



Schweizerisches Zentrum für Bienenforschung
Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
Liebefeld, CH-3003 Bern



Identifizierung von chemischen Orientierungsstoffen von *Varroamilben (Varroa destructor)* im Hinblick auf eine biologische Bekämpfung des Bienenparasiten

SCHLUSSBERICHT UND DATENVERZEICHNISSE

Franz-Xaver Dillier, Peter Fluri, Patrick Guerin

2002

Mitteilung Nr. 45

Dank

Zum Gelingen der Arbeit haben das ganze Team des Zentrums für Bienenforschung in Bern und die Mitarbeiter an der Abteilung Physiologie Animale am Zoologischen Institut der Universität Neuenburg beigetragen. Besonders danken möchten wir V. Kilchenmann für die Auswertung der „Purge and Trap“-Analysen, A. Imdorf, M. Dettli, B. Bachofen, R. Gauch, R. Kuhn, D. Gerster und Ch. Strub für die Hilfe im Labor, auf den Bienenständen, zahlreichen Anregungen und hilfreichen Diskussionen. Finanziert wurde die Studie durch einen Beitrag des Bundesamtes für Veterinärwesen BVET, Bern (Beitrag Nr. 012.96.2), des Vereins deutschschweizerischer und rätoromanischer Bienenfreunde und der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Milchwirtschaft FAM.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	2
2	Elektrophysiologie	2
2.1.1	Stand des Projektes:.....	3
2.1.2	Zusammenfassung Elektrophysiologie:	3
3	Kramerkugel Versuche	4
3.1.1	Methode:.....	4
3.1.2	Diskussion:.....	7
3.1.3	Schlüsse:	8
4	Purge and Trap Analyse.....	8
4.1.1	Einleitung:	8
4.1.2	Methode:.....	8
4.1.3	Resultate:.....	9
4.1.4	Diskussion:.....	13
5	Olfaktometerertest und Hohenheim Wahltest.....	14
5.1	Olfaktometerertest.....	14
5.1.1	Einleitung:	14
5.1.2	Methode:.....	14
5.1.3	Resultate:.....	14
5.1.4	Diskussion:.....	15
5.2	Hohenheim Wahltest.....	16
6	Absteigetest	17
6.1.1	Methode:.....	18
6.1.2	Resultate:.....	19
	Diskussion:.....	24
7	Stand des Projektes	25
8	Literaturverzeichnis	26
Anhang I: Datenverzeichnis		30
I.	Elektrophysiologie:.....	30
II.	Kramerkugel:.....	30
III.	„Purge and Trap“ Analyse:.....	31
IV.	Olfaktometerertest und Hohenheim Wahltest:	31
V.	Datenverzeichnis Absteigetest:.....	32
Anhang II: Tabelle „Purge and Trap“		34
Anhang III: Boxplots.....		45

1 EINLEITUNG

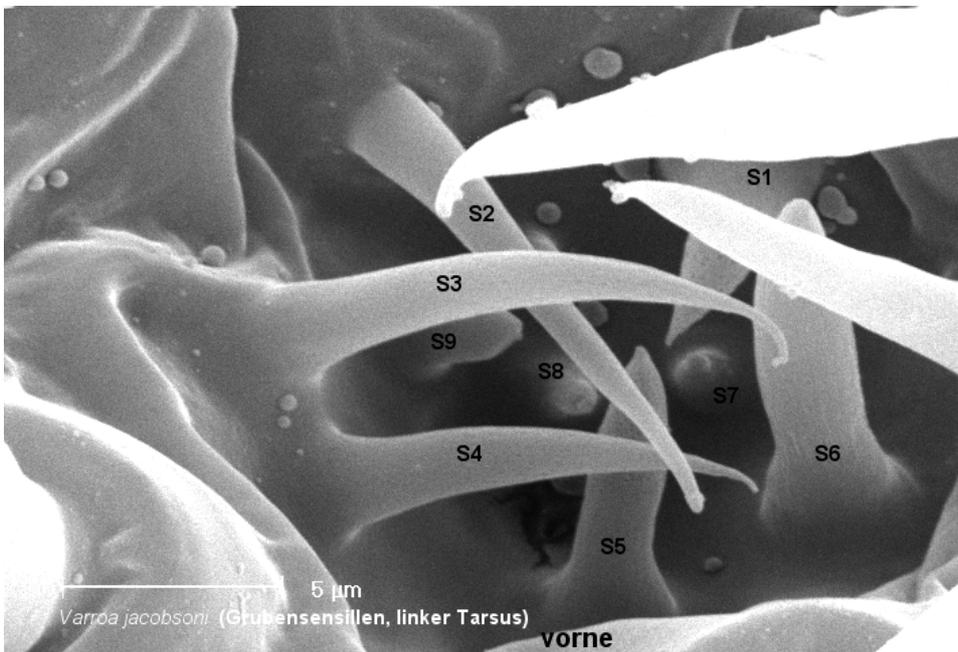
Der Bericht gliedert sich in die fünf Teiluntersuchungen:

- Elektrophysiologische Untersuchung der olfaktorischen Sensillen
- Analyse Orientierungsverhalten Laufverhaltens von *Varroamilben* auf der Laufkompensator Biotestanlage (Kramer Kugel)
- „Purge and Trap“ Analyse der Gerüche von Bienen, Bienenlarven und Futtersaft
- Olfaktometertest und Hohenheim Wahltest
- Abstiegstest zum Transferverhalten von *Varroamilben* von den Ammenbienen auf die Brut

Die Milbe *Varroa destructor* muss, um sich im Bienenvolk zu reproduzieren von den Ammenbienen in die Zellen der verdeckelungsbereiten Brut absteigen. Dort kann sie sich durch eintauchen in den proteinreichen Futtersaft verbergen. Futtersaft spielt eine zentrale Rolle beim Futter und Informationsaustausch im Bienenvolk, der Trophallaxe. *Varroa* könnte von diesem Informationskanal profitieren. Es wird angenommen, dass sie sich dabei auch durch Geruchsignale leiten lässt. Wir wollten mit verschiedenen Methoden die Hypothese testen, ob der Futtersaft für die Orientierung der Milben eine entscheidende Rolle spielt.

2 ELEKTROPHYSIOLOGIE

Rasterelektronische Aufnahmen zeigten, dass *Varroa* auf der Oberseite der Vorderbeine ein Grubensinnesorgan besitzt. In dieser Grube befinden sich Wandporensensillen,



die sich im Vergleich mit von anderen Arachniden und Insekten beschriebenen Sensillen, als Geruchssinnesorgane deuten lassen. Es gelangen uns elektrophysiologische Ableitungen von Aktionspotentialen an diesen Sensillen in Reaktion auf eine Reizung mit volatilen Geruchsstoffen.

Abb. 1 Grubensinnesorgan mit den tast- und geschmackempfindlichen Randborsten R1 bis R9 und den Grubensensillen S1 bis S9.

2.1.1 Stand des Projektes:

Die Methodik und die Ergebnisse dieser Versuche sind ausführlich in den Veröffentlichungen „*Varroa* riecht mit den Beinen“ und „Odour-mediated transfer to brood cells of its honeybee host, *Apis mellifera*, and olfactory cell responses of *Varroa destructor* to volatiles“ dargestellt. Deshalb folgt hier nur eine kurze Zusammenfassung.

2.1.1.1 Technische Probleme:

Die Handhabung der extrem kleinen Tiere und die Auflösungsgrenze der optischen Instrumente führen in einen Grenzbereich der technischen Möglichkeiten der Elektrophysiologiestation.

2.1.1.2 Stand der Erprobung:

Die Olfaktorische Wahrnehmung von flüchtigen Substanzen konnte mit zwei Varianten der Methode (Glaselektroden und Wolframelektroden) nachgewiesen werden.

2.1.1.3 Grenzen der Methode

Für ein Screening nach verhaltensaktiven Substanzen war die Elektrophysiologie mit der zur Verfügung stehenden Anlage zu aufwändig und zuwenig reproduzierbar, um sie mit der dort vorhandenen Möglichkeit zur GC_MS-Analyse zu koppeln.



Abb. 2 Mit der Elektrophysiologiestation gekoppelter Gaschromatograph.

2.1.1.4 Voraussetzungen für ein Weiterfahren

Optimaler Zustand der Arbeitsstation und Verbesserungen am optischen System

2.1.2 Zusammenfassung Elektrophysiologie:

- *Varroa destructor* besitzt auf der Dorsalseite des ersten Beinpaars in einer Grube 9 unterschiedliche Sensillen
- elektrophysiologische Ableitungen und die Morphologie zeigen, dass sich darunter olfaktorische Sensillen befinden
- *Varroa* kann Gerüche von Bienen und Brutwaben und volatilen Verbindungen wahrnehmen und darauf reagieren

3 KRAMERKUGEL VERSUCHE

In den Wintermonaten versuchten wir zu testen ob Futtersaft, wenn er den Milben auf der Laufkompensatorkugel im Luftstrom angeboten wird, bei ihnen eine gerichtete Folge-reaktion auslösen kann. Der Futtersaft wird im Bienenvolk aus Pollen ausschliesslich von den Ammenbienen, den Hauptwirten der Parasiten, in der Hypopharingealdrüse produziert. Die Ammenbienen verteilen den Futtersaft über die sogenannte Trophallaxe, den sozialen Futteraustausch der sozialen Insekten, den übrigen Stockgenossen und Füttern damit die Larven.

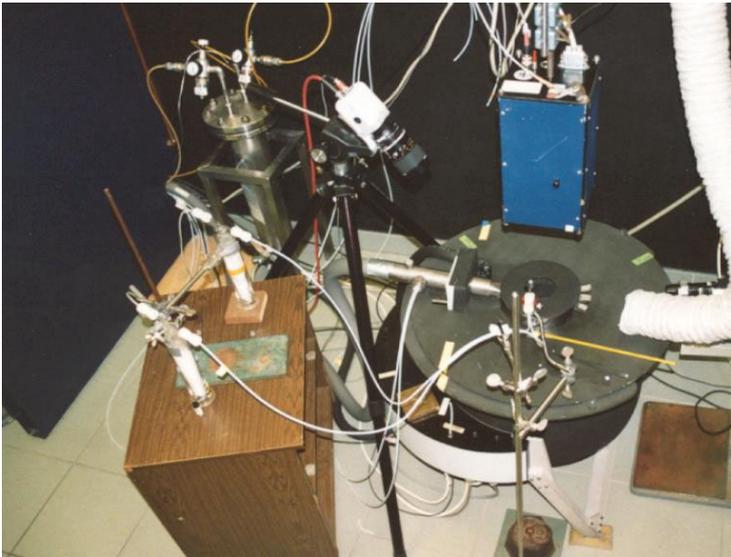


Abb. 3 Kramerkugellabor. Die Milbe läuft in einer klimatisierten oben offenen Kammer auf der Kramerkugel. Die infrarot Bewegungsdetektionseinheit für die Laufkompensation ist im blauen Kasten untergebracht. Die Bewegung der Milbe wird zusätzlich mit zwei Infrarotkameras (links oben und rechts neben dem Luftabzugsrohr) gefilmt

Matthias Rickli (1992,1994) konnte zeigen, dass Milben im Laufkompensatortest auf Ammenbienen und Larven reagieren. Ziel der Versuche ist es abzuklären ob im Drohnentuttersaft Komponenten vorhanden sind, die auf *Varroa*-Milben anziehend wirken. Es sollte versucht werden die positiven Resultate von M. Rickli mit einer Gegenwind-Folgereaktion auf lebende Bienen zu replizieren und diese Resultate mit der Reaktion auf lebende Drohnenlarven und Drohnentuttersaft zu vergleichen. Es ging vorerst darum die damals erfolgreichen Versuchsbedingungen wieder herzustellen und eventuell anzupassen.

3.1.1 Methode:

Stimuli: 10 - 20 lebende Bienen in 100 ml zylindrischer Gaswaschflasche
lebende Drohnen (grosse L5 Larven kurz vor dem Verdeckeln)
Drohnentuttersaft gelöst in dest. H2O und aufgetragen auf Filterpapier in 100 ml zylindrischer Gaswaschflasche

Setup: Kamerkugel mit Tracking-Steuerungsprogramm 80 Sek kombiniert mit Videoaufnahmen von vorne oben und flach von hinten (Abb. 3).

- 10 Sek. Kontrolle ohne Anblasen der *Varroa*,
- 30 Sek. Anblasen mit reiner Luft,
- 30 Sek. Anblasen mit Stimulus beladender Luft und
- 10 Sek. Endkontrolle ohne Anblasen.

3.1.1.1 Stimulierung:

Stimulierung mit elektronisch gesteuertem Stimulus Apparat zur Erzeugung von definierten Aktivkohle gefilterten Luftströmen. Der Kontroll- und der Stimulusluftstrom wird durch Teflonschläuche zu einer rechtwinklig abgelenkten Pasteurpipette mit Spitzenabstand von 1 oder 2 cm entweder gepulst oder kontinuierlich in Richtung *Varroa* in den konditionierten Hauptluftstrom geblasen (Abb. 4). Die Versuchs-*Varroa* wird unmittelbar vor dem Versuchsbeginn mit einem Pinsel von einer Biene abgestreift und ihr ein Stück Reflektorfolie (3M Folie) auf den Carapax (Rücken) geklebt. Anschliessend wird die *Varroa* auf die Kugel gesetzt und der Versuch unmittelbar danach im Dunkeln gestartet. (Videoaufnahmen mit dem Rotlicht des Trackingsystems der Kramerkugel bei eingesetztem Rotfilter)

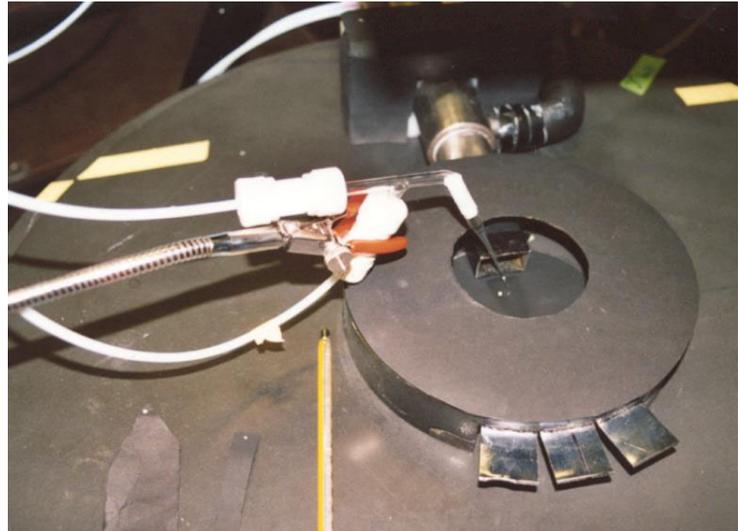


Abb. 4 Stimulusapparatur. Der Geruchsstimulus wird elektronisch gesteuert über eine an der Spitze abgelenkte Pasteur-Pipette in den Luftstrom vor der Milbe eingeblasen

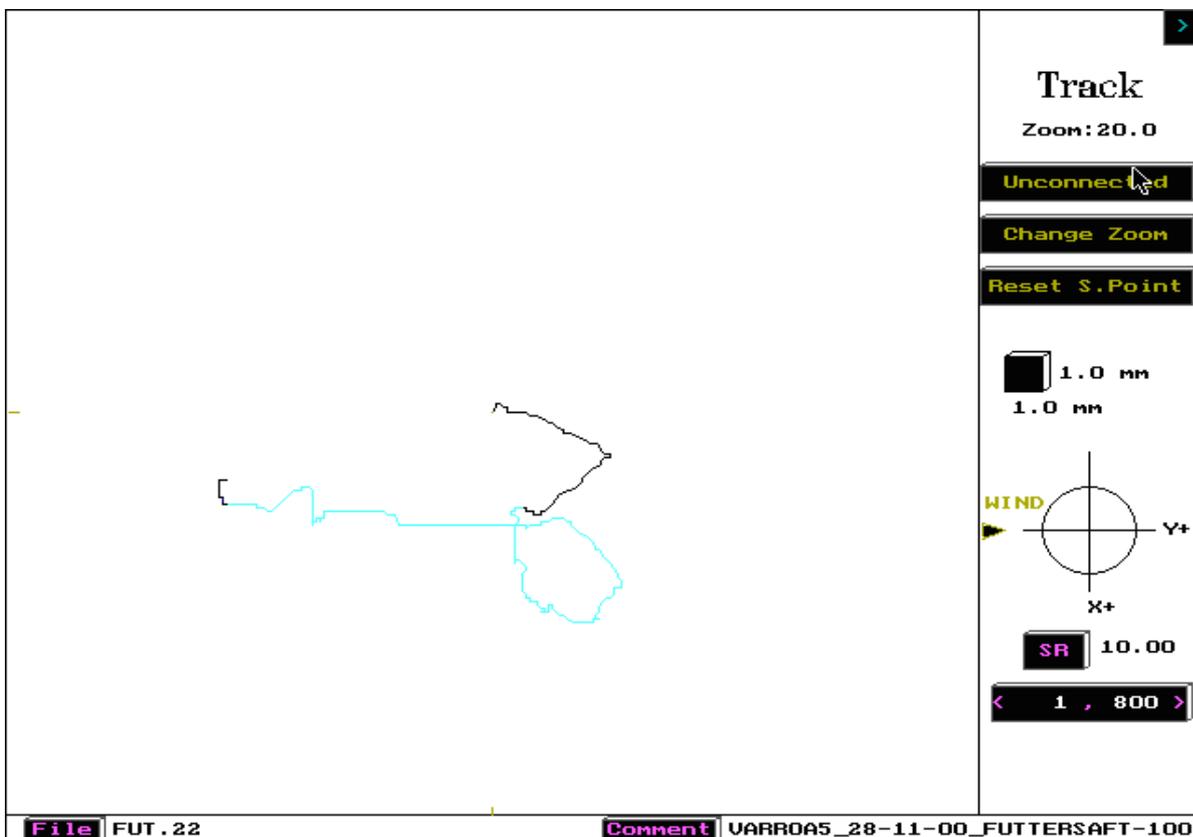


Abb. 5 Aufzeichnung einer Laufspur

3.1.1.2 Resultate:

Der Verhaltensnachweis einer Reaktion auf volatile Komponenten aus dem Futtersaft ist nicht gelungen:

- Keine signifikant messbaren Unterschiede in der Folgereaktion zwischen der Kontrolle mit reiner Luft und Luft mit Geruchsstimulus. Keine systematische Richtungsänderung beim Wechsel von Kontrolle (reine Luft) zu Stimulus, weder bei Drohnenlarven, noch bei lebenden Bienen noch bei Drohnenfuttersaft
- Auch bei der Kontrolle konnte die von Rickli festgestellte Bevorzugung der Richtungen windabwärts oder quer zum Wind nicht festgestellt werden.
- keine eindeutige positiv Kontrolle (Folgereaktion auf lebende Bienen oder lebende Larven)

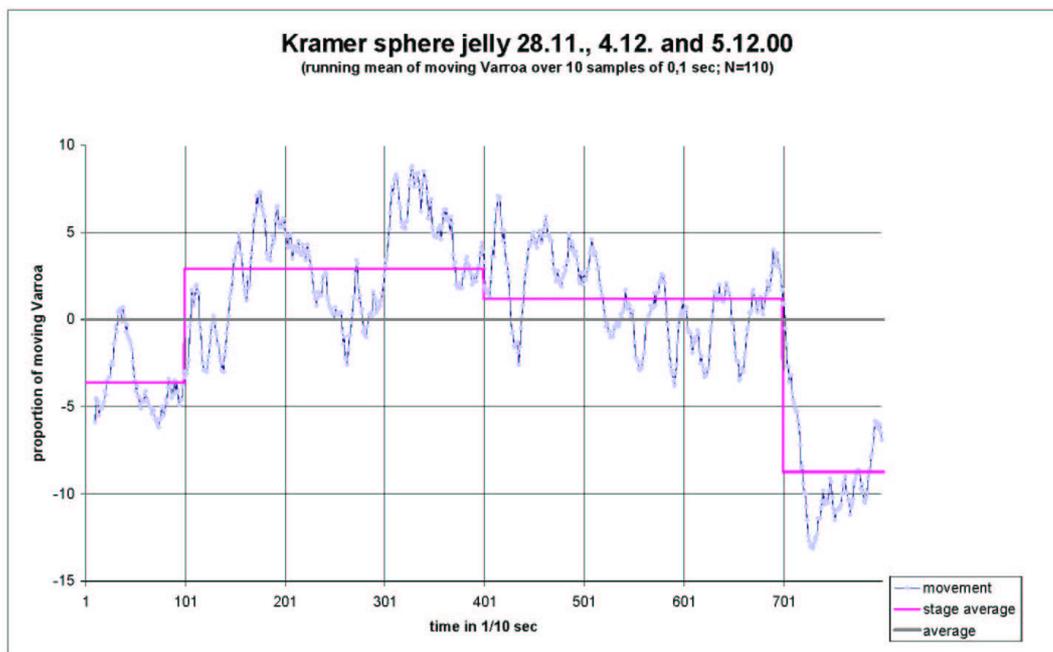


Abb. 6 Kramerkugelauswertung. Die Graphik zeigt die Auswertung der Laufzeit auf der Kamerkugel mit Futtersaft als Stimulus. Die ersten 10s sind Anpassungszeit ohne Luftstrom, dann folgen 30s reine Luft gefolgt von 30s Luft mit Futtersaftgeruch und als Endkontrolle nochmals 10s ohne Luftstrom. Der Unterschied in der Laufdauer zwischen reiner Luft und Stimulusluft ist nicht signifikant.

Mögliche Gründe:

- *Varroa* reagiert sehr empfindlich auf Anblasen (stoppt Bewegung)
- Sehr kritische Abhängigkeit der Laufmotivation von den Versuchsbedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit.....)
- Sehr grosse individuelle Unterschiede im Verhalten.

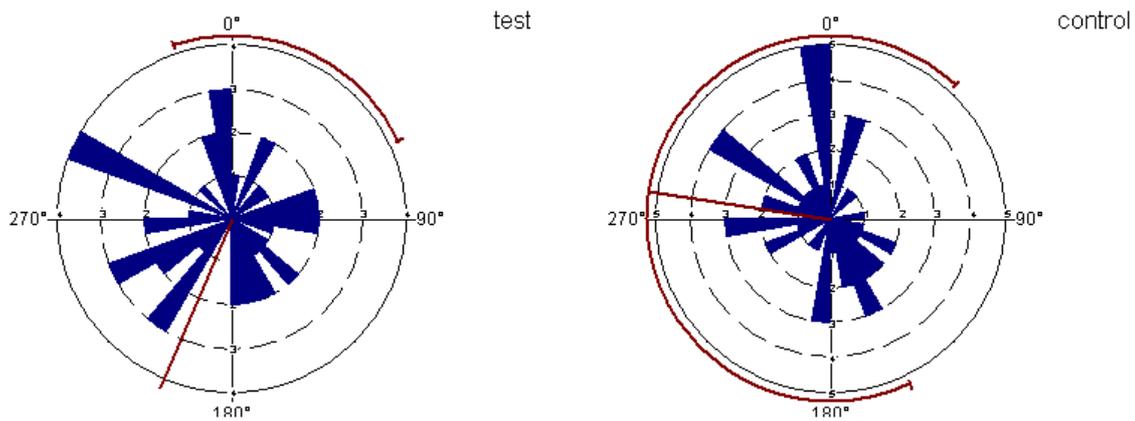


Abb. 7 In dieser Graphik sind die Richtungsverteilungen der Läufe mit reiner Luft (rechts) und Futtersaftgeruch (links) dargestellt. Rot ist der „mean vector“ der Richtung und die zirkuläre Varianz dargestellt (die 0° Richtung ist die Richtung gegen den Wind). Auch bezüglich der Laufrichtungen sind keine klaren Tendenzen auszumachen, sie weichen nicht signifikant von einer Zufallsrichtung ab.

3.1.2 Diskussion:

Vorzüge des Systems und technische Probleme:

- Die „open loop“ Bedingungen bieten eine gute Vergleichbarkeit der Bedingungen für alle Tiere. Auch die gute Aufzeichnungs- und Auswertsoftware (sehr hohe Auflösung und viele auswertbare Laufparameter) spricht für eine Verwendung der Kramerkegel.
- Die Umweltbedingungen für die *Varroa*, die Justierung der Anlage und die richtigen Stimulusparameter müssten nach verschiedenen Änderungen und altersbedingten Verschleisserscheinungen an der Anlage noch wiedergefunden und neu optimiert werden.
- Eine Optimierung der Anlage wurde versucht, hat aber noch nicht den gewünschten Erfolg gebracht. Eine weitere Optimierung scheint möglich, ist aber sehr zeitaufwendig und sprengt damit den Rahmen des vorliegenden Projektes.
- Eine Alternative könnte die geplante Anschaffung einer neuen modernen Laufkompensatorkegel mit kleinerem Durchmesser und Steuerung über ein Videosystem (ohne Reflektoren) bieten. Die neue Anlage ist aber wegen Verzögerungen bei der Entwicklung zur Zeit noch nicht verfügbar.

Eigenheiten des Versuchstieres und Nachteile des Laufkompensators:

- Die gebotene Versuchssituation scheint nicht optimal an die körperlichen und ökologischen Bedingungen der *Varroa* angepasst zu sein.
- *Varroa* ist kein Lauftier, genügend lange auswertbare Läufe sind deshalb nur unter wirklich optimalen Bedingungen zu erwarten.
- *Varroa* ist im Verhalten eher auf „Igelreaktion“ programmiert (unter dem Carapax verstecken und auf bessere Zeiten warten, als aktiv nach Duftquellen zu suchen).
- Die allgegenwärtige Motivationsproblematik bei Verhaltensversuchen tritt bei *Varroa* somit noch verschärft auf! Wahrscheinlich müssen die *Varroa* für Versuche in Reproduktionsstimmung sein, da sie in ihrem Lebenszyklus nur sehr selten und kurz ihren Wirt verlassen und sich dabei olfaktorisch orientieren müssen.

3.1.3 Schlüsse:

Aufgrund der Probleme mit den Kramer-Kugel-Resultaten wurde im Frühjahr beschlossen, die Futtersaft-Hypothese mit dem im Jahr 1999 entwickelten Absteigetest anzugehen.

4 PURGE AND TRAP ANALYSE

4.1.1 Einleitung:

Wir wollten die Geruchs-Komponenten von Bienen (Arbeiterinnen und Drohnen), Arbeiterinnen- und Drohnenlarven, sowie von Futtersaft aus verdeckelungsbereiten Drohnenzellen analysieren. Es besteht der Verdacht, dass sich die *Varroa* von flüchtigen Substanzen des Futtersaftes (eventuell auch ihren Abbauprodukten) anlocken lassen. Nach Literaturangaben sollte die Zusammensetzung des Futtersaftes in Arbeiterinnen- und Drohnenzellen die gleiche sein. Er ist aber in den Arbeiterinnenzellen in geringeren Quantitäten vorhanden und deshalb schwieriger rein und in genügender Menge zu gewinnen. Deshalb beschränkten wir uns auf die Analyse des Futtersaftes aus Drohnenzellen. Als Vergleich dienten Messungen an lebenden Arbeiterinnen- und Drohnenlarven, an lebenden Arbeiterinnen (50 pro Probe), lebenden Drohnen (25 pro Probe) und an Proben von kommerziell gesammeltem tiefgefrorenem Geleé royal.

4.1.2 Methode:

Für eine zuverlässige Analyse benötigten wir 3-5 Messungen mit je 1 ml Material beim Geleé royal und beim Drohnenfuttersaft und je 50 lebende Bienen (30 Drohnen) oder Larven. Der Drohnenfuttersaft wurde am Tag der Messungen mit einem kleinen Chromstahl-Wägespatel aus verdeckelungsbereiten Drohnenzellen herausgekratzt. Dazu wurden die Zellen mit einer Pinzette seitlich geöffnet und die Drohnenlarven vorsichtig (ohne sie zu verletzen) aus den Zellen herausgezogen. Die gleiche Prozedur diente auch dazu, lebende Larven zu gewinnen. Der gelbliche zähflüssige Futtersaft aus 30-50 Zellen, vereingigt ergab die benötigten 1 g Substanz für einen Messdurchgang.

Proben:

- 9 Proben von je 50 lebende Arbeiterinnen aus Volk 91 von Brutwabe abgesammelt mit CO₂ betäubt und in 25 ml Proben U-Rohr-Sparger ohne Fritte abgefüllt.
- 7 Proben von je 30 lebende Drohnen von Brutwabe abgesammelt mit CO₂ betäubt und in 25 ml Proben U-Rohr-Sparger ohne Fritte abgefüllt (Probe 1 und 3 ohne Betäubung). (Probe 1-5 Volk 91, Probe 6 und 7 Volk 28).
- 8 Proben von je 50 L5 Arbeiterinnenlarven > 100 mg aus den Völkern 33, 44, 59 und 91 aus Brutwaben gezupft und in 25 ml U-Rohr-Sparger ohne Fritte abgefüllt. Vor der Messung für 20 Min Sparger mit Larven in Wasserbad bei 34°C konditioniert.
- 10 Proben von je 50 L5 Drohnenlarven > 300 mg aus den Völkern 67, 79 und 90 aus Brutwaben gezupft und in 25 ml U-Rohr-Sparger abgefüllt. Vor der Messung für 20 Min Sparger mit Larven in Wasserbad bei 34°C konditioniert.
- 4 Proben von je 1g Geleé royal gelöst in 1 ml H₂O in 5 ml U-Rohr Purger-Sparger ohne Fritte.
- 3 Proben von je 1g Drohnenfuttersaft gelöst in 1 ml H₂O in 5 ml U-Rohr Purger-Sparger ohne Fritte.

Die meisten Arbeiterinnen und viele Drohnen waren nach dem Purgen mit N₂ nach Versuchsende nach einer kurzen Erholungszeit wieder flugfähig! Auch die meisten Larven überlebten die Messprozedur.

Extraction of the volatile components

The Purge and Trap system LSC 3100 (Tekmar, Cincinnati, OH, USA) included a 25-ml non-fritted sparger resp. 5 ml, a trap (No 1, Tekmar, (Tennax)) as well as a cryofocusing unit. The moisture control module was not used.

The operating conditions were as follows: purge gas: nitrogen; purge flow (vent): 30 ml/min; prepurge: 0 min; water bath: 34 °C; purge: 20 min; drypurge: 0 min; cap cool-down: -140 °C; desorb preheat to 210 °C; desorb: 4 min at 220 °C; inject: within 1 min from -140 to 220 °C; bake: 7 min at 230 °C; 6-port valve: 150 °C; line: 150 °C; capillary union heater (= transfer line from purge and trap to gas chromatograph): 150 °C.

Gas chromatography

A Hewlett-Packard (HP) 5890, Series II was used. The operating conditions were as follows: carrier gas: helium; inlet pressure: 50 kPa; flow: approx. 1.9 ml/min at 45 °C; transfer line (from GC to MS): 280 °C; interface: direct inlet; temperature programme: 13 min at 45 °C, heating rate: 5 °C/min up to 240 °C, and 5 min at 240 °C; capillary column: SPB1 sulfur (Supelco), 30m x 0.32 mm id., film thickness: 4 µm.

Detection

Two detectors were mounted in parallel by splitting the flow at the end of the capillary column (split ratio: approx. 1:1 at 45 °C), i.e. a Hewlett-Packard flame ionisation detector (FID) and a mass-sensitive detector (MSD model HP 5972), operating in the scan mode (TIC) from 26 to 250 amu at 1.1 scan/s, ionisation by EI at 70eV by autotuning; MS-Scan after 3.5 min. The MSD was used for the identification of the VOC, the FID for their relative quantification.

Die Messungen wurden zusammen mit Verena Kilchenmann und Roland Gauch im Frühsommer 1999 und 2000 durchgeführt. Die Daten sind tabelliert und die Peaks soweit möglich mit Hilfe der FAM-Datenbank und Literaturangaben identifiziert. Nicht identifizierte Peaks sind in den Tabellen mit Fragezeichen bezeichnet, bei unsicheren Angaben ist dem Substanznamen ein Fragezeichen beige gestellt. Die insgesamt 137 gefundenen Peaks aus allen Messungen zusammen wurden nach der RT (Retentionszeit) geordnet, durchnummeriert und die einander entsprechenden Peaks übereinander gelegt. Alle Peaks die kleiner als die 5-fache Höhe des Blindwertes der Probenreihe erreichten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

4.1.3 Resultate:

In der Tabelle im Anhang II sind die Resultate aus allen Messreihen zusammengestellt, die verschiedenen Kategorien sind farblich gekennzeichnet (lebende Arbeiterbienen (gelb), lebende Drohnen (rotbraun), Arbeiterinnenlarven (blau), Drohnenlarven (grün), Geleé royal (lila) und Drohnenfuttersaft (rosa)). Im Histogramm (Abb. 8) sind die FID-Peaks (Flammen-Ionisations-Detektor) in einer Übersichtsgraphik zusammengestellt. Die Farben im Histogramm entsprechen denen in der Tabelle im Anhang II. Der Anhang III zeigt dann die einzelnen Peaks als Boxplot-Grafik zum besseren Vergleich der Kategorien (worker = lebende Arbeiterinnen, drone = lebende Drohnen, w_larvae = lebende Arbeiterinnenlarven, d_larvae = lebende Drohnenlarven, r_jelly = kommerzieller Geleé royal/Weiselsaft, d_jelly = Drohnenfuttersaft aus L5 Drohnenzellen).

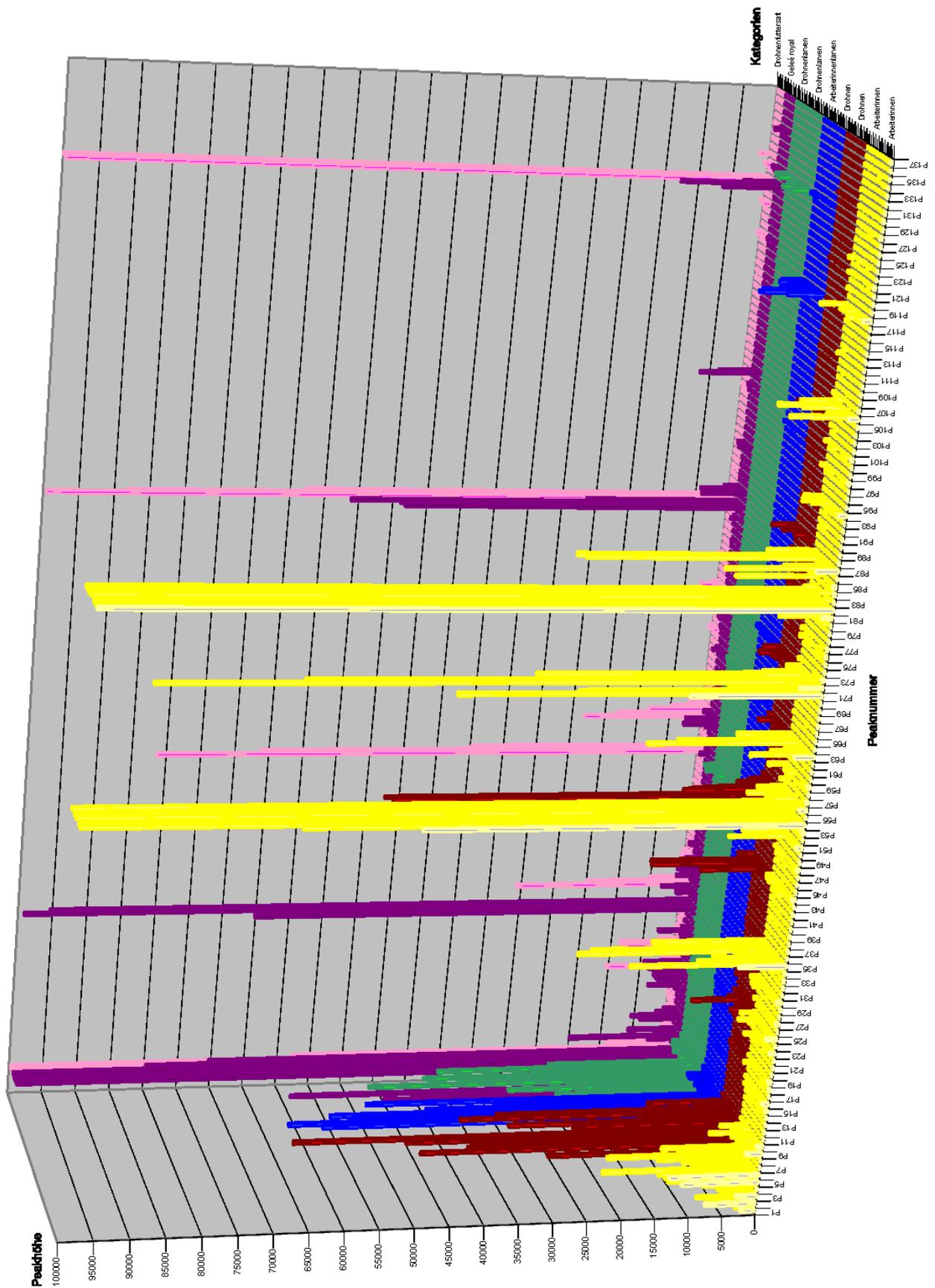


Abb. 8 Vergleichendes Histogramm der FID-Peakhöhen der insgesamt 137 verschiedenen Peaks aus GC-MS Chromatogrammen aus den „Purge an Trap“-Analysen von Arbeiterbienen (gelb), Drohnen (rotbraun), Arbeiterinnenlarven (blau), Drohnenlarven (grün), Geleé royal (lila) und Drohnenfuttersaft (rosa). Die Flüchtigkeit der Substanzen nimmt mit zunehmender Molekülgröße in Richtung höherer Peaknummern ab.

Kategorie	Anzahl Peaks	identifiziert	davon identifiziert mit ?
gesamt	137	117	48
Arbeiterinnen	58 (45)	53 (41)	22 (14)
Drohnen	41 (38)	39 (36)	8 (7)
Arbeiterinnenlarven	18 (17)	15 (14)	3 (3)
Drohnenlarven	21 (18)	19 (16)	6 (4)
Geleé royal	61 (58)	51 (53)	16 (14)
Drohnenfuttersaft	41 (39)	35 (33)	11 (9)

Tabelle 1 Anzahl der in den Chromatogrammen einer Kategorie gefundenen Peaks. Die Werte in den Klammern bedeuten, in mehr als der Hälfte der Chromatogramme einer Kategorie vorhandener Peak. Identifiziert mit ? bedeutet, dass entweder ein zu kleiner Peak die Identifikation unsicher machte, eine Seitengruppe nicht mit Sicherheit positioniert werden konnte, oder es sich um einen ungenügend aufgelösten mehrfach Peak handelt (für Details siehe auch Anhang II und III).

Die Arbeiterinnen und der Geleé royal zeigten die reichhaltigsten Chromatogramme, bei den Drohnenlarven hingegen liessen sich am wenigsten Stoffe nachweisen (Tabelle 1). Als Erklärung kann man annehmen, dass die Arbeiterinnen viele Geruchstoffe aus der Aussenwelt in den Bienenstock hineintragen. Ob hingegen die grosse Vielfalt beim kommerziellen Geleé royal eine Eigenschaft dieses Produktes ist, oder aus dem Herstellungsverfahren stammt bleibt offen.

In der Tabelle 2 wurde der Versuch unternommen, die Boxplots der Peaks aus den Chromatogrammen der FID-Analyse im Anhang III qualitativ hinsichtlich ihrem potentiellen Informationsgehalt zu bewerten. In diese Zusammenstellung sind nur die Verteilungsmuster der Peakhöhen, wie sie aus den Boxplots ersichtlich sind, eingeflossen. Die Tabelle 2 kann einige Hinweise geben, welche Peaks zwischen den Kategorien eine Differenzierung erlauben, oder ein im Hinblick auf die Präferenzen der *Varroa*-Milben interessantes Muster zeigen. In der Zusammenstellung der Tabelle 2 wurden Peaks, die nur bei den Arbeiterinnen oder nur beim Geleé royal vorkamen, weggelassen. Die Spalten zeigen Peaks die bei lebenden Arbeiterinnen, lebenden Drohnen, Arbeiterinnenlarven, Drohnenlarven und Drohnenfuttersaft auftraten. In der drittletzten Spalte von rechts wurde beurteilt, ob eine Differenzierung bezüglich dem Geschlecht und in der zweitletzten Spalte bezüglich dem Stadium (Adulttiere oder Larven) vorlag. In der letzten Spalte erfolgte eine qualitative Beurteilung des potentiellen Informationsgehaltes für die chemische Orientierung der *Varroa*, gemäss den aus anderen Versuchen bekannten Präferenzen. Für die Bewertung wurden folgende Kriterien herangezogen:

- Bevorzugung von Ammenbienen durch die phoretischen Milben
⇒ hoher Peak bei den Arbeiterinnen positiv bewertet
- Bevorzugung der Drohnenlarven gegenüber Arbeiterinnenlarven im Absteigetest
⇒ grosse Unterschiede in der Peakhöhe zwischen Arbeiterinnen- und Drohnenlarven positiv bewertet
- positiver Effekt des Drohnenfuttersaftes auf das Verhalten im Absteigetest
⇒ hoher Peak beim Drohnenfuttersaft positiv bewertet

Peak-Nr.	Arbeiterinnen	Drohnen	A-Larven	D-Larven	D-Futtersaft	Sex-	Stadium	<i>Varroa</i>
P1			+		++			
P2	++	+	++	+		++		
P3	+		++	+		+		
P6		+	+	+				
P9		++				+	+	
P11				+	++			+
P15	++		+	+	+	+		
P18	+	+			+++		+	
P19	+	+			+		+	
P20		+		+	++	+		
P21					++			
P23	+	+	+	+	+			
P25	+	+					+	
P26		+				+		
P27	++			+	+			++
P30		+			++	+		
P31				+				+
P33	+	+			++		+	
P34	+	+			++		+	
P36					+			
P39	+	++					+	
P40		++				+		
P42					+			
P43	+					+		
P44	+	+++				+		
P48	++		+			++		
P49				+	+++	+		+
P51	++	+		+		+	+	+
P53		+++				+		
P54	+++	+			+	+	+	
P55		+			++		+	
P57	+	+			+		+	
P60					+			
P61	+	++				+	+	
P63	++	+					+	
P64			++	+	+		+	
P66	+				++			
P67		+				+		
P68		+				+		
P69					+			
P70					+			
P72	++	+		+	+			+
P76	+	+			+		+	+
P81	++	+				+	+	
P83	+		+			+		
P84					++			

P85 Peak-Nr.	+ Arbeiterinnen	+ Drohnen	A-Larven	D-Larven	++ D-Futtersaft	Sex-	+ Stadium	<i>Varroa</i>
P88	++				+	+		
P95		+				+		
P99		+	++		+			
P104		+				+		
P105					+			
P111		+	+	+		+		
P114			+		++			
P116					+			
P117		+	++	+			+	
P119					+			
P122							+	
P123					+			
P125		+				+		
P126					+			
P128	+		+	++	+			+
P129					+			
P130	+	+					+	

Tabelle 2 Zusammenstellung der Muster im Auftreten der Peaks im Vergleich der Kategorien nach den Boxplots im Anhang III. Die Peakhöhe wurde mit +, ++ oder +++ gewichtet. In den Spalten 1-5 wurde die Peakhöhe in den Kategorien lebende Arbeiterinnen, lebende Drohnen, Arbeiterinnenlarven, Drohnenlarven und Drohnenfuttersaft gewichtet. In den drei letzten Spalten ist angegeben, ob das Verteilungsmuster der Peaks (Anhang II und III) mit dem Geschlecht, dem Stadium (Adult oder Larve) oder den Präferenzen der *Varroa* korreliert. Peaks die nur in einzelnen Chromatogrammen, nur im Geleé royal oder nur bei den Arbeiterinnen auftraten, wurden weggelassen, da sie für unsere Fragestellungen nur eine geringe Aussagekraft haben.

Diese qualitativen Bewertungen wurden in der Tabelle 2 in drei Stufen durch +, ++ oder +++ gekennzeichnet. Die chemischen und biologischen Eigenschaften der Stoffe wurden in diesem ersten Schritt noch nicht berücksichtigt. Spalten in der Tabelle im Anhang II, die in den Boxplots im Anhang III ein Muster in der Verteilung der Peakhöhen zeigen, das potentiell eine Unterscheidung der von *Varroa* bevorzugten Kategorien gegenüber den anderen erlauben würden, sind dort, entsprechend der Bewertung in der letzten Spalte in der Tabelle 2, farbig unterlegt. Es handelt sich um die folgenden Peaks:

P11 = ?	P27 = Hexane und Acetic acid, ethyl ester
P31 = Furan, tetrahydro ?	P49 = 2-Butanone, 3-hydroxy
P51 = Heptane	P72 = Octane
P76 = 1-Pentanol, 3- methyl- ?	P128 = Bezoic acid, methylester ?

4.1.4 Diskussion:

Diese Zusammenstellung soll als Datenbank für mögliche Stoffe dienen, die *Varroa* zur Orientierung benutzen könnte. Die chemische Natur der aufgelisteten Komponenten ist noch nicht gewichtet. Ob und welche der Stoffe von *Varroa* wahrgenommen werden

können oder eine biologische Bedeutung als Pheromone oder Kairomone haben könnten, muss noch abgeklärt werden.

5 OLFAKTOMETERTEST UND HOHENHEIM WAHLTEST

5.1 Olfaktometertest

5.1.1 Einleitung:

Ziel der Versuche war es abzuklären, ob im Drohnenfuttersaft Komponenten vorhanden sind, die auf *Varroa*-Milben anziehend wirken. Mit einem einfachen flachen Olfaktometer (ähnlich den Windkanalversuchen von P. Blumer) wurde eine technisch einfachere Alternative zur Kramerkugel getestet (Versuchsapparatur siehe Abb. 9). Sie hatte sich für *Drosophila*-Larven bewährt. Die Versuchsanordnung wurde von oben mit einer Videokamera gefilmt und die Laufspuren der Milben auf dem Bildschirm auf Transparentfolien übertragen und auf eine Beeinflussung der Laufrichtung durch den Duftstimulus ausgewertet.

5.1.2 Methode:

Stimuli: 20 (7.7.2000) oder 30-40 (13.7.2000) lebende Bienen in 100 ml Zylinder) 25 Drohnenlarven in 50 ml Erlenmeyerkolben (gesammelt am 5. 07.2000) und die Luft über den Larven mit einer elektronisch gesteuerten Stimulusapparatur in den kontinuierlichen Hauptluftstrom im Olfaktometer eingeblasen. Das Ziel war, eine V-förmige Duftfahne zu erzeugen.

Setup: Versuchsschema:

- 1 Min. Kontrolle
- 1 Min. Stimulus gepulst
- 1 Min. Kontrolle
- 1 Min. Stimulus kontinuierlich
- 1 Min. Endkontrolle (Kontrolle keine Luft durch Pasteurpipette, besser wäre Reinluft!!!)

Versuchsparameter: Raumluft in Klimakammer: ca. 28°C 40%RH

Hauptluftstrom: ca. 0,1 m/s

Stimulusgenerator: 64x0,1 Sek. Puls mit 0,5 Sek Intervall
oder 1 Min kontinuierlich
50 ml/Min. oder 92 ml /Min.

5.1.3 Resultate:

Bei der nachträglichen Überprüfung der Strömungsverhältnisse, durch sichtbar machen der Duftwolke, wurden beim ersten Ansatz chaotische Strömungsverhältnisse durch das Gebläse beobachtet. Sie konnten durch ändern der Parameter nicht behoben werden.

Durch Saugen am Ausgang anstatt Blasen in den Eingang konnte beim 2. Versuch (Abb. 9) eine definierte schmale V-förmige Duftwolke erzeugt werden.

Beide Versuche ergaben:

- Relativ lange Läufe, aber nur sehr wenige davon in Richtung zur Duftquelle
- Keine systematische Richtungsänderung beim Wechsel von Kontrolle zu Stimulus, weder bei Drohnenlarven, noch bei lebenden Bienen

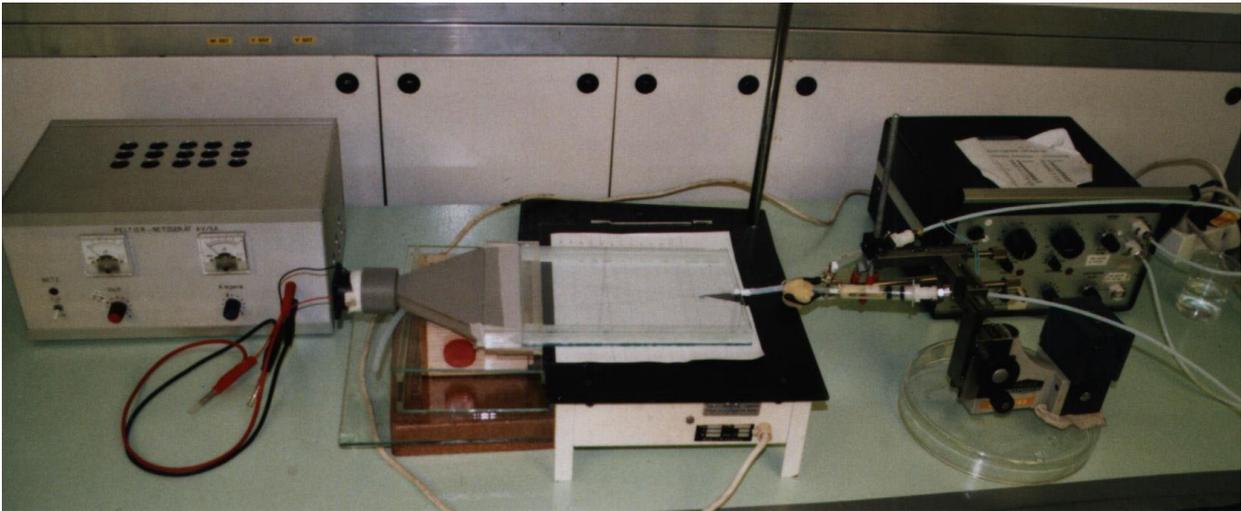


Abb. 9 Versuchsaufbau des flachen Olfaktometers. Rechts sieht man die Stimulusapparatur, die über 5 Milliliter Spritzen mit Stimulusmaterial oder Reinluft einen Geruchsstimulus in den kontinuierlichen Luftstrom einblasen, und links den Ventilator mit Trichter, der die Luft durch die Apparatur saugt.

5.1.4 Diskussion:

Die „Closed loop“ Bedingungen, wo das Tier seine Position relativ zur Duftquelle im Gegensatz zu den „Open Loop“ Bedingungen auf der Kramerkugel selber bestimmen kann, scheinen für die Laufmotivation besser zu sein. Dieser Vorteil geht aber auf Kosten der Vergleichbarkeit der Bedingungen für alle Tiere.

Eine gute Auswertung setzt ein Videotrackingssystem voraus (relativ aufwändig).

Die Umweltbedingungen für die *Varroa*, und die richtigen Stimulusparameter müssten erst gefunden werden. (Die Windkanalversuche von P. Blumer und verschiedene Bemühungen in Hohenheim und Holland zeigten die dabei auftretenden Schwierigkeiten auf). Kühnen und Calderone (1998) hatten Erfolg mit einem vergleichbaren Aufbau. Das in Neuenburg vorhandene Olfaktometer scheint ungeeignet und ein Um- oder Neubau, aufbauend auf den Erfahrungen von Kühnen und Calderone (1998), müsste für eine Weiterführung der Versuche ins Auge gefasst werden. Eine Alternative könnte der Hohenheim Wahltest darstellen. Im übrigen gelten die gleichen Nachteile bezüglich der Ökologie von *Varroa* wie beim Laufkompensator, der Kramerkugel.

5.2 Hohenheim Wahltest

Der in Hohenheim von P. Rosenkranz entwickelte Wahltest (siehe Dissertation Pia Au-meier) wurde in Bern nachgebaut und durch Vorversuche evaluiert. Nach keinen Reak-tionen auf Futtersaft in den Vorversuchen, wurde dem von uns entwickelten Absteige-test der Vorzug gege-ben und die Option Hohenheim-Wahltest zurückgestellt. Die Testapparatur steht in zwei Prototypen in Bern zur Verfügung.

test der Vorzug gege-ben und die Option Hohenheim-Wahltest zurückgestellt. Die Testapparatur steht in zwei Prototypen in Bern zur Verfügung.

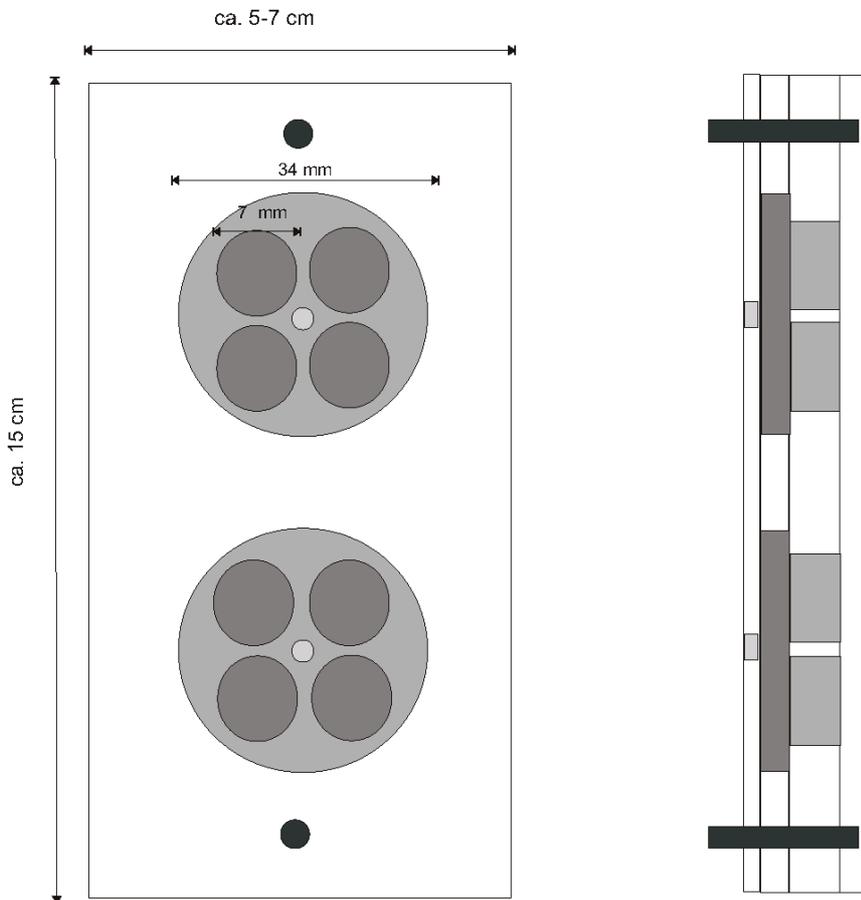


Abb. 10 Bauplan für den Nachbau des Hohenheimer Wahltestapparates

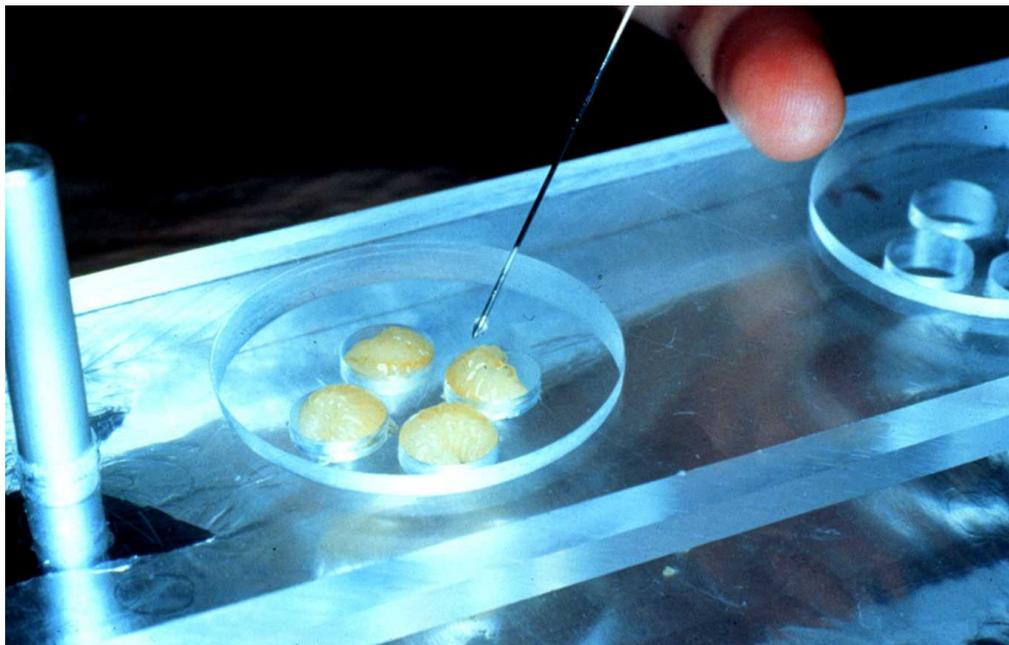


Abb. 11 Hohenheimer Wahltestapparatur mit Larven als Stimulus (Foto P. Rosenkranz)

6 ABSTEIGETEST

Die ektoparasitische Milbe *Varroa destructor* befiel ursprünglich nur die asiatische Honigbiene, *Apis cerana*, ist aber heute nach einem Wirtswechsel eine weltweite Bedrohung für die europäische Honigbiene, *Apis mellifera*. Weibliche *Varroa*-Milben befallen sowohl die erwachsenen Bienen als auch deren Larven. Die Fortpflanzung der Milben findet hingegen ausschliesslich in den verschlossenen Brutzellen der Honigbienen statt. *Varroa* ist für das Absteigen von den Ammenbienen auf ein enges Zeitfenster limitiert. Wenn sie zu früh absteigt wird die *Varroa* von den Ammenbienen erkannt und die Zellen ausgeräumt. Es wird angenommen, dass sich die Milben bei ihrem Abstieg von den Ammenbienen auf die Larven zumindest teilweise von Geruchstoffen leiten lassen. Die Trophallaxe, der soziale Futteraustausch, spielt eine zentrale Rolle in der Sozialorganisation und im Informationsaustausch im Bienenvolk.



Abb. 12 Trophallaxe, sozialer Futteraustausch im Bienenvolk



Abb. 13 Weiselzelle mit Larve im Futtersaft

Dieses Verhalten legt nahe, dass der Futtersaft als Auslöser für das Absteigeverhalten eine Rolle spielen könnte. Vielleicht bildet er auch eine chemische Tarnung für die *Varroa* in den entscheidenden Stunden vor dem Verdeckeln der Larvenzellen.

Drohnenzellen scheinen aber ca. 8 mal attraktiver für die Milben zu sein als die Arbeiterinnenzellen. Sie enthalten aber auch mehr Futtersaft und werden über eine längere Zeit versorgt als die Arbeiterinnenzellen. Sind vielleicht bestimmte Substanzen, zum Beispiel Abbauprodukte im Weiselsaft für *Varroa* attraktiv? Es ist bekannt, dass Zecken und Milben oft auf schwefelhaltige Proteinabbauprodukte reagieren. Die grössere Menge an Weiselsaft und längere Versorgungszeit der Drohnenzellen könnte Abbauprozesse fördern und die Qualität des Weiselsaftes beeinflussen. Das Vorhandensein von Weiselzellen scheint den Befallsgrad der Waben zu fördern. Andererseits scheinen die Weiselzellen selbst weniger von *Varroa*-befall betroffen zu sein (Harizanis P. C. 1991).

Das Ziel dieser Versuche war, einen einfachen Verhaltentest zu entwickeln, um das Abstiegsverhalten der Milben auf die Brutzellen quantitativ zu erfassen, und zu prüfen, wieweit dabei Geruchskomponenten eine Rolle spielen. Für eine gute Reproduzierbarkeit soll der Test möglichst einfach gehalten werden und nahe bei den Stockbedingungen bleiben und die folgenden Fragen beantworten:

- Sind die Ammenbienen bei der Auslösung dieses Verhaltens entscheidend mitbeteiligt?
- Geht die Verhaltensausslösung von Gerüchen aus den Larvenzellen aus?
- Spielen die Menge und die Qualität des Weiselsaftes in den Brutzellen für die Auslösung des Abstiegsverhaltens eine Rolle?

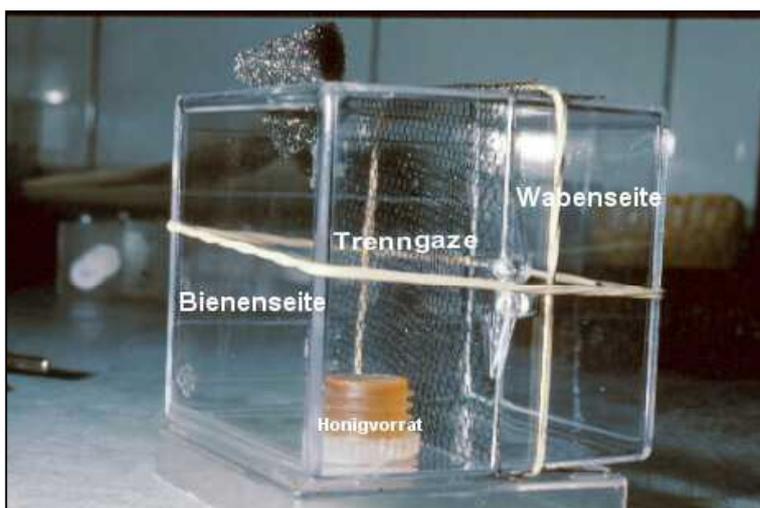


Abb. 14 Polystyrol-Kästchen, 5x5x5 cm, mit Trenngitter von 3 mm Maschenweite zwischen der Bienen- und der Wabenseite für den Abstiegstest.

6.1.1 Methode:

Der Test wurde in einem in der Mitte durch eine Kunststoffgaze vertikal geteilten transparenten Polystyrolkästchen im Brutschrank durchgeführt. Die eine Hälfte enthielt die mit *Varroa* infizierten Donatorbienen, die andere die Akzeptorbrut oder entsprechend der Fragestellung manipulierte Brutzellen (Drohnenbrut, Arbeiterinnenbrut, leere Zellen, Futtersaft u.s.w.). Dazu wurden in ein Plexiglkästchen von 5x5x5 cm (Abb. 14) in der einen Hälfte 25 von *Varroa* befallene und 25 varroafreie Bienen aus einem *Varroa*-Volk eingesetzt (Abb. 15) und in die andere Hälfte ein varroafreies Wabenstück eingefügt (Abb.16).

Nach 24 h im Brutschrank bei 32°C wurden die Tiere in den Kästchen mit CO₂ betäubt und anschliessend tiefgefroren, um den Aufenthaltsort der Milben für die Auswertung festzuhalten. Als Mass für den Abstieg der Milben von den Trägerbienen diente derjenige Anteil der *Varroa*, der sich bei Versuchsende in der Wabenhälfte des Testkästchens oder – als zweites schärferes Kriterium – diejenige Untergruppe der Milben, die sich in einer Larvenzelle befand. Die Methodik und die Ergebnisse dieser Versuche sind ausführlich im Bericht „Vorversuche zur biologischen *Varroa*-bekämpfung, D. Gester und Ch.

Abb. 15 Einfüllen der befallenen Bienen ins Testkästchen





Strub“ für 1999 und in der Veröffentlichung „Odour-mediated transfer to brood cells of its honeybee host, *Apis mellifera*, and olfactory cell responses of *Varroa destructor* to volatiles“ für die ganze Periode dargestellt. Deshalb folgt hier nur eine kurze Zusammenfassung und ein Ausblick auf offene Fragen.

Abb. 16 Testkästchen mit Akzeptorbrutwabe und Bienen.

6.1.2 Resultate:

6.1.2.1 Ergebnisse der ersten Vorversuche

Mit zwei Serien von je 5 Ansätzen, die für 2,5 h, 5 h, 10 h, 20 h und 40 h im Brutschrank blieben, wurde eine geeignete Versuchsdauer ermittelt. Bei den letzten beiden Ansätzen begannen sich einige der älteren Maden in den unverdeckelten Zellen einzuspinnen, andere hingegen waren schon nach 5 Stunden aus den Zellen herausgekrochen, wenn das Gazegitter zuwenig Widerstand bot. Es wurde eine möglichst lange Versuchzeit gewählt um den *Varroa* genügend Zeit zum Absteigen zu lassen, aber eine Dauer von 24 h erwies sich als ein guter Kompromis um die Ausfälle bei den Larven trotzdem gering zu halten. Um ein Herauskriechen der Larven zu vermeiden, muss das Trenngitter straff gespannt sein und satt an der Wabenoberfläche anliegen

6.1.2.2 Effekt des Trenngitters

Ein Kunststoffgitter mit 3 mm Maschenweite zwischen den Bienen und der Wabe mit der verdeckelungsbereiten Brut hatte keinen Einfluss auf die Absteigerate (Abb. 17).

Absteigetest: Vergleich mit und ohne Trenngitter, 1. Serie Mai

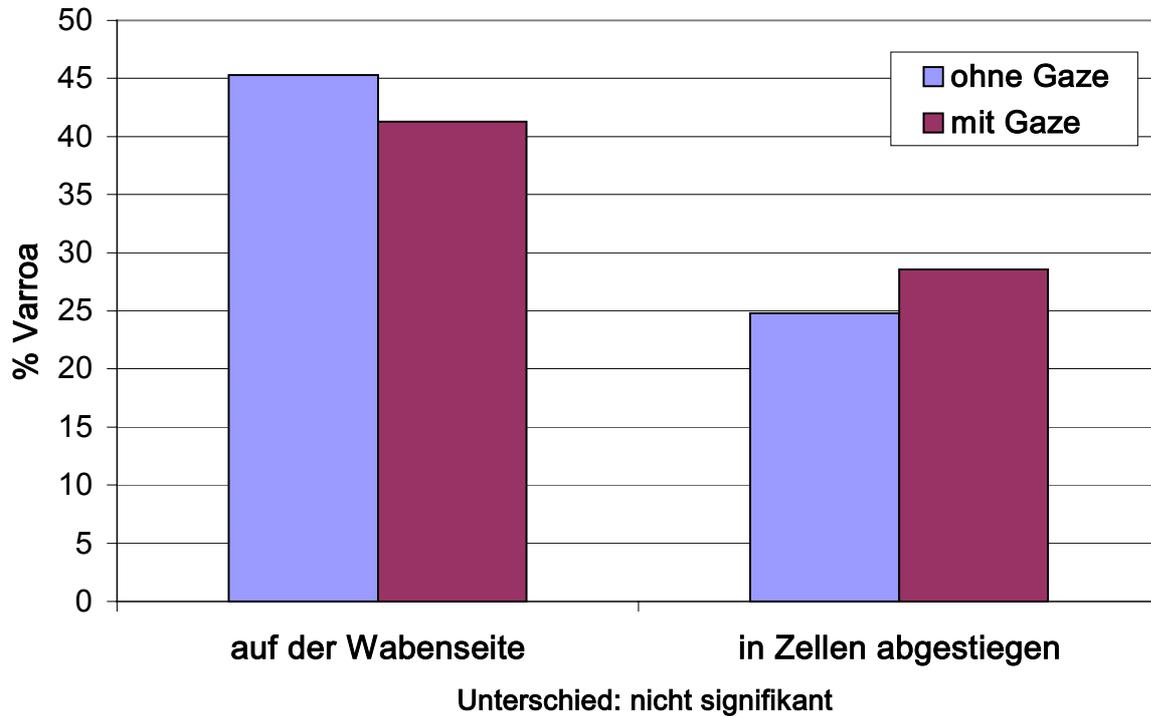


Abb. 17 Prozentsatz der *Varroa* die in den Kästchen mit und ohne Trenngitter auf die Wabenseite wechselten oder in die Larvenzellen eindrangen. Die Zahl der *Varroa* auf der Wabenseite und in den Brutzellen war in beiden Kästchentypen nach 24 Stunden gleich hoch: *Varroa* auf der Wabenseite (Mai tests: N=6, t-test, P=0.89; Juni tests: N=6, t-Test, P=0.32) und *Varroa* in den Zellen (Mai tests: N=6, t-test, P=0.31; Juni test: N=6, t-Test, P=0.15). Der Anteil der *Varroa* auf der Wabenseite des Kästchens war etwa derselbe im Mai und im Juni (27 *Varroa* von 54 in 6 Kästchen ohne Trenngitter und 26 *Varroa* von 63 in 6 Kästchen mit Trenngitter im Mai; 42 *Varroa* von 131 in 6 Kästchen ohne Trenngitter und 60 *Varroa* von 137 in 6 Kästchen mit Trenngitter im Juni).

6.1.2.3 Unterschied Drohnenlarven-Arbeiterinnenlarven

In den Kästchen mit Trenngitter war die Absteigerate signifikant höher, wenn eine Wabe mit Drohnenbrut, anstatt einer Wabe mit Arbeiterinnenbrut, angeboten wurde (Abb. 18).

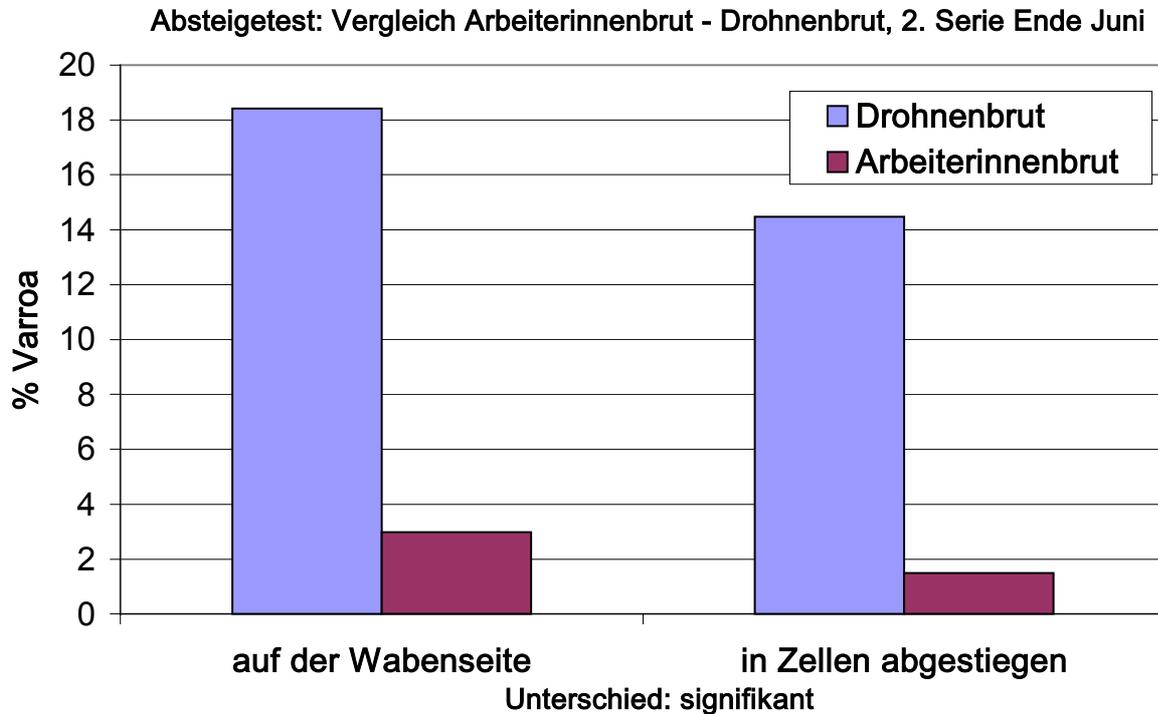


Abb. 18 Prozentsatz der *Varroa* die in den Kästchen mit Arbeiterinnen- und Drohnenlarven auf die Wabenseite wechselten oder in die Larvenzellen eindrangten. In beiden Testserien (Anfang Juni mit 5 Kästchen und Ende Juni mit 6 Kästchen) wurden bei den Drohnenbrut-Kästchen signifikant mehr *Varroa* auf der Wabenseite gezählt (zweiseitiger T-test, $P < 0.01$ in beiden Serien): *Varroa* auf der Wabenseite (Anfang Juni Tests: 5 Kästchen, 2 mit Arbeiterinnenlarven, 3 mit Drohnenlarven; Ende Juni Tests: 6 Kästchen, 3 mit Arbeiterinnenlarven, 3 mit Drohnenlarven) und *Varroa* in den Zellen (Mai tests: $N=6$, t-test, $P=0.31$; Juni test: $N=6$, t-test, $P=0.15$). Mit dem strengeren Kriterium, der Anzahl *Varroa* in den Larvenzellen, war der Unterschied nur noch in der ersten Serie signifikant (zweiseitiger t-Test, $P < 0.01$), aber nicht mehr in der zweiten Serie Ende Juni (zweiseitiger t-Test, $P < 0.10$). Der Anteil der *Varroa* die die Bienen verliessen, war Ende Juni nur 11% verglichen mit 34% Anfang Juni (38 *Varroa* von 82 auf Drohnenbrut in 3 Kästchen und 4 *Varroa* von 42 auf Arbeiterinnenbrut in 2 Kästchen Anfang Juni und 14 *Varroa* von 76 auf Drohnenbrut in 3 Kästchen und 2 *Varroa* von 67 auf Arbeiterinnenbrut in 3 Kästchen Ende Juni).

6.1.2.4 Einfluss des Futtersaftes

Ein Stück leere ausgebaute Wabe konnte die *Varroa* nicht zum Verlassen der Bienen bewegen (Abb.19). Hingegen führten zuvor bebrütete Waben mit nur Futtersaft (Zellen mit frisch ausgezupften Arbeiterinnenlarven) zu einer Absteigerate zwischen derjenigen von Kästchen mit lebenden Arbeiterinnenlarven und Kästchen mit leeren Zellen (Abb. 19). Die Ergebnisse dieser Versuchserie wurden in Form eines Posterbeitrages am Treffen der europäischen Sektionen der IUSI (Internatiol Union for the Study of Social Insects) in Berlin vorgestellt.

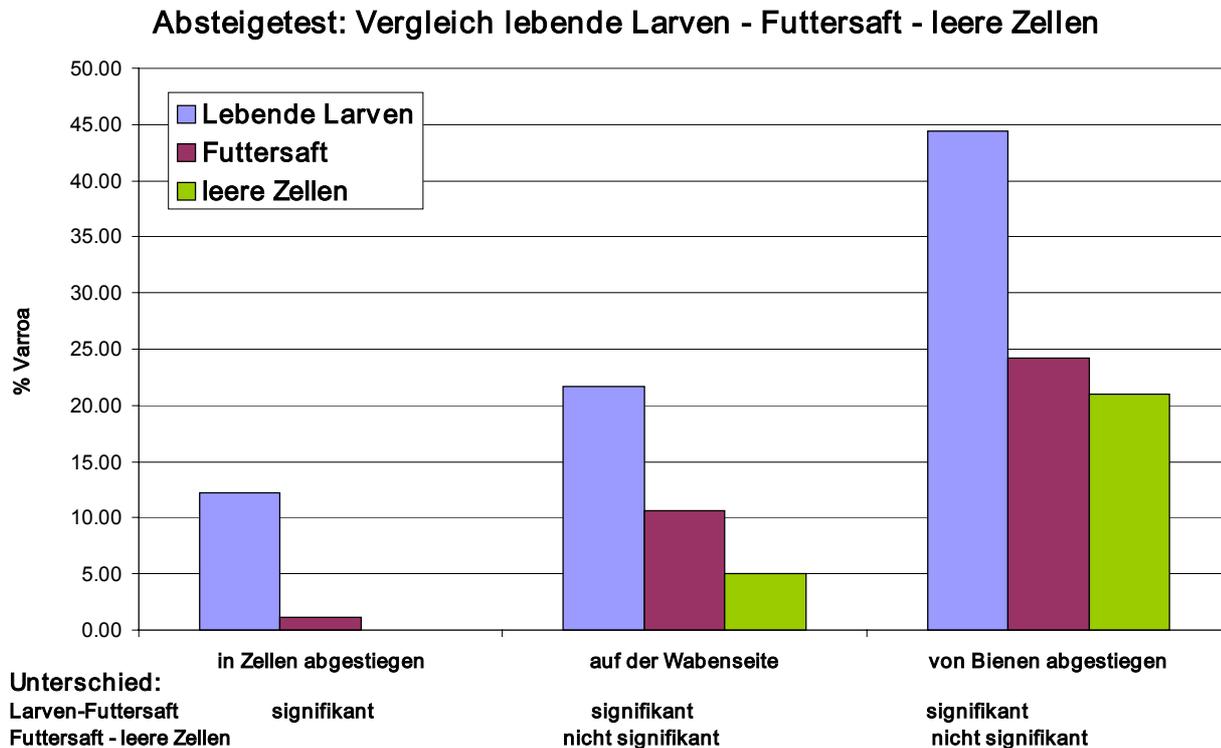


Abb. 19 Prozentsatz der *Varroa* die in den Kästchen mit Arbeiterinnenlarven, mit Drohnennuttersaft (Brutwaben bei denen die Larven vorsichtig mit einer Pinzette ausgezupft wurden und nur der Futtersaft in den Zellen verblieb) oder leeren Zellen von den Bienen abstiegen und der Anteil davon die auf die Wabenseite wechselten oder in die Larvenzellen eindringen. Dargestellt sind die zusammengefassten Daten aus 9 Testserien im Sommer 1999 und 2001 (28 Kästchen mit arbeiterrinnenbrut, 8 Kästchen mit Drohnennuttersaft und 10 Kästchen mit leeren Zellen). Es bestand ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der *Varroa* die auf die Wabenseite wechselten, sowohl zwischen den Kästchen mit Arbeiterinnenbrut und den Kästchen mit Drohnennuttersaft (zweiseitiger t-Test, $P < 0.002$) als auch zwischen den Kästchen mit Drohnennuttersaft und den Kästchen mit leeren Zellen (zweiseitiger t-Test, $P < 0.017$).



6.1.2.5 Tastversuche Insektenleim

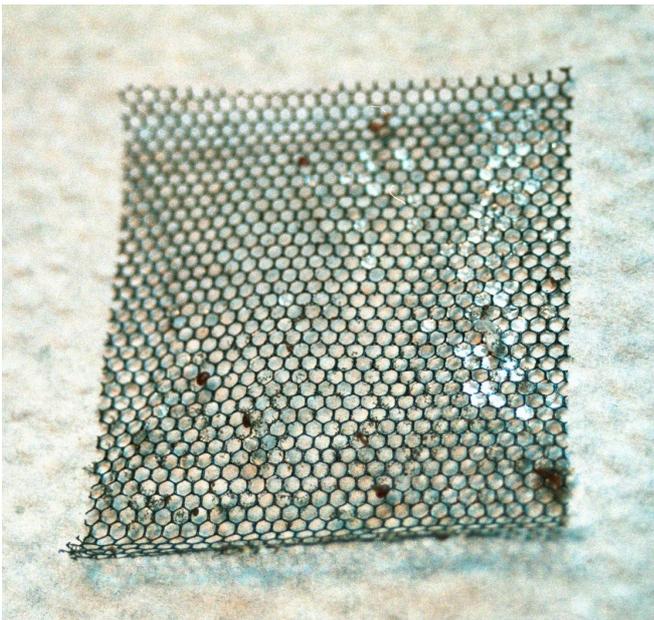


Abb. 19 Kästchen mit Doppelgitter-Leimfalle und betäubten Bienen nach dem Versuchsende. Oben, Kästchen mit Wabe mit Arbeiterinnenlarven, die mit einem mit Insektenleim bestrichenen Gitter dedeckt ist. Die Wabe wurde auf der Rückseite um 0,5 cm verkürzt, so dass zwischen dem Leimgitter und dem Trenngitter zur Bienenseite ein PVC-Spann- und Abstandsring eingesetzt werden konnte. Links Leimgitter nach dem Test mit festgeklebten *Varroa*-Milben.

Um Herauszufinden, ob bei den Testskästchen mit herausgezupften Larven und nur Futtersaft oder leeren Zellen, die *Varroa*-Weibchen in der für sie unbefriedigenden Situation in den Brutzellen wieder auf die Ammenbienen zurückkehren, wurden am Ende der Versuchssaison 2001 Tastversuche mit zu Leimfallen umgebauten Testkästchen durchgeführt. Die Akzeptorwaben wurden dazu auf der Rückseite um 0.5 cm verkürzt und nach dem Einsetzen ins Kästchen mit einem mit Insektenleim (Andermatt Biocontrol) bestrichenen Trenngitter abgedeckt (Abb. 20 oben). Ein PCV-Abstands- und Befestigungsring von 0.5 cm Breite zwischen dem Leimgitter und dem Trenngitter zur Bienenseite hinderte die Bienen mit ihren Extremitäten mit der Leimfalle in Kontakt zu geraten. Der Abstand zwischen den beiden Gittern stellte für *Varroa* kein Hindernis dar. Die gefangenen Milben waren zufällig über das Leimgitter verteilt (Abb. 20 links) und nicht auf den Rand konzentriert.

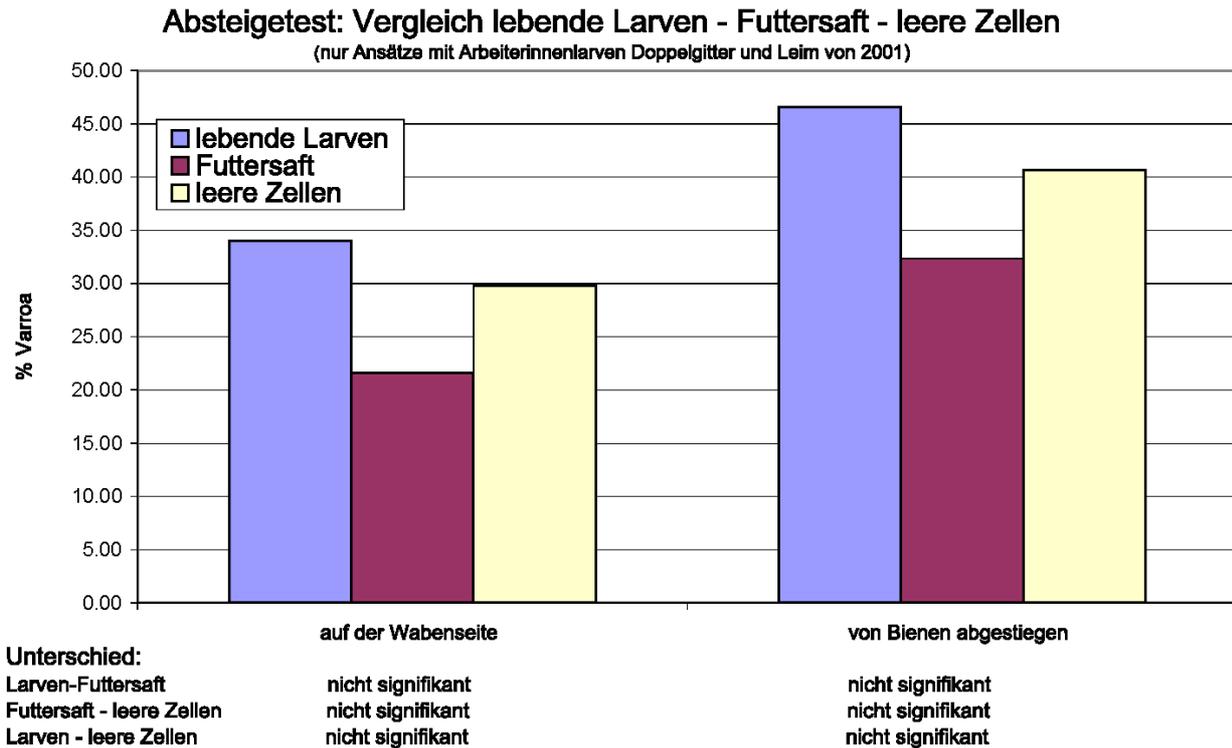


Abb. 20 Tastversuche mit Kästchen mit Doppelgitter und Insektenleim. Prozentsatz der *Varroa* die in den Kästchen mit Arbeiterinnenlarven und leeren Zellen auf dem mit Insektenleim bestrichenen Gitter auf der Wabenseite kleben blieben. Dargestellt sind die zusammengefassten Daten aus 2 Vorserien (10 Kästchen mit Arbeiterinnenlarven, Doppelgitter und Leim und 6 Kästchen mit leeren Zellen, Doppelgitter und Leim) Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der *Varroa* auf dem Leimgitter zwischen den Kästchen mit Arbeiterinnenbrut und den Kästchen mit leeren Zellen (zweiseitiger t-Test, $P < 0.002$).

6.1.3 Diskussion:

In den Kästchen mit Trenngitter war die Absteigerate signifikant höher, wenn eine Wabe mit Drohnenbrut, anstatt einer Wabe mit Arbeiterinnenbrut angeboten wurde. Ein Stück leere ausgebaute Wabe konnte die *Varroa* nicht zum Verlassen der Bienen bewegen, hingegen führten zuvor bebrütete Waben mit nur Futtersaft (Zellen mit frisch ausgezupften Arbeiterinnenlarven) zu einer Absteigerate zwischen derjenigen von Kästchen mit lebenden Arbeiterinnenlarven und Kästchen mit leeren Zellen.

Ein Zusatzversuch diente demselben Vergleich der Absteigerate zwischen Kästchen mit Waben mit lebenden Larven und Waben mit leeren Zellen, aber diesmal mit Kästchen mit Doppelgitter (Abb. 20). Bei diesen Kästchen hinderte das auf der den Waben zugewandten Seite mit Insektenleim bestrichene Gitter die Milben am Zurücksteigen auf die Ammenbienen. Mit dieser Anordnung zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Kategorien mehr (Abb. 21). Das deutet darauf hin, dass die *Varroa* sehr viel mobiler als erwartet sein könnte. In beiden Fällen, den Zellen mit lebenden Arbeiterinnenlarven und den leeren Zellen, sind ca. 30% der Milben innert 24 Stunden auf der Leimfalle hängen geblieben. Vielleicht ist dieser Prozentsatz der Tiere unabhängig von der äusseren Reizsituation immer abstiegsbereit (physiologischer Zustand der Milbenweibchen?) und

sucht aktiv nach geeigneten Brutzellen. Die *Varroa* würde dann, je nach dem Angebot an vorhandenen Brutzellen, entscheiden, in einer Zelle zu bleiben oder auf die Ammenbienen zurückzusteigen. Bei den Ansätzen mit einer Leimfalle würden jedoch alle diese mobilen Milben abgefangen. Ein Kontrolltest soll abklären, ob der Insektenleim selbst das Verhalten der Milben beeinflusst.

Eine solche Hypothese stellt die Annahme einer olfaktorischen Orientierung der Milbenweibchen grundsätzlich in Frage. Auch eine rein gustatorische Orientierung oder eine Kombination verschiedenster Orientierungsfaktoren kann unter dieser Hypothese zur Erklärung der bisherigen Resultate nicht mehr ausgeschlossen werden. Deshalb muss diese Hypothese mit einer geeigneten Testanordnung und statistisch auswertbarem Datenmaterial unbedingt geprüft werden, um die bisherigen Resultate abzusichern und sinnvoll einzuordnen.

Mit einem zusätzlichen Kontrolltest ist ebenfalls abzuklären, ob der Futtersaft allein für die Verhaltensreaktion der *Varroa* verantwortlich ist, oder weitere Faktoren aus den Brutzellen für die Auslösung des Absteigeverhaltens oder den Entscheid in den Brutzellen zu bleiben hauptverantwortlich oder zumindest mitbeteiligt sind. Die Zellen mit frisch herausgezupften Larven könnten noch Erkennungsfaktoren enthalten, die direkt von den Larven oder ihnen Stoffwechselprodukten stammen. Falls sich Futtersaft als verhaltenswirksam erweist, bleibt mit einem geeigneten Test zu prüfen, ob sich diese Wirkung auch unter den komplexeren Bedingungen im gesamten Bienenvolk immer noch nachweisen lässt.

7 STAND DES PROJEKTES

Eine wissenschaftliche Publikation zur Thematik, sie verbindet die Ergebnisse der Elektrophysiologie mit den Verhaltenstests, wurde unter dem Titel „Odour mediated transfer to brood cells of its honeybee host, *Apis mellifera*, and olfactory cell responses of *Varroa destructor* to volatiles“ zur Veröffentlichung eingereicht.

Ein Ziel des Projektes war es abzuklären, wieweit sich die Kombination von Elektrophysiologie und Gaschromatographie zum Aufspüren von Orientierungsstoffen einsetzen lässt. Mit den elektrophysiologischen Ableitungen konnte gezeigt werden, dass die Milbe volatile Stoffe wahrnehmen und darauf reagieren kann. Die Methode ist aber sehr anspruchsvoll und stösst bei den ausserordentlich kleinen Sensillen der Milben an ihre technischen Grenzen. Nach Rücksprache mit verschiedenen Spezialisten auf dem Gebiet, hat es sich gezeigt, dass die Methode für ein grösser angelegtes Screening nach Erkennungsstoffen zu aufwändig ist. Deshalb wurde beschlossen die vielversprechende Hypothese, dass der Futtersaft bei der *Varroa*milbe eine Bedeutung im Orientierungszusammenhang besitzt, im Verhaltenstest zu überprüfen. Futtersaft spielt im Rahmen der Trophallaxe, dem Nahrungs- und Informationsaustausch bei sozialen Insekten, im Bienenvolk eine zentrale Rolle. *Varroa* könnte auf diesem Informationskanal parasitieren. In der Phase der Optimierung und Weiterentwicklung der Testverfahren zur biologischen Wirksamkeit von flüchtigen Orientierungssubstanzen (Kramerkugel-Tests, Olfaktometer-Test Evaluation, Einführung des Hohenheimer-Wahltests) ergaben Versuche anderer Gruppen (Nazzi et al., 2001) mit dem bei unseren Projektpartnern in Hohenheim entwickelten Wahltest erste Hinweise auf eine Verhaltensbeeinflussung der *Varroa* durch den Arbeiterinnenfuttersaft der Bienen. Deshalb schien es zweckmässig im Sinne einer Arbeitsteilung mit unseren Partnern direkt die nächste Projekt-Phase anzugehen. Der Abstiegstest als Vorstufe zur Erprobung von Orientierungsstoffen im Bienenvolk, konnte erfolgreich weiterentwickelt und eingesetzt werden.

Dem Projekt-Ziel die Frage genauer zu beantworten, auf welche Weise die Milben die richtigen Brutwaben mit Larven im für die Reproduktion der *Varroa* geeignetem Entwicklungsstadium finden, sind wir einen grossen Schritt näher gekommen. Dass dabei chemische Orientierungsstoffe beteiligt, sind konnte nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass der Bienen-Futtersaft dabei eine Rolle spielt.

Das Ziel ins olfaktorische Kommunikations- und Orientierungssystem der *Varroa*milben einzugreifen, um sie beim Aufsuchen der Wirtszellen zu stören oder fehl zu leiten und auf diese Weise die Reproduktion der Milben in den Brutwaben zu hemmen (biologische Bekämpfung) ist greifbarer geworden.

Die letzten Tastversuche haben aber einige grundsätzliche Fragen zum Orientierungssystem der *Varroa*milben neu aufgeworfen. Deshalb sind eine Reihe von Kontrollversuchen und Anschlussversuchen notwendig um die Ergebnisse zu deuten und abzusichern.

8 LITERATURVERZEICHNIS

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. (2001) Bedeutung cuticulärer Duftstoffmuster für die Wirtsfindung der parasitischen *Varroa*-Milbe und Abwehrreaktionen von Afrikanisierten und Carnica-Bienen. Dissertation Universität Tübingen, Selbstverlag.

Beetsma J., Boot W.J, Calis J. (1999) Invasion behaviour of *Varroa jacobsoni* Oud.: from bees into brood cells, Apidologie 30, 125-140.

Berg S., Schmidt-Bailey J., Fuchs S. (1999) Zeit als begrenzender Faktor des Eindringens von *Varroa jacobsoni* in Drohnenbrutzellen, in: Rosenkranz P., Garrido C. (Eds.), Soziale Insekten, IUSI-Tagung Hohenheim 1999. 15.

Blumer Meyre P., Fluri P., Guerin P. (1998) Aspekte der olfaktorischen Orientierung von *Varroa jacobsoni*. Mitteilungen der Sektion Bienen (31), 1-19

Boot W.J. (1995) Invasion of *Varroa* mites into honey bee brood cells, Dissertation, Agricultural University, Wageningen.

Boot W.J., Beetsma J., Calis J.N.M. (1994) Behaviour of *Varroa* mites invading honey-bee brood cells, Exp. Appl. Acarol. 18, 371-379.

Boot W.J., Calis J.N.M., Beetsma J. (1992) Differential periods of *Varroa* mite invasion into worker and drone cells of honey bees, Exp. Appl. Acarol. 16, 295-301.

Breed M.D. (1998) Recognition pheromones of the honey bee, Bioscience 48, 463-470.

Calderone N.W., Calderone N.W., Kuenen L.P.S., (2001) Effects of western honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony, cell, type, and larval sex on host acquisition by female *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), Journal of economic Entomology 94, 1022-1030.

Calderone N.W., Lin S. (2000) Chemical determinants of host locomotion by *Varroa jacobsoni*, American Bee Journal. 140, 902.

Calderone N.W., Lin S. (2001) Behavioural responses of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to extracts of larvae, cocoons and brood food of worker and drone honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). 26, 341-350.

- Calis J.N.M., Boot W.J., Beetsma J., (1999) Model evaluation of methods for *Varroa jacobsoni* mite control based on trapping in honey bee brood, *Apidologie*, 30, 197-207.
- Camazine S., Crailsheim K., Hrasnigg N., Robinson G. E., Leonhard B., Kropiunigg, H. (1998) Protein trophallaxis and the regulation of pollen foraging by honey bees (*Apis mellifera* L.), *Apidologie*, 29, 113-126.
- Charrière J.D., Imdorf A., Bachofen B., Tschan A., (1999) Ausschneiden von Drohnenbrut - eine wirksame Massnahme zur Reduktion des *Varroa*-befalls, *Schweiz Bienen-Zeitung* 122, 132-138.
- Crailsheim K. (1998) Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.), *Apidologie* 29, 97-112.
- de Bruyne M., Dicke M., Tjallingii W.F. (1991) Receptor cell responses in the anterior tarsi of *Pytoseiulus persimilis* to volatile kairomone components, *Exp. Appl. Acarol.* 13, 53-58.
- de Jong D. (1981) Effect of queen cell construction on the rate of invasion of honeybee brood cells by *Varroa jacobsoni*; 20, 254-257.
- Dillier F.-X., Dettli, M., Guerin P., Fluri, P. (2001) Do olfactory cues from food jelly influence *Varroa* mite's transfer from the nurse bees (*Apis mellifera*) into brood cells ? Poster, IUSSI 2. European Meeting 2001.
- Dillier F.X., Fluri P., Guerin P., (2001) Die Varroamilbe riecht mit den Beinen, *Schweiz Bienen-Zeitung* 124, 28-31.
- Dillier F.X., Fluri P., Guerin P., (2001) *Varroa destructor* a son nez sur ses pattes, *Rev suisse d'apicult.* 98, 462-468.
- Donzé G., Guerin P.M., (1994) Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood, *Behav. Ecol. Sociobiol.* 34, 305-319.
- Donzé G., Schnyder-Candrian S., Bogdanov S., Diehl P-A., Guerin P., Kilchenmann V., Monachon F. (1997) Aliphatic alcohol's and aldehydes of the honeybee cocoon induce arrestment behaviour in *Varroa jacobsoni* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasite of *Apis mellifera*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 37, 129-145.
- Endris J.J., Baker T.C. (1993) Aktionspotentiale, abgeleitet am ersten Laufbein von *Varroa jacobsoni*, nach olfaktorischer Stimulierung, *Apidologie* 24, 488-490.
- Fluri, P., Lüscher M., Wille, H., Gerig L. (1982) Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honeybees, *J. Insect. Physiol.* 28, 61-68.
- Fuchs S. (1990) Bevorzugung von Drohnenbrutzellen in Bienenvölkern von *Apis mellifera carnica* durch *Varroa jacobsoni*, *Apidologie* 21, 193-200.
- Fuchs S., Müller K. (1988) Invasion of honeybee brood cells by *Varroa jacobsoni* in relation to the age of the larvae, in: *European Research on Varroa Control*, Proc. Meeting of EC Expert's Group / Bad Homburg 1986, Cavalloro R. (Ed.)
- Gerster D., Strub Ch. (1999) Vorversuche zur biologischen *Varroa*-bekämpfung, Semesterarbeit, Schweizerische Hochschule für Landwirtschaft, Zollikofen, Kanton Bern, 1-19.
- Goetz B., Koeniger N. (1993) The distance between larva and cell opening triggers broodcell invasion by *Varroa jacobsoni*, *Apidologie*, 24, 67-72.

- Guerin P.M., Körber T., McMahon C., Guerenstein P., Grenacher S., Vlimant M., Diehl P-A., Steullet P., Syed Z. (2000) Chemosensory and behavioural adaptations of ectoparasitic arthropods, *Nova Acta Leopoldina* NF 83, 316, 213-229.
- Harizanis P C . (1991) Infestation of queen cells by the mite *Varroa jacobsoni*, 22, 533-538.
- Hess E., Vlimant M. (1982) The tarsal sensory system of *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae, Metatrata). Wall pore and terminal pore sensilla, *Rev.Suisse Zool.* 89,713-729.
- Hrassnigg N., Crailsheim K. (1998) Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies, *J Insect Physiol* 44, 929-939.
- Ifantidis M.D. (1988) Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honeybee *Apis mellifera* brood cells, *Apidologie*, 19, 387-396.
- Ifantidis M.D., (1991) Re-examination of reproduction parameters of the mite *Varroa jacobsoni* Oudemans, *Proceedings of the International Symposium on Recent Research on Bee Pathology*, September 5-7, 1990 20-26.
- Kuenen L.P.S., Calderone N.W., (1998) Positive anemotaxis by *Varroa* mites: responses to bee odour plumes and single clean-air puffs, *Physiological Entomology* 23, 255-264.
- Kuenen L.P.S., Calderone N.W. (2000) *Varroa* mite infestations in elevated honey bee brood cells: Effects of context and caste, *Journal of Insect Behavior* 13 (2), 201-215
- Le Conte Y., Arnold D., Trouiller J., Masson C., Chappe B., Ourisson G. (1989) Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honeybees by simple aliphatic esters, *Science* 245, 638-639.
- Le Conte Y., Sreng L., Trouiller J. (1994) The recognition of larvae by worker honeybees, *Naturwissenschaften* 81, 462-465.
- Maga, J.A. (1983) Honey flavor, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 16, 65-68.
- Mariaca R.G., Berger T.F.H., Gauch R., Imhof M.I., Jeangros B., Bosset J.O. (1997) Occurrence of volatile mono- and sesquiterpenoids in highland and lowland plant species as possible precursors of flavor compounds in milk and dairy products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 4423-4434.
- Martin S. (1998) A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies, *Ecological Modelling* 109, 267-281.
- Milani N., Nanelli R. (1989) The tarsal sense organ in *Varroa jacobsoni* Oud.: SEM observations, In: Cavalloro R. (Ed.) *Present status of Varroa infestation in Europe and Progress in the Varroa mite Control*, Commission of the European communities, Luxembourg, pp. 71-82.
- Moritz B., Crailsheim K. (1987) Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.), *Journal of Insect Physiology*, 33, 923-931.
- Nazzi F., Milani N., Della Vedova G., Nimis M. (2001) Semiochemicals from larval food affect the locomotory behaviour of *Varroa destructor*, *Apidologie* 32(2), 149-155.
- Oldroyd B.P. (1999) Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees, *TREE* 14, 312-315.
- Otten C., Fuchs S. (1988) Individual differences in *Varroa jacobsoni* of preference for drone larvae to worker bee larvae. in: *European research on Varroa infestation control*, Proc. of a Meeting of EC Expert's Group / Bad Homburg 1986. Ed.: Cavalloro R.

- Ramm D., Böckeler W. (1989) Ultrastrukturelle Darstellungen der Sensillen in der Vordertarsengrube von *Varroa jacobsoni* (Acari), Zool. Jb. Anat. 119, 221-236.
- Rembold H., Kremer J.P. (1980) Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L., 11, 29-38.
- Rickli M., (1994) Chemostimuli involved in host finding and recognition in *Varroa jacobsoni* Oud., a honeybee parasite, Thèse, Université de Neuchâtel, Neuchâtel pp. 86.
- Rickli, M., Guerin, P. M., and Diehl, P. -A., (1992) Palmitic acid released from honeybee worker larvae attracts the parasitic mite *Varroa jacobsoni* on a servosphere, Naturwissenschaften, 79, 320-322.
- Schmidt-Bailey J., Fuchs S. (1997) Experiments for the efficiency of *Varroa* control with drone brood-trapping combs, Apidologie 28, 184-186.
- Spivac M. (1999) Dynamics and control of *Varroa* parasitism on *Apis*, Apidologie, 30, 81-83.
- Steullet P., Guerin P.M. (1992) Perception of breath components by the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae) II. Sulfide-receptors, J. Comp. Physiol. A 170, 677-685.
- Steullet P., Guerin P.M. (1994) Identification of vertebrate volatiles stimulating olfactory receptors on tarsus I of the tick *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae). I. Receptors within the Haller's organ capsule, J. Comp. Physiol. A 173, 27-38.
- Vandame R. (1996) Importance de l'hybridation de l'ôte dans la tolérance a un parasite: Cas de l'acararien parasite *Varroa jacobsoni* chez les races d'abeilles *Apis mellifera* européenne et africanisée, en climat tropical humide du Mexique, Thèse, Université Claude Bernard, Lyon pp. 109.
- Wehner R. (1987) "Matched-filters" - neuronal models of the external world, J. Comp. Physiol. A, 161, 511-531.
- Wieting R., Ferenz H.J. (1991) Behavioural study on the invasion of honey bee by the mite *Varroa jacobsoni* on wax combs and ANP Combs, American Bee Journal, 131, 117-118.
- Zaitoun S. (1993) Initial studies on the attractivity of honeybee brood for *Varroa jacobsoni* Oudemans. Dissertation Universität Hohenheim, Stuttgart

ANHANG I: DATENVERZEICHNIS

I. Elektrophysiologie:

Bundesordner Elektrophysiologie (Ordner mit Ausdrucken aller elektrophysiologischen Ableitungen, methodischen Angaben und Publikationen)

Cd-Rom: Elektrophysiologie_1

Mit folgenden Ordnern:

- Bilder-Em (Rasterelektronische Aufnahmen und Photos der Elektrophysiologiestation in Neuenburg)
- Blumer97 (Elektrophysiologiedaten Pascal Blumer im Original-Sapid-format und im Autospike-asd-format, Ausdrücke ausgewählter Ableitungen als Word- und PDF-files und Tabelle)
- electrophys doc (Ausdrücke ausgewählter Ableitungen als Word-files)
- syntech (Autospike Programmfiles, Elektrophysiologie Aufzeichnung und Auswertungssoftware)
- sapid (Sapid Programmfiles, ältere Elektrophysiologie Aufzeichnung und Auswertungssoftware)
- Prot_elektrophys.doc (Protokollblattvorlage für Elektrophysiologie)
- Dillier99-01_I (Rohdaten der elektrophysiologischen Ableitungen von F.-X. Dillier und bearbeitete Versionen, Daten von 1999 im Sapid-format und Daten von 2000 als Autospike-32-Projekte Endung-asp)

Cd-Rom: Elektrophysiologie_2

Mit folgenden Ordnern:

- Dillier99-01_II (elektrophysiologische Ableitungen von F.-X. Dillier Daten von 2000 als Autospike-32-Projekte, Endung-asp, bearbeitete Versionen)

II. Kramerkegel:

- Bundesordner Kramerkegel 2000 1) (Ordner mit Ausdrucken des Versuchsschemas der Laufspuren und der beschreibenden statistischen Daten zu den Kramerkegelversuchen von 2000 geordnet nach Datum und Stimulus. Die Kontrolle mit reiner Luft ist in den Ausdrucken jeweils gelb und die Stimulus-Periode rot unterlegt)
- Bundesordner Kramerkegel 2000 2) (Fortsetzung von Ordner Kramerkegel 2000 1 und Ausdrücke der statistischen Auswertungen (Systat, Kreisstatistik, Exceltabellen, Diagramme und Berichte und Besprechungsgrundlagen)
- Bundesordner Kramerkegel 2001 (Ordner mit Ausdrucken des Versuchsschemas der Laufspuren und der beschreibenden statistischen Daten zu den Kramerkegelversuchen von 2001 geordnet nach Datum und Stimulus. Die Kontrolle mit reiner Luft ist in den Ausdrucken jeweils gelb und die Stimulus-Periode rot unterlegt)
- Videobänder (Videoaufzeichnungen der Kramerkegelversuche)

Cd-Rom: Daten F.X. Dillier

Mit folgenden Ordnern:

- Kramerkugel
- Auswertungen_excel (Kramerkugelauswertungen mit Kreisstatistik, zusammenfassenden Tabellen und Diagrammen)
- Kramerkugel_Photos (Aufnahmen der Kramerkugeleinrichtung in Neuenburg)
- Kramerkugel_Rohdaten (Rohdaten (mit Filename Fut für Futtersafttests und Bee für Bientestfiles als durchnummerierte Textfiles für Sphere4.exe Programm) und Laufprotokolle als Tif-Files geordnet nach Versuchsdaten)
- Protokolle (Protokollformulare)
- Systat_Auswertungen (Systatdaten und Auswertungen der Versuchsparemeter über alle Versuchserien und Statistikausdrucke)
- Vorversuche_Kramerkugel_defekt (Versuchsdaten vor der Revision der Kramerkugel mit zu hohen Luftstrom Geschwindigkeiten)
- Flowpara.doc, Kramerkugel.doc, Kramerkugelausw.doc (Word-dokumente mit methodischen Angaben, Versuchsparametern Auswertungen und Schlussfolgerungen)
- Sphere4.exe (Kramerkugeldaten Auswertungsprogramm)

III. „Purge and Trap“ Analyse:

- Bundesordner Purge +Trap Analysen 1999/2000 (Ordner mit Probenlisten (LarvenWägungen) Ausdrucken der methodischen Parameter, Chromatogramme und Excel-Listen der Auswertungen unterteilt in:
 - Listen, methodisches 2000, Arbeiterinnenfuttersaft, Drohnenfuttersaft,
 - methodisches 1999, Drohnenlarven, Arbeiterinnenlarven, Drohnen, Arbeiterinnen

Cd-Rom: Daten F.X. Dillier

Mit folgenden Ordnern:

- Pt_gc-ms (Excel-Auswertungen mit Gaschromatograph-Massenspektrometer Analysen)
- futtersaft.doc, futtersaft1.rtf (Word-dokumente mit methodischen Angaben, Versuchsparametern)
- Statistica Auswertungen (Boxplot Graphiken der FID-Peaks Grafik_p1.STG bis Grafik_p137.STG)

IV. Olfaktometertest und Hohenheim Wahltest:

- Bundesordner Olfaktometer Tests (Videoauswertungen zum Olfaktometertest, Notizen zu den Hohenheim-Wahltest Vorversuchen)
- Videobänder (Videoaufzeichnungen zum Olfaktometertest)

Cd-Rom: Daten F.X. Dillier

Mit folgenden Ordnern:

- Olfaktometer_Versuche (Word-dokumente mit methodischen Angaben und Testdiskussion)
- Hohenheim_test (hohenheim-test.cdr Skizze des Testapparates zum Nachbau im Corel-Draw-Format, Materialliste Hohenheimer Test.doc)

V. Datenverzeichnis Absteigetest:

- Bundesordner Biotest 1999 (Testprotokolle aller Testserien, Sammelprotokolle, Auszählprotokolle, Excel-Tabellen, Diagramme, Brutschrank-Mikroklimaaufzeichnungen)
- Bundesordner Biotest 2001 (Testprotokolle aller Testserien, Sammelprotokolle, Auszählprotokolle, Excel-Tabellen, Diagramme, Brutschrank-Mikroklimaaufzeichnungen, Versuche serienübergreifend durchnummeriert (rot) entsprechend den Zahlen im Excel-File Absteigetest_Protokollblätter_99-01.xls)
- Semesterarbeit von D.Gerster und Ch.Strub: Vorversuche zur biologische *Varroa* bekämpfung
- Videobänder (Videoaufzeichnungen zu Vorversuchen mit Absteigetest)

Cd-Rom: Daten F.X. Dillier

Mit folgenden Ordnern:

- bilder-Absteigetest (Photos zum Abstiegstest und Standbilder von Videoaufnahmen bei den Abstiegstest-Vorversuchen)
- Formulare (Formularvorlagen zum Sammeln der Donatorbienen, Aufnahmen des Brutprotokolls der Akzeptorwaben und Auswerten der Testkästchen)
- Milbenfall (Milbenfall-Diagramme der *Varroa* kolonien über die Versuchssaison)
- excel_Auswertungen (Exceltestprotokolle(integrierte Auswertungsformel und Statistische Tests) mit Auswertungstabellen, Statistiken und Diagrammen)

Unterordner:

- Testserien_99
- Testserien_01
- Vereinigte_Datensätze_99-01
- Protokolle_99-01_gesamt
- Tätigkeitbericht_01
- Poster_Berlin
- Systat_Auswertungen (Systat data-File und Auswertung)
- Auswertungen_pdf (PDF-Dokumente von zusammenfassenden Tabellen und Diagrammen)
- Ipro_Absteigestes (Brutschrank-Mikroklimaaufzeichnungen, als elpro_Files (mdf), PS-Files oder PDF-Files)
- auswBiotest-diagramme.doc (Text dokument mit Vergleichsdiagrammen)

Weiter auf der Daten-CD:

Cd-Rom: Daten F.X. Dillier

folgende Ordner:

- Bericht als Word-Dokument und als PDF-Dokument (Schlussbericht.doc, Schlussbericht.pdf)
- Artikel (Word-Dokumente und Material zu Publikationen)
- Vorträge (Powerpoint-dokumente und Material zu Vorträgen)
- Berichte-Anträge (diverse Textdokumente)

ANHANG II: TABELLE „PURGE AND TRAP“

Die einzelnen Peaks der „Purge and Trap“-Analyse sind in der Reihenfolge ihrer Retentionszeit im Chromatogramm in der Tabelle aufgeführt. In den Zeilen sind für die einzelnen Messungen nach Kategorien geordnet, die Peakhöhen im FID-Chromatogramm angegeben. Die den Peaknummern (P1-P137) entsprechenden Substanznamen sind als Legende zur Tabelle unten aufgeführt. Die Bezeichnung folgt der Regel: Chemische Bezeichnung (bei einigen Substanzen ist zur Identifikationshilfe zusätzlich, abgetrennt durch eine Strichpunkt der Trivialname angeführt), ein „und“ zwischen Bezeichnungen bedeutet, dass es sich um einen nicht genügend aufgelösten Mehrfachpeak, ein „?“ eine nicht identifizierte Substanz handelt. Ein in eine Klammer „(?)“ oder „-?-“, gesetztes Fragezeichen deutet auf eine Unsicherheit bei der Stellung einer Seitengruppe und ein dem Substanznamen nachgestelltes „?“ bedeutet, dass ein zu kleiner Peak die Identifikation unsicher machte oder eine Unsicherheit bei der Substanzidentifizierung auftrat.

Peak-Nummer	Substanzname	Trivialname
P1	Acetaldehyd	
P2	?	
P3	?	
P4	?	
P5	Ethanol	
P6	2-Propanone	Aceton
P7	?	
P8	?	
P9	2-Propanol	
P10	Pentane	
P11	?	
P12	Formic acid, ethyl ester	
P13	1,3-Pentadiene ?	
P14	2-Butene, 2-methyl od. Cyclopropane, xx-dimethyl ?	
P15	Methane, thio-bis	Dimethylsulfid
P16	Acetic acid, methyl ester	
P17	Methane, dichloro-	
P18	Propanal, 2-methyl-	
P19	1-Propanol	Propylalkohol
P20	2,3-Butanedione	Diacetyl
P21	? und Pentane, 2-methyl-	
P22	Butanal ?	
P23	2-Butanone	Ethyl-methylketon
P24	Pentane, 3-methyl-	
P25	2-Butanol	
P26	3-Buten-2-ol, 2-methyl-	

Peak-Nummer	Substanzname	Trivialname
P27	Hexane und Acetic acid, ethyl ester	
P28	Acetic acid, ethyl ester	
P29	Furan, ?-methyl ?	
P30	1-Propanol, 2-methyl und Furan, tetrahydro- ?	
P31	Furan, tetrahydro ?	
P32	Cyclopentane, methyl- ?	
P33	Butanal, 3-methyl-	
P34	Butanal, 2-methyl-	
P35	1-Butanol	
P36	2-Propanone, 1-chloro ?	
P37	Benzene	
P38	Cyclohexane	
P39	2-Pentanone und Hexane, 2-methyl- ?	
P40	1-Penten-3-ol ?	
P41	Pentane, 2,3-dimethyl- ?	
P42	2-Pentanone	
P43	Hexane, 3-methyl- ?	
P44	2-Pentanol	
P45	?	
P46	?	
P47	Cyclopentane, 1,2-dimethyl- ?	
P48	?	
P49	2-Butanone, 3-hydroxy	
P50	Propanoic acid, ethyl ester	
P51	Heptane	
P52	Acetic acid, propyl ester ?	
P53	3-Buten-1-ol, 3-methyl-	
P54	1-Butanol, 3-methyl-od 2-methyl- ?	
P55	1-Butanol, 2-methyl-	
P56	Cyclohexane, methyl- ?	
P57	Disulfide, dimethyl-	
P58	Cyclopentane, ethyl- ?	
P59	Acetic acid, 1-methylpropyl ester ?	
P60	?	
P61	1-Pentanol	
P62	2-Butenal, 2-methyl- ?	
P63	2-Butenal, 2-methyl- ? und ? und 2-Buten-1-ol, 3-metyl- ?	
P64	? und Benzene, methyl-	
P65	Heptane, 4-methyl-	
P66	?	

Peak-Nummer	Substanzname	Trivialname
P67	Hexanal	
P68	3-Hexanol ?	
P69	Butanoic acid, ethyl ester	
P70	1-Octene ?	
P71	Acetic acid, butyl ester	
P72	Octane	
P73	?	
P74	Cyclopentanecarboxyaldehyde ?	
P75	Heptane, 2,4-dimethyl-	
P76	1-Pentanol, 3- methyl- ?	
P77	2-Pentanol, acetat ?	
P78	3-Hexen-1-ol ?	
P79	?	
P80	2-Hexen-1-ol (E) ?	
P81	1-Hexanol	
P82	1-Butanol, 3-methyl-, acetate ?	
P83	Benzene, 1,3(?) -dimethyl-	Xylene
P84	2-Heptanone	
P85	2-Heptanol	
P86	Styrene	
P87	2-Buten-1-ol, 3-methyl-, acetate ?	
P88	Nonane	
P89	?	
P90	Cyclohexanecarboxyaldehyde ?	
P91	Propanoic acid, 2-methyl-, butyl ester ?	
P92	Benzaldehyd und .alpha.-Pinene?	
P93	alpha-Pinene, (-)-	
P94	1-Butanol, 3-methyl-, propanoate ?	
P95	1-Heptanol	
P96	?	
P97	?	
P98	? Ester	
P99	Hept-5-en-2-one 6-Methyl-	
P100	1-Octene-3-yne, 2-methyl- ?	
P101	Butanonic acid, butyl ester	
P102	Hexanoic acid, ethyl ester	
P103	Pentanoic acid, 2-hydroxy-3-methyl-, methyl ester ?	
P104	Octanal	
P105	?	
P106	Acetic acid, hexyl ester ?	

Peak-Nummer	Substanzname	Trivialname
P107	? Ester	
P108	Decane	
P109	?	
P110	1-Phellandrene	
P111	1-Hexanol, 2-ethyl-	
P112	? und Benzene, 1-methyl-4- (1-methylethyl)	p-Cymene ?
P113	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)	p-Cymene
P114	.Beta.-Ocimene(Z)-; 1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-	
P115	?	
P116	Limonene	
P117	1,3,6od.7-Octatriene, 3,7-Dimethyl? und Ocimene	
P118	Cyclohexene, 1-methyl- od. Cyclopenten, 1,5-dimethyl- und Butanonic acid, 3-methyl ester ?	
P119	.Beta.-Ocimene(E)-	
P120	trans-2-Undecen-1-ol ?	
P121	Ethanone, 1-phenyl-	
P122	1-Octanol	Caprylalkohol
P123	8-Nonen-2-one?	
P124	Alkohol ungesättigt	
P125	Linalool oxide (Z) (furanoid) (CAS-Nr 5989-33-3) ?	
P126	2-Nonanone	
P127	?	
P128	Bezoic acid, methylester ?	
P129	Nonanal	
P130	Undecan	
P131	Octanoic acid, methyl ester	
P132	Acetic acid, phenylmethyl ester ?	
P133	Octanoic acid, ethyl ester	
P134	3-Octen-1-ol, acetate (E) ?	
P135	Dodecan	
P136	Naphthalene	
P137	Tridecane ?	

	Nummer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18
Arbeiterinnen	BL0009	Height	2124	7592	3052	11429	13346			2406	856					318	918		218
	BL0010	Height	2583	6812	3615	13183	14642			3359	844				176	246		934	912
	BL0011	Height	2575	8133	4654	13258	10396			2309	1751				678	359	1085		
	BL0023	Height	3274	2671	1188	12237	8151			2030	355					221	386		158
	BL0024	Height	2852	2808	3057	21742	9903			2261	331					210	279		
	BL0025	Height	3229	5953	3593	5655	13276			2671	1193				210	182	623		
	BL0026	Height	3285	7038	2710	6138	20423			5576	1391				219	270	881		
	BL0027	Height	3542	4251	1901	9149	9567			1769	361					436	479		
BL0028	Height	4187	4959	1501	14990	11708			3193	209					424	394			
	n		9	9	9	9	9			9					4	9		9	3
Drohnen	BL0016	Height	1280	1661	550	28150	46988			24881									272
	BL0017	Height	2183	2610	423	11834	39867			34132	196					137			354
	BL0018	Height	2801	1637	418	11474	38861			14299	321								218
	BL0019	Height	3180	2453	658	31076	48278			40857	292								184
	BL0020	Height	2538	2289	279	12632	64404			35010	274								283
	BL0021	Height	2352	1485	1069	3392	14744			4427	511								
	BL0022	Height	3626	1435	829	5319	22379			11681	485								
		n	7	7	7	7	7	7		7	6						1		
Arbeiterinnen-larven	BL0001	Height		5612	1738		1644	27864		1048									
	BL0002	Height	452	6330	4529	11289	59140			2279	187					234			
	BL0003	Height	675	7622	3910	2540	63845			2681						351			
	BL0004	Height		6034	4588		5899	54244		2549	221					255			
	BL0005	Height	209	6023	4226		8339	57251		2728	509					217			
	BL0006	Height	8078	5879	4035		6652	42788		2086	985								
	BL0007	Height	8801	5142	4080		7626	32274		2795	348								
	BL0008	Height	3627	5549	4258		13598	51113		2663	484								
	n	6	6	8	8	8	8	8	8	6						4			
Drohnenlarven	BL0012	Height	264	2828	2253		1806	22311		1415	215					406			
	BL0013	Height		1624	1206		2860	16053		1386	310	147				352			
	BL0014	Height	498	3420	2642		11610	28908		2527	631	321				138			180
	BL0015	Height		1567	1122		3079	19479		1601	391	194							
	BL0029	Height	3315	4372	2745		7800	49373		2177	257								
	BL0030	Height		2182	2437		4111	35681		1815	268								
	BL0031	Height	595	2650	2768		6638	40618		2440	490	167							
	BL0032	Height	361	2924	2096		6562	23886		1603	401								
BL0033	Height	611	3004	3496		9405	37891		1860	175								152	
BL0034	Height		1863	2206		4108	20572		1479	316									
	n	6	10	10		10	10	10		10			4			3		1	1
Gelée Royal	FS004	Height	45036			2358	856397	63176		5099		621	6675			402	722		4887
	FS005	Height	39592			5026	1338608	98268		16946			7665			1318			4928
	FS006	Height	58700		1057	2429	730520	80816		3250			3436			5160			4552
	FS007	Height	22764	1174	1190	4685	1041654	71279		7139			1874			2866			2029
	n	4	1	2	4	4	4	4	4	4			4			4			4
Drohnen-larven	FS001	Height	25316			2248	578405	8609		1211		1570			515				11320
	FS002	Height	6936			3452	210608	9472		874		806			555				5159
	FS003	Height	3558			3471	57886	8175		824		182			251				1804
	n	3	3		3	3	3	3	2	1	3	3		3		1			3

	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	P31	P32	P33	P34	P35	P36	P37	P38
Arbeiterinnen	408				746	1574			465			758			194	191	6968			
	837				1213	3448			765			943			333	529	22403			
	212				377	793			490			1291					12169			
	193				260	445			408			971			277	136	9670			
	297				332	407			275			416			159	3040				
	1338			168	816	2239			869			2238			164		28572			
	1730			226	2226	3422			907			2138			471		26277			
	275				441	1042			408			717			182		5991			
	361				303	2375			620			1463			173		16724			
	9			2	9	9			9	9					8	3	9			
Drohnen	294	101			1639	3510		234				3352			283	182	750			
	482	141			443	2349		371				2850			370	261	331			
	408	375			575	1379		205				1408			265	152	302			
	1657	284			1632	8180		582				5050			313		992			
	393	280			496	2224		394				2779			359	164	671			
	132					171						223								
					229	710		173				370					232			
6	5			6	7		6				7			5	4	6				
Arbeiterinnen-					158															
					576															
					527															
					401				173											
					344				649											
					244															
					184															
					242															
						8														
					252					136			141							
Drohnenlarven					157				151			155								
					183				389			167								
									207			250								
					382				185			331								
		278			206				197			193								
		556			163				325			233								
		687							421		150	331								
		790							284		286	287								
		567							274			186								
		6			6				10			2		10						
Gelse	1744		327		704	974	165		66945			1051		484	2752	3239		597		
	5880		198		624	457	594		65252			2934		287	2553	3130		1805		
	2204		1435		871	4599			181681			2540		2750	2788	2996		396	358	265
	5826		623		670	556	221		96085			4478		428	1090	1222		708		
4		4		4	4	3		4			4		4	4	4		3	2	1	
Drohnen-	1296	6685	9032		429				277			26602			1484	1504		153		
	474	10873	9153		340				228			15406			1090	962				
	174	8155	2621		178							5127			404	368				
3	3	3		3				2			3			3	3		1			

	P59	P60	P61	P62	P63	P64	P65	P66	P67	P68	P69	P70	P71	P72	P73	P74	P75	P76	P77	P78	
Arbeiterinnen	269				2823								18758	3354	256			157	165		
	774				8792								50798	3605	570			453	654		
	297		133		5462								33607	4389	657			302	185		
					3061			340					12160	1298	287			305			
					555								2047	1458							
	1539		153		22034								90765	6493				723	286		
	1401		208		17276								70144	6295				529	398		
	661				2775								14511	2007	233			204	306		
	2894		167		8051			223					37700	2082	515			741	633		
	7		4	1	9			2					9	9	6			8	7		
Drohnen			322		1232									757				706		159	
			155		1681					540				1117				223			
			150		1133				394	252				2585				199			
			261		1462				620	2747				2747				301			
			253		3027				287	922			143	4208							
					193									933							
					841				706					2788							
			5	7					3	4			1	7				4		1	
	Arbeiterinnen-larven						753								267						
						1803									526						
					2728									405							
					4318									387							
					4971									348							
					966									904							
					1156									750							
					1885									700							
					8									8							
Drohnenlarven							188								882						
					235									977							
					752									1277							
					784									889							
					247									1247							
					215									1125							
					202									1381							
					580									2031							
					544									1422							
					295									1509							
Gelees						10								10							
					1006									1713				185			
					964				329	1713			270	1389							
					1371			210	290	1578			524	237							
					444				560				145	173				227	277		
					4				244				172	133							
					4				4				2	1				2			
					158				882				198	288							
					1043				1043				209	441							
	Drohnen-lutterzeit	131							511				279	946							
157								511				279	946								
2						1		3			2	3	3						3		

	P79	P80	P81	P82	P83	P84	P85	P86	P87	P88	P88	P90	P91	P92	P93	P94	P95	P96	P97	P98		
Arbeiterinnen			1384	111251			215	475													288	
		949	7140	118394	1074	2185	691	15524					141				976				1645	691
		645	3237	239715		246	308	6909								153	1986					336
		341	2301	266490			353	1825									1433					357
			245	5801	119			1110														
			7409	235355			273	462					689				2757					1122
			7077	172403	1913		397	34535					627			142	3727					976
			303	1363	169789		11453	2142	3985								996					576
			1126	4397	373565		499	1244	7018								2783					133
		5		9	9	3	6	8	9				3			2	8					1
Drohnen			1589				1632															8
			507				398								134							156
			750				543															191
			912				454															220
			1283				724															
			220																			
			646				540															
			7				6								1							3
	Arbeiterinnen-larven																					
Drohnenlarven																						
Gale6 Royal																						
Drohnen-lutensaft																						

	P89	P100	P101	P102	P103	P104	P105	P106	P107	P108	P109	P110	P111	P112	P113	P114	P115	P116	P117	P118
Arbeiterinnen			267					1392	192											1134
			787		152			9155	225											1785
			596		136			3680	379											2554
			247					1559	244	231										1354
								162												
Drohnen			1049					5815	1271								191			1871
			839		487			8859	1019			344			703		288			1928
			272					1262	150						174					905
			761		250			4844	510			137			620					3897
			8		4			8	8	2		2			1		2			8
							613													1063
Drohnen- Arbeiterinnen-						375														
	191					1162							233							144
	158					849							158							
	188					1528							191							
	149					356														
	207				2264			138					132							
	5				7			1					4							2
Arbeiterinnen-																				
																				5211
																219			8769	
	325															178			8006	
	355																		4994	
																			3881	
																			3042	
																207			3984	
																			3224	
	5															3				8
Drohnenlarven																				
																				724
																				376
																				402
																				426
																				311
																			159	
																			138	
																			324	
																			339	
																			213	
																			10	
Geleé Royal																				
			302	9079				243		162										288
	179	134		5888			243													224
	188	937		329			206			171	151									205
		261					149			173										
	3	3	3	3			4		2	2	2								2	2
Drohnen- futtersaft																				
								111												176
	446						107													246
	185						253													157
	3						3													2
																				1

	P118	P120	P121	P122	P123	P124	P125	P126	P127	P128	P129	P130	P131	P132	P133	P134	P135	P136	P137	
Arbeiterinnen				212						273	184								176	
				670					145		165					312			181	
				152		600				610	140						653			
				257						458	195									
						249				311										
				170		731				134	257	181								
Drohnen		265		356					207	312	328						201			
		368		320		1172					216			238			184			
		2		532		4			3	6	7			1		1	3		2	
				235		275						170								
				128		204						208								
				289		157						269								
Arbeiterinnen-larven				198		325					199									
				344		145					295									
				301							134									
				6		5					311									
											7									
											198									
Drohnenlarven										283										
										282										
										205										
										173										
										528										
										623										
										654										
										8										
										3150										
										1836										
										3585										
										1796										
										965										
										944										
										780										
								181		2236										
								233		1740										
										1876										
Gelee									2	10										
	714		166		176			8965		901					1123			206		
	227		217		188			7427		1228					579			132		
	734		134		223			14283		981		156			1583					
			203					4758		843					272					
	3		4		3			4		4			1		4			2		
Drohnen-futtersaft	688				1061			197848		1484										
	971				792			160643		1162										
	450				716			129436		1637										
	3				3			3		2										

ANHANG III: BOXPLOTS

Die einzelnen Peaks der „Purge and Trap“-Analyse sind in der Reihenfolge ihrer Retentionszeit im Chromatogramm entsprechend der Tabelle im Anhang II als Boxplot-Grafik der Kategorie (worker = lebende Arbeiterinnen, drone = lebende Drohnen, w_larvae = lebende Arbeiterinnenlarven, d_larvae = lebende Drohnenlarven, r_jelly = kommerzieller Geleé royal/Weiselsaft, d_jelly = Drohnenfuttersaft aus L5 Drohnenzellen) gegen die Peakhöhe im FID-Chromatogramm abgebildet. Für jede Graphik ist die fortlaufende Peaknummer (P1-P137) und bei den identifizierten Peaks der Substanzname angegeben.

