



Journal für Kulturpflanzen

Journal of Cultivated Plants

Themenheft Bienenschutz

5

Band 72
Mai 2020
Print: ISSN 1867-0911
Internet: ISSN 1867-0938



ulmer



JKI

Julius Kühn-Institut

Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

Journal für Kulturpflanzen

Journal of Cultivated Plants



Journal für Kulturpflanzen vereint mit Pflanzenbauwissenschaften
Print: ISSN 1867-0911, Internet: ISSN 1867-0938
Homepage: <https://ojs.openagrar.de/index.php/Kulturpflanzenjournal>

Charakteristik

Das Journal für Kulturpflanzen enthält wissenschaftliche Originalbeiträge, Übersichtsarbeiten und Berichte zu allen Themengebieten der Kulturpflanze, z. B. Pflanzenbau, Pflanzenschutz und Phytomedizin, Pflanzengesundheit, Pflanzengenetik, Pflanzenernährung, Bodenkunde, Bienenschutz, Pflanzenschutztechnik, Vorratsschutz. Außerdem werden Mitteilungen und Nachrichten, Personalien, Literaturhinweise und Buchbesprechungen veröffentlicht.

Verantwortlicher Herausgeber / Editor-in-Chief

Prof. Dr. Frank Ordon, Präsident und Professor des Julius Kühn-Instituts – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg

Schriftleitung / Managing Editor

Dr. Anja Hühnlein, Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, Tel.: 03946/47-2206, E-Mail: journal-kulturpflanzen@julius-kuehn.de

Co-Schriftleitung

Dr. Ulrike Stahl (JKI Quedlinburg)

Co-Schriftleitung Pflanzenbauwissenschaften

Prof. Dr. Hans-Peter Kaul (Universität für Bodenkultur Wien)

Redaktionsbeirat / Editorial Board

Prof. Dr. Henryk Flachowsky (JKI Dresden)
Prof. Dr. Simone Graeff-Hönniger (Universität Hohenheim)
Prof. Dr. Jörg Michael Greef (JKI Braunschweig)
Prof. Dr. Johannes Hallmann (JKI Braunschweig)
Dr. Olaf Hering (JKI Berlin)
Prof. Dr. Johannes Jehle (JKI Darmstadt)
Prof. Dr. Wilhelm Jelkmann (JKI Dossenheim)
Dr. Hella Kehlenbeck (JKI Kleinmachnow)
Dr. Heinz-Josef Koch (Institut für Zuckerrübenforschung Göttingen)
Prof. Dr. Carola Pekrun (Hochschule für Wirtschaft und Umwelt Nürtingen-Geislingen)
Dr. Jens Pistorius (JKI Braunschweig)
Dr. Bernhard Carl Schäfer (JKI Braunschweig)
Prof. Dr. Dr. h.c. Ewald Schnug (JKI Braunschweig)
Dr. Hartwig Schulz (JKI Berlin)
Dr. Günter Schumann (JKI Quedlinburg)
Prof. Dr. Hartmut Stützel (Leibniz Universität Hannover)
Prof. Dr. Friedhelm Taube (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel)
Prof. Dr. Reinhard Töpfer (JKI Siebeldingen)
Dr. Ute Katharina Vogler (JKI Braunschweig)
Prof. Dr. Jens Karl Wegener (JKI Braunschweig)
Dr. Peter Wehling (JKI Groß Lüsewitz)
Dr. Ralf Wilhelm (JKI Quedlinburg)
Prof. Dr. Peter Zwerger (JKI Braunschweig)

Wissenschaftlicher Beirat

Prof. Dr. Wolfgang Friedt (Justus-Liebig-Universität Gießen)
Dr. Erich Jörg (Ministerium für Wirtschaft, Verkehr, Landwirtschaft und Weinbau Rheinland-Pfalz)
Elmar Pfülb (Bundessortenamt Hannover)
Prof. Dr. Bernward Märlander (Institut für Zuckerrübenforschung Göttingen)
Mag. Astrid Plenk (AGES - Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH)
Prof. Dr. Joseph-Alexander Verreet (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel)

Manuskripteinreichung

Bitte reichen Sie Original- und Übersichtsarbeiten sowie Kurzmitteilungen und Nachrichten über das elektronische Zeitschriftenverwaltungssystem ein:

<https://ojs.openagrar.de/index.php/Kulturpflanzenjournal>.

Um die Einreichung zu beginnen, registrieren Sie sich als Nutzer der Zeitschrift über einen Klick auf „Registrieren“ im oberen rechten Bildschirmrand. Nach erfolgreicher Manuskripteinreichung erhalten Sie eine Bestätigung per E-Mail. Indem Sie sich mit Ihrem Benutzernamen und Passwort im System anmelden, können Sie jederzeit den Status Ihrer Einreichung einsehen.

Bei Fragen zur Manuskripteinreichung kontaktieren Sie gern die Schriftleiterin Dr. Anja Hühnlein (Tel.: 03946 47-2206,

E-Mail: journal-kulturpflanzen@julius-kuehn.de).

Hinweis für Autoren der zweimal jährlich erscheinenden Ausgabe

„Pflanzenbauwissenschaften“: Bitte machen Sie zu Beginn der Einreichung im Feld „Kommentare für die Redaktion“ deutlich, dass es sich um einen Beitrag für die Pflanzenbauwissenschaften handelt.

Verlag

Eugen Ulmer KG, Wollgrasweg 41, 70599 Stuttgart (Hohenheim).

Telefon (0711) 45 07-0, Fax (0711) 45 07-1 20.

E-Mail: info@ulmer.de, UST-ID: DE147639185.

Vertrieb: Daniela Knorre.

Leserservice: Nadine Wieland.

Tel. (0711) 4507-105, Fax - 120, E-Mail: leserservice@ulmer.de

Anzeigen: Marc Alber, verantwortlich.

Preisliste Nr. 15 gültig seit 1. 1. 2009. Anzeigenschluss am 20. des Vormonats.

Bankverbindungen

Deutsche Bank AG Stuttgart IBAN:

DE62 6007 0070 0147 6878 00 (BIC: DEUTDE33XXX)

Bank Austria Bregenz IBAN: AT18 1200 0518 8801 4200 (BIC: BKAUATWW)

PostFinance Zürich IBAN: CH86 0900 0000 8004 7072 8 (BIC: POFICHBEXXX)

Abonnements

Das Journal für Kulturpflanzen erscheint monatlich. Jahresbezugspreis Inland als Postvertriebsstück € 249,60 inkl. MwSt. Ausland Gesamtpreis € 258,70.

Einzelheftpreis € 22,00 zzgl. Versandkosten. Die Einzel- sowie Gesamtpreise sind preisgebunden. Berechnung: sofern nicht anders vereinbart, jeweils innerhalb des Kalenderjahres. Kündigungsfrist: 6 Wochen zum Ende des Rechnungszeitraums. Bestellungen nehmen jede Buchhandlung und der Verlag entgegen.

Druck

Ungeheuer + Ulmer KG GmbH + Co, Körnerstraße 14–18, 71634 Ludwigsburg.

Satz und Herstellung

mediaTEXT Jena GmbH, www.mediatext.de

Copyright



Seit Januar 2019 werden alle wissenschaftlichen Beiträge im Journal für Kulturpflanzen als Open-Access-Artikel unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

Beitragseinreichung:

<https://ojs.openagrar.de/index.php/Kulturpflanzenjournal>



Bienen schützen – warum?

Bienen sind seit jeher besondere Sympathieträger – die Bedeutung von Bienen, insbesondere Honigbienen (*Apis mellifera* L.), ist durch den wohlschmeckenden Honig und andere Bienenprodukte seit Jahrtausenden im Bewusstsein der Menschen. Da Mensch, Landwirtschaft, Umwelt und Natur von der Bestäubungsleistung profitieren, ist Bienenschutz – der Schutz aller Bienen – nicht nur im Interesse der Landwirtschaft, sondern von gesamtgesellschaftlicher Bedeutung. Bestäubung ist essentiell für den Ertrag. Sowohl die Ertragsmenge als auch die Produktqualität, Inhaltsstoffe und Lagereigenschaften werden positiv beeinflusst. Der Wert der Bestäubungsleistung geht bei Honigbienen somit weit über den Wert der Bienenprodukte hinaus, und auch viele andere der etwa 580 in Deutschland lebenden Wildbienenarten sind wichtige Bestäuber.

Als vom Menschen gehaltene Art hat die Honigbiene weltweit eine besondere Situation. Imker und Imkerinnen können selbst durch gute imkerliche Praxis einen gewissen Beitrag zur Gesunderhaltung ihrer Honigbienen leisten, und durch die Möglichkeit der gezielten Auf- und Umstellung von Honigbienenvölkern Einfluss auf die Ernährungsbedingungen und auch Bestäubungsleistung im Flugradius von etwa 2 km nehmen. Dabei können sie Orte mit entsprechender Verfügbarkeit bestimmter nektar- und pollenspendenden Pflanzen oder Honigtau anwandern. Alle einheimischen Wildbienen – zu denen auch die Hummeln gehören – können jedoch nicht verstellt oder umgesiedelt werden und haben oft auch einen kleineren Flugradius als Honigbienen. Daher sind Habitats- und Nahrungsgüte, und Vernetzung von Habitaten im näheren Umkreis, besonders wichtig für das Wohlergehen einzelner Individuen bis hin zu ganzen Populationen. Nahrungsverfügbarkeit (inkl. Nahrungsqualität) und Gestaltung ländlicher und urbaner Räume haben damit einen wesentlichen und direkten Einfluss auf die Nahrungs- und Nistmöglichkeiten und damit auf die Grundlage für den Erhalt und Förderung vieler Bienenarten. Neben Nahrungsmangel, bzw. geringer Diversität, können weitere Stressfaktoren wie z.B. der

(unsachgemäße) Einsatz von Pflanzenschutzmitteln auf Pflanzen an denen Bienen Nektar und Pollen sammeln, aber auch Bienenkrankheiten die Gesundheit von Bienen beeinflussen und im jeweiligen Habitat auch als Faktoren zusammenwirken.

Die Fragen, ob und inwiefern bei welchen Arten es ein „Bienensterben“ oder ein „Artensterben“ gibt, wie der Gesundheitsstatus von Wild- und Honigbienen tatsächlich ist, und welchen Beitrag unterschiedlichste Faktoren, wie beispielsweise Pflanzenschutzmittel, an der Schädigung von Individuen bis hin zu Populationen haben, werden in der Öffentlichkeit besonders kontrovers – und oft, mangels Daten, mit viel Bauchgefühl diskutiert. Um Status quo und Trends messbar zu machen, müssen Erfassungsmethoden zum Vorkommen, Populationsgrößen und Verteilung verschiedener Bienen entwickelt werden. Um dem für eine Reihe von Arten bestätigten negativen Trends entgegenzuwirken, ist auch eine rasche und weiträumige Umsetzung von Maßnahmen in der Fläche, und Entwicklung regional und lokal angepasster, maßgeschneiderter Förder- und Schutzmaßnahmen für die verschiedenen Natur-, Landschafts-, und urbanen Räume dringend.

Mit Blick auf die Zukunft ist zu erwarten, dass neue Wirkmechanismen und Behandlungsmethoden für den Pflanzenschutz entwickelt werden, sich landwirtschaftliche Praktiken ändern und so auch die Prüfmethodik und Prüfschemata fortlaufend angepasst werden müssen. So wird derzeit die (Weiter-)Entwicklung von Prüfmethoden für biologische Pflanzenschutzmittel, die Viren, Pilze und Bakterien zur Bekämpfung von Schadorganismen einsetzen, immer wichtiger.

Um die biologische Vielfalt, die Bestäubungsleistung und den hohen ökologischen Nutzen zu bewahren und dauerhaft zu schützen, muss der Einfluss des Menschen und all seiner Handlungen auf Bienen untersucht werden. Denn für Artenrückgang und Verlust von Populationen wird oft einseitig die Landwirtschaft als ursächlich beschuldigt, selbst wenn Probleme auch in landwirtschaftsfernen Bereichen zu beobachten sind und eben nicht nur

Affiliation

Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Bienenschutz, Braunschweig

Kontaktanschrift

Dr. Jens Pistorius, Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Bienenschutz, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, E-Mail: jens.pistorius@julius-kuehn.de

auf Pflanzenschutzinsatz und der Produktion auf den Anbauflächen zurückzuführen sind. Daher bin ich der Auffassung, dass wir alle potentiell schädigenden Faktoren emotions- und ideologiefrei wissenschaftlich betrachten und bewerten müssen, wenn wir Bienen schützen wollen. Nur so können effektive, effiziente und nachhaltige Maßnahmen zum Schutz vor Schadeinflüssen, aber auch zur gezielten Förderung, erarbeitet werden.

Einen Beitrag zu leisten, dass die Bestäubungsleistung, Biodiversität und Bienenhaltung eben nicht nur erhalten, sondern zum Nutzen aller deutlich verbessert werden, liegt im Interesse der Bienen - letztendlich aber auch im Kerninteresse der Landwirtschaft und der Menschheit, um die eigene Nahrungsmittelversorgung, durch den Erhalt der Kulturpflanzenproduktion, und Erhalt der Ökosysteme, sicher zu stellen. Dafür sind alle Akteure und Interessensgruppen gleichermaßen aufgefordert aktiv zu werden und die Intensität von Schutz- und Fördermaßnahmen weiter zu erhöhen – es ist noch deutlich Luft „nach oben“. Der jetzt begonnene Bewusstseinswandel muss verfestigt werden und die schon erreichten Verbesserungen immer weiter intensiviert werden. Nur wenn wir die Bemühungen weiterführen und weiter verstärken kann das Ziel, Bienen und damit auch viele andere schützenswerte Arten zu erhalten, gelingen.

Die Wissenschaft ist daher insgesamt gefordert praxisnahe, praxistaugliche und wissenschaftlich fundierte,

wirksame und zielführende Maßnahmen für verschiedenste Akteure zu entwickeln und fortlaufend zu überprüfen. In diesem Themenheft werden daher einige exemplarische Arbeiten des Instituts für Bienenschutz vorgestellt, die einen Einblick in die Bandbreite der öko-toxikologischen und agrarökologischen Arbeiten mit Honig- und Wildbienen, als auch das breite Adressatenfeld des Instituts, geben. Die Beiträge zu spezifischen Themen, wie der Entwicklung von Prüfmetho-den für Wildbienen, der Auswirkung von Pflanzenschutzmittel-Tankmischungen auf Honig- und Wildbienen, den spezifischen Methoden der komplexen Rückstandsanalytik für die Untersuchung von Bienenvergiftungen und Forschungsfragen, des Bienenzählers Beecheck als neuartige Langezeit-Messmethode für die Erfassung aller ein- und ausfliegenden Bienen, und die Entwicklung von Monitoringmethoden zeigen einen Ausschnitt der aktuellen Arbeiten.

Über die Vielzahl der Themen gilt es die Gesellschaft mit wissenschaftlich fundierten Erkenntnissen zur Umsetzung zielführender und wirksamer Maßnahmen zur Förderung und einem verbesserten Schutz von Bienen zu versorgen. Dies soll einen Beitrag dazu leisten, die Biodiversität, Bestäubungsleistung und Bienenhaltung, wie auch die Kulturpflanzenproduktion, nicht nur zu erhalten, sondern zum Nutzen aller deutlich zu verbessern.

Harmen P. Hendriksma, Silvio Erler, Henri Greil

Perspectives on long-term bee vitality monitoring

Perspektiven für ein
Langzeit-Bienenvitalitätsmonitoring

123

Abstract

Bees are essential pollinators and their protection is relevant to secure biodiversity and agricultural production. MonViA-project members and partners collaborate in monitoring projects to develop effective policies to support biodiversity in Germany. In the current case-study, the impact of climate on honey bee population performance was assessed. We modeled year-to-year Central-European honey yield changes and found + 1°C temperature change to stimulate annual honey yield by + 0.9 kg per colony, and + 100 mm precipitation to reduce honey yields – 0.4 kg. In regard to different climate change scenarios for Germany, our modelling suggests a potential + 0.4 to + 0.8 kg honey yield gain per colony in 2050, as compared to 2020. We conclude that the German honey bee population may benefit by rising temperatures. We discuss how bee performance is linked to weather and how our analysis would be strengthened by including more data, with a higher temporal and spatial resolution, i.e., intra-annually and -nationally. Pollinator trend monitoring should be extended with analyses that include e.g., extreme weather conditions, disease loads, availability of floral resource, beekeeping practice, land use and landscape structure.

Key words: *Apis mellifera*, honey bees, wild bees, pollinator populations, temperature, precipitation, climate, impact assessment

Zusammenfassung

Bienen sind essentielle Bestäuber und daher ist ihr Schutz von zentraler Bedeutung für die Sicherung der biologischen Vielfalt und der landwirtschaftlichen Produktion. Innerhalb des Projekts MonViA werden viele Partner zusammenarbeiten, um wirksame Strategien zur Förderung der biologischen Vielfalt zu entwickeln. Wir präsentieren eine Langzeit-Fallstudie wie sich Klima auf die Leistungsfähigkeit von Honigbienenvölkern auswirkt. Veränderungen des mitteleuropäischen Honigertrags haben wir in Bezug auf die Änderung von Temperatur und Niederschlag modelliert. Eine + 1°C Temperaturänderung steigert den jährlichen Honigertrag um + 0,9 kg pro Volk, während + 100 mm Niederschlag den Ertrag um – 0,4 kg verringert. Basierend auf Klimawandelprognosen im Zeitraum 2020–2050, schätzen wir eine potenzielle Ertragssteigerung von + 0,4 bis + 0,8 kg Honig pro Volk. Wir schließen daraus, dass die Honigbienenpopulation in Deutschland von steigenden Temperaturen profitieren könnte. Weiterhin diskutieren wir, wie die Bienenleistung mit dem Wetter zusammenhängt und wie unsere Analysen durch die Einbeziehung weiterer Daten, mit einer höheren zeitlichen und räumlichen Auflösung, gestärkt werden könnten. Die Einflüsse extremer Wetterbedingungen, imkerlicher Praxis, Krankheitsbelastung, Verfügbarkeit von Nahrungsressourcen, Landnutzung und auch Landschaftsstrukturen sollten im Rahmen des Monitorings der Bienenvitalität miterfasst werden.

Affiliation

Julius Kühn-Institut (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Bee Protection, Braunschweig, Germany

Correspondence

Dr. Harmen P. Hendriksma, Julius Kühn-Institut (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Bee Protection, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Germany, e-mail: harmen.hendriksma@julius-kuehn.de

Accepted

8 April 2020

Stichwörter: *Apis mellifera*, Honigbienen, Wildbienen, Bestäuberpopulationen, Temperatur, Niederschlag, Klima, Folgenabschätzung

Introduction

Honey bees and non-*Apis* wild bees provide the indispensable service of pollination, for both wild plants as well as crops. Protection of bees therefore is of utmost relevance to human nutrition, society and the environment. The need and urgency for protective measures is high considering the progressive loss of biodiversity, involving decline of vegetation, animals and interlinking ecosystem functions, such as bee-pollination (KEVAN and VIANA, 2018; IPBES, 2019; DIAZ et al., 2019). Earth's entomofauna shows steep declines in many regions (BIESMEIJER et al., 2006; HALLMANN et al., 2017; BIDAU, 2018; LISTER and GARCIA, 2018; POWNEY et al., 2019; FORISTER et al., 2019; SEIBOLD et al., 2019; HALLMANN et al., 2020). However, a baseline with spatially inclusive and comprehensive data is missing, and much needed (DIDHAM et al., 2020). To protect and improve vitality and diversity of bee populations on the long term, we need general trend monitoring to find robust indicators to develop effective measures, to support the performance and vitality of bee-pollinators.

Several factors are implicated in the decline of pollinator populations, including habitat loss (SEIBOLD et al.,

2019), landscape fragmentation, pesticide use (WOODCOCK et al., 2017), parasites and pathogens (SCHROEDER and MARTIN, 2012; CORNELISSEN et al., 2019), and climate change (SÁNCHEZ-BAYO and WYCKHUYS, 2019) as main drivers concerning bees. In terms of floral resource continuity, especially habitat and climate are major drivers in provisioning bees with a balanced and high-quality nutrition (pollen and nectar), in particular at times of rearing offspring. Intensive agricultural production systems often cannot cover nutritional needs for pollinator populations – which may contribute to inadequate crop pollination (Thompson, 2001). The current trend of declining pollinator abundancies within agricultural landscapes may be countered by cross-linking habitats with near-natural vegetation and flowering strips or hedgerows (SCHULTE et al., 2017; DOLEZAL et al., 2019; SEIBOLD et al., 2019).

With this study, we aim to provide perspective on long-term monitoring of honey bee vitality, regarding many interactions, e.g. between land use, climate and bee health. Populations are influenced by many factors that may change over time, thus trend monitoring using long-time data series will help to understand the driving factors to vital pollinator populations. Our broader research scope is framed within a nationwide monitoring of biodiversity in agricultural landscapes called MonViA (see Table 1). Project MonViA aims to investigate which policy measures have a positive influence on agricultural biodiversity, including bee population health and diversi-

Table 1. MonViA project overview.

 National Monitoring of Biological Diversity in Agricultural Landscapes – a project on behalf of the German Federal Ministry of Food and Agriculture, involving the Federal Agency for Agriculture and Food, the Thünen-Institut and Julius Kühn-Institut.	
Why MonViA	Land area in Germany is 50% used for agriculture. According to many studies, agriculture is a key driver of biodiversity decline, and biodiversity changes affect the performance and stability of agricultural production. Key Question: Which measures need to be recommended by policy makers to promote biodiversity, e.g., of bee pollinators?
What we do	The Institute for Bee Protection (Julius Kühn-Institut) works on five subprojects. <ol style="list-style-type: none"> 1) Monitoring of honey bees: Extensive data from various projects exist, e.g. on honey yields, bee health parameters, and population densities. We aim to combine and perform multivariate long-term trend analyses. 2) Monitoring of wild bees: We aim to facilitate the central collection of nationwide recording data on wild bees: from literature research, expert reports, and from collectors. 3) Hymenopterans in orchards and vineyards: A systematic study on management practice impacts on the biodiversity of wild bees and wasps. 4) Citizen Science: A public mobile phone application will collect site-specific data on honey bee and wild bee occurrences. 5) Digital platform: Current and historic data on wild and honey bees, as well as climate and land use, are to be brought together in a national database. The repository is used to improve insight into the effects of land use on distribution and vitality of bees, and to enable regional assessment of pollination services.
How	We will cooperate with many German partners to encompass regional and national datasets on wild and honey bees from institutions, experts, farmers, beekeepers, and citizen scientists.
Need	Long-term, continuous, comprehensive biodiversity data collection for Germany. Within MonViA, monitoring data are harmonized with other national and international monitoring programmes, to allow reciprocal support and advantage.

ty. A large scale monitoring can provide a strong scientific basis for determining measures to promote and fund affirmative action, towards safeguarding appropriate habitats with sufficient resources for bees.

The complexity of climate change is currently much in focus of biodiversity concerns, because not only average weather conditions are shifting, but also extremes such as heat and droughts are increasing (WAGNER, 2020). Global warming may cause mismatched plant-pollinator interactions (SCAVEN and RAFFERTY, 2013; GÉRARD et al., 2020). When native ranges become inhabitable due to climate change, both plants and pollinators may need to shift their habitat ranges, if possible, in particular for highly adapted species. Some native bee species, such as bumble bees in North America and Europe, have been reported to be pushed toward more Northern ranges, or otherwise become extinct (KERR et al 2015; SOROYE et al., 2020). Alternatively, other bee species may profit from a warmer climate. For instance, the Western honey bee (*Apis mellifera*) is an African/Mediterranean species in its evolutionary origin (WHITFIELD et al., 2006), hence this bee potentially performs better if summers in Central-Europe become warmer and dryer.

In the current case-study, we explore to what extent climate affects honey bee colony productivity in Germany. Honey yield per colony is a good proxy to measure colony vitality, because it is based on colony health and the availability of forage in the surrounding habitat. We expect increasing temperature (T) to be beneficial to honey yields, for instance via stimulating bee activity, and by stimulating the growth of floral resources. Precipitation (P) is also essential to colony development, in regard of floral resource development. Notwithstanding, honey bee foraging may be impeded by long periods of rainfall, or by severe drought, thus precipitation may also be a restrictive variable to honey yields (HE et al., 2016). The derivative question is to what extent the whole population is affected by climate change. To answer this, we model the relationship between environmental conditions and colony performance for Central Europe in general, and predict long-term change in colony performance due to climate change for Germany in particular.

Materials and Methods

Honey yield per colony – a proxy for colony performance – was analyzed with linear modeling. We describe how year-to-year honey yield is affected by average annual weather variables. The analysis was performed on relativized data (see below), independent of long-term changes in honey production (e.g., differences in bee-keeping practice, economy, emerging pests, data collection, etc.).

Honey production and bee colony data (1961–2017) was taken from the FAO database (<http://faostat.fao.org>), which is based on data collected by the Deutscher Imkerbund e.V. (D.I.B.- Mitgliederstatistik). We calculated yearly honey yield (Y) data by dividing

honey production (in tons) by population size (number of hives). Weather data, i.e., yearly average temperature and precipitation values for the period 1961–2017 were taken from the CEDA archive (<http://archive.ceda.ac.uk>; CRU CY 4.02). Temperature data (T) were in °C, and precipitation data (P) were in millimeters (see Fig. 1E; 1 mm = 1 L/m²), with precipitation effect size summarized into decimeters (see Fig. 2B; 1 dm). The weather impact analysis on honey yields was performed using data of six Central European countries (EU; n = 342). The countries were Germany and its neighbors (DE, FR, CH, AT, TCH, PO), excluding countries with insufficient data (DK, NL, BE, LU). We fused data of Czech Republic and Slovakia into former Czechoslovakia (TCH) to have a continuous data set for 1961–2017 (MORITZ and ERLER, 2016).

Data analyses and modeling were performed using JMP Pro 15.1.0 software. For Germany, Temperature (T) and precipitation (P) data were analyzed over time by means of linear regression (1961–2017; n = 57 years). Linear Mixed Effects Models were used to assess if honey yields in Central Europe were relatively lower or higher (ΔY) according to years being relatively colder or warmer (ΔT) and/or wetter or dryer (ΔP). The data ΔY , ΔT and ΔP were calculated per country and per whole year, relative to a baseline average of ± 5 neighboring years, e.g., $\Delta Y_{\text{year } x} = Y_{\text{year } x} \text{ minus the decade average } (Y_{\text{years } x-5, x-4, x-3, x-2, x-1, x+1, x+2, x+3, x+4, x+5})$. This weather impact analysis (EU model) included ΔY as response variable, with the predictor variables ΔT and ΔP . We further included country identity as random factor (6 levels), and three interaction terms: $\Delta T \times \Delta P$, $\Delta T \times \text{Country}$, $\Delta P \times \text{Country}$. Non-significant interactions ($p > 0.05$) were removed from the model. The model intercept was set to zero since all data values were relative and on average zero.

Climate change prediction for Germany are listed in Table 2. A best-, an intermediate-, and a worst-case greenhouse gas concentration scenario (Representative Concentration Pathway (RCP) 2.6, 4.5 and 8.5, respectively) were provided by Germany's National Meteorological Service (Deutscher Wetterdienst). We estimated yearly temperature and precipitation averages for years 2020 and 2050, and the change (Δ) over this period, by linear interpolations of baseline values for the period 1971–2000 (8.5°C and 773 mm) and the climate predictions for the period 2031–2060 (Table 2).

Results

The annual population size of honey bee colonies in Germany over the period 1961–2017 was on average 1.3 million hives ± 0.42 SD with an average of 21 thousand tons ± 5.5 SD honey produced per year (n = 57) (Fig. 1; A, B). The yearly honey yield per colony was on average 18.8 kg ± 8.6 SD. Honey yields in Germany are increasing, with + 0.44 kg annually (Fig. 1C; $F_{1,55} = 144.5$, $p < 0.0001$, $R^2 = 0.72$, Formula: Yield = $-853 + 0.438 \times \text{year}$). The absolute honey yield data showed annual autocorrelation (ACF = 0.71), i.e., the honey yield results

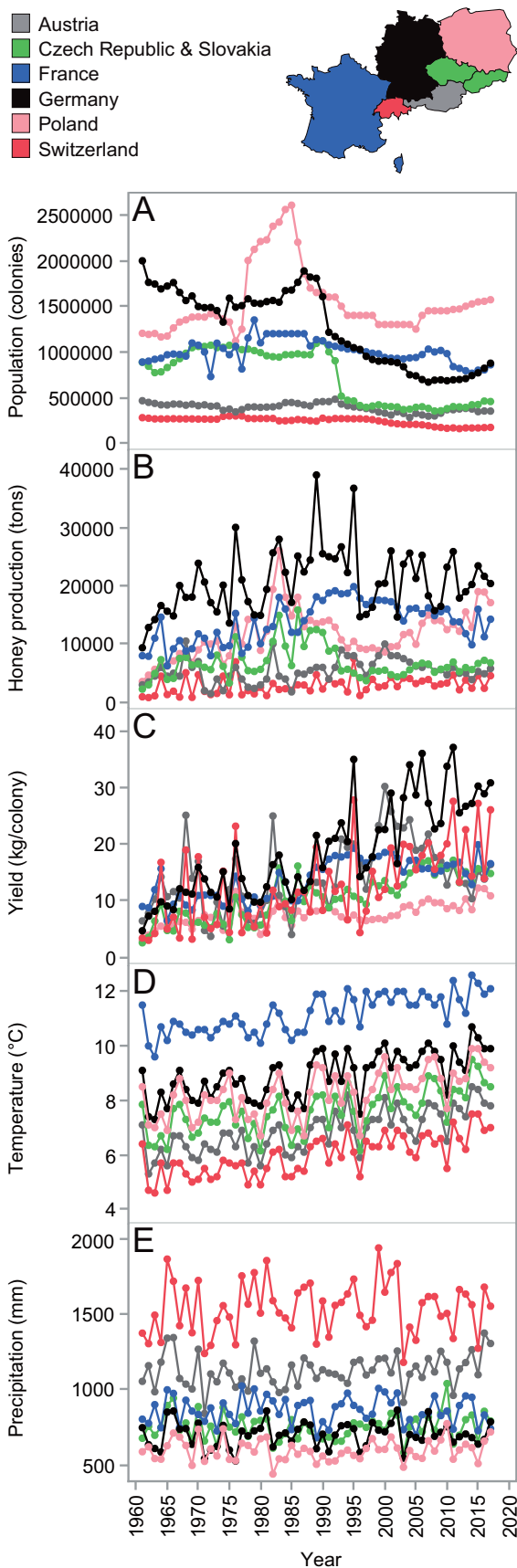


Fig. 1. Central-European honey bee and weather data. Shown are annual data on total honey bee populations (A), total honey productions (B), mean colony yields (C), mean temperatures (D), and mean precipitations (E). Lines connect dots of sequential yearly data, per country (see legend), for the period 1961–2017.

of one year tended to be similar to preceding and/or succeeding years.

Over the period 1961–2017 the yearly mean temperature and precipitation in Germany were $8.9^{\circ}\text{C} \pm 0.8$ SD, and $699 \text{ mm} \pm 83$ SD, respectively. The average temperature in Germany increased significantly, with 1.9°C (Fig. 1D; $F_{1,55} = 46.2$, $p < 0.0001$, $R^2 = 0.46$, Formula: $T = -58.9 + 0.034 \times \text{year}$). Precipitation did not significantly change ($+23 \text{ mm}$) over the period 1961–2017 (Fig. 1E; $F_{1,55} = 0.34$, $p = 0.55$, $R^2 = 0.006$, Formula: $P = -80.7 + 0.39 \times \text{year}$).

Regarding the data of six Central-European countries, we found years with high temperature to stimulate honey yield (Fig. 2A; $\Delta T: F_{1,339.3} = 7.07$, $p = 0.008$), while a high precipitation to reduce yield (Fig. 2B; $\Delta P: F_{1,323.7} = 4.69$, $p = 0.031$). The interaction $\Delta T \times \Delta P$ showed that temperature and precipitation affected honey yields independently ($F_{1,4.88} = 1.35$, $p = 0.30$). The interaction $\Delta T \times \text{Country}$ showed that yield stimulation by temperature is a valid effect for Central Europe in general, since the effect did not differ between particular countries ($F_{1,319.2} = 0.86$, $p = 0.51$). The interaction $\Delta P \times \text{Country}$ result showed that yield decline by precipitation is also a valid effect for Central Europe in general with no difference between countries ($F_{5,323.3} = 0.18$, $p = 0.97$). The three non-significant interactions were removed from the model.

The Central-EU-wide model found $+1^{\circ}\text{C}$ temperature change to stimulate honey yield with $+0.9 \text{ kg}$ per colony, while $+1 \text{ dm}$ precipitation change to reduce honey yield with -0.4 kg per colony (Fig. 2C). A low mean R^2 value of 0.08 ($n = 6$ countries) suggests a weak model fit, with 8% annual yield variation explained by the annual average temperature and precipitation data, and the remaining 92% being unexplained variation.

The EU weather model coefficients (Fig. 2C), combined with a 30 year climate prediction for Germany (Table 2), predict honey yield per colony to increase with $+0.4 \text{ kg}$, $+0.5 \text{ kg}$ or $+0.8 \text{ kg}$, due to climate change, under best-, intermediate-, and worst-case green house gas concentration scenarios, respectively. With the approximate 0.9 million hives in Germany to date, these scenarios reflect a potential national production increase of 383 tons, 484 tons and 677 tons honey in 2050 as compared to 2020, due to climate change. These predictions come with the cautionary note that we ignored autocorrelation trends within temporal datasets, and that we based the predictions on linear relation assumptions.

Discussion

Considering the high economic and natural value of pollination, it is important to maintain healthy bee populations to safeguard adequate pollination for crops and wild plants. However, bee pollinators globally are facing problems, with reduced biodiversity and declines in populations (POTTS et al., 2010; KEVAN and VIANA, 2018). In a case study for Germany, we investigated long-term honey

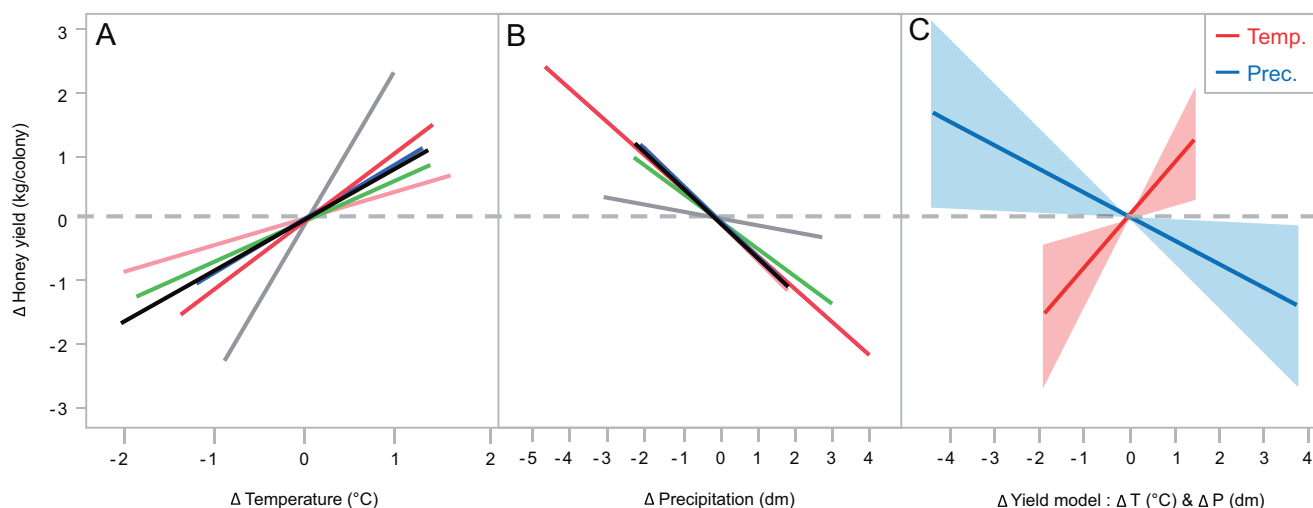


Fig. 2. Impact of annual weather on honey yields. Differences in honey yield ΔY are shown in relation to variance in yearly temperatures ΔT (A), and precipitations ΔP (B) in six Central-European countries (colors shown at Fig. 1). The lines with shaded 95%-CI intervals (C), indicate temperature (red) and precipitation (blue) deviation effects in our year-based honey yield model; $\Delta Y = 0.87 \times \Delta T - 0.39 \times \Delta P$.

Table 2. Climate predictions for Germany. Temperature (T; in $^{\circ}$ C) and precipitation (P; in mm) predictions, given for a best-, intermediate-, and worst-case scenario (RCP 2.6, 4.5, and 8.5). We interpolated data between the periods 1971–2000 (baseline) and 2031–2060, to obtain estimates for years 2020 and 2050, and change (Δ) estimates for this period (in bold). Given values are medians (50th percentile) with a range indication in brackets [15th percentile – 85th percentile].

Climate Predictions	RCP 2.6	RCP 4.5	RCP 8.5
T period 2031–2060	9.7 [9.5 – 10.1]	10.0 [9.6 – 10.4]	10.5 [10.2 – 10.8]
T interpolation year 2020	9.2 [9.1 – 9.4]	9.4 [9.2 – 9.6]	9.7 [9.5 – 9.8]
T interpolation year 2050	9.8 [9.6 – 10.1]	10.1 [9.7 – 10.6]	10.7 [10.3 – 11.0]
ΔT 2020 – 2050	+ 0.6$^{\circ}$C	+ 0.7$^{\circ}$C	+ 1.0$^{\circ}$C
P period 2031–2060	815 [775 – 842]	822 [789 – 851]	825 [775 – 857]
P interpolation year 2020	797 [774 – 813]	801 [782 – 818]	803 [774 – 821]
P interpolation year 2050	818 [775 – 847]	825 [790 – 857]	829 [775 – 863]
ΔP 2020 – 2050	+ 20.9 mm	+ 24.3 mm	+ 25.8 mm

bee colony performance, with a focus on potential effects of climate change. Our model for Central Europe indicated a significant positive impact of higher annual temperature on honey yield, as well as a significant negative impact of annual precipitation on honey yield. Subsequently, changing climate variables (Table 2) might affect the German honey bee population positively, as our estimates predict an increase in honey production.

We suspect two underlying principles to drive effects on honey yield, as measure of honey bee performance. On the one hand, climate affects vegetation development, thus determines the availability and quality of floral resources for bees (OGILVIE et al., 2017). On the other hand, daily weather conditions can affect bee foraging behaviors directly, i.e., by temperature (AUBLET et al., 2009; COMBA, 1999), rain (HE et al., 2016), but also potentially by wind (COMBA, 1999; HENNESSY et al., 2020).

However, in absence of day-to-day environmental data, with parallel data on colony growth, our case-study may merely suggest the causation of climate impact on yearly colony performance (Fig. 2). Additional analyses per season may further differentiate optimal performance conditions for colonies, noting that warmth may stimulate honey yields (this study), yet it may also detriment colony survival during the subsequent winter (SWITANEK et al., 2017). We also note that the largest part in yield data variation remained unexplained. Thus, our aim in context of the MonViA-project is to combine a multitude of long-term data sets, with day-to-day data sets, to improve the impact assessments for bee performance.

In this study, we find that honey yields in several Central European countries respond similarly to temperature and precipitation impacts (Fig 2). Our results are specific to the central-EU region, i.e., as perhaps more rain may

benefit colonies in dryer climates, but not in wetter climates. Similarly, very cold regions may benefit by a temperature increase, while very hot regions may not. We recommend and intend to extend this research further, with additional data of colder and hotter regions included, to estimate climatic ranges for optimal honey bee colony performance, and for assessing the consequences of seasonally dependent changes. Further, a non-linear approach may allow to help identify performance optima, for which we need more data, covering large spatio-temporal scales.

We aim to include vegetation data into performance analyses, to disentangle direct climatic effects on colonies, from indirect climatic impacts via the development and availability of floral resources (nectar and pollen). Regarding vegetation, we note that with 16.7 million hectares about half of the total area of Germany is under agricultural land use. Our bee performance assessments, in context of the MonViA project, will particularly consider agricultural landscapes. For land use and landscape structure are various long-term monitoring data already available (e.g., crops grown, production rates, phenology, intensive versus extensive management practices, use of agrochemicals such as pesticides and fertilizers, near-natural habitats, and heterogeneity and connectivity of landscapes). The combination of continuous datasets via beekeeping statistics, meteorological data, and plant-phenology data, should enable to separate direct and indirect impacts by weather on bees.

Within MonViA, we strive a 100% spatial coverage for Germany, with spatial and temporal extensions of datasets, by means of including historical data and international data, and combining academic data with federally collected statistics, and other available data, like from monitoring by remote sensing. As illustrated with our multi-national data approach (Fig. 2), international context is valuable to corroborate regional or national findings. International data can enrich analyses of data that are not nationally available. For example, colony performance in light of an ongoing epidemiological monitoring of multiple honey bee diseases in Switzerland (VON BÜREN et al., 2019), might be transferable to the German situation.

Noteworthy is the opportunity to investigate the interaction between climate and bee pathogens. As disease pathogenesis can be linked to weather conditions, global warming may indirectly impact bee health and vitality. For example, the reproduction of *Varroa destructor*, a serious brood parasite of honey bee colonies is highly linked to climatic conditions during the winter (NÜRNBERGER et al., 2019). *Ascospaera apis* (chalkbrood) may manifest itself by larval mycosis when bee larvae get chilled (PUERTA et al., 1994). This disease is common in social bees (ARONSTEIN and MURRAY, 2010), but also in solitary bees (TORCHIO, 1992; JAMES, 2005). Understudied is also the pathogenesis of bee viruses that plague colonies, and their potential interaction with climate (DI PRISCO et al., 2011; NATSOPOULOU et al., 2017). It is possible that, especially at times of nutritional stress and/or

under extreme climatic conditions, certain diseases may prosper and contribute to the demise of bee populations.

Managed honey bees undeniably provide essential pollination services, yet the high diversity of species and families of solitary bees deserve more credit and attention as regarding their importance for pollination in agro-ecosystems. As compared to managed honey bees, wild bees are relatively understudied and it is difficult to perform long-term trend monitoring regarding their population statuses. If data sets on honey bees and wild bees are combined, with inclusion of historical data, as well as with data from current monitoring projects, meta-level analyses opportunities are enabled. For example, regarding stability and vitality of parallel living bee populations in Germany, over time, a positive trend observed for one bee population may be shared by another, for instance in response to floral improvement via global warming. In contrast, negative interaction of concern are that certain bees may outcompete others via floral resource collection (STEFFAN-DEWENTER and TSCHARNTKE, 2000; MALLINGER et al., 2017), and that pathogens can be transmitted between species (DOLEZAL et al., 2016; GRAYSTOCK et al., 2015; MALLINGER et al., 2017), meanwhile impacting populations of bees, and plants, differentially (GÉRARD et al., 2020).

To our perspective, many of the factors that drive honey bee colony productivity, may hold validity for the performance of wild bees too, e.g., regarding floral resources, pesticide exposure, diseases, etc., alongside broader societal effects like land-use change. To date, the majority of studies into pollinator declines focus on honey bees, and to a lesser extent on bumble bees. For Germany, but also for the world in general, there is a notable lack of information on the solitary bees, which make up the majority, over 85%, of the estimated 25,000–30,000 species of bees worldwide (BATRA, 1984). The identification of wild bees is time-intensive and expertise is very scarce, resulting in datasets which tend to be regional and not open-source. However, in light of progressive ease of data-management in this age of digitization, we aim to direct effort to make expert data on wild bee populations available, to perform inter-regional trend monitoring (i.e., national and international). The multitude of investigations on individual, population, and ecosystem levels should enable a scientific data driven approach to support insect populations.

The use of an overarching data platform, as foreseen in project MonViA, envisions further integrations with pollinator relevant datasets. For honey bees, the integration of epidemiological data on bee diseases, pesticide damages, and beekeeper data collections, are valuable for the monitoring of long-term population health measures. In addition, spatio-temporal use of pesticide application data in agriculture may reveal the impact of detrimental agrochemical applications. Integration of land use data, such as remote sensing data on crops and landscape structures, may help explain inter-regional variation in bee performance.

With the current momentum of increasing computation power, and genetic data analyses capacities, also population genetics are valuable metrics to consider, for instance in regard of the stability and resilience of environmentally challenged populations (MATIAS et al., 2017; THEODOROU et al., 2018; THEODOROU et al., 2020). Mating frequency of honey bee queens reduce under more rainy conditions (EL-NIWEIRI and MORITZ, 2011), which may negatively affect queen performance (e.g., egg laying), and the lower degree of polyandry may limit colony performance (i.e., due to a low gene diversity and lower disease resistance). For honey bees in particular, different breeding lines are a very interesting variable to consider in regard to colony performance. Some strains may be climatically better adjusted, while others may perform relatively better under pressure of disease and parasites, e.g., *Varroa destructor* (NÜRNBERGER et al., 2019).

Many citizen science initiatives represent great opportunities in support of bee population monitoring. Data collected by lay persons can support the analyses of scientific data collections (BRODSCHNEIDER et al., 2019). Ecosystem monitoring efforts for wild bees can be supported via, e.g., species identification for biodiversity assessment. For honey bees, the involvement of beekeepers as citizen scientists is extremely valuable. Data on colony health can flow both from and toward beekeepers, noting that honey bee colony health depends on the extent to which beekeepers are informed on beekeeping practices (JACQUES et al., 2017). Access to honey bee colony data is essential within the MonViA project, for instance, to allow making resilience estimates. Whereas small colonies are likely relatively vulnerable, large colonies may be able to buffer climatic impact and better bridge times of nutritional scarcity. Yet above all, honey bee colonies are managed, which involves essential information regarding beekeeping practices. The feeding of colonies, the treatment of parasites and diseases, the travel with colonies toward floral resources, are all beekeeping interventions, likely highly explanatory to colony growth, productivity and survival. Hence, an essential component in the analyses of honey bee colony performances is the consideration of beekeeping practices (GENERSCH et al., 2010).

With the MonViA project we aim to provide an internationally linkable data resource for agricultural landscapes and beyond, to monitor national long-term biodiversity trends, in support pollinators and safeguard biodiversity as a whole. Based on our modelling results, we conclude that the honey bee population in Germany could potentially benefit by rising Central-European temperatures. Albeit, population level data analyses based on yearly country averages (Fig. 1) are most certainly less powerful to assess environmental impacts on colony performance, as compared to within year colony level data. Notwithstanding, the combination of different research approaches can enable to bridge knowledge gaps, e.g., between short-term causality findings, and observed long-term population trends.

Acknowledgments

The presented study is part of the joint project ‘Farmland biodiversity Monitoring’ (MonViA) that has been funded by the Federal Ministry of Food and Agriculture. We are much obliged to Stephan HÄRTEL and Robin F. A. MORITZ for reviewing the manuscript before submission. Torsten ELLMANN and Olaf LÜCK are kindly thanked for sharing Deutscher Imkerbund e.V. Mitgliederstatistik data. Thomas LEPPERT from the Deutscher Wetterdienst (Abteilung Agrarmeteorologie) is kindly thanked for providing RCP scenario-based climate model predictions. We are grateful to Abdulrahim T. ALKASSAB, André KRAHNER and Jens PISTORIUS for their input and discussion.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.


References

- ARONSTEIN, K.A., K.D. MURRAY, 2010: Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S20–S29, DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.018.
- AUBLET, J.F., M. FESTA-BIANCHET, D. BERGERO, B. BASSANO, 2009: Temperature constraints on foraging behaviour of male Alpine ibex (*Capra ibex*) in summer. *Oecologia*, **159** (1), 237e247.
- BATRA, S.W.T., 1984: Solitary Bees. *Scientific American* **250**, 120–127.
- BIDAU, C.J., 2018: Doomsday for insects? The alarming decline of insect populations around the world. *Entomology, Ornithology and Herpetology* **7**, 1000e1130, DOI: 10.4172/2161-0983.1000e130.
- BIESMEIJER, J.C., S.P. ROBERTS, M. REEMER, R. OHLEMÜLLER, M. EDWARDS, T. PEETERS, A.P. SCHAFFERS, S.G. POTTS, R. KLEUKERS, C.D.O. THOMAS, J.O. SETTELE, W.E. KUNIN, 2006: Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* **313** (5785), 351–354, DOI: 10.1126/science.1127863.
- BRODSCHNEIDER, R., K. GRATZER, E. KALCHER-SOMMERSGUTER, H. HEIGL, W. AUER, R. MOOSBECKHOFER, K. CRAILSHEIM, 2019: A citizen science supported study on seasonal diversity and monoflorality of pollen collected by honey bees in Austria. *Scientific Reports* **9**, 16633, DOI: 10.1038/s41598-019-53016-5.
- CLARKE, D., D. ROBERT, 2018: Predictive modelling of honey bee foraging activity using local weather conditions. *Apidologie* **49**, 386–396, DOI: 10.1007/s13592-018-0565-3.
- COMBA, L., 1999: Patch use by bumblebees (hymenoptera apidae): Temperature, wind, flower density and traplining. *Ethology Ecology and Evolution*, **11** (3), 243e264, DOI: 10.1080/08927014.1999.9522826.
- CORNELISSEN, B., P. NEUMANN, O. SCHWEIGER, 2019: Global warming promotes biological invasion of a honey bee pest. *Global Change Biology* **25** (11), 3642–3655, DOI: 10.1111/gcb.14791.
- DIDHAM, R.K., Y. BASSET, C.M. COLLINS, S.R. LEATHER, N.A. LITTLEWOOD, M.H.M. MENZ, J. MÜLLER, L. PACKER, M.E. SAUNDERS, K. SCHÖNRÖGGE, A.J.A. STEWART, S.P. YANOVIK, C. HASSALL, 2020: Interpreting insect declines: seven challenges and a way forward. *Insect Conservation and Diversity* **13**, 103–114; DOI: 10.1111/icad.12408.
- DI PRISCO, G., X. ZHANG, F. PENNACCHIO, E. CAPRIO, J. LI, J.D. EVANS, G. DEGRANDI-HOFFMAN, M. HAMILTON, Y.P. CHEN, 2011: Dynamics of Persistent and Acute Deformed Wing Virus Infections in Honey Bees, *Apis mellifera*. *Viruses* **3** (12), 2425–2441, DOI: 10.3390/v3122425.
- DIAZ, S., J. SETTELE, E.S. BRONDÍZIO, H.T. NGO, J. AGARD, A. ARNETH, P. BALVANERA, K.A. BRAUMAN, S.H.M. BUTCHART, K.M.A. CHAN, L.A. GARIBALDI, K. ICHII, J. LIU, S.M. SUBRAMANIAN, G.F. MIDGLEY, P. MILOSLAVICH, Z. MOLNÁR, D. OBURA, A. PFAFF, S. POLASKY, A. PURVIS, J. RAZZAQUE, B. REYERS, R.R. CHOWDHURY, Y.J. SHIN, I. VISSEREN-HAMAKERS, K.J. WILLIS, C.N. ZAYAS, 2019: Pervasive human-driven decline of life on Earth points to the need for transformative change. *Science*, **366** (6471), eaax3100, DOI: 10.1126/science.aax3100.


- DOLEZAL, A.G., S.D. HENDRIX, N.A. SCAVO, J. CARRILLO-TRIPP, M.A. HARRIS, M.J. WHEELLOCK, M.E. O'NEAL, A.L. TOTH, 2016: Honey Bee Viruses in Wild Bees: Viral Prevalence, Loads, and Experimental Inoculation. *PLOS ONE* **11** (11), e0166190, DOI: 1371/journal.pone.0166190.
- DOLEZAL, A.G., A.L. ST. CLAIR, G. ZHANG, A.L. TOTH, M.E. O'NEAL, 2019: Native habitat mitigates feast–famine conditions faced by honey bees in an agricultural landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **116** (50), 25147–25155, DOI: 10.1073/pnas.1912801116.
- EL-NIWEIRI, M.A.A., R.F.A. MORITZ, 2011: Mating in the rain? Climatic variance for polyandry in the honeybee (*Apis mellifera jemenitica*). *Population Ecology* **53**, 421–427, DOI: 10.1007/s10144-011-0271-8.
- FORISTER, M.L., E.M. PELTON, S.H. BLACK, 2019: Declines in insect abundance and diversity: we know enough to act now. *Conservation Science and Practice* **1**, e80, DOI: 10.1111/csp.2.80.
- GENERSCH, E., W. VON DER OHE, H. KAATZ, A. SCHROEDER, C. OTTEN, R. BÜCHLER, S. BERG, W. RITTER, W. MÜHLEN, S. GISDER, M. MEIXNER, G. LIEBIG, P. ROSENKRANZ, 2010: The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* **41**, 332–352, DOI: 10.1051/apido/2010014.
- GÉRARD, M., M. VANDERPLANCK, T. WOOD, D. MICHEZ, 2020: Global warming and plant–pollinator mismatches. Emerging topics in life sciences ETL20190139, DOI: 10.1042/ETLS2019019.
- GRAYSTOCK, P., D. GOULSON, W.O.H. HUGHES, 2015: Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282** (1813), 20151371, DOI: 10.1098/rspb.2015.1371.
- HALLMANN, C.A., M. SORG, E. JONGEJANS, H. SIEPEL, N. HOFLAND, H. SCHWAN, W. STENMANS, A. MÜLLER, H. SUMSER, T. HÖRREN, D. GOULSON, H. DE KROON, 2017: More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLOS One*, **12** (10), e0185809, DOI: 10.1371/journal.pone.0185809.
- HALLMANN, C.A., T. ZEEGERS, R. VAN KLINK, R. VERMEULEN, P. VAN WIELINK, H. SPLJKERS, J. VAN DELK, W. VAN STEENIS, E. JONGEJANS, 2020: Declining abundance of beetles, moths and caddisflies in the Netherlands. *Insect Conservation and Diversity* **13** (2), 127–138, DOI: 10.1111/icad.12377.
- HE, X.J., L.Q. TIAN, X.B. WU, Z.J. ZENG, 2016: RFID monitoring indicates honeybees work harder before a rainy day. *Insect Science* **23**, 157–159, DOI: 10.1111/1744-7917.12298.
- HENNESSY, G., C. HARRIS, C. EATON, P. WRIGHT, E. JACKSON, D. GOULSON, F.F.L.W. RATNIEKS, 2020: Gone with the wind: effects of wind on honey bee visit rate and foraging behavior. *Animal Behaviour* **161**, 23e31, DOI: 10.1016/j.anbehav.2019.12.018.
- IPBES, 2019: Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. *Global Assessment Report on Biodiversity and Ecosystem Services*. IPBES Secretariat, Paris, France.
- JACQUES, A., M. LAURENT, EPILOBEE CONSORTIUM, M. RIBIÈRE-CHABERT, M. SAUSSAC, S. BOUGARD, G.E. BUDGE, P. HENDRIKX, M.P. CHAUZAT, 2017: A pan-European epidemiological study reveals honey bee colony survival depends on beekeeper education and disease control. *PLOS ONE* **12** (3), e0172591, DOI: 10.1371/journal.pone.0172591.
- JAMES, R.R., 2005: Temperature and chalkbrood development in the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata*. *Apidologie* **36** (1), 15–23, DOI: 10.1051/apido:2004065.
- KERR, J.T., A. PINDAR, P. GALPERN, L. PACKER, S.G. POTTS, S.M. ROBERTS, P. RASMONT, O. SCHWEIGER, S.R. COLLA, L.L. RICHARDSON, D.L. WAGNER, L.F. GALL, D.S. SIKES, A. PANTOJA, 2015: Climate change impacts on bumblebees converge across continents. *Science* **349**, 177–180, DOI: 10.1126/science.aaa7031.
- KEVAN, P.G., B.F. VIANA, 2018: The global decline of pollination services. *Biodiversity* **4** (4) 3–8, DOI: 10.1080/14888386.2003.9712703.
- LISTER, B.C., A. GARCIA, 2018: Climate-driven declines in arthropod: abundance restructure a rainforest food web. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **115**, E10397.
- MALLINGER, R.E., H.R. GAINES-DAY, C. GRATTON, 2017: Do managed bees have negative effects on wild bees?: A systematic review of the literature. *PLOS ONE* **12** (12), e0189268, DOI: 10.1371/journal.pone.0189268.
- MATIAS, D.M.S., C. BORGEMEISTER, H. VON WEHRDEN, 2017: Thinking beyond Western commercial honeybee hives: towards improved conservation of honey bee diversity. *Biodiversity and Conservation* **26**, 3499–3504, DOI: 10.1007/s10531-017-1404-y.
- MORITZ, R.F.A., S. ERLER, 2016: Lost colonies found in a data mine: Global honey trade but not pests or pesticides as a major cause of regional honeybee colony declines. *Agriculture Ecosystems and Environment* **216**, 44–50, DOI: 10.1016/j.agee.2015.09.027.
- NATSOPOULOU, M.E., D.P. MCMAHON, V. DOUBLET, E. FREY, P. ROSENKRANZ, R.J. PAXTON, 2017: The virulent, emerging genotype B of Deformed wing virus is closely linked to overwinter honeybee worker loss. *Scientific Reports* **7**, 5242, DOI: 10.1038/s41598-017-05596-3.
- NÜRNBERGER, F., S. HÄRTEL, I. STEFFAN-DEWENTER, 2019: Seasonal timing in honey bee colonies: phenology shifts affect honey stores and varroa infestation levels. *Oecologia* **189**, 1121–1131, DOI: 10.1007/s00442-019-04377-1.
- OGLIVIE, J.E., S.R. GRIFFIN, Z.J. GEZON, B.D. INOUE, N. UNDERWOOD, D.W. INOUE, R.E. IRWIN, 2017: Interannual bumble bee abundance is driven by indirect climate effects on floral resource phenology. *Ecology Letters* **20**, 1507–1515, DOI: 10.1111/ele.12854.
- POTTS, S.G., S.P.M. ROBERTS, R. DEAN, G. MARRIS, M.A. BROWN, R. JONES, P. NEUMANN, J. SETTELE, 2010: Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research* **49**: 15–22, DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.02.
- POWNEY, G.D., C. CARVELL, M. EDWARDS, R.K.A. MORRIS, H.E. ROY, B.A. WOODCOCK, N.J.B. ISAAC, 2019: Widespread losses of pollinating insects in Britain. *Nature Communications* **10**, 1018, DOI: 10.1038/s41467-019-08974-9.
- PUERTA, F., J.M. FLORES, M. BUSTOS, F. PADILLA, F. CAMPANO, 1994: Chalkbrood development in honeybee brood under controlled conditions. *Apidologie* **25** (6), 540–546, DOI: 10.1051/apido:19940604.
- SÁNCHEZ-BAYO, F., K.A.G. WYCKHUYS, 2019: Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation* **232**, 8–27, DOI: 10.1016/j.biocon.2019.01.020.
- SCAVEN, V.L., N.E. RAFFERTY, 2013: Physiological effects of climate warming on flowering plants and insect pollinators and potential consequences for their interactions. *Current zoology* **59** (3), 418–426, DOI: 10.1093/czoolo/59.3.418.
- SCHROEDER, D.C., S.J. MARTIN, 2012: Deformed wing virus - The main suspect in unexplained honeybee deaths worldwide. *Virulence* **3** (7), 589–591, DOI: 10.4161/viru.22219.
- SCHULTE, L.A., J. NIEMI, M.J. HELMERS, M. LIEBMAN, J.G. ARBUCKLE, D.E. JAMES, R.K. KOLKA, M.E. O'NEAL, M.D. TOMER, J.C. TYNDALL, H. ASBJORNSEN, P. DROBNEY, J. NEAL, G. VAN RYSWYK, C. WITTE, 2017: Prairie strips improve biodiversity and the delivery of multiple ecosystem services from corn–soybean croplands. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **114** (42), 11247–11252, DOI: 10.1073/pnas.1620229114.
- SEIBOLD, S., M.M. GOSSNER, N.K. SIMONS, N. BLÜTHGEN, J. MÜLLER, D. AMBARLI, C. AMMER, J. BAUHUS, M. FISCHER, J.C. HABEL, K.E. LINSSENMAIR, T. NAUSS, C. PENONE, D. PRATI, P. SCHALL, E.D. SCHULZE, J. VOGT, S. WÖLLAUER, W.W. WEISSER, 2019: Arthropod decline in grasslands and forests is associated with landscape-level drivers. *Nature* **574**, 671–674, DOI: 10.1038/s41586-019-1684-3.
- SOROYE, P., T. NEWBOLD, J. KERR, 2020: Climate change contributes to widespread declines among bumble bees across continents. *Science* **367**, 685–688, DOI: 10.1126/science.aax8591.
- STEFFAN-DEWENTER, I., T. TSCHARNTKE, 2000: Resource overlap and possible competition between honey bees and wild bees in central Europe. *Oecologia* **122**, 288–296, DOI: 10.1007/s004420050034.
- SWITANEK, M., K. CRAILSHEIM, H. TRUHETZ, R. BRODSCHNEIDER, 2017: Modelling seasonal effects of temperature and precipitation on honey bee winter mortality in a temperate climate. *Science of the Total Environment* **579**, 1581–1587, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.11.178.
- TEDESCO, P.A., R. BIGORNE, A.E. BOGAN, X. GIAM, L.C. JÉZÉQUE, B. HUGUENY, 2014: Estimating how many undescribed species have gone extinct. *Conservation Biology* **28**, 1360–1370, DOI: 10.1111/cobi.12285.
- THEODOROU, P., R. RADZEVIČIŪTĖ, B. KAHNT, A. SORO, I. GROSSE, R.J. PAXTON, 2018: Genome-wide single nucleotide polymorphism scan suggests adaptation to urbanization in an important pollinator, the red-tailed bumblebee (*Bombus lapidarius* L.). *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences* **285**, 20172806, DOI: 10.1098/rspb.2017.2806.
- THEODOROU, P., R. RADZEVIČIŪTĖ, G. LENTENDU, B. KAHNT, M. HUSEMANN, C. BLEIDORN, J. SETTELE, O. SCHWEIGER, I. GROSSE, T. WUBET, T.E. MURRAY, R.J. PAXTON, 2020: Urban areas as hotspots for bees and pollination but not a panacea for all insects. *Nature Communications* **11**, 576, DOI: 10.1038/s41467-020-14496-6.
- THOMSON, J.D., 2001: Using pollination deficits to infer pollinator declines: Can theory guide us? *Conservation Ecology* **5** (1), 6.
- TORCHIO, P.F., 1992: Effects of Spore Dosage and Temperature on Pathogenic Expressions of Chalkbrood Syndrome Caused by *Ascosphaera torchioi* within Larvae of *Osmia lignaria* propinqua (Hymenoptera: Megachilidae). *Environmental Entomology* **21** (5), 1086–1091, DOI: 10.1093/ee/21.5.1086.
- VON BÜREN, R.S., B. OEHEM, N.J. KUHN, S. ERLER, 2019: High-resolution maps of Swiss apiaries and their applicability to study spatial dis-

- tribution of bacterial honey bee brood diseases. *PeerJ* 7, e6393, DOI: 10.7717/peerj.6393.
- WAGNER, D.L., 2020: Insect Declines in the Anthropocene. *Annual Review of Entomology* 65 (1), 457-480, DOI: 10.1146/annurev-ento-011019-025151.
- WHITFIELD, C.W., S.K. BEHURA, S.H. BERLOCHER, A.G. CLARK, J.S. JOHNSTON, W.S. SHEPPARD, D.R. SMITH, A.V. SUAREZ, D. WEAVER, N.D. TSUTSUI, 2006: Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* 314 (5799), 642–645, DOI: 10.1126/science.1132772.
- WOODCOCK, B.A., J.M. BULLOCK, R.F. SHORE, M.S. HEARD, M.G. PEREIRA, J. REDHEAD, L. RIDDING, H. DEAN, D. SLEEP, P. HENRYS, J. PEYTON, S. HULMES, L. HULMES, M. SÁROSPATAKI, C. SAURE, M. EDWARDS, E. GENERSCH, S. KNÄBE, R.F. PYWEL, 2017: Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science* 356 (6345), 1393-1395, DOI: 10.1126/science.aaa1190.

© The Author(s) 2020.

 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).

© Der Autor/Die Autorin 2020.

 Dies ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt wird (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

Sven Bermig¹, Richard Odemer¹, Alina J. Gombert¹, Malte Frommberger¹, Ralf Rosenquist², Jens Pistorius¹

Experimental validation of an electronic counting device to determine flight activity of honey bees (*Apis mellifera* L.)

Validierung eines elektronischen Bienenzählers zur Bestimmung der Flugaktivität

Abstract

In this work, a functional prototype of the BeeCheck counting device was evaluated for its accuracy to validate its suitability for scientific purposes. Two different approaches were applied: (i) we manually compared electronic data of the counting device by video recordings of entry and exit events, and (ii) by using the so-called “robber’s test” in a tunnel tent. The results showed an expected temperature dependency of the general flight activity. Difficulties occurred with certain activities at the hive entrance. The various running speeds of individuals, approaching or stuck bees, and bees moving back and forth in the tube were a challenge for sensor technology and the mathematical algorithm. To minimize such mistakes and to increase the counting accuracy, it is necessary to correct the algorithm accordingly. This will be addressed in the “V-I-Bee” follow-up project and future perspectives of using an improved counting device are discussed.

Key words: BeeCheck, automatic bee counter, risk assessment, smart beekeeping, capacitive sensor

werden, um seine Tauglichkeit für den wissenschaftlichen Einsatz zu validieren. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt: (i) Vergleich der elektronischen Daten des Zählgerätes durch Videoaufnahmen von Ein- und Ausflügen mit manueller Auswertung durch einen Beobachter sowie (ii) die Validierung mittels „Räubertest“ im bienendichten Zelt. Die Ergebnisse zeigten eine zu erwartende Temperatur Abhängigkeit der Flugaktivität sowie die Fehleranfälligkeit bei gewissen Aktivitäten am Flugloch. So waren unterschiedliche Geschwindigkeiten, sich entgegenkommende oder im Flugloch verharrende Bienen, sowie sich vor- und rückwärts bewegende Bienen eine Herausforderung für den Algorithmus, der aus den gemessenen Sensordaten die Bienen-transaktionen ableitet. Um diese Grenzfälle zu minimieren und die Zählgenauigkeit zu erhöhen, ist es notwendig den Algorithmus entsprechend korrektiv anzupassen. Dies soll im Folgeprojekt „Etablierung digitaler Indikatoren der Bienenvitalität in Agrarlandschaften – V-I-Bee“ angegangen werden.

Stichwörter: BeeCheck, automatisierter Bienenzähler, Risikobewertung, digitales Bienenvolk, kapazitive Sensorik

Zusammenfassung

Ein Funktionsprototyp des Bienenzählers BeeCheck sollte in dieser Arbeit auf seine Genauigkeit hin überprüft

Introduction

For nearly 100 years, there were efforts to develop appropriate methods to count honey bees (*Apis mellifera* L.)

Affiliations

Julius Kühn-Institut (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Bee Protection, Braunschweig, Germany¹
GERO Meßsysteme GmbH, 38112 Braunschweig, Germany²

Correspondence

Dr. Richard Odemer, Julius Kuehn-Institute (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Bee Protection, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Germany, e-mail: richard.odemer@julius-kuehn.de

Sven Bermig, Thüringer Landesamt für Landwirtschaft und Ländlichen Raum, Referat 21 – Futtermittel- und Marktüberwachung, Düngung und Bodenschutz, Naumburger Str. 98, 07743 Jena, Germany, e-mail: sven.bermig@tllr.thueringen.de

Accepted

7 April 2020

with the aid of machines. Working on his Ph.D. thesis, LUNDIE (1925) describes for the first-time what knowledge gain such a bee counter could contribute to (Fig. 1). Correlating honey flow and flight activity to determine how much and at what time plants produce nectar was called the first and most important point. Second, LUNDIE mentions the recording of various environmental influences on bees. With the first point representing a more general beekeeping interest, the second point also reflects scientific questions that are currently discussed in bee research (CHMIEL et al., 2020).

A standard method for estimating the strength of bee colonies is the “Liebefeld method” (IMDORF et al., 1987). Mainly applied and established in Europe, this method is also used globally as part of higher tier testing regimes for plant protection products (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2007). It requires the beekeeper to pull out every single comb to estimate adjacent bees. For this purpose, a special frame is employed, analogous to the frame size used in the hives. In this special frame, a grid forms squares of 10 dm² and equals to 125 bees per square. Now, each comb can be estimated by pushing the bees theoretically into these squares and counting the units (squares). In addition to bees, the extent of brood and the number of stocks (nectar, pollen) can also be recorded (LIEBIG, 2013). Such external influences are reflected in the population dynamics of the estimated colonies (increases and decreases). The main disadvantage of this method lies in its high expenditure, a lot of time and personnel is required which culminates in a huge invasive operation for each bee colony. To measure effects with high resolution, colonies must be estimated at relatively short time intervals. Hence, there is always a risk to damage the queen or to cause distur-

bance within the colony cluster that may lead to a reduction of the brood.

A less invasive methodology that contrasts with the above mentioned is the use of RFID technology (radio-frequency identification). Foragers are identified that are familiar with the surroundings and caught. Subsequently, small microchips are glued to the dorsal side of the thorax, and worker bees are exposed to environmental stressors (e.g. pesticide feeding). In a next step, success and duration of homing flights can be evaluated (JEKER and GROSSAR, 2020). Currently, this technology is still very expensive (approximately 1 Euro per chip) and the performance is low. Reproducible results require several hundred chips, which usually cannot be reused. Besides, only a small part of the total population can be mapped (few 100 bees per colony of up to 35,000) consisting of old bees only (foragers). Since the return rates in the control often vary substantially, results may not always be interpreted correctly. Capturing, gluing and releasing the workers must be coordinated in a complex manner. Counting bees without RFID chips would also be possible and more cost-efficient, but also more time-consuming and inconvenient for large study designs (ODEMER et al., 2018).

Looking at the above-mentioned disadvantages, an increasing degree of automation would thus provide benefits in terms of temporal resolution, lower acquisition costs, and less invasive operations at the colony level. However, counting devices with infrared technology, for example, appeared impractical and too imprecise so far (LIU et al., 1990; STRUYE, 1999). In addition to cloud-based technologies, current development covers automated visual, camera-based systems using artificial intelligence (AI) (JIANG et al., 2016; GONSIOR et al., 2020; TAUSCH et al., 2020).

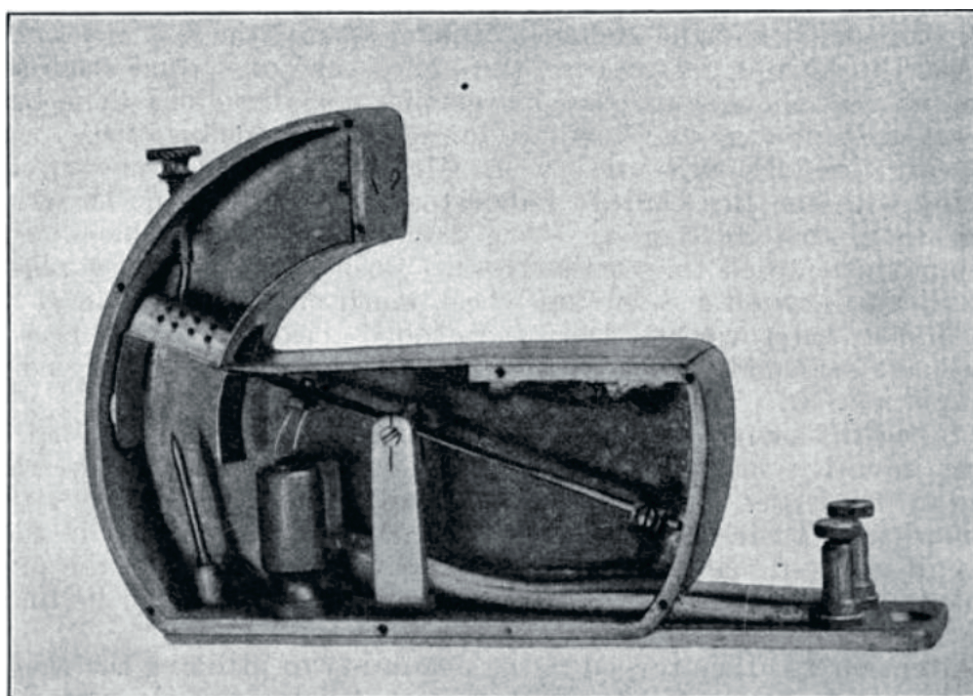


Fig. 1. Illustration of an incoming gate as part of the first automated bee-counter. An electrical circuit is closed as soon as the bee passes through the gate (from LUNDIE, 1925).

These optical systems usually require a high level of maintenance. Transparent surfaces that are in contact with bees and necessary for video tracking have to be cleaned frequently as they get dirty quickly. A somewhat different approach was introduced by CAMPBELL et al. (2005) in a study with bumblebees (*Bombus impatiens*). Instead of an optical system, the authors used a capacitive sensor. This can provide the same information as an optical sensor, but it also provides information about the size and speed of the individual to be measured and requires less maintenance. With honey bees, this could be particularly useful to distinguish between drones and workers or also between foragers loaded with pollen and/or nectar. With support from the DBU (German Federal Environmental Foundation), the project partner Gero Meßsysteme GmbH from Braunschweig and the Institute for Bee Protection (JKI), a new electronic bee counter the “BeeCheck” was developed as part of a cooperation project. The device is equipped with 24 single entrance tubes, each containing seven capacitive sensors (Fig. 2). This unique feature clearly distinguishes the BeeCheck from previously established devices.

The new counter was developed against the background to reduce not only colony disturbance to a minimum by using the entire width of the hive entrance, but also to be independent of external energy supply in the field. Further, reliable and precise counting results should be delivered, accessible online for remote monitoring. The functional prototype has been completed, which already features decisive functional properties. In a follow-up project (V-I-Bee) teething troubles should be eliminated, a stable working state established and the practical suitability should be enhanced. With this refinement, the BeeCheck can provide novel insights in bee behavior and promote new study designs for regulatory risk assessment.

Materials and methods

The basis of the data acquisition of the BeeCheck is a capacitive measuring system, which is integrated in a hive bottom for the “Hohenheimer Einfachbeute” hive type (Fig. 2). Other hive dimensions can be easily adapted. It comprises 24 entrance tubes made of PE plastic, with seven capacitive sensors installed in each tube (Fig. 3). The circuit board with the sensors is located below the tubes through which the bees have to pass to get outside or into the hive. As a result, their direction of movement is automatically detected by the sensor units (DEUTSCHE BUNDESTIFTUNG UMWELT, 2015–2019).

The electric capacity changes due to the passage of the bees. Hence, each bee acts as dielectric due to its body water content. The capacitance of the sensor changes and can ultimately be rendered as a signal. The signals of each sensor in all entrance tubes sample four times per second (= 4 Hz) and provide a very large amount of data. Extrapolated per day, this would generate 10,000 printed pages.

Such enormous amounts of data are managed in the best possible way only by a technical solution. The BeeCheck, therefore, comes with a built-in algorithm that evaluates which signals represent entering or exiting of a bee. However, the main challenges to date are partially passing bees that stay in the tube for a while or bees coming towards one another in the same tube, which in turn cannot be counted as an entry or exit. Also, the different running speed of the bees is a challenge for the acquisition. Particularly, slow walking or long stays in the tube can lead to incorrect measurements. The algorithm is, overall, required to display a daily balance of incoming and outgoing bees. Its precision currently provides minute-by-minute up to second-by-second accuracy.

As is often the case with algorithm-based measurement systems, it is necessary to find ways in which the



Fig. 2. BeeCheck device. A: Front view of the BeeCheck device. B: Hive bottom with the entrance tubes mounted on an exchangeable drawer tablet. C: Close-up of the 24 entrance tubes (rear-view).

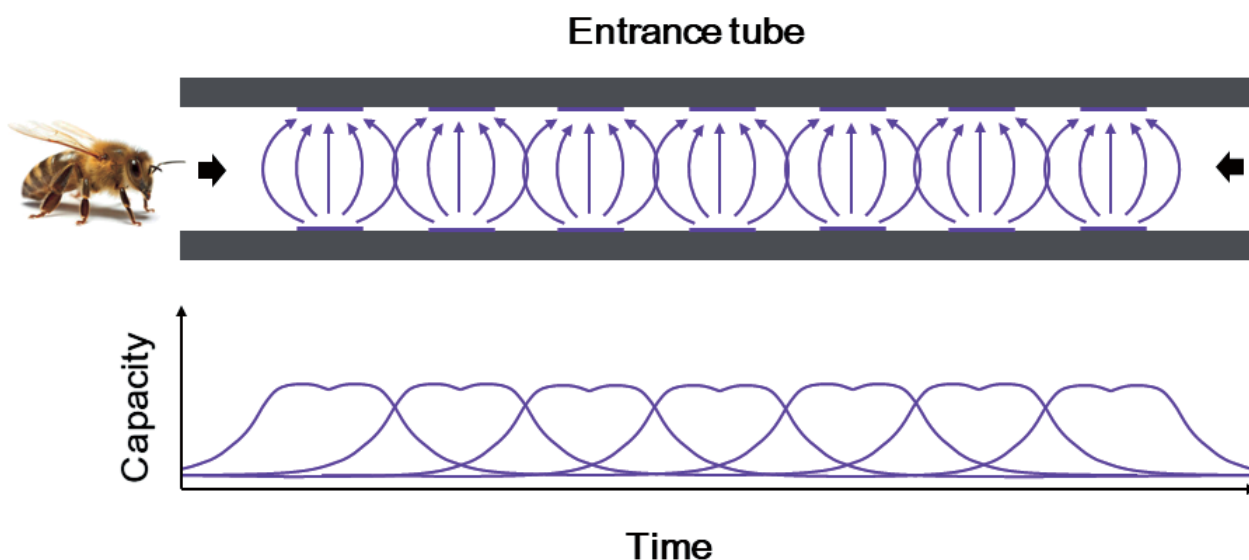


Fig. 3. Schematic view of the sensor arrangement in the entrance tube and idealized capacitive measurement curves. The bee enters from the left and must pass all seven sensors to reach the hive and *vice versa*.

values recorded by the algorithm can be checked and validated (BONNIFAIT and GARCIA, 1996). For this purpose, two different validation approaches were employed; (i) video analysis was conducted to match the counts of the algorithm with user observations and (ii) the experimental method by (STRUYE, 1999) for infrared sensors was tested and further refined in semi-field experiments.

Video observation

At various points during the bee season, the BeeCheck device was integrated into different field trials with crops attractive for bees (oilseed rape, phacelia) to encourage foraging. We used various *A. mellifera* colonies from our own stock and of different strengths (5,000–10,000 bees/colony). Subsequently, cameras were set up in front of the hive entrances and 3-minute videos were recorded at different times of the day considering different weather situations and agricultural practices (e.g. crop protection application). The videos were then manually evaluated for each entrance tube by a human observer. To ensure that all movements of the bees could be captured by the observer, the videos were viewed in slow-motion. A playing speed of 0.3 has proven to be best suitable for this purpose by providing sufficient accuracy and processing speed. These data were forwarded to our partner company Gero Meßsysteme GmbH to find possible errors in the algorithm and to eliminate them accordingly.

Robber's test

Semi-field experiments were carried out to implement the so-called "robber's test" according to STRUYE (1999). Three honey bee colonies with a strength of approximately 10,000 bees were set up in parallel in a covered gauze tent of about 80 m², respectively (Fig. 4). The area was free of forage. One to two honeycombs were then placed as a lure in an empty box set in the opposite direction to

the colony, with the lid open. This box was further equipped with a BeeCheck device. Once the bees accepted the food source in the box, the lid was closed and bees had to enter and leave through the entrance tubes of the BeeCheck. Counting was started early in the morning before and ended in the evening after bee-flight. Remaining bees in the box were manually counted and removed. Hypothetically, the daily balance between both sums should be zero ($\sum \text{entering} - [\sum \text{leaving bees} + \sum \text{remaining bees}] = 0$), since all bees that fly in also fly back to their hive. These numbers were also forwarded to Gero Meßsysteme GmbH to find possible errors in the algorithm and to eliminate them accordingly.

Results

With the current BeeCheck data daily flight activities of experimental colonies can be displayed and evaluated using the raw data provided by our partner Gero Meßsysteme GmbH. Respective R scripts can easily be written to implement various statistical features such as general in and out flight activity (Fig. 5) or a correlation of temperature and humidity data with the flight activity (Fig. 6, R CORE TEAM, 2019, ODEMER, 2020).

In Fig. 5A a daily activity curve from one colony is displayed covering six consecutive days. Single flight counts are shown from incoming (green) and leaving (yellow) bees with several peaks (outliers) in the evening and early morning hours. Cumulative flight counts (daily sum) are shown from incoming (green) and leaving (yellow) bees (Fig. 5B). The difference between $\sum \text{leaving} - \sum \text{entering}$ bees is shown in red. Hourly cumulative differences vary from 799 lost to 13.662 attracted bees. However, a daily trend can be identified as attracting rather than losing bees.



Fig. 4. Robber's test experimental setup in the tunnel tent. Left: honey bee colony, right: honeycombs as a lure for foragers in a box equipped with a Bee-Check device.

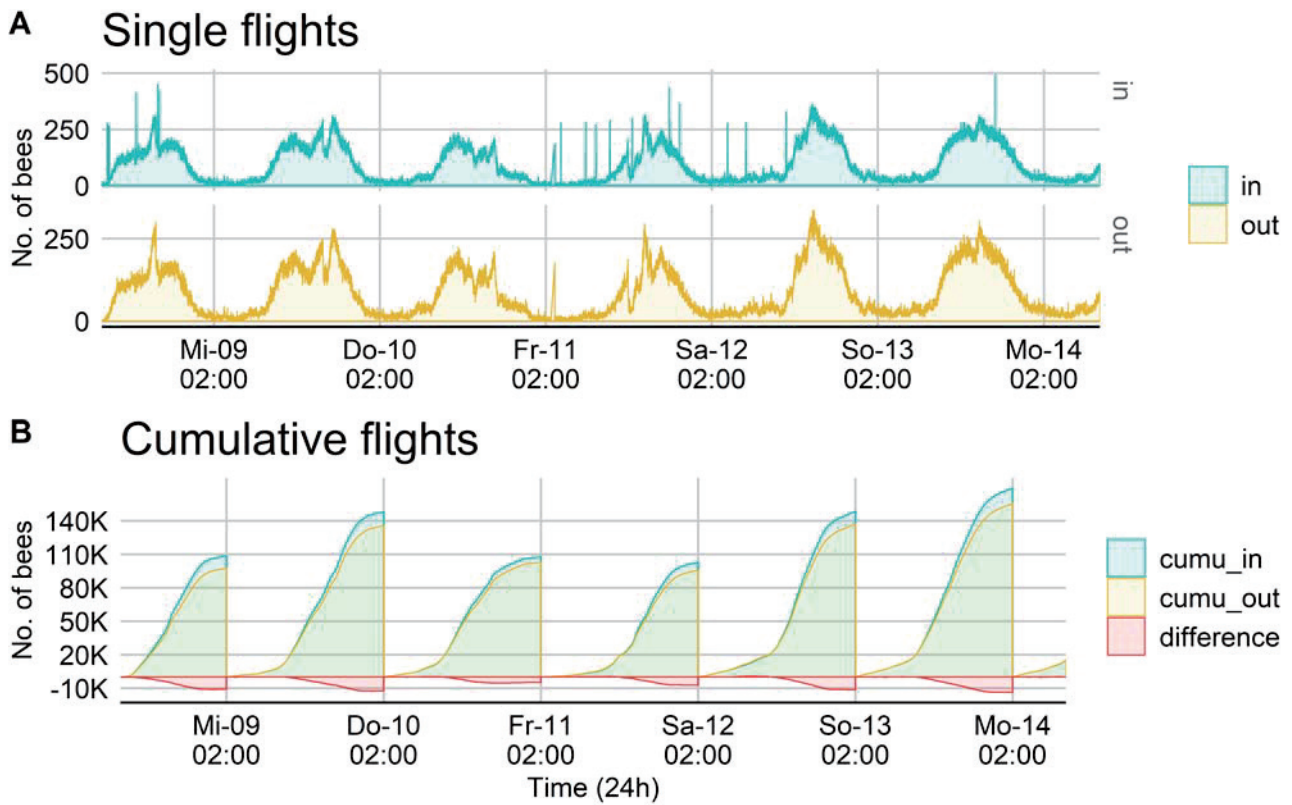


Fig. 5. Daily activity curve of a bee colony at the beginning of May 2018 covering six days. A: Single flight counts are shown from incoming (green) and leaving (yellow) bees. B: Cumulative flight counts (daily sum) are shown from incoming (green) and leaving (yellow) bees. The difference between \sum leaving - \sum entering bees is shown in red.

In Fig. 6 scatter plots of three different colonies (J46, J49, J51) are shown, recorded from 27th to 31th May 2018. In Fig. 6A a weak positive correlation of flight activity (No. of bees leaving the colony/5 min intervals)

and increasing temperature was revealed (R^2 J46: 0.33, J49: 0.38, J51: 0.35). This correlation, however, included several outliers represented by unrealistic values. The BeeCheck continuously counted several hundred leaving

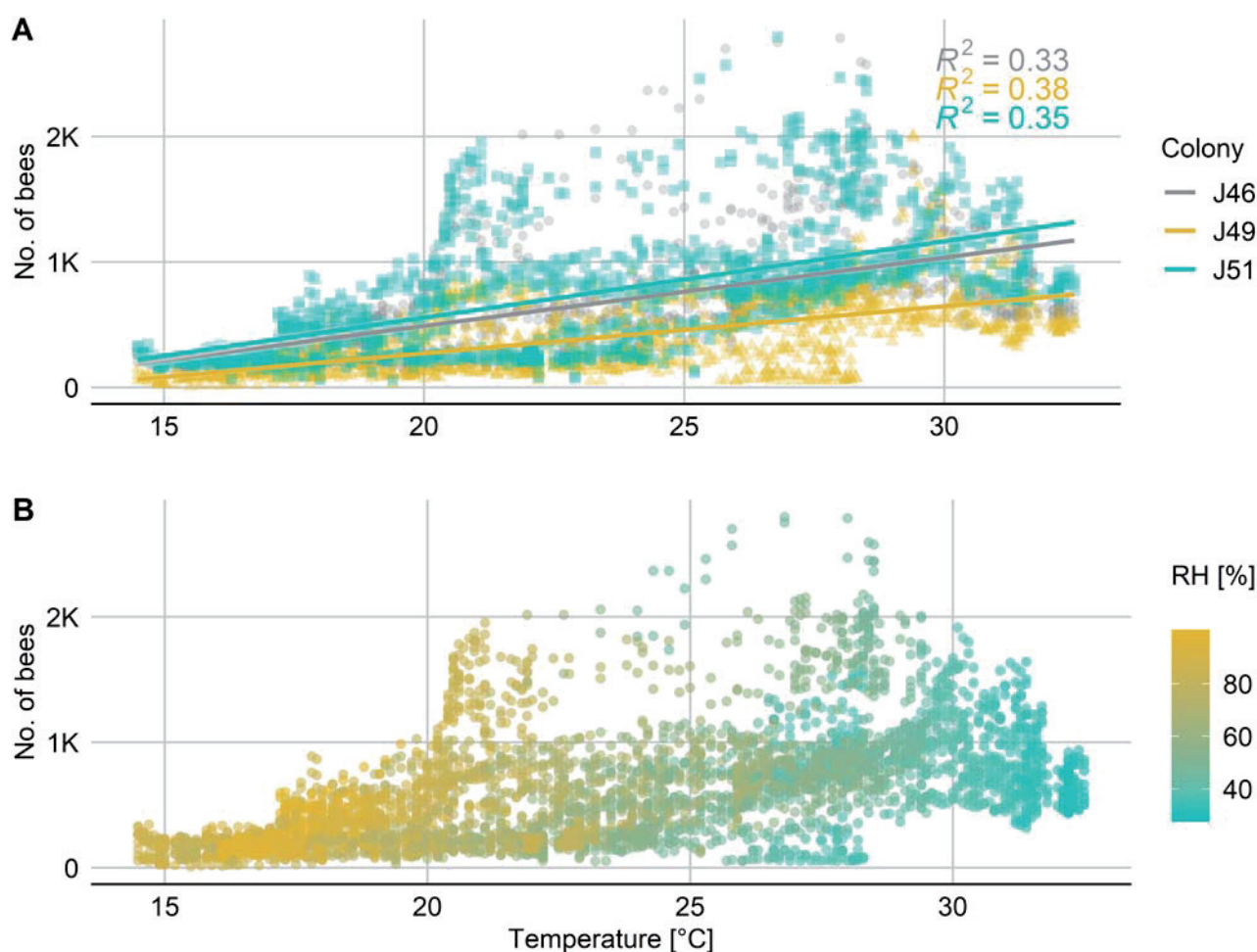


Fig. 6. Temperature dependent activity curve of a bee colony at the end of May 2018 covering four days. A: A weak positive correlation of temperature and flight activity (No. of bees leaving the colony/5 min intervals) was revealed. B: All flight data were ungrouped and plotted against the temperature and colored with a relative humidity (RH) gradient.

bees/5 min at times not favorable for flight activity such as night and early morning hours (10 p.m. – 5 a.m.) in all three colonies. In Fig. 6B all flight data were ungrouped and plotted against the temperature and colored with a relative humidity (RH) gradient. Higher humidity values were found with lower temperatures and *vice versa*.

By using two different verification methods we found that the speed at which bees pass through the entrance tube is displayed in the curve progression of the sensors (Fig. 7A-C). Further, we identified so-called borderline cases where the algorithm has difficulties to interpret data correctly. As an example are to name different running speeds of the bees, oncoming or stuck bees, and bees moving back and forth in the tube (Fig. 7D, see also outliers in Figs. 5 and 6).

Under field conditions, regular maintenance of the devices as well as the manual readout of the memory was necessary to uphold the BeeChecks operability. The battery life in our tests turned out to last for at least three months of continuous operation. With the gathered information of two seasons (2018, 2019), the algorithm could be further improved by our partner Gero based on

data provided by the verification tests. Many of the above-mentioned borderline cases are no longer present, however, not all of them could be eliminated yet.

Video observation

In total, when considering 24 single entrance tubes per device, a time contingent of approximately 220 min per video was necessary to count all incoming and outgoing bees in slow-motion mode (0.3x speed). Per season, 100 videos were recorded. To evaluate the data, one must correlate events sharing the same timestamp – of firmware used in the device and the recording time of the videos. With these data, incorrect interpretations of the algorithm would become obvious and could be fixed. Due to the large dataset and limited personnel capacity, the evaluation could not yet be finished completely.

Robber's test

Due to several verification loops that are necessary to establish new algorithms, additional tests are planned for 2020. However, data from the robber's test were, similar to the video analyses, not yet finally evaluated. This is

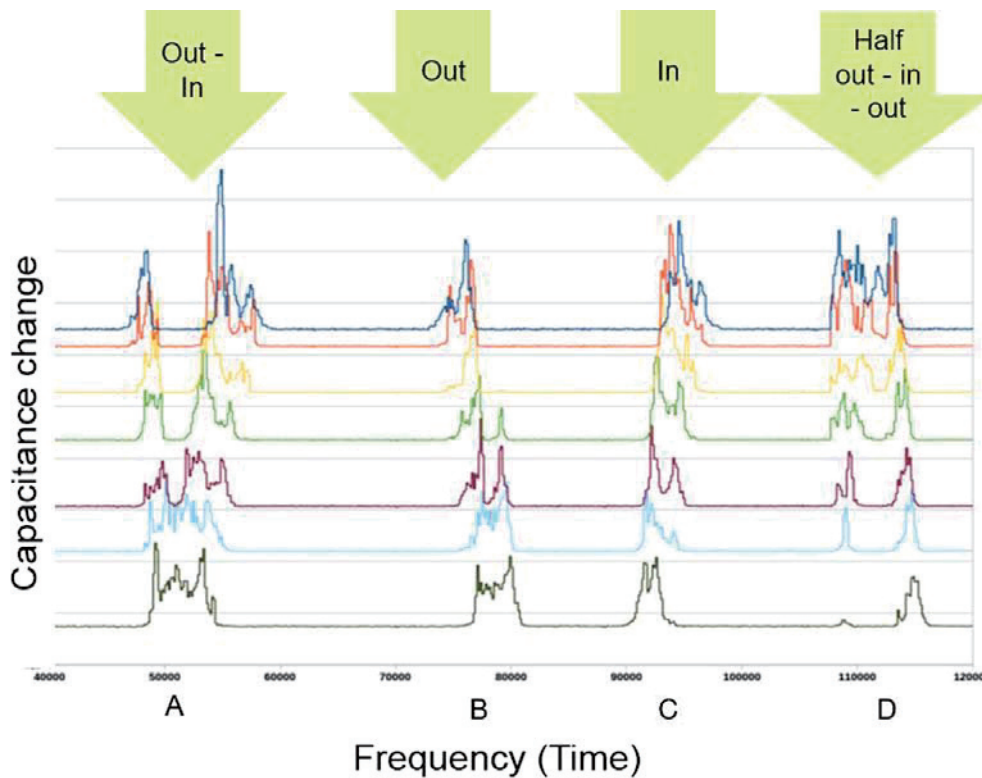


Fig. 7. Capacitance changes of the seven sensors within one entrance tube displaying different flight events. Every line represents one sensor, the top dark blue line is the one closest and the bottom dark green line the farthest to the hive. A: bee is leaving and entering right after, B: bee is leaving, C: bee is entering, D: borderline case: bee is stuck at halfway out, then moves fully out.

going to be covered by an upcoming project funded by the German Federal Agency for Agriculture and Food (BLE) called “Establishment of digital indicators of bee vitality in agricultural landscapes – V-I-Bee”.

Discussion

With the newly developed BeeChek counter, a robust and easy to maintain device for field use was established. Both, optical and capacitive sensors were preliminarily tested. The capacitive sensors turned out to be superior, since they measure more precisely and were less susceptible to dirt, debris, and propolisation from bees. This is a big disadvantage of optical sensors, such as infrared, where frequent failure is reported as signals are jammed by such contaminants (CAMPBELL et al., 2005). Here presented flight data from leaving and entering bees are mostly in line with current literature (CLARKE and ROBERT, 2018) and we confirmed a positive correlation with temperature (DANKA and BEAMAN, 2007). However, several teething troubles need to be taken care of. Interestingly, there are selective activity outliers shown when bees should be inside the hive at night time or early morning hours. The biggest challenge for this novel capacitance-based measuring system lies in the interpretation of signals by the algorithm. Certain events, such as bees

sitting in front of the entrance, oncoming or stuck bees, and bees moving back and forth in the tube without actually leaving or entering the hive are currently drivers for erroneous results and considered as borderline cases. The outliers from our data are such cases. We recorded daily increases of up to 13.662 bees per day and colony, which is very unrealistic. To eliminate borderline cases and improve the algorithm, extremely time-consuming verification methods are necessary. Flight assessments must be performed manually either with the help of a human observer (KOLMES and SAM, 1990) or with video recordings of the hive entrance. Hence, we started the evaluation of videos played in slow-motion to subsequently adapt the algorithm. Equally important are data generated from robber’s tests in tunnel tents (Figure 5). With this simple test setup, the precision of a counting device can easily be evaluated (STRUYE, 1999). The total sum of entering and leaving bees (plus remainers) must equal zero. It is highly essential to quickly evaluate our data to feed the results into the algorithm and start field testing as the bee season has already started.

Foraging flights performed by workers serve primarily food acquisition for the colony and are for ontogenetic reasons carried out by older bees (GOULD and GOULD, 1988; GARY, 1992). Entrance observations can, therefore, not only provide information about the availability of food sources but also decipher the age structure and

resource requirement of a colony (McLELLAN, 1977). If there are brief, strong fluctuations in flight traffic, this could indicate an acute external influence reflected by the entire colony. Effects of pesticides could, therefore, be displayed promptly and directly (PHAM-DELGUE et al., 2002), and long-lasting chronic effects could also be made visible with a counting device. The BeeCheck, thus, represents a clear advantage and an addition to the previous surveillance technology. Electronic hive scales are used as a standard in beekeeping, with a primary purpose to display honey flow. One or two hives equipped with scales are placed in areas of interest, such as the forest as source for honeydew honey, respectively. These areas are usually distant from the beekeeper's residence, which is why he has to rely on modern transmission technology. The hive scale is equipped with a GSM module and sends weighing data to the beekeeper at regular intervals. The latter then uses increments and declines to estimate whether the honey flow in the forest is good enough to migrate more colonies (HUBBE, 2010). Even though hive scales are long been used for scientific purposes (MEIKLE et al., 2018), an appropriate bee counter would be feasible to monitor imminent hazards from the environment more sensitively. For instance, a spray application in bee attractive crops could be tracked live and its effect on bees evaluated directly. Since sublethal effects are often difficult to measure or even remain unseen with unknown consequences at the colony level (DESNEUX et al., 2007), this could be of great benefit. In the context of regulatory risk assessment and the testing of plant protection products, this tool could provide a valuable link to background- and forager mortality under field conditions.

In a current debate, these sublethal effects and their impact on the colony are discussed (CHMIEL et al., 2020). Here, a precise bee counter would be able to assess the natural mortality (background mortality) of control colonies, placed in the same setting as treated hives. This could improve evaluation and interpretation of effects. Further, changes in flight behavior could be related to substances that harm bees but are not of acute toxicity for the colony. Ultimately, counting could be coupled with weighing data – combined in one device – to measure environmental effects on honey bee colonies more accurately and less intrusive than before (MEIKLE et al., 2018). The BeeCheck device developed so far has the potential to fulfill the above-mentioned attributes. However, it needs improvement to enhance data reliability and increase operational handling under the required conditions (i.e. remote management). For this reason, we were able to obtain a follow-up grant to continue the development. The institute for bee protection (JKI) takes on project coordination with partners from industry and research to integrate the BeeCheck not only in field-studies but also to feed data in simulation models such as the BEEHAVE (BECHER et al., 2014; THORBEB et al., 2017). In particular, partners from contract research organizations will validate the BeeCheck and its contribution to higher-tier studies for regulatory risk assessment. With

the flight data as a performance parameter, negative influences at the colony level could be displayed well in large-scale field studies.

In addition to the BeeCheck's scientific output, data will also be provided to federal and state institutions as well as beekeeping associations. From these data, useful information could be derived in terms of *Varroa* treatment recommendations or food resource notifications in respective areas. In the follow-up project "Establishment of digital indicators of bee vitality in agricultural landscapes – V-I-Bee", we will not only carry on with further validation but also aim for the BeeCheck's marketability.

Acknowledgements

We appreciate the participation of all seasonal helpers in the field and we express our gratitude to the JKI technical staff for their assistance. The data that support the findings of this study are available in the „Open Science Framework" under the following link: <https://osf.io/uqzp2/>.

Conflicts of interest


The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- BECHER, M.A., V. GRIMM, P. THORBEB, J. HORN, P.J. KENNEDY, J.L. OSBORNE, 2014: BEEHAVE: a systems model of honeybee colony dynamics and foraging to explore multifactorial causes of colony failure. *The Journal of applied ecology* **51** (2), 470–482, DOI: 10.1111/1365-2664.12222.
- BONNIFAIT, P., G. GARCIA, 1996: A multisensor localization algorithm for mobile robots and its real-time experimental validation. *IEEE International Conference on Robotics and Automation*, Minneapolis, MN, USA, 1395–1400.
- CAMPBELL, J.M., D.C. DAHN, D.A.J. RYAN, 2005: Capacitance-based sensor for monitoring bees passing through a tunnel. *Measurement Science and Technology* **16** (12), 2503–2510, DOI: 10.1088/0957-0233/16/12/015.
- CHMIEL, J.A., B.A. DAISLEY, A.P. PITEK, G.J. THOMPSON, G. REID, 2020: Understanding the Effects of Sublethal Pesticide Exposure on Honey Bees: A Role for Probiotics as Mediators of Environmental Stress. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8**, DOI: 10.3389/fevo.2020.00022.
- CLARKE, D., D. ROBERT, 2018: Predictive modelling of honey bee foraging activity using local weather conditions. *Apidologie* **49** (3), 386–396, DOI: 10.1007/s13592-018-0565-3.
- DANKA, R.G., L.D. BEAMAN, 2007: Flight Activity of USDA-ARS Russian Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) During Pollination of Lowbush Blueberries in Maine. *Journal of Economic Entomology*, **100** (2), 267–272.
- DBU (DEUTSCHE BUNDESSTIFTUNG UMWELT), 2019: Sensorsystem zur Erfassung und Einschätzung von Einflüssen auf die Gesundheit, Bestäubungsleistung und Vitalität von Bienenvölkern: Projektbericht.
- DESNEUX, N., A. DECOURTYE, J.-M. DELPUECH, 2007: The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual review of entomology* **52**, 81–106, DOI: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091440.
- GARY, N.E., 1992: Activities and behavior of honey bees. In: *The hive and the honey bee*. DADANT & SONS (Eds.), Hamilton, IL, USA, S. 269–372.
- GONSIOR, G., F. TAUSCH, K. SCHMIDT, S. KNÄBE, 2020: Impact of an Ooemen feeding with a neonicotinoid on daily activity and colony development of honeybees assessed with an AI based monitoring device, DOI: 10.1101/2020.02.04.933556.

- GOULD, J.L., C.G. GOULD, 1988: The Honey Bee, Scientific American Library.
- HUBBE, U., 2010: Der Waagstock. Rubrik Imkerpraxis. Deutsches Bienen-Journal **03** (3).
- IMDORF, A., G. BUEHLMANN, L. GERIG, V. KILCHENMANN, H. WILLE, 1987: Überprüfung der Schätzmethode zur Ermittlung der Brutfläche und der Anzahl Arbeiterinnen in freifliegenden Bienenvölkern. *Apidologie* **18** (2), 137–146, DOI: 10.1051/apido:19870204.
- JEKER, L., D. GROSSAR, 2020: Under Review: Data Requirements and Method Development of a New Bee Risk Assessment Scheme for Plant Protection Product Registration. *Chimia* **74** (3), 176–182, DOI: 10.2533/chimia.2020.176.
- JIANG, J.-A., C.-H. WANG, C.-H. CHEN, M.-S. LIAO, Y.-L. SU, W.-S. CHEN, C.-P. HUANG, E.-C. YANG, C.-L. CHUANG, 2016: A WSN-based automatic monitoring system for the foraging behavior of honey bees and environmental factors of beehives. *Computers and Electronics in Agriculture* **123**, 304–318, DOI: 10.1016/j.compag.2016.03.003.
- KOLMES, S.A., Y. SAM, 1990: Foraging Rates and Hive Contents During the Establishment of Honeybee Colonies (*Apis Mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research* **29** (3), 126–131, DOI: 10.1080/00218839.1990.11101208.
- LIEBIG, G., 2013: Durch Zählen an den Tag gebracht, DOI: 10.13140/RG.2.2.13498.29127.
- LIU, C., J.J. LEONARD, J.J. FEDDES, 1990: Automated Monitoring of Flight Activity at a Beehive Entrance using Infrared Light Sensors. *Journal of Apicultural Research* **29** (1), 20–27, DOI: 10.1080/00218839.1990.11101193.
- LUNDIE, A.E., 1925: Flight activities of the honeybee. United States Department of Agriculture Bulletin.
- MCLELLAN, A.R., 1977: Honeybee Colony Weight as an Index of Honey Production and Nectar Flow: A Critical Evaluation. *The Journal of applied ecology* **14** (2), 401, DOI: 10.2307/2402553.
- MEIKLE, W.G., N. HOLST, T. COLIN, M. WEISS, M.J. CARROLL, Q.S. MCFREDERICK, A.B. BARRON, 2018: Using within-day hive weight changes to measure environmental effects on honey bee colonies. *PloS one* **13** (5), e0197589, DOI: 10.1371/journal.pone.0197589.
- ODEMER, R., 2020: Experimental validation of an electronic counting device to determine flight activity of honey bees (*Apis mellifera* L.), dataset, DOI: 10.17605/OSF.IO/UQZP2.
- ODEMER, R., L. NILLES, N. LINDER, P. ROSENKRANZ, 2018: Sublethal effects of clothianidin and *Nosema* spp. on the longevity and foraging activity of free flying honey bees. *Ecotoxicology* (London, England) **27** (5), 527–538, DOI: 10.1007/s10646-018-1925-5.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), 2007: Guidance Document on the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Brood Test under Semi-Field Conditions 75. ENV/JM/MONO (2007)22.
- PHAM-DELGUE, M.-H., A. DECOURTYE, L. KAISER, J. DEVILLERS, 2002: Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie* **33** (5), 425–432, DOI: 10.1051/apido:2002033.
- RCORE TEAM, 2019: R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- STRUYE, M.H., 1999: Possibilities and limitations of monitoring the flight activity of honeybees by means of BeeSCAN bee counters. In: *Hazards of pesticides to bees, Avignon (France)*.
- TAUSCH, F., K. SCHMIDT, M. DIEHL, 2020: Current achievements and future developments of a novel AI based visual monitoring of beehives in ecotoxicology and for the monitoring of landscape structures, DOI: 10.1101/2020.02.04.933580.
- THORBEC, P., P.J. CAMPBELL, P.J. SWEENEY, H.M. THOMPSON, 2017: Using BEEHAVE to explore pesticide protection goals for European honeybee (*Apis mellifera* L.) worker losses at different forage qualities. *Environmental toxicology and chemistry* **36** (1), 254–264, DOI: 10.1002/etc.3504.

© The Author(s) 2020.

 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).

© Der Autor/Die Autorin 2020.

 Dies ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt wird (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

Gabriela Bischoff¹, Benjamin Grasz¹, Hartmut Nowak¹, Kerstin Paulutt¹, Jens Pistorius²

Auf der Suche nach Rückständen von Pflanzenschutzmitteln in Bienen, Pflanzen und Bienenprodukten

Looking for residues of pesticides in bees, plants and bee products

141

Zusammenfassung

Die chemisch-analytische Bestimmung von Schadstoff-Rückständen verschiedenen Ursprungs ist essentiell für die Expositionsermittlung im Rahmen der Aufklärung von Bienenvergiftungen und von Studien zur Bewertung des Risikos für Bienen. Die etablierte und umfassend validierte Multimethode ist sowohl zur Bestimmung von Rückständen in Bienen- und Pflanzenproben als auch für diverse Bienenprodukte (z.B. Pollen/Bienenbrot, Gelée Royal oder Wachs) sehr gut geeignet. Die Zusatzversuche zur Methodenüberprüfung wurden mit dem jeweils aktuellen Wirkstoffspektrum der Untersuchungsstelle für Bienenvergiftungen und verschiedenen Zusatzkonzentrationen durchgeführt. Die Zusatzkonzentrationen wurden so gewählt, dass möglichst alle Wirkstoffe des Untersuchungsprogramms sowohl mit LC-MS/MS als auch mit GC-MS bestimmt werden konnten. Mit den Matrices „Bienen“ und „Raps“ wurden Validierungen mit den Konzentration 1, 10 und 50 µg/kg durchgeführt. Die Quantifizierung wurde mit Matrix-Standards vorgenommen, um die durch Probeninhaltsstoffe hervorgerufenen Matrixeinflüsse zu reduzieren.

Für 240 Wirkstoffe (vor allem Insektizide, Fungizide), die 2011 im Screening-Programm enthalten waren, lagen die Wiederfindungsraten mit Bienenmatrix beim Zusatzniveau von 10 µg/kg überwiegend zwischen 70% und 110%, mit relativen Standardabweichungen unter 15%.

Stichwörter: Rückstandsanalytik, Multimethode, Pestizide, LC-MS/MS, GC-MS, Bienen, Pflanzen

Abstract

The chemical-analytical determination of pollutant residues of various origins is essential for the determination of exposure in the context of the investigation of bee poisoning and of studies to assess the risk to bees. The established and extensively validated multi-method is very well suited for the determination of residues in bee and plant samples as well as for various bee products (e.g. pollen/bee bread, royal jelly or wax). The validation experiments were carried out with the current spectrum of active substances of the investigation center for bee poisoning incidents and various concentration levels. The concentrations were chosen so that as far as possible all active substances of the investigation program could be determined with LC-MS/MS and GC-MS. Validations with the concentrations 1, 10 and 50 µg/kg were carried out with the matrices “bees” and “rape”. The quantification was carried out with matrix standards in order to reduce the matrix influences caused by sample ingredients. For 240 active substances (especially insecticides, fungicides), included in the screening program in 2011, the recovery rates with the bee matrix at the concentration level of 10 µg/kg were mostly between 70% and 110%, with relative standard deviations below 15%.

Key words: Residue analysis, multi-method, pesticides, LC-MS/MS, GC-MS, bees, plants

Affiliationen

Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Bienenschutz, Berlin¹

Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Bienenschutz, Braunschweig²

Kontaktanschrift

Dr. Gabriela Bischoff, Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Bienenschutz, Königin-Luise-Str. 19, 14195 Berlin-Dahlem, E-Mail: gabriela.bischoff@julius-kuehn.de

Zur Veröffentlichung angenommen

2. April 2020

Einleitung

Bestäuberinsekten sind ein bedeutsamer Bestandteil der globalen Artenvielfalt. Etwa 80 Prozent aller Wild- und Nutzpflanzen in Deutschland sind auf die Bestäubung von Insekten angewiesen. Seit vielen Jahren werden Rückgänge insbesondere bei Wildbienen sowie bei den Pflanzen beobachtet, die auf sie angewiesen sind. Der Verlust an Bestäubern, und damit verbunden der Verlust der Bestäubungsleistung, kann erhebliche negative ökologische und ökonomische Auswirkungen hinsichtlich der Pflanzenproduktion, der Produktqualität, der Erhaltung der Wildpflanzenvielfalt, der Stabilität des Ökosystems und der Ernährungssicherheit haben. Bienen sind verschiedensten Gefährdungen ausgesetzt, die für Schwächung, Verhaltensänderungen, Orientierungs- und Kommunikationsprobleme bis hin zum Tod verantwortlich sein können. Dazu gehören Mangel an ausreichender und vielfältiger Nahrung, Krankheitserreger (Parasiten, Viren), landwirtschaftliche und imkerliche Praktiken, Agrochemikalien, Umwelt- und Lebensraumveränderungen, Klimawandel, gezieltes Vergiften (Frevel) und die mögliche Kombination verschiedener Faktoren (GOULSON et al., 2015, PISTORIUS, 2016, POTTS et al., 2010). In neuerer Zeit wurde auch der Einfluss künstlichen Lichts in der Nacht und anthropogener hochfrequenter elektromagnetischer Strahlung auf Bestäuber untersucht (VANBERGEN et al., 2019).

Die chemisch-analytische Bestimmung von Schadstoffrückständen verschiedenen Ursprungs bei der Aufklärung von Bienenschäden oder als ein Faktor bei der Bewertung des Risikos in verschiedenen Versuchsszenarien ist ein essentieller Bestandteil vieler Untersuchungen zum Bienenschutz (WISK, 2014, WERNECKE et al., 2019).

Das Julius Kühn-Institut (JKI) hat laut Pflanzenschutzgesetz (§ 57 Abs. 2 Nr. 11) die Aufgabe, Bienen auf Schäden durch Pflanzenschutzmittel zu untersuchen. Diese Aufgabe wird von der Untersuchungsstelle für Bienenvergiftungen (UBieV) wahrgenommen, die im Institut für Bienenschutz angesiedelt ist.

Damit ein Schadensverursacher ermittelt werden kann, sollten nicht nur die toten Bienen sondern auch Pflanzen eingesandt werden, an denen sich die Bienen bei der Nahrungssuche vergiftet haben könnten. Eine chemische Untersuchung der eingesandten Proben erfolgt bei geeignetem Probenmaterial in der Regel dann, wenn anhand der vorliegenden Informationen zum Schadensfall und des eingesandten Probenmaterials eine mögliche Vergiftung nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann oder zuvor im Biotest (Aedes-Test, Indikator: Larven der Gelbfieber-Mücke *Aedes aegypti* L.) eine Kontaktgiftwirkung nachgewiesen wurde und somit zu klären ist, ob eine Vergiftung durch Pflanzenschutzmittel vorliegt.

Für die Rückstandsanalytik werden Methoden benötigt, mit denen möglichst viele der hinsichtlich Wasserlöslichkeit, Flüchtigkeit, Molekülgröße und Stabilität sehr unterschiedlichen Substanzen möglichst schnell

und einfach in einem Analysengang bestimmt werden können.

Im Jahr 2003 veröffentlichten KLEIN und ALDER eine Multimethode zur Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen in Lebensmitteln mit LC-MS/MS nach Methanolextraktion und Aufreinigung an Diatomeenerde. Es handelt sich dabei um eine schnelle, einfache und effiziente Methode, die in die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §§ 64 LFGB (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch) aufgenommen wurde (Methode L 00.00–113). Diatomeenerde oder Kieselgur ist für die Rückstandsanalyse in sofort einsetzbaren Kartuschen (z.B. ChemElut™) erhältlich.

Ebenfalls im Jahr 2003 wurde von ANASTASSIADES et al. eine Extraktionsmethode zur Analyse einer Vielzahl von Pestiziden, die sog. „QuEChERS-Methode“ publiziert. Diese Methode erhielt ihren Namen aufgrund ihrer positiven Eigenschaften im Vergleich mit bis dato eingesetzten Methoden: Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged, Safe (schnell, einfach, günstig, effizient, robust, sicher) und besteht aus zwei Schritten, Flüssig-Flüssig-Extraktion und Reinigung durch dispersive Festphasenextraktion (dSPE). Die ursprünglich vor allem für fettarme Obst- und Gemüseproben konzipierte Methode wurde in den folgenden Jahren weiterentwickelt, um sowohl zusätzliche Wirkstoffe als auch weitere Probenotypen mit sehr verschiedenen Begleitstoffanteilen (die sog. „Matrix“) untersuchen zu können. Die QuEChERS-Methode wurde ebenfalls in die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §§ 64 LFGB aufgenommen (Methode L 00.00–115) und ist heute die am meisten verbreitete Methode in der Rückstandsanalytik von Lebensmitteln.

In den folgenden Jahren wurden zunehmend Methoden entwickelt und veröffentlicht, die sich mit der Extraktion organischer Schadstoffrückstände (Pestizide, Tierarzneimittel, Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), Polychlorierte Biphenyle (PCB), u.a.) aus Honigbienen, Pollen, Wachs und Honig befassen (PRZYBYLSKI und SEGARD, 2009, WALORCZYK und GNUSKOWSKI, 2009, WIEST et al., 2011, KASLOTIS et al., 2014, AL NAGGAR et al., 2015, CALATAYUD-VERNICH et al., 2016, KILJANEK et al., 2016, ROSZKO et al., 2016, TETTE et al., 2016, AL-ALAM et al., 2017, GIL GARCÍA et al., 2017). Die meisten Methoden basieren auf verschiedenen Modifikationen der QuEChERS-Methode. Diese waren insbesondere für die Analyse fetthaltiger Proben nötig, um den sogenannten „Matrixeffekt“ herabzusetzen. In der analytischen Chemie bezeichnet der Matrixeffekt die Kombination aller Einflüsse auf die Messung und Mengenbestimmung der Zielsubstanz, die durch mitextrahierte, störende Probeninhaltsstoffe hervorgerufen wird (IUPAC).

Für alle Multimethoden gilt, dass die gewonnenen Extrakte, abhängig von den zu bestimmenden Analyten mittels gas- (GC) oder flüssigchromatographischer (LC) Methoden analysiert werden. Als Detektor wird in der Regel ein Massenspektrometer (MS) verwendet, um die gesuchten Substanzen sicher identifizieren zu können.

In der Untersuchungsstelle für Bienenvergiftungen werden die Proben seit Anfang der 1980er Jahre mit

rückstandsanalytischen Multimethoden untersucht. Von 1982 bis 2005 wurde für die Extraktion der Bienen- und Pflanzenproben das Lösungsmittelgemisch Hexan/Aceton (3:1, v:v) eingesetzt und die Identifizierung erfolgte mittels GC-MS-Verfahren. Ab 2006 wurde die von KLEIN und ALDER (2003) publizierte Methode erprobt und nach notwendigen Modifikationen für die Rückstandsanalysen eingesetzt. SEEFELD fasste die chemischen Untersuchungen zur Aufklärung von Schadensfällen an Honigbienen durch Pflanzenschutzmittel im Zeitraum 1985 bis 2006 zusammen. Die Publikation erschien im Jahr 2008.

Seit 2007 stehen der UBieV für die Identifizierung und Quantifizierung der Zielsubstanzen in den Probenextrakten neben der GC-MS- auch LC-MS/MS-Messsysteme zur Verfügung. Damit wurde der Tatsache Rechnung getragen, dass viele der Pflanzenschutzmittelwirkstoffe vorzugsweise mit der LC-MS/MS-Technik nachweisbar sind. Daneben gibt es nach wie vor eine Reihe von Wirkstoffen (z.B. chlororganische Insektizide, Pyrethroide), die nur oder besser mit GC-MS bestimmt werden können. Hinsichtlich der Vielzahl an Substanzen, die mit beiden Messsystemen ermittelt werden können, bietet das Untersuchungsverfahren zusätzliche Sicherheit bei der Klärung von Schadensfällen.

Das zur Schadensfallklärung verwendete Screening-Programm beinhaltet sowohl in Deutschland und anderen europäischen Ländern zugelassene als auch nicht mehr zugelassene Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe, bienentoxische Substanzen aus anderen Anwendungsgebieten (Biozide, z.B. Insektensprays) und solche, die in der Imkerei zum Einsatz kommen. Die dem Screening-Programm zugrundeliegende Multimethode wird kontinuierlich an aktuelle Erfordernisse und neue Wirkstoffe angepasst und umfasst zurzeit ca. 290 Wirkstoffe, etwa die Hälfte sind Insektizide, Akarizide und Varroazide sowie ausgewählte Metaboliten dieser Substanzgruppen. In diesem Artikel wird die Methode im Detail vorgestellt.

Material und Methoden

Aufarbeitung

Der Ablauf der Rückstandsanalysen ist in Abb. 1 am Beispiel der Schadensfallbearbeitung zusammengefasst. Unterschiede ergeben sich aus der Fragestellung, Art und Menge des für die Rückstandsanalysen zur Verfügung stehenden Probenmaterials. Die Methode wird im Folgenden am Beispiel der Analysen im Schadensfall ausführlich beschrieben. Für die übrigen Probenmaterialien werden nur die wesentlichen Abweichungen vom Grundschema genannt.

Schadensfälle (Bienen, Pflanzen)

Die Analysenproben für die Rückstandsanalytik bestehen aus 100 Bienen (ca. 5–10 g) bzw. 5 g Pflanzenmaterial, das vor der Entnahme mit einer Schere vorzerkleinert wird. Für die Bienenprobe werden 10 Bienen gewogen und das Gewicht von 100 Bienen errechnet. Die Analysenprobe wird in ein Zentrifugenglas mit einem Fas-

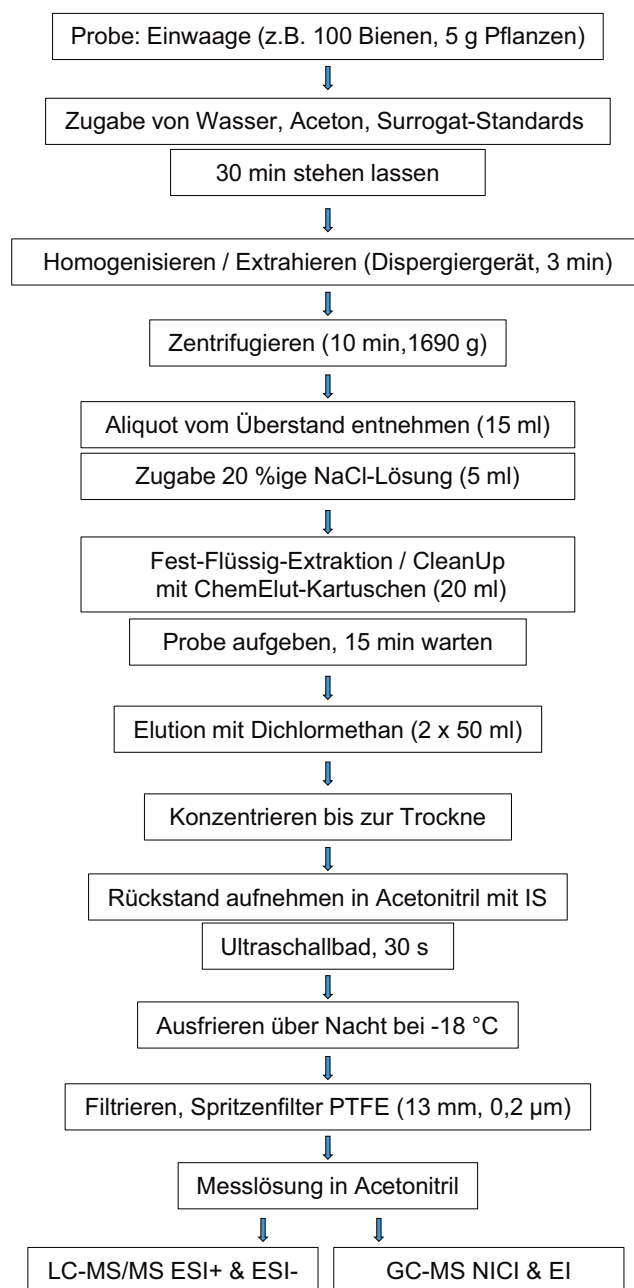


Abb. 1. Ablaufschema der Multimethode für die Bestimmung von Rückständen in Bienen- und Pflanzenproben

sungsvermögen von 80 ml eingewogen und nach Zugabe von 50 µl einer Surrogat-Standard-Lösung (Erläuterung unter Punkt „Interne Standards“) mit 20 ml Aceton und einer definierten Menge Reinstwasser (0,055 µS/cm) versetzt. Die Gesamtwassermenge (Restfeuchte in der Probe plus Zugabe) soll bei den Bienenproben 10 ml betragen. Da aufgrund der eingesandten Gesamtprobenmenge in der Regel eine individuelle Wassergehaltsbestimmung nicht möglich ist, erfolgt die Wasserzugabe aufgrund empirisch ermittelter Werte in Abhängigkeit des Gewichtes von 10 Bienen. Bei den Pflanzenproben soll die Gesamtwassermenge 10 ml betragen. Es wird pauschal von einer Restfeuchte von 80% ausgegangen und jeder Analysenprobe werden 6 ml Wasser zugesetzt.

Nach einer Einwirkzeit von 30 min werden die Proben 3 min mit einem Dispergiergerät homogenisiert und anschließend 10 min bei 1690 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren werden 15 ml des überstehenden Probenextrakts entnommen, mit 5 ml einer 20%igen Natriumchloridlösung versetzt und auf eine ChemElut™-Kartusche (20 ml, unbuffered, Agilent) gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 15 min wird zweimal mit je 50 ml Dichlormethan in einen 250 ml Rundkolben eluiert. Die Eluate werden am Rotationsverdampfer bei max. 35°C Wasserbadtemperatur bis zur Trockne konzentriert. Der Rückstand wird mit 2,5 ml einer Lösung in Acetonitril versetzt, welche die internen, überwiegend isoto-penmarkierten Standards (aktuell 15) für die Quantifizierung enthält, und für 30 Sekunden im Ultraschallbad gelöst. Der verschlossene Rundkolben wird über Nacht in einen Tiefkühlschrank (-18°C) gestellt, wodurch störende Begleitstoffe zum Teil ausgefroren werden. Der Probenextrakt wird über einen Spritzenfilter (PTFE 13 mm, 0,2 µm) in ein Vial (Probenfläschchen) filtriert.

Wachs

Für die Analyse werden 5 g Probe eingewogen und nach Zugabe von 50 µl der Surrogat-Standard-Lösung und 30 ml einer Aceton-Wasser-Mischung (3:1, v:v) ist der weitere Ablauf identisch mit der oben beschriebenen Vorgehensweise für Bienen.

Honig (Futterkranz), Nektar, Honigblasen, Königin-/Arbeiterinnenfuttersaft (Gelée Royal, Worker Jelly)

Für die Analyse wird in der Regel 1 g Probe eingewogen. Nach Zugabe einer definierten Menge einer zur Zielstellung passenden Surrogat-Standard-Lösung und 20 ml einer Aceton-Wasser-Mischung (3:1, v:v) ist der weitere Ablauf der Analyse bis zur Konzentrierung des Extrakts identisch mit der oben beschriebenen Vorgehensweise. Die Eluate werden am Rotationsverdampfer bis auf ca. 2 ml konzentriert. Der verbleibende Extrakt wird in ein Reagenzglas mit Normschliff überführt und anschließend mit Stickstoff bei Raumtemperatur zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit 1 ml einer Lösung in Acetonitril versetzt, die ausgewählte interne Standards für die Quantifizierung enthält, und für 10 Sekunden im Ultraschallbad gelöst. Nach Lagerung über Nacht im Tiefkühlschrank (-18°C) wird der Probenextrakt über einen Spritzenfilter (PTFE 13 mm, 0,2 µm) in ein Vial filtriert.

Pollen/Bienenbrot

Für die Analyse wird 1 g Probe eingewogen. Nach Zugabe einer ausgewählten Surrogat-Standard-Lösung und 20 ml einer Aceton-Wasser-Mischung (2:1, v:v) ist der weitere Ablauf der Analyse bis zur Konzentrierung des Extrakts identisch mit dem oben beschriebenen Prozedere für Bienen und anschließend mit dem für Gelée Royal.

Interne Standards

Ein interner Standard (IS) ist eine chemische Verbindung, die der Probe oder dem Probenextrakt in einer

bekanntem Menge in einem bestimmten Stadium der Analyse zugesetzt wird, um die korrekte Ausführung (eines Teils) der Analysemethode zu überprüfen. Der interne Standard sollte chemisch stabil sein und/oder typischerweise das gleiche Verhalten wie der Zielanalyt zeigen (SANTE, 2019). Der sogenannte Surrogat-Standard (SANTE: prozeduraler interner Standard (P-IS)) ist ein interner Standard, der den Proben zu Beginn der Analyse hinzugefügt wird, um verschiedene Fehlerquellen in allen Phasen der Methode von der Aufarbeitung bis zur Quantifizierung zu erkennen. Die Surrogat-Standard-Lösung enthält drei isoto-penmarkierte, in diesen Fällen deuterierte Referenzsubstanzen (Acetamidrid D3, Pirimicarb D6, Chlorpyrifos D10). „Deutert“ bedeutet, dass in den betreffenden Ausgangsmolekülen in der Regel mehrere Wasserstoffatome durch Deuterium ersetzt wurden, was mit der Zahl hinter dem „D“ ausgedrückt wird. Diese Substanzen kommen natürlicherweise nicht vor und damit wird sichergestellt, dass die Kontroll-Standards nicht bereits in der zu analysierenden Probe enthalten sind. Sie sind damit Stellvertreter oder Ersatz für die Zielsubstanzen der Analyse. Voraussetzung für die Verwendung von isoto-penmarkierten internen Standards ist die massenspektrometrische Messung, die den gleichzeitigen Nachweis der co-eluierenden, nicht markierten Analyten und der entsprechenden isoto-penmarkierten internen Standards ermöglicht. Die im Zuge der Gesamtanalyse für die Surrogat-Standards erzielten Ergebnisse (Wiederfindung) dienen der Kontrolle und werden nicht in die Ergebnisberechnung einbezogen.

Die für die Quantifizierung verwendeten internen Standards werden auch Injektionsstandard (I-IS) oder instrumenteninterner Standard genannt. Diese werden unmittelbar vor dem Bestimmungsschritt (d.h. vor der Injektion) den endgültigen Extrakten hinzugefügt. Dies ermöglicht eine Überprüfung und mögliche Korrektur von Schwankungen des Einspritzvolumens (SANTE, 2019) und der Messempfindlichkeit. Letzteres gilt vor allem für die GC-MS.

Messungen und Identifizierung

Für die Identifizierung und Quantifizierung der Zielsubstanzen in den Probenextrakten stehen ein GC-MS- (DSQ™ II, Thermo Electron Corporation), ein GC-MS/MS- (TSQ™ 8000 Evo, Thermo Scientific) und zwei LC-MS/MS-Messgeräte (4000 QTRAP®, AB/MDS SCIEX und QTRAP® 6500+, SCIEX) zur Verfügung.

Im Folgenden werden die Mess- und Auswerteparameter für die Gerätesysteme (DSQ™ II, 4000 QTRAP®) detailliert beschrieben, die in der Regel im Rahmen von Analysen eingesetzt werden, bei denen das gesamte Untersuchungsspektrum (z.B. Schadensfallklärung) gefragt ist. Die beiden anderen massenspektrometrischen Gerätesysteme werden in der Regel für Analysen im Rahmen von Projekten eingesetzt. In diesen Fällen sind die zu analysierenden Wirkstoffe bekannt und die Messbedingungen werden für die jeweilige Fragestellung optimiert.

GC-MS

Für die GC-MS-Messungen wird ein DSQ™ II-Gerät (Single Stage Quadrupol) gekoppelt an einen Trace GC Ultra™ mit split/splitless-Injektor (210°C, Splitless: 0,0 bis 1,5 min) und CTC CombiPAL Autosampler (CTC Analytics) (10°C) in den Messmodi EI und NCI verwendet. Die Trennung erfolgt an einer Zebron™ ZB-MultiResidue™-1 Kapillare (30 m, 0,25 mm i.D., 0,25 µm Filmstärke, Phenomenex) mit Helium 5.0 als Trägergas, einem Fluss von 1,2 ml/min (constant flow) und folgendem Temperaturprogramm: 70°C, 2 min halten, mit 5°C/min auf 320°C heizen, 10 min halten.

Die massenspektrometrischen Messbedingungen sind im EI-Modus: -70 eV, Full scan 50–650 u, Ionenquelle 225°C, Transferline 275°C und im NCI-Modus: -70 eV, Full scan 20–650 u, CI Gas Methan 1,7 ml/min, Ionenquelle 180°C, Transferline 275°C.

Das Injektionsvolumen ist 1 µl und die Messzeit beträgt 62 min. Zwischen den Proben wird Acetonitril injiziert und mit einem kurzen Temperaturprogramm gemessen.

Als Steuerungs- und Auswerte-Software wird Xcalibur™ 1.4 SR 1 genutzt.

Die Zielsubstanzen werden nach der chromatographischen Trennung und massenspektrometrischer Detektion in zwei Schritten anhand ihrer Retentionszeit und der Full Scan-Spektren identifiziert. Das Full Scan-Spektrum

zeigt die Gesamtheit aller zum Messzeitpunkt gebildeten und detektierten Ionen des definierten Massenbereichs (50–650 u bzw. 20–650 u). Im halbautomatischen Grob-Screening wird anhand von Layouts (Abb. 2) eine Liste der potentiell in der Probe enthaltenen Wirkstoffe erstellt, deren Identität im Fein-Screening durch Spektrenvergleich abgesichert wird. Für die Identifizierung werden vorrangig die in eigenen EI- und NCI-Bibliotheken niedergelegten Substanzspektren herangezogen.

LC-MS/MS

Für die LC-MS/MS-Messungen kommt ein Triple Stage Quadrupole Massenspektrometer 4000 QTRAP® mit ESI-Quelle (Elektro-Spray-Ionisation) zum Einsatz, das an eine Prominence UFLC XR HPLC-Anlage (Shimadzu) gekoppelt ist. Es werden Messungen mit positiver (Positiv-Modus) und negativer Ionisation (Negativ-Modus) durchgeführt. Die Säulenofentemperatur ist auf 40°C und die des Autosamplers auf 15°C gesetzt.

Im Positiv-Modus 1 werden die Messungen an einer Synergi™ Hydro Trennsäule (150 × 3 mm; 4 µm; 80 Å) mit einer SecurityGuard cartridge AQ C₁₈ als Vorsäule (4 × 2,0 mm) (beide von Phenomenex) durchgeführt. Es werden 10 µl Probenextrakt injiziert, und die Messzeit umfasst 22 Minuten.

Im Negativ-Modus wird eine Kinetex® C₁₈-Trennsäule (50 × 3 mm; 2,6 µm; 100 Å) mit einer SecurityGuard Car-

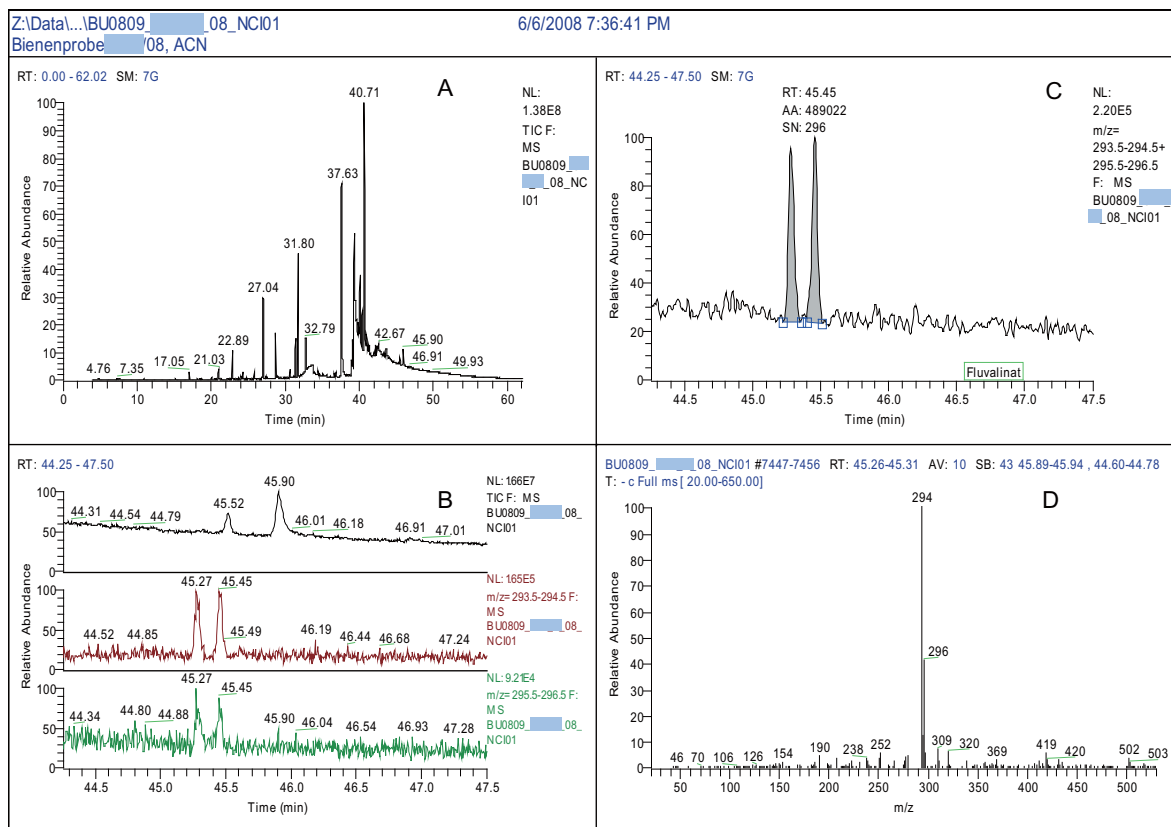


Abb. 2. Layouts zur Auswertung der GC-MS-NCI-Messergebnisse am Beispiel von tau-Fluvalinat in einer Bienenprobe. Chromatogramm (A), Fragment-Ionen für Grob-Screening (B) und Quantifizierung (C), Spektrum für Bibliotheksvergleich (D)

tridge Ultra als Vorsäule verwendet (beide von Phenomenex). Es werden 5 µl Probenextrakt injiziert und die Messzeit umfasst 6 Minuten.

Diese Trennsäule wird auch für die Messungen im Positiv-Modus 2 verwendet, um große Moleküle wie Azadirachtin und Abamectin bestimmen zu können. Es werden ebenfalls 5 µl Extrakt injiziert und die Messung dauert 8 min.

In allen Mess-Modi wird zwischen den Proben Acetonitril injiziert.

Für die Gradiententrennung werden in allen Fällen ein Methanol/Wasser-Gemisch (90:10, v:v, Solvent A) und Wasser (Solvent B) verwendet, die jeweils 0,1% Essigsäure und 5 mM Ammoniumformiat enthalten. Die jeweiligen Flussraten und Gradienten sind in der folgenden Tab. 1 zusammengefasst.

Die massenspektrometrischen Parameter sind wie folgt gewählt: Scan type: sMRM, Quelltemperatur: 500°C, Ion spray voltage: +5500 V im Positiv-Modus 1 und 2 sowie -4500 V im Negativ-Modus, Curtain Gas (N₂): 35 psi, Ion Source Gas 1 (Nebulizer Gas, N₂): 70 psi, Ion Source Gas 2 (Turbo Gas): 50 psi, Collision gas (N₂): high. Als Steuerungssoftware wird Analyst® in der Version 1.5.2 und für die Identifizierung und Quantifizierung die Software MultiQuant™ in der Version 2.1.1 verwendet.

Die Zielsubstanzen werden anhand ihrer Retentionszeit und dreier charakteristischer MRM-Übergänge identifiziert. Abb. 3 zeigt dies am Beispiel einer Bienenprobe und dem darin nachgewiesenen Insektizid Clothianidin.

Das Multiple Reaction Monitoring (MRM) ist in den meisten Fällen die Standard-Methode für die Bestim-

mung der Zielsubstanzen, wenn ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer verwendet wird. Im MRM-Modus wird das Molekül-Ion (Precursor-Ion) des Analyten im ersten Massenfilter (Quadrupol 1) selektiert, durch Kollision mit Stickstoffmolekülen fragmentiert (Quadrupol 2) und drei charakteristische Fragment-Ionen (Product-Ions) werden durch einen zweiten Massenfilter (Quadrupol 3) ausgewählt und registriert. Der Haupt-MRM ist der empfindlichste Übergang (intensivstes Signal) und wird zur Quantifizierung des Analyten (sog. „Quantifizier“) verwendet. Mindestens ein weiterer Übergang (MRM) wird zur Bestätigung (sog. „Qualifizier“) der Identität der Substanz benötigt. Die Verwendung mehrerer Qualifizier-MRM erhöht die Sicherheit des Nachweises.

Quantifizierung

Die Rückstände in den Proben werden mit Matrix-Standards quantifiziert. Die dafür benötigten Extrakte werden aus vergleichbarem möglichst rückstandsfreiem Probenmaterial hergestellt und mit den Referenzsubstanzen sowie den deuterierten internen Standards versetzt. Im Rahmen von Projekten können das Proben der unbehandelten Kontrollen sein.

Im Rahmen der Schadensfallklärung werden Standardreihen mit den Matrices „Bienen“ und „Raps“ und den Konzentrationen 0,5, 1, 5, 10, 100 und 500 pg/µl in Acetonitril verwendet. Die Wahl des Lösungsmittels ermöglicht eine Messung mit GC-MS und LC-MS/MS aus einem Extrakt. Die Quantifizierung erfolgt über die relativen Peakflächen nach der Methode des internen Standards (SANTE, 2019, CHEMGAPEDIA). Dazu wird eine Kalibrier-

Tab. 1. Für die Trennung verwendete Gradienten in der LC-MS/MS

Gradient im:	Zeit [min]	Fluss [ml/min]	Solvent A [%]	Solvent B [%]
Positiv-Modus 1	0,0	0,6	10	90
	12,0	0,6	100	0
	18,0	0,6	100	0
	18,1	0,6	10	90
	22,0	0,6	10	90
Negativ-Modus	0,0	0,7	10	90
	0,5	0,7	100	0
	3,8	0,7	100	0
	4,8	0,7	10	90
	6,0	0,7	10	90
Positiv-Modus 2	0,0	0,9	10	90
	3,0	0,9	100	0
	6,0	0,9	100	0
	6,1	0,9	10	90
	8,0	0,9	10	90

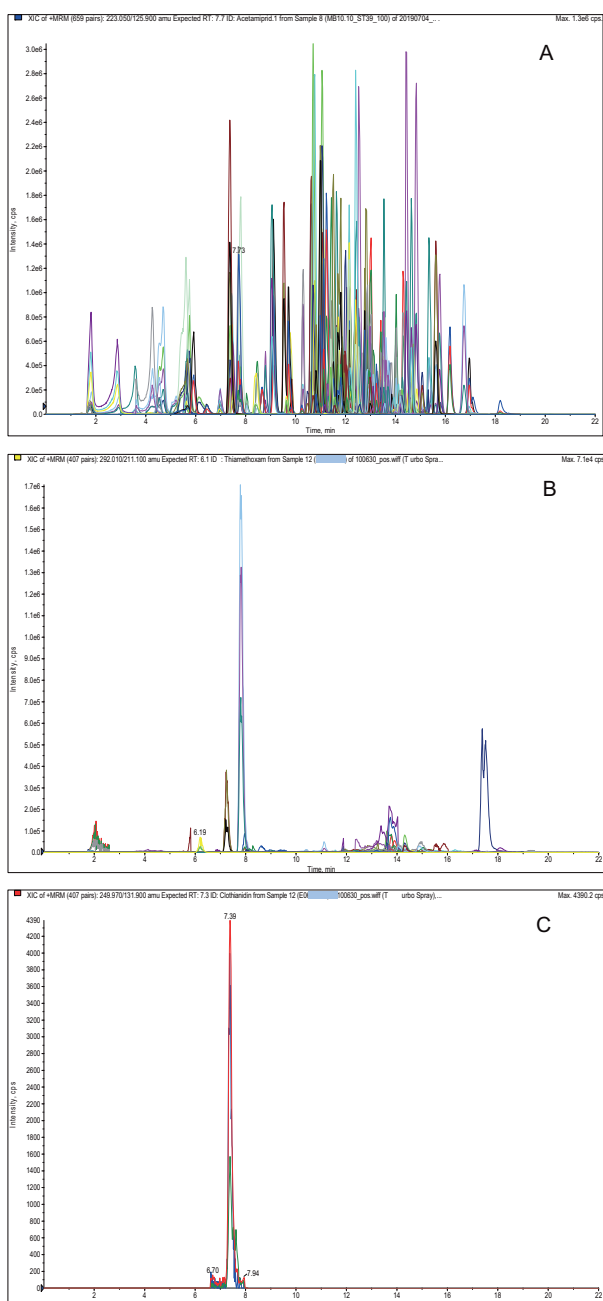


Abb. 3. LC-MS/MS-Chromatogramme eines 100 pg/μl Standards mit 216 Referenzsubstanzen und 5 internen Standards in Bienenmatrix für die Identifizierung und Quantifizierung von u.a. Pflanzenschutzmittelwirkstoffen (A), einer Bienenprobe (B) und dem darin nachgewiesenen Clothianidin in einer vergrößerten Ansicht (C), in der nur die gemessenen für diesen Wirkstoff charakteristischen MRM-Übergänge gezeigt werden (jede bunte Linie entspricht einem Übergang und verbindet die Messpunkte).

funktion aus den Mess-Signalen der oben genannten Standardlösungen, bestehend aus internen Standards und Analyten in bekannten Konzentrationen, erstellt. Die Standardlösungen (Verdünnungsreihe) enthalten alle dieselbe Menge an internen Standards. Die Signale (Peakfläche) beider Komponenten werden für die Berechnung der Kalibrierfunktion (Signalverhältnis Analyt/interner Standard = relative Peakfläche) genutzt.

Im Rahmen von Projekten beinhalten die Kalibrationsreihen entsprechend der Fragestellung und der zu messenden Wirkstoffe in der Regel eine größere Anzahl Matrix-Standards (mindestens 10 Messpunkte) mit Konzentrationen von 0,01 pg/μl bis zu 100 pg/μl.

Müssen die Probenextrakte für eine korrekte Quantifizierung verdünnt werden, können sie ab einer 1:100-Verdünnung unter Verwendung von Referenzstandards in Lösungsmittel gemessen werden, da die Matrixeffekte durch diese Verdünnung in der Regel ausreichend verringert werden. Bei geringeren Verdünnungen müssen auch die Matrix-Standards entsprechend verdünnt werden, damit die Matrixanteile in Probenextrakten und Standards möglichst gleich sind.

Zwischen den Proben wird Lösungsmittel injiziert und auch die für die Messreihe verwendete Matrix wird, mit und ohne interne Standards, mitgemessen, um Wirkstoff-Blindwerte oder Störungen einzelner MRM-Übergänge und deren Herkunft zu bestimmen.

Validierung (Methodenüberprüfung)

Methodenüberprüfungen sollen prinzipiell aufzeigen, ob und mit welcher Qualität, die für das komplette Screening ausgewählten Wirkstoffe mit einer Multimethode nachgewiesen werden können. Zum dem Zweck werden definierte Mengen der zu bestimmenden Substanzen den Probenmaterialien zugesetzt und die Analysen in Anlehnung an die Leitlinie der EU mit Hinweisen für Laboratorien zur Validierung und Qualitätssicherung (SANCO bis 2013, seitdem SANTE, in der jeweils aktuellen Version) durchgeführt. Diese sind im „guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed“ detailliert beschrieben. Kriterien für die Methodenbeurteilung sind die Wiederfindungsraten, Nachweis- (LOD = Limit of Detection) und Bestimmungsgrenzen (LOQ = Limit of Quantification) der gesuchten Substanzen.

Die Zusatzversuche mit den diversen relevanten Probenmaterialien (Bienen, Pflanzen, Pollen, Honig, Gelée Royal, Wachs, Boden) wurden mit dem jeweils aktuellen Wirkstoffspektrum der Untersuchungsstelle für Bienenvergiftungen, verschiedenen Zusatzkonzentrationen und, in der Regel, jeweils fünf Wiederholungen durchgeführt. Die Zusatzkonzentrationen wurden so gewählt, dass möglichst alle Wirkstoffe des Untersuchungsprogramms mit beiden Messsystemen bestimmt werden konnten. Je nach Matrix lag die Zusatzkonzentration zwischen 10 μg/kg und 50 μg/kg. Das war aufgrund der Heterogenität der Wirkstoffe und der Komplexität der Probenmaterialien mit z.T. stark variierenden Begleitstoffanteilen notwendig. Nur mit den Matrices „Bienen“ und „Raps“ wurde auch ein Zusatzversuch mit 1 μg/kg durchgeführt. Ziel war es, die Grenzen der Nachweisbarkeit für die im Fokus des Screenings stehenden Stoffe mit der eingesetzten Methode zu ermitteln.

Diesem Aspekt wird im Rahmen von Projekten durch Zusatzversuche mit den für die Studie ausgewählten

Wirkstoffen und – so weit möglich – allen relevanten Probenmaterialien (unbehandelt, wirkstofffreie Kontrollproben) nachgegangen. Die Zusatzkonzentrationen zur Bestimmung der Wiederfindungsraten werden so gewählt, dass sie im Bereich von Nachweis- und Bestimmungsgrenze und relevanter, durchschnittlicher Konzentrationen liegen.

Die Festlegung der LOD-Werte erfolgt anhand der Messergebnisse von Matrix-Standards. Dafür werden fein abgestufte Standardreihen verwendet, die mit den Probenserien mehrfach gemessen werden, da unterschiedliche Mess-Zeitpunkte und Geräte-Zustände zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können.

In der LC-MS/MS wird die LOD als die niedrigste Konzentration festgelegt, bei der mindestens zwei MRM nachgewiesen werden, deren Signale mindestens dreimal höher sind als das Grundrauschen des Chromatogramms und deren Verhältnis im Bereich der geforderten Kriterien liegt (SANTE, 2019). In der GC-MS ist die LOD die niedrigste Konzentration, bei der mindestens zwei charakteristische Fragment-Ionen nachgewiesen werden und die Intensität der beiden Fragmente dreimal höher ist als das Grundrauschen des Chromatogramms (s. Abb. 2 B).

Gemäß den Anforderungen der oben genannten SANTE-Leitlinie ist die LOQ die niedrigste Zusatzkonzentration der Validierung, bei der nach Anwendung der vollständigen Methode für alle Analyten mittlere Wiederfindungsraten im Bereich von 70–120% mit einer relativen Standardabweichung (RSD = relative standard deviation) von $\leq 20\%$ erzielt werden.

Wenn es nicht möglich ist, eine ausreichende Anzahl von Validierungsversuchen durchzuführen, um diesem Konzept zu folgen, wird die nächsthöhere Konzentration der Kalibrierungsstandards über der Nachweisgrenze als LOQ festgelegt.

Die Ergebnisse der Validierungen zeigen die Qualität der Multimethode zu dem Zeitpunkt der Überprüfung mit der jeweiligen Probenmatrix und dem aktuellen Zustand der Messgeräte.

In Tab. 2 sind beispielhaft die Ergebnisse für ausgewählte Insektizide, Akarizide und Varroazide zusammengestellt, die seit 2008 unter anderem in den Proben der Untersuchungsstelle nachgewiesen wurden. Bei den Zusatzkonzentrationen 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wurden mit wenigen Ausnahmen Wiederfindungsraten zwischen 70% und 105% mit RSD von 1% bis 12% erreicht. Bei der Zusatzkonzentration 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ waren von den 27 Wirkstoffen sieben nicht mehr nachweisbar, wobei es sich durchweg um mit GC-MS bestimmbare Wirkstoffe handelt. Das als Biozid (Insektensprays) eingesetzte Permethrin ist z.B. erst ab Konzentrationen über 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bestimmbar.

Für zehn weitere Substanzen wurden Wiederfindungsraten zwischen 42% und 69% erreicht, in zwei Fällen liegt die RSD über 20%. Das zeigt den Einfluss der Gesamtanalyse bei geringen Wirkstoffgehalten in der Bienenmatrix trotz sehr guter Nachweisempfindlichkeit des Messsystems. Für den Wirkstoff Spinosyn A wurden

daher auch bei höheren Zusatzkonzentrationen Wiederfindungsraten unter 70% ermittelt (Tab. 2).

Bei den LOD- und LOQ-Werten zeigen sich sehr große Unterschiede bezüglich der Messsysteme. Mit LC-MS/MS können in der Regel auch sehr geringe Wirkstoffgehalte noch empfindlich gemessen werden. Die berechneten Werte für die LOQ liegen z.T. über der jeweiligen Zusatzkonzentration, für die jedoch Ergebnisse erzielt wurden, die den Kriterien der SANTE-Leitlinie entsprechen. Beim Zusatz mit 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ betrifft das etliche mit GC-MS quantifizierte Wirkstoffe, wie z.B. Chlorpyrifos und beim Zusatz mit 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nur Deltamethrin. Das liegt an den der Berechnung zugrundeliegenden Werten für Einwaage, Aliquotierung und Endvolumen.

Unter Berücksichtigung aller 240 Wirkstoffe, die 2011 im Zusatzversuch mit Bienenmatrix enthalten waren, lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Wiederfindungsraten beim Zusatzniveau von 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ überwiegend zwischen 70% und 110%, mit relativen Standardabweichungen unter 15% lagen. Für 10% der Substanzen wurden Ergebnisse unter 70% erzielt und 8% nicht nachgewiesen. Letzteres betraf Wirkstoffe, die entweder erst ab höheren Konzentrationen bestimmbar sind (vor allem Herbizide wie z.B. Ethofumesat oder das Akarizid Permethrin), Extramethoden erfordern (z.B. Dithianon, Flumethrin) oder deren Nachweis aufgrund der Instabilität des Wirkstoffs im Probenextrakt (z.B. Amitraz, Prothioconazol) bzw. bei der Messung (z.B. Captan) nicht möglich ist. Diese instabilen Wirkstoffe sind alternativ anhand gebildeter Abbauprodukte nachweisbar. Sehr positiv ist zu bewerten, dass mit der Rückstandsmethode ohne weitere Reinigungsschritte keine Wiederfindungsraten über 120% ermittelt wurden.

Jeder Zusatzversuch dient dazu, das Potential und die Grenzen einer Methode unter den gewählten Bedingungen für die Rückstandsanalyse eines Probenmaterials auszuloten. Um die Anwendbarkeit und Qualität der Multimethode in einem anderen Zusammenhang aufzuzeigen, sind in Abb. 4 die Ergebnisse für 22 ausgewählte Fungizide aus einem Zusatzversuch mit Pollen dargestellt. Die Wiederfindungsraten liegen bei der zugesetzten Konzentration von 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ zwischen 76% (Trifloxystrobin) und 106% (Zoxamide) mit relativen Standardabweichungen von 3% bis 17%.

Es ist nicht möglich, mit einer Multimethode alle Analyten mit gleicher Qualität und Empfindlichkeit zu bestimmen. Das gilt generell auch für andere Multimethoden, die für die Bestimmung einer Vielzahl von Pflanzenschutzmittelwirkstoffen mit GC-MS und/oder LC-MS/MS in Bienen eingesetzt werden (WALORCZYK und GNUSKOWSKI, 2009, WIEST et al., 2011, KASIOTIS et al., 2014, KILJANEK et al., 2016).

Die umfangreichen Basisvalidierungen mit allen relevanten Wirkstoffen werden regelmäßig aber aus Kapazitätsgründen nur in größeren zeitlichen Abständen wiederholt. Bei Bedarf erfolgen Überprüfungen der Methode mit neu ins Screening-Programm aufgenommenen Wirkstoffen.

Die Matrix-Standards für die Rückstandsanalysen von Pflanzenmaterial im Rahmen der Schadensfallklärung

Tab. 2. Wiederfindungsraten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für ausgewählte Insektizide, Akarizide und Varroazide in Bienenmatrix bei verschiedenen zugesetzten Wirkstoffkonzentrationen

Wirkstoff	Methode	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Zusatzkonzentration (n = 4)					
				1 µg/kg		10 µg/kg		50 µg/kg	
				WFR %	RSD %	WFR %	RSD %	WFR %	RSD %
Acetamiprid	LC	0,03	0,06	62	12	95	2	91	6
Alpha-Cypermethrin	GC	3,13	6,25	n.n.	n.n.	82	3	76	5
Beta-Cyfluthrin	GC	0,63	1,25	92	11	101	11	77	3
Brompropylat	GC	3,13	6,25	n.n.	n.n.	88	7	86	4
Chlorpyrifos	GC	0,63	1,25	94	5	82	8	78	12
Clothianidin	LC	0,31	0,63	103	12	95	4	88	7
Coumaphos	GC	3,13	6,25	n.n.	n.n.	92	5	79	3
Deltamethrin	GC	6,25	12,5	n.n.	n.n.	101	11	77	3
Dimethoat	LC	0,03	0,06	85	3	101	2	96	3
Etofenprox	LC	0,03	0,06	46	7	72	4	71	7
Fipronil	GC	0,63	1,25	103	7	71	11	76	8
Imidacloprid	LC	0,31	0,63	77	7	97	3	91	5
Indoxacarb	LC	0,31	0,63	48	14	70	7	71	5
Lambda-Cyhalothrin	GC	0,63	1,25	94	4	84	3	74	3
Omethoat	LC	0,13	0,31	94	6	103	3	105	2
Parathion-methyl	GC	3,13	6,25	n.n.	n.n.	102	7	88	12
Permethrin	GC	31,3	43,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	94	4
Phosalon	LC	0,06	0,13	55	22	80	3	78	5
Prallethrin	GC	0,63	1,25	69	9	82	9	79	12
Pirimicarb	LC	0,01	0,03	80	2	95	1	93	6
Propoxur	LC	0,06	0,13	79	4	82	3	85	9
Spinosyn A	LC	0,06	0,13	42	14	68	5	64	7
Spirodiclofen	GC	3,13	6,25	n.n.	n.n.	93	10	84	11
Tau-Fluvalinat	GC	0,63	1,25	45	19	82	5	74	3
Tetramethrin	LC	0,63	1,25	51	26	79	6	79	2
Thiacloprid	LC	0,03	0,06	55	9	102	4	86	8
Thiamethoxam	LC	0,03	0,06	66	9	104	6	88	1

LOD = Nachweisgrenze, LOQ = Bestimmungsgrenze, WFR = Wiederfindungsrate, RSD = relative standard deviation = relative Standardabweichung, n.n. = nicht nachweisbar
 Parameter für Berechnung von LOD und LOQ in µg/kg: 8 g Einwaage, 4 g Aliquot in 2,5 ml Endvolumen.
 Die Einwaage ergibt sich aus der Tatsache, dass 100 Bienen für die Analyse verwendet wurden, die 8 g wogen.

werden nur mit Raps-Matrix hergestellt. Das liegt darin begründet, dass im Falle von Bienenvergiftungen sehr unterschiedliche Pflanzenproben (Raps-, Kartoffel-, Spargelkraut, Blühstreifenmischung, Blätter von Obstbäumen oder Beerensträuchern) mitgeschickt werden, für die kein unbehandeltes Material für die Herstellung von Matrix-Standards vorliegt. Zusatzversuche mit Raps-, Kartoffel- und Spargelkraut haben gezeigt, dass die Ergebnisse vergleichbar sind und das in diesem Fall auf eine Pflanzen-Matrix zurückgegriffen werden kann, um die Messzeit zu begrenzen und einen möglichst hohen Probendurchsatz zu erreichen.

Wichtig für die Bewertung eines Schadenfalls und die Ermittlung des potentiellen Verursachers des Schadens

sind die Identifizierung möglichst vieler übereinstimmender Wirkstoffe in Bienen- und Pflanzenproben und die Konzentrationen der gefundenen toxischen sowie weiterer relevanter Wirkstoffe.

Matrixeffekte

Die Messungen beider chromatographischer Verfahren, GC-MS und LC-MS/MS, können starken Matrixeffekten (Signalerhöhung oder -unterdrückung) unterliegen, welche die Messung beeinflussen und bei der Quantifizierung zu falschen Ergebnissen führen können. HAJŠLOVÁ und ZROSTLÍKOVÁ haben die Auswirkungen dieser Effekte

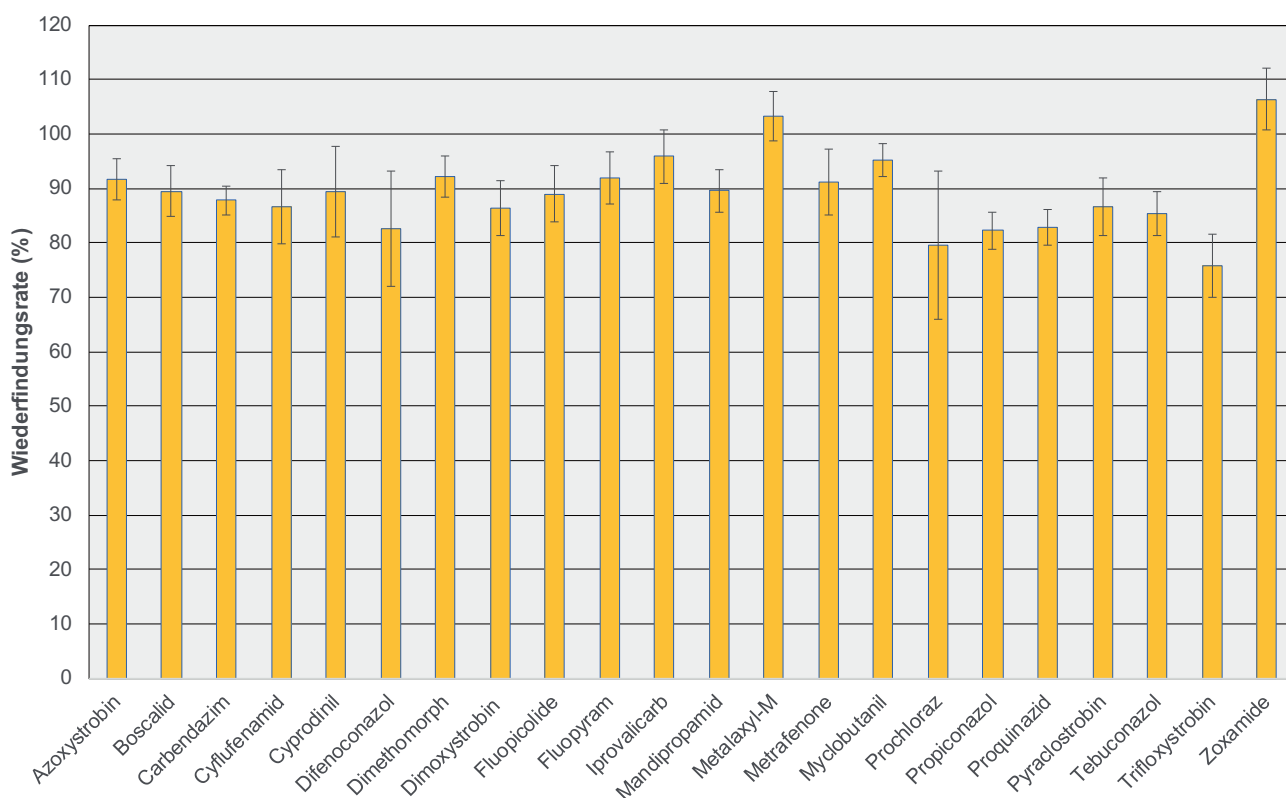


Abb. 4. Wiederfindungsraten für ausgewählte Fungizide in Pollenmatrix bei einer zugesetzten Wirkstoffkonzentration von 20 µg/kg. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus 5 Wiederholungen, die jeweils zweifach injiziert wurden, mit der absoluten Standardabweichung (\pm %).

in der Spurenanalytik und Strategien zu deren Vermeidung bzw. Kompensation bereits 2003 in einem Übersichtsartikel beschrieben. Es müssen also Lösungen gefunden werden, um Fehler zu vermeiden.

Jeder Probe werden zu Beginn der Aufarbeitung deuterierte Wirkstoffe (Surrogat-Standards) für die Qualitätskontrolle der Gesamtanalyse zugesetzt. Die Streuung der Surrogat-Wiederfindungen in Bienenproben aus Schadensfällen gibt einen Einblick in die zum Teil erheblichen Einflüsse der Matrix. STAHNKE et al. (2009) fanden, dass für den Großteil der von ihnen untersuchten Wirkstoffe die Eigenschaften der Analyte keinen signifikanten Einfluss auf die Stärke der Signalsuppression in der LC-MS/MS hatten. Es zeigte sich, dass die Matrixeffekte retentionszeitabhängig waren; da die Retentionszeit bestimmt, mit welcher Fraktion der Matrix die Analyte koeluieren. Eigenschaften und Konzentration der Matrix wurden als entscheidende Parameter für das Ausmaß von Matrixeffekten identifiziert.

Zur Reduktion der Matrixeinflüsse werden in der Bienenanalytik, soweit im Rahmen einer Multimethode möglich, verschiedene Maßnahmen wie Verdünnung der Probenextrakte (STAHNKE et al., 2012) und chromatographische Trennung genutzt. Da diese Maßnahmen in der Regel nicht ausreichen, oder wie die Verdünnung nicht immer genutzt werden können, da sehr geringe Mengen für Bienen toxischer Substanzen nachgewiesen werden müs-

sen, wird die Quantifizierung der Wirkstoffe mit Matrix-Standards vorgenommen, um die Matrixeinflüsse zu kompensieren. Um das zu erreichen, müssen Standard und Probe eine sehr ähnliche Zusammensetzung aufweisen.

In Abb. 5 sind Beispiele für die Matrixeffekte bei der Quantifizierung verschiedener Insektizide mit Referenzsubstanzen in Bienenmatrix bzw. Lösungsmittel dargestellt.

Eine weitere Lösung zur Reduktion von Matrixeffekten ist die Verwendung deuterierter (isotopenmarkierter) Referenzsubstanzen als interne Standards für die Quantifizierung. Aufgrund der identischen chemischen Struktur werden für diese internen Standards je nach Messsystem fast die gleichen Retentionszeiten wie für die untersuchten Analyten erreicht. So wird die Messung von internem Standard und Analyt im gleichen Maß durch Matrixkomponenten beeinflusst und die Kalibrierung kann dann mit Referenzsubstanzen in Lösungsmittel durchgeführt werden. Den positiven Effekt zeigen die Beispiele von Dimethoat, Imidacloprid und Alpha-Cypermethrin in Abb. 5, die unter Verwendung von Dimethoat D6, Imidacloprid D4 bzw. Trans-Cypermethrin D6 quantifiziert wurden.

Bei dieser Quantifizierungsmethode sind Isotopenreinheit und Stabilität des isotopenmarkierten Standards unbedingt zu beachtende Faktoren. Selbst bei einer Isotopenreinheit von 99,9% kann der Anteil der nicht mar-

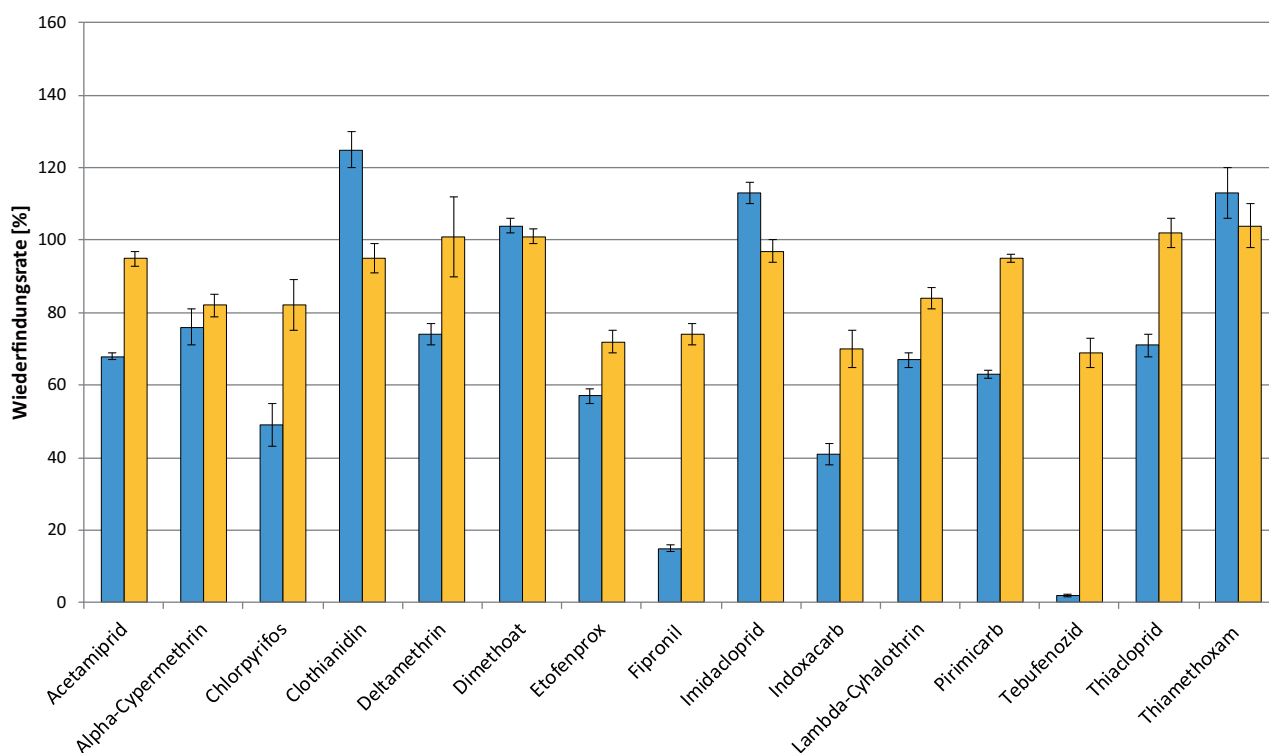


Abb. 5. Matrixeffekte bei der Quantifizierung verschiedener Insektizide in Bienenproben mit Referenzsubstanzen in Lösungsmittel (blaue Säulen) oder Bienenmatrix (gelbe Säulen). Die Zusatzkonzentration war 10 µg/kg. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus 5 Wiederholungen, die jeweils zweifach injiziert wurden, mit der absoluten Standardabweichung (± %).

kierten, nativen Substanz aufgrund der Messempfindlichkeit besonders bei niedrigen Konzentrationen die Peakfläche des Analyten signifikant beeinflussen bzw. seine Anwesenheit vortäuschen.

Für die Multimethode ist das leider keine allgemein anwendbare Lösung, da nicht für alle Analyten deutere „Zwillingssubstanzen“ verfügbar sind. Wenn möglich werden strukturähnliche, überwiegend deutere, Substanzen für bestimmte Gruppen (z.B. Pyrethroide, Azol-Fungizide) als interne Standards verwendet. Es sollte in jedem Fall beachtet werden, dass die betreffenden Substanzen so zeitgleich wie möglich eluieren, um eine maximale Kompensation der Matrixeffekte zu erreichen.

In Projekten mit wenigen Zielsubstanzen und verfügbaren deuterten internen Standards kann von dieser Variante Gebrauch gemacht werden. In Abb. 6 werden am Beispiel des Insektizids Thiacloprid die sehr unterschiedlich ausgeprägten Matrixeffekte in verschiedenen Probenmaterialien im Vergleich mit einem Lösungsmittelstandard aufgezeigt.

Abbildung 7 zeigt den positiven Effekt des Einsatzes von Thiacloprid D4 als internem Standard bei der Quantifizierung von Thiacloprid in Gelée Royal, Nektar und Pollen. Die mit Matrix- und Lösungsmittel-Standards erzielten Ergebnisse stimmen sehr gut überein, was die sehr weitgehende Kompensation des Matrixeffekts belegt.

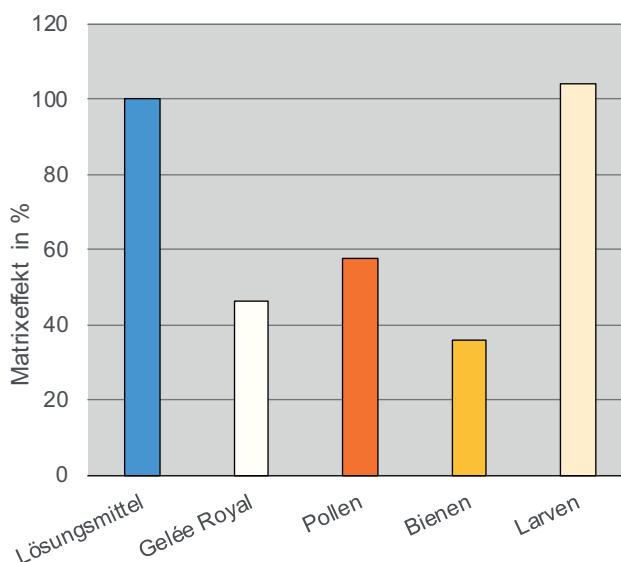


Abb. 6. Matrixeffekte bei der Bestimmung von Thiacloprid in verschiedenen Probenmaterialien im Vergleich zum Lösungsmittel-Standard (Konzentration: 10 µg/µl). Das Ergebnis der Division der Peakfläche des Analyten Thiacloprid durch die Peakfläche des strukturell ähnlichen internen Standards Imidacloprid D4 (= relative Fläche) in Lösungsmittel wurde auf 100% gesetzt. Die Unterschiede zeigen den durch die Begleitstoffe bedingten Matrixeffekt, aus dem in der Regel eine Signalunterdrückung resultiert.

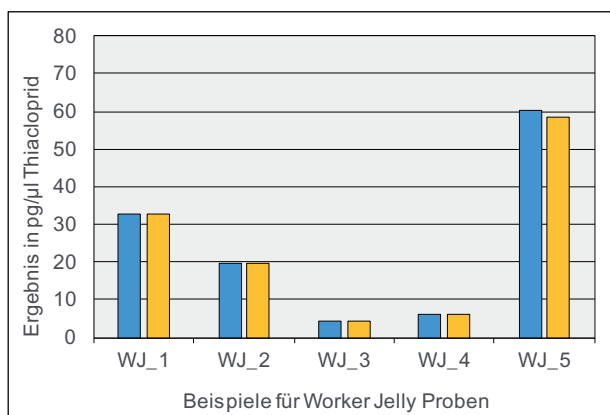
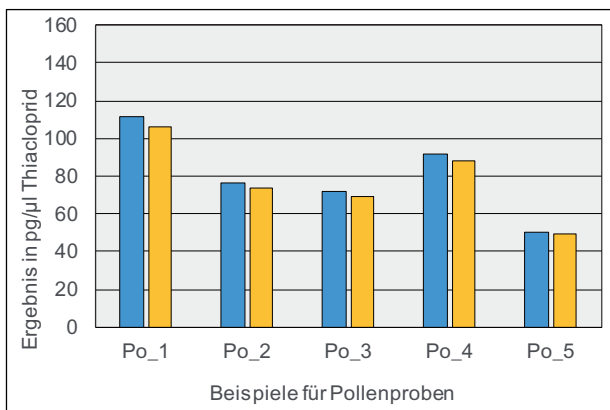
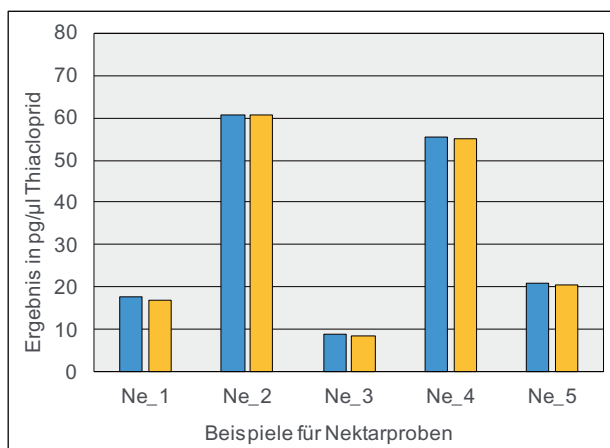


Abb. 7. Kompensation des Matrixeffekts bei der Quantifizierung von Thiachloprid in verschiedenen Probenotypen mit Lösungsmittel-Standards (blaue Säulen) im Vergleich zu Matrix-Standards (gelbe Säulen) jeweils unter Verwendung von Thiachloprid D4 als internem Standard. Für die jeweilige Matrix (Nektar, Pollen, Worker Jelly) wurden reale Proben mit Konzentrationen zwischen 4 pg/µl und etwa 100 pg/µl ausgewählt. Die Angaben sind Mittelwerte aus Doppelinjektionen.

Fazit

Die hier vorgestellte, umfassend validierte Multimethode ist für die Bestimmung von Rückständen in Bienen- und Pflanzenproben sehr gut geeignet, was sich an den erzielten Wiederfindungsraten, LOD- und LOQ-Werten zeigt. Sie ist darüber hinaus vielseitig anwendbar. So waren bei

den Bienenprodukten (Pollen/Bienenbrot, Gelée Royal oder Wachs) nur geringfügige Anpassungen (Extraktionsvolumina, Aliquotierung, Endvolumen) erforderlich, um die Multimethode erfolgreich einzusetzen und auch bei geringen Probenmengen ausgewählte Wirkstoffe im unteren Spurenbereich ($< 1 \mu\text{g}/\text{kg}$) bestimmen zu können. Somit ist sowohl eine solide Aufklärung von potentiellen Bienenvergiftungen als auch eine breite Anwendung im Bereich der Forschung möglich.

Jüngste Studien nutzten die Multimethode zur Bestimmung der Rückstandsbelastung essentieller Nahrungsquellen der Honigbienen und deren Auswirkung (BÖHME et al., 2017, 2018B). So wurde z.B. der Frage nachgegangen, ob wirkstoffhaltiges Pollenfutter zu einer Kontamination von Königinnen- oder Arbeiterinnen-Futtersaft führt (BÖHME et al., 2018a, 2019). Auch die Stabilität von Imidacloprid in Bienen war unter verschiedenen Aspekten nach Fütterung mit einer insektizidhaltigen Zuckerlösung Gegenstand einer Untersuchung (SCHOTT et al., 2017).

Aus der Kombination von Routineanalytik bei der Schadensfallklärung und einem breiten Spektrum experimenteller Fragestellungen resultieren zusätzliche Validierungen der Methode hinsichtlich diverser Matrices, Substanzkombinationen und Konzentrationen.

Danksagung

Wir danken Herrn Dr. Klaus Wallner von der Landesanstalt für Bienenkunde der Universität Hohenheim für die Durchsicht des Manuskripts und die wertvollen Hinweise.

Interessenskonflikte


Die Autoren erklären, dass keine Interessenskonflikte vorliegen.

Literatur


- AL-ALAM, J., Z. FAJLOUN, A. CHBANI, M. MILLET, 2017: A multiresidue method for the analysis of 90 pesticides, 16 PAHs, and 22 PCBs in honey using QuEChERS-SPME. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **409**, 5157–5169, DOI: 10.1007/s00216-017-0463-y.
- AL NAGGAR, Y., G. CODLING, A. VOGT, E. NAIEM, M. MONA, A. SEIF, J.P. GIESY, 2015: Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera*L.) and their potential hazard to bee colonies in Egypt Yahya. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **114**, 1–8, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.12.039.
- ANASTASSIADES, M., S.J. LEHOTAY, D. STAJNBAHER, F.J. SCHENCK, 2003: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* **86** (2), 412–431.
- BÖHME, F., G. BISCHOFF, C.P.W. ZEBITZ, P. ROSENKRANZ, K. WALLNER, 2017: Chronic exposure of honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to a pesticide mixture in realistic field exposure rates. *Apidologie* **48**, 353–363, DOI: 10.1007/s13592-016-0479-x.
- BÖHME, F., G. BISCHOFF, C.P.W. ZEBITZ, P. ROSENKRANZ, K. WALLNER, 2018a: From field to food – will pesticide-contaminated pollen diet lead to a contamination of royal jelly? *Apidologie* **49** (1), 112–119, DOI: 10.1007/s13592-017-0533-3.

- BÖHME, F., G. BISCHOFF, C.P.W. ZEBITZ, P. ROSENKRANZ, K. WALLNER, 2018b: Pesticide residue survey of pollen loads collected by honeybees (*Apis mellifera*) in daily intervals at three agricultural sites in South Germany. *PLOS ONE* **13**, e0199995, DOI: 10.1371/journal.pone.0199995.
- BÖHME, F., G. BISCHOFF, C.P.W. ZEBITZ, P. ROSENKRANZ, K. WALLNER, 2019: From field to food II – will pesticide-contaminated pollen diet lead to a contamination of worker jelly? *Journal of Apicultural Research* **58** (4), 112–119, DOI: 10.1080/00218839.2019.1614727.
- CALATAYUD-VERNICH, P., F. CALATAYUD, E. SIMÓ, M.M. SUAREZ-VARELA, Y. PICÓ, 2016: Influence of pesticide use in fruit orchards during blooming on honeybee mortality in 4 experimental apiaries. *Science of the Total Environment* **541**, 33–41, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.08.131.
- CHEMGAPEdia, 2020: Chemie, Analytische Chemie, Analytik, Kalibrierung. URL: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/kalibrierung.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/datenauswertung/quantitativ/innererstandard/innerstandardm80ht0801.vscml.html>
- GIL GARCÍA, M.D., S. UCLÉS DUQUE, A.B. LOZANO FERNÁNDEZ, A. SOSA, A.R. FERNÁNDEZ-ALBA, 2017: Multiresidue method for trace pesticide analysis in honeybee wax comb by GC-QqQ-MS. *Talanta* **163**, 54–64, DOI: 10.1016/j.talanta.2016.10.083.
- GOULSON, D., E. NICHOLLS, C. BOTIAS, E.L. ROTHERAY, 2015: Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* **347** (6229), article number 1255957, DOI: 10.1126/science.1255957.
- HAIŠLOVÁ, J., J. ZROSTLÍKOVÁ, 2003: Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *Journal of Chromatography A* **1000** (1-2), 181–197, DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00539-9.
- IUPAC, 2020: Compendium of Chemical Terminology (the “Gold Book”), URL: <http://goldbook.iupac.org/terms/view/M03759>.
- KASIOŃ, K.M., C. ANAGNOSTOPOULOS, P. ANASTASIADOU, K. MACHERA, 2014: Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Science of the Total Environment* **485**, 633–642, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.042.
- KILJANEK, T., A. NIEWIADOWSKA, S. SEMENIUK, M. GAWEL, M. BORZĘCKA, A. POSYŃIAK, 2016: Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry – Honeybee poisoning incidents. *Journal of Chromatography A* **1435**, 100–114, DOI: 10.1016/j.chroma.2016.01.045.
- KLEIN, J., L. ALDER, 2003: Applicability of Gradient Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry to the Simultaneous Screening for About 100 Pesticides in Crops. *Journal of AOAC International* **86** (5), 1015–1037, DOI: 10.1093/jaoac/86.5.1015.
- PISTORIUS, J., 2016: Vergiftungen von Honigbienen (*Apis mellifera* L.) durch insektizidhaltigen Staubabrieb beim Anbau von Raps und Mais. Dissertation, Universität Rostock, Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut, 188 S., DOI: 10.5073/dissjki.2016.003.
- POTTS, S.G., J.C. BIESMEIJER, C. KREMEN, P. NEUMANN, O. SCHWEIGER, W.E. KUNIN, 2010: Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in ecology & evolution* **25** (6), 345–353, DOI: 10.1016/j.tree.2010.01.007.
- PRZYBYLSKI, C., C. SEGARD, 2009: Method for routine screening of pesticides and metabolites in meat based baby-food using extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **32**, 1858–1867, DOI: 10.1002/jssc.200900016.
- ROSZKO, M.L.M. KAMIŃSKA, K. SZYM CZYK, R. JEDRZEJCZAK, 2016: Levels of selected persistent organic pollutants (PCB, PBDE) and pesticides in honey bee pollen sampled in Poland. *PLOS ONE* **11**, e0167487, DOI: 10.1371/journal.pone.0167487.
- SANTE, 2019: XXX/12682/2019 (Implemented by 01.01.2020): Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, URL: <https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl Article.asp?CntID=727>.
- SCHOTT, M., G. BISCHOFF, G. EICHNER, A. VILCINSKAS, R. BÜCHLER, M.D. MEIXNER, A. BRANDT, 2017: Temporal dynamics of whole body residues of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in live or dead honeybees. *Scientific reports* **7**, Article number: 6288, DOI: 10.1038/s41598-017-06259-z.
- SEEFELD, F., 2008: Chemische Untersuchungen zur Aufklärung von Schadensfällen an Honigbienen durch Pflanzenschutzmittel im Zeitraum 1985 bis 2006. Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut Heft **418**.
- STAHNKE, H., T. REEMTSMA, L. ALDER, 2009: Compensation of Matrix Effects by Postcolumn Infusion of a Monitor Substance in Multi-residue Analysis with LC-MS/MS. *Analytical Chemistry* **81** (6), 2185–2192, DOI: 10.1021/ac802362s.
- STAHNKE, H., S. KITTLAUS, G. KEMPE, L. ALDER, 2012: Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed? *Analytical Chemistry* **84** (3), 1474–1482, DOI: 10.1021/ac202661j.
- TETTE, P.A.S., F.A. DA SILVA OLIVEIRA, E.N.C. PEREIRA, G. SILVA, M.B. DE ABREU GLÓRIA, C. FERNANDES, 2016: Multiclass method for pesticide quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry* **211**, 130–139, DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.05.036.
- VANBERGEN, A.J., S.G. POTTS, A. VIAN, E.P. MALKEMPER, J. YOUNG, T. TSCHULIN, 2019: Risk to pollinators from anthropogenic electro-magnetic radiation (EMR): Evidence and knowledge gaps. *Science of the Total Environment* **695**, Article number 133833, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.133833.
- WALORCZYK, S., B. GNUSKOWSKI, 2009: Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1216**, 6522–6531, DOI: 10.1016/j.chroma.2009.07.045.
- WERNECKE, A., M. FROMMBERGER, R. FORSTER, J. PISTORIUS, 2019: Letale Auswirkungen verschiedener Tankmischungen aus Insektiziden, Fungiziden und Düngemitteln auf Honigbienen unter Labor-, Halbfreiland- und Freilandbedingungen. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* **14**, 239–249, DOI: 10.1007/s00003-019-01233-5.
- WIEST, L., A. BULETÉ, B. GIROUD, C. FRATTA, S. AMIC, O. LAMBERT et al., 2011: Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **1218** (34), 5743–5756, DOI: 10.1016/j.chroma.2011.06.079.
- WISK, J.D., 2014: Assessing Exposure of Pesticides to Bees. In: *Pesticide Risk Assessment for Pollinators*. Fischer, D., T. Moriarty (Hrsg.), Wiley Blackwell, 45–74, DOI: 10.1002/9781118852408.ch7.

© Der Autor/Die Autorin 2020.

 Dies ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt wird (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

© The Author(s) 2020.

 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).

Anna Wernecke, Denise Castle

Auswirkungen von Pflanzenschutzmittel-Tankmischungen auf Honigbienen und mögliche physiologische Interaktionen

Effects of tank mixtures of plant protection products on honey bees and possible physiological interactions

154

Zusammenfassung

Im Zuge der Nahrungssuche werden Bestäuber, wie Honigbienen, unter Umständen einer Vielzahl von Pflanzenschutzmitteln (PSM) ausgesetzt. Während die Effekte einzelner PSM auf Bienen im Rahmen des Zulassungsprozesses umfangreich geprüft werden, erfolgt für Tankmischungen eine routinemäßige Risikobewertung i.d.R. nur für Insektizide und bekannte potentiell synergistisch wirkende Mischungspartner. Aus ökonomischen und arbeitswirtschaftlichen Gründen kommen Mischungen von PSM dennoch häufig zum Einsatz. In einigen Fällen führen Interaktionen zwischen den Mischungspartnern hierbei zu unerwünschten additiven oder synergistischen Effekten. Insbesondere für Pyrethroide und Neonikotinoide in Mischung mit Ergosterol-Biosynthese-hemmenden Azolfungiziden ist das synergistische Potential der Mischtoxizität auf Honigbienen bekannt und wird regulatorisch bereits berücksichtigt. Diese Wirkungssteigerung resultiert aus der Hemmung des Hauptentgiftungsenzyms P450 durch Azolfungizide, sodass das jeweilige Insektizid von den Bienen nicht mehr abgebaut werden kann. Erste Hinweise auf wirkungssteigernde Effekte liegen ebenfalls für Mischungen aus Insektiziden und Zusatzstoffen vor. Für eine realistische Risikobewertung ist ein besseres Verständnis von Mischungseffekten essentiell, das nur über weitere Forschung erreicht werden kann.

Stichwörter: Honigbienen, Tankmischungen, Synergistische Effekte, Entgiftung

Abstract

During foraging bouts pollinators like honey bees may be exposed to multiple plant protection products (PPPs). In contrast to applications of single PPPs the effects of tank mixtures are not routinely evaluated in the risk assessment process of PPPs with the exception of known synergistic insecticides and mixing partners. Due to economical constraints and process efficiency PPP mixtures are commonly used in agricultural practices. However, sometimes interactions among agrochemicals lead to undesirable additive and synergistic effects. Especially mixtures of pyrethroids or neonicotinoids with azole fungicides, which inhibit sterol biosynthesis, have a synergistic potential of negatively affecting honey bees. For such mixtures, regulatory restrictions are already in place. These synergistic effects are associated with azole fungicides inhibiting the main detoxification enzyme P450, which hinders the bee to detoxify the insecticide. Further studies provide first evidence for increased impacts of mixtures of insecticides with adjuvants on honey bees. More research is necessary to better understand mixture toxicity and to implement this knowledge in the risk assessment.

Key words: Honey bees, Tank mixtures, Synergistic impacts, Detoxification

Affiliation

Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Bienenschutz, Braunschweig

Kontaktanschrift

M.Sc. Anna Wernecke, Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Bienenschutz, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, E-Mail: anna.wernecke@julius-kuehn.de

Zur Veröffentlichung angenommen

03. April 2020

Einleitung

Annähernd 90% der blühenden Wildpflanzenspezies und über zwei Drittel der menschlichen Hauptnahrungspflanzen sind bei der Weitergabe des Blütenpollens auf Tierbestäubung angewiesen (IPBES, 2017). Ein Akt der Befruchtung, der die Grundlage für den Fortbestand vieler Pflanzen legt und so der Natur zu mehr Vielfalt und Stabilität verhilft. Der Marktwert der globalen tierischen Bestäubungsleistung wurde 2015 auf bis zu 577 Billionen US\$ jährlich geschätzt (IPBES, 2017). Neben den Wildbienen zählt die Westliche Honigbiene *Apis mellifera* mit rund 81 Millionen Völkern weltweit zu den wichtigsten ökologischen und ökonomischen Bestäubern (KLEIN et al., 2007; IPBES, 2017). Ihre Gesundheit wird von einer Vielzahl einzelner und interagierender Stressoren beeinflusst. Abgesehen von biologischen Faktoren, wie Pathogenen und Parasiten oder Umweltfaktoren, wie Witterungsverhältnissen und Nahrungsressourcen, beeinflussen insbesondere chemische Stressoren, wie Pflanzenschutzmaßnahmen, die Vitalität der Honigbiene (RORTAIS et al., 2017; KOPIT und PITTS-SINGER, 2018). Der weltweite Pflanzenschutzmittelumsatz lag im Jahr 2018 bei rund 47,9 Milliarden Euro (STATISTA, 2020). Neben Fungiziden, Wachstumsregulatoren und Herbiziden kommen Honigbienen auf ihren Trachtflügen auch als Nichtzielorganismen mit einer Reihe von Insektiziden in Kontakt, sofern diese in blühenden oder bienenattraktiven Kulturen zum Einsatz kommen. Im Kampf gegen Schaderreger setzen Landwirte in der Praxis vermehrt auf Tankmischungen (THOMPSON und WILKINS, 2003). Hierunter wird im Agrarsektor das eigenmächtige Mischen fertig formulierter, käuflich erworbener Produkte (darunter PSM, Düngemittel oder Zusatzstoffe) im PSM-Tank des Pflanzenschutzgerätes verstanden. Die Kombination mehrerer Mischungspartner bietet dem Landwirt die Möglichkeit in einem Arbeitsgang den Arbeitsaufwand zu reduzieren, Aufwandmengen zu senken und so sowohl Zeit als auch Arbeitskosten einzusparen. Gleichzeitig können Tankmischungen das Wirkspektrum gegen verschiedene Schaderreger erweitern und der Resistenzentwicklung entgegenwirken (RODE, 1986; BVL, 2018). Werden bei der Ausbringung alle Anwendungsvorschriften erfüllt, ist der Einsatz von Tankmischungen gesetzlich zulässig (BVL, 2015). Eine Regelung zu Tankmischungen seitens der deutschen Bienenschutzverordnung besteht nicht (BIENSCHV, 1992).

Während die Effekte einzelner PSM auf Bienen im Rahmen des Zulassungsprozesses umfangreich geprüft und bewertet werden, erfolgt für Tankmischungen eine routinemäßige Risikobewertung i.d.R. nur für Insektizide und bekannte potentiell synergistisch wirkende Mischungspartner. Eine Prüfung aller potentiell möglichen Mischungskombinationen ist aufgrund der Fülle an Handelspräparaten auf dem Markt kaum möglich. Obwohl viele Mischungen keine negativen Effekte auf Bienen hervorrufen, kommt es bei einigen Anwendungen zu additiven oder gar synergistischen Wirkungssteigerungen, sodass sich die Einstufung der Bienengefährlichkeit in

Mischung ändern kann (BROWN und KEGLEY, 2015; BVL, 2018). Bei einem additiven Effekt entspricht die Toxizität der Tankmischung der Summe der Toxizität der einzelnen PSM (CEDERGREEN et al., 2013). Eine synergistische Wirkungssteigerung hingegen liegt vor, wenn die Toxizität der Mischung die Summe der Einzelkomponenten übersteigt (BLISS, 1939). In seltenen Fällen werden auch antagonistische Wechselwirkungen durch Tankmischungen erzielt, bei denen die Effekte geringer ausfallen als erwartet (AHMAD, 2007). In den letzten Jahren wurden zahlreiche Toxizitätsstudien zu Honigbienen veröffentlicht. Nur ein geringer Teil hiervon jedoch untersucht die Toxizität von PSM in Mischung (WANG et al., 2019). Bislang sind die Mischtoxizität und die damit verbundenen letalen und subletalen Auswirkungen auf Bestäuber nicht umfassend erforscht, was eine realistische Einschätzung der Risiken erschwert, welche im Zulassungsverfahren von PSM jedoch für Entscheidungsprozesse von großer Bedeutung ist.

Status quo 2020

Tankmischungen ohne Toxizitätssteigerungen

Die aktuelle Datenlage lässt darauf schließen, dass nicht alle Kombinationen eine erhöhte Toxizität bei Honigbienen bewirken. Bestätigen lässt sich dies für eine getestete Tankmischung aus einem Neonikotinoid (Insektizid, welches in das zentrale Nervensystem von Insekten eingreift) und einem respirationshemmenden Fungizid. Bei der im Rapsanbau häufig verwendeten Tankmischung aus Biscaya® (Wirkstoff: Thiacloprid; IRAC (2019): 4A) und Cantus® Gold (Wirkstoff: Boscalid, Dimoxystrobin; FRAC (2019): C2 und C3) traten weder auf Laborebene noch unter Halbfreiland- oder Freilandbedingungen biologisch relevante Mortalitätserhöhungen oder Verhaltensanomalien im Vergleich zur Einzelformulierung oder Kontrollvariante auf (WERNECKE et al., 2019).

Tankmischungen aus mehreren Insektiziden

Die nationale Zulassungsmanagementbehörde für Pflanzenschutzmittel (das BVL – Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) gab im Jahr 2015 in einer Fachmeldung bekannt, dass Mischungen aus mehreren B4-Insektiziden (bienenungefährliche) unvertretbare Auswirkungen auf Honigbienen hervorrufen (BVL, 2015). Hierin heißt es: „Speziell bei der Mischung mehrerer Insektizide sind Vergiftungen von Bienen nicht auszuschließen, auch wenn die Mischungspartner als bienenungefährlich eingestuft sind. Die Einstufung als bienenungefährlich basiert auf einer Prüfung bis zu der höchsten durch die Zulassung festgelegten Aufwandmenge des einzelnen Mittels. Die Mischung mehrerer Mittel ist toxiologisch einer Erhöhung der Aufwandmenge gleichzusetzen, da Dosisaddition oder synergistische Prozesse nicht ausgeschlossen werden können. Eine Mischung mehrerer Insektizide sollte deshalb wie ein bienengefährliches Pflanzenschutzmittel betrachtet werden, also nicht auf blühende oder von Bienen beflogene Pflanzen ausgebracht werden.“ (BVL, 2015). Für Bienen bedeuten

Tankmischungen aus mehreren Insektiziden eine Doppelbelastung, die letztlich die Entgiftungskapazitäten der Biene übersteigt. Daher entsprechen derartige Mischungen wegen zu hoher Risiken für den Naturhaushalt nicht der guten fachlichen Praxis.

Tankmischungen aus Pyrethroiden und Azolfungiziden

Das Phänomen der synergistischen Wirkung ist von Pyrethroiden (synthetische Insektizide mit neurotoxischer Wirkung) und Azolfungiziden, den Ergosterol-Biosynthese-Hemmern (EBH-Fungiziden), bekannt. Bereits 1992 stellten COLIN und BELZUNCES die synergistischen Effekte einer Tankmischung aus Deltamethrin und Prochloraz auf Honigbienen fest. In den Folgejahren erschienen weitere Studien u.a. von PILLING und JEPSON (1993), PILLING et al. (1995), THOMPSON und WILKINS (2003) und WERNECKE et al. (2019), die die synergistischen Wechselwirkungen zwischen Pyrethroiden und EBH-Fungiziden belegten. Seit Ende der 90er Jahre wird daher die Anwendung von pyrethroidhaltigen Insektiziden zusammen mit Azolfungiziden geregelt. B4-Pyrethroide dürfen laut Bienenschutzauflage NB6623 in Mischung mit Ergosterol-Biosynthese-hemmenden Fungiziden an blühenden Pflanzen und an Pflanzen, die von Bienen befliegen werden, nur abends nach dem täglichen Bienenflug bis 23:00 Uhr angewendet werden, es sei denn, die Anwendung dieser Mischung an blühenden Pflanzen und an Pflanzen, die von Bienen befliegen werden, ist ausweislich der Gebrauchsanleitung des Fungizids auch während des Bienenfluges ausdrücklich erlaubt (BVL, 2019a). Potentielle EBH-Wirkstoffe sind der „Fungicide Resistance Action Committee“ – Liste (FRAC, 2019) zu entnehmen. Dennoch registriert die deutsche Untersuchungsstelle für Bienenvergiftungen des Julius Kühn-Institutes immer wieder Schadfälle durch Fehlanwendungen von Pyrethroid-Azolfungizid-Tankmischungen (JKI, 2017).

Keine wissenschaftlichen Empfehlungen hingegen gibt es zu der bienensicheren Anwendung von Spritzfolgen synergistisch wirkender Mischungspartner. Laborversuche mit Honigbienen weisen auf starke synergistische Effekte bei zeitnahen Spritzfolgen hin (WERNECKE et al., 2019). Diese führten zunächst zu heftigen Krämpfen und unkoordinierten Bewegungen bei den Versuchsbienen und ergaben bereits 48 h nach der Applikation Mortalitätsraten von bis zu 100% bei maximal zulässiger Aufwandmenge (WERNECKE et al., 2019). Inwiefern diese Mortalitätserhöhungen auch in der Praxis zu beobachten sind, gilt es in höherstufigen Tests mit Azolfungizid-Vertretern zu prüfen, die eine möglichst hohe Bindungsaffinität aufweisen.

Tankmischungen aus Neonikotinoiden und Azolfungiziden

Seit 2018 werden nun auch Thiacloprid-Azolfungizid-Tankmischungen durch die Auflage NB6613 in ihrer Anwendung beschränkt. Verschiedene Studien an Honigbienen (u.a. SCHMUCK et al., 2003; IWASA et al., 2004; THOMPSON et al., 2014; WERNECKE et al., 2019) machten Regulierungsbedarf deutlich. In den Untersuchungen

von WERNECKE et al. (2019) konnten hoch signifikante synergistische Wirkungssteigerungen bei Tankmischungen aus Biscaya® (Wirkstoff: Thiacloprid) und verschiedenen EBH-Fungiziden auf Laborebene nachgewiesen werden, die sich bei höherstufigen Tests im Halbfreiland und Freiland für die getestete Tankmischung aus Biscaya® (Wirkstoff: Thiacloprid) und Mirage® 45 EC (Wirkstoff: Prochloraz) bestätigten. Hier kam es wenige Stunden nach der Applikation zu einer Vielzahl krampfender Honigbienen im Pflanzenbestand sowie vor der Beute und einem starken Mortalitätsanstieg (WERNECKE et al., 2019). Folglich dürfen laut Auflage NB6613 Mittel mit dem Wirkstoff Thiacloprid nicht auf blühende oder von Bienen beflogene Pflanzen in Mischung mit Fungiziden aus der Gruppe der Ergosterol-Biosynthese-Hemmer ausgebracht werden, es sei denn die Anwendung dieser Mischungen auf blühenden oder bienenattraktiven Kulturen ist in der Gebrauchsanleitung des Fungizids ausweislich erlaubt. Von der Auflage NB6613 ausgenommen sind demnach EBH-Fungizide mit dem Wirkstoff Prothioconazol, wie Propulse®, Proline® und Curbatur®, da für diesen Wirkstoff in Studien keine Wirkungssteigerung in Kombination mit B4-Neonikotinoiden nachgewiesen werden konnte (BVL, 2018). Mittel mit dem Hinweis NB6645 dürfen daher weiterhin „in Mischung mit einem als nicht bienengefährlich eingestuftem Insektizid aus der Gruppe der Neonikotinoide an blühenden Pflanzen und an Pflanzen, die von Bienen befliegen werden, angewendet werden, sofern dies ausweislich in der Gebrauchsanleitung des Insektizids erlaubt ist“ (BVL Fachmeldung Stand 12.11.2018) (BVL, 2018).

Für die Neonikotinoide Mospilan® SG und Danjiri® (beides mit dem Wirkstoff Acetamiprid), welche beide in Soloapplikation als bienenungefährlich (B4) gelten, gibt es bereits seit 2013 die Auflage NB6612, die besagt, dass das Mittel in Mischung mit Fungiziden aus der Wirkstoffgruppe der Ergosterol-Biosynthese-Hemmer, aufgrund von Toxizitätssteigerungen, als bienengefährlich eingestuft wird (B1) und damit nicht auf blühende Pflanzen und Pflanzen, die von Bienen befliegen werden, ausgebracht werden darf (BVL, 2020a; BVL, 2020c).

Tankmischungen mit Zusatzstoffen

Neben reinen PSM-Tankmischungen wurden in jüngster Vergangenheit auch Tankmischungen mit Zusatzstoffen kritisch hinterfragt. Aktuell befinden sich mehr als 330 PSM-Zusatzstoffe auf dem deutschen Markt (Stand Februar 2020), die der Spritzbrühe u.a. in Form von Netzmitteln (Herabsetzung der Oberflächenspannung), Haftmitteln (Verbesserung der Anhaftung und der Regenfestigkeit), Penetrationsmitteln (kutikuläre Durchdringung) oder Schaumverminderern zugesetzt werden können (WOLBER und SEEMANN, 2006; BVL, 2020b; BVL, 2020d). Gemäß Artikel 2, Absatz 3 d der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 definieren sich Zusatzstoffe als „Stoffe oder Zubereitungen, die aus Beistoffen oder Zubereitungen mit einem oder mehreren Beistoffen bestehen [...], die vom Verwender mit einem Pflanzenschutzmittel vermischt werden, um dessen Wirkung oder ande-

re pestizide Eigenschaften zu verstärken [...]“. Sie sollen folglich die Wirksamkeit und das Wirkungspotential von PSM auch unter ungünstigen Bedingungen (bspw. einer starken Blattbehaarung), sicherstellen. Für den Vertrieb ist bisher nur ein Genehmigungsantrag erforderlich (BVL, 2020d). Im Gegensatz zu PSM, wie Insektiziden und Fungiziden, werden für Zusatzstoffe i.d.R. keine Daten als Bewertungsgrundlage für Risiken und Wirksamkeit eingereicht. Erste durchgeführte Versuche unter Laborbedingungen geben Hinweise auf mögliche, durch Zusatzstoffe verursachte, Wirkungssteigerungen von Insektiziden in Tankmischung. Negative Effekte (u.a. letale und subletale Auswirkungen z.B. auf Lernfähigkeit oder Immunabwehr) ließen sich hierbei für adulte Honigbienen (Bsp.: CIARLO et al., 2012; CHEN et al., 2018, WERNECKE et al., 2018) und Honigbienenlarven (Bsp.: FINE et al., 2017; ZHU et al., 2014) nachweisen. Inwieweit jedoch Tankmischungen aus PSM und Zusatzstoffen tatsächlich ein realistisches Risiko für Honigbienen und andere Nichtzielorganismen bieten, ist bisher umstritten. Ob Unterschiede im wirkungssteigernden Potential zwischen einzelnen Zusatzstoffklassen bestehen und diese Effekte auch unter Praxisbedingungen auftreten, gilt es in weiteren Untersuchungen zu klären.

Interaktion von Pflanzenschutzmitteln und Biene

Charakteristik und Wirkungsweise von Insektiziden

Zur Sicherung quantitativer und qualitativer Erträge sind PSM, wie Insektizide, fester Bestandteil der modernen Landwirtschaft. Neben Carbamaten, Organophosphaten, oder Diamiden kommen derzeit v.a. Pyrethroide und Neonikotinoide in der landwirtschaftlichen Praxis zum Einsatz (KOPIT und PITTS-SINGER, 2018; JKI, 2020a; JKI, 2020b). Hierbei wirken sie an spezifischen Targets (u.a. Rezeptoren) der Schädlinge, indem sie diese z.B. hemmen oder aktivieren (z.B. DAVID et al., 2005; JESCHKE und NAUEN, 2008; SOLTANINEJAD und ABDOLLAHI, 2009). Insbesondere für Pyrethroide und Neonikotinoide ist das Potential der Mischtoxizität auf Honigbienen bekannt (PILLING et al., 1995; IWASA et al., 2004).

Pyrethroide. Pyrethroide zählen zu den effektivsten Insektiziden im Pflanzenschutz mit einem breiten Wirkungsspektrum gegen Schaderreger (VIJVERBERG und VANDEN BERCKEN, 1990). Als synthetische Verbindungen ähneln sie in der Struktur dem natürlichen Chrysanthemengift Pyrethrum, sind gleichzeitig jedoch stabiler und wirksamer (CASIDA, 1980). Seit dem sie in den 1970er Jahren in den Verkehr gebracht wurden (SODERLUND, 2010), erobernten sie den Weltmarkt (VIJVERBERG und VANDEN BERCKEN, 1990) und kommen als Fraß- und Kontaktgifte (BVL, 2011) auch in bienenattraktiven Kulturen, wie Apfel oder Raps (JKI, 2020a; JKI, 2020b) während der Blüte zum Einsatz. Hierbei sind sie nicht zwangsläufig selektiv für Nichtziel-Arthropoden (INGLESFIELD, 1989). Sie entfalten ihre insektizide Wirkung indem sie die spannungsabhängigen Natriumkanäle in den Membranen von Nervenzel-

len der Insekten blockieren und sie so am Schließen hindern (DAVID et al., 2005). Infolgedessen kommt es zu einer Störung der elektrischen Signalübertragung im zentralen Nervensystem und somit innerhalb kürzester Zeit zu Ausfallerscheinungen beim Insekt, denen im schlimmsten Fall der Tod folgt (bekannt als Knock-down) (SODERLUND, 2010; KILJANEK et al., 2016). Hierbei lassen sich je nach Pyrethroid-Typ unterschiedliche Symptome beobachten. Entsprechend ihrer chemischen Struktur können zwei Klassen von Pyrethroiden unterschieden werden: Typ I (ohne Alpha-Cyanogruppe (-C-N)) wie Permethrin und Typ II (Komplementierung des Grundgerüsts durch eine Alpha-Cyanogruppe), zu dem u.a. Lambda-Cyhalothrin, eines der am häufigsten eingesetzten Insektizide im Rapsanbau, gehört (NASUTI et al., 2003; SODERLUND, 2010; JKI, 2020b). Für beide Typen ist der spannungsabhängige Natriumkanal das primäre Target. Während Typ I-Pyrethroide kurze Folgen wiederholter Nervenimpulse mit einer bis zu 10-fachen Verlängerung der Öffnungszeit des Natriumkanals hervorrufen, induzieren Typ II-Pyrethroide lang anhaltende Folgen von Nervenimpulsen mit einer bis zu 200-fach längeren Öffnungszeit (FAULDE, 2010; SODERLUND, 2010) von bis zu einer Minute (FAULDE, 2010). Entsprechend fällt die Wirkung der Typ II-Pyrethroide stärker aus (FAULDE, 2010). Hier wird das Choreoathetose Syndrom (bekannt als „CS“-Syndrom) ausgelöst, was für unkoordinierte Bewegungen, grobschlägigen Tremor und klonische Krämpfe bekannt ist, wohingegen Typ I das sogenannte „T“-Syndrom mit Muskelzittern (Tremor), Übererregbarkeit und Ataxie hervorruft (NASUTI et al., 2003; REICHL, 2011). In seltenen Fällen können bei Pyrethroiden des Typs I und II beide Syndrome beobachtet werden (SODERLUND, 2010).

Neonikotinoide. Ähnlich wie Pyrethroide zählen Neonikotinoide zu den synthetischen Insektiziden, die auf das zentrale Nervensystem von Insekten wirken (SIMON-DELISO et al., 2015). Als Kontakt- und Fraßgift kamen sie seit den 1980er Jahren aufgrund ihrer systemischen Eigenschaften v.a. als Beizmittel zum Einsatz, finden jedoch auch als Sprühapplikation Anwendung (SIMON-DELISO et al., 2015). Als hochwirksame Insektizide mit breitem Wirkungsspektrum binden sie an den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) von Insekten (BAI et al., 1991, ZHANG et al., 2000) und verhindern so den Abbau des Acetylcholins durch das Enzym Acetylcholinesterase. Hierdurch wird der Rezeptor dauerhaft stimuliert und die neuronale Weiterleitung von Nervenreizen gestört. Folglich kommt es zu spastischen Lähmungen und zellenergetischer Erschöpfung die letztlich zum Tod des Schadinsekts führt (JESCHKE und NAUEN, 2008; SIMON-DELISO et al., 2015). Aufgrund der hohen Selektivität von Neonikotinoiden gegenüber dem nikotinischen Acetylcholinrezeptor von Insekten haben sie nur eine geringe Toxizität für Warmblüter (PHUA et al., 2009), wirken dagegen jedoch nur gering selektiv gegen Nichtziel-Arthropoden, wie Bienen (MAIN et al., 2018). Die Stärke der Toxizität wird durch chemisch-strukturelle Eigenschaften bedingt. Demnach zeigen cyanosubstituierte Neonikotinoide (Bsp.: Thiaclo-

prid und Acetamiprid) eine deutlich geringere Toxizität gegenüber Honigbienen als nitrosubstituierte Neonikotinoide (Bsp. Imidacloprid, Clothianidin, Thiamethoxam, Dinotefuran und Nitenpyram) (IWASA et al., 2004). Hierbei scheint die geringere Toxizität von cyanosubstituierten Neonikotinoiden für Honigbienen nicht auf unterschiedliche Sensitivitäten am Wirkort, sondern eher auf eine schnellere Detoxifizierung am Enzym Cytochrome P450 (IWASA et al., 2004) und auf eine höhere Expression (ALPTEKIN et al., 2016) zurückzuführen zu sein.

Entgiftungsmechanismen der Honigbiene

Im Vergleich zu anderen Insekten ist bei Honigbienen das Genom der am Detoxifizierungsprozess beteiligten Enzyme stark reduziert (CLAUDIANOS et al., 2006), was jedoch nicht zu einer höheren Sensitivität führt (HARDSTONE und SCOTT, 2010). Trotz der geringen Anzahl an Entgiftungsenzymen sind Honigbienen in der Lage, bestimmte Insektizide, wie bspw. Thiacloprid, schnell und effektiv zu entgiften (MANJON et al., 2018).

Xenobiotika, wie z.B. PSM, aber auch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, werden im Allgemeinen in drei Phasen detoxifiziert. Das bedeutet, dass wasserunlösliche und nur schwer ausscheidungsfähige Substanzen enzymatisch in wasserlösliche Metabolite umgewandelt werden, um sie transportfähig zu machen, sodass sie schließlich ausgeschieden werden können (BERENBAUM und JOHNSON, 2015).

In der ersten dieser drei Phasen (Funktionalisierung) sind hauptsächlich Enzyme der Familie der Cytochrome P450 s und Carboxylesterasen beteiligt (BERENBAUM und JOHNSON, 2015). Cytochrome P450 Monooxygenasen oxidieren eine Substanz (z.B. Pyrethroide oder Neonikotinoide; JOHNSON et al., 2009; SCHMUCK et al., 2003), indem ein Atom molekularen Sauerstoffs an die Substanz zu einem funktionalen Produkt transferiert wird, während das andere Atom, mit NADPH + H⁺ als Reduktionsmittel zu Wasser reduziert wird (FEYEREISEN, 2012). Carboxylesterasen hydrolysieren Esterbindungen (PILLING et al., 1995), um die Wasserlöslichkeit der Substanzen, (z.B. Pyrethroide, Neonikotinoide oder Organophosphate), zu steigern (CARVALHO et al., 2013).

In Phase II (Konjugation) sind insbesondere Gluthation-S-Transferasen beteiligt (BERENBAUM und JOHNSON, 2015; GONG und DIAO, 2017), welche Glutathion an die Produkte aus Phase I transferieren, um die Wasserlöslichkeit noch weiter zu erhöhen.

Phase III umfasst schließlich den Transportprozess durch die Zellmembran aus der Zelle heraus. Dies wird vor allem durch spezielle Transportproteine, z.B. aus der Familie der ABC-Transporter, realisiert (BERENBAUM und JOHNSON, 2015). Die enzymatische Detoxifizierung zu verstehen ist wichtig, um sowohl Resistenzen gegenüber PSM von Zielorganismen nachvollziehen zu können, aber auch um negative Effekte von PSM auf Nicht-Zielorganismen zu reduzieren. Überexpression von P450 kann zu Resistenzen von Schädlingen gegen Insektizide, wie Pyrethroide (DAVID et al., 2005; RODPRADIT et al., 2005) und Neonikotinoide führen (ELZAKI et al., 2016; PANG et al., 2016)

Zugrundeliegende Mechanismen der Mischtoxizität
Prinzipiell lassen sich Interaktionen zwischen Chemikalien unterschiedlich kategorisieren. Zu den wichtigsten Klassen zählen antagonistische, additive und synergistische Effekte (JIA et al., 2009). Wie sich eine Mischung letztlich im Einzelnen auswirkt, ist abhängig vom Wirkmechanismus der PSM und damit verbunden, der Wahl des Rezeptors (MARQUADT et al., 2019). Die Stärke der Ausprägung wird u.a. durch Umweltfaktoren (CARVALHO-NETTO et al., 2006), genetische Variationen (KIM und FAY, 2007) oder die Vitalität der betroffenen Individuen bestimmt (JOHNSON, 2015).

Antagonistische Effekte entstehen, wenn ein Mischungspartner (Antagonist) die Aktivität eines anderen hemmt, sodass die Mischung zu einer Reduktion der Effekte im Vergleich zur Soloanwendung führt (PALMER-YOUNG et al., 2017). Das tritt z.B. auf, wenn ein Mischungspartner den anderen an der Bindung am Target (der molekularen Zielstruktur) hindert, welche für die Entfaltung der Wirkung des Wirkstoffes essentiell ist. Hierzu kommt es, wenn der Antagonist noch vor dem anderen Mischungspartner am Target bindet und dieses besetzt oder an einem zweiten Target bindet, wodurch sich die Struktur des Targets für den anderen Mischungspartner ändert, sodass sich die Bindungsaffinität reduziert (JIA et al., 2009; PALMER-YOUNG et al., 2017). Außerdem kann eine reduzierte Wirkstoffaufnahme zu einer Verringerung der Effekte beitragen (DUFFEY und STOUT, 1996).

Additive Effekte hingegen ergeben sich, wenn die Effekte der Mischungspartner unabhängig voneinander auftreten (KÖNEMANN, 1981). Das passiert u. a. wenn zwei Substanzen einer Mischung einen ähnlichen Wirkmechanismus haben (Bsp.: gleiche Wirkung auf den gleichen Rezeptor, z.B. Tankmischung aus zwei Neonikotinoiden) (MARQUADT et al., 2019).

Verstärken sich Wirkstoffe gegenseitig in ihrer Wirkung, kommt es zu synergistischen Effekten. Hierbei wird ein größerer Effekt erzielt, als die Soloanwendung beider Substanzen erwarten ließe (CEDERGREEN, 2014; PALMER-YOUNG et al., 2017). Dieser überadditive Effekt lässt sich im Wesentlichen auf sechs Prozesse zurückführen: die Bioverfügbarkeit, die Aufnahme, den innerlichen Transport, die Bindung am Target, die Metabolisierung und die Ausscheidung (CEDERGREEN, 2014). So kommt es beispielsweise zu synergistischen Effekten, wenn eine Substanz die biologische Verfügbarkeit einer anderen erhöht (CEDERGREEN, 2014). Ebenso fördert eine verbesserte Wirkstoffaufnahme die Effekte, was v.a. für oberflächenaktive Zusatzstoffe zutrifft. Die Aufnahmerate und der Transport zum Wirkort wird u.a. durch die Konkurrenz um biologische Liganden sowie die Hemmung von Transportproteinen beeinflusst (CEDERGREEN, 2014). Der Großteil der stark synergistischen Interaktionen lässt sich jedoch durch Eingriffe in die Metabolisierungsprozesse und die Konkurrenz um den Zugang zum gleichen P450-Enzym erklären (JOHNSON et al., 2009; CEDERGREEN, 2014). Hierbei verringert eine Substanz die metabolische Enzymaktivität, was i.d.R. eine erhöhte Toxizität des anderen Mischungspartners bewirkt (CEDERGREEN, 2014).

Bekannt ist dieses Phänomen bspw. für die im Pflanzenschutz häufig eingesetzten Azolfungizide (IWASA et al., 2004). Während diese Fungizide allein auf Honigbienen normalerweise keine erhöhte Mortalität oder ähnliche Effekte bewirken (siehe z.B. WADE et al., 2019; WERNECKE et al., 2019), weisen Imidazole aus der Gruppe der Ergosterol-Biosynthese-Hemmer in Kombination mit Insektiziden ein wirkungssteigerndes Potential auf (PILLING und JEPSON, 1993; WADE et al., 2019). Als Inhibitoren hindern sie die Cytochrom P450-Monogenasen an der Metabolisierung lipophiler Verbindungen in Phase I (BRATTSTEN et al., 1994; BERENBAUM und JOHNSON, 2015). Sie gehen mit dem Eisen-Atom im aktiven Zentrum von Cytochrom P450-Enzymen eine starke Interaktion ein (KRÄMER und TESTA, 2009) und setzen dadurch die Aktivität von P450 herab (VINGGAARD et al., 2006), wodurch die Insektizide (Bsp.: Thiacloprid und Lambda-Cyhalothrin) nicht mehr richtig abgebaut werden können. Tankmischungen aus Azolfungiziden und Pyrethroiden führen folglich durch die Hemmung der mikrosomalen Oxidation und der damit verbundenen Störung des natürlichen Entgiftungsprozesses zu einer erhöhten Toxizität des Pyrethroids für Honigbienen (PILLING et al., 1995). Gleiches gilt für Mischungen aus Azolfungiziden und Neonikotinoiden. Hier kann sich die Toxizität des Neonikotinoids um mehr als das 1000-fache erhöhen (IWASA et al., 2004). Wie stark der synergistische Effekt ausfällt, wird durch die aktiven Bestandteile des Fungizids (PILLING und JEPSON, 1993), dessen Bindungsaffinität (TRÖSKEN et al., 2004) und Dosis bedingt (THOMPSON et al., 2014). Andere Fungizide, wie z.B. Substanzen aus der Wirkstoffgruppe der Succinat-Dehydrogenase-Hemmer oder Strobilurine, die nicht zur Klasse der EBI-Fungizide gehören, führen dagegen nicht zu synergistischen Effekten (JOHNSON et al., 2013; WERNECKE et al., 2019), da sie nicht an P450 binden (TUCKER und LILLICH, 1974; BARTLETT et al., 2002) und es so zu keinen Wechselwirkungen der Mischungspartner kommt.

Fazit und Ausblick

Angesichts des landwirtschaftlich intensiven Einsatzes von PSM und der verhältnismäßig geringen Zahl gemeldeter Bienenvergiftungen, ist davon auszugehen, dass das aktuelle Zulassungsverfahren für PSM und die damit einhergehende Erteilung spezifischer Bienenschutzauflagen grundsätzlich ein hohes Schutzniveau gewährleistet. Dennoch sind die Interaktionen zwischen Mischungspartnern komplex und die potentiellen Auswirkungen von Tankmischungen auf Bestäuber nicht umfassend erforscht. Prinzipiell bieten im Rahmen des Zulassungsverfahrens geprüfte Tankmischungen (Bsp. Tankmischungen aus Thiacloprid und Prothioconazol) daher die höchste Sicherheit (BVL, 2018). Für alle weiteren Tankmischungen gilt es zu bedenken, dass eine mögliche Schädigung von Nichtzielorganismen nicht ausgeschlossen werden kann. Gemäß der guten fachlichen Praxis sind Mischungen aus mehr als zwei Mischungspartnern zu vermeiden (BVL, 2018).

Für ein besseres Verständnis und die folgerichtige Bewertung der Risiken ist daher auch zukünftig weitere Forschung auf dem Gebiet der Tankmischungen essentiell. Aufgrund der Marktbreite an Produkten ist eine weitere systematische Testung von Wirkstoffgruppen und Formulierungstypen erforderlich, um eventuell risikoreiche Tankmischungen identifizieren zu können. Die Praxisrelevanz auffälliger Laborergebnisse ist in höherstufigen Tests zu prüfen. Hierbei sind sowohl akute als auch chronische Auswirkungen letaler und sublethaler Natur auf adulte Tiere und Larven von Bedeutung. Auch die Ausweitung der Untersuchungen vom Modellorganismus „Honigbiene“ auf eusoziale und solitäre Wildbienen ist ein weiterer, notwendiger Schritt. Die Schließung dieser bestehenden Wissenslücken ist letztlich die Grundvoraussetzung für eine bestäuberfreundliche und nachhaltige Landwirtschaft zur Erhaltung der biologischen Vielfalt und zum Schutz der Bestäuber.

Erklärung zu Interessenkonflikten

Die Autoren erklären hiermit, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.


Literatur

- WOLBER und SEEMANN, 2006: Der Turbo für den Pflanzenschutz. Zugriff: 08. Oktober 2019, URL: <https://www.agrarheute.com/heftarchive/dlz/download/1093+&cd=1&hl=de&ct=clnk&gl=de&client=firefox-b-d>.
- AHMAD, M., 2007: Potentiation/antagonism of pyrethroids with organophosphate insecticides in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of economic entomology*, **100** (3), 886–893, DOI: 10.1093/jee/100.3.886.
- ALPTEKIN, S., C. BASS, C. NICHOLLS, M.J.I. PAINE, S.J. CLARK, L. FIELD, G.D. MOORES, 2016: Induced thiacloprid insensitivity in honeybees (*Apis mellifera* L.) is associated with up-regulation of detoxification genes. *Insect molecular biology* **25** (2), 171–180, DOI: 10.1111/imb.12211.
- BAI, D., S.C.R. LUMMIS, W. LEICHT, H. BREER, D.B. SATELLE, 1991: Actions of imidacloprid and related nitromethylene on cholinergic receptors of an identified insect motor neuron. *Pestic Sci* **33**, 197–204, DOI: 10.1002/ps.2780330208.
- BARTLETT, D.W., J.M. CLOUGH, J.R. GODWIN, A.A. HALL, M. HAMER, B. PARR-DOBZANSKI, 2002: The strobilurin fungicides. *Pest management science* **58** (7), 649–662, DOI: 10.1002/ps.520.
- BARTLETT, D.W., J.M. CLOUGH, J.R. GODWIN, A.A. HALL, M. HAMER, B. PARR-DOBZANSKI, 2002: The strobilurin fungicides. *Pest management science* **58** (7), 649–662, DOI: 10.1002/ps.520.
- BRATTSTEN, L.B., D.A. BERGER, L.B. DUNGAN, 1994: In vitro inhibition of midgut microsomal P450 s from *Spodoptera eridania* caterpillars by demethylation inhibitor fungicides and plant growth regulators. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **48** (3), 234–243, DOI: 10.1006/pest.1994.1025.
- BROWN, T.J., S.E. KEGLEY, 2015: The Curious Beekeeper – Chemical Synergies: When 1 + 1 does not equal 2. *American Bee Journal* **155** (1), 91–94.
- BERENBAUM, M.R., R.M. JOHNSON, 2015: Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Current opinion in insect science* **10**, 51–58, DOI: 10.1016/j.cois.2015.03.005.
- BIENSCHV [Bienenschutzverordnung], 1992: Verordnung über die Anwendung bienengefährlicher Pflanzenschutzmittel, Bienenschutzverordnung vom 22. Juli 1992 (BGBl. I S. 1410), die zuletzt durch Artikel 6 der Verordnung vom 27. Juni 2013 (BGBl. I S. 1953) geändert worden ist.
- BLISS, C.I., 1939: The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of applied biology* **26** (3), 585–615, DOI: 10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x.
- BVL [Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit], 2011: PSM-Zulassungsbericht Karate Zeon. Zugriff: 27.


- Februar 2020, URL: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/01_zulassungsberichte/024675-00-00.pdf?__blob=publicationFile&v=3.
- BVL [Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit], 2015: Bienenschutz bei Tankmischungen mit mehreren Insektiziden. Zugriff: 05. Februar 2020, URL: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Fachmeldungen/04_pflanzenschutzmittel/2015/2015_03_20_Fa_Bienenschutz.html.
- BVL [Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit], 2018: Neue Vorgaben zum Bienenschutz bei Tankmischungen von Insektiziden mit Fungiziden. Zugriff: 05. Februar 2020, URL: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Fachmeldungen/04_pflanzenschutzmittel/2018/2018_11_12_Fa_Bienenschutz_Tankmischung_Insekt_Fung.html.
- BVL [Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit], 2019a: Kodeliste für Kennzeichnungstexte und sonstige Auflagen zugelassener Pflanzenschutzmittel. Zugriff: 07.02.2020, URL: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/PSM_Kodeliste.pdf?__blob=publicationFile&v=5.
- BVL [Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit], 2020a: Danjiri. Zugriff: 18. Februar 2020, URL: <https://apps2.bvl.bund.de/psm/jsp/DatenBlatt.jsp?kennr=005655-60>.
- BVL [Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit], 2020b: Liste der Zusatzstoffe (Stand 6. Februar 2020). Zugriff: 12. Februar 2020, URL: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/Zusatzstoffe_liste.pdf?__blob=publicationFile&v=13.
- BVL [Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit], 2020c: Mospilan SG. Zugriff: 18. Februar 2020, URL: <https://apps2.bvl.bund.de/psm/jsp/DatenBlatt.jsp?kennr=005655-00>.
- BVL [Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit], 2020d: Zusatzstoffe gemäß § 42 Pflanzenschutzgesetz. Zugriff: 12.02.2020, URL: https://www.bvl.bund.de/DE/Arbeitsbereiche/04_Pflanzenschutzmittel/01_Aufgaben/05_Zusatzstoffe/psm_Zusatzstoffe_node.html.
- CARVALHO, S.M., L.P. BELZUNCES, G.A. CARVALHO, J.-L. BRUNET, A. BADIOU-BENETEAU, 2013: Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environmental toxicology and chemistry* **32** (9), 2117–2124, DOI: 10.1002/etc.2288.
- CARVALHO-NEITO, E.F., C. MARKHAM, D.C. BLANCHARD, R.L. NUNES-DE-SOUZA, R.J. BLANCHARD, 2006: Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **85** (1), 140–147, DOI: 10.1016/j.pbb.2006.07.022.
- CASIDA, J.E., 1980: Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environmental health perspectives* **34**, 189–202, DOI: 10.1289/ehp.8034189.
- CEDERGREEN, N., C. SVENDSEN, T. BACKHAUS, 2013: Chemical mixtures: concepts for predicting toxicity. *Encyclopedia of Environmental Management*. New York: Taylor and Francis, 2601–2610, DOI: 10.1081/E-EEM-120046684.
- CEDERGREEN, N., 2014: Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS one* **9** (5), DOI: 10.1371/journal.pone.0096580.
- CHEN, J., J.D. FINE, C.A. MULLIN, 2018: Are organosilicon surfactants safe for bees or humans?. *Science of the total environment* **612**, 415–421, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.175.
- CIARLO, T.J., C.A. MULLIN, J.L. FRAZIER, D.R. SCHMEHL, 2012: Learning impairment in honey bees caused by agricultural spray adjuvants. *PLoS One* **7** (7), DOI: 10.1371/journal.pone.0040848.
- CLAUDIANOS, C., H. RANSON, R.M. JOHNSON, S. BISWAS, M.A. SCHULER, M.R. BERENBAUM, R. FEYEREISEN, J.G. OAKESHOTT, 2006: A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect molecular biology* **15** (5), 615–636, DOI: 10.1111/j.1365-2583.2006.00672.x.
- COLIN, M.E., L.P. BELZUNCES, 1992: Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *Apis mellifera* L.: A convenient biological approach. *Pesticide Science* **36** (2), 115–119, DOI: 10.1002/ps.2780360206.
- DAVID, J.P., C. STRODE, J. VONTAS, D. NIKOU, A. VAUGHAN, P.M. PIGNATELLI, C. LOUIS, J. HEMINGWAY, H. RANSON, 2005: The *Anopheles gambiae* detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102** (11), 4080–4084, DOI: 10.1073/pnas.0409348102.
- DUFFEY, S.S., M.J. STOUT, 1996: Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **32** (1), 3–37, DOI: 10.1002/(SICI)1520-6327(1996)32:1<3::AID-ARCH2>3.0.CO;2-1.
- ELZAKI, M.E.A., W. ZHANG, A. FENG, X. QIU, W. ZHAO, Z. HAN, 2016: Constitutive overexpression of cytochrome P450 associated with imidacloprid resistance in *Laodelphax striatellus* (Fallén). *Pest management science* **72** (5), 1051–1058, DOI: 10.1002/ps.4155.
- FAULDE, M., 2010: Insektizide, Akarizide und Repellenzien. In: Aspöck H (ed) *Krankheiten durch Arthropoden*. Wien, Österreich, Denisia-Verlag, Denisia 30, S. 113.
- FEYEREISEN, R., 2012: Insect CYP Genes and P450 Enzymes. In: *Insect molecular biology and biochemistry*. Gilbert, L.I. (Hrsg.), Amsterdam, Elsevier, S. 236–316.
- FINE, J.D., D.L. COX-FOSTER, C.A. MULLIN, 2017: An inert pesticide adjuvant synergizes viral pathogenicity and mortality in honey bee larvae. *Scientific Reports* **7** (1), 1–9, DOI: 10.1038/srep40499.
- FRAC [Fungicide Resistance Action Committee], 2019: FRAC Code List©* 2019: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action. Zugriff: 11. Februar 2020, URL: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2019-finale0af2a2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?Status=Temp&sfvrsn=7d8c489a_2.
- GONG, Y., Q. DIAO, 2017: Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology* (London, England) **26** (1), 1–12, DOI: 10.1007/s10646-016-1742-7.
- HARDSTONE, M.C., J.G. SCOTT, 2010: Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? *Pest management science* **66** (11), 1171–1180, DOI: 10.1002/ps.2001.
- INGLESFIELD, C., 1989: Pyrethroids and terrestrial non-target organisms. *Pesticide science* **27** (4), 387–428, DOI: 10.1002/ps.2780270407.
- IPBES [Weltbiodiversitätsrat], 2017: The assessment report on pollinators, pollination and food production. Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services (IPBES), S.G. Potts, V. L. Imperatriz-Fonseca, and H. T. Ngo (eds). Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany. 552 pages. Zugriff: 17. Februar 2020, URL: https://ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/2017_pollination_full_report_book_v12_pages.pdf.
- IRAC [Insecticide Resistance Action Committee], 2019: The IRAC Mode of Action Classification Online. Zugriff: 11. Februar 2020, URL: <https://www.irac-online.org/modes-of-action/>.
- IWASA, T., N. MOTOYAMA, J.T. AMBROSE, R.M. ROE, 2004: Mechanism for the differential toxicity of Neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* **23** (5), 371–378, DOI: 10.1016/j.cropro.2003.08.018.
- JIA, J., F. ZHU, X. MA, Z. W. CAO, Y.X. LI, Y.Z. CHEN, 2009: Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. *Nature reviews Drug discovery* **8** (2), 111–128, DOI: 10.1038/nrd2683.
- JESCHKE, P., R. NAUEN, 2008: Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest management science* **64** (11), 1084–1098, DOI: 10.1002/ps.1631.
- JKI [Julius Kühn-Institut], 2017: Jahresbericht 2017 der Untersuchungsstelle für Bienenvergiftungen. Zugriff: 18.02.2020, URL: <https://bienenuntersuchung.julius-kuehn.de/index.php?menuid=91>.
- JKI [Julius Kühn-Institut], 2020a: Wirkstofffranking Apfel 2014. Zugriff: 19.02.2020, URL: <https://papa.julius-kuehn.de/index.php?menuid=54&reporeid=75>.
- JKI [Julius Kühn-Institut], 2020b: Wirkstofffranking Winterraps 2018. Zugriff: 19.02.2020, URL: <https://papa.julius-kuehn.de/index.php?menuid=54&reporeid=319>.
- JOHNSON, R.M., 2015: Honey bee toxicology. *Annual review of entomology* **60**, 415–434, DOI: 10.1146/annurev-ento-011613-162005.
- JOHNSON, R.M., H.S. POLLOCK, M.R. BERENBAUM, 2009: Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *Journal of economic entomology* **102** (2), 474–479, DOI: 10.1603/029.102.0202.
- JOHNSON, R.M., L. DAHLGREN, B.D. SIEGFRIED, M.D. ELLIS, 2013: Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS one* **8** (1) e54092, DOI: 10.1371/journal.pone.0054092.
- KILJANEK, T., A. NIEWIADOWSKA, A. POSYNIK, 2016: Pesticide poisoning of honeybees: a review of symptoms, incident classification, and causes of poisoning. *Journal of Apicultural Science* **60** (2), 5–24, DOI: 10.1515/jas-2016-0024.
- KIM, H.S., J.C. FAY, 2007: Genetic variation in the cysteine biosynthesis pathway causes sensitivity to pharmacological compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104** (49), 19387–19391, DOI: 10.1073/pnas.0708194104.
- KLEIN, A.M., B.E. VAISSIERE, J.H. CANE, I. STEFFAN-DEWENTER, S.A. CUNNINGHAM, C. KREMEN, T. TSCHARNTKE, 2007: Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B: biological sciences* **274** (1608), 303–313, DOI: 10.1098/rspb.2006.3721.

- KÖNEMANN, H., 1981: Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: A proposal for a quantitative approach and experimental results. *Toxicology* **19** (3), 229–238, DOI: 10.1016/0300-483X(81)90132-3.
- KOPIT, A.M., T.L. PITTS-SINGER, 2018: Routes of pesticide exposure in solitary, cavity-nesting bees. *Environmental Entomology* **47** (3), 499–510, DOI: 10.1093/ee/nvy034.
- KRÄMER, S.D., B. TESTA, 2009: The Biochemistry of Drug Metabolism - An Introduction: Part 7. Intra-Individual Factors Affecting Drug Metabolism. *Chemistry and Biodiversity* **6**, 1477–1660, DOI: 10.1002/cbdv.200900233.
- MAIN, A.R., E.B. WEBB, K.W. GOYNE, D. MENGEL, 2018: Neonicotinoid insecticides negatively affect performance measures of non-target terrestrial arthropods: a meta-analysis. *Ecological Applications* **28** (5), 1232–1244, DOI: 10.1002/eap.1723.
- MANJON, C., B.J. TROCZKA, M. ZAWORRA, K. BEADLE, E. RANDALL, G. HERTLEIN, K.S. SINGH, C.T. ZIMMER, R.A. HOMEM, B. LUEKE, R. REID, L. KOR, M. KOHLER, J. BENTING, M.S. WILLIAMSON, T.G.E. DAVIES, L.M. FIELD, C. BASS, R. REID, 2018: Unravelling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Current Biology* **28** (7), 1137–1143, DOI: 10.1016/j.cub.2018.02.045.
- MARQUADT, H., S. SCHÄFER, H. BARTH, 2019: Toxikologie. Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- NASUTI, C., F. CANTALAMESSA, G. FALCIONI, R. GABBIANELLI, 2003: Different effects of Type I and Type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. *Toxicology* **191** (2–3), 233–244, DOI: 10.1016/S0300-483X(03)00207-5.
- PALMER-YOUNG, E.C., B.M. SADD, R.E. IRWIN, L.S. ADLER, 2017: Synergistic effects of floral phytochemicals against a bumble bee parasite. *Ecology and evolution* **7** (6), 1836–1849, DOI: 10.1002/ece3.2794.
- PANG, R., M. CHEN, Z. LIANG, X. YUE, H. GE, W. ZHANG, 2016: Functional analysis of CYP6ER1, a P450 gene associated with imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Scientific reports* **6**, 34992, DOI: 10.1038/srep34992.
- PILLING, E.D., P.C. JEPSON, 1993: Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pest Management Science* **39** (4), 293–297, DOI: 10.1002/ps.2780390407.
- PILLING, E.D., K.A.C. BROMLEYCHALLENGER, C.H. WALKER, P.C. JEPSON, 1995: Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide λ -cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz, in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **51** (1), 1–11, DOI: 10.1006/pest.1995.1001.
- PHUA, D.H., C.C. LIN, M.-L. WU, J.F. DENG, C.C. YANG, 2009: Neonicotinoid insecticides: an emerging cause of acute pesticide poisoning. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* **47** (4), 336–341, DOI: 10.1080/15563650802644533.
- REICHL, F.X., 2011: Moderne Umweltmedizin: Umweltbelastungen – Diagnostik – Therapie. Berlin, Germany, Lehmanns Media, S. 119–120, ISBN 978-3-86541-399-4.
- RODE, H., 1986: Zur Kombination von Pflanzenschutzmitteln bei der Schaderregerbekämpfung im Apfelintensivanbau. *Archiv für Gartenbau*, Berlin **34** (2), 95–107.
- RODPRADIT, P., S. BOONSUEPSAKUL, C. CHAREONVIRIYAPHAO, M.J. BANGS, P. RONGNOPARUT, 2005: Cytochrome P450 genes: molecular cloning and overexpression in a pyrethroid-resistant strain of *Anopheles minimus* mosquito. *Journal of the American Mosquito Control Association* **21** (1), 71–79, DOI: 10.2987/8756-971X(2005)21[71:CPGMCA]2.0.CO;2.
- RORTAIS, A., G. ARNOLD, J.L. DORNE, S.J. MORE, G. SPERANDIO, F. STREISSL, C. SZENTESI, F. VERDONCK, 2017: Risk assessment of pesticides and other stressors in bees: principles, data gaps and perspectives from the European Food Safety Authority. *Science of the Total Environment* **587**, 524–537, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.127.
- SCHMUCK, R., T. STADLER, H.W. SCHMIDT, 2003: Field relevance of a synergistic effect observed in the laboratory between an EBI fungicide and a chloronicotinyl insecticide in the honeybee (*Apis mellifera* L., Hymenoptera). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* **59** (3), 279–286, DOI: 10.1002/ps.626.
- SIMON-DELSON, N., V. AMARAL-ROGERS, L.P. BELZUNCES, J.M. BONMATIN, M. CHAGNON, C. DOWNS, L. FURLAN, D.W. GIBBONS, C. GIORIO, V. GIROLAMI, D. GOULSON, D.P. KREUTZWEISER, C.H. KRUPKE, M. LIESS, E. LONG, M. McFIELD, P. MINEAU, E.A.D. MITCHELL, C.A. MORRISSEY, D.A. NOOME, L. PISA, J. SETTELE, J.D. STARK, A. TAPPARO, H. VAN DYCK, J. VAN PRAAGH, J.P. VAN DER SLUIJS, P.R. WHITEHORN, M. WIEMERS, 2015: Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* **22** (1), 5–34, DOI: 10.1007/s11356-014-3470-y.
- STATISTA, 2020: Volumen des Welpflanzenschutzmarktes in den Jahren 2007 bis 2018. Zugriff: 27. Februar 2020, URL: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/183085/umfrage/umsatz-auf-dem-welpflanzenschutzmarkt-seit-2007/>.
- SODERLUND, D.M., 2010: Toxicology and mode of action of pyrethroid insecticides. In Hayes' handbook of pesticide toxicology (pp. 1665–1686). Academic Press, DOI: 10.1016/B978-0-12-374367-1.00077-X.
- SOLTANINEJAD, K., M. ABDOLLAHI, 2009: Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: A systematic review. *Medical Science Monitor* **15** (3), 75–90.
- THOMPSON, H., S. WILKINS, 2003: Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures. *Bulletin of Insectology* **56** (1), 131–134.
- THOMPSON, H.M., S.L. FRYDAY, S. HARKIN, S. MILNER, 2014: Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to Neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. *Apidologie* **45** (5), 545–553, DOI: 10.1007/s13592-014-0273-6.
- TRÖSKEN, E.R., K. SCHOLZ, R.W. LUTZ, W. VÖLKELE, J.A. ZARN, W.K. LUTZ, 2004: Comparative assessment of the inhibition of recombinant human CYP19 (aromatase) by azoles used in agriculture and as drugs for humans. *Endocrine research* **30** (3), 387–394, DOI: 10.1081/ERC-200035093.
- TUCKER, A.N., T.T. LILICH, 1974: Effect of the Systemic Fungicide Carboxin on Electron Transport Function in Membranes of *Micrococcus denitrificans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **6** (5), 572–578, DOI: 10.1128/AAC.6.5.572.
- Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Aufhebung der Richtlinien 79/117/EWG und 91/414/EWG des Rates, ABl. L309 vom 24.11.2009.
- VINGGAARD, A.M., U. HASS, M. DALGAARD, H.R. ANDERSEN, E. BONEFELD-JØRGENSEN, S. CHRISTIANSEN, P. LAIER, M.E. POULSEN, 2006: Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. *International journal of andrology* **29** (1), 186–192, DOI: 10.1111/j.1365-2605.2005.00604.x.
- VIJVERBERG, H.P., J. VANDEN BERCKEN, 1990: Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Critical reviews in toxicology* **21** (2), 105–126, DOI: 10.3109/10408449009089875.
- WADE, A., C.-H. LIN, C. KURKUL, E.R. REGAN, R.M. JOHNSON, 2019: Combined Toxicity of Insecticides and Fungicides Applied to California Almond Orchards to Honey Bee Larvae and Adults. *Insects* **10** (1), DOI: 10.3390/insects10010020.
- WANG, Y., Y.Z. ZHU, W. LI, 2019: Comparative examination on synergistic toxicities of chlorpyrifos, acephate, or tetraconazole mixed with pyrethroid insecticides to honey bees (*Apis mellifera* L.). *Environmental Science and Pollution Research* **27**, 6971–6980, DOI: 10.1007/s11356-019-07214-3.
- WERNECKE, A., M. FROMMBERGER, J. PISTORIUS, 2018: Auswirkungen von Tankmischungen auf Honigbienen. In: JKI (Hrsg.): 61. Deutsche Pflanzenschutztagung: Herausforderung Pflanzenschutz - Wege in die Zukunft; 11. - 14. September 2018, Universität Hohenheim -Kurzfassungen der Vorträge und Poster- (Julius-Kühn-Archiv 461), Braunschweig, 399.
- WERNECKE, A., M. FROMMBERGER, R. FORSTER, J. PISTORIUS, 2019: Lethal effects of various tank mixtures including insecticides, fungicides and fertilizers on honey bees under laboratory, semi-field and field conditions. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* **14** (3), 239–249, DOI: 10.1007/s00003-019-01233-5.
- ZHANG, A., H. KAYSER, P. MAIENFISCH, J.E. CASIDA, 2000: Insect nicotinic acetylcholine receptor: conserved neonicotinoid specificity of [3H]imidacloprid binding site. *Journal of Neurochemistry* **75**, 1294–1303, DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.751294.x.
- ZHU, W., D.R. SCHMEHL, C.A. MULLIN, J.L. FRAZIER, 2014: Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PloS one* **9** (1), DOI: 10.1371/journal.pone.0077547.

© Der Autor/Die Autorin 2020.

 Dies ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt wird (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

© The Author(s) 2020.

 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).

Anke C. Dietzsch, Tobias Jütte

Non-*Apis* bees as model organisms in laboratory, semi-field and field experiments

Non-*Apis* Bienen als Modelorganismen in Labor-, Halbfreiland- und Freilandversuchen

Abstract

As part of the registration process of plant protection products (PPPs) and their active substances in the EU, the risk of PPPs for bees has been assessed so far by using the European honey bee (*Apis mellifera* L.) as a surrogate species. In the past few years other bee species have been discussed to augment data on honey bees. The addition of bee species in the registration process goes along with adapting test methodologies to new bee species and understanding how to use these species at different tiers (laboratory, semi-field and field levels). Here we first discuss the importance of bees as test organisms, outline the current state of research relevant to the methodology and design of experiments with bees and highlight recent activities in the standardization of test procedures.

Key words: honey bee, bumble bees, solitary bees, ecotoxicology, risk assessment, sensitivity, method development

Zusammenfassung

Im Rahmen der Zulassung von Pflanzenschutzmitteln und ihren Wirkstoffen in der EU wurde das Risiko für Bienen bisher anhand der Westlichen Honigbiene (*Apis mellifera* L.) als Modellorganismus für alle Bienenarten bewertet. In den letzten Jahren wurde kontrovers diskutiert, ob Wildbienenarten in der Risikobewertung eben-

falls berücksichtigt werden sollten, um die bisherigen Datenanforderungen für Honigbienen zu erweitern. Dies geht damit einher, etablierte, standardisierte Methoden für die Honigbiene an zusätzliche Wildbienenarten anzupassen und zu verstehen, wie diese Arten auf den verschiedenen Testebenen (Labor-, Halbfreiland- und Freilandtests) eingesetzt werden können. In diesem Artikel gehen wir zunächst auf die Bedeutung von Bienen als Testorganismen ein, diskutieren den derzeitigen Stand der Forschung, die für die Methodenentwicklung und das experimentelle Design für das Arbeiten mit Bienen wichtig ist, um abschließend einen Ausblick auf aktuelle Aktivitäten in der Standardisierung von Testmethoden zu geben.

Stichwörter: Honigbiene, Hummeln, Solitärbienen, Ökotoxikologie, Risikobewertung, Sensitivität, Methodenentwicklung

Bees in agricultural landscapes

Pollinators are an integral part of global biodiversity; insects – primarily bees – are the most prominent pollinator group of many crops and wild plants (POTTS et al., 2010). As a domesticated species, European honey bees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera: Apidae) are economically important pollinators (MORSE and CALDERONE, 2000; MWEBAZE et al., 2010; BARTOMEUS et al., 2014; ORÉ BARRIOS et al., 2017). However, the great majority of bee species

Affiliation

Julius Kühn-Institut (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Bee Protection, Braunschweig, Germany

Correspondence

Dr. Anke C. Dietzsch, Julius-Kühn Institut (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Bee Protection, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Germany, e-mail: anke.dietzsch@julius-kuehn.de

Accepted

7 April 2020

are *non-Apis* bees that display varying levels of sociality (MICHENER, 2007). Germany hosts almost 600 wild bee species (WESTRICH et al., 2011) including colony-building bumble bees as well as ground-nesting and hole-nesting solitary bee species. Wild bee species contribute significantly to crop pollination (KLEIN et al., 2007; GARIBALDI et al., 2013), and many of them forage and nest in agricultural landscapes. An increase in their abundance and diversity can increase crop productivity (VENTURINI et al., 2017; CATARINO et al., 2019 but BARTOMEUS et al., 2014). The exact number of wild bee species using agricultural landscapes has yet to be estimated for the different regions of Germany (and worldwide). Bees in agricultural landscapes are exposed to a variety of stressors, which are recognized as drivers of wild bee declines and honey bee colony losses (GOULSON et al., 2015). It is essential to reduce and regulate these factors in order to maintain or increase ecological and economic benefits.

Bees as model organisms in the registration process

Plant protection products (PPPs) are one of the stressors identified as a major driver for bee declines (SANCHEZ-BAYO and WYCKHUYS, 2019). Depending on the geographical and political region, their legalization and use with respect to their environmental impact is policed by regulatory authorities, e.g. the United States Environmental Protection Agency (USEPA), Brazilian Institute of the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) and Australian Pesticide and Veterinary Medicines Authority (APVMA) (HANDFORD et al., 2015). In this review, we focus on the legislative framework and schemes applied in Europe. Within the European Union, PPPs are regulated by means of the registration process of plant protection products and their active substances (EUROPEAN PARLIAMENT, COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2009). This process involves the evaluation of hazards of PPPs to beneficial insects, including bees, based on a specific use and employing standardized test procedures. So far, these tests are designed to use the European honey bee as a surrogate species for all bee species.

After the publication of the EFSA Bee Guidance Document (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013) and of a growing number of studies that showed losses of insect diversity and abundance (BIESMEIJER et al., 2006; HALLMANN et al., 2017; SEIBOLD et al., 2019), the discussion about other surrogate species in the risk assessment procedure became more intense (e.g. BOYLE et al., 2019). First attempts were made to expand and adapt the existing guidelines to other bee species, especially bumble bees and solitary bees (FISCHER and MORIARTY, 2011; RORTAIS et al., 2017). While the process has not implemented the use of other bee species on a regular basis, new guidelines were recently adopted to assess risks for bumble bees (Apidae: *Bombus terrestris*) (OECD, 2017b, 2017c) and in the future for solitary bees (Apidae: *Osmia bicornis*) (OECD, 2019b).

Honey bees

As discussed above, testing European honey bees as a model organism for bees in general has been the usual way of evaluation, and test methods for honey bees in the laboratory, under semi-field and field conditions have been well-established (EPP0, 2010). They include acute and chronic exposure tests of adult honey bees (OECD, 1998a, 1998b, 2017a) and honey bee larvae (OECD, 2013, 2016), and a test on honey bee development (OECD, 2007). Honey bees are eusocial insects that form perennial colonies with many thousands of individuals. Consequently, they can be repeatedly sampled for individual bees almost year-round, are commercially available, are widely distributed and are therefore ideally suited for experimental usage (THOMPSON and PAMMINGER, 2019).

Non-Apis bees

A proper risk assessment of pesticides to bees must integrate two aspects: (a) the toxicity of the pesticide and (b) the probability of exposure (VAN DER VALK et al., 2013). Toxicity of pesticides to non-*Apis* bees has been suggested to be extrapolatable from data on honey bees (HEARD et al., 2017; LEWIS and TZILIVAKIS, 2019; REID et al., 2020; THOMPSON and PAMMINGER, 2019). However, honey bee LD₅₀ values may not always be good predictors across different bee species (MAYACK and BOFF, 2019), and sensitivity among different taxa can be variable (ARENA and SGOLASTRA, 2014; LEWIS and TZILIVAKIS, 2019) and dependent e.g. on body mass (THOMPSON, 2016). Even if toxicity data can be extrapolated, there might be still a need for higher tier experiments to account for different exposure probabilities in a realistic setting (THOMPSON, 2016).

The probability of exposure to PPPs depends not only on the intensity of agricultural practice but also on certain aspects of bee biology including nest location and foraging range as well as time, period of day and number of days when foraging (BRITAIN and POTTS, 2011; VAN DER VALK et al., 2013). Exposure risks to non-*Apis* bees from PPPs is assumed to be similar or higher than to the European honey bee (Table 1), but in most cases there are still major data gaps that complicate an assessment (ROUBIK, 2014).

To account for some of the described differences in life history traits between bee species, impacts of pesticides on some non-*Apis* bee species are considered in some cases of the current registration process even though test procedures have not been established and harmonized for every tier and every species. While inclusion of tests on bee species other than honey bees may be desirable in order to be protective of non-*Apis* bees, it can be challenging to work with them in laboratory or (semi-)field trials. Wild bee species often produce smaller numbers of individuals per population, shorter periods of seasonal activity and restricted food preferences (Table 2, ROUBIK, 2014).

In order to conduct regular trials with a particular species in the framework of the registration process, a species has to be available in large numbers, standardizable

Table 1. Potential exposure routes and their relative importance to European bees (adopted from FISCHER and MORIARTY, 2011, extended by additional information (GRADISH et al., 2019; SGOLASTRA et al., 2019)); – = no potential exposure; + = low potential exposure; ++ = medium potential exposure; +++ = high potential exposure

Exposure	European honey bees	Bumble bees	Solitary bees
Nectar	+++	++(+)	+ to +++
Pollen	+ to +++	++ to +++	+ to +++
Honey dew	+ to +++	-/+	–
Water	+ to +++	+(+)	+(+)
Nesting material	+	+	+ to +++
Exposure to soil	-/+	- to ++	- to +++
Foliar residues	+++	+++	+++
Direct spray (at flowering)	+++	+++	+++
Dust drift	++	++	++

Table 2. Life history traits of European bee species (based on information from PRŶS-JONES and CORBET, 1991; WINSTON, 1995; GOULSON, 2003; MICHENER, 2007; CUEVA DEL CASTILLO et al., 2015; WESTRICH, 2018; SGOLASTRA et al., 2019)

	European honey bees	Bumble bees	Solitary bees
Sociality	Eusocial (perennial)	Eusocial (annual)	Semi-social, para-social, sub-social, quasi-social or solitary (short-lived)
Casts	Queens, drones, worker bees	Queens, males, worker bees	Females, males
Number of individuals per nest	Up to 50.000	On average 25–150 (species-specific; worldwide mean 20 to 1848)	Single to multiple individuals per nest; in some species aggregations of 10,000 nests and more
Fecundity	Approx. 1,500 eggs per day	Approx. 4 to 16 eggs in batches at a time	Approx. 2 eggs per day (10–40 eggs over entire life span)
Food sources	Polylectic (often mass flowering crops)	Poly- to oligolectic	Poly-, oligo- or monolectic*
Nest location	Epigeaic	Epigeaic and/or endogaic	Epigeaic or endogaic*

* often with specializations or special requirements

and easily measurable in its endpoints¹ and representative in its life history traits of a larger (sub)group of bee species (SGOLASTRA et al., 2019). Ideally it should also have a prolonged or relatively flexible foraging season so that it can be used in various settings. So far there have been very few species meeting these requirements.

Bumble bees. Like honey bees, bumble bees are eusocial and form colonies housing defined castes (Table 2). Colonies in the temperate zones are founded by a single

queen that forages and raises the first generation of workers (BENTON, 2009). Workers then take over brood care and forage while the queen lays eggs. The size of a colony increases until reproductive offspring are produced. While the colony then slowly dies, the reproductive offspring leave the nest and mate, and the gynes hibernate and initiate new colonies in the next season. In a few instances, depending on climate and species, an autumn/winter generation may be established (STELZER et al., 2010), but data on its reproductive success is lacking.

In contrast to the assessment of honey bee colonies, the production of queens and males is a crucial part in a bumble bee colony cycle and an important endpoint in the assessment of colony performance. However, the number of reproductive offspring is often highly variable even within the same species. Factors influencing this

¹Measurement Endpoint: a measurable ecological characteristic that is related to the valued characteristic chosen as the assessment endpoint and is a measure of biological effects (e.g. death, reproduction, growth) of particular species, and can include measures of exposure as well as measures of effects; Assessment Endpoint: a qualitative/quantitative expression of a specific factor with which a risk may be associated as determined through an appropriate risk assessment; an explicit expression of the environmental value that is to be protected

parameter include parasitism, land use context, life span of the founding queen, time of initiation, and growth and size of the colony (MÜLLER and SCHMID-HEMPEL, 1992; SAMUELSON et al., 2018). This multitude of factors complicates a standardization that has to be ensured for risk assessment trials.

A further essential requirement for conducting standardized risk assessment trials is the availability of colonies. Of the approx. 250 bumble bee species worldwide (GOULSON, 2003), there are only a few species that have been successfully established and raised in captivity (Table 3). Although the foundations of bumble bee domestication go back to the 19th century, rearing methods were not fully developed until the late 20th century (EVANS, 2017). All (commercially) reared bumble bee species are pollen storers who feed pollen from separate pollen pots to their larvae directly by perforating the cell wall (SAKAGAMI, 1976), in contrast to pocket makers who feed pollen via a pocket at the side of the larval cell (SLADEN, 1899). This characteristic is a good example of how life history traits can define exposure probabilities to pesticides (COLLA, 2014): pocket makers may feed contaminated pollen to (and only affect) the current cohort of larvae while pollen storers may keep (and mix) it in separate containers and later feed it to all larvae of the colony.

Solitary bees. Of the almost 20.000 known bee species in the world (nearly 2.000 in Europe; NIETO et al., 2014), only a few have been reared in captivity to primarily support the pollination of specific crops in the agricultural landscape (e.g. BOSCH and KEMP, 2002). The alfalfa leaf-cutting bee *Megachile rotundata*, various mason bees *Osmia* spp. and the ground-nesting wild bee species *Nomia melanderi* are some of the few species that have been used in ecotoxicological studies (Table 4, KOPIT und PITTS-SINGER, 2018). Wild bee species differ in several key

traits, including their food and nesting resources (WCISLO und CANE, 1996; MICHENER, 2007; ROUBIK, 2014), for which they utilize either one host plant species (monolecty), one host plant family (oligolecty) or more than one host plant family (polylecty) (CANE und SIPES, 2006; MÜLLER und KUHLMANN, 2008).

Sociality is another aspect that is highly variable among wild bees, spanning a wide range that includes solitary, semi-social, para-social, sub-social, quasi-social and kleptoparasitic. Sociality can be an important aspect of life history for assessing risks of PPPs to wild bees. Some solitary bee species, e.g. species within the Halictids, perform regurgitation (trophallaxis) like honey bees; this extends exposure from one individual to many (MARTINS, 2014) and may increase exposure probabilities on a population rather than an individual level. Within the species that are solitary, individual females serve as reproductive units and have to take care of the offspring themselves rather than being replaceable by a group of workers who care for the brood (as in honey bees and bumble bees). Hence, solitary bee females are more comparable to founding bumble bee queens who provide resources to their offspring on their own (STONER, 2016). PPP exposure of a single female can directly affect reproductive success over the lifespan of this individual (STRAUB et al., 2015).

Solitary bees usually occur as only one generation per year (univoltine); a few species with higher degrees of sociality have several generations per year (multivoltinism), correlated to environmental factors such as temperature and food resources (WESTRICH, 1989). Depending on the period of emergence, exposure probabilities may vary greatly, and early-emerging females with one generation face a different risk compared to late-emerging females or species with two generations. Finally, nesting requirements define exposure and can be different between ground-nesting species that dig their

Table 3. Bumble bee species used in ecotoxicological assays (adopted from ARENA and SGOLAstra, 2014 and references therein; extended by additional references (WAY and SYNGE, 1948; WU et al., 2010; BioBEST, 2020))

Native range	Species name	Rearing in captivity*
Europe	<i>Bombus lapidarius</i>	Yes
	<i>Bombus lucorum</i>	Yes
	<i>Bombus pascuorum</i>	No
	<i>Bombus terrestris</i>	Yes (ca)
	<i>Bombus vestalis</i>	No
North America	<i>Bombus impatiens</i>	Yes (ca)
	<i>Bombus occidentalis</i>	Yes
	<i>Bombus terricola</i>	No
Asia	<i>Bombus ignitus</i>	Yes (ca)
	<i>Bombus hypocrita</i>	Yes
	<i>Bombus patagiatus</i>	Yes

* ca = commercially available

Table 4. Wild bee species other than *Bombus* sp. used in ecotoxicological assays (adopted from ARENA und SGOLASTRA, 2014 and references therein; extended by information from additional references (e.g. WAY und SYNGE, 1948; HELSON et al., 1994; BOSCH und KEMP, 2002; CAUICH et al., 2004; CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006; NOCELLI et al., 2012; QUIROGA MURCIA et al., 2017; DHARAMPAL et al., 2018; JÜTTE et al., 2019; PADILHA et al., 2020))

Native range	Species name	Nesting	Rearing in captivity*
Europe	<i>Andrena flavipes</i>	Ground-nesting	No
	<i>Megachile rotundata</i>	Above-ground	Yes (ca)
	<i>Osmia bicornis</i>	Above-ground	Yes (ca)
	<i>Osmia cornuta</i>	Above-ground	Yes (ca)
North America	<i>Andrena erythronii</i>	Ground-nesting	No
	<i>Nomia melanderi</i>	Ground-nesting	Yes (ucp)
	<i>Osmia lignaria</i>	Above-ground	Yes (ca)
	<i>Osmia ribifloris</i>	Above-ground	Yes
Asia	<i>Osmia cornifrons</i>	Above-ground	Yes (ca)
	<i>Trigona iridipennis</i> †††	Above-ground	No
Central and South America	<i>Melipona beecheii</i> †††	Above-ground	Yes (ucp)
	<i>Melipona quadrifasciata</i> †††	Above-ground	Yes (ucp)
	<i>Melipona scutellaris</i> †††	Above-ground	Yes (ucp)
	<i>Nannotrigona perilampoides</i> †††	Above-ground	Yes (ucp)
	<i>Plebeia emerina</i> †††	Above-ground	Yes (ucp)
	<i>Scaptotrigona postica</i> †††	Above-ground	Yes (ucp)
	<i>Scaptotrigona tubiba</i> †††	Above-ground	No
	<i>Scaptotrigona xanthotricha</i> †††	Above-ground	No
	<i>Tetragonisca angustula</i> †††	Above-ground	Yes (ucp)
	<i>Tetragonisca fiebrigii</i> †††	Above-ground	Yes (ucp)
	<i>Trigona nigra</i> †††	Above-ground	No
	<i>Trigona spinipes</i> †††	Above-ground	No

†also native to parts of Asia and North Africa; ††also native to parts of Asia; †††eusocial species * ca = commercially available, ucp = used for specific commercial purposes but not generally commercially available

own cavities and the species that nest above ground or in existing underground cavities (SGOLASTRA et al., 2019). Some wild bee species use nesting resources like leaves, soil, resin or fibres to line their brood cells, which may be another source of contaminants (VAN DER VALK et al., 2013).

The high diversity of life-history traits and environmental requirements make solitary bees a group of organisms that are particularly difficult to rear in large numbers. Hence many species are not suitable as model organisms in the risk assessment of registration processes for PPPs. The number of wild bee species used in ecotoxicological tests is therefore limited (Table 4).

Developing methods

Using bee species other than honey bees in the registration process requires not only the knowledge of their characteristics and life history traits but also establishing routines and standards in handling, caring for the bees' specific requirements and reliably measuring endpoints

in 1st tier (laboratory) and higher tier (semi-field and field) trials. There have been numerous studies on various species over the last decades that have collected valuable information on feeding, housing, rearing, overwintering and endpoints in different experimental settings (cf. references in EFSA PANEL ON PLANT PROTECTION PRODUCTS AND THEIR RESIDUES, 2012 and SGOLASTRA et al., 2019). However, a better understanding of the variability of these traits among bees has only complicated the development of standard procedures.

The Bee Protection Group of the International Commission for Plant Pollinator Relationships (ICPPR) provides a forum, in which these aspects are addressed, and coordinates international research and ring tests². Its working groups (e.g. *Apis*, non-*Apis*) focus on the development of suitable test methods and the evaluation of parameters and endpoints related to bee health and effects of PPPs. Regulatory test guidelines and guidance

²Ring test: an inter-laboratory test that allows to evaluate the performance of testing laboratories, and is based on analysis of similar homogeneous samples

documents of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) are often based on data and information collected and collated by the working groups (OECD, 2019a).

Bumble bees

As mentioned earlier, laboratory (1st tier) test methods for bumble bees have already been standardized and implemented in guidelines for risk assessment processes (OECD, 2017b, 2017c) using *Bombus terrestris* (Europe) and *Bombus impatiens* (North America) as model species. Queenless microcolonies of these two species have been proposed to be a useful tool for evaluating a range of endpoints at colony level (KLINGER et al., 2019); however, disadvantages of using only worker bees are likely to outweigh the benefits (cf. WU-SMART and SPIVAK, 2018). For example, one limitation of this method is nest initiation by worker bees and subsequent drone production from unfertilized eggs, which is difficult to standardize in the framework of risk assessment.

While laboratory tests have been conducted on more than those two bumble bee species (cf. Table 3), studies on PPPs that include manipulative semi-field and field experiments have so far only utilized the commercially available species *Bombus terrestris* and *Bombus impatiens* (CUTLER and SCOTT-DUPREE, 2014; GILL and RAINE, 2014; GRADISH et al., 2016; WOODCOCK et al., 2017; SIVITER et al., 2018; DIETZSCH et al., 2019; RUNDLÖF and LUNDIN, 2019). These studies used the weight of a colony, the size/volume of the nest and/or the number of workers (colony strength), males and gynes as proxies for a colony's development and success and thus as endpoints. Rearing colonies from sister queens (queenright) in captivity by commercial suppliers (e.g. Koppert, BioBest) should allow for a way of standardization among colonies that are exposed to the same environmental settings (VAN DER STEEN, 2001; CABRERA et al., 2016). While such a restriction of genetic variability in experimental bee colonies neglects a wide range of naturally occurring genetic traits and as a consequence may restrain the generalization of test results (BAKKER, 2016), it may not yet have the desired effect of reducing experimental error. Measuring differences in certain endpoints such as gyne production may only be achieved by highly replicating the number of colonies in trials to accomplish an adequate protection goal (e.g. detection of 25% reduction in queen production; cf. CABRERA et al., 2016). Semi-field and field trials have proven different parameters to be significant for colony success, including initial colony strength and its influence on trial duration, colony development and reproductive success in different seasons (DIETZSCH et al., 2018). Food availability is another crucial factor for queen production and queen weight (FRANKE et al., 2018). To further reduce variability in endpoints, colonies should not only contain a similar initial number of workers and brood stages and show an appropriate worker/brood ratio but also develop with a synchronized speed (KLEIN et al., 2018). This latter criterion is very time-consuming to achieve and requires laboratory space

and capacities to conduct assessments for a possibly large number of replicates. While synchronized developmental speed has been shown to work in semi-field trials (KLEIN et al., 2018) and was included as a criterion in ring tests (KNÄBE et al., 2019), it may not be feasible to achieve in field experiments with multiple colonies per site and multiple replicates in each treatment. Other aspects such as colony disturbance during the experimental (semi-) field phase (including removal of wax ceilings for brood nest evaluation) and its influence on endpoints have yet to be experimentally addressed.

Solitary bees

Although establishment of – at least 1st tier – guidelines for solitary bees in the risk assessment process has been initiated (OECD, 2019b), so far standardized methods have not been approved. As for bumble bees, laboratory toxicity tests were performed on many different species (Table 4), yet most experiments on effects of PPPs, particularly higher tier tests, have used only commercially available species, e.g. *Osmia bicornis*, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata* (ABBOTT et al., 2008; SANDROCK et al., 2014; RUNDLÖF et al., 2015; BECKER and KELLER, 2016; NICHOLLS et al., 2017; WOODCOCK et al., 2017; DIETZSCH et al., 2019 but DHARAMPAL et al., 2018). This might be problematic since the three species belong to the same family (Megachilidae) and display relatively similar life history traits, hence may only mirror very few aspects of exposure and behavior of solitary bee species. In addition, availability is not always ensured for all areas of a species' native range in the framework of the registration process. Since imports of such species are restricted, and different regions (e.g. EU authorization zones) within the same registration area may require different native species, the use of a small set of commercially available species can complicate the implementation of adequate tests.

While the difficulty in bumble bee experiments is the handling of high variability within endpoints, problems in experiments with solitary bees occur in relation to standardized feeding of contaminated food under laboratory conditions, general breeding requirements and year-round management/availability of viable individuals. On a laboratory level, methodologies were refined over the last years and standardized ring tests were conducted (ROESSINK et al., 2018), which led to the above mentioned proposal for a new guideline (OECD, 2019b). Additional 1st tier experiments explored artificial rearing as well as acute and chronic PPP exposure of solitary bee larvae (SGOLASTRA et al., 2015; BECKER and KELLER, 2016; EERAERTS et al., 2019). A greater challenge are semi-field and field trials where hatching times and hatching ratios of bee individuals have to be synchronized, and assessment of nest provisioning and mortality rates of adults have to be monitored continuously. Experimental basics such as choice of easily assessable nesting material, hatching times as well as activity patterns and longevity of the solitary bee species over the season were methodologically addressed by some studies (BOSSE et al., 2014; DIETZSCH et al., 2014; KNÄBE et al., 2016; KONDAGALA et al.,

2016). They gave valuable information for semi-field ring tests, which resulted in repeatable and meaningful results of the measured endpoints (KNÄBE et al., 2019). Manipulative approaches that combined laboratory methods with field exposure conditions (e.g. experiments on contaminating nesting material; JÜTTE et al., 2018) highlighted specific exposure routes with little relevance to honey bees and bumble bees. Further experimental aspects such as disturbance during the nesting phase due to assessments (Kunz et al., unpublished data) and establishment of a suitable reference substance for brood studies (LÜCKMANN et al., 2018a) have to be considered in future optimizations of test methodologies.

Across species

Besides experiments that only use one species of bee, recent years saw more – primarily laboratory – experiments involving multiple bee species (ARENA and SGOLASTRA, 2014; UHL et al., 2019). These studies allow direct comparison of sensitivity rather than relying on meta-analyses of data from multiple studies (like discussed in LEWIS and TZILIVAKIS, 2019; THOMPSON and PAMMINGER, 2019). Direct comparisons of bees in laboratory and semi-field studies (honey bee vs. bumble bee, honey bee vs. solitary bee; HEARD et al., 2017; SGOLASTRA et al., 2017; ALKASSAB et al., 2018; ANSELL, 2019; JÜTTE et al., 2019) show clear differences in the sensitivity of bees and in some cases contradict results from the above mentioned meta-analyses. The direct-comparison approach highlights the need for applying the same laboratory and/or environmental conditions on multiple species to better understand and assess effects. Although standardization of test methods for different solitary bee species is still in progress, experimental efforts (DEVILLERS et al., 2003; ARENA and SGOLASTRA, 2014; UHL et al., 2016; JÜTTE et al., 2019) have addressed the question of whether and to what extent honey bees are indeed a suitable surrogate for other bee species in the registration process.

Knowledge gaps and outlook

By explicitly integrating other bee species into standardized protocols, the current revision of the EFSA Bee Guidance Document (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013) emphasizes the need for a broader risk assessment in the PPP registration process. Most of the recently developed test methods for bumble bees (higher tier trials) and solitary bees (all tiers approaches) indicated some shortcomings; they highlight the need for further improvements in standardizing toxicity tests. The (submitted) manuscripts of the ICPPR non-*Apis* working group on protocols for bumble bees and mason bees under semi-field conditions (FRANKE et al., 2020; KLEIN et al., 2020) as well as the results of laboratory ring tests on oral exposure of solitary bees (ROESSINK et al., 2018) point to model species and test designs for future risk assessment. Further interdisciplinary research can play an integrative role in evaluating and extrapolating these

existing data. For example, experiments on the toxicogenomics (MANJON et al., 2018; BEADLE et al., 2019; TROCZKA et al., 2019) and the phylogenetics of bees (HAYWARD et al., 2019) clarify mechanisms that correlate with the sensitivity of bee species and hence may facilitate finding model species to extrapolate from. Yet, the goal to identify surrogate species among solitary bee species remains extremely difficult to attain due to the huge variability within important life-history traits. The bee species used so far do not adequately cover this variability (e.g. only hole-nesting solitary bee species and bumble bee pollen storers in higher tier studies). Concepts like the “focal species” approach, which is used in higher tier risk assessment of mammals and birds, could give some directions to choosing and testing appropriate bee species (LÜCKMANN et al., 2018b). A ‘focal species’ is a real species that uses the crop of interest when a pesticide is applied. It is considered to be representative of all other species of the same feeding guild that may occur in the particular crop (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2009).

Future research should also cover aspects essential for everyday agricultural practice such as the impact of tank mixtures and additives on bee health (ROBINSON et al., 2017; CARNESECCHI et al., 2019; WERNECKE et al., 2019), which has not yet been systematically tested on honey bees and other bee taxa. By expanding risk assessment to a landscape level and incorporating modelling approaches, exposure routes and landscape-scale/landscape-context effects of PPPs are evaluated for bee populations/communities rather than individual bees (DANNER et al., 2014; RORTAIS et al., 2017; SIMON-DELISO et al., 2017; UHL and BRÜHL, 2019). This allows for factors such as spatiotemporal migratory population dynamics that are difficult to detect with single field experiments due to limitations of experimental duration and of spatial scale (UHL and BRÜHL, 2019). By considering a multitude of potential stressors at various spatial and temporal scales we may be able to minimize or even exclude risks for bees in anthropogenic landscapes.

Conflict of interest

The authors declare that they do not have any conflicts of interest.

References

- ABBOTT, V.A., J.L. NADEAU, H.A. HIGO, M.L. WINSTON, 2008: Lethal and sublethal effects of imidacloprid on *Osmia lignaria* and clothianidin on *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Economic Entomology* 101 (3), 784-796.
- ALKASSAB, A.T., A. WERNECKE, T. JÜTTE, M. FROMMBERGER, J.H. ECKERT, J. PISTORIUS, 2018: PSM-Tankmischungen: Vergleichende Untersuchung der Empfindlichkeit von Honigbienen, Hummeln und Solitärbiene. In: 61. Deutsche Pflanzenschutztagung: Herausforderung Pflanzenschutz - Wege in die Zukunft; 11.-14. September 2018, Universität Hohenheim, Julius-Kühn-Archiv 461, S. 571.
- ANSELL, G., 2019: Method development for solitary bee pesticide risk assessment using *Megachile rotundata* as a surrogate species. MSc thesis, University of Guelph.


- ARENA, M., F. SGOLASTRA, 2014: A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology* **23** (3), 324–334, DOI: 10.1007/s10646-014-1190-1.
- BAKKER, F., 2016: Design and analysis of field studies with bees: A critical review of the draft EFSA guidance. *Integrated Environmental Assessment and Management* **12** (3), 422–428, DOI: 10.1002/ieam.1716.
- BARTOMEUS, I., S.G. POTTS, I. STEFFAN-DEWENTER, B.E. VAISSIÈRE, M. WOYCIECHOWSKI, K.M. KREWENKA, T. TSCHULIN, S.P.M. ROBERTS, H. SZENTGYÖRGYI, C. WESTPHAL, R. BOMMARCO, 2014: Contribution of insect pollinators to crop yield and quality varies with agricultural intensification. *PeerJ* **2**, e328, DOI: 10.7717/peerj.328.
- BEADLE, K., K.S. SINGH, B.J. TROCZKA, E. RANDALL, M. ZAWORRA, C.T. ZIMMER, A. HAYWARD, R. REID, L. KOR, M. KOHLER, B. BUER, D.R. NELSON, M.S. WILLIAMSON, T.G.E. DAVIES, L.M. FIELD, R. NAUEN, C. BASS, 2019: Genomic insights into neonicotinoid sensitivity in the solitary bee *Osmia bicornis*. *PLoS genetics* **15** (2), e1007903, DOI: 10.1371/journal.pgen.1007903.
- BECKER, M.C., A. KELLER, 2016: Laboratory rearing of solitary bees and wasps. *Insect Science* **23** (6), 918–923, DOI: 10.1111/1744-7917.12242.
- BENTON, T., 2009: *Bumblebees*, Harper Collins Publishers Limited.
- BIESMEIJER, J.C., S.P.M. ROBERTS, M. REEMER, R. OHLEMÜLLER, M. EDWARDS, T. PEETERS, A.P. SCHAFFERS, S.G. POTTS, R. KLEUKERS, C.D. THOMAS, J. SETTELE, W.E. KUNIN, 2006: Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* **313** (5785), 351–354.
- BIOBEST, 2020: Bumblebee species. Zugriff: 27. Februar 2020, URL: <https://www.biobestgroup.com/en/biobest/pollination/things-to-know-about-bumblebees-7052/species-6674/>.
- BOSCH, J., W.P. KEMP, 2002: Developing and establishing bee species as crop pollinators: the example of *Osmia* spp. (Hymenoptera: Megachilidae) and fruit trees. *Bulletin of Entomological Research* **92** (1), 3–16, DOI: 10.1079/BER2001139.
- BOSSE, G., T. JÜTTE, O. KLEIN, 2014: Experimental designs for field and semi-field studies with solitary wild bees. In: *Hazards of Pesticides to Bees - 12th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group*, Ghent (Belgium), September 15-17 2014, Julius-Kühn-Archiv 450, S. 226–229.
- BOYLE, N.K., T.L. PITTS-SINGER, J. ABBOTT, A. ALIX, D.L. COX-FOSTER, S. HINAREJOS, D.M. LEHMANN, L. MORANDIN, B. O'NEILL, N.E. RAINE, R. SINGH, H.M. THOMPSON, N.M. WILLIAMS, T. STEEGER, 2019: Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non-*Apis* bees: Foundation and summaries. *Environmental Entomology* **48** (1), 4–11, DOI: 10.1093/ee/nvy103.
- BRITAIN, C.A., S.G. POTTS, 2011: The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. *Basic and Applied Ecology* **12**, 321–331.
- CABRERA, A.R., M.T. ALMANZA, G.C. CUTLER, D.L. FISCHER, S. HINAREJOS, G. LEWIS, D. NIGRO, A. OLMSTEAD, J. OVERMYER, D.A. POTTER, N.E. RAINE, C. STANLEY-STARR, H. THOMPSON, J. VAN DER STEEN, 2016: Initial recommendations for higher-tier risk assessment protocols for bumble bees, *Bombus* spp. (Hymenoptera: Apidae). *Integrated Environmental Assessment and Management* **12** (2), 222–229, DOI: 10.1002/ieam.1675.
- CANE, J.H., S.D. SIPES, 2006: Characterizing floral specialization by bees: analytical methods and a revised lexicon for oligolecty. In: *Plant-Pollinator Interactions: From Specialization to Generalization*. WASER, N.M., J. OLLERTON (Eds), Chicago, The University of Chicago Press, S. 99–122.
- CARNESECCHI, E., C. SVENDSEN, S. LASAGNI, A. GRECH, N. QUIGNOT, B. AMZAL, K. TOMA, S. TOSI, A. RORTAIS, J. CORTINAS-ABRAHANTES, E. CAPRI, N. KRAMER, E. BENFENATI, D. SPURGEON, G. GUILLOT, J.L.C.M. DORNE, 2019: Investigating combined toxicity of binary mixtures in bees: Meta-analysis of laboratory tests, modelling, mechanistic basis and implications for risk assessment. *Environment International* **133** (Part B), 105256, DOI: 10.1016/j.envint.2019.105256.
- CATARINO, R., V. BRETAGNOLLE, T. PERROT, F. VIALLOUX, S. GABA, 2019: Bee pollination outperforms pesticides for oilseed crop production and profitability. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **286** (1912), 20191550, DOI: 10.1098/rspb.2019.1550.
- CAUICH, O., J.J.G. QUEZADA-EUÁN, J.O. MACIAS-MACIAS, V. REYES-OREGEL, S. MEDINA-PERALTA, V. PARRA-TABLA, 2004: Behavior and pollination efficiency of *Nannotrigona perilampoides* (Hymenoptera: Meliponini) on greenhouse tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) in subtropical México. *Journal of Economic Entomology* **97** (2), 475–481, DOI: 10.1093/jee/97.2.475.
- COLLA, S., 2014: Bumble bees: Natural history and pesticide exposure routes. In: *Pollinator safety in agriculture*. ROUBIK, D.W. (Eds), Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, S. 49–56.
- CORTOPASSI-LAURINO, M., V.L. IMPERATRIZ-FONSECA, D.W. ROUBIK, A. DOLLIN, T. HEARD, I. AGUILAR, G.C. VENTURIERI, C. EARDLEY, P. NOGUEIRA-NETO, 2006: Global meliponiculture: Challenges and opportunities. *Apidologie* **37** (2), 275–292, DOI: 10.1051/apido:2006027.
- CUEVA DEL CASTILLO, R., S. SANABRIA-URBÁN, M.A. SERRANO-MENESES, 2015: Trade-offs in the evolution of bumblebee colony and body size: a comparative analysis. *Ecology and Evolution* **5** (18), 3914–3926, DOI: 10.1002/ece3.1659.
- CUTLER, C.G., C.D. SCOTT-DUPREE, 2014: A field study examining the effects of exposure to neonicotinoid seed-treated corn on commercial bumble bee colonies. *Ecotoxicology* **23** (9), 1755–1763, DOI: 10.1007/s10646-014-1340-5.
- DANNER, N., S. HÄRTEL, I. STEFFAN-DEWENTER, 2014: Maize pollen foraging by honey bees in relation to crop area and landscape context. *Basic and Applied Ecology* **15** (8), 677–684, DOI: 10.1016/j.baee.2014.08.010.
- DEVILLERS, J., A. DECOURTYE, H. BUDZINSKI, M.H. PHAM-DELÈGUE, S. CLUZEAU, G. MAURIN, 2003: Comparative toxicity and hazards of pesticides to *Apis* and non-*Apis* bees. A chemometrical study. *SAR and QSAR in Environmental Research* **14** (5-6), 389–403.
- DHARAMPAL, P.S., C.M. CARLSON, L. DIAZ-GARCIA, S.A. STEFFAN, 2018: In vitro rearing of solitary bees: A tool for assessing larval risk factors. *Journal of Visualized Experiments* **137**, e57876, DOI: 10.3791/57876.
- DIETZSCH, A.C., M. FROMMBERGER, J. PISTORIUS, 2018: Developing methods for field experiments using commercially reared bumblebee colonies - initial colony strength and experimental duration as influential factors. In: *Hazards of Pesticides to Bees - 13th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group*, October 18 - 20 2017, Valencia (Spain), Julius-Kühn-Archiv 462, S. 176–179.
- DIETZSCH, A.C., N. KUNZ, I.P. WIRTZ, M. FROMMBERGER, J. PISTORIUS, 2014: Evaluating the feasibility of using the red mason bee (*Osmia bicornis* L.) in different experimental setups. In: *Hazards of Pesticides to Bees - 12th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group*, Ghent (Belgium), September 15-17 2014, Julius-Kühn-Archiv 450, S. 174–178.
- DIETZSCH, A.C., N. KUNZ, I.P. WIRTZ, M. STÄHLER, U. HEIMBACH, J. PISTORIUS, 2019: Does winter oilseed rape grown from clothianidin-coated seeds affect experimental populations of mason bees and bumblebees? A semi-field and field study. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* **14** (3), 223–238, DOI: 10.1007/s00003-019-01225-5.
- EERAERTS, M., M. PISMAN, R. VANDERHAEGEN, I. MEEUS, G. SMAGGHE, 2019: Recommendations for standardized oral toxicity test protocols for larvae of solitary bees, *Osmia* spp. *Apidologie* **101** (3), 784, DOI: 10.1007/s13592-019-00704-w.
- EFSA PANEL ON PLANT PROTECTION PRODUCTS AND THEIR RESIDUES, 2012: Scientific Opinion on the science behind the development of a risk assessment of Plant Protection Products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA Journal* **10** (5), 2668, DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2668.
- EPPO, 2010: Environmental risk assessment scheme for plant protection products - Chapter 10: honeybees. *EPPO Bulletin* **40**, 1–9.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2009: Guidance document on risk assessment for birds and mammals on request from EFSA. *EFSA Journal* **7** (12), 1438, DOI: 10.2903/j.efsa.2009.1438.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013: EFSA Guidance Document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA Journal* **11** (7), 3295.
- EUROPEAN PARLIAMENT, COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2009: Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union*, L 309/1-L 309/50.
- EVANS, E., 2017: From humble bee to greenhouse pollination workhorse: Can we mitigate risks for bumble bees? *Bee World* **94** (2), 34–41, DOI: 10.1080/0005772X.2017.1290892.
- FISCHER, D., T. MORIARTY (Eds.), 2011: Pesticide risk assessment for pollinators: Summary of a SETAC Pellston Workshop, Pensacola, FL, USA, Society of Environmental Toxicology and Chemistry.
- FRANKE, L., C. ELSTON, T. JÜTTE, O. KLEIN, S. KNÄBE, J. LÜCKMANN, I. ROESSINK, M. PERSIGHEHL, M. CORNEMENT, N. EXELER, H. GIFFARD, B. HODAPP, S. KIMMEL, B. KULLMANN, C. SCHNEIDER, A. SCHNURR, 2020: Results of 2-year ring-testing of a semi-field study design to investigate potential impacts of plant protection products on the solitary bees *Osmia bicornis* (Linnaeus, 1758) and *Osmia cornuta* (Latreille, 1805) (Hymenoptera, Megachilidae) and a proposal of a suitable test design. *Environmental Toxicology and Chemistry*, submitted.

- FRANKE, L., O. KLEIN, J. FRICKE, J. SORLI, S. KNAEBE, 2018: 3.11 Bumble bee queen production in semi-field studies: Assessment of endpoints and challenges. In: *Hazards of Pesticides to Bees - 13th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group, October 18 - 20 2017, Valencia (Spain)*, Julius-Kühn-Archiv 462, S. 134-136.
- GARIBALDI, L.A., I. STEFFAN-DEWENTER, R. WINFREE, M.A. AIZEN, R. BOMMARCO, S.A. CUNNINGHAM, C. KREMEN, L.G. CARVALHEIRO, L.D. HARDER, O. AFIK, I. BARTOMEUS, F. BENJAMIN, V. BOREUX, D. CARIVEAU, N.P. CHACOFF, J.H. DUDENHÖFFER, B.M. FREITAS, J. GHAZOUL, S. GREENLEAF, J. HIPÓLITO, A. HOLZSCHUH, B. HOWLETT, R. ISAACS, K. JAVOREK, C.M. KENNEDY, K. KREWENKA, S. KRISHNAN, Y. MANDELİK, M.M. MAYFIELD, I. MOTZKE, T. MUNYULI, B.A. NAULT, M. OTIENO, J. PETERSEN, G. PISANTY, S.G. POTTS, R. RADER, T.H. RICKETTS, M. RUNDLÖF, C.L. SEYMOUR, C. SCHÜEPP, H. SZENTGYÖRGYI, T. HISATOMO, T. TSCHARNTKE, C.H. VERGARA, B.F. VIANA, T.C. WANGER, C. WESTPHAL, N. WILLIAMS, A.M. KLEIN, 2013: Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* **339** (6127), 1608–1611, DOI: 10.1126/science.1230200.
- GILL, R.J., N.E. RAINE, 2014: Chronic impairment of bumblebee natural foraging behaviour induced by sublethal pesticide exposure. *Functional Ecology* **28** (6), 1459–1471, DOI: 10.1111/1365-2435.12292.
- GOULSON, D., 2003: *Bumblebees; their Behaviour and Ecology*. Oxford, UK, Oxford University Press.
- GOULSON, D., E. NICHOLLS, C. BOTÍAS, E.L. ROTHERAY, 2015: Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* **347** (6229), 1255957, DOI: 10.1126/science.1255957.
- GRADISH, A.E., G.C. CUTLER, A.J. FREWIN, C.D. SCOTT-DUPREE, 2016: Comparison of buckwheat, red clover, and purple tansy as potential surrogate plants for use in semi-field pesticide risk assessments with *Bombus impatiens*. *PeerJ* **4**, e2228, DOI: 10.7717/peerj.2228.
- GRADISH, A.E., J. VAN DER STEEN, C.D. SCOTT-DUPREE, A.R. CABRERA, G.C. CUTLER, D. GOULSON, O. KLEIN, D.M. LEHMANN, J. LÜCKMANN, B. O'NEILL, N.E. RAINE, B. SHARMA, H. THOMPSON, 2019: Comparison of pesticide exposure in honey bees (Hymenoptera: Apidae) and bumble bees (Hymenoptera: Apidae): Implications for risk assessments. *Environmental Entomology* **48** (1), 12–21, DOI: 10.1093/ee/nvy168.
- HALLMANN, C.A., M. SORG, E. JONGEJANS, H. SIEPEL, N. HOFLAND, H. SCHWAN, W. STENMANS, A. MÜLLER, H. SUMSER, T. HÖRREN, D. GOULSON, H. DE KROON, 2017: More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLoS ONE* **12** (10), e0185809, DOI: 10.1371/journal.pone.0185809.
- HANDFORD, C.E., C.T. ELLIOTT, K. CAMPBELL, 2015: A review of the global pesticide legislation and the scale of challenge in reaching the global harmonization of food safety standards. *Integrated Environmental Assessment and Management* **11** (4), 525–536.
- HAYWARD, A., K. BEADLE, K.S. SINGH, N. EXELER, M. ZAWORRA, M.-T. ALMANZA, A. NIKOLAKIS, C. GARSIDE, J. GLAUBITZ, C. BASS, R. NAUEN, 2019: The leafcutter bee, *Megachile rotundata*, is more sensitive to N-cyanoamidine neonicotinoid and butenolide insecticides than other managed bees. *Nature Ecology & Evolution* **3** (11), 1521–1524, DOI: 10.1038/s41559-019-1011-2.
- HEARD, M.S., J. BAAS, J.-L. DORNE, E. LAHIVE, A.G. ROBINSON, A. RORTAIS, D.J. SPURGEON, C. SVENDSEN, H. HESKETH, 2017: Comparative toxicity of pesticides and environmental contaminants in bees: Are honey bees a useful proxy for wild bee species? *Science of the Total Environment* **578**, 357–365, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.180.
- HELSON, B.V., K.N. BARBER, P.D. KINGSBURY, 1994: Laboratory toxicology of six forestry insecticides to four species of bee (Hymenoptera: Apoidea). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **27**, 107–114.
- JÜTTE, T., C. STEINIGEWEG, J. PISTORIUS, 2018: Exposure by nesting material? – Investigation of potentially suitable methods for higher tier studies with solitary bees. In: *Hazards of Pesticides to Bees - 13th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group, October 18 - 20 2017, Valencia (Spain)*, Julius-Kühn-Archiv 462, S. 164-169.
- JÜTTE, T., A. WERNECKE, G. BISCHOFF, A. KRAHNER, A. DIETZSCH, J. PISTORIUS, 2019: Sensitivity of the honey bee and different wild bee species to plant protection products – two years of comparative laboratory studies: Book of Abstracts. Bern.
- KLEIN, A.M., B. VAISSIÈRE, J.H. CANE, I. STEFFAN-DEWENTER, S.A. CUNNINGHAM, C. KREMEN, T. TSCHARNTKE, 2007: Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**, 303–313.
- KLEIN, O., C. ELSTON, L. FRANKE, T. JÜTTE, S. KNÄBE, J. LÜCKMANN, J. VAN DER STEEN, M.J. ALLAN, A. ALSCHER, K. AMSEL, M. CORNEMENT, N. EXELER, J. SORLI GUEROLA, B. HODAPP, C. JENKINS, S. KIMMEL, V. TÄNZLER, 2020: Results of 2-year ring-testing of a semi-field study design to investigate potential impacts of plant protection products on bumble bees (Hymenoptera, Apidae) and a proposal of a suitable test design. *Environmental Toxicology and Chemistry*, submitted.
- KLEIN, O., L. FRANKE, J. FRICKE, J. SORLI, S. KNAEBE, 2018: 3.10 Bumble bee semi-field studies: Choice and management of colonies to reduce variability in assessment endpoints. In: *Hazards of Pesticides to Bees - 13th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group, October 18 - 20 2017, Valencia (Spain)*, Julius-Kühn-Archiv 462, S. 132-134.
- KLINGER, E.G., A.A. CAMP, J.P. STRANGE, D. COX-FOSTER, D.M. LEHMANN, 2019: *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) microcolonies as a tool for biological understanding and pesticide risk assessment. *Environmental Entomology* **48** (6), 1249–1259, DOI: 10.1093/ee/nvz117.
- KNÄBE, S., M. ALLAN, A. ALSCHER, K. AMSEL, C. CLASSEN, M. CORNEMENT, C. ELSTON, N. EXELER, L. FRANKE, J. FRICKE, M. FROMMBERGER, H. GIFFARD, J. SORLI GUEROLA, S. HECHT-ROST, B. HODAPP, I. HOTOPP, C. JENKINS, T. JÜTTE, S. KIMMEL, O. KLEIN, B. KULLMANN, J. LÜCKMANN, M. PERSIGHEL, I. ROESSINK, C. SCHNEIDER, A. SCHNURR, V. TÄNZLER, S. VAN DER STEEN, 2019: 2.1. Summary of an ICP-PR Non-Apis workshop – Subgroup higher tier (bumble bees and solitary bees) with recommendations for a semi-field experimental design: Book of Abstracts. Bern.
- KNÄBE, S., M.M. CANDOLFI, L. FRANKE, J. FRICKE, T. JÜTTE, O. KLEIN, A. SCHUSTER, T. VOLLMER, 2016: Experimental design for semi-field trials to test brood affecting plant protection products with solitary bees. In: *26th Annual Meeting SETAC Europe*, Nantes, France.
- KONDAGALA, V., M. CANDOLFI, T. JÜTTE, O. KLEIN, S. KNÄBE, T. VOLLMER, 2016: Development of suitable experimental designs for semi-field trials with solitary bees. In: *26th Annual Meeting SETAC Europe*, Nantes, France.
- KOPIT, A.M., T.L. PITTS-SINGER, 2018: Routes of pesticide exposure in solitary, cavity-nesting bees. *Environmental Entomology* **47** (3), 499–510, DOI: 10.1093/ee/nvy034.
- LEWIS, K.A., J. TZILIVAKIS, 2019: Wild bee toxicity data for pesticide risk assessments. *Data* **4** (3), 98, DOI: 10.3390/data4030098.
- LÜCKMANN, J., C. CLAßEN, O. MAYER, O. JAKOBY, 2018a: 3.9 Semi-field testing of the solitary bee *Osmia bicornis* (L., 1758) (Hymenoptera, Megachilidae) in flowering *Phacelia tanacetifolia* – Chances, improvements and limitations. In: *Hazards of Pesticides to Bees - 13th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group, October 18 - 20 2017, Valencia (Spain)*, Julius-Kühn-Archiv 462, S. 126-131.
- LÜCKMANN, J., M. FAUPEL, J.-D. LUDWIGS, 2018b: 3.8 'Focal species' – can this well-known concept in higher-tier risk assessments be an appropriate approach for solitary bees? In: *Hazards of Pesticides to Bees - 13th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group, October 18 - 20 2017, Valencia (Spain)*, Julius-Kühn-Archiv 462, S. 122-125.
- MANJON, C., B.J. TROCZKA, M. ZAWORRA, K. BEADLE, E. RANDALL, G. HERTLEIN, K.S. SINGH, C.T. ZIMMER, R.A. HOMEM, B. LUEKE, R. REID, L. KOR, M. KOHLER, J. BENTING, M.S. WILLIAMSON, T.G.E. DAVIES, L.M. FIELD, C. BASS, R. NAUEN, 2018: Unravelling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Current Biology* **28** (7), 1137–1143.e5, DOI: 10.1016/j.cub.2018.02.045.
- MARTINS, D.J., 2014: Sweat bees (Halictidae): Natural history and pesticide exposure. In: *Pollinator safety in agriculture*. ROUBIK, D.W. (Eds), Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, S. 75-89.
- MAYACK, C., S. BOFF, 2019: LD50 values may be misleading predictors of neonicotinoid toxicity across different bee species. *Uludağ Arıcılık Dergisi* **19** (1), 19–33, DOI: 10.31467/uluaricilik.568251.
- MICHENER, C.D., 2007: *The Bees of the World*. Baltimore, Johns Hopkins University Press.
- MORSE, R., N.W. CALDERONE, 2000: The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. *Bee Culture* **128**, 1-15.
- MÜLLER, A., M. KÜHLMANN, 2008: Pollen hosts of western palaeartic bees of the genus *Colletes* (Hymenoptera: Colletidae): the Asteraceae paradox. *Biological Journal of the Linnean Society* **95** (4), 719–733, DOI: 10.1111/j.1095-8312.2008.01113.x.
- MÜLLER, C.B., P. SCHMID-HEMPEL, 1992: Correlates of reproductive success among field colonies of *Bombus lucorum*: The importance of growth and parasites. *Ecological Entomology* **17** (4), 343–353, DOI: 10.1111/j.1365-2311.1992.tb01068.x.
- MWEEBAZE, P., G. MARRIS, G. BUDGE, M. BROWN, S.G. POTTS, T.D. BREESE, A. MACLEOD, 2010: Quantifying the Value of Ecosystem Services: A Case Study of Honeybee Pollination in the UK. From the Wealth of Nations to the Wealth of Nature: Rethinking Economic Growth, Venice, Italy.
- NICHOLLS, E., R. FOWLER, J.E. NIVEN, J.D. GILBERT, D. GOULSON, 2017: Larval exposure to field-realistic concentrations of clothianidin has no effect on development rate, over-winter survival or adult


- metabolic rate in a solitary bee, *Osmia bicornis*. PeerJ 5, e3417, DOI: 10.7717/peerj.3417.
- NIETO, A., S.P.M. ROBERTS, J. KEMP, P. RASMONT, M. KUHLMANN, GARCÍA CRIADO, M., J.C. BIESMEIJER, P. BOGUSCH, H.H. DATHE, P. DE LA RÚA, T. DE MEULEMEESTER, M. DEHON, A. DEWULF, F.J. ORTIZ-SÁNCHEZ, P. LHOMME, A. PAULY, S.G. POTTS, C. PRAZ, M. QUARANTA, V.G. RADCHENKO, E. SCHEUCHL, J. SMIT, J. STRAKA, M. TERZO, B. TOMOZII, J. WINDOW, D. MICHEZ, 2014: European Red List of Bees. Luxembourg, Publication Office of the European Union.
- NOCELLI, R.C.F., T.C. ROAT, ZACARIN, Elaine Cristina Mathias DA SILVA, O. MALAPISINA, 2012: Riscos de pesticidas sobre as abelhas. In: *Semana dos Polinizadores*, Petrolina, Embrapa Semiárido, S. 196-212.
- OECD, 1998a: Test No. 213: Honeybees, acute oral toxicity test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD, 1998b: Test No. 214: Honeybees, acute contact toxicity test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD, 2007: No. 75: Guidance document on the honey bee (*Apis mellifera* L.) brood test under semi-field conditions, Series on Testing and Assessment, Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD, 2013: Test No. 237: Honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, single exposure. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD, 2016: No. 239: Guidance document on honeybee larval toxicity test following repeated exposure, Series on Testing and Assessment, Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD, 2017a: Test No. 245: Honey bee (*Apis mellifera* L.), chronic oral toxicity test (10-day feeding). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Organisation for Economic Co-operation and Development, DOI: 10.1787/9789264284081-en.
- OECD, 2017b: Test No. 246: Bumblebee, acute contact toxicity test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Organisation for Economic Co-operation and Development, DOI: 10.1787/9789264284104-en.
- OECD, 2017c: Test No. 247: Bumblebee, acute oral toxicity test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Organisation for Economic Co-operation and Development, DOI: 10.1787/9789264284128-en.
- OECD, 2019a: OECD Work Related to Bees/Pollinators. Zugriff: 28. Februar 2020, URL: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/pesticides-biocides/work-related-bees-pollinators.htm>.
- OECD, 2019b: Project 2.65: New TG on Acute Contact Toxicity Test for the solitary living Mason Bee (*Osmia* spp.).
- ORÉ BARRIOS, C., E. MAURER, C. LIPPERT, S. DABBERT, 2017: Eine ökonomische Analyse des Imkerei-Sektors in Deutschland.
- PADILHA, A.C., B. PIOVESAN, M.C. MORAIS, J. de BPAZINI, M.J. ZOTTI, M. BOTTON, A.D. GRÜTZMACHER, 2020: Toxicity of insecticides on Neotropical stingless bees *Plebeia emerina* (Friese) and *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Ecotoxicology* 29 (1), 119–128, DOI: 10.1007/s10646-019-02150-x.
- POTTS, S.G., J.C. BIESMEIJER, C. KREMEN, P. NEUMANN, O. SCHWEIGER, W.E. KUNIN, 2010: Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 25 (6), 345–353, DOI: 10.1016/j.tree.2010.01.007.
- PRYS-JONES, O., S. CORBET, 1991: Bumblebees. Slough, The Richmond Publishing.
- QUIROGA MURCIA, D.E., M.J. ZOTTI, I. ZENNER DE POLANIA, E.E. PECH-PECH, 2017: Toxicity evaluation of two insecticides on *Tetragonisca angustula* and *Scaptotrigona xanthotricha* (Hymenoptera: Apidae). *Agronomía Colombiana* 35 (3), 340–349, DOI: 10.15446/agron.colomb.v35n3.65447.
- REID, R.J., B.J. TROCZKA, L. KOR, E. RANDALL, M.S. WILLIAMSON, L.M. FIELD, R. NAUEN, C. BASS, T.E. DAVIES, 2020: Assessing the acute toxicity of insecticides to the buff-tailed bumblebee (*Bombus terrestris audax*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104562, DOI: 10.1016/j.pestbp.2020.104562.
- ROBINSON, A., H. HESKETH, E. LAHIVE, A.A. HORTON, C. SVENDSEN, A. RORTAIS, J.L. DORNE, J. BAAS, M.S. HEARD, D.J. SPURGEON, 2017: Comparing bee species responses to chemical mixtures: Common response patterns? *PLoS ONE* 12 (6), e0176289, DOI: 10.1371/journal.pone.0176289.
- ROESSINK, I., N. HANEWALD, C. SCHNEIDER, N. EXELER, A. SCHNURR, A.-M. MOLITOR, E. SOLER, S. KIMMEL, C. MOLITOR, G. SMAGGHE, S. VAN DER STEEN, 2018: 4.6 A method for a solitary bee (*Osmia* sp.) first tier acute contact and oral laboratory test: an update. In: *Hazards of Pesticides to Bees - 13th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group, October 18 – 20 2017, Valencia (Spain)*, Julius-Kühn-Archiv 462, S. 158.
- RORTAIS, A., G. ARNOLD, J.-L. DORNE, S.J. MORE, G. SPERANDIO, F. STREISSL, C. SZENTES, F. VERDONCK, 2017: Risk assessment of pesticides and other stressors in bees: Principles, data gaps and perspectives from the European Food Safety Authority. *Science of the Total Environment* 587-588, 524–537, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.127.
- ROUBIK, D.W. (Eds.), 2014: Pollinator safety in agriculture, Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- RUNDLÖF, M., G.K.S. ANDERSSON, R. BOMMARCO, I. FRIES, V. HEDERSTROM, L. HERBERTSSON, O. JONSSON, B.K. KLATT, T.R. PEDERSEN, J. YOURSTONE, H.G. SMITH, 2015: Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature* 521 (7550), 77–80, DOI: 10.1038/nature14420.
- RUNDLÖF, M., O. LUNDIN, 2019: Can costs of pesticide exposure for bumblebees be balanced by benefits from a mass-flowering crop? *Environmental Science & Technology* 53 (24), 14144–14151, DOI: 10.1021/acs.est.9b02789.
- SAKAGAMI, S.F., 1976: Specific differences in the bionomic characters of bumblebees. A comparative review. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University. Series 6, Zoology* 20 (3), 390–447.
- SAMUELSON, A.E., R.J. GILL, M.J.F. BROWN, E. LEADBEATER, 2018: Lower bumblebee colony reproductive success in agricultural compared with urban environments. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 285 (1881), 20180807, DOI: 10.1098/rspb.2018.0807.
- SÁNCHEZ-BAYO, F., K.A.G. WYCKHUYS, 2019: Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation* 232, 8–27, DOI: 10.1016/j.biocon.2019.01.020.
- SANDROCK, C., L.G. TANADINI, J.S. PETTIS, J.C. BLESSMEIJER, S.G. POTTS, P. NEUMANN, 2014: Sublethal neonicotinoid insecticide exposure reduces solitary bee reproductive success. *Agricultural and Forest Entomology* 16, 119–128, DOI: 10.1111/afe.12041.
- SEIBOLD, S., M.M. GOSSNER, N.K. SIMONS, N. BLÜTHGEN, J. MÜLLER, D. AMBARI, C. AMMER, J. BAUHUS, M. FISCHER, J.C. HABEL, K.E. LINSSENMAIR, T. NAUSS, C. PENONE, D. PRATI, P. SCHALL, E.-D. SCHULZE, J. VOGT, S. WÖLLAUER, W.W. WEISSER, 2019: Arthropod decline in grasslands and forests is associated with landscape-level drivers. *Nature* 574 (7780), 671–674, DOI: 10.1038/s41586-019-1684-3.
- SGOLA STRA, F., S. HINAREJOS, T.L. PITTS-SINGER, N.K. BOYLE, T. JOSEPH, J. LUCKMANN, N.E. RAINE, R. SINGH, N.M. WILLIAMS, J. BOSCH, 2019: Pesticide exposure assessment paradigm for solitary bees. *Environmental Entomology* 48 (1), 22–35, DOI: 10.1093/ee/nvy105.
- SGOLA STRA, F., P. MEDRZYCKI, L. BORTOLOTTI, M.T. RENZI, S. TOSI, G. BOGO, D. TEPPER, C. PORRINI, R. MOLOWNY-HORAS, J. BOSCH, 2017: Synergistic mortality between a neonicotinoid insecticide and an ergosterol-biosynthesis-inhibiting fungicide in three bee species. *Pest Management Science* 73 (6), 1236–1243, DOI: 10.1002/ps.4449.
- SGOLA STRA, F., S. TOSI, P. MEDRZYCKI, C. PORRINI, G. BURGIO, 2015: Toxicity of spirotetramat on solitary bee larvae, *Osmia cornuta* (Hymenoptera: Megachilidae), in laboratory conditions. *Journal of Apicultural Science* 59 (2), 73–83, DOI: 10.1515/JAS-2015-0024.
- SIMON-DELSON, N., G. SAN MARTIN, E. BRUNEAU, C. DELCOURT, L. HAUTIER, 2017: The challenges of predicting pesticide exposure of honey bees at landscape level. *Scientific Reports* 7 (1), 3801, DOI: 10.1038/s41598-017-03467-5.
- SIVITER, H., M.J.F. BROWN, E. LEADBEATER, 2018: Sulfoxaflor exposure reduces bumblebee reproductive success. *Nature*, DOI: 10.1038/s41586-018-0430-6.
- SLADEN, F.W.L., 1899: Bombi in captivity, and habits of Psithyrus. *Entomologist's Monthly Magazine* 35, 230–234.
- STELZER, R.J., L. CHITTKA, M. CARLTON, T.C. INGS, 2010: Winter active bumblebees (*Bombus terrestris*) achieve high foraging rates in urban Britain. *PLoS ONE* 5 (3), e9559, DOI: 10.1371/journal.pone.0009559.
- STONER, K.A., 2016: Current pesticide risk assessment protocols do not adequately address differences between honey bees (*Apis mellifera*) and bumble bees (*Bombus* spp.). *Frontiers in Environmental Science* 4, 813, DOI: 10.3389/fenvs.2016.00079.
- STRAUB, L., G.R. WILLIAMS, J. PETTIS, I. FRIES, P. NEUMANN, 2015: Super-organism resilience: eusociality and susceptibility of ecosystem service providing insects to stressors. *Current Opinion in Insect Science* 12, 109–112, DOI: 10.1016/j.cois.2015.10.010.
- THOMPSON, H., 2016: Extrapolation of acute toxicity across bee species. *Integrated Environmental Assessment and Management* 12 (4), 622–626, DOI: 10.1002/ieam.1737.
- THOMPSON, H.M., T. PAMMINGER, 2019: Are honeybees suitable surrogates for use in pesticide risk assessment for non-*Apis* bees? *Pest Management Science* 75 (10), 2549–2557, DOI: 10.1002/ps.5494.
- TROCZKA, B.J., R.A. HOMEM, R. REID, K. BEADLE, M. KOHLER, M. ZAWORRA, L.M. FIELD, M.S. WILLIAMSON, R. NAUEN, C. BASS, T.G.E.

- DAVIES, 2019: Identification and functional characterisation of a novel N-cyanoamidine neonicotinoid metabolising cytochrome P450, CYP9Q6, from the buff-tailed bumblebee *Bombus terrestris*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **111**, 103171, DOI: 10.1016/j.ibmb.2019.05.006.
- UHL, P., O. AWANBOR, R.S. SCHULZ, C.A. BRÜHL, 2019: Is *Osmia bicornis* an adequate regulatory surrogate? Comparing its acute contact sensitivity to *Apis mellifera*. *PLoS ONE* **14** (8), e0201081, DOI: 10.1371/journal.pone.0201081.
- UHL, P., C.A. BRÜHL, 2019: The impact of pesticides on flower-visiting insects: A review with regard to European risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **38** (11), 2355–2370, DOI: 10.1002/etc.4572.
- UHL, P., L.A. FRANKE, C. REHBERG, C. WOLLMANN, P. STAHLSCHEIDT, L. JEKER, C.A. BRÜHL, 2016: Interspecific sensitivity of bees towards dimethoate and implications for environmental risk assessment. *Scientific Reports* **6**, 34439, DOI: 10.1038/srep34439.
- VAN DER STEEN, J.J.M., 2001: Review of the methods to determine the hazard and toxicity of pesticides to bumblebees. *Apidologie* **32** (5), 399–406.
- VAN DER VALK, H., I. KOOMEN, R.C.F. NOCELLI, M. d. F. RIBEIRO, B.M. FREITAS, S.M. CARVALHO, J.M. KASINA, D.J. MARTINS, G. MAINA, P. NGARUIYA, M. GIKUNGU, M. MUTISO, C. ODHIAMBO, W. KINUTHIA, P. KIPYAB, T. BLACQUIÈRE, J. VAN DER STEEN, I. ROESSINK and J. WASSENBERG, B. GEMMILL-HERREN, 2013: Aspects determining the risk of pesticides to wild bees: Risk profiles for focal crops on three continents. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- VENTURINI, E.M., F.A. DRUMMOND, A.K. HOSHIDE, A.C. DIBBLE, L.B. STACK, 2017: Pollination reservoirs for wild bee habitat enhancement in cropping systems: A review. *Agroecology and Sustainable Food Systems* **41** (2), 101–142, DOI: 10.1080/21683565.2016.1258377.
- WAY, M.J., A.D. SYNGE, 1948: The effects of D.D.T. and of benzene hexachloride on bees. *Annals of Applied Biology* **35** (1), 94–109, DOI: 10.1111/j.1744-7348.1948.tb07353.x.
- WCISLO, W.T., J.H. CANE, 1996: Floral resource utilization by solitary bees (Hymenoptera: Apoidea) and exploitation of their stored foods by natural enemies. *Annual Review of Entomology* **41**, 257–286, DOI: 10.1146/annurev.en.41.010196.001353.
- WERNECKE, A., M. FROMMBERGER, R. FORSTER, J. PISTORIUS, 2019: Lethal effects of various tank mixtures including insecticides, fungicides and fertilizers on honey bees under laboratory, semi-field and field conditions. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* **14** (3), 239–249, DOI: 10.1007/s00003-019-01233-5.
- WESTRICH, P., 1989: Die Wildbienen Baden-Württembergs. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer.
- WESTRICH, P., 2018: Die Wildbienen Deutschlands. Stuttgart, Ulmer.
- WESTRICH, P., U. FROMMER, K. MANDERY, H. RIEMANN, H. RUHNKE, C. SAURE, J. VOITH, 2011: Rote Liste und Gesamtartenliste der Bienen (Hymenoptera, Apidae) Deutschlands. In: *Rote Liste gefährdeter Tiere, Pflanzen und Pilze Deutschlands: Band 3: Wirbellose Tiere (Teil 1)*. BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ (Eds), Bonn-Bad Godesberg, S. 373–416.
- WINSTON, M.L., 1995: The Biology of the Honey Bee. Cambridge, Harvard University Press.
- WOODCOCK, B.A., J.M. BULLOCK, R.F. SHORE, M.S. HEARD, M.G. PEREIRA, J. REDHEAD, L. RIDDING, H. DEAN, D. SLEEP, P. HENRYS, J. PEYTON, S. SAULMES, L. HULMES, M. SÁROSPATAKI, C. SAURE, M. EDWARDS, E. GENERSCH, S. KNÄBE, R.F. PYWELL, 2017: Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science* **356** (6345), 1393–1395, DOI: 10.1126/science.aaa1190.
- WU, J., J.-L. LI, W.-J. PENG, F.-L. HU, 2010: Sensitivities of three bumblebee species to four pesticides applied commonly in greenhouses in China. *Insect Science* **17** (1), 67–72, DOI: 10.1111/j.1744-7917.2009.01286.x.
- WU-SMART, J., M. SPIVAK, 2018: Effects of neonicotinoid imidacloprid exposure on bumble bee (Hymenoptera: Apidae) queen survival and nest initiation. *Environmental Entomology* **47** (1), 55–62, DOI: 10.1093/ee/nvx175.

© The Author(s) 2020.

 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).

© Der Autor/Die Autorin 2020.

 Dies ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt wird (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

André Krahnert, Henri Greil

Assessing the efficacy of bee promoting measures (Hymenoptera, Apiformes) along an urban-rural gradient

Beurteilung der Wirksamkeit von bienenfördernden Maßnahmen
(Hymenoptera, Apiformes) entlang eines Stadt-Land-Gradienten

173

Abstract

Cities are emerging as refugia for pollinators, among which bees play a pivotal role for maintaining ecosystem functioning in agricultural and urban settings. While measures to promote bees have been investigated predominantly in the agricultural or rural context, a wide knowledge gap persists with regard to the effectiveness of such measures within urban landscapes. In order to guide research addressing this lack of knowledge, the aim of this perspective paper is to give an overview of the recent research activities based on the published peer-reviewed literature. While research on flower seed mixtures in general focuses on nutritional aspects, studies on plantings of perennial herbs are relatively limited to few plant taxa. Implementation of comparable case studies investigating the effects of tree plantings on bee populations is hampered by a lack of methodological standardization. The conservation value of providing nesting sites in cities needs to be further investigated, in particular concerning ground-nesting bee species. While several case studies indicate a nutritional supporting function of green roofs for urban bee populations, findings with regard to vertical isolation remain equivocal. Various factors driving bee diversity and population structure in the urban context at the local and landscape scale have been identified, the reported relevant landscape scale being represented by radii between 500 and 1000 m in most cases. Future study designs reflecting a continuous and complete gradient of urbanization will be helpful in comparing results on bee promoting measures in agricultural

landscapes (which are numerous) to urban settings (which are still encountered much less frequently). Studies looking into the genetic structure of bee populations with regard to urbanization so far represent only a tiny fraction of bee diversity, and the further development of molecular methods could yield novel tools for assessing the success of bee promoting measures in terms of habitat connectivity in the near future.

Key words: bees, Hymenoptera, conservation, measure, urban, rural, gradient

Zusammenfassung

Die Bedeutung von Städten als Refugien für Bestäuberinsekten zeichnet sich zunehmend ab. Bienen spielen eine wichtige Rolle in der Stabilisierung von Ökosystemen, sowohl im ruralen als auch im urbanen Kontext. Während bienenfördernde Maßnahmen vor allem im landwirtschaftlichen bzw. ruralen Kontext untersucht wurden, besteht eine große Wissenslücke in Bezug auf die Effektivität solcher Maßnahmen in urbanen Landschaften. Ziel dieses Übersichtsartikels ist es, einen Überblick über jüngere Forschungsaktivitäten basierend auf der im Peer-Review-Verfahren publizierten Literatur zu geben, um Empfehlungen für zukünftige Forschungsprojekte zum Schließen dieser Wissenslücke abzuleiten. Während Studien zu Saatgutmischungen hauptsächlich auf Ernährungsaspekte abzielen, sind Studien zu Staudenpflanzungen auf vergleichsweise wenige Pflanzen-

Affiliation

Julius Kühn-Institut (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Bee Protection, Braunschweig, Germany

Correspondence

Dr. André Krahnert, Julius Kühn-Institut (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Bee Protection, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Germany, e-mail: andre.krahnert@julius-kuehn.de

Accepted

6 April 2020

taxa beschränkt. Die Durchführung vergleichbarer Studien zu Effekten von Baumpflanzungen auf Bienenpopulationen wird durch eine geringgradige Methodenstandardisierung erschwert. Der Naturschutzwert künstlicher Niststrukturen in Städten bedarf weiterer Erforschung, insbesondere im Hinblick auf bodennistende Bienenarten. Während mehrere Fallstudien auf eine Ernährungsfunktion von Gründächern für urbane Bienenpopulationen hindeuten, sind die Ergebnisse bezüglich der vertikalen Isolation von Gründächern nicht eindeutig. Zahlreiche Faktoren wurden identifiziert, die die Diversität und Populationsstruktur im urbanen Raum auf lokaler und Landschaftsebene beeinflussen. Der relevante Landschaftsmaßstab wird in den meisten Fällen durch Radien zwischen 500 und 1000 m repräsentiert. Zukünftige Studien, deren Versuchsaufbau einen kontinuierlichen und vollständigen Urbanisierungsgradienten berücksichtigt, werden von Nutzen sein, um die zahlreichen Ergebnisse zu bienenfördernden Maßnahmen in Agrarlandschaften mit den bislang wenigen Ergebnissen in urbanen Landschaften zu vergleichen. Studien, die die genetische Struktur von Bienenpopulationen im Hinblick auf Urbanisierung berücksichtigen, repräsentieren bislang nur einen sehr kleinen Ausschnitt der Bienenvielfalt. Die Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden könnte in naher Zukunft neuartige Werkzeuge zur Bewertung des Erfolgs bienenfördernder Maßnahmen im Hinblick auf die Habitatkonnektivität bereitstellen.

Stichwörter: Bienen, Hymenoptera, Schutzmaßnahmen, urban, rural, Gradient

Introduction

Cities emerge as refugia for pollinator diversity (TOMMASI et al., 2004; BALDOCK et al., 2015; SIROHI et al., 2015; HALL et al., 2017; SAMUELSON et al., 2018; but see CARDOSO und GONÇALVES, 2018, RAZO-LEÓN et al., 2018; COLLADO et al., 2019; FITCH et al., 2019b; HARRISON et al., 2019). Among pollinators, bees play a pivotal role and are therefore considered a keystone species group. Maintaining bee diversity is important for ecosystem functioning, not only in agricultural landscapes, but also in urban settings. Conservation of wild bee diversity in urbanized landscapes supports pollination services (MATTESON und LANGELLOTTO, 2009; LOWENSTEIN et al., 2015), which are positively related to urbanization at the landscape scale (THEODOROU et al., 2016). While measures to promote bees have been investigated predominantly in the agricultural or rural context, a wide knowledge gap persists with regard to the effectiveness of such measures within urban landscapes. This is likely to be a consequence of feasibility: better opportunities to replicate study sites within rural compared to urban landscapes (lower costs, larger pool of suitable sampling sites) have probably restricted experimental case studies to agricultural settings (e.g. BYRNE und DELBARCO-TRILLO, 2019), while case studies in cities or along an urbanization gradient have

been conducted as natural experiments lacking experimental habitat manipulation, e.g. using allotment/community gardens (MATTESON et al., 2008; AHRNÉ et al., 2009; VAIDYA et al., 2018), parks (McFREDERICK und LEBUHN, 2006; ZAJDEL et al., 2019), public green spaces and botanical gardens (BANASZAK-CIBICKA und ŽMIHORSKI, 2012; BANASZAK-CIBICKA et al., 2018a; BANASZAK-CIBICKA et al., 2018b), churchyards and cemeteries (BATES et al., 2011), urban agricultural sites (BENNETT und LOVELL, 2019), greenroofs (TONIETTO et al., 2011; HOFMANN und RENNER, 2018; FOURNIER et al., 2020), ornamental flowerbeds (GUNNARSSON und FEDERSEL, 2014), vacant lots and urban farms (SIVAKOFF et al., 2018), golf courses (THRELFALL et al., 2015) and wastelands (TWERD und BANASZAK-CIBICKA, 2019); but see BLACKMORE und GOULSON (2014), POTTER et al. (2019) and Fig. 1 for examples involving experimental manipulation. All types of vegetated urban habitat have a potential of improvement, in the sense of promoting bee populations and diversity, through adapted management or conversion. Bee promoting measures may benefit other pollinator and non-pollinator taxa and, depending on the measure, increase floral diversity within cities. While the social sciences and urban planning play an important role in assessing conservation measures, including bee promoting measures, within cities (e.g. VAN HEEZIK et al., 2012; BELLAMY et al., 2017; BURR et al., 2018; TURO und GARDINER, 2019), more ecological research is needed to guide urban planners in incorporating the needs of bees into their spatially explicit decision taking processes.

Bees need foraging and nesting habitats. They utilize ecological requisites by commuting between different partial habitats, which have to be situated within the commuting flight ranges (i.e. the distances of flights for nest-provisioning and not dispersal distances). Since landscape friction is an important factor underlying the accessibility of food resources for bees and wasps (JOHANSSON et al., 2018), connectivity between habitat patches has to be taken into account especially with regard to urban areas, where habitats tend to be highly fragmented. Habitat corridors can ameliorate potential negative effects of urban environments on pollinator communities (SENAPATHI et al., 2017). As cities gain importance as conservation areas for bee populations, the importance of connectivity between rural and urban populations increases for the maintenance of pollination services in agricultural crops. Acknowledging this agro-economic perspective, the creation of corridors between cities and the surrounding area has been put on the political agenda in Germany (BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ, BAU UND REAKTORSICHERHEIT, 2017).

The aim of this perspective paper is to give an overview of the recent research activities with regard to bee promoting measures in the urban context and to guide research on this topic in the near future towards successful study designs that help clarify so far unresolved issues. Focusing on temperate climates, we deliberately disregarded studies from the tropics.

Case study: Model project „Bee City of Braunschweig“

In 2018, the City of Braunschweig Department of Urban Greenery and Sports successfully applied for considerable funding regarding enhancement of urban biodiversity and climate mitigation from the German Federal Government and the German federal state of Lower Saxony. Together with funding from the city-owned resources, funding totals almost 6 million Euro.

A major part of this amount will be used for measures to promote the urban bee diversity. About 10 ha of species-rich meadows and 3.3 ha of perennial flower strips, species-rich mixed shrub plantings and extensive ruderal corridors will be created throughout the entire city. Moreover, 7000 m² of roof greening and 7500 m² of facade greening will be implemented. Six orchard meadows totalling 1.8 ha and 15 ha of short rotation plantations for biomass energy production will be created within city boundaries. 500 willow trees (*Salix* spp.) and 650 trees from other genera will be planted throughout the city.

The Institute for Bee Protection, Julius Kühn Institute, took the opportunity to utilize the comprehensive development of bee promoting measures by the city for addressing application-oriented research questions answering which is pivotal to guide successful implementation of such measures by urban planners. These questions regard, inter alia, the influence of local and landscape context on success of implemented measures and the exchange among bee populations along network corridors within the city as well as between the city and the surrounding agricultural landscapes. A further focus is set on adapted strategies targeting at the support of underrepresented bee taxa as well as ecological bee guilds dependent on specific habitat characteristics. After designing implementation measures according to the current state of knowledge, measures will be monitored over multiple years to evaluate their effectiveness for promoting urban bee populations and enhancing bee diversity. The findings are to be processed so that they can be transferred to other cities and municipalities.

An initial monitoring of the state and distribution of the bee diversity in the City of Braunschweig was started in 2019, covering more than 50 study sites spread over the entire city. Seeding of a standardized perennial seed mixture, developed by the Institute of Bee Protection primarily to suit the needs of bees (Table 1), and planting of bee-attractive herbs are planned to take place in 2020. The Institut für Bee Protection is continuously partnering up with various stakeholders in the region and at the national level in order to increase the pool of study sites, including areas in the agricultural landscapes surrounding the city, and to support the exchange of relevant information.

Fallbeispiel: Forschungsmodellprojekt „Bienenstadt Braunschweig“

Im Jahr 2018 bewarb sich das Amt für Stadtgrün und Sport der Stadt Braunschweig erfolgreich um beträchtliche Fördermittel des Bundes und des Landes Niedersachsen für die Erhöhung der städtischen Biodiversität und den Klimaschutz. Zusammen mit den Eigenmitteln der Stadt beläuft sich die Förderung auf fast 6 Millionen Euro.

Ein Großteil dieses Betrags wird für Maßnahmen zur Förderung der städtischen Bienenvielfalt verwendet. In der gesamten Stadt werden etwa 10 ha artenreiche Wiesen und 3,3 ha mehrjährige Blühflächen, artenreiche Staudenmischpflanzungen und ausgedehnte Ruderalkorridore angelegt. Darüber hinaus werden 7000 m² Dachbegrünung und 7500 m² Fassadenbegrünung realisiert. Innerhalb der Stadtgrenzen werden sechs Streuobstwiesen von insgesamt 1,8 ha und 15 ha Kurzumtriebsplantagen zur Energiegewinnung aus Biomasse angelegt. In der ganzen Stadt werden 500 Kopfweiden (*Salix* spp.) und 650 Bäume anderer Gattungen gepflanzt.

Das Institut für Bienenschutz, Julius Kühn-Institut, ergriff die Gelegenheit, umfassende bienenfördernde Maßnahmen in der Stadt für die Beantwortung anwendungsorientierter Forschungsfragen zu entwickeln, die für die erfolgreiche Umsetzung solcher Maßnahmen durch Stadtplaner von zentraler Bedeutung sind.

Diese Fragen betreffen u.a. den Einfluss des lokalen und landschaftlichen Kontextes auf den Erfolg der umgesetzten Maßnahmen und den Austausch zwischen den Bienenpopulationen entlang der Vernetzungskorridore innerhalb der Stadt sowie zwischen der Stadt und den umliegenden Agrarlandschaften. Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf angepassten Strategien zur Förderung unterrepräsentierter Bientaxa sowie Bienengilden in Abhängigkeit von spezifischen Habitateigenschaften. Im Anschluss an die Konzeption von Umsetzungsmaßnahmen nach dem aktuellen Wissensstand werden die Maßnahmen über mehrere Jahre hinweg überwacht, um ihre Wirksamkeit zur Förderung städtischer Bienenpopulationen und zur Verbesserung der Bienenvielfalt zu bewerten. Die Erkenntnisse sollen so aufbereitet werden, dass sie auf andere Städte und Gemeinden übertragen werden können.

Ein erstes Monitoring des Zustands und der Verteilung der Bienenvielfalt in der Stadt Braunschweig wurde 2019 begonnen, welches mehr als 50 über die gesamte Stadt verteilte Untersuchungsstandorte umfasst. Die Aussaat einer standardisierten mehrjährigen Samenmischung, die vom Institut für Bienenschutz vor allem im Hinblick auf die Bedürfnisse der Bienen entwickelt wurde (Tabelle 1), und die Pflanzung von bienenfreundlichen Stauden sind für 2020 geplant. Das Institut für Bienenschutz sucht fortlaufend die Vernetzung mit weiteren Akteuren in der Region und auf nationaler Ebene, um den Umfang der Untersuchungsflächen, auch in den Agrarlandschaften der Umgebung der Stadt, zu erhöhen und den Austausch relevanter Informationen zu unterstützen.

Fig. 1. The Model project „Bee City of Braunschweig“, a case study involving bee promoting measures along an urban-rural gradient

Bee promoting measures

In addition to the presented bee promoting measures, adapted management of urban green spaces can develop resource poor areas into bee friendly habitats. Simple measures such as mowing less frequently increases the diversity and abundance of bees foraging in suburban lawns (LERMAN et al., 2018).

Flower seed mixtures

Creating foraging habitats for bees by seeding flower mixtures has been demonstrated as an effective way to promote wild bee populations in the agricultural landscape (e.g. HEARD et al., 2007; HAALAND et al., 2011; BLAAUW und ISAACS, 2014; FELTHAM et al., 2015; JÖNSSON et al., 2015; SCHEPER et al., 2015; WILLIAMS et al., 2015; BALZAN et al., 2016). Very often, effectiveness of a seed mixture is assessed from a purely botanical perspective, i.e. in terms of species richness and abundance of flowering species without taking effects on bee populations into consideration (e.g. LANE et al., 2019).

The vast number of seed mixtures is probably one reason for the high number of studies on this topic (at least in the agricultural context). In general, plant selection focuses on nutritional aspects (nectar and pollen supply; Table 1). Nectar and pollen quantity of plant species used in commercial seed mixtures varies widely, the tested perennial mixture producing more nectar and pollen than the tested annual mixture (HICKS et al., 2016). POTTER et al. (2019) used DNA-metabarcoding of pollen sampled by wild bees to assess the extent to which bees forage in wildflower strips sown in an urban environment and to identify key plant species for bee foraging. In an agricultural setting, WARZECHA et al. (2018) identified a fraction of plant species contained within four seed mixtures as key species crucial for the flower visiting bee community. Perennial seed mixtures are to be preferred over annual mixtures, in order to allow for a build up of bee populations over multiple years (but see CARVELL et al., 2006; RUNDLÖF et al., 2018). With regard to collection of leaf material used for nest construction, relevant bee species tend to prefer certain plant species over others (MACIVOR, 2016b). However, compared to floral food resources, this aspect has so far received little attention in the development of seed mixtures and other bee promoting measures. The same is true for potential provision of above-ground nesting sites, in case the vegetation is (at least in part) not manipulated (e.g. mowed) over two winter periods (Fig. 2).

Plantings of perennial herbs

Plantings of perennial herbs are a bee-promoting measure much less studied compared to flower seed mixtures, probably due to the much higher costs involved in the former. Economical feasibility might be a reason why plantings of herbs are rarely encountered in the agricultural context, where the limited half life of set-aside patches potentially reduces the financial investments. On the opposite, green spaces in cities are much more per-

sistent over time, and the exposure in public spaces probably justifies higher financial investments in such plantings, which citizens generally regard as environmental enrichment. Moreover, unlike seed mixtures, planters can be used for floral enrichment in areas with a high coverage of impermeable substrate. Compared to seed mixtures, plantings allow for a more flexible and target-oriented design of vegetation structure and configuration, thus enabling plant designers to better incorporate aesthetic needs and functional aspects within the urban context into the development of the urban green infrastructure. Studies delivering taxonomically detailed data on flower visitation of plant taxa suitable for planting focus on certain taxa, such as *Geranium* spp. (MASIEROWSKA et al., 2018) and *Lobularia maritima* (SIMAO et al., 2018), or aim at potential differences between native and exotic plant species (e.g. MATTESON und LANGELOTTO, 2011; SALISBURY et al., 2015). Even small patches with planted herbs can have a positive effect on bee communities in a city (SIMAO et al., 2018).

Tree plantings

Research on tree species and cultivars suitable for bee foraging is pivotal for urban bee conservation, since city planners, facing increasing problems of draught stress in city trees, and shifting towards novel tree taxa, lack solid data necessary to take bee foraging into account in their decisions. Few studies have investigated the effect of floral resources in trees on bee populations. While floral resources close to the ground (i.e. flower seed mixtures and plantings of herbs) are easily accessible and can be studied using long-established methods, floral resources in trees are much more difficult to access and the respective methodology is much less standardised. Classical approaches such as transect walks and observation plots are not applicable, and various trap types such as pan traps and flight interception traps need further methodological development in order to yield results that are comparable over multiple studies.

Depending on the species, trees and other flowering woody plants can be used for augmenting floral resources for bees in urban and suburban landscapes (MACH und POTTER, 2018). HAUSMANN et al. (2016) found 19% of the Berlin bee fauna foraging on city trees, with higher visitation rates to tree flowers by wild bees in surroundings with a higher proportion of green spaces. For common city-dwelling bees species, trees can be an important pollen source (MACIVOR et al., 2014). SOMME et al. (2016) investigated the suitability of widespread urban trees as resources for pollinating insects by analyzing the amount of nectar production as well as the chemical composition of nectar and pollen. In addition to floral resources, honeydew might be an alternative nutritional resource for wild bees offered by trees, at least for bumblebees (CAMERON et al., 2019). Willows are an important nutritional resource for bees early in the year. In this dioecious species, male trees support a greater abundance of bees, and species assemblages differ among willow pedigrees (TUMMINELLO et al., 2018).

Table 1. The seed mixture used in the project “Bee City of Braunschweig” (Fig. 1). The mixture consists of 47 annual and perennial plants. The table shows the total number of bee species (excluding *Apis mellifera* and *Bombus* spp.) collecting pollen from these plant taxa, as well as the number of oligolectic (collecting pollen from one or a few plant families) and narrow oligolectic bee species (collecting pollen from one or a few plant genera) collecting pollen from these plant species (data obtained from WESTRICH, 2018). Based on these data, more than 200 species could benefit from the plants included in the mixture.

Species	Family	Total number of bee species	Number of narrow oligolectic bee species	Number of oligolectic bee species
<i>Achillea millefolium</i>	Asteraceae	28	–	7
<i>Anthemis arvensis</i>	Asteraceae	6	–	4
<i>Anthemis tinctoria</i>	Asteraceae	7	–	6
<i>Anthriscus sylvestris</i>	Apiaceae	25	–	2
<i>Ballota nigra</i>	Lamiaceae	7	–	2
<i>Barbarea vulgaris</i>	Brassicaceae	13	–	5
<i>Betonica officinalis</i>	Lamiaceae	5	–	3
<i>Campanula rotundifolia</i>	Campanulaceae	28	10	–
<i>Campanula trachelium</i>	Campanulaceae	17	8	–
<i>Cardamine pratensis</i>	Brassicaceae	19	–	2
<i>Centaurea cyanus</i>	Asteraceae	8	–	–
<i>Centaurea jacea</i>	Asteraceae	39	–	7
<i>Centaurea scabiosa</i>	Asteraceae	31	–	7
<i>Cichorium intybus</i>	Asteraceae	38	–	10
<i>Crepis biennis</i>	Asteraceae	20	–	7
<i>Daucus carota</i>	Apiaceae	25	–	4
<i>Echium vulgare</i>	Boraginaceae	38	3	–
<i>Heracleum sphondylium</i>	Apiaceae	31	–	3
<i>Hippocrepis comosa</i>	Fabaceae	16	–	2
<i>Hypericum perforatum</i>	Clusiaceae	16	–	–
<i>Hypochaeris radicata</i>	Asteraceae	33	–	11
<i>Isatis tinctoria</i>	Brassicaceae	18	–	1
<i>Knautia arvensis</i>	Dipsacaceae	13	–	3
<i>Lathyrus pratensis</i>	Fabaceae	10	1	4
<i>Leontodon autumnalis</i>	Asteraceae	29	–	9
<i>Leucanthemum vulgare</i>	Asteraceae	22	–	2
<i>Matricaria recutita</i>	Asteraceae	5	–	1
<i>Medicago lupulina</i>	Fabaceae	1	–	–
<i>Melilotus albus</i>	Fabaceae	23	–	6
<i>Papaver rhoeas</i>	Papaveraceae	10	–	–
<i>Picris hieracioides</i>	Asteraceae	40	–	14
<i>Plantago media</i>	Plantaginaceae	7	–	–
<i>Ranunculus acris</i>	Ranunculaceae	43	1	–
<i>Ranunculus bulbosus</i>	Ranunculaceae	20	1	–
<i>Reseda lutea</i>	Resedaceae	10	1	–
<i>Reseda luteola</i>	Resedaceae	4	1	–
<i>Salvia pratensis</i>	Lamiaceae	20	–	–
<i>Scabiosa columbaria</i>	Dipsacaceae	7	–	3
<i>Sinapis arvensis</i>	Brassicaceae	66	–	6
<i>Stachys sylvatica</i>	Lamiaceae	4	–	1
<i>Tanacetum vulgare</i>	Asteraceae	21	–	7
<i>Teucrium scorodonia</i>	Lamiaceae	5	–	–
<i>Trifolium medium</i>	Fabaceae	3	–	2
<i>Trifolium pratense</i>	Fabaceae	28	–	7
<i>Verbascum lychnitis</i>	Scrophulariaceae	2	–	–
<i>Verbascum nigrum</i>	Scrophulariaceae	1	–	–



Fig. 2. Fall aspect of an uncut wildflower strip in Friedland (Lower Saxony, Germany). Vegetation remaining uncut over two winter periods can provide above-ground nesting opportunities for wild bees suitable for reproduction (Photo: André Krahner).

Nesting sites

In addition to nutritional resources, nesting sites (Fig. 3) have to be taken into consideration in urban bee conservation (FORTEL et al., 2016). In cities, bee composition can be biased toward cavity-nesting species, while soil-nesting species may occur less frequently due to soil limitation and/or disturbance (MATTESON et al., 2008). A number of case studies indicate a trend toward fewer ground-nesting bee species in urban habitats (HERNANDEZ et al., 2009). This may be due to extensive sealing of the soil within cities. For cavity-nesting species, an urban matrix can provide better nesting opportunities compared to the surrounding countryside in some situations (CANE et al., 2006). EVERAARS et al. (2011) observed effects of microsite conditions on the occurrence of

Osmia bicornis in an urban context. Distribution and density of suitable nesting sites play an important role in enhancing bee populations and connectivity among them in urban settings (LÓPEZ-URIBE et al., 2015). So-called ‘bee hotels’ (i.e. artificial nesting structures for above-ground nesting species) are successfully applied in the fields of environmental education and public outreach. However, their potential as measures for conserving bee species remains to be further elucidated (MACIVOR and PACKER, 2015).

Green roofs

Green roofs represent a special case of herb plantings and/or seeding in the city, since the plant species pool for this purpose is very limited. Nevertheless, city dwelling



Fig. 3. Urban nesting habitat for ground-nesting bees. Nesting habitat on urban green in Braunschweig (Lower Saxony, Germany; left), with an aggregation of *Andrena vaga* (right, female with *Salix* pollen load) in spring (Photos: André Krahner).

bees use green roofs as forage habitats, e.g. for collection of *Sedum* pollen (MACIVOR et al., 2015), and probably also as nesting sites, to some extent. Due to the microclimate on flat-topped buildings, thermophilic species are probably overrepresented in these habitats, while limited plant species numbers are likely to result in underrepresentation of pollen specialist bees on green roofs (HOFMANN und RENNER, 2018). At the local scale, plant and bee community composition of green roofs are correlated (TONIETTO et al., 2011). Findings with regard to potential vertical isolation, especially for small bee species, remain equivocal (HOFMANN und RENNER, 2018). KRATSCHEMER et al. (2018) observed higher wild bee diversity and abundance on green roofs with fine substrates and increasing forage availability, and conclude that areas with fine and deeper substrates would benefit eusocial and ground nesting bees. Proportion of green space in the surrounding area is positively correlated with overall bee abundance and species richness (TONIETTO et al., 2011) and species richness of cavity nesting bees and wasps (MACIVOR, 2016a), emphasizing the importance of connectivity between green roofs and the surrounding habitat.

Local and landscape factors driving bee diversity and population structure

Urban pollinator communities are influenced by both local and landscape-level factors (BALDOCK, 2020). Local factors such as flower density, number of plant species (BATES et al., 2011; FISCHER et al., 2016) and sun exposure (EVERAARS et al., 2011) can be driving the distribution of bee species. In cities, floral diversity locally increases bee species richness (HENNIG und GHAZOU, 2012; HAMBLIN et al., 2018). Increasing local temperatures reduce bee abundance in cities (HAMBLIN et al., 2018), although higher average temperatures within cities may provide better microclimatic conditions for the mostly thermo- and

xerophilic wild bee species compared to the surrounding rural landscape (Fig. 4). Local land use is an important factor driving bee species richness and abundance (but see DYLEWSKI et al., 2019), and higher bee species richness and abundance was observed on sites with a higher proportion of permeable substrate at the local scale along an urban-rural gradient (CHOATE et al., 2018). The importance of local factors is, however, likely to differ between bee species, depending on the commuting flight ranges and other life history traits. For example, FOSTER et al. (2017) did not find an effect of local land use on bumblebee species richness, and only marginal effects of land use on bumblebee abundance.

In addition to local factors, bee populations are influenced by landscape factors such as habitat configuration and connectivity, since bees generally use different partial habitats within the landscape. Therefore, mapping of land use within a study area on the landscape scale can help explain the distribution pattern of bee populations, in addition to local factors such as on-site floral richness and nesting opportunities. While classical mapping of landscape features on the ground is time consuming and resource intensive, landscape classification based on remote-sensing data is a feasible option to take landscape effects into consideration. These data are available for rural and urban landscapes at the same resolution, and can be further refined by additional data, e.g. higher-resolution data gathered for administrative purposes. SAMUELSON und LEADBEATER (2018) propose a landscape classification protocol targeted at ecological research on pollinators, providing a case study along an urban-rural gradient.

The EU CORINE Land Cover inventory (EUROPEAN UNION, COPERNICUS LAND MONITORING SERVICE, 2020a) offers a uniform classification of the most important types of ground cover. Some of these types are relevant for the distribution of bee populations, such as natural grasslands, forests, urban green spaces and surface water bodies. It is also possible to calculate the proportion of



Fig. 4. Xerotherm urban habitat. Sun exposed nesting habitat in Berlin-Dahlem (Germany; left), with multiple nest entrances of a halictid bee species (right) in spring (Photos: André Krahnert).

impervious substrate in a landscape from land use classification (FORTEL et al., 2014). More directly, the proportion of impervious substrate can be used as a proxy for urbanization. Following this approach, FITCH et al. (2019a) linked changes in the observed sex ratio in bee communities to urbanization, and SCHOCHET et al. (2016) found species specific effects of urbanization on the occurrence of different bumblebee species. Data on coverage of impervious substrate (Fig. 5) are readily available from the EU Copernicus program (EUROPEAN UNION, COPERNICUS LAND MONITORING SERVICE, 2020b).

In heterogeneous urban landscapes, land use exerts direct and indirect effects on floral resources and the flower-visiting insect fauna dominated by bees (MATTESON et al., 2013). Based on previous studies in urban settings, the most relevant landscape scale for bees is a radius of about 500–1000 m (but see PARDEE und PHILPOTT, 2014). FORTEL et al. (2014) found a significant effect of impervious substrate on bee abundance and species richness at radii of 500 and 1000 m, but not at a radius of 2000 m. A 500 m radius has been chosen as the relevant landscape scale for the analysis of plant-pollinator networks (GESLIN et al., 2013), effects of wildflower plantings on bee species richness and abundance in different agricultural landscapes (BATARY et al., 2010; GRASS et al., 2016), and the bee fauna visiting flowering lawn weeds along an urban-rural gradient (LARSON et al., 2014). Significantly negative effects of percent agricultural cover in the surrounding landscape on bee species richness and phylogenetic diversity were observed at a 750 m radius (GRAB et al., 2019). In an urban landscape, LOWENSTEIN et al. (2014) identified the smallest tested radius of 100 m as

the relevant scale with regard to the influence of land cover and sociometric variables, such as solar radiation, impervious substrate, tree canopy cover and population density, on bee abundance, species richness and community composition. However, in this study system there was a high degree of similarity in correlations between response and predictor variables over the analyzed radii from 100–1500 m (LOWENSTEIN et al., 2014), rendering it impossible to identify the most relevant landscape scale from these results. Correlations between bee genus richness and landscape diversity peaked a radius of 1000 m (THEODOROU et al., 2017).

The molecular tools to analyse genetic exchange within population such as microsatellites are under ongoing development (e.g. MOHRA et al., 2000; NEUMANN und SEIDELMANN, 2006; ČERNÁ und STRAKA, 2012). Population structure has been investigated in several bee species (DARVILL et al., 2006; EXELER et al., 2008; ČERNÁ et al., 2013), also in an urban context (LÓPEZ-URIBE et al., 2015). Using genome-wide SNPs, THEODOROU et al. (2018) found little evidence of population structure in *Bombus lapidarius* associated with urbanization.

Differing sensitivity to microclimatic characteristics of urban habitats (BURDINE und MCCLUNEY, 2019) and land use change (CARIVEAU und WINFREE, 2015) might change the suitability for particular bee species to persist in the cities in the longer term. The evolutionary adaptations of bees to the urban environment have been studied with regard to wing morphology (BEASLEY et al., 2019), while MACIVOR und MOORE (2013) found indications for ecologically adaptive traits with regard to the use of plastics for nest construction in an urban environment.

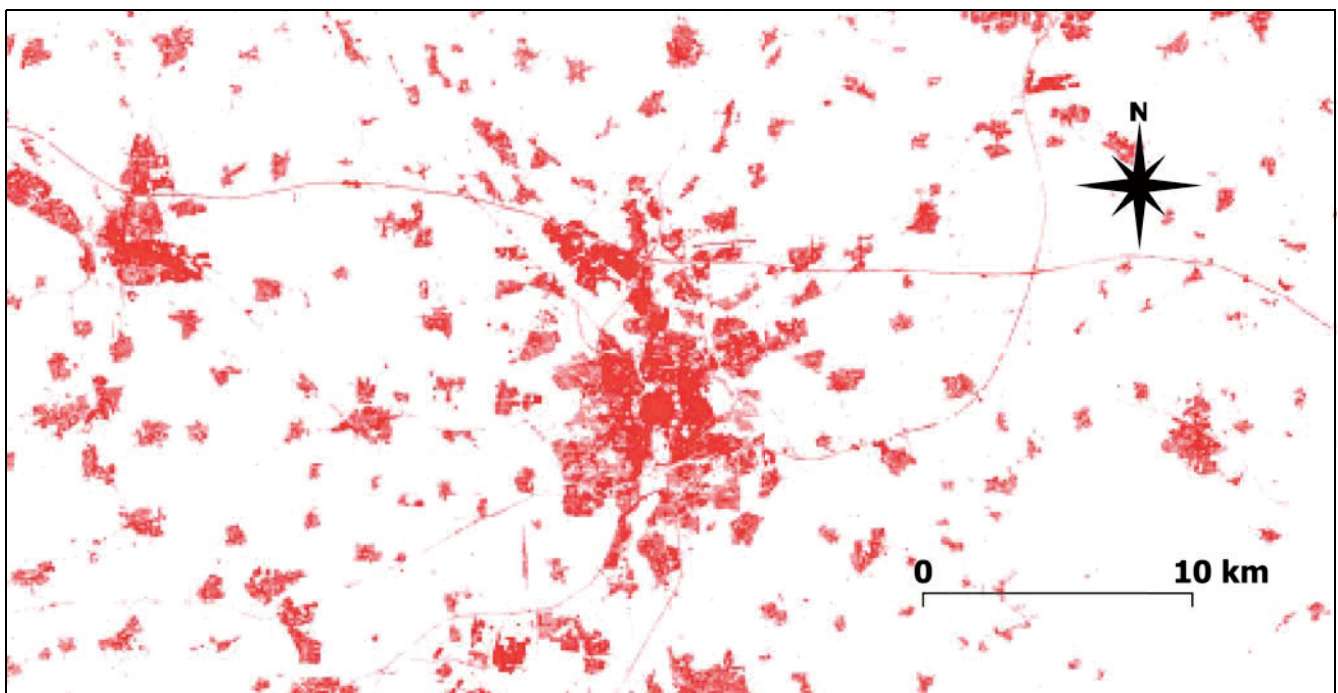


Fig. 5. Coverage of impervious substrate in Braunschweig and surroundings (Lower Saxony, Germany). Increasing coverage of impervious substrate is represented by increasing red colour. Data were obtained from the EU Copernicus program (EUROPEAN UNION, COPERNICUS LAND MONITORING SERVICE, 2020b).

A citizen scientist approach has been suggested as a plausible option for bee monitoring at morphospecies level, depending on volunteer training and engagement (MASON und ARATHI, 2019). However, because bee species identification at species level is notoriously difficult and requires professional training, detailed information on the development of bee populations can only be gathered through a professional long-term monitoring program.

Guidance on near-future research

From the overview of recently published studies, several aspects are suggested that could guide research on bee promoting measures in urban settings towards study designs capable of resolving so far unresolved issues.

First of all, it is suggested that study designs are used which best represent a continuous degree of urbanization along a gradient which stretches from highly urbanized landscapes to landscapes dominated by intensive agriculture. Such studies will be very helpful in comparing results on bee promoting measures in agricultural landscapes (which are rather numerous) to urban settings (which are still encountered much less frequently). In this way, some lessons learned within the agricultural context can potentially be transferred to urban settings, and research on urban bee conservation can focus on the remaining open questions. Studies should stretch over multiple years, allow an estimation of activity density in the sampled habitats, and should incorporate before-after as well as with-without impact design, in order to compensate for annual fluctuations in population size and thus to estimate the impact of a measure on population development.

The relevant landscape scale should be identified for each study system and with regard to the research question, since the available studies indicate some (although relatively small) variation in the relevant scale. Modern GIS and publicly available data based on remote sensing allow an easy incorporation of landscape scale factors into ecological modelling. Methodological standardization needs to be tackled with regard to use of floral resources in trees by bees. Case studies on genetic structure of bee populations with regard to urbanization are still relatively scarce and represent only a tiny fraction of phylogenetic and functional bee diversity. Development of the relevant molecular methods has progressed over the past years, and the results from studies on genetic population structuring are promising with regard to future adaptations of molecular tools for documenting the success of bee promoting measures in terms of habitat connectivity.

Conflicts of interest

The authors declare that they do not have any conflicts of interest.

References


- AHRNÉ, K., J. BENGTTSSON, T. ELMQVIST, 2009: Bumble Bees (*Bombus* spp) along a Gradient of Increasing Urbanization. *Plos One* 4 (5), e5574, DOI: 10.1371/journal.pone.0005574.
- BALDOCK, K.C.R., 2020: Opportunities and threats for pollinator conservation in global towns and cities. *Current Opinion in Insect Science*, DOI: 10.1016/j.cois.2020.01.006.
- BALDOCK, K.C.R., M.A. GODDARD, D.M. HICKS, W.E. KUNIN, N. MITSCHUNAS, L.M. OSGATHORPE, S.G. POTTS, K.M. ROBERTSON, A.V. SCOTT, G.N. STONE, I.P. VAUGHAN, J. MEMMOTT, 2015: Where is the UK's pollinator biodiversity? The importance of urban areas for flower-visiting insects. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 282 (1803), 20142849, DOI: 10.1098/rspb.2014.2849.
- BALZAN, M.V., G. BOCCI, A.-C. MOONEN, 2016: Utilisation of plant functional diversity in wildflower strips for the delivery of multiple agroecosystem services. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 158 (3), 304–319, DOI: 10.1111/eea.12403.
- BANASZAK-CIBICKA, W., M. FLISZKIEWICZ, A. LANGOWSKA, M. ŻMIHORSKI, 2018a: Body size and wing asymmetry in bees along an urbanization gradient. *Apidologie* 49 (3), 297–306, DOI: 10.1007/s13592-017-0554-y.
- BANASZAK-CIBICKA, W., L. TWERD, M. FLISZKIEWICZ, K. GIEJASZ, A. LANGOWSKA, 2018b: City parks vs. natural areas - is it possible to preserve a natural level of bee richness and abundance in a city park? *Urban Ecosystems* 21 (4), 599–613, DOI: 10.1007/s11252-018-0756-8.
- BANASZAK-CIBICKA, W., M. ŻMIHORSKI, 2012: Wild bees along an urban gradient: winners and losers. *Journal of Insect Conservation* 16 (3), 331–343, DOI: 10.1007/s10841-011-9419-2.
- BATARY, P., A. BALDI, M. SAROSPATAKI, F. KOHLER, J. VERHULST, E. KNOP, F. HERZOG, D. KLEUN, 2010: Effect of conservation management on bees and insect-pollinated grassland plant communities in three European countries. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 136, 35–39, DOI: 10.1016/j.agee.2009.11.004.
- BATES, A.J., J.P. SADLER, A.J. FAIRBRASS, S.J. FALK, J.D. HALE, T.J. MATTHEWS, 2011: Changing bee and hoverfly pollinator assemblages along an urban-rural gradient. *PLoS ONE* 6 (8), e23459, DOI: 10.1371/journal.pone.0023459.
- BEASLEY, D.E., J.L. FITZGERALD, A. FOWLER, K. KELEHER, M.M. LÓPEZ-URIBE, R.R. DUNN, 2019: Do Bee Wings Adapt for Flight in Urban Environments? *Southeastern Naturalist* 18 (2), 183, DOI: 10.1656/058.018.0210.
- BELLAMY, C.C., A.P.N. VAN DER JAGT, S. BARBOUR, M. SMITH, D. MOSELEY, 2017: A spatial framework for targeting urban planning for pollinators and people with local stakeholders: A route to healthy, blossoming communities? *Environmental Research* 158, 255–268, DOI: 10.1016/j.envres.2017.06.023.
- BENNETT, A.B., S. LOVELL, 2019: Landscape and local site variables differentially influence pollinators and pollination services in urban agricultural sites. *PLoS ONE* 14 (2), e0212034, DOI: 10.1371/journal.pone.0212034.
- BLAAUW, B.R., R. ISAACS, 2014: Flower plantings increase wild bee abundance and the pollination services provided to a pollination-dependent crop. *Journal of Applied Ecology* 51 (4), 890–898, DOI: 10.1111/1365-2664.12257.
- BLACKMORE, L.M., D. GOULSON, 2014: Evaluating the effectiveness of wildflower seed mixes for boosting floral diversity and bumblebee and hoverfly abundance in urban areas. *Insect Conservation and Diversity* 7 (5), 480–484, DOI: 10.1111/icad.12071.
- BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ, BAU UND REAKTORSICHERHEIT, 2017: Weißbuch Stadtgrün: Grün in der Stadt – Für eine lebenswerte Zukunft. Berlin.
- BURDINE, J.D., K.E. MCCLUNEY, 2019: Differential sensitivity of bees to urbanization-driven changes in body temperature and water content. *Scientific Reports* 9 (1), 1643, DOI: 10.1038/s41598-018-38338-0.
- BURR, A., D.M. HALL, N. SCHAEF, 2018: The perfect lawn: exploring neighborhood socio-cultural drivers for insect pollinator habitat. *Urban Ecosystems* 21 (6), 1123–1137, DOI: 10.1007/s11252-018-0798-y.
- BYRNE, F., J. DELBARCO-TRILLO, 2019: The effect of management practices on bumblebee densities in hedgerow and grassland habitats. *Basic and Applied Ecology* 35, 28–33, DOI: 10.1016/j.baee.2018.11.004.
- CAMERON, S.A., S.A. CORBET, J.B. WHITFIELD, 2019: Bumble bees (*Hymenoptera: Apidae: Bombus terrestris*) collecting honeydew from the giant willow aphid (*Hemiptera: Aphididae*). *Journal of Hymenoptera Research* 68 (4), 75–83, DOI: 10.3897/jhr.68.30495.
- CANE, J.H., R.L. MINCKLEY, L.J. KERVIN, T.H. ROULSTON, N.M. WILLIAMS, 2006: Complex Responses Within A Desert Bee Guild (*Hymenop-*

- tera: Apiformes) To Urban Habitat Fragmentation. *Ecological Applications* **16** (2), 632–644, DOI: 10.1890/1051-0761(2006)016[0632:CRWADB]2.0.CO;2.
- CARDOSO, M.C., R.B. GONÇALVES, 2018: Reduction by half: the impact on bees of 34 years of urbanization. *Urban Ecosystems* **21** (5), 943–949, DOI: 10.1007/s11252-018-0773-7.
- CARIVEAU, D.P., R. WINFREE, 2015: Causes of variation in wild bee responses to anthropogenic drivers. *Current Opinion in Insect Science* **10**, 104–109, DOI: 10.1016/j.cois.2015.05.004.
- CARVELL, C., P. WESTRICH, W.R. MEEK, R.F. PYWELL, M. NOWAKOWSKI, 2006: Assessing the value of annual and perennial forage mixtures for bumblebees by direct observation and pollen analysis. *Apidologie* **37** (3), 326–340, DOI: 10.1051/apido:2006002.
- ČERNÁ, K., J. STRAKA, 2012: Identification of 37 microsatellite loci for *Anthophora plumipes* (Hymenoptera: Apidae) using next generation sequencing and their utility in related species. *European Journal of Entomology* **109** (2), 155–160, DOI: 10.14411/eje.2012.020.
- ČERNÁ, K., J. STRAKA, P. MUNCLINGER, 2013: Population structure of pioneer specialist solitary bee *Andrena vaga* (Hymenoptera: Andrenidae) in central Europe: the effect of habitat fragmentation or evolutionary history? *Conservation Genetics* **14** (4), 875–883, DOI: 10.1007/s10592-013-0482-y.
- CHOATE, B.A., P.L. HICKMAN, E.A. MORETTI, 2018: Wild bee species abundance and richness across an urban–rural gradient. *Journal of Insect Conservation* **22** (3-4), 391–403, DOI: 10.1007/s10841-018-0068-6.
- COLLADO, M.A., D. SOL, I. BARTOMEUS, 2019: Bees use anthropogenic habitats despite strong natural habitat preferences. *Diversity and Distributions* **25** (6), 924–935, DOI: 10.1111/ddi.12899.
- DARVILL, B., J.S. ELLIS, G.C. LYE, D. GOULSON, 2006: Population structure and inbreeding in a rare and declining bumblebee, *Bombus muscorum* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology* **15** (3), 601–611, DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.02797.x.
- DYLEWSKI, Ł., Ł. MAĆKOWIAK, W. BANASZAK-CIBICKA, 2019: Are all urban green spaces a favourable habitat for pollinator communities? Bees, butterflies and hoverflies in different urban green areas. *Ecological Entomology* **22**, 335, DOI: 10.1111/een.12744.
- EUROPEAN UNION, COPERNICUS LAND MONITORING SERVICE, 2020a: CORINE Land Cover. Access: 4th March 2020, URL: <https://land.copernicus.eu/pan-european/corine-land-cover>.
- EUROPEAN UNION, COPERNICUS LAND MONITORING SERVICE, 2020b: Imperviousness Density 2015 – Copernicus Land Monitoring Service. Access: 3rd March 2020, URL: <https://land.copernicus.eu/pan-european/high-resolution-layers/imperviousness/status-maps/2015?tab=metadata>.
- EVERAARS, J., M.W. STROHBACH, B. GRUBER, C.F. DORMANN, 2011: Microsite conditions dominate habitat selection of the red mason bee (*Osmia bicornis*, Hymenoptera: Megachilidae) in an urban environment: A case study from Leipzig, Germany. *Landscape and Urban Planning* **103** (1), 15–23, DOI: 10.1016/j.landurbplan.2011.05.008.
- EKELER, N., A. KRATOCHWIL, A. HOCHKIRCH, 2008: Strong genetic exchange among populations of a specialist bee, *Andrena vaga* (Hymenoptera: Andrenidae). *Conservation Genetics* **9** (5), 1233–1241, DOI: 10.1007/s10592-007-9450-8.
- FELTHAM, H., K. PARK, J. MINDERMAN, D. GOULSON, 2015: Experimental evidence that wildflower strips increase pollinator visits to crops. *Ecology and Evolution* **5** (16), 3523–3530, DOI: 10.1002/ece3.1444.
- FISCHER, L.K., J. EICHFELD, I. KOWARIK, S. BUCHHOLZ, 2016: Disentangling urban habitat and matrix effects on wild bee species. *PeerJ* **4**, e2729, DOI: 10.7717/peerj.2729.
- FITCH, G., P. GLAUM, M.-C. SIMAO, C. VAIDYA, J. MATTHIJS, B. IULIANO, I. PERFECTO, 2019a: Changes in adult sex ratio in wild bee communities are linked to urbanization. *Scientific Reports* **9** (1), 3767, DOI: 10.1038/s41598-019-39601-8.
- FITCH, G., C.J. WILSON, P. GLAUM, C. VAIDYA, M.-C. SIMAO, M.A. JAMIESON, 2019b: Does urbanization favour exotic bee species? Implications for the conservation of native bees in cities. *Biology Letters* **15** (12), 20190574, DOI: 10.1098/rsbl.2019.0574.
- FORTELE, L., M. HENRY, L. GUILBAUD, A.L. GUIRAO, M. KUHLMANN, H. MOURET, O. ROLLIN, B.E. VAISSIÈRE, 2014: Decreasing abundance, increasing diversity and changing structure of the wild bee community (Hymenoptera: Anthophila) along an urbanization gradient. *PLoS ONE* **9** (8), e104679, DOI: 10.1371/journal.pone.0104679.
- FORTELE, L., M. HENRY, L. GUILBAUD, H. MOURET, B.E. VAISSIÈRE, 2016: Use of human-made nesting structures by wild bees in an urban environment. *Journal of Insect Conservation* **20** (2), 239–253, DOI: 10.1007/s10841-016-9857-y.
- FOSTER, G., J. BENNETT, T. SPARKS, 2017: An assessment of bumblebee (*Bombus* spp) land use and floral preference in UK gardens and allotments cultivated for food. *Urban Ecosystems* **20** (2), 425–434, DOI: 10.1007/s11252-016-0604-7.
- FOURNIER, B., D. FREY, M. MORETTI, 2020: The origin of urban communities: From the regional species pool to community assemblages in city. *Journal of Biogeography* **21**, 1, DOI: 10.1111/jbi.13772.
- GESLIN, B., B. GAUZENS, E. THÉBAULT, I. DAJOZ, 2013: Plant pollinator networks along a gradient of urbanisation. *PLoS ONE* **8** (5), e63421, DOI: 10.1371/journal.pone.0063421.
- GRAB, H., M.G. BRANSTETTER, N. AMON, K.R. URBAN-MEAD, M.G. PARK, J. GIBBS, E.J. BLITZER, K. PAVEDA, G. LOEB, B.N. DANFORTH, 2019: Agriculturally dominated landscapes reduce bee phylogenetic diversity and pollination services. *Science* **363** (6424), 282–284, DOI: 10.1126/science.aat6016.
- GRASS, I., J. ALBRECHT, F. JAUKER, T. DIEKÖTTER, D. WARZECHA, V. WOLTERS, N. FARWIG, 2016: Much more than bees—Wildflower plantings support highly diverse flower-visitor communities from complex to structurally simple agricultural landscapes. *Agriculture Ecosystems & Environment* **225**, 45–53, DOI: 10.1016/j.agee.2016.04.001.
- GUNNARSSON, B., L. FEDERSEL, 2014: Bumblebees in the city: abundance, species richness and diversity in two urban habitats. *Journal of Insect Conservation* **18** (6), 1185–1191, DOI: 10.1007/s10841-014-9729-2.
- HAALAND, C., R.E. NAISBIT, L.-F. BERSIER, 2011: Sown wildflower strips for insect conservation: a review. *Insect Conservation & Diversity* **4** (1), 60–80, DOI: 10.1111/j.1752-4598.2010.00098.x.
- HALL, D.M., J.R. CAMILO, R.K. TONNETTO, J. OLLERTON, K. AHRNE, M. ARDUSER, J.S. ASCHER, K.C.R. BALDOCK, R. FOWLER, G. FRANKIE, D. GOULSON, B. GUNNARSSON, M.E. HANLEY, J.I. JACKSON, G. LANGELOTTO, D. LOWENSTEIN, E.S. MINOR, S.M. PHILPOTT, S.G. POTTS, M.H. SIROHI, E.M. SPEVAK, G.N. STONE, C.G. THRELFALL, 2017: The city as a refuge for insect pollinators. *Conservation Biology* **31** (1), 24–29, DOI: 10.1111/cobi.12840.
- HAMBLIN, A.L., E. YOUNGSTEADT, S.D. FRANK, 2018: Wild bee abundance declines with urban warming, regardless of floral density. *Urban Ecosystems* **21** (3), 419–428, DOI: 10.1007/s11252-018-0731-4.
- HARRISON, T., J. GIBBS, R. WINFREE, 2019: Anthropogenic landscapes support fewer rare bee species. *Landscape Ecology* **34** (5), 967–978, DOI: 10.1007/s10980-017-0592-x.
- HAUSMANN, S.L., J.S. PETERMANN, J. ROLFF, 2016: Wild bees as pollinators of city trees. *Insect Conservation and Diversity* **9** (2), 97–107, DOI: 10.1111/icad.12145.
- HEARD, M.S., C. CARVELL, N.L. CARRECK, P. ROTHERY, J.L. OSBORNE, A.F.G. BOURKE, 2007: Landscape context not patch size determines bumble-bee density on flower mixtures sown for agri-environment schemes. *Biology Letters* **3** (6), 638–641, DOI: 10.1098/rsbl.2007.0425.
- HENNIG, E.I., J. GHAZOUL, 2012: Pollinating animals in the urban environment. *Urban Ecosystems* **15** (1), 149–166, DOI: 10.1007/s11252-011-0202-7.
- HERNANDEZ, J.L., G.W. FRANKIE, R.W. THORP, 2009: Ecology of Urban Bees: A Review of Current Knowledge and Directions for Future Study. *Cities and the Environment* **2** (1), Article 3.
- HICKS, D.M., P. OUVRRARD, K.C.R. BALDOCK, M. BAUDE, M.A. GODDARD, W.E. KUNIN, N. MITSCHUNAS, J. MEMMOTT, H. MORSE, M. NIKOLITSI, L.M. OSGATHORPE, S.G. POTTS, K.M. ROBERTSON, A.V. SCOTT, F. SINCLAIR, D.B. WESTBURY, G.N. STONE, 2016: Food for Pollinators: Quantifying the Nectar and Pollen Resources of Urban Flower Meadows. *PLoS ONE* **11** (6), DOI: 10.1371/journal.pone.0158117.
- HOFMANN, M.M., S.S. RENNER, 2018: Bee species recorded between 1992 and 2017 from green roofs in Asia, Europe, and North America, with key characteristics and open research questions. *Apidologie* **49** (3), 307–313, DOI: 10.1007/s13592-017-0555-x.
- JOHANSSON, V., A. KOFFMAN, M. HEDBLUM, G. DEBONI, P. ANDERSSON, 2018: Estimates of accessible food resources for pollinators in urban landscapes should take landscape friction into account. *Ecosphere* **9** (10), e02486, DOI: 10.1002/ecs2.2486.
- JÖNSSON, A.M., J. EKROOS, J. DÄNHARDT, G.K.S. ANDERSSON, O. OLSSON, H.G. SMITH, 2015: Sown flower strips in southern Sweden increase abundances of wild bees and hoverflies in the wider landscape. *Biological Conservation* **184**, 51–58, DOI: 10.1016/j.biocon.2014.12.027.
- KRATSCHEMER, S., M. KRIECHBAUM, B. PACHINGER, 2018: Buzzing on top: Linking wild bee diversity, abundance and traits with green roof qualities. *Urban Ecosystems* **21** (3), 429–446, DOI: 10.1007/s11252-017-0726-6.
- LANE, I.G., J. WOLFIN, E. WATKINS, M. SPIVAK, 2019: Testing the Establishment of Eight Forbs in Mowed Lawns of Hard Fescue (*Festuca brevipila*) for Use in Pollinator Conservation. *HortScience* **54** (12), 2150–2155, DOI: 10.21273/HORTSCI14336-19.
- LARSON, J., A. KESHEIMER, D. POTTER, 2014: Pollinator assemblages on dandelions and white clover in urban and suburban lawns. *Jour-*


- nal of Insect Conservation **18** (5), 863–873, DOI: 10.1007/s10841-014-9694-9.
- LERMAN, S.B., A.R. CONTOSTA, J. MILAM, C. BANG, 2018: To mow or to mow less: Lawn mowing frequency affects bee abundance and diversity in suburban yards. *Biological Conservation* **221**, 160–174, DOI: 10.1016/j.biocon.2018.01.025.
- LÓPEZ-URIBE, M.M., S.J. MORREALE, C.K. SANTIAGO, B.N. DANFORTH, 2015: Nest suitability, fine-scale population structure and male-mediated dispersal of a solitary ground nesting bee in an urban landscape. *PLoS ONE* **10** (5), e0125719, DOI: 10.1371/journal.pone.0125719.
- LOWENSTEIN, D.M., K.C. MATTESON, E.S. MINOR, 2015: Diversity of wild bees supports pollination services in an urbanized landscape. *Oecologia* **179** (3), 811–821, DOI: 10.1007/s00442-015-3389-0.
- LOWENSTEIN, D.M., K.C. MATTESON, I. XIAO, A.M. SILVA, E.S. MINOR, 2014: Humans, bees, and pollination services in the city: the case of Chicago, IL (USA). *Biodiversity and Conservation* **23** (11), 2857–2874, DOI: 10.1007/s10531-014-0752-0.
- MACH, B.M., D.A. POTTER, 2018: Quantifying bee assemblages and attractiveness of flowering woody landscape plants for urban pollinator conservation. *PLoS ONE* **13** (12), e0208428, DOI: 10.1371/journal.pone.0208428.
- MACÍVOR, J.S., 2016a: Building height matters: nesting activity of bees and wasps on vegetated roofs. *Israel Journal of Ecology & Evolution* **62** (1-2), 88–96, DOI: 10.1080/15659801.2015.1052635.
- MACÍVOR, J.S., 2016b: DNA barcoding to identify leaf preference of leafcutting bees. *Royal Society open science* **3** (3), 150623, DOI: 10.1098/rsos.150623.
- MACÍVOR, J.S., J.M. CABRAL, L. PACKER, 2014: Pollen specialization by solitary bees in an urban landscape. *Urban Ecosystems* **17** (1), 139–147, DOI: 10.1007/s11252-013-0321-4.
- MACÍVOR, J.S., A.E. MOORE, 2013: Bees collect polyurethane and polyethylene plastics as novel nest materials. *Ecosphere* **4** (12), art155, DOI: 10.1890/ES13-00308.1.
- MACÍVOR, J.S., L. PACKER, 2015: ‘Bee hotels’ as tools for native pollinator conservation: a premature verdict? *PLoS ONE* **10** (3), e0122126, DOI: 10.1371/journal.pone.0122126.
- MACÍVOR, J.S., A. RUTTAN, B. SALEHI, 2015: Exotics on exotics: Pollen analysis of urban bees visiting *Sedum* on a green roof. *Urban Ecosystems* **18** (2), 419–430, DOI: 10.1007/s11252-014-0408-6.
- MASIEROWSKA, M., E. STAWIARZ, R. ROZWALKA, 2018: Perennial ground cover plants as floral resources for urban pollinators: A case of *Geranium* species. *Urban Forestry & Urban Greening* **32**, 185–194, DOI: 10.1016/j.ufug.2018.03.018.
- MASON, L., H.S. ARATHI, 2019: Assessing the efficacy of citizen scientists monitoring native bees in urban areas. *Global Ecology and Conservation* **17**, e00561, DOI: 10.1016/j.gecco.2019.e00561.
- MATTESON, K.C., J.S. ASCHER, G.A. LANGELOTTO, 2008: Bee Richness and Abundance in New York City Urban Gardens. *Annals of the Entomological Society of America* **101** (1), 140–150, DOI: 10.1603/0013-8746(2008)101[140:BRAAIN]2.0.CO;2.
- MATTESON, K.C., J.B. GRACE, E.S. MINOR, 2013: Direct and indirect effects of land use on floral resources and flower-visiting insects across an urban landscape. *Oikos* **122** (5), 682–694, DOI: 10.1111/j.1600-0706.2012.20229.x.
- MATTESON, K.C., G.A. LANGELOTTO, 2009: Bumble Bee Abundance in New York City Community Gardens: Implications for Urban Agriculture. *Cities and the Environment* **2** (1).
- MATTESON, K.C., G.A. LANGELOTTO, 2011: Small scale additions of native plants fail to increase beneficial insect richness in urban gardens. *Insect Conservation and Diversity* **4** (2), 89–98, DOI: 10.1111/j.1752-4598.2010.00103.x.
- McFREDERICK, Q.S., G. LEBUHN, 2006: Are urban parks refuges for bumble bees *Bombus* spp. (Hymenoptera: Apidae)? *Biological Conservation* **129** (3), 372–382, DOI: 10.1016/j.biocon.2005.11.004.
- MOHRA, C., M. FELLENDORF, G. SEGELBACHER, R.J. PAXTON, 2000: Dinucleotide microsatellite loci for *Andrena vaga* and other andrenid bees from non-enriched and CT-enriched libraries. *Molecular Ecology* **9** (12), 2189–2192, DOI: 10.1046/j.1365-294x.2000.01053-19.x.
- NEUMANN, K., K. SEIDELMANN, 2006: Microsatellites for the inference of population structures in the Red Mason bee *Osmia rufa* (Hymenoptera, Megachilidae). *Apidologie* **37** (1), 75–83, DOI: 10.1051/apido:2005060.
- PARDEE, G.L., S.M. PHILPOTT, 2014: Native plants are the bee’s knees: local and landscape predictors of bee richness and abundance in backyard gardens. *Urban Ecosystems* **17** (3), 641–659, DOI: 10.1007/s11252-014-0349-0.
- POTTER, C., N. de VÈRE, L.E. JONES, C.R. FORD, M.J. HEGARTY, K.H. HODDER, A. DIAZ, E.L. FRANKLIN, 2019: Pollen metabarcoding reveals broad and species-specific resource use by urban bees. *PeerJ* **7**, e5999, DOI: 10.7717/peerj.5999.
- RAZO-LEÓN, A.E., M. VÁSQUEZ-BOLAÑOS, A. MUÑOZ-URIAS, F.M. HUERTA-MARTÍNEZ, 2018: Changes in bee community structure (Hymenoptera, Apoidea) under three different land-use conditions. *Journal of Hymenoptera Research* **66** (1–2), 23–38, DOI: 10.3897/jhr.66.27367.
- RUNDLÖF, M., O. LUNDIN, R. BOMMARCO, 2018: Annual flower strips support pollinators and potentially enhance red clover seed yield. *Ecology and Evolution* **8** (16), 7974–7985, DOI: 10.1002/ece3.4330.
- SALISBURY, A., J. ARMITAGE, H. BOSTOCK, J. PERRY, M. TATCHELL, K. THOMPSON, 2015: Enhancing gardens as habitats for flower-visiting aerial insects (pollinators): should we plant native or exotic species? *Journal of Applied Ecology* **52** (5), 1156–1164, DOI: 10.1111/1365-2664.12499.
- SAMUELSON, A.E., R.J. GILL, M.J.F. BROWN, E. LEADBEATER, 2018: Lower bumblebee colony reproductive success in agricultural compared with urban environments. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **285** (1881), 20180807, DOI: 10.1098/rspb.2018.0807.
- SAMUELSON, A.E., E. LEADBEATER, 2018: A land classification protocol for pollinator ecology research: An urbanization case study. *Ecology and Evolution* **8** (11), 5598–5610, DOI: 10.1002/ece3.4087.
- SCHEPER, J., R. BOMMARCO, A. HOLZSCHUH, S.G. POTTS, V. RIEDINGER, S.P.M. ROBERTS, M. RUNDLÖF, H.G. SMITH, I. STEFFAN-DEWENTER, J.B. WICKENS, V.J. WICKENS, D. KLEIN, 2015: Local and landscape-level floral resources explain effects of wildflower strips on wild bees across four European countries. *Journal of Applied Ecology* **52** (5), 1165–1175, DOI: 10.1111/1365-2664.12479.
- SCHOCHET, A.B., K.-L.J. HUNG, D.A. HOLWAY, 2016: Bumble bee species exhibit divergent responses to urbanisation in a Southern California landscape. *Ecological Entomology* **41** (6), 685–692, DOI: 10.1111/een.12343.
- SENAPATHI, D., M.A. GODDARD, W.E. KUNIN, K.C.R. BALDOCK, 2017: Landscape impacts on pollinator communities in temperate systems: Evidence and knowledge gaps. *Functional Ecology* **31** (1), 26–37, DOI: 10.1111/1365-2435.12809.
- SIMAO, M.-C.M., J. MATTHIJS, I. PERFECTO, 2018: Experimental small-scale flower patches increase species density but not abundance of small urban bees. *Journal of Applied Ecology* **55** (4), 1759–1768, DOI: 10.1111/1365-2664.13085.
- SIROHI, M.H., J. JACKSON, M. EDWARDS, J. OLLERTON, 2015: Diversity and abundance of solitary and primitively eusocial bees in an urban centre: A case study from Northampton (England). *Journal of Insect Conservation* **19** (3), 487–500, DOI: 10.1007/s10841-015-9769-2.
- SIVAKOFF, F., S. PRAJZNER, M. GARDINER, 2018: Unique Bee Communities within Vacant Lots and Urban Farms Result from Variation in Surrounding Urbanization Intensity. *Sustainability* **10** (6), 1926, DOI: 10.3390/su10061926.
- SOMME, L., L. MOQUET, M. QUINET, M. VANDERPLANCK, D. MICHEZ, G. LOGNAY, A.-L. JACQUEMART, 2016: Food in a row: Urban trees offer valuable floral resources to pollinating insects. *Urban Ecosystems* **19** (3), 1149–1161, DOI: 10.1007/s11252-016-0555-z.
- THEODOROU, P., K. ALBIG, R. RADZEVICIUTE, J. SETTELE, O. SCHWEIGER, T.E. MURRAY, R.J. PAXTON, 2017: The structure of flower visitor networks in relation to pollination across an agricultural to urban gradient. *Functional Ecology* **31** (4), 838–847, DOI: 10.1111/1365-2435.12803.
- THEODOROU, P., R. RADZEVICIUTE, J. SETTELE, O. SCHWEIGER, T.E. MURRAY, R.J. PAXTON, 2016: Pollination services enhanced with urbanization despite increasing pollinator parasitism. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **283** (1833), DOI: 10.1098/rspb.2016.0561.
- THEODOROU, P., R. RADZEVICIUTE, B. KAHNT, A. SORO, I. GROSSE, R.J. PAXTON, 2018: Genome-wide single nucleotide polymorphism scan suggests adaptation to urbanization in an important pollinator, the red-tailed bumblebee (*Bombus lapidarius* L.). *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **285** (1877), DOI: 10.1098/rspb.2017.2806.
- THRELFALL, C.G., K. WALKER, N.S.G. WILLIAMS, A.K. HAHS, L. MATA, N. STORK, S.J. LIVESLEY, 2015: The conservation value of urban green space habitats for Australian native bee communities. *Biological Conservation* **187**, 240–248, DOI: 10.1016/j.biocon.2015.05.003.
- TOMMASI, D., A. MIRO, H.A. HIGO, M.L. WINSTON, 2004: Bee diversity and abundance in an urban setting. *The Canadian Entomologist* **136** (6), 851–869, DOI: 10.4039/n04-010.
- TONIETTO, R., J. FANT, J. ASCHER, K. ELLIS, D. LARKIN, 2011: A comparison of bee communities of Chicago green roofs, parks and prairies. *Landscape and Urban Planning* **103** (1), 102–108, DOI: 10.1016/j.landurbplan.2011.07.004.

- TUMMINELLO, G., T.A. VOLK, S.H. MCART, M.K. FIERKE, 2018: Maximizing pollinator diversity in willow biomass plantings: A comparison between willow sexes and among pedigrees. *Biomass and Bioenergy* **117**, 124–130, DOI: 10.1016/j.biombioe.2018.07.013.
- TURO, K.J., M.M. GARDINER, 2019: From potential to practical: conserving bees in urban public green spaces. *Frontiers in Ecology and the Environment* **17** (3), 167–175, DOI: 10.1002/fee.2015.
- TWERD, L., W. BANASZAK-CIBICKA, 2019: Wastelands: their attractiveness and importance for preserving the diversity of wild bees in urban areas. *Journal of Insect Conservation* **23** (3), 573–588, DOI: 10.1007/s10841-019-00148-8.
- VAIDYA, C., K. FISHER, J. VANDERMEER, 2018: Colony Development and Reproductive Success of Bumblebees in an Urban Gradient. *Sustainability* **10** (6), 1936, DOI: 10.3390/su10061936.
- VAN HEEZIK, Y.M., K.J.M. DICKINSON, C. FREEMAN, 2012: Closing the Gap: Communicating to Change Gardening Practices in Support of Native Biodiversity in Urban Private Gardens. *Ecology and Society* **17** (1), DOI: 10.5751/es-04712-170134.
- WARZECHA, D., T. DIEKÖTTER, V. WOLTERS, F. JAUKER, 2018: Attractiveness of wildflower mixtures for wild bees and hoverflies depends on some key plant species. *Insect Conservation and Diversity* **11** (1), 32–41, DOI: 10.1111/icad.12264.
- WESTRICH, P., 2018: *Die Wildbienen Deutschlands*. Stuttgart, Ulmer.
- WILLIAMS, N.M., K.L. WARD, N. POPE, R. ISAACS, J. WILSON, E.A. MAY, J. ELLIS, J. DANIELS, A. PENCE, K. ULLMANN, J. PETERS, 2015: Native wildflower plantings support wild bee abundance and diversity in agricultural landscapes across the United States. *Ecological Applications* **25** (8), 2119–2131, DOI: 10.1890/14-1748.1.
- ZAJDEL, B., M. BORĄŃSKI, K. KUCHARSKA, A. JOJCZYK, K. BRZEZIŃSKA, 2019: Bumblebee Communities (Apidae, Bombini) in Urban Parks in Relation to Park Area and Other Characteristics. *Polish Journal of Ecology* **67** (1), 84, DOI: 10.3161/15052249PJE2019.67.1.007.

© The Author(s) 2020.

 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).

© Der Autor/Die Autorin 2020.

 Dies ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt wird (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

Mitteilungen und Nachrichten

Neues aus der Deutschen Genbank Obst (DGO):

Sammlung alter Apfelsorten am Standort des Lehr- und Versuchszentrums Gartenbau in Erfurt – seit 2018 als Mitglied der Deutschen Genbank Obst

Monika Möhler

Das Lehr- und Versuchszentrum Gartenbau (LVG) in Erfurt gehört seit Januar 2019 zum Thüringer Landesamt für Landwirtschaft und Ländlichen Raum. Seit der Gründung im Jahr 1991 besteht das LVG Erfurt aus den Bereichen Fachschule, zur Ausbildung von Technikern und Meistern im Gartenbau bzw. Garten- und Landschaftsbau, aus der Überbetrieblichen Ausbildung für Gartenbau und Garten- und Landschaftsbau für die Länder Hessen und Thüringen, der Agrarökonomie und dem Agrarmarketing im gartenbaulichen Bereich sowie dem Bereich Versuchswesen. Das Referat Gartenbau und Gartenbauliches Versuchswesen arbeitet seit der Gründung des LVG in den Schwerpunkten Obstbau, Gemüsebau, Zierpflanzenbau und Garten- und Landschaftsbau.

Im obstbaulichen Versuchswesen liegen die Schwerpunkte der Versuchstätigkeit auf Untersuchungen im Bereich des Steinobstes und der Bewässerung. Im Rahmen der Mitteldeutschen Kooperation haben sich die Versuchsstandorte in Dresden, Ditzfurt und Erfurt darauf geeinigt, dass am Standort Erfurt Süßkirschen, Sauerkirschen, Pflaumen und Aprikosen bearbeitet werden. Dabei werden neue Sorten für die Standorte in Mitteldeutschland geprüft, neue Erziehungssysteme untersucht und effektive Bewässerungsstrategien erarbeitet. Versuche zu neuen Unterlagen mit Eignung für den Nachbau runden das Versuchsprogramm ab.

Während beim Steinobst der Fokus auf neuen Sorten für den Anbau in der obstbaulichen Praxis liegt, wird seit 1994 eine Sammlung alter Apfelsorten gepflegt, deren Ursprung der Standort auf der Erfurter iga war. Diese Sammlung umfasst derzeit 190 Sorten, veredelt auf die Unterlage M 26. Mit dieser Sammlung ist die LVG Erfurt seit 2018 Sammlungshaltender Partner im Netzwerk der Deutschen Genbank Apfel (Abb. 1).

Das LVG Erfurt nutzt diese Sammlung sehr intensiv in der Ausbildung eigener Azubis, in der Fachschule bzw. in der Ausbildung von Streuobstfachwarten. In Veredlungskursen wird gerade auf Reisermaterial alter, für die Region angepasster Sorten zurückgegriffen. In Übungen zur Pomologie liefern diese Sorten durch ihre hohe Variabilität eine gute Grundlage, um die

Streuobstfachwarte zu befähigen Sorten unterscheiden und bestimmen zu können. Jährlich werden die heimischen Baumschulen mit Früchten dieser alten Apfelsorten beliefert, um sie auch den Kunden wieder näher zu bringen. So fällt die Entscheidung bei der Auswahl eines eigenen Apfelbaumes nicht nur leichter, der Erhalt einer hohen Sortenvielfalt kann so aktiv unterstützt werden. Ein fester Termin ist auch die jährliche Sortenschau zum Erntefest in Gierstädt, wo neben den Standardsorten und neuen Sorten besonders die alten Apfelsorten im Mittelpunkt der Sortenschau stehen, denn nur was man kennt, kann man auch beurteilen. Auch im Streuobstbereich Thüringens gibt es regelmäßige Sortenschauen mit Sortenbestimmungen.



Abb. 1. Präsentation alter Apfelsorten anlässlich einer Technikschauschau im Obstbau am Standort Mönchpfeffel, bei Artern

Affiliation

Thüringer Landesamt für Landwirtschaft und Ländlichen Raum, Referat 33 Gartenbau und Gartenbauliches Versuchswesen, Erfurt

Kontaktanschrift

Monika Möhler, Referentin Obstbau, Thüringer Landesamt für Landwirtschaft und Ländlichen Raum, Referat 33 Gartenbau und Gartenbauliches Versuchswesen, Leipziger Straße 75 a, 99085 Erfurt, Tel: +49 (0) 361 574157 722, Fax: +49 (0) 361 574157 777, E-Mail: monika.moehler@tllr.thueringen.de

Mitteilungen und Nachrichten

Aus den Arbeitskreisen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft (DPG):

Arbeitskreis Krankheiten im Getreide und Mais - 2020

Helmut Tischner

Die 33. Tagung des Arbeitskreises Krankheiten in Getreide und Mais fand am 3. und 4. Februar 2020 im Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen in Braunschweig statt. Schwerpunktthemen waren: Krankheitsbekämpfung in Mais, Fusarien und Mykotoxine im Mais und Getreide, Krankheitsbekämpfung in Getreide mit Fungiziden und Biologicals.

Die nächste Tagung ist für den 25. und 26. Januar 2021 in Braunschweig geplant.

Die Zusammenfassungen eines Teils der Beiträge werden – soweit von den Vortragenden eingereicht – im Folgenden wiedergegeben.

1) *Trichoderma harzianum* – Das neue Pathogen im Mais?

Pfordt, A., Schiwiek, S., von Tiedemann, A.

Georg-August-Universität Göttingen, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz, Grisebachstr. 6, D-37077 Göttingen, Deutschland
E-Mail: annette.pfordt@uni-goettingen.de

Trichoderma harzianum gehört zu der Gruppe der Ascomyceten und ist ein weltweit ubiquitär auftretender Artenkomplex. Aufgrund seiner mycoparasitären und endophytischen Eigenschaft wird es unter anderem in der Landwirtschaft als biologisches Pflanzenschutz- und Pflanzenstärkungsmittel genutzt. Bisher ist diese Art nicht als phytopathologischer Erreger an Maiskolben beschrieben. Im Jahr 2018 konnte jedoch erstmalig an einem Feldversuchsstandort in Süddeutschland ein massives Auftreten von *Trichoderma* sp. am Maiskolben beobachtet werden. Aus den befallenen Maiskolben konnte *Trichoderma harzianum* isoliert und kultiviert werden. Erste Inokulationsversuche unter kontrollierten Bestimmungen im Gewächshaus konnten einen Befall am Maiskolben bestätigen. Dabei zeigten sich weißes Myzelwachstum zwischen den Körnern sowie massive Produktion von grün- bis graugrünen Konidien auf den Körnern und zwischen den Lieschblättern. Die Befallsstärke wurde visuell anhand der prozentual befallenen Fläche am Kolben bestimmt. Dabei erwiesen sich vier Isolate von den Standorten Künzing, Pocking, Coix de Pardies (F) und Bernburg als hoch aggressiv und konnten einen Befall von 95–100% generieren. 16 weitere *T. harzianum* Isolate aus dem süd- sowie mitteldeutschen Raum konnten keinen Befall erzeugen. Des Weiteren reduzierte sich der Trockensubstanzgehalt, nach der Inokulation mit den pathogenen Isolaten, signifikant um 30% im Vergleich zur Kontrolle. Mittels weiterer molekulargenetischer Untersuchungen sowie Sequenzierung des Tef 1 α Gens konnten diese

pathogenen Isolate der Arten *T. afroharzianum* sowie *T. harzianum* zugeordnet werden.

2) Entwicklung eines Entscheidungshilfesystems zur gezielten Bekämpfung der Turcicum-Blattdürre (*Exserohilum turcicum*) und der Augenfleckenkrankheit (*Kabatiella zaeae*) im Mais

Streit, S., von Tiedemann, A.

Georg-August-Universität Göttingen, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz, Grisebachstr. 6, D-37077 Göttingen, Deutschland
E-Mail: Sebastian.streit@agr.uni-goettingen.de

Durch Intensivierung des Maisanbaus und veränderte Anbausysteme konnte eine Zunahme von Blattkrankheiten im Mais unter mitteleuropäischen Klimabedingungen registriert werden. In vorherigen Untersuchungen konnten dabei die zwei wichtigsten Blattkrankheiten identifiziert werden: Die Turcicum-Blattdürre, ausgelöst durch *Exserohilum turcicum* (*E. turcicum*) (Pass.), LEONHARD and SUGGS (1974), teleomorph: *Setosphaeria turcica* (Luttrell) Leonhard & Suggs (1974) und die Kabatiella-Augenfleckenkrankheit, ausgelöst durch *Kabatiella zaeae* (*K. zaeae*) NARITA and HIRATSUKA (1959). Durch den zunehmenden Befallsdruck und die Zulassung von Blattfungiziden ab 2014 im Mais ergab sich für Landwirte und Berater eine neue Entscheidungssituation. Gegenwärtig fehlt allerdings ein an Schadensschwellen orientiertes Entscheidungshilfesystem, welches den zukünftigen Fungizideinsatz auf das notwendige Maß begrenzt und damit nutzungseffizient gestaltet. Ziel dieser Untersuchungen ist es daher, Befalls-Verlust-Relationen für die beiden o.g. Krankheiten zu ermitteln. Hierzu wurden 2017 Inokulationsversuche im Feld an zwei klimatisch unterschiedlichen Standorten in Deutschland durchgeführt, die den typischen klimatischen Ansprüchen der beiden Erreger entsprechen (Landkreis Rendsburg-Eckernförde für *K. zaeae* bzw. Landkreis Rendsburg für *E. turcicum*). In den Parzellenversuchen wurden die Faktoren Nutzungstyp (Silo- und Körnermais), Sorte (anfällig vs. weniger anfällig), Infektionszeitpunkt (BBCH 32 vs. BBCH 65), sowie Inokulumstärke (hoch vs. niedrig) variiert. Der Befallsverlauf wurde alle 14 Tage durch Sichtbonitur an zehn Pflanzen erfasst. Zur Silo- bzw. Körnerreife wurden diese zehn Pflanzen manuell geerntet und weiteren Untersuchungen zugeführt.

Für beide Erreger konnten signifikante Effekte ($P < 0,05$) der Sorte, des Infektionszeitpunkts und der Inokulumstärke gefunden werden. Für *E. turcicum* ergab sich ein Regressionskoeffi-

Affiliation

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz, Freising-Weihenstephan

Kontaktanschrift

Dr. Helmut Tischner, Leiter des Arbeitskreises Krankheiten im Getreide und Mais, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz, Lange Point 10, 85354 Freising-Weihenstephan, E-Mail: helmut.tischner@lfl.bayern.de

zient (R^2) von 0,48 ($P = 0,01$; $n = 12$) zwischen der Befallsstärke zu BBCH 65 und dem späteren Körnermaisertrag. Unter Annahme eines Körnermaispreises von 170 €/t und Kosten der Fungizidapplikation von 65 €/ha (Fungizid und Applikation ohne Spezialgerät) führt dies zu einer ökonomischen Schadschwelle von 5% mittlerem Befall auf den Blattetagen L-2 bis L+2 zu BBCH Stadium 65.

Für *K. zeae* war der Zusammenhang zwischen Befall und Silomaisertrag nur schwach korreliert (höchstes $R^2 = 0,33$, in Abhängigkeit von der Sorte), jedoch konnte ein Zusammenhang zwischen der mittleren Befallsstärke und dem gebildeten Energieertrag in MJ (Netto-Energie-Laktation, NEL/ha, quantifiziert mittels Nahinfrarotspektroskopie) identifiziert werden ($R^2 = 0,52$; $P = 0,01$; $n = 24$). Berücksichtigt man diese pathogenbedingte Reduktion in der Milcherzeugung eines Milchviehbetriebes (Erlössituation 2015/16 Niedersachsen) liegt die ökonomische Schadschwelle für *K. zeae* bei ca. 20% (unter Annahme gleicher Kosten der Fungizidapplikation wie oben).

Um zu prüfen, inwieweit die Sortenwahl Einfluss auf die ökonomische Bewertung der jeweiligen Krankheit nehmen kann, wurden im Jahr 2019 pro Pathogen fünf Sorten im Feld in vierfacher Wiederholung künstlich inokuliert und anschließend alle 21 Tage bonitiert. Hier zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede in der Befallsstärke ($P = 0,05$). Während sich die Befallsstärke zum Zeitpunkt der Siloreife (BBCH 87) bei der Augenfleckenkrankheit nur um den Faktor 2,5 unterschied, lag der Faktor bei Turcicum-Blattdürre bei über 4 (Inokulation mit Rassengemisch aus Rasse 0 und 1). Die hier beschriebenen Befalls-Verlust-Relationen sollen in weiteren Feldversuchen konsolidiert werden und zusammen mit schlagspezifischen Risikofaktoren (u. a. Sortenwahl) als Grundlage für ein Entscheidungshilfesystem zur gezielten Bekämpfung von Blattkrankheiten im deutschen Maisanbau dienen.

Literatur

- LEONHARD, K.J., E.G. SUGGS, 1974: *Setosphaeria prolata*, the ascigerous state of *Exserohilum prolatum*. *Mycologia* **66** (2), 281-297.
- NARITA, T., Y. HIRATSUKA, 1959: Studies on *Kabatiella zeae* n. sp., the causal agent of a new leaf spot disease of corn. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **24** (3), 147-153.

3) Regenwürmer als Bioregulatoren – Unterdrückung von Fusarien und Reduktion ihrer Mykotoxine in der Mais-Mulchauflage

van Cappelle, Ch.¹, Meyer-Wolfarth, F.², Meiners, T.³, Sandor, M.⁴, Schrader, S.¹

¹Johann Heinrich von Thünen-Institut, Institut für Biodiversität, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Deutschland

²Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11-12, D-38104 Braunschweig, Deutschland

³Julius Kühn-Institut, Institut für Ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Königin-Luise-Str. 19, D-14195 Berlin, Deutschland

⁴Universität für Agrarwissenschaften und Veterinärmedizin, Landwirtschaftliche Fakultät, Cluj-Napoca, Calea Manastur 3-5, RO-400372 Cluj-Napoca Calea, Rumänien

E-Mail: christine.vancappellet@thuenen.de

Die Reduktion der Bodenbearbeitungsintensität und der Einsatz von Mulchtechniken fördern das Überleben bodenbürtiger, phytopathogener und mykotoxinproduzierender Pilze wie z.B.

Fusarien. Das Infektionsrisiko für die Folgefrucht steigt (ecosystem disservice). Gleichzeitig wird aber auch die Diversität antagonistisch wirkender fungivorer Bodentiere erhöht. Sie fördern die Pathogenunterdrückung und reduzieren den Mykotoxingehalt (ecosystem service). Unklar ist allerdings bisher, welche ecosystem service/disservice Balance daraus resultiert und welche Wirkmechanismen innerhalb der Selbstregulation greifen.

Um das bioregulatorische Potential der Regenwurmart *Lumbricus terrestris* auf Schadpilze der Gattung *Fusarium* und die Reduktion der von ihr produzierten Mykotoxine (Deoxynivalenol (DON), Zearalenon (ZEN), 3-Acetyl-Deoxynivalenol (3-AcDON) und Fumonisin B1 (FB1)) zu analysieren und zu bewerten, wurden im Rahmen des EU-Projektes SoilMan Freilandversuche mit Mesokosmen in Deutschland und Rumänien durchgeführt. Im Hinblick auf die Pathogenunterdrückung und die Mykotoxinreduktion wurden die folgenden Hypothesen überprüft: (1) *L. terrestris* unterdrückt die drei *Fusarium*arten *F. graminearum*, *F. culmorum* und *F. verticillioides* in Maisstroh; (2) *L. terrestris* beschleunigt die Reduktion der Fusarium-Toxine (DON, 3-AcDON, ZEN und FB1) in der Mulchauflage; (3) das bioregulatorische Potential der Regenwürmer hängt von der Region und der Substratgröße ab.

Die Ergebnisse belegen, dass das Regulationspotential von *L. terrestris* zwischen den Fusarienarten variiert und von Standort und Substratgröße abhängt. *L. terrestris* reduziert die Konzentrationen von *Fusarium*-Toxinen in der Mulchauflage signifikant um bis zu 300%. Die Reduktionsraten hängen dabei von dem jeweiligen Toxin und der Region (Standort- und Bodenbedingungen) ab, sind aber unabhängig von der Substratgröße.

Die vorliegenden Erkenntnisse leisten einen wichtigen Beitrag zu einem besseren Verständnis der komplexen Zusammenhänge zwischen landwirtschaftlichem Management und der ecosystem service/disservice Balance in Agrarökosystemen.

4) Epidemiologische Grundlagen von Gelbrost an Winterweizen - Untersuchung neuer Rassen und Entwicklungen

Kabakeris, T.¹, Sommerfeldt, N.², Schmitt, A.¹, Klocke, B.¹

¹Julius Kühn-Institut, Institut für Strategien und Folgenabschätzung, Stahnsdorfer Damm 81, D-14532 Kleinmachnow, Deutschland

²Landesamt für Ländliche Entwicklung, Landwirtschaft und Flurneuordnung, Pflanzenschutzdienst, Referat 32, Dienstsitz Wünsdorf, Steinplatz 1, D-15806 Zossen / OT Wünsdorf, Deutschland

E-Mail: Theresa.kabakeris@julius-kuehn.de

Den Hintergrund der Untersuchungen bildete das Auftreten von Gelbrost-Rassen, die im Jahr 2011 erstmals in Europa gefunden und nach der Weizensorte Warrior benannt wurden, auf der die ersten epidemischen Ausbrüche beobachtet wurden (HOVMÖLLER et al., 2015). Die Warrior- und eine als Warrior(-) bezeichnete Rasse, die die Weizensorte Ambition nicht befallen kann, etablierten sich im vergangenen Jahrzehnt in Europa und dominierten von da an das ehemals diversere Gelbrost-Rassenspektrum (GRRC, 2020). Vor allem in den Jahren 2014 und 2015 kam es durch die Warrior-Rassen in Deutschland zu starken Gelbrostepidemien, die mutmaßlich auch auf die milden Winter zurückzuführen waren (GÖSSNER, 2015; WAGNER et al., 2016). Untersuchungen haben bislang gezeigt, dass die Warrior-Rassen neben der hohen Zahl an Virulenzen, die sie aufweisen, auch über ein weiteres Temperaturspektrum in ihren Ansprüchen verfügen (VALLAVIELLE-POPE et al., 2018).

Am Julius Kühn-Institut (JKI) wurden epidemiologische Untersuchungen der Warrior-Rassen im Vergleich zu einem

Referenzisolat durchgeführt. Das Referenzisolat gehört zur Rasse R237 E141, die bereits in den Jahren 2000–2002 für die Bewertung der Gelbrostesistenz im Feld verwendet wurde (BUNDESSORTENAMT, 2003). Für den Vergleich wurden ein Isolat der Rasse Warrior sowie zwei Isolate der Rasse Warrior(-), die aus deutschen Zusendungen im Jahr 2016 isoliert wurden, verwendet. In Keimtests und Klimakammerversuchen wurden die Keimfähigkeit der Sporen und die Befallsstärke auf Keimpflanzen bei unterschiedlichen Temperaturen und Blattnässedauern untersucht. Keimversuche fanden in Petrischalen auf Wasseragar (6 g / l) bei 6 konstanten Temperaturstufen von 0 °C bis 30 °C und 7 unterschiedlichen Expositionszeiträumen (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h und 26 h) statt. Die Keimversuche wurden je Isolat an 4 bis 5 Terminen wiederholt, wobei jeweils mindestens 100 frische Uredosporen ausgezählt wurden. Bei den Keimpflanzenversuchen in Klimakammern wurde nach 17 Tagen die Befallsstärke des inokulierten Keimblattes an jeweils 20 Keimpflanzen drei verschiedener Weizensorten mit unterschiedlicher Resistenzausprägung (JB Asano, KWS Barny, Patras) bonitiert. Die Pflanzen wurden nach der Inokulation mit Gelbrostsporen bei einer optimalen Keimtemperatur von 10 °C und Dunkelheit für 26 Stunden vorinkubiert und anschließend in einem Tag (16 h) / Nacht (8 h) Temperaturregime in den Varianten 20 °C / 10 °C und 25 °C / 16 °C inkubiert. Durch Benetzung der Pflanzen und Abdeckung mit Folien wurden während der Vorinkubationsphase Blattnässezeiträume von jeweils 2 h, 6 h, 9 h, 12 h und 26 h erreicht.

Es zeigte sich, dass die alte Gelbrost-Rasse R237 E141 nach 4 h Expositionsdauer auf dem flüssigen Medium wesentlich höhere Keimraten aufwies als die Warrior-Rassen. Bei 10 °C lag die Keimrate der alten Rasse hier zwischen 71 und 88 %. Bei den Warrior-Isolaten keimten nach 4 h im Mittel nur 11 % der Sporen, wobei die Spannweite hierbei sehr hoch war (0–65 %). Diese hohe Variabilität in der Keimfähigkeit der Warrior-Rassen wurde auch noch nach 12 h Expositionsdauer beobachtet. In den Temperaturstufen 5 °C, 10 °C und 15 °C lagen die Werte der Keimfähigkeit hier zwischen 2 und 80 %. Im Gegensatz dazu lagen die Keimraten der alten Rasse nach 12 h in den Temperaturstufen 5 °C, 10 °C und 15 °C in einem viel engeren Bereich (79 - 99 %). Ab 20 °C fiel die Keimrate der alten Rasse bis zur Expositionsdauer von 12 h auf maximal 7 % ab. Bei einzelnen Wiederholungen von Warrior- und Warrior(-) wurden nach 12 h bei 20 °C noch Keimraten von 31 bzw. 34 % beobachtet, bei 25 °C noch von 10 bzw. 21 %.

Trotz der insgesamt geringeren Keimfähigkeit im Keimtest zeigten sich in den Keimpflanzenversuchen höhere Befallsstärken durch die Infektion mit Warrior-Rassen als mit der alten Rasse. Dies war im Temperaturregime 20 °C / 10 °C vor allem bei längeren Blattnässedauern ab 9 h der Fall. Insgesamt war zu beobachten, dass die Befallsstärke der Warrior-Rassen stark von der Blattnässedauer abhing, während der Befall durch die alte Gelbrost-Rasse davon weitestgehend unabhängig war. Im Temperaturregime 25 °C / 16 °C kam es nach 26 h Blattnässedauer zu keinem Befall durch die alte Rasse. Bei den Warrior-Rassen wurde dagegen bei der anfälligen Sorte JB Asano im Mittel eine Befallsstärke von 12 % bonitiert.

Aus den Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die Warrior-Rassen andere Infektionsstrategien besitzen als eine vormals in Deutschland vertretene, aggressive Rasse. Trotz geringerer Keimfähigkeit kommt es zu hohen Befallsstärken, die durch längere Blattnässeperioden in der Infektionsphase stark begünstigt werden. Nach erfolgreicher Keimung werden zudem auch sommerliche Temperaturen (25 °C am Tag und 16 °C in der Nacht) toleriert und führen vor allem bei anfälligen Sorten zu relevanten Befallsstärken.

Literatur

- BUNDESSORTENAMT, 2003: *Beschreibende Sortenliste: Getreide, Mais, Öl- und Faserpflanzen, Leguminosen (großkörnig), Hackfrüchte (außer Kartoffeln)*.
- GÖSSNER, K., 2015: Kein Jahr für Weizen. *Bauernzeitung* 56 (6), 24-25.
- GRRC 2020. Yellow Rust Tools – maps and charts: Races – Changes across years. Zugriff: 20. Februar 2020, URL: <http://agro.au.dk/forskning/internationale-plattform/wheatrust/yellow-rust-tools-maps-and-charts/races-changes-across-years/>.
- HOVMØLLER, M.S., S. WALTER, R.A. BAYLES, A. HUBBARD, K. FLATH, N. SOMMERFELDT, M. LECONTE, P. CZEMBOR, J. RODRIGUEZ-ALGABA, T. THACH, J.G. HANSEN, P. LASSEN, A.F. JUSTESEN, S. ALI, C.D. VALLAVIEILLE-POPE, 2015: Replacement of the European wheat yellow rust population by new races from the centre of diversity in the near-Himalaya region. *Plant Pathology*, DOI: 10.1111/ppa.12433.
- VALLAVIEILLE-POPE, C.D., B. BAHRI, M. LECONTE, O. ZURFLUH, Y. BELAID, E. MAGHREBI, F. HUARD, L. HUBER, M. LAUNAY, M.O. BANCAL, 2018: Thermal generalist behaviour of invasive *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* strains under current and future climate conditions. *Plant Pathology* 67 (6), 1307-1320, DOI: 10.1111/ppa.12840.
- WAGNER, C., B. KLOCKE, J. SCHWARZ, 2016: Auftreten und Bekämpfung von Gelbrost (*Puccinia striiformis*) in Winterweizen und Wintertriticale in den Jahren 2008 bis 2015 am Versuchsstandort Dahnsdorf (Brandenburg). *Julius-Kühn-Archiv* 454, 387-388, DOI: 10.5073/JKA.2016.454.000.

5) GetreideProtekt - Fungizidversuche zur protektiven und kurativen Bekämpfung von Weizenschwarzrost

Schmitt, A.-K.¹, Ehlers, J.², Klocke, B.¹

¹Julius Kühn-Institut, Institut für Strategien und Folgenabschätzung, Stahnsdorfer Damm 81, D-14532 Kleinmachnow, Deutschland

²Humboldt Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin, Deutschland
E-Mail: anne-kristin.schmitt@julius-kuehn.de

Der globale Klimawandel wird die deutsche Getreideproduktion auch im Hinblick auf Resistenz vor biotischem Stress vor neue Herausforderungen stellen. Es ist zu erwarten, dass Pathogene wie z. B. der Weizenschwarzrost neu epidemisch werden können. Der Weizenschwarzrost, verursacht durch den Pilz *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, gehört weltweit zu den wichtigsten Getreidekrankheiten und kann zu erheblichen Ertragsschäden bis hin zum Totalausfall führen. In Mitteldeutschland trat der Weizenschwarzrost 2013 erstmals nach Jahrzehnten wieder im Winterweizen auf (OLIVERA FIRPO et al., 2017; FLATH et al., 2018). Eine Bekämpfung des Weizenschwarzrostes wird aufgrund des geringen Angebotes resistenter Sorten und der in Deutschland aktuell nicht zugelassenen Fungizide erschwert. Um kurzfristig auf eine mögliche Weizenschwarzrostepidemie reagieren zu können, ist die Entwicklung von Strategien für einen optimierten Einsatz von Fungiziden erforderlich. Im Rahmen des von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) geförderten „GetreideProtekt“-Projektes wird dazu die Wirksamkeit von ausgewählten Fungiziden in Keim- und Adultpflanzenversuchen im Hinblick auf Sortenresistenz, Applikationszeitpunkt und Aufwandmenge getestet, mit dem Ziel potente Mittel zur Kontrolle des Weizenschwarzrostes zu finden und Behandlungsempfehlungen für die landwirtschaftliche Praxis zu geben.

Der Keimpflanzenversuch wurde mit den drei Sorten Julius, Patras und Spontan bei Tag/Nacht-Temperaturen von 22°C/10°C durchgeführt. Die Keimpflanzen wurden mit einem reinen Azolpräparat (Proline) sowie mit Wirkstoffkombinationen aus Azol + Strobilurin (Fandango) und aus Azol + Carboxamid (Elatus Era) und mit Aufwandmengen von 100 %, 50 %, 25 % und 12,5 % behandelt. Die künstliche Schwarzrostinokulation der Weizensorten erfolgte mit einem hochvirulenten Isolat (TKTTF) 7, 5, 3 und 1 Tag vor (kurative Wirkungsweise) bzw. 1, 3, 5, und 7 Tage nach (protektive Wirkungsweise) der Fungizidapplikation im BBCH 12. Drei Wochen nach der jeweiligen Inokulation wurde die Befallsstärke als prozentualer Anteil befallener Blattfläche geschätzt.

Neben dem Keimpflanzenversuch wurde auch die Wirksamkeit von Proline und Fandango gegen Weizenschwarzrost an jeweils 120 Adultpflanzen der Sorten Julius, Patras und Spontan in Abhängigkeit vom Applikationstermin bei einer Tag/Nachttemperatur von 20°C/10°C getestet. Dazu wurden die jeweiligen Fungizide mit der maximal zugelassenen Aufwandmenge 7 Tage vor (protektive Wirkungsweise) bzw. 7 Tage nach (kurative Wirkungsweise) der Schwarzrostinokulation mit einer Fahrradspritze appliziert. Anschließend wurde die Befallshäufigkeit und -stärke an 1005 Weizenhalmen geschätzt.

Die Bonitur der 16.000 Einzelpflanzen im Keimpflanzenversuch zeigt, dass die Bekämpfung des Weizenschwarzrostes vom Fungizid, dem Applikationszeitpunkt und der Aufwandmenge abhängig ist. Fungizide mit Wirkstoffkombinationen können den Weizenschwarzrost effektiver kontrollieren als ein reines Azolpräparat. Dabei zeigte Fandango gemittelt über alle Inokulationstermine, Sorten und Aufwandmengen mit einer geringen Befallsstärke von 3,8 % die höchste Wirksamkeit. Bezüglich der protektiven und kurativen Fungizidapplikation sind Unterschiede in ihrer Wirksamkeit erkennbar. Bei protektiver Anwendung von Fandango und Elatus Era konnte 1 bzw. 5 Tage vor der Schwarzrostinfektion mit einer Aufwandmenge von 50 % der Befall gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant reduziert werden. Fungizidapplikationen, die protektiv 7 Tage vor der Inokulation mit Schwarzrost durchgeführt wurden, zeigten vor allem bei Proline, aber auch bei Fandango und Elatus Era eine geringere Wirkungsweise. Die kurative Anwendung von allen 3 Fungiziden führte 3 bzw. 1 Tag nach dem Auftreten von Weizenschwarzrost bereits bei einer Aufwandmenge von 12,5 % zu einer guten Befallskontrolle mit geringen Befallsstärken. Es können jedoch keine Aussagen zur Dauer der Wirksamkeit gemacht werden. Je stärker sich der Weizenschwarzrost etablieren konnte, umso mehr nahm die Wirksamkeit von Proline ab, wohingegen bei Fandango eine Aufwandmenge von 50 % ausreichte, um eine Schwarzrostinokulation, die 7 Tage vor der Behandlung erfolgte, vollständig zu kontrollieren.

Die ersten Ergebnisse des Adultpflanzenversuches zur Fungizidwirksamkeit gegen Weizenschwarzrost zeigen, dass die Anwendung von Proline und Fandango bei allen Sorten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu signifikant geringeren Befallshäufigkeiten führte. Dabei konnte, wie auch im Keimpflanzenversuch festgestellt wurde, die Applikation des Azol+Strobilurin-Präparates den Schwarzrostbefall effektiver kontrollieren als die Anwendung des reinen Azolwirkstoffes. Um Empfehlungen für eine optimale Terminierung der Fungizid-anwendung zur Bekämpfung des Weizenschwarzrostes geben zu können, sind weitere Untersuchungen zur Wirksamkeit der Fungizide in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt an Keim- und Adultpflanzen nötig und werden im Rahmen des Projektes auch durch Freilandversuche ergänzt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Weizenschwarzrost mit Fungiziden aus verschiedenen Wirkstoffgruppen effektiv zu kontrollieren ist. In Kombination mit einer gut

wirksamen Schwarzrostresistenz ist es langfristig möglich, deutsche Getreidesorten vor Weizenschwarzrost zu schützen und den Ansprüchen des Integrierten Pflanzenschutzes gerecht zu werden.

Literatur

- FLATH, K., T. MIEDANER, D.O. OLIVERA, M.N. ROUSE, Y. JIN, 2018: Genes for wheat stem rust resistance postulated in German cultivars and their efficacy in seedling and adult?plant field tests. *Plant Breeding* **137**, 301-312.
- OLIVERA FIRPO, P.D., M. NEWCOMB K. FLATH, N. SOMMERFELDT-IMPE, L.J. SZABO, M. CARTER, D.G. LUSTER, Y. JIN, 2017: Characterization of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* isolates derived from an unusual wheat stem rust outbreak in Germany in 2013. *Plant Pathology* **66**, 1258-1266.

6) Teilflächenspezifische Prognose von Halmbasiskrankheiten in Winterweizen - Aktueller Stand im Forschungsvorhaben AssSys

Herrmann, M.

Zentralstelle der Länder für EDV-gestützte Entscheidungshilfen und Programme im Pflanzenschutz (ZEPP), Rüdeshheimer Straße 60-68, D-55545 Bad Kreuznach, Deutschland
E-Mail: herrmann@zepp.info

Precision Farming ermöglicht die bedarfsgerechte Applikation von Pflanzenschutzmitteln. Aktuell wird das räumliche Auftreten von Pflanzenkrankheiten im Schlag allerdings nicht berücksichtigt, weshalb im Rahmen des Forschungsvorhabens „AssSys – Assistenzsystem zur teilflächenspezifischen Applikation von Pflanzenschutzmitteln“ ein Prognosetool entwickelt wird, welches exemplarisch die relative Verteilung von Halmbasiskrankheiten in Winterweizen im Schlag prognostizieren soll. In den Jahren 2018 und 2019 wurden visuelle Bonituren zum Befall mit den Halmbasiskrankheiten echter Halmbauch, scharfer Augenfleck und Fusarium-Halmbasisverbräunung zum Zeitpunkt der Milchreife in mehreren Praxis schlägen durchgeführt. Hierzu wurden etwa 150 Boniturstellen in Form eines Gitternetzes angelegt und je Boniturstelle 20 Halme (2018 10 Halme) auf das jeweilige Krankheitsauftreten hin untersucht. Zudem wurden Befallsdaten aus einem Vorgängerprojekt der ZEPP in die Auswertungen integriert. Die bonitierten Befallsverteilungen wurden anhand des Moran's I charakterisiert. Befallsverteilungen ohne indizierte räumliche Aggregation wurden aus den weiteren Untersuchungen exkludiert. Zusätzlich wurden je Schlag Lage-, Feuchte- und Bestandsparameter erhoben, um deren Eignung für eine räumliche Prognose des jeweiligen Krankheitsbefalls einschätzen zu können. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die räumliche Ausprägung des Topographic Wetness Index (TWI) schlagübergreifend mit dem relativen Auftreten von Fusarium-Halmbasisverbräunung negativ korreliert war. Basierend auf dieser Erkenntnis wurde ein Prognosetool entwickelt, welches das relative Auftreten von Fusarium-Halmbasisverbräunung räumlich im Schlag anhand des TWI prognostiziert, indem drei Zonen unterschiedlicher Befallsgefährdung ausgewiesen werden. Die Validität der ausgewiesenen Zonen wurde schlagübergreifend anhand der erhobenen Boniturstellen beurteilt. Die Trefferquote beträgt in Abhängigkeit von der ausgewiesenen Zone zwischen 52 % und 65 %. Geplant ist, die Prognosegüte durch die Integration zusätzlicher Parameter in das Prognosetool zu verbessern. Die

Förderung des Vorhabens erfolgt aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) aufgrund eines Beschlusses des deutschen Bundestages über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung.

7) Evaluierung von Entscheidungshilfen in der Weizenkultur

Prahl, K., Birr, T., Klink, H., Verreet, J.-A.
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Institut für Phytopathologie,
Herman-Rodewald-Straße 9, D-24118 Kiel, Deutschland
E-Mail: prahl@phytomed.uni-kiel.de

Ausgelöst durch gesellschaftlichen und politischen Druck ist die Nachfrage nach Entscheidungshilfen zur Reduktion des Pflanzenschutzmitteleinsatzes höher denn je. Aus diesem Grund wurden aus den bisher veröffentlichten Entscheidungshilfen diejenigen ausgewählt, die zum einen Erregerkomplexe berücksichtigen und zum anderen schon in der Praxis angewendet werden. Dementsprechend wurden im Jahr 2019 das IPS-Modell Weizen, das ISIP System und der Xarvio™ Field Manager untereinander hinsichtlich ihres Wirkungsgrades gegenüber einer 4-fach applizierten Gesundvariante untersucht.

In Schleswig-Holstein konnte 2019 sowohl in der Sorte Ritmo als auch in der Sorte RGT Reform überregional ein epidemiologisches Auftreten des Erregers *S. tritici* beobachtet werden. Die ebenfalls in Schleswig-Holstein bedeutenden Erreger *P. recondita*, *P. striiformis* und *B. graminis* konnten nachgewiesen werden, davon zeigte jedoch nur der Erreger *P. recondita* überregional einen epidemischen Befall in der Sorte Ritmo. Insgesamt wurden von den Entscheidungshilfen 42 Applikationen in der Sorte RGT Reform und 58 Applikationen in der hoch anfälligen Sorte Ritmo empfohlen. 93% der Empfehlungen beruhten dabei auf einer Indikation des Erregers *S. tritici*. Im Mittel über alle Standorte und Sorten wurden durch das IPS-Modell Weizen und das ISIP System je 2,8 Behandlungen und durch den Xarvio™ Field Manager 2,0 Behandlungen je Standort empfohlen. Zur Überprüfung des Wirkungsgrades der Entscheidungshilfen wurde der Befall der jeweiligen Variante zwischen der Gesundvariante (100%) und Kontrolle (0%) auf den oberen 3 Blättagen (Fahnenblatt bis F-2) zu EC77 eingeordnet. Das IPS-Modell Weizen und das ISIP System erreichten jeweils einen Wirkungsgrad von 93% und der Xarvio™ Field Manager 78% gegenüber der Gesundvariante bei Betrachtung der BSB (Befallsstärke im Bestand) der Hauptschadpathogene *S. tritici*, *P. striiformis*, *P. recondita* und *B. graminis*.

Neben den epidemiologischen Daten ist der Kornertrag eine maßgebliche Bewertungsgrundlage für die Qualität von Prognosemodellen. Dabei zeigten alle Varianten, sowie die Gesundvariante einen signifikant erhöhten Kornertrag gegenüber der Kontrolle und eine nicht signifikante Abweichung zur Gesundvariante. Ein Test auf nicht Unterlegenheit (non-inferiority test) ergab, dass alle Prüfvarianten der Gesundvariante nicht unterlegen waren. Im Mittel wurde in der Gesundvariante der Kornertrag gegenüber der Kontrolle um 23,8% erhöht. Die Prüfvarianten IPS-Modell Weizen, ISIP System und Xarvio™ Field Manager erhöhten den Kornertrag jeweils um 21,3%, 20,0% und 19,3%.

Im ökonomischen Vergleich konnte das IPS-Modell Weizen den höchsten Erlös nach Abzug der Fungizidkosten erzielen. Trotz der unterschiedlichen Wirkungsgrade der Entscheidungshilfen auf den Pathogenbefall, konnten nur geringe Unterschiede im Ertrag gezeigt werden. Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse des Jahres 2019 wurde deutlich, dass der Xarvio™ Field Manager sich vor allem bei der Beurteilung der Blättag

F-2 zu den anderen Entscheidungshilfen unterschied. So wurde bei Verringerung des bewerteten Blattapparates von den obersten drei auf die obersten 2 Blättagen eine erhebliche Wirkungsgradsteigerung von 11% im Mittel beim Xarvio™ Field Manager festgestellt. Zudem wurde die Blättag F-2 nur an 2 der 7 Standorte (IPS-Modell Weizen 7 von 7, ISIP System 4 von 7) nach voller Entfaltung (EC 32) geschützt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Blättag F-2 im Xarvio™ Field Manager als nicht so schützenswert eingestuft wird, wie zum Beispiel im IPS-Modell Weizen und im ISIP-System. Eine detaillierte Betrachtung der Einflussgrößen auf die Entscheidungen konnte im Xarvio™ Field Manager und auch im ISIP System aufgrund einer geringen Transparenz nicht nachvollzogen werden.

Ein weiterer nicht direkt messbarer Faktor für die Evaluierung von Entscheidungshilfen ist der mit der Anwendung einhergehende Arbeitsaufwand. Hier zeigte sich, dass alle Entscheidungshilfen mit einem grundsätzlich sehr geringen Arbeitsaufwand betrieben werden können, wobei das ISIP-System den geringsten Arbeitsaufwand für die Anwendung benötigte.

Letztlich zeigten alle Entscheidungshilfen Stärken und Schwächen, die in der Zukunft weitere Untersuchung zur Bestätigung der Ergebnisse benötigen.

8) Bekämpfung von Blattkrankheiten in Wintergerste in Brandenburg und Ringversuchsergebnisse 2019

Kupfer, S.
Landesamt für ländliche Entwicklung, Landwirtschaft und Flurneuordnung,
Müllroser Chaussee 54, D-15236 Frankfurt (Oder), Deutschland
E-Mail: stefania.kupfer@lelf.brandenburg.de

In Brandenburg werden ca. 110.000 ha Wintergerste angebaut. Auch das Jahr 2019 war von großer Trockenheit geprägt. Befallsbonituren auf 30 ausgewählten Monitoringflächen zeigten Befall mit Netzflecken, Echem Mehltau und Zwergrost. Zu BBCH 75 wurde auf diesen Schlägen der Befall der einzelnen Krankheiten in unbehandelten Kontrollen mit den durchgeführten Praxis-Fungizidvarianten verglichen. Hauptkrankheit war der Zwergrost mit 63,2% sowie die Netzfleckenkrankheit mit 25,3% Befallshäufigkeit in den unbehandelten Kontrollen. Die Fungizidmaßnahmen zeigten eine deutliche Reduzierung des Befalls. Knapp 70% der Monitoringschläge wurden ab BBCH 37/39 mit verschiedensten Fungiziden behandelt. Auf einigen Praxischlägen wurde auch zweimal ein Fungizid appliziert.

Ramularia trat in Brandenburg auch im Jahr 2019 nicht auf. Die Ergebnisse der Sensitivitätsuntersuchungen von Netzflecken und Ramularia gegenüber Carboxamiden sowie des Zwergrostes gegenüber Strobilurinen wurden vorgestellt und diskutiert.

Im Rahmen der Ringversuchsgruppe (Brandenburg, Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen) wurden abgestimmte Fungizidversuche in Gerste durchgeführt. Eine der Versuchsfragestellungen war die Überprüfung der Bekämpfung von Blattkrankheiten (Schwerpunkt Netzflecken) nach Bekämpfungsrichtwert mit und ohne Carboxamide, hinsichtlich der Resistenzsituation sowie die Umsetzung der Antiresistenzstrategie. Es wurden 6 bzw. 8 Standorte in die Auswertung einbezogen. Zum Einsatz kamen unterschiedliche Fungizide aus unterschiedlichen Wirkstoffgruppen. Es wurden Ergebnisse zu den Wirkungsgraden und den Erträgen besprochen. Die in der gemeinsamen Feldbaubroschüre (Berlin, Brandenburg, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen) dargestellten Bekämpfungsempfehlungen zum Einsatz von Fungiziden in Wintergerste wurden erläutert. Lang-

jährige Versuchsergebnisse zeigen, dass auf Standorten mit geringer bis mittlerer Ertrags erwartung, geringem Befallsdruck, resistenten Sorten oder bei zu erwartender Trockenheit eine gezielte Fungizid-Einmalbehandlung im BBCH 37/39 bis 49 ökonomische Vorteile gegenüber der Zweimalbehandlung hat. Allerdings sind standortspezifische Besonderheiten in die Entscheidung mit einzubeziehen.

9) Leistung „biologischer Varianten“ bei der Krankheitsbekämpfung in Getreide

Weigand, S.

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz, Lange Point 10, D-85354 Freising-Weißenstephan, Deutschland
E-Mail: stephan.weigand@lfl.bayern.de

Die Wirkung von biologischen Alternativen („biologicals“) prüft der Amtliche Pflanzenschutzdienst in Bayern seit mehreren Jahren, unter anderem im Rahmen seiner Feldversuche zur Krankheitsbekämpfung in Getreide. Richtschnur für die Auswahl der Einzelpräparate ist dabei die bestehende oder angestrebte Zulassung für den ökologischen Anbau (z. B. FiBL-Listung). Geprüft wurden verschiedene Algenpräparate, die als Biostimulanzien unter anderem die pflanzeigene Abwehr anregen und so vor biotischem und abiotischem Stress schützen sollen, daneben aber auch rein anorganische Pflanzenschutz- oder Düngemittel, wie Kaliumhydrogencarbonat, Schwefel- oder Schwefel-Kupfer-Präparate. In einer ersten Stufe werden diese Produkte solo eingesetzt und auf direkte oder indirekte Wirkungen bezüglich Krankheitsbefall, Erhalt des Blattgrüns und Ertrag geprüft. In weiteren Varianten werden auch chemisch-biologische „Hybridsysteme“ untersucht. Dies sind Spritzfolgen, mit einer chemischen Erstbehandlung in der Schossphase und dem biologischen Präparat zum Abschluss. Ein anderer Ansatz sind Mischungen mit reduzierten Aufwandsmengen chemischer Präparate, ergänzt mit biologischen Zusatzstoffen, welche die fungizide Wirkung des Basismittels unterstützen sollen. Beide kombinierten Systeme sollen Hinweise liefern, ob sich hierbei auch für konventionelle Betriebe sinnvolle Einsparpotenziale für chemisch-synthetische Pflanzenschutzmittel ergeben.

Die wenigen Einzelversuche ergeben kein einheitliches Bild, ebenso wie die begrenzte Auswahl an Prüfmitteln bislang noch keine fundierte Bewertung erlaubt. Vor allem die solo eingesetzten, in der Regel dreifach applizierten Algenpräparate zeigten im Blattbereich keine oder nur sehr begrenzte Effekte. Dies gilt besonders beim Auftreten der Septoria-Blattdürre oder von Rosten im Weizen oder der Ramularia-Sprenkelnekrose in der Gerste. Nur in 4 von insgesamt 10 Versuchen unterschieden sich die Erträge überhaupt signifikant von der fungizidfreien Kontrolle, nur in 2 Versuchen konnten auch die Behandlungskosten durch den Einsatz der Algenpräparate abgedeckt werden. Tendenziell etwas bessere Wirkungen erbrachten „aktiv formulierte“ Schwefelpräparate. Allerdings ließen sich auch hier, trotz teils guter Bonituren im Blattbereich, die Erträge letztlich nur in 8 von 21 Einzelversuchen signifikant von der Kontrolle unterscheiden. In den bayernweiten Versuchsserien aus dem letzten Jahr erbrachte der Einsatz von insgesamt 4,9 kg/ha Schwefel, in zweifacher Applikation, in Winterweizen einen mittleren Mehrertrag von 4,2 dt/ha, in Wintergerste von nur 1,3 dt/ha. Deutlich besser, ökonomisch vereinzelt sogar günstiger als manch chemische Standardvariante, schnitten dagegen chemisch-biologische Spritzfolgen ab. Allerdings war auch hier die Wirkung größtenteils auf die chemische Erstbehandlung zurückzuführen.

Die Mehrzahl der Versuche stammt auch aus den Trockenjahren 2018 und 2019 mit vergleichsweise geringem Krankheitsbefall. Unter Starkbefall, das müssen weitere Versuche zeigen, wird sich die ermittelte Vorzüglichkeit chemischer Vergleichsvarianten noch deutlich vergrößern.

10) Biostimulanzien – eine kausale Interpretation der Ertragssteigerung und der positiven Auswirkungen auf die pflanzliche Biomasse am Beispiel von „Phosphit“

Klink, H., Prahl, K., Birr, T., Verreet, J.-A.

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Institut für Phytopathologie, Herman-Rodewald-Straße 9, D-24118 Kiel, Deutschland
E-Mail: hklink@phytomed.uni-kiel.de

Der Begriff „Biostimulanzien“ wird in der öffentlichen Diskussion oftmals völlig falsch verwendet, obwohl die EU-Düngeregulatorverordnung 2019/1009 für Biostimulanzien einen klaren Rechtsrahmen vorsieht. Biostimulanzien werden im Bereich der sogenannten „Düngeprodukte“ in der Produktfunktionskategorie 6 einklassifiziert. Grundlage für diese Klassifizierung sind Kriterien, die zu einer Verbesserung von a) der Effizienz der Nährstoffversorgung, b) der Toleranz gegenüber abiotischen Stress, c) von Qualitätsmerkmalen und d) der Verfügbarkeit von Nährstoffen in der Rhizosphäre führen. Diese Effekte resultieren indirekt über eine Stimulierung von pflanzeigenen Enzymen. Somit sind Biostimulanzien eine vollkommen eigenständige Gruppe und sowohl von Düngemitteln oder Pflanzenschutzmitteln inhaltlich in der Wirkung und Indikation deutlich zu trennen.

Anorganische Biostimulanzien haben Vorteile hinsichtlich definierter Inhaltsstoffe und einer Wirksamkeit gegenüber variierenden Umweltbedingungen. Nach dem Einsatz von Phosphit als Saatgutbehandlung konnte im Weizen eine Steigerung der Wurzelmasse, der Wurzeloberfläche und Wurzelvolumen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden bei unterschiedlichen Nährstoffversorgungen und Umweltsituationen belegt und konnten durch internationale Vergleichsstudien bestätigt werden. Diese Effekte führten auch zu deutlichen Mehrerträgen, die durch Blattapplikationen von Phosphit zusätzlich gesteigert werden konnten. Ebenso konnte in der Kultur Raps (mehrjährig und überregional) der Fruchtansatz durch eine kombinierte Herbst- und Frühjahrsbehandlung ertragswirksam gesteigert werden. In allen Kulturen stellte in den Versuchen ein optimales Pflanzenschutzregime die Befallsfreiheit sicher, und somit sind die gemessenen Effekte ausschließlich physiologischer Art.

Erstmalig konnte nach einer Phosphit-Applikation als Ursache dieser physiologischen Effekte in den verschiedenen Kulturen eine Stimulierung der Nitratreduktase als Schlüsselenzym der Stickstoffassimilation nachgewiesen werden. Diese Stimulierung konnte auch zusätzlich genetisch in einer gesteigerten Expression der für die Nitratreduktase entscheidenden Gene (NRT1.2, NIA 1 und NIA 2) belegt werden. Somit konnte der wissenschaftliche Beweis einer stimulierenden Wirkung von Phosphit von den phänologischen Effekten, über die Enzymebene bis hin zur genetischen Ebene lückenlos als Kausalkette nachgewiesen werden. Diese Beweisführung hat es bisher für Biostimulanzien nicht gegeben. Damit kann festgestellt werden, dass Phosphit eindeutig den anorganischen Biostimulanzien zuzuordnen ist, da alle Kriterien der Produktfunktionskategorie gemäß Düngeproduktverordnung 2019/1009 erfüllt werden und die stimulierende Wirkung auf verschiedenen Ebenen wissenschaftlich belegt wurde.

Datum/Ort	Thema	Veranstalter/Kontakt
20.05.2020 Frankfurt	Fachinformationsdienst Biodiversitätsforschung – Workshop: Explorieren von Biodiversitätsliteratur mittels Textmining	https://www.biofid.de/de/registrierung/ Veranstalter: Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung Kontakt: biofid@ub.uni-frankfurt.de
21. – 22.05.2020 Berlin	WCPGPB-2020 2 nd World Congress on Plant Genomics and Plant Breeding	https://conferenceera.com/plant-genomics-plant-breeding-conference/ E-Mail: plantgenetics2020@conferenceera.com
25. – 26.05.2020 Wieselburg, Österreich	75. ALVA – Jahrestagung: Landwirtschaft in der Zukunft – alles digital	https://tagung.alva.at/index.php
28. – 29.05.2020 Paris	German-French Maize Breeder School „New target traits and new tools for European maize breeding“	https://gpz-online.de/terminkalender/
10.06.2020 Dahndorf	Feldversuchstag JKI-Versuchsfeldstandort Dahnsdorf: 25 Jahre Dauerfeldversuche	https://www.julius-kuehn.de/veranstaltungen/ Kontakt: Jürgen Schwarz E-Mail: juergen.schwarz@julius-kuehn.de
16. – 18.06.2020 Gut Brockhof in Erwitte/Lippstadt	DLG-Feldtage – Der Treffpunkt für Pflanzenbauprofis	https://www.dlg-feldtage.de/de/home/
18. – 19.06.2020 Hohenheim	Tagung der AG 9 (Geschichte) anlässlich des 81. Geburtstages von Prof. Dr. Hartwig Geiger	https://gpz-online.de/terminkalender/
20.06.2020 Quedlinburg	Tag der offenen Tür des Julius Kühn-Instituts Quedlinburg	https://www.julius-kuehn.de/veranstaltungen/veranstaltung/news/tag-der-offenen-tuer-quedlinburg-1/
21. – 24.06.2020 Wernigerode	International Symposium on Rye Breeding & Genetics	https://meetings.ipk-gatersleben.de/eucarpia-rye-2020/ Veranstalter: IPK Kontakt: Ulrike Lohwasser E-Mail: lohwasse@ipk-gatersleben.de
24. – 26.06.2020 Karlsruhe	48. Jahrestagung des DPG-Arbeitskreises Biometrie und Versuchsmethodik	https://plant-protection.net/de/arbeitskreise/biometrie Veranstalter: DPG E-Mail: peter.lancashire@bayer
17. – 24.07.2020 Helsinki	XXVI International Congress of Entomology – ICE2020	https://ice2020helsinki.fi/
25. – 29.07.2020 Washington, DC	Plant Biology 2020	https://plantbiology.aspb.org/ Veranstalter: American Society of Plant Biologists Kontakt: info@aspb.org
23. – 28.08.2020 Rotterdam	21 st general congress Eucarpia Breeding: The Key To Innovative Solutions	https://eucarpia2020.org/home.php Veranstalter: European Association for Research on Plant Breeding – Eucarpia Kontakt: eucarpia@plantum.nl
31.08.2020 Göttingen	Insektenkonferenzen Pflanzen schützen – Insektenvielfalt erhalten	https://plant-protection.net/de/insekten-konferenzen/ Veranstalter: DPG, DGaE, JKI



DIE GANZE VIelfALT DER WILDBIENEN



➔ Das Großwerk über unsere Wildbienen vom führenden Experten

➔ 1700 brillante Fotos zeigen, wie die fleißigen Bestäuber leben

Dr. Paul Westrich beschreibt ausführlich die Lebensräume der Wildbienen, ihre Bruffürsorge und Nester, ihre Nutznießer und Gegenspieler sowie die Abhängigkeiten zwischen Bienen und Blüten und skizziert die Gefährdung der Wildbienen und ihren Schutz. Über 565 Steckbriefe enthalten zudem alles Wissenswerte zu Verbreitung, Biologie, Flugzeit sämtlicher heimischer Arten. Über 420 davon sind in Lebendfotos und mit Merkmalen zur Feldbestimmung dargestellt. Viele Arten und Verhaltensweisen sind so zum ersten Mal im Bild zu sehen.

Die Wildbienen Deutschlands. Paul Westrich.

2., aktualisierte Auflage 2019. 824 S., 1700 Farbfotos, 17 Zeichnungen, 14 Tabellen, geb. ISBN 978-3-8186-0880-4. € 99,00 [D]

Änderungen und Irrtümer vorbehalten.



Dr. Paul Westrich studierte Biologie und promovierte in Tübingen. Mit seinem Werk „Die Wildbienen Baden-Württembergs“

machte er die Wildbienen einem breiten Publikum bekannt. Seitdem erforscht er diese Tiergruppe und gibt sein Wissen in zahlreichen Publikationen und Vorträgen weiter. Für seine grundlegenden Arbeiten über Wildbienen wurde er mit der Meigen-Medaille der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie ausgezeichnet.

Viele Arten, Nester und Verhaltensweisen zum ersten Mal im Bild zu sehen

#SolidaritätBuchhandel
Kaufen Sie Ihre Bücher vor Ort.
www.buchhandlung-finden.de

Bestellen Sie bei Ihrem Buchhändler oder im Ulmer Onlineshop unter www.ulmer.de

Journal für Kulturpflanzen

Journal of Cultivated Plants

Inhalt Band 72, Heft 5/2020

Editorial

Bienen schützen – warum? JENS PISTORIUS 121

Originalarbeit

Perspectives on long-term bee vitality monitoring HARMEN P. HENDRIKSMA, SILVIO ERLER, HENRI GREIL 123

Übersichtsarbeiten

Experimental validation of an electronic counting device to determine flight activity of honey bees (*Apis mellifera* L.) SVEN BERMIG, RICHARD ODEMER, ALINA J. GOMBERT, MALTE FROMMBERGER, RALF ROSENQUIST, JENS PISTORIUS 132

Auf der Suche nach Rückständen von Pflanzenschutzmitteln in Bienen, Pflanzen und Bienenprodukten GABRIELA BISCHOFF, BENJAMIN GRASZ, HARTMUT NOWAK, KERSTIN PAULUTT, JENS PISTORIUS 141

Auswirkungen von Pflanzenschutzmittel-Tankmischungen auf Honigbienen und mögliche physiologische Interaktionen ANNA WERNECKE, DENISE CASTLE 154

Non-*Apis* bees as model organisms in laboratory, semi-field and field experiments ANKE C. DIETZSCH, TOBIAS JÜTTE 162

Assessing the efficacy of bee promoting measures (Hymenoptera, Apiformes) along an urban-rural gradient ANDRÉ KRAHNER, HENRI GREIL 173

Mitteilungen und Nachrichten

Neues aus der Deutschen Genbank Obst (DGO):
Sammlung alter Apfelsorten am Standort des Lehr- und Versuchszentrums Gartenbau in Erfurt – seit 2018 als Mitglied der Deutschen Genbank Obst (MONIKA MÖHLER) 185

Aus den Arbeitskreisen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft (DPG):
Arbeitskreis Krankheiten im Getreide und Mais - 2020 (HELMUT TISCHNER) 186

Termine

192

Unser Titelbild: Bienenschutzforschung in all seinen Facetten: vom Labor (l.o.), über das Halbfreiland (r.o.), bis zum Freilandexperiment (l.u.), und Bienenmonitoring (r.u.), Fotos: JKI, Institut für Bienenschutz. Die Bilder werden unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>) zur Verfügung gestellt.