällig ausgewählte Anzahl an mikroskopisch-negativen Proben (37) nachuntersucht. Lediglich bei 9 der 19 lichtmikroskopisch positiven Proben konnte ein Amplifikat der erwarteten Größe von 209 bp erzeugt werden. Abbildung 35 stellt exemplarisch das Ergebnis einer solchen PCR dar.

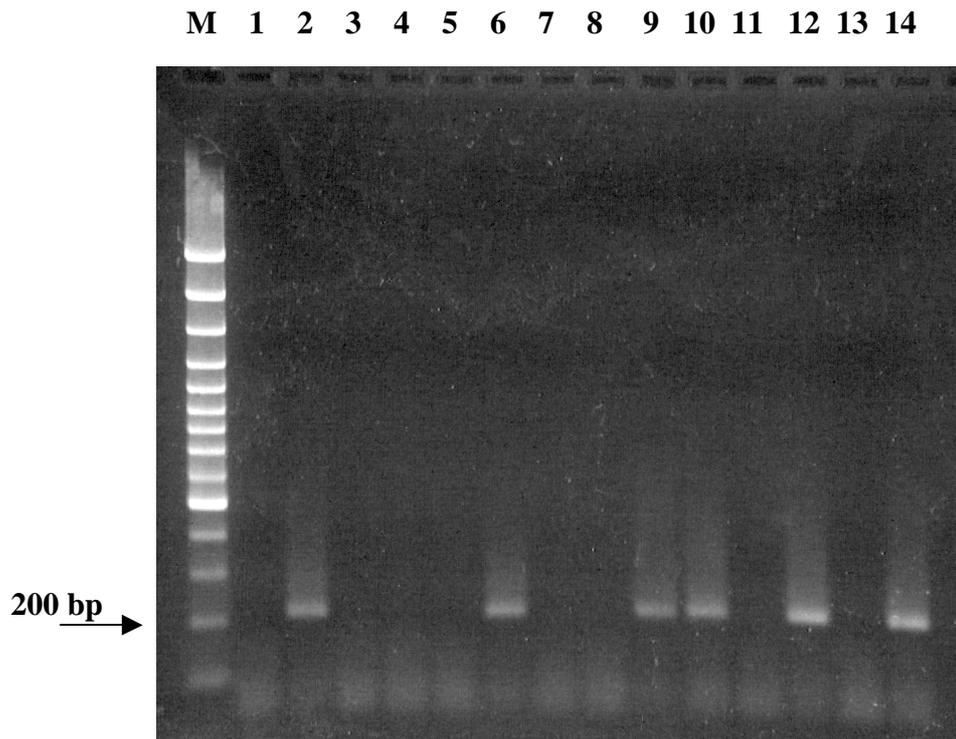


Abbildung 35: Beispiel für eine Gel-Elektrophorese von PCR-Produkten einer *Nosema apis*-PCR; 2 % Agarose; M: 100 bp Marker (NewEnglandBioLabs), 1-12: Bienenproben; 13: Negativkontrolle (a.d.); 14: Positivkontrolle.

4.2.2.2 Universelle Mikrosporidien-PCR

Mit dem universellen Mikrosporidien-Primerpaar MICRO-F/MICRO-R nach VISVESVARA *et al.* (1995) erbrachten 18 der 56 Bienenproben ein Amplifikat mit der erwarteten Größe von 1.3 kbp. Unter diesen 18 Proben befanden sich auch die neun Proben, die mit der *N. apis* spezifischen PCR positiv getestet worden waren. Sechs weitere hier positiv getestete Proben waren mikroskopisch positiv aber *N. apis* negativ. Die verbleibenden drei Fälle waren sowohl mikroskopisch, als auch in der *N. apis*-PCR negativ. Damit erwies sich die universelle Mikrosporidien-PCR im Vergleich zu den mikroskopischen Untersuchungen als sensitiver. Lediglich eine von 56 untersuchten Proben wurde lichtmikroskopisch als positiv bewertet, ergab aber mit keiner der beiden PCR-Methoden einen positiven Befund. Abbildung 36 illustriert exemplarisch ein PCR-Ergebnis mit den von VISVESVARA *et al.* (1995) beschriebenen Primern. Die Sequenzierung von Produkten, die mit dieser PCR positiv, aber *N. apis* negativ waren ergab eine 99 %ige Übereinstimmung der Amplifikate mit dem GenBank-Eintrag DQ329034.1 für *Nosema ceranae* (partial 16S small subunit ribosomal gene).



Abbildung 36: Nachweis von PCR-Produkten der universellen Mikrosporidien-PCR mit dem Primerpaar MICRO-F/MICRO-R; M: 100 bp Marker (NewEnglandBioLabs), 2-20: Bienenproben; 21: Negativkontrolle (a. d.); Spur 22: Positivkontrolle *N. apis* positive Bienenprobe

5. Diskussion

Mit *Black queen cell virus* (BQCV), Deformed wing virus (DWV) und Kashmir bee virus (KBV) wurden exemplarisch drei der 18 bei Bienen bislang beschriebenen Viren für die vorliegende epidemiologische Studie ausgewählt. Dies geschah in der Absicht, jeweils einen Vertreter aus den Bereichen hauptsächlich arthropodenübertragener (DWV) und hauptsächlich oral aufgenommener Viren (BQCV) näher zu untersuchen. Darüber hinaus wurde mit KBV ein weiteres arthropodenübertragenes Virus ausgewählt, das durch seine hohe Pathogenität für Bienen besonders bedeutend ist. Es wurde in Deutschland erstmals im Rahmen der jüngsten Massensterben im Winterhalbjahr 2002/2003 (Hessen, Baden-Württemberg und Niedersachsen) nachgewiesen (Büchler, 2003; Siede und Büchler, 2004).

Bei 90.5 % (124) der untersuchten 137 Bienenvölker konnte mindestens ein Virus nachgewiesen werden. In allen 19 bayerischen Landkreisen, aus denen Imker zwischen März 2004 und April 2005 an der Studie teilnahmen, waren virusinfizierte Bienen zu finden. Der Großteil des untersuchten Probenmaterials stammte dabei von Völkern, die nach den Erfahrungen der jeweiligen Imker als klinisch auffällig eingestuft wurden (102 Proben). Diese Völker zeigten u.a. eine erhöhte Sterblichkeit, Totalausfälle, bienenleere Stände, sowie neurologisch auffällige Bienen mit Zittern, Flugunfähigkeit und Krabbeln vor dem Bienenstand. Mit 96 % waren diese Völker hochsignifikant häufiger mit Viren infiziert als Bienen aus symptomlosen Völkern (n=35). Aber auch in letzteren wurde mit 74.3 % eine hohe Zahl von Völkern Virus-positiv getestet. Im Einzelnen fanden sich bei jeweils 66.4 % Nachweise für BQCV und DWV. KBV konnte in keiner der Bienenproben nachgewiesen werden. Einen aktuellen Vergleich für diese Zahlen stellt der vor wenigen Wochen erschienene Zwischenbericht des sog. Monitoring-Projekts „Völkerverluste“ der Arbeitsgemeinschaft deutscher Bieneninstitute dar. (www.staff.uni-marburg.de/~ag-biene/Zwischenbericht%20005.pdf). Als Reaktion auf die verheerenden Bienenverluste der Jahre 2002/2003 wurde ein landesweites Projekt lanciert, bei dem 1120 Bienenvölker von 112 Imkern in einer Langzeitstudie auf mögliche Ursachen für periodische Völkerverluste untersucht werden sollen. Hierbei werden eine Vielzahl von Parametern wie Klima, Trachtverlauf, Betriebsparameter, Erwerbsformen der Imkerei, Erträge, Varroa-Bekämpfungsverfahren und Bienenkrankheiten über mehrere Jahre aufgezeichnet. Das Monitoring umfasst dabei die

Bienenviren ABPV, DWV, KBV und *Sacbrood virus* (SBV), sowie den Befall mit Mikrosporidien. Nach den Angaben dieses Zwischenberichtes wurden landesweit bei 346 Bienenproben 6 % ABPV, 12 % SBV und 7 % DWV nachgewiesen. KBV konnte auch in dieser Studie in keiner Bienenprobe festgestellt werden. Insgesamt wird der Anteil Virus-positiver Proben als gering eingestuft. Diese Ergebnisse zeigen einen deutlichen Unterschied zu den hier gefundenen Daten. In beiden Studien wurden weitgehend standardisierte Untersuchungsverfahren gewählt (R. Siede, pers. Mitteilung). Unterschiede finden sich aber in der Art der Probennahme, sowie der Auswahl der zu untersuchenden Völker. Im Monitoring-Projekt wurden jeweils nur die Köpfe von 10 Bienen eines zu untersuchenden Volkes für die RNA-Isolierung eingesetzt. Darüber hinaus wurden alle zu beprobenden Völker nach statistischen Methoden ausgewählt und waren meist klinisch unauffällig. Auf der Grundlage der vorliegenden Daten kann nicht abschließend entschieden werden, ob diese methodischen Unterschiede zu den hier beobachteten Diskrepanzen geführt haben. Allerdings erscheint die Tatsache, dass in dieser Studie hauptsächlich auffällige Völker einbezogen wurden als wahrscheinliche Erklärung. Sowohl der Zeitraum der Probennahme, als auch die Verteilung der beprobten Standorte (vgl. Abbildung 21, 37) waren vergleichbar.

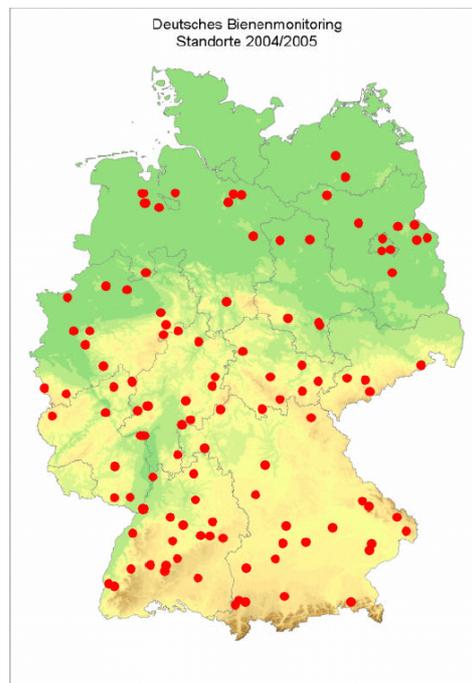


Abbildung 37: Standorte des Monitoring-Projekts „Völkerverluste“ der Arbeitsgemeinschaft deutscher Bieneninstitute

Vergleichsuntersuchungen zur Verbreitung von BQCV in Deutschland liegen nicht vor, so dass eine Bewertung der vorliegenden Ergebnisse erschwert ist. Nach derzeitigem Wissensstand wird BQCV vornehmlich oral aufgenommen und ist vor allem für Bienenbrut pathogen. In adulten Arbeiterinnen führt es in der Regel zu latenten Infektionen, sofern nicht eine gleichzeitige Infektion mit Mikrosporidien vorliegt (Grabensteiner und Nowotny, 2001).

Sowohl DWV-positive, als auch BQCV-positive Proben wurden gehäuft in den Wintermonaten (Oktober bis Februar) gefunden. Es erscheint wahrscheinlich, dass die ungünstigen abiotischen Faktoren innerhalb einer Wintertraube, sowie der gesteigerte Infektionsdruck durch den engen Kontakt zwischen Bienen einerseits, sowie zwischen Ektoparasit und Wirt andererseits, dieses Phänomen hervorrufen könnten.

Im Vergleich zu den Bienenproben fanden sich in den Milben mit 94.3 % noch höhere Befallsraten mit DWV. Dies macht die Bedeutung des Vektors als Erregerreservoir deutlich und erklärt auch den hohen Durchseuchungsgrad der zugehörigen Bienenproben. Unklar bleibt, welche Auswirkungen die auch von anderen Autoren (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Tentcheva *et al.*, 2004a; b; Chen *et al.*, 2005) beschriebene weite Verbreitung von DWV auf die Bienengesundheit hat und welche Rolle sie in dem vermutlich multifaktoriellen Geschehen der periodisch wiederkehrenden Bienensterben hat.

Mit einer Häufigkeit von 20 % war BQCV in Varroamilben deutlich seltener nachzuweisen als in Bienenproben. Dieser Befund entspricht den Erwartungen und stützt die Beobachtungen, nach denen BQCV hauptsächlich oral – von Biene zu Biene – und nicht durch den Saugakt des Ektoparasiten übertragen wird. Unklar bleibt jedoch, ob eine mögliche Übertragung von BQCV durch saugende Milben für ein mögliches Krankheitsgeschehen bei Bienen nicht sogar den wichtigeren Übertragungsweg darstellt, da für eine mögliche Infektion der Verdauungstrakt der Biene als natürliche Barriere für Virusinfektionen umgangen wird. Zur Klärung dieser Frage sind weitere Studien nötig.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu KBV mit publizierten und von verschiedenen Autoren mit Erfolg angewendeten Primerpaaren (Stoltz *et al.*, 1995; Hung *et al.*, 2000; Evans, 2001; Evans *et al.*, 2001; Siede und Büchler, 2004; u.a.) belegen eine begrenzte

Spezifität und Sensitivität der Methoden. In allen Fällen, in denen mit den Primern KBV-1 und KBV-2 nach STOLTZ *et al.* (1995) PCR-Produkte aus Milbenhomogenaten erzeugt wurden, traten zwar keinerlei Störbanden auf, die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen, insbesondere bei schwachen Signalen in der Agarose-Gel-Elektrophorese war jedoch häufig nicht gegeben. Beide Primerpaare sind grundsätzlich in der Lage, mit einer KBV Vorlage zu hybridisieren und spezifische Amplifikate in der RT-PCR zu bilden, wie die Sequenzierungsergebnisse von PCR-Produkten der Positivkontrolle zeigen (vgl. Abb. 30 und 31). Insbesondere bei Proben, die ABPV-RNA enthielten, wurden jedoch mit dem Primerpaar nach STOLTZ *et al.* (1995) geringe Mengen PCR-Produkt gebildet. Diese Mengen waren zu gering um im Rahmen dieser Studie für eine nachfolgende Differenzierung mittels einem Verdau mit Restriktions-Endonukleasen oder einer Sequenzierung auszureichen. KBV-positive Bienenproben sind häufig ebenfalls mit ABPV belastet (Hung *et al.*, 1996a; Evans, 2001; Siede und Büchler, 2004). Die mit der PCR nach STOLTZ *et al.* (1995) zu amplifizierende Teilsequenz des RNA-Polymerasegens zeigt zudem große Sequenzhomologien zwischen den beiden Viren (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus ergeben Datenbankrecherchen, dass für die beiden Primer KBV-1 und KBV-2 innerhalb des ABPV-Genoms potentielle Bindungsstellen existieren. Abbildung 38 illustriert ein alignment der entsprechenden Regionen innerhalb des GenBank-Eintrages AF486073.2. Dieser Eintrag steht für das Genom des ABPV-Isolates POLAND1, welches bezüglich des untersuchten Genabschnittes zu 94 bis 97 % homolog zu den in dieser Arbeit nachgewiesenen ABPV-Isolaten ist.

```

AF486073 GATACATTGAAGGATGAGAGAAGACCAATTGAAAAAGTAGATCAACTGAAAACACGTGTG 5340
KBV-1    -----GATGAACGTCGACCTATTGA----- 20
          ***** * *****

```



```

AF486073 ATTCTACACATGTTTGTGGTGATTCTGTATATATGATGACACATAGCCAACCCTCTGGTA 5710
KBV-2    -----TGACTCATAGCCAACCCACA----- 20
          **** ***** *

```

Abbildung 38: Alignment der Sequenzen der Primer nach STOLTZ *et al.* (1995) mit dem ABPV-GenBank-Eintrag AF486073; „-“: fehlendes Nukleotid; „*“: Übereinstimmung in den verglichenen Sequenzen

Die potentiellen Bindungsstellen im ABPV-Genom weichen zwar an mehreren Stellen von der Primersequenz ab, eine Fehlhybridisierung kann aber, insbesondere bei

Vorliegen großer Mengen ABPV-RNA, nicht ausgeschlossen werden. Bei mit beiden Viren belasteten Proben besteht deshalb die grundsätzliche Möglichkeit, dass die Bindungsstellen im Genom beider Viren bei der Hybridisierung mit den Primern konkurrieren und die Bildung von spezifischen KBV-Amplifikaten negativ beeinflusst wird. Da sowohl mit ABPV- als auch mit KBV-Vorlagen rein rechnerisch ähnlich große Produkte gebildet werden können, ist eine Differenzierung auf der Grundlage der Gel-Elektrophorese allein nicht möglich. Es kann also bislang nicht entschieden werden, ob die beobachteten schwachen Produkte nach einer RT-PCR nach STOLTZ *et al.* (1995) (vgl. z.B. Abb. 30B, Spur 6, 18) Amplifikate von KBV- oder ABPV-RNA sind. Entweder, die Produkte sind KBV-spezifisch und gehen auf eine nur geringe Zahl an KBV-Kopien zurück oder aber die gleichzeitig vorliegende ABPV-RNA hemmt die Bildung spezifischer KBV-Produkte und führt so zu geringen Produktausbeuten. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass die in diesen Fällen beobachteten Produkte nicht auf KBV-RNA zurückgehen und allein auf die suboptimalen Primerbindungsstellen innerhalb des ABPV-Genoms zurückzuführen sind. Diese letzte These wird auf den ersten Blick durch die Ergebnisse mit der RT-PCR nach EVANS *et al.* (2001) gestützt. Da das hierfür benutzte zweite Primerpaar mit RNA beider Viren hybridisiert, wäre anzunehmen, dass damit auch KBV-RNA-haltige Proben identifiziert werden können. Dies wird auch mit Hilfe der Positivkontrolle gezeigt. Beim Vorliegen beider Viren in einer Probe werden jedoch auch hier die verschiedenen RNA-Vorlagen um die Bindung an Primer konkurrieren. Eine eventuell höhere Affinität von ABPV-RNA für einen oder beide Primer oder ein für KBV ungünstiges Konzentrationsverhältnis beider Viren würde dann zu einer bevorzugten Amplifizierung von ABPV-Vorlagen und damit zur Maskierung von KBV-belasteten Proben führen. Der Prozentsatz der KBV-infizierten Milbenproben würde dadurch unterschätzt.

Auffällig und für das Untersuchungsgebiet neu ist jedoch die Tatsache, dass mittels der laut Literaturangaben KBV-spezifischen RT-PCR nach STOLTZ *et al.* (1995) in 10 Fällen KBV-positive Milbenproben gefunden und mittels Sequenzierung der Amplifikate bestätigt werden konnten. Die Tatsache, dass diese Isolate untereinander zu 100 % identische Sequenzen zeigten (vgl. Abb. 31) könnte zu der Vermutung Anlass geben, es handle sich um eine Kontamination der Proben innerhalb des Labors. Diese Vermutung kann jedoch durch mehrere Argumente weitgehend entkräftet werden: i., die Amplifikation spezifischer Produkte war in diesen 10 Fällen reproduzierbar; ii., die Probenaufbereitung durch RNA-Isolierung, die Herstellung der Reaktionsansätze und

die Durchführung der RT-PCR wurden in räumlich voneinander getrennten Laborbereichen durchgeführt; es wurden keinerlei Kontaminationen der mitgeführten Negativkontrollen (aqua dest., *Acheta domesticus*-RNA) beobachtet; iii., die verwendete Positivkontrolle des Bieneninstituts Kirchhain bestand aus isolierter KBV-RNA, so dass eine Kontamination bei der Isolierung von Proben-RNA oder PCR-Mastermixen durch eine Aufarbeitung der Positivkontrolle ausgeschlossen werden kann. Einer Kontamination der PCR-Ansätze direkt vor Durchführung der Amplifikation widerspricht die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Der Nachweis von KBV in 10 Milbenproben erscheint der Verfasserin deshalb als gesichert. Eine künftige Nachuntersuchung von Proben mit Hilfe weiterer Techniken wie dem kürzlich entwickelten real-time PCR-Verfahren nach CHANTAWANNAKUL *et al.* (2006) könnte zu einer Verbesserung der künftigen diagnostischen Sicherheit führen.

Unklar verbleibt die Tatsache, dass in 14.3 % der Milbenproben, aber in keiner der Bienenproben ein Nachweis von KBV-RNA gelang. Die Bedeutung von Varroamilben als Vektor von KBV wurde in mehreren unabhängigen Studien gezeigt (Hung und Shimanuki, 1999; Hung *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005) und es ist anzunehmen, dass auch bei den untersuchten Bienenvölkern eine Übertragung auf Bienen stattgefunden hat. Zum einen wäre denkbar, dass Inhaltsstoffe der Bienen einen Nachweis von KBV-RNA mittels RT-PCR hemmen und erschweren könnten. Dies widerspricht jedoch den Ergebnissen anderer Autoren (Stoltz *et al.*, 1995; Siede und Büchler, 2004). Darüber hinaus, könnte der lange Zeitraum zwischen dem Tod der untersuchten Bienen (hauptsächlich Totenfall des Winterhalbjahres) und der Probennahme und RNA-Isolierung im Labor zu einem Abbau von Virus-RNA in den verwesenden Proben geführt haben und Viren in toten Varroamilben eine höhere Tenazität zeigen. Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass Bienen nach Injektion bereits geringer Dosen KBV in die Hämolymphe innerhalb weniger Tage erkranken und versterben können (Bailey und Woods, 1977; Bailey *et al.*, 1979), wobei Bienenstände häufig bienenleer angetroffen werden. Die Beobachtung von bienenleeren Ständen nach der Winterruhe wurde auch häufig von den an dieser Studie teilnehmenden Imkern berichtet. Es ist grundsätzlich denkbar, dass KBV-erkrankte Bienen beispielsweise aufgrund gestörter Orientierungsleistungen außerhalb des Stockes versterben und hohe KBV-Gehalte in zurückbleibenden, vielleicht noch nicht infizierten Arbeiterinnen, bei einer Probenentnahme am Bienenstock nicht auftreten und somit nicht nachgewiesen

werden können. Für die Diagnostik könnte deshalb die Untersuchung des potentiellen Erregerreservoirs *Varroa destructor* von entscheidender Bedeutung sein.

Aufgrund der geschilderten methodischen Schwierigkeiten muß angenommen werden, dass die hier postulierten Häufigkeiten von KBV im Untersuchungsmaterial nicht geeignet sind, um eine Prävalenz für dieses Bienenvirus abzuschätzen. Unabhängig davon sprechen die Daten jedoch dafür, dass Bienen in Bayern Kontakt zu dem als vergleichsweise virulent eingestuften Erreger haben. Die Tatsache, dass KBV in sechs Landkreisen nachgewiesen werden konnte lässt vermuten, dass es sich nicht um Einzelfälle handelt und mit einem Vorkommen in weiteren Landkreisen gerechnet werden muß. Ein landesweites Vorkommen durch die flächendeckende Verbreitung von *Varroa destructor*, Bienenwanderungen und Handel mit infizierten Bienen erscheint denkbar. Diese Erstbeschreibung für das Vorkommen von KBV in Bayern ist deshalb für die Diskussion um die Gründe für periodisch wiederkehrende Massenverluste unserer einheimischen Bienenvölker von besonderer Bedeutung und künftig weiter zu untersuchen.

Die lichtmikroskopische Untersuchung von 131 Bienenproben erbrachte in 14.5 % der Fälle einen Nachweis von Mikrosporidiensporen. 7.6 % der Proben konnten als schwer, 4.6 % als mittelgradig und 2.3 % als leicht belastet eingestuft werden. Im Vergleich hierzu werden im Zwischenbericht des Monitoring-Projekts „Völkerverluste“ für Bayern (und bundesweit) ungleich höhere Häufigkeiten von 27.2 % (bzw. 33 %) genannt. Die Differenzierung der in der hier vorliegenden Studie positiv beurteilten Bienenproben mittels PCR und Sequenzierung von Amplifikaten ergibt, dass etwa jeweils die Hälfte dieser Funde auf die Mikrosporidienarten *Nosema apis* und *N. ceranae* zurückgeführt werden können. Nach bisherigen Erkenntnissen haben beide Mikrosporidienarten eine etwa vergleichbare Pathogenität (Ritter, 2006). Weiterhin wird postuliert, dass nur schwer mit Mikrosporidien belastete Völker Krankheitserscheinungen, wie das Abkoten im Nest, zeigen (Ritter, 1996). Verschiedene Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass eine Infektion mit Mikrosporidien die Pathogenität von Virusinfektionen durch die Zerstörung des Darmepithels - und damit eines wichtigen Teils natürlicher Infektabwehr der Bienen - steigern kann. Eine Aktivierung von Bienenviren bei gleichzeitiger Infektion mit *N. apis* wird ebenfalls diskutiert (Bailey und Gibbs, 1964; Bailey et al. 1983) und als eine

mögliche Ursache für erhöhte Bienenverluste genannt. Die Tatsache, dass die Mehrzahl der in dieser Arbeit untersuchten Bienenvölker klinisch auffällig waren und gleichzeitig nur vergleichsweise wenige dieser Völker stark mit Mikrosporidien belastet waren, spricht gegen diese Hypothese. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Mikrosporidienbefall und Virusinfektion konnte nicht festgestellt werden.

Mit Hilfe der in dieser Studie erarbeiteten Daten lassen sich keine abschließenden Aussagen über die Ursachen der periodisch auftretenden Völkerverluste in Bayern treffen. Hierzu sind flächendeckende, kostenintensivere Untersuchungen an einer statistisch aussagekräftigen Zahl von Bienen- und Milbenproben und Standorten zu einer Vielzahl von Erregern und abiotischen Faktoren nötig. Sie machen jedoch in eindrucklicher Weise deutlich, wie zahlreich und weit verbreitet Bienenviren in den heimischen Populationen sind und wie wichtig die Untersuchung und Berücksichtigung von Ekto- und Endoparasiten der Biene für die Diagnostik, aber auch die wissenschaftliche Aufklärung der Übertragungs- und Pathogenitätsmechanismen von Viren der Honigbiene sein können.

6. Zusammenfassung

Zur Epidemiologie arthropodenübertragener Viroser der Honigbiene, *Apis mellifera*, in Bayern

102 klinisch auffällige und 35 symptomlose Bienenvölker aus 19 bayerischen Landkreisen sowie 70 Proben des Ektoparasiten *Varroa destructor* wurden mittels RT-PCR auf das Vorkommen von *Black queen cell virus* (BQCV), Deformed wing virus (DWV) und Kashmir bee virus (KBV) untersucht. In 90.5 % der Bienenproben wurde mindestens eines der Viren nachgewiesen, wobei klinisch auffällige Völker hoch signifikant häufiger betroffen waren als symptomlose Völker (96 % vs. 74.3 %; $p < 0.01$). Während KBV nicht in den Bienen nachgewiesen werden konnte, fanden sich BQCV- und DWV-Infektionen in jeweils 66.4 % der Proben. 42.3 % der Völker zeigten Doppelinfektionen mit BQCV und DWV.

131 der Bienenvölker wurden zusätzlich lichtmikroskopisch auf eine Infektion mit Mikrosporidien untersucht. Dabei wurden bei 14.5 % der Proben Mikrosporidiensporen nachgewiesen. 2.3 % der Proben zeigten leichte, 4.6 % mittelgradige und 7.6 % hohe Befallsgrade. Mit Hilfe einer *Nosema apis*-spezifischen PCR und einer universellen Mikrosporidien-PCR wurde in neun Proben eine Infektion mit *Nosema apis* und in neun weiteren Proben eine Infektion mit *Nosema ceranae* nachgewiesen. Eine Infektion von Bienen mit Viren war nicht mit einer Mikrosporidieninfektion korreliert.

In den von den Bienen gewonnenen und getrennt davon untersuchten Varroa-Milben fand sich bei 94.3 % DWV, 20 % BQCV und 14.3 % KBV. 94.3 % aller Milbenproben wiesen mindestens ein Virus auf, 22.8 % zeigten eine Doppelinfektion und 5.7 % eine Infektion mit drei Bienenviren. Der hier gezeigte Nachweis von KBV in den Landkreisen Amberg, Landshut, Erding, Mühldorf am Inn, Rosenheim und Oberallgäu ist die erste Beschreibung für ein Vorkommen von KBV in Bayern.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung stützen die These nach einer ursächlichen Beteiligung von arthropodenübertragenen Bienenviren an den periodisch auftretenden Massenverlusten von Bienenvölkern in Bayern.

7. Summary

Epidemiology of arthropod-borne virus infections of the honey-bee, *Apis mellifera*, in Bavaria

102 samples of clinically impaired honey bee colonies and 35 samples of colonies without clinical symptoms from 19 bavarian districts together with 70 samples of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* were examined for the presence of *Black queen cell virus* (BQCV), Deformed wing virus (DWV) and Kashmir bee virus (KBV) by using RT-PCR. 90.5 % of the bee samples were infected by at least one of these viruses. Clinically impaired bee colonies were significantly more often infected than colonies without symptoms (96 % vs. 74.3 %; $p < 0.01$). KBV could not be detected in bee samples. The prevalences of BQCV and DWV in the investigated material was 66.4 % each, whereas 42.3 % of the bee colonies were infected with both viruses.

In additional experiments, 131 bee samples were examined for the presence of microsporidia by light microscopy. 14.5 % of these samples revealed microsporidian spores, out of which 2.3 % were slightly infected, 4.6 % moderately and 7.6 % severely infected. By using both, a *Nosema apis* specific PCR and universal microsporidian specific PCR, the infections could be differentiated as follows: *N. apis* was detectable in nine cases and nine other cases revealed to be *N. ceranae*. So far, no correlation could be shown between viral- and microsporidian-infections in these honey bees.

94.3 % (66) of the *Varroa*-mite samples were positive for DWV, 20 % for BQCV and 14.3 % for KBV, respectively. Similarly 94.3 % of the mite samples had a single infection, 22.8 % a double, and 5.7 % a triple viral infection. The detection of KBV in samples of the bavarian districts Amberg, Landshut, Erding, Mühldorf am Inn, Rosenheim und Oberallgäu reflects the first description of the occurrence of this virus in Bavaria.

The results of this study further support the hypothesis, that arthropod-borne honey-bee viruses are possibly involved in periodically occurring mass mortalities of honey bees in Bavaria.

9. LITERATURVERZEICHNIS

- ALLEN, M. F., BALL, B.V.** (1995). Characterisation and serological relationships of strains of Kashmir bee virus. *Ann. Appl. Biol.* **126**, 471-484.
- ALLEN, M., BALL, B.** (1996). The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* **77(3)**, 141-162.
- ANDERSON, D. L.** (1991). Kashmir bee virus - a relatively harmless virus of honey bee colonies. *Am. Bee J.* **131**, 767-770.
- ANDERSON, D. L., GIACON, H.** (1992). Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. *J. Econ. Entomol.* **85**, 47-51.
- ANDERSON, D. L., GIBBS, A. J.** (1989). Transpupal transmission of Kashmir bee virus and sacbrood virus in the honey bee (*Apis mellifera*). *Ann. Appl. Biol.* **114**, 1-7.
- ANDERSON, D. L., TRUEMAN, J. W. H.** (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.* **24**, 165-189.
- AUMEIER, P., ROSENKRANZ, P.** (1995). Welche Faktoren der Bienenlarvenkutikula beeinflussen die Wirtsfindung der *Varroa*-Weibchen? *Apidologie* **26**, 327-329.
- BAILEY, L.** (1955). The infection of the ventriculus of the adult honeybee by *Nosema apis* (Zander). *Parasitology* **45**, 86 - 94.
- BAILEY, L.** (1969). The multiplication and spread of sacbrood virus of bee. *Ann. Appl. Biol.* **63**, 483-491.
- BAILEY, L.** (1975). Recent research on honeybee viruses. *Bee World* **56 (2)**, 55- 64.
- BAILEY, L.** (1976). Viruses attacking the honey bee. *Adv. Virus Res.* **20**, 271-304.
- BAILEY, L., BALL, B.V.** (1978). *Apis iridescent virus* and "clustering disease" of *Apis cerana*. *J. Invertebr. Pathol.* **31(3)**, 368-371.
- BAILEY, L., FERNANDO, E. F. W.** (1972). Effects of sacbrood virus on adult honey-bees. *Ann. Appl. Biol.* **72**, 27-35.
- BAILEY, L., GIBBS, A. J.** (1964). Acute infection of bees with paralysis virus. *J. Insect Pathol.* **6**, 395-407.

-
- BAILEY, L., MILNE, R.G.** (1978). Filamentous virus-like particles in honey bees in Britain. *J. Invertebr. Pathol.* **32**, 390-391.
- BAILEY, L., WOODS, R.D.** (1974). Three previously undescribed viruses from the honey bee. *J. Gen. Virol.* **25**, 175-186.
- BAILEY, L., WOODS, R.D.** (1977). Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on Sacbrood and Acute bee-paralysis viruses. *J. Gen. Virol.* **37**, 175-182.
- BAILEY, L., GIBBS, A. J., WOODS, R.D.** (1963). Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera*). *Virology* **21**, 390-395.
- BAILEY, L., GIBBS, A. J., WOODS, R. D.** (1964). Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* **23**, 425-429.
- BAILEY, L., BALL, B.V., WOODS, R.D.** (1976). An Iridovirus from bees. *J. Gen. Virol.* **32**, 459-461.
- BAILEY, L., CARPENTER, J.M., WOODS, R.D.** (1979). Egypt bee virus and australian isolates of Kashmir bee virus. *J. Gen. Virol.* **43**, 641-647.
- BAILEY, L., BALL, B.V., CARPENTER, J.M., WOODS, R.D.** (1980a). Small virus-like particles in honey bees associated with Chronic paralysis virus and with a previously undescribed disease. *J. Gen. Virol.* **46**, 149-155.
- BAILEY, L., CARPENTER, J.M., GOVIER, D.A., WOODS, R.D.** (1980b). Bee virus Y. *J. Gen. Virol.* **51**, 405-407.
- BAILEY, L., CARPENTER, J.M., WOODS, R.D.** (1981). Properties of a filamentous virus of the honey bee (*Apis mellifera*). *Virology* **114**, 1-7.
- BAILEY, L., CARPENTER, J. M., WOODS, R. D.** (1982). A strain of Sacbrood virus from *Apis cerana*. *J. Invertebr. Pathol.* **39**, 264-265.
- BAILEY, L., BALL, B.V., PERRY, J.N.** (1983). Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann. Appl. Biol.* **103**, 13-20.
- BALL, B. V.** (1983). Der Zusammenhang zwischen *V. jacobsoni* und Viruserkrankung der Honigbiene. *Allg. Dtsch. Imkerztg.* **17**, 177-179.
- BALL, B. V.** (1996). Honeybee viruses: a cause for concern? *Bee World* **77**, 117-119.

- BALL, B.V., ALLEN, M.F.** (1988). The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann. Appl. Biol.* **113**, 237-244.
- BENJEDDOU, M., LEAT, N., ALLSOPP, M., DAVISON, S.** (2001). Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67(5)**, 2384-2387.
- BENJEDDOU, M., LEAT, N., ALLSOPP, M., DAVISON, S.** (2002a). Development of infectious transcripts and genome manipulation of *Black queen-cell virus* of honey bees. *J. Gen. Virol.* **83**, 3139-3146.
- BENJEDDOU, M., LEAT, N., DAVISON, S.** (2002b). *Black queen-cell virus* RNA is infectious in honey bee pupae. *J. Invertebr. Pathol.* **81**, 205-206.
- BOOT, W. J., CALIS, J. N. M., BEETSMA, J.** (1992). Differential periods of *Varroa* mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Exp. Appl. Acarol.* **16**, 295-301.
- BOOT, W. J., DRIESSEN, R. G., CALIS, J. N. M., BEETSMA, J.** (1995). Further observations on the correlation between attractiveness of honey bee brood cells to *Varroa jacobsoni* and the distance from larva to cell rim. *Entomol. Exp. Appl.* **76**, 223-232.
- BOOT, W. J., TAN, N. Q., DIEN, P. C., HUAN, L. V., VAN DUNG, N., LONG, L. T., BEETSMA, J.** (1997). Reproductive success of *Varroa jacobsoni* brood of its original host, *Apis cerana*, in comparison to that of its new host, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Bulletin of Entomological Research* **87**, 119-126.
- BOWEN-WALKER, MARTIN, S. J., GUNN, A.** (1999). The transmission of Deformed Wing Virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J. Invertebr. Pathol.* **73**, 101-106.
- BRØDSGAARD, C.J., RITTER, W., HANSEN, H., BRØDSGAARD, H.F.** (2000). Interactions among *Varroa jacobsoni* mites, acute paralysis virus, and *Paenibacillus larvae larvae* and their influence on mortality of larval honeybees in vitro. *Apidologie* **31**, 543-554.
- BÜCHLER, R.** (2003). Pressemitteilung des Hessischen Dienstleistungszentrums für Landwirtschaft, Gartenbau und Naturschutz (HDLGN), Bieneninstitut Kirchhain, 31. 03. 2003. www.hdlgn-hessen.de.
- BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT** (2003a). Künast: Bienen sind für unsere Umwelt unverzichtbar. Pressemitteilung Nr. 218 vom 1. September 2003, www.verbraucherministerium.de

BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (2003b). Apothekenpflicht für bestimmte Arzneimittel gegen Varroatose der Bienen aufgehoben. *BMVL-Information Nr. 1/2 vom 9.1.2004*, www.verbraucherministerium.de

BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (2004). Der kleine Beutenkäfer. Erkennen und bekämpfen. Broschüre erhältlich unter: www.apis.admin.ch/de/krankheiten/docs/schaedlinge/beutenkaefer.pdf

CALDERONE, N. W., KUENEN, L. P. S. (2001). Effect of honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), colony, cell type and larval sex on host selection by female *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *J. Econ. Entomol.* **94**, 1022-1030.

CALDERONE, N. W., LIN, S., KUENEN, L. P. S. (2002). Differential infestation of honey bee, *Apis mellifera*, worker and queen brood by the parasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie* **33**, 389-398.

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. Invertebr. Pathol.* **91**, 69-73.

CHEN, Y., PETTIS, J. S., EVANS, J. D., KRAMER, M., FELDLAUFER, M. F. (2004). Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie* **35**, 441-448.

CHEN, Y. P., HIGGINS, J. A., FELDLAUFER, M. F. (2005). Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (1), 436-441.

CHRISTIAN, P., CARSTENS, E., DOMIER, L., JOHNSON, J., JOHNSON, K., NAKASHIMA, N., SCOTTI, P., VAN DER WILK, F. (2005). *Dicistroviridae*. In : Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. Virus Taxonomy - Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, S. 783-788. San Diego, Academic Press.

CLARK, T.B. (1978). A filamentous virus of the honey bee. *J. Invertebr. Pathol.* **32**, 332-340.

CZEKOŃSKA, K. (2000). The influence of *Nosema apis* on young honeybee queens and transmission of the disease from queens to workers. *Apidologie* **31**, 701-706.

CZIBENER, C., LA TORRE, J. L., MUSCIO, O. A., UGALDE, R. A., SCODELLER, E. A. (2000). Nucleotide sequence analysis of Triatomavirus shows that it is a member of a novel group of insect RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **81**, 1149-1154.

- DAVISON, S., LEAT, N., BENJEDDOU, M. (2003). Development of molecular tools for honeybee virus research: the South African contribution. *African Journal of Biotechnology* **2**(12), 698-713.
- DE GRAAF, D. C., RAES, H., JACOBS, F. J. (1994a). Spore dimorphism in *Nosema apis* (Microsporida, Nosematidae) developmental cycle. *J. Invertebr. Pathol.* **63**, 92-94.
- DE GRAAF, D. C., RAES, H., SABBE, G., DE RYCKE, P. H., JACOBS, F. J. (1994b). Early development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the midgut epithelium of the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* **63**, 74-81.
- DE GUZMAN, L. I., DELFINADO-BAKER, M. (1996). A new species of *Varroa* (Acari: Varroidae) associated with *Apis koschevnikovi* (Apidae: Hymenoptera) in Borneo. *Internat. J. Acarol.* **22**(1), 23-27.
- DE JONG, D., MORSE, R. A. (1988). Utilisation of raised brood cells of the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), by the mite, *Varroa jacobsoni* (Acarina: Varroidae). *Entomol. Gen.* **14**, 103-106.
- DE JONG, D., DE JONG, P. H., GONCALVES, L. S. (1982a). Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *J. Apic. Res.* **21**(3), 165-167.
- DE JONG, D., MORSE, R. A., EICKWORT, G. C. (1982b). Mite pests of honey bees. *Annual Review of Entomology* **27**, 229-252.
- DE MIRANDA, J. R., DREBOT, M., TYLER, S., SHEN, M., CAMERON, C. E., STOLTZ, D. B., CAMAZINE, S. M. (2004). Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *J. Gen. Virol.* **85**, 2263-2270.
- DE RUIJTER, A., CALIS, J. (1988). Distribution of *Varroa jacobsoni* female mites in honey bee worker brood cells of normal and manipulated depth Acarina: Varroidae. *Entomol. Gen.* **14**, 107-109.
- DELFINADO-BAKER, M., AGGARWAL, K. (1987). A new *Varroa* (Acari: Varroidae) from the nest of *Apis cerana* (Apidae). *Internat. J. Acarol.* **13**(4), 233-237.
- DUAY, P., DE JONG, D., ENGELS, W. (2003). Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie* **34**, 61-65.
- ECKERT, J., FRIEDHOFF, K.-T., ZAHNER, H., DEPLAZES, P. (2005). Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag, Stuttgart.

- EVANS, J.D.** (2001). Genetic evidence for coinfection of honey bees by acute bee paralysis and Kashmir bee viruses. *J. Invertebr. Pathol.* **78**, 189-193.
- FARRAR, C. L.** (1947). Nosema losses in package bees as related to queen superseding and honey yields. *J. Econ. Entomol.* **(40) 3**, 333-338.
- FAUQUET, C. M., MAYO, M. A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L. A.** (2005). Virus taxonomy – Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Academic Press.
- FREEMAN, M. A., YOKOYAMA, H., OGAWA, K.** (2004). A microsporidian parasite of the genus *Spraguea* in the nervous tissues of the Japanese anglerfish *Lophius litulon*. *Folia Parasitol.* **51**, 167-176.
- FRIES, I.** (1988). Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. *Apidologie* **19 (3)**, 319–328.
- FRIES, I., GRANADOS, R. R., MORSE, R. A.** (1992). Intracellular germination of spores of *Nosema apis* Z. *Apidologie* **23**, 61–70.
- FRIES, I., FENG, F., DASILVA, A., SLEMENDA, S. B. UND PIENIAZEK, N. J.** (1996): *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, **32**, 356-365.
- v. FRISCH, K.** (1959): *Aus dem Leben der Bienen*, 6. Aufl. Springer-Verlag Berlin.
- FUCHS, S.** (1990). Preference for drone brood cells by *Varroa jacobsoni* Oud. in colonies of *Apis mellifera carnica*. *Apidologie* **21**, 193-199.
- FUCHS, S., LANGENBACH, K.** (1989). Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood cells and reproduction of *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **20**, 257-266.
- FUJIYUKI, T., TAKEUCHI, H., ONO, M., OHKA, S., SASAKI, T., NOMOTO, A., KUBO, T.** (2004). Novel insect picorna-like virus identified in the brains of aggressive worker honeybees. *J. Virol.* **78(3)**, 1093-1100.
- FYG, W.** (1964). Anomalies and diseases of the queen honey bee. *Annu. Rev. Entomol.* **9**, 207–224.
- GAREDEW, A., SCHMOLZ, E., LAMPRECHT, I.** (2004). The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie* **35**, 419-430.

-
- GENERSCH, E., YUE, C., FRIES, I., DE MIRANDA, J.** (2006). Detection of *Deformed wing virus*, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *J. Invertebr. Pathol.* **91**, 61-63.
- GHOSH, R.C., BALL, B.V., WILLCOCKS, M.M., CARTER, M.J.** (1999). The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. *J. Gen. Virol.* **80**, 1541-1549.
- GLINSKI, Z., JAROSZ, J.** (1984). Alterations in hemolymph proteins of drone honeybee larvae parasitized by *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* **15**, 329-337.
- GLINSKI, Z., JAROSZ, J.** (1990). Microorganisms associated fortuitously with *Varroa jacobsoni* mite. *Microbios* **62**, 59-68.
- GLINSKI, Z., JAROSZ, J.** (1992). *Varroa jacobsoni* as a carrier of bacterial infections to a recipient bee host. *Apidologie* **23**, 25-31.
- GOETZ, B., KOENIGER, N.** (1993). The distance between larva and cell opening triggers brood cell invasion by *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* **24**, 67-72.
- GOVAN, V.A., LEAT, N., ALLSOPP, M., DAVISON, S.** (2000). Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA-viruses. *Virology* **277**, 457-463.
- GRABENSTEINER, E., NOWOTNY, N.** (2001). Virusinfektionen bei der Honigbiene (*Apis mellifera*). *Wien. Tierärztl. Mschr.* **88**, 79-87.
- HARIZANIS, P. C.** (1991). Infestation of queen cells by the mite *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* **22**, 533-538.
- HARTWIG, A., PRZEŁĘCKA, A.** (1971). Nucleic acids in intestine of *Apis mellifica* infected with *Nosema apis* and treated with Fumagillin DCH: cytochemical and autoradiographic studies. *J. Invertebr. Pathol.* **18**, 331-336.
- HUNG, A. C. F.** (2000). PCR detection of Kashmir bee virus in honey bee excreta. *J. Apicult. Res.* **39** (3-4), 103-106.
- HUNG, A. C. F., SHIMANUKI, H.** (1999). A scientific note on the detection of Kashmir bee virus in individual honeybees and *Varroa jacobsoni* mites. *Apidologie* **30**, 353-354.
- HUNG, A. C. F., SHIMANUKI, H., KNOX, D. A.** (1996). Inapparent infection of Acute paralysis virus and Kashmir bee virus in the U.S. honey bees. *Am. Bee J.* **136**, 874-876.

-
- HUNG, A. C. F., PENG, C. Y. S., SHIMANUKI, H.** (2000). Nucleotide sequence variations in Kashmir bee virus isolated from *Apis mellifera* L. and *Varroa jacobsoni* Oud.. *Apidologie* **31**, 17–23.
- ISHIHARA, R.** (1968). Some observations on the fine structure of sporoplasm discharged from spores of a microsporidian, *Nosema bombycis*. *J. Invertebr. Pathol.* **12**, 245–258.
- JOHNSON, K. N., CHRISTIAN, P. D.** (1998). The novel genome organization of the insect picorna-like virus *Drosophila C* virus suggests this virus belongs to a previously undescribed virus family. *J. Gen. Virol.* **79**, 191-203.
- KAESTNER, A.** (1973): Lehrbuch der speziellen Zoologie, Band I: Wirbellose, 3.Teil: Insecta: B. Spezieller Teil, 1.Aufl., Gustav Fischer Verlag Stuttgart, S. 637-649.
- KUENEN, L. P. S., CALDERONE, N. W.** (2000). *Varroa* mite infestations in elevated honey bee brood cells: effects of context and caste. *J. Insect Behav.* **13**, 201-215.
- LANDWIRTSCHAFTSKAMMER NORDRHEIN-WESTFALEN** (2003). Deutschlandweites Bienensterben alarmiert Imkerschaft. www.landwirtschaftskammer.de/fachangebot/bienenkunde/fachartikel/voelkersterben.htm
- LE CONTE, Y., ARNOLD, G., TROUILLER, J., MASSON, C., CHAPPE, B., OURISSON, G.** (1989). Attraction of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* to the drone larvae of honeybees by simple aliphatic esters. *Science* **245**, 638-639.
- LEAT, N., BALL, B., GOVAN, V., DAVISON, S.** (2000). Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *J. Gen. Virol.* **81**, 2111-2119.
- LIU, T. P.** (1984). Ultrastructure of the midgut of the worker honey bee *Apis mellifera* heavily infected with *Nosema apis*. *J. Invertebr. Pathol.* **44**, 282–291.
- LIU, T. P.** (1992). Oöcytes degeneration in the queen honey bee after infection by *Nosema apis*. *Tissue and Cell* **24(1)**, 131–138.
- LOMMEL, S. A., MORRIS, T. J., PINNOCK, D. E.** (1985). Characterization of nucleic acids associated with Arkansas bee virus. *Intervirology* **23(4)**, 199-207.
- MALONE, L. A., GATEHOUSE, H. S.** (1998). Effects of *Nosema apis* infection on honey bee (*Apis mellifera*) digestive proteolytic enzyme activity. *J. Invertebr. Pathol.* **71**, 169–174.

-
- MARCANGELI, J., MONETTI, L., FERNANDEZ, N.** (1992). Malformations produced by *Varroa jacobsoni* on *Apis mellifera* in the province of Buenos Aires, Argentina. *Apidologie* **23**, 399-402.
- MARI, J., POULOS, B. T., LIGHTNER, D. V., BONAMI, J.-R.** (2002). Shrimp taura syndrome virus : genomic characterization and similarity with members of the genus *Cricket paralysis-like viruses*. *J. Gen. Virol.* **83**, 915-926.
- MARTIN, S. J.** (1994). Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Exp. Appl. Acarol.* **18**, 87-100.
- MARTIN, S., HOGARTH, A., VAN BREDA, J., PERRETT, J.** (1998). A scientific note on *Varroa jacobsoni* Oudemans and the collapse of *Apis mellifera* L. colonies in the United Kingdom. *Apidologie* **29**, 369–370.
- MAYO, M. A.** (2002). Virus taxonomy-Houston 2002. *Arch. Virol.* **147**, 1071-1076.
- MEHLHORN, H., PIEKARSKI, G.** (2002). Grundriss der Parasitenkunde. 6., überarb. und erw. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg GmbH, Heidelberg, Berlin.
- MINISTRY OF AGRICULTURE AND FORESTRY, WELLINGTON, NEW ZEALAND** (2003): Import risk analysis: Honey bee (*Apis mellifera*) genetic material.
www.biosecurity.govt.nz/pests-diseases/animals/risk/honey-bee-genetic-material-ra.pdf
- MOON, J. S., DOMIER, L. L., MC COPPIN, N. K., D'ARCY, C. J., JIN, H.** (1998). Nucleotide sequence analysis shows that *Rhopalosiphum padi* virus is a member of a novel group of insect-infecting RNA viruses. *Virology* **243**, 54-65.
- MÜLLER, A., STELLERMANN, K., HARTMANN, P., SCHRAPPE, M., FÄTKENHEUER, G., SALZBERGER, B., DIEHL, V., FRANZEN, C.** (1999). A powerful DNA extraction method and PCR for detection of microsporidia in clinical stool specimens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**(2), 243-246.
- NAKASHIMA, N., SASAKI, J., TORIYAMA, S.** (1999). Determining the nucleotide sequence and capsid-coding region of Himetobi P virus: a member of a novel group of RNA viruses that infect insects. *Arch. Virol.* **144**, 2051-2058.
- NAZZI, F., MILANI, N., DELLA VEDOVA, G., NIMIS, M.** (2001). Semiochemicals from larval food affect the locomotory behaviour of *Varroa destructor*. *Apidologie* **32**, 149-155.

-
- NAZZI, F., MILANI, N., DELLA VEDOVA, G.** (2004). A semiochemical from larval food influences the entrance of *Varroa destructor* into brood cells. *Apidologie* **35**, 403-410.
- NORDSTRÖM, S., FRIES, I., AARHUS, A., HANSEN, H., KORPELA, S.** (1999). Virus infections in Nordic honey bee colonies with no, low or severe *Varroa jacobsoni* infestations. *Apidologie* **30**, 475-484.
- ONGUS, J. R., PETERS, D., BONMATIN, J.-M., BENGSCH, E., VLAK, J. M., VAN OERS, M. M.** (2004). Complete sequence of a picorna-like virus of the genus *Iflavirus* replicating in the mite *Varroa destructor*. *J. Gen. Virol.* **85**, 3747-3755.
- PENG, Y.-S., FANG, Y., XU, S., GE, L.** (1987). The resistance mechanism of the asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans. *J. Invertebr. Pathol.* **49**, 54-60.
- RADEMACHER, E.** (2006). Oxalsäure als Tierarzneimittel zur Bekämpfung der Varroose legal einsetzbar. ADIZ/db/IF 2/2006, S. 9.
- RATH, W.** (1999). Co-adaption of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **30**, 97-110.
- REHM, S. M., RITTER, W.** (1989). Sequence of sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for the calculation of the development period. *Apidologie* **20**, 339-343.
- RITTER, W.** (1996). Diagnostik und Bekämpfung der Bienenkrankheiten. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- RITTER, W.** (2006). *Nosema ceranae*. Asiatischer Nosema-Erreger festgestellt-neu verbreitet oder erst jetzt entdeckt? ADIZ/db/IF 3/2006, S.7.
- ROMMEL, M., ECKERT, J., KUTZER, E., KÖRTING, W., SCHNIEDER, T.** (2000). Veterinärmedizinische Parasitologie. 5., vollst. Neubearb. Auflage, Parey Buchverlag, Berlin.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W.** (2001): Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Vol. 1-3, 3. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SAMMATARO, D., GERSON, U., NEEDHAM, G.** (2000). Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annu. Rev. Entomol.* **45**, 519-548.
- SASAKI, J., NAKASHIMA, N., SAITO, H., NODA, H.** (1998). An insect picorna-like virus, plautia stali intestine virus, has genes of capsid proteins in the 3' part of the genome. *Virology* **244**, 50-58.

- SCHNEIDER, P., DRESCHER, W.** (1987). Einfluss der Parasitierung durch die Milbe *Varroa jacobsoni* Oud. auf das Schlupfgewicht, die Gewichtsentwicklung, die Entwicklung der Hypopharynxdrüsen und die Lebensdauer von *Apis mellifera* L.. *Apidologie* **18**, 101-110.
- SCHULZ, A.** (1984). Reproduktion und Populationsentwicklung der parasitischen Milbe *Varroa jacobsoni* Oud. in Abhängigkeit vom Brutzyklus ihres Wirtes *Apis mellifera* L.. *Apidologie* **15**, 401-420.
- SHEN, M., CUI, L., OSTIGUY, N., COX-FOSTER, D.** (2005). Intricate transmission routes and interactions between bicorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J. Gen. Virol.* **86**, 2281-2289.
- SHIMANUKI, H., CALDERONE, N. W., KNOX, D. A.** (1994). Parasitic mite syndrome: the symptoms. *Am. Bee J.* **134**, 827-828.
- SIEDE, R., BÜCHLER, R.** (2003). Symptomatischer Befall von Drohnenbrut mit dem Black Queen Cell Virus auf hessischen Bienenständen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **116**, 130-133.
- SIEDE, R., BÜCHLER, R.** (2004). Erstbefund des Kaschmir-Bienen-Virus in Hessen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **117**, 12-15.
- SIEWING, R.** (1980): Lehrbuch der Zoologie, Band I, Allgemeine Zoologie, 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, S. 627 ff.
- STECHE, W., HELD, T.** (1981). Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen über die Ontogenie von *Nosema apis* Zander. *Apidologie* **12(2)**, 185 – 207.
- STOLTZ, D., SHEN, X.-R., BOGGIS, C., SISSON, G.** (1995). Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *J. Apic. Res.* **34(3)**, 153-160.
- TENTCHEVA, D., GAUTHIER, L., JOUVE, S., CANABADY-ROCHELLE, L., DAINAT, B., COUSSERANS, F., COLIN, M. E., BALL, B. V., BERGOIN, M.** (2004a). Polymerase chain reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie* **35**, 431-439.
- TENTCHEVA, D., GAUTHIER, L., ZAPPULLA, N., DAINAT, B., COUSSERANS, F., COLIN, M. E., BERGOIN, M.** (2004b). Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* **70 (12)**, 7185-7191.

- TROUILLER, J.,** ARNOLD, G., CHAPPE, B., LE CONTE, Y., BILLION, A., MASSON, C. (1994). The kairomonal esters attractive to the *Varroa jacobsoni* mite in the queen brood. *Apidologie* **25**, 314-321.
- VAN MUNSTER, M.,** DULLEMANS, A. M., VERBEEK, M., VAN DEN HEUVEL, J. F. J. M., CLÉRIVET, A., VAN DER WILK, F. (2002). Sequence analysis and genomic organization of Aphid lethal paralysis virus: a new member of the family *Dicistroviridae*. *J. Gen. Virol.* **83**, 3131-3138.
- VISVESVARA, G. S.,** DA SILVA, A. J., CROPPO, G. P., PIENIAZEK, N. J., LEITCH, G. J., FERGUSON, D., DE MOURA, H., WALLACE, S., SLEMENDA, S. B., TYRRELL, I., MOORE, D. F., MEADOR, J. (1995). In vitro culture and serologic and molecular identification of *Septata intestinalis* isolated from urine of a patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* **33** (4), 930-936.
- WANG, DER-I,** MOELLER, F. E. (1970). The division of labor and queen attendance behavior of nosema-infected worker honey bees. *J. Econ. Entomol.* **63**, 1539-1541.
- WANG, DER-I,** MOELLER, F. E. (1971). Ultrastructural changes in the hypopharyngeal glands of worker honey bees infected by *Nosema apis*. *J. Invertebr. Pathol.* **17**, 308-320.
- WANG, X.,** ZHANG, J., LU, J., YI, F., LIU, C., HU, Y. (2004). Sequence analysis and genomic organization of a new insect picorna-like virus, *Ectropis obliqua* picorna-like virus, isolated from *Ectropis obliqua*. *J. Gen. Virol.* **85**, 1145-1151.
- WEBSTER, T. C.** (1993). *Nosema apis* spore transmission among honey bees. *Am. Bee J.* **133**, 869-870.
- WEBSTER, T. C.,** POMPER, K. W., HUNT, G., THACKER, E. M., JONES, S. C. (2004). *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. *Apidologie* **35**, 49-54.
- WEINBERG, K. P.,** MADEL, G. (1985). The influence of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. on the protein concentration and the hemolymph volume of the brood of worker bees and drones of the honeybee *Apis mellifera* L.. *Apidologie* **16**, 421-436.
- WILSON, J. E.,** POWELL, M. J., HOOVER, S. E., SARNOW, P. (2000). Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol. Cell. Biol.* **20**(14), 4990-4999.
- WU, C.-Y.,** LO, C.-F., HUANG, C.-J., YU, H.-T., WANG, C.-H. (2002). The complete genome sequence of *Perina nuda* picorna-like virus, an insect-infecting RNA virus with a genome organization similar to that of the mammalian picornaviruses. *Virology* **294**, 312-323.

YUE, C., GENERSCH, E. (2005). RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* **86**, 3419-3424.

ZANDER, E., BÖTTCHER F. K. (1989): Handbuch der Bienenkunde: Haltung und Zucht der Biene. 12. Aufl., Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

ZHANG, Z.-Q. (2000). Notes on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) parasitic on honeybees in New Zealand. *Syst. Appl. Acarol. Special Publications* **5**, 9-14.

9.1 Abbildungsnachweise

Einige der in dieser Arbeit verwendeten Abbildungen und Schemazeichnungen wurden nicht von der Verfasserin angefertigt, sondern dem Internet entnommen. Die Originale sind unter folgenden Internetadressen einsehbar:

- Abb. 1: www.intelkurs-sh.de
- Abb. 2: www.bee-info.com
- Abb. 4 A: www.ars.usda.gov
- Abb. 4 B: www.dpi.vic.gov.au
- Abb. 5: www.bioinf.uni-leipzig.de
- Abb. 7: www.ars.usda.gov
- Abb. 8: www.anu.edu.au
- Abb. 9: www.ento.vt.edu
- Abb. 10: website.lineone.net
- Abb. 11: www.betterbee.com
- Abb. 12: www.saarcamica.com
- Abb. 13 A: www.ars.usda.gov
- Abb. 13 B: www.tc.umn.edu
- Abb. 13 C: www.landwirtschaftskammer.de
- Abb. 14: www.taurachsoft.at
- Abb. 15: bienen-meier.ch
- Abb. 16: www.imkerhomepage.de
- Abb. 17: www.apis.admin.ch
- Abb. 19: www.biol.lu.se
- Abb. 20: buckfast.freeweb.hu

9.2 Aufruf zur Einsendung von Bienenproben

Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie
 Institutsvorstand: Prof. Dr. K. Pfister



Dr. rer. nat., Dr. med. vet. Frank Just
 Dipl. Biol. (Univ.), Zoologe, Tierarzt

München, den 06.02.2004

An den
 Landesverband der Bayerischen Imker e.V.
 An die
 Bezirks- und Kreisverbände des LVBI
 An alle
 interessierten Imkerinnen und Imker

Aufruf

Zur Einsendung von Probenmaterial

Sehr geehrte Damen und Herren,
 Liebe Imkerinnen und Imker,

Am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München beginnt im Rahmen von Grundlagenforschungen an Arthropodenviren ein neues Projekt zur

Diagnose, Epidemiologie und Bekämpfung arthropodenübertragener Virose der Honigbiene.

Ein erstes Ziel der Studie ist die Erfassung der Verbreitung von durch *Varroa destructor* übertragenen Viren in den Bienenpopulationen Bayerns, sowie die Isolierung und molekularbiologische Charakterisierung von Bienenviren in Bayern.

Wir fordern deshalb alle interessierten Imkerinnen und Imker mit auffälligen Völkerverlusten im Jahr 2004 zur Einsendung von Probenmaterial (in Form von toten Bienen, Milben und Gemüllen) auf.

Aus organisatorischen Gründen bitten wir alle Interessierten **vor Einsendung des Materials** um Kontaktnahme mit unserem Institut und Anforderung unseres Informationsmaterials zur Probenentnahme. Die Untersuchungen sind für die teilnehmenden Imker kostenfrei.

Bitte unterstützen Sie unser Projekt durch Ihre Teilnahme

Mit freundlichen Grüßen

gez.:
 Dr. Dr. F. Just
 (Projektleiter)



Leopoldstr. 5
 80802 München
 Tel.: (089) 2180-3515
 Fax: (089) 2180-3623

Postanschrift:
 Postfach 44 03 61
 80752 München

U-Bahn
 Linie U 3 / U 6
 Haltestelle
 Universität

E-Mail:
Frank.Just@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

9.3 Merkblatt über die Einsendung von Bienenproben

Merkblatt

Über die Einsendung von Bienenproben für die virologische Untersuchung

Allgemeines

Bitte beachten Sie, dass wir aus Kostengründen nur ausreichend frankierte Sendungen annehmen können !!!

Bitte versenden Sie die Proben umgehend nach der Probenziehung

Bitte legen Sie jeder Sendung vollständig ausgefüllte, vordruckte Untersuchungsanträge bei

(Bei mehr als einer Probe pro Sendung die Einzelproben bitte genau beschriften / Für jeden Stockstandort bitte eigenen Untersuchungsantrag verwenden)

Probenmaterial

1., Bienen

Besonderes Interesse besteht an Proben nach auffälligem Wintertotenfall, massivem Totenfall zu jeder beliebigen Jahreszeit, Totalausfällen ganzer Völker. Auch Proben von Totenfall in sonst unauffälligen Völkern sind geeignet.

Menge: 30-50 Bienen je Volk; Proben aus verschiedenen Völkern nicht mischen!

Verpackung: Bitte ausschließlich luftdurchlässiges Material wie Pappschachteln verwenden, da tote Insekten in luftdichten Plastikverpackungen schnell in Verwesung übergehen und die Virusausbeute negativ beeinflusst wird.

2., Gemülle, Varroa

Gemülleproben und Totenfall von Varroamilben (auch nach Behandlung) in luftdurchlässigem Material wie Pappschachteln verpacken.

Menge: maximal entsprechend dem Volumen von 30-50 Bienen

Wichtig sind Angaben über Art und Zeitpunkt der Varroose-Behandlung

3., Auftretende Insekten

Auf den Bienenwaben beobachtete Fremdinsekten wie Käfer, Wachsmotten u.a. können zur Bestimmung ebenfalls an uns eingeschendet werden

Bezugsquelle für Untersuchungsanträge / Versandadresse für Bienenproben:

Dr. Dr. F. JUST
Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie
Leopoldstraße 5
80802 München

Tel.: 089/2180-3515 Fax.: 089/2180-3623
<mailto:frank.just@tropa.vetmed.uni-muenchen.de>

9.4 Untersuchungsantrag

LMU
Ludwig-Maximilians-Universität München



Untersuchungsantrag

Zur Einsendung von Bienenproben für die virologische Untersuchung
(bitte vollständig in Blockschrift ausfüllen)

Angaben zum Tierhalter/Imker

Name:
Vorname:
Straße:
PLZ, Ort:
Tel.:
Fax.:
e-mail:

Angaben zum Einsender (falls abweichend vom Tierhalter)

Name:
Vorname:
Straße:
PLZ, Ort:
Tel.:
Fax.:
e-mail:

Angaben zum Betrieb

- Vollerwerbsimker
 Nebenerwerbsimker
 Hobbyimker

Zahl der Völker: _____

Imker seit: _____

Art und Zeitpunkt der Varroosebehandlung

Angaben zur Probennahme

- Standort des Stockes aus dem die Probe stammt

(nach Möglichkeit Angaben über Geograph. Länge/Breite oder aber genaue Standortangabe anhand topograph. Karte)

- Stocknummer: _____

- Für den Standort zuständiger Landkreis: _____

Probenmaterial

- Bienen Gemüttele/Varroa Fremdinsekten zur Bestimmung

Datum der Probennahme: _____ Zahl der Proben von diesem Standort: _____

(Falls mehr als eine Probe) Bezeichnungen der Proben von diesem Standort: _____

(bitte wenden)

Untersuchungsantrag (Rückseite)

Sonstige Mitteilungen zur Probennahme

(Bitte machen Sie Angaben über die Begleitumstände der Probenziehung [z.B. massiver Totenfall, Totalausfall, ...].

sonstige Beobachtungen wie Krankheitserscheinungen, usw.)

Angaben zu früheren Erkrankungsfällen im Bestand

(Bitte machen Sie Angaben über Zeitpunkt, Art und Ausmaß früherer Erkrankungen in ihren Bienenbeständen und ggfs.

über Ihre Völker-Verluste im vergangenen Jahr)

Raum für persönliche Mitteilungen

Wir bedanken uns herzlich für Ihre Mitarbeit

9.5 Rohdaten

Tabelle 6: Rohdaten; Aus Datenschutzgründen werden die Namen und die Standortdaten der Imker nicht aufgeführt. *Nr.1-137:* Laufende Probennummer Bienen; *V1-V70:* Laufende Probennummer Milben; *Lkr.:* Landkreis, Kurzform; *Monat:* Monat der Probenziehung; *Auffällig:* Einstufung nach Angaben des Imkers auf dem Untersuchungsantrag; *B:* Ergebnis BQCV; *K:* Ergebnis KBV; *D:* Ergebnis DWV; *A:* Ergebnis ABPV; *Nlm:* Ergebnis Mikrosporidien Lichtmikroskopie; *Ns:* Ergebnis *Nosema apis* spezifische PCR; *Nu:* Ergebnis universelle Mikrosporidien-PCR; *MRNA:* Milbenzahl für RNA-Isolierung; *n.u.:* nicht untersucht;

* Positiveinträge unter K und A erfolgten nur nach Bestätigung durch Sequenzierung

<i>Nr.</i>	<i>Imker</i>	<i>Lkr</i>	<i>Monat</i>	<i>Auffällig</i>	<i>B</i>	<i>K*</i>	<i>D</i>	<i>A*</i>	<i>Nlm</i>	<i>Ns</i>	<i>Nu</i>	<i>MRNA</i>
1	1	MSP	III	ja	+	-	+	n.u.	-	-	-	
2	1	MSP	III	ja	+	-	+	n.u.	+	-	-	
3	1	MSP	III	ja	+	-	+	n.u.	-	-	+	
4	1	MSP	III	ja	+	-	+	n.u.	-	-	-	
5	2	SR	III	ja	+	-	+	n.u.	-	-	-	
6	3	OA	III	ja	+	-	+	n.u.	-	-	-	
7	3	OA	III	ja	-	-	+	n.u.	-	-	-	
8	3	OA	III	ja	+	-	+	n.u.	-	-	-	
9	4	OA	III	ja	-	-	+	n.u.	-	-	-	
10	5	DGF	III	ja	+	-	+	n.u.	-	-	-	
11	5	DGF	III	nein	+	-	+	n.u.	-	-	-	
12	5	DGF	III	ja	+	-	+	n.u.	-	-	-	
13	6	OA	III	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
14	6	OA	III	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
15	7	SR	III	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
16	8	RO	III	nein	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
17	8	RO	III	nein	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
18	8	RO	III	ja	-	-	+	n.u.	-	-	-	
19	8	RO	III	nein	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
20	8	RO	III	nein	-	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
21	8	RO	III	nein	-	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
22	8	RO	III	nein	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
23	8	RO	III	nein	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
24	8	RO	III	nein	+	-	-	n.u.	+	+	+	
25	8	RO	III	nein	+	-	-	n.u.	-	-	-	
26	8	RO	III	nein	-	-	-	n.u.	-	-	-	
27	8	RO	III	nein	-	-	-	n.u.	-	-	-	
28	8	RO	III	nein	-	-	+	n.u.	-	-	-	
29	8	RO	III	nein	-	-	-	n.u.	-	-	-	
30	8	RO	III	nein	+	-	-	n.u.	+	+	+	
31	8	RO	III	nein	-	-	-	n.u.	+	-	+	
32	8	RO	III	nein	-	-	-	n.u.	-	-	+	
33	8	RO	III	nein	-	-	+	n.u.	-	-	-	
34	8	RO	III	nein	-	-	+	n.u.	-	-	-	
35	8	RO	III	nein	+	-	+	n.u.	-	-	-	
36	8	RO	III	nein	-	-	-	n.u.	-	-	-	
37	8	RO	III	nein	+	-	+	n.u.	-	-	-	
38	8	RO	III	ja	+	-	+	n.u.	-	-	-	
39	8	RO	III	nein	+	-	+	n.u.	-	-	-	
40	8	RO	III	nein	+	-	-	n.u.	-	-	-	
41	8	RO	III	nein	+	-	+	n.u.	-	-	-	
42	8	RO	III	ja	-	-	+	n.u.	-	-	-	
43	8	RO	III	nein	+	-	+	n.u.	-	-	-	
44	8	RO	III	nein	+	-	+	n.u.	-	-	-	
45	8	RO	III	nein	+	-	-	n.u.	-	-	-	
46	9	OA	III	ja	+	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	
47	10	CHA	III	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
48	10	CHA	III	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
49	10	CHA	III	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
50	10	CHA	III	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
51	10	CHA	III	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
52	10	CHA	III	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
53	10	CHA	III	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
54	10	CHA	III	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
55	10	CHA	III	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
56	10	CHA	III	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
57	11	MSP	IV	ja	-	-	-	n.u.	-	-	-	
58	11	MSP	IV	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	

Nr.	Imker	Lkr	Monat	Auffällig	B	K*	D	A*	Nlm	Ns	Nu	MRNA
59	11	MSP	IV	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
60	11	MSP	IV	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
61	11	MSP	IV	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
62	11	MSP	IV	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
63	11	MSP	IV	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
64	11	MSP	IV	ja	+	-	-	n.u.	+	-	-	
65	11	MSP	IV	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
66	11	MSP	IV	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
67	12	TÖL	III	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
68	12	TÖL	III	ja	-	-	-	n.u.	+	n.u.	n.u.	
69	13	FÜ	IV	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
70	14	HAS	IV	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
71	15	TÖL	IV	ja	-	-	-	n.u.	+	n.u.	n.u.	
72	15	TÖL	IV	ja	-	-	+	n.u.	+	n.u.	n.u.	
73	16	OA	V	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
74	17	NEW	V	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
75	17	NEW	V	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
76	17	NEW	V	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
77	17	NEW	V	ja	+	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	
78	18	MIL	V	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
79	19	OA	V	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
80	20	NES	V	ja	+	-	-	n.u.	+	-	+	
81	21	SR	IV	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
82	21	SR	IV	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
83	21	SR	IV	ja	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	
84	21	SR	IV	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
85	21	SR	IV	ja	+	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	
86	21	SR	IV	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
87	21	SR	IV	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
88	21	SR	IV	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
89	21	SR	IV	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
90	21	SR	IV	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
91	21	SR	IV	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
92	21	SR	IV	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
93	12	TÖL	VI	ja	-	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
94	12	TÖL	VI	nein	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	
95	12	TÖL	VII	nein	+	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	
96	22	MÜ	VII	nein	+	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	
97	23	HAS	VII	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
98	23	HAS	VII	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
99	23	HAS	VII	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
100	23	HAS	VII	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
101	12	TÖL	VIII	nein	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
102	24	M	VIII	nein	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
103	12	TÖL	IX	ja	+	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	
104	25	A	X	ja	+	-	+	n.u.	+	n.u.	n.u.	
105	26	TÖL	X	ja	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
106	8	RO	XI	nein	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
107	8	RO	XI	nein	-	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
108	27	OA	XII	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
109	27	OA	XII	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
110	27	OA	XII	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
111	27	OA	XII	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
112	28	MÜ	XII	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
113	28	MÜ	XII	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
114	28	MÜ	XII	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
115	28	MÜ	XII	ja	+	-	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	
116	28	MÜ	XII	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
117	28	MÜ	XII	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
118	29	HAS	I	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
119	5	DGF	II	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
120	30	REG	XII	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
121	31	AS	III	ja	+	-	+	n.u.	-	-	+	
122	31	AS	III	ja	-	-	+	n.u.	-	-	+	
123	31	AS	III	ja	-	-	+	n.u.	+	-	+	
124	31	AS	III	ja	-	-	+	n.u.	+	+	+	
125	31	AS	III	ja	-	-	+	n.u.	-	-	+	
126	32	LA	III	ja	+	-	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	
127	33	LA	III	ja	+	-	+	n.u.	+	+	+	
128	33	LA	III	ja	+	-	+	n.u.	-	-	-	
129	33	LA	III	ja	+	-	+	n.u.	+	+	+	
130	33	LA	III	ja	+	-	+	n.u.	+	-	-	

Nr.	Imker	Lkr	Monat	Auffällig	B	K*	D	A*	Nlm	Ns	Nu	MRNA
131	33	LA	III	ja	+	-	+	n.u.	-	-	-	
132	33	LA	III	ja	+	-	+	n.u.	-	-	+	
133	34	ED	III	ja	+	-	+	n.u.	+	+	+	
134	34	ED	IV	ja	+	-	-	n.u.	+	+	+	
135	35	RO	IV	ja	+	-	+	n.u.	-	-	-	
136	35	RO	IV	ja	+	-	+	n.u.	+	+	+	
137	35	RO	IV	ja	+	-	-	n.u.	+	+	+	
V1	3	OA	III	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V2	5	DGF	III	nein	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	3
V3	5	DGF	III	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	3
V4	6	OA	III	ja	-	-	-		n.u.	n.u.	n.u.	10
V5	6	OA	III	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	8
V6	7	SR	III	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V7	8	RO	III	nein	-	-	-		n.u.	n.u.	n.u.	1
V8	8	RO	III	ja	-	-	-		n.u.	n.u.	n.u.	4
V9	8	RO	III	nein	-	-	-		n.u.	n.u.	n.u.	1
V10	8	RO	III	nein	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	4
V11	8	RO	III	nein	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	1
V12	9	OA	III	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	7
V13	10	CHA	III	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	9
V14	10	CHA	III	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	3
V15	10	CHA	III	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V16	10	CHA	III	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	6
V17	10	CHA	III	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V18	10	CHA	III	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	8
V19	10	CHA	III	ja	+	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	4
V20	10	CHA	III	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	4
V21	11	MSP	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	6
V22	11	MSP	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	4
V23	11	MSP	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V24	11	MSP	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V25	11	MSP	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V26	11	MSP	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V27	11	MSP	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V28	11	MSP	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V29	11	MSP	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	6
V30	14	HAS	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V31	17	NEW	V	ja	+	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V32	21	SR	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V33	21	SR	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	5
V34	21	SR	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	9
V35	21	SR	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V36	21	SR	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V37	12	TÖL	VII	nein	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	4
V38	12	TÖL	VIII	nein	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	4
V39	12	TÖL	IX	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	9
V40	25	A	X	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V41	8	RO	XI	nein	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V42	8	RO	XI	nein	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V43	27	OA	XII	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V44	27	OA	XII	ja	-	+	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V45	27	OA	XII	ja	-	+	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V46	27	OA	XII	ja	+	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	10
V47	28	MÜ	XII	ja	-	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	10
V48	28	MÜ	XII	ja	-	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	10
V49	28	MÜ	XII	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V50	28	MÜ	XII	ja	-	+	+		n.u.	n.u.	n.u.	4
V51	28	MÜ	XII	ja	+	+	+		n.u.	n.u.	n.u.	6
V52	29	HAS	I	ja	+	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V53	5	DGF	II	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V54	30	REG	XII	ja	-	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	9
V55	31	AS	III	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V56	31	AS	III	ja	-	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	10
V57	31	AS	III	ja	-	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	2
V58	31	AS	III	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V59	31	AS	III	ja	-	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	10
V60	32	LA	III	ja	+	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	10
V61	33	LA	III	ja	-	+	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V62	33	LA	III	ja	+	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V63	33	LA	III	ja	+	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V64	33	LA	III	ja	+	+	+		n.u.	n.u.	n.u.	10
V65	33	LA	III	ja	+	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	10

<i>Nr.</i>	<i>Imker</i>	<i>Lkr</i>	<i>Monat</i>	<i>Auffällig</i>	<i>B</i>	<i>K*</i>	<i>D</i>	<i>A*</i>	<i>Nlm</i>	<i>Ns</i>	<i>Nu</i>	<i>MRNA</i>
V66	33	LA	III	ja	+	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	10
V67	34	ED	III	ja	+	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	3
V68	34	ED	IV	ja	+	+	+		n.u.	n.u.	n.u.	1
V69	35	RO	IV	ja	+	+	+		n.u.	n.u.	n.u.	2
V70	35	RO	IV	ja	-	-	+		n.u.	n.u.	n.u.	2

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. vet. K. Pfister danke ich für die Überlassung des Themas und sein Interesse an dieser Arbeit.

Vielmals danke ich Herrn Dr. rer. nat. Dr. med. vet. Frank Just, der mit seiner Betreuung entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Seine freundschaftliche Unterstützung, seine Hilfsbereitschaft und seine Geduld, seine kritischen, aber auch aufmunternden Worte waren mir immer eine Motivation.

Herrn PD Dr. med. vet. S. Reese danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und für seine ausführliche Beratung.

Herrn Dr. R. Siede vom Hessischen Dienstleistungszentrum für Landwirtschaft, Gartenbau und Naturschutz, Bieneninstitut Kirchhain, danke ich für die Bereitstellung von Positivkontrollen für die virologische Untersuchung.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Imkern, die an der Untersuchung teilgenommen haben.

Frau Heidrun Schöl danke ich für ihre gute Laune und ihre liebenswerte Art.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern und meinem „großen“ Bruder. Auf all meinen Wegen (und Umwegen) stehen sie mir mit Rat und Tat zur Seite, eigene Interessen werden dabei oftmals in den Hintergrund gestellt. Ihr ward und seid mir immer eine Stütze.