

Schnelle parallele Evolution überwindet globalen Honigbienen-Parasiten

[Rapid parallel evolution overcomes global honey bee parasite](https://doi.org/10.1038/s41598-018-26001-7)

Melissa Oddie, Ralph Büchler, Bjørn Dahle, Marin Kovacic, Yves Le Conte, Barbara Locke,

Joachim R. de Miranda, Fanny Mondet & Peter Neumann -- Open Access, Lizenz siehe unten --

Sci Rep **8**, 7704 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26001-7>

Übersetzung: Claudia Blauert

In eusozialen Insektenkolonien kooperieren die Nestgefährten bei der Bekämpfung von Parasiten, eine Eigenschaft, die als soziale Immunität bezeichnet wird.

Als die ektoparasitäre Milbe *Varroa destructor* den Wirt wechselte von östlichen Honigbienen (*Apis cerana*) zu den westlichen Honigbienen (*Apis mellifera*), versagte deren soziale Immunität jedoch. Diese Milbe hat sich inzwischen zur weltweit schwersten Bedrohung für *A. mellifera* entwickelt. Trotzdem sind einige isolierte *A. mellifera*- Populationen bekannt dafür, dass sie den Befall mittels natürlicher Auslese überleben, weitgehend durch Unterdrückung der Milbenreproduktion, aber die zugrunde liegenden Mechanismen sind nur unzureichend verstanden.

Hier zeigen wir auf, dass sich ein kosteneffektiver, sozialer Immunitätsmechanismus schnell und unabhängig voneinander in vier natürlichen, *V. destructor*- überlebenden *A. mellifera* Populationen entwickelt hat.

Uncapping/ Recapping:

Bereits verdeckelte Arbeiterinnen-Brutzellen werden von den Arbeiterinnen aller vier "überlebenden" Populationen häufiger erneut geöffnet und wieder verdeckelt („uncapping/ recapping“), dabei zielen sie effektiver auf milbenbefallene Zellen als Arbeiterinnen anderer lokaler Völker, die keine Anpassung entwickelt haben. Direkte Experimente bestätigten die Wirksamkeit der Entdeckung/ Wiederverdeckung zur Reduzierung des Fortpflanzungserfolges von Milben, ohne dabei Nestmitglieder opfern zu müssen.

Unsere Ergebnisse liefern einen eindrucksvollen Beweis dafür, dass Honigbienen exotische Parasiten über einfache qualitative und quantitative adaptive Verhaltensänderungen überwinden können. Durch schnelle, parallele Evolution in vier Wirtspopulationen hat sich offenbar ein Schlüsselmechanismus entwickelt, der das Überleben der von Milben befallenen Kolonien erklärt.

Eusoziale Insektenkolonien können als Superorganismen betrachtet werden bestehend aus kooperierenden Individuen übergreifender Generationen, analog zu Zellen in einem mehrzelligen Organismus^{1,2}. Eine solche Zusammenarbeit zur Reproduktion schließt die Arbeitsteilung ein, die Brutpflege und die Parasitenabwehr über soziale Immunität³⁻⁵.

Die soziale Immunität umfasst das Verhalten, physiologische oder organisatorische Merkmale, die die Gesundheit der Kolonie fördern, unabhängig von ihren Folgen für die Gesundheit einzelner Bienen.

Dies ist eine erfolgreiche Strategie, die bei vielen Insektenarten⁶ zur Evolution der Sozialität beigetragen hat, da das Opfern und Entfernen der infizierten Individuen aus der Kolonie den Parasiten zwingt, seine Virulenz⁷ einzudämmen - entweder durch die Reduktion seines eigenen Fortpflanzungserfolges oder der Übertragung von Krankheitserregern - und damit eine koadaptive Beziehung zu seinem Wirt anzustreben.

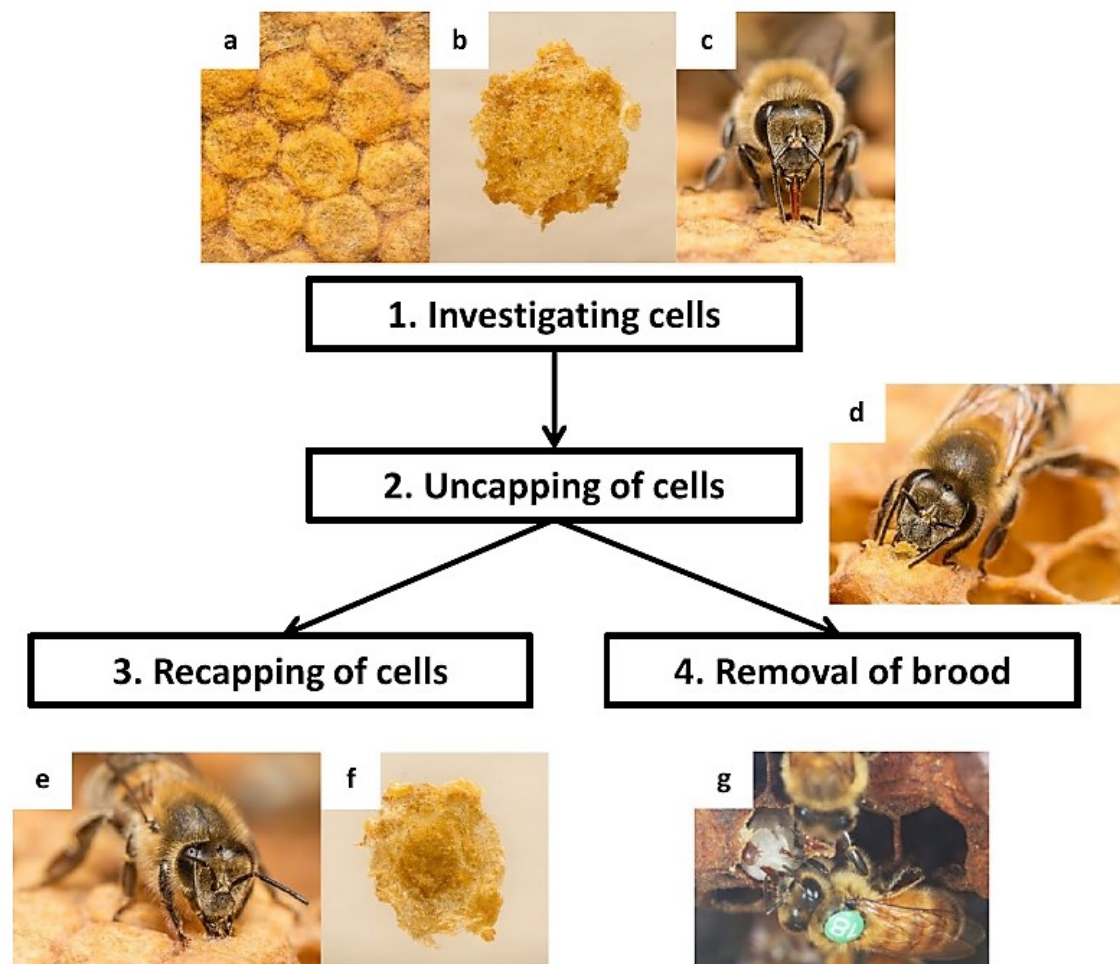


Abbildung 1:

1. Zellen werden untersucht, 2. Der Zelldeckel wird geöffnet (Uncapping), 3. Die geöffnete Zelle wird wieder verschlossen, 4. Ausräumen der Brut

Dieses Ethogramm zeigt das Verhaltensmuster der sozialen Immunität von erwachsenen Arbeiterinnen, die auf milbenverseuchte geschlossene Brutzellen abzielen.

(a) Draufsicht auf die Arbeiterinnen-Brutzellen, (b) Unterseite eines intakten, vom glänzenden Larvenseidenkokon vollständig bedeckten Zellen-Deckels.

Das Ethogramm besteht aus vier Stufen: 1. Untersuchung der Zellen: Arbeiterinnen inspizieren die Wachsdeckel der Zellen mit ihren Zungen und Antennen (c). 2. Entfernen der Zellen-Deckel (Uncapping): Die Arbeiterinnen entfernen mit ihren Unterkiefern die Deckel der Zellen (d).

Diese ersten beiden Schritte werden immer in der gleichen Reihenfolge durchgeführt. Ein wichtiger Übergang erfolgt nach Stufe 2, wobei sich die Arbeiterinnen zwischen den folgenden beiden Schritten entscheiden können. 3. Erneutes Verschliessen der Zellen: Arbeiterinnen verwenden Wachsdrüsensekrete und ihre Unterkiefer, um die Zellen erneut zu verdeckeln (e), was dazu führt, dass die Unterseite eines solchen Zelldeckels ein auffälliges, dunkler erscheinendes Zentrum hat, das matt wirkt (Anm.: dort fehlen die Reste des Kokons) (f). 4. Entfernen der Brut: Arbeiterinnen ziehen die von Milben befallene Brut aus den Zellen heraus und entfernen sie (g). Die gesamte Verhaltensabfolge ist aufgrund der Entscheidungsfindung durch mehrere beteiligte Arbeiterinnen flexibel. Die Sequenz kann nach Stufe 1 beendet sein (d.h. die Zellen werden untersucht, aber nicht geöffnet) oder nach Stadium 2 (d.h. zuvor geöffnete Zellen können wieder verdeckelt werden oder nicht) und sowohl das Öffnen der Zellen, als auch das erneute Verschliessen kann unvollständig durchgeführt werden (d.h. die Brutdeckel werden nur unvollständig geöffnet und/oder wieder verdeckelt). Fotos in c, d & e © Anders Lindström.

Die Vorteile der sozialen Immunität auf Ebene der Kolonie überwiegen für den Wirt daher normalerweise die Kosten in Form von verlorenen Individuen^{4,8}, insbesondere bei gut etablierten, koadaptierten Schadorganismen.

Es kann jedoch eine Neukalibrierung der individuellen und sozialen Abwehrkräfte des Wirtes erforderlich sein, wenn er einen neuartigen Parasiten überleben will. Die Kraft der sozialen Immunität ist so stark, dass diese Neukalibrierung schnell erreicht werden kann, durch einfache Verschiebungen von Verhaltensmustern, deren positive Auswirkungen durch die Sozialstruktur und die Populationsdynamik zusätzlich verstärkt werden⁹.

Diese Dynamik kann im Fall der ektoparasitären Milbe *Varroa destructor* eine Rolle spielen, die innerhalb des letzten Jahrzehnts¹⁰ den Wirt von der östlichen Honigbiene (*Apis cerana*) zur westlichen Honigbiene (*Apis mellifera*) wechselte.

Die Milbe ist heute in *A. mellifera*- Populationen weltweit¹⁰ fast allgegenwärtig und obwohl afrikanische Honigbienen (*A. m. scutellata*)-Hybriden als resistent bekannt sind^{3,11,12}, gilt sie als die primäre biologische Ursache für große Kolonieverluste von europäischen Honigbienen weltweit^{10,13-15}.

Diese dramatischen Auswirkungen werden hauptsächlich durch von Milben übertragene Viren hervorgerufen, wobei die Schädigendsten zu Varianten des Deformed Wing Virus (DWV)¹⁶⁻¹⁸ (Verkrüppelte-Flügel-Virus) zählen, welche die Wintersterblichkeit der Bienen steigern und innerhalb von etwa zwei Jahren zum Zusammenbruch der Völker führen können^{10,13,16}. Dennoch wurden kürzlich einige Populationen der europäischen Honigbiene in *V. destructor*- positiven Regionen gefunden, die den Milbenbefall auf natürliche Weise überlebt haben, ohne Behandlung seit mehr als 17 Jahren^{3,19-23}.

1)Institute of Bee Health, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland. 2)LLH Bee Institute, Erlenstr.9, 35274, Kirchhain, Germany. 3)Norwegian Beekeepers Association, Dyrskuev, 20, NO-2040, Kløfta, Norway. 4)Department of Animal and Aquacultural Sciences, Norwegian University of Life Sciences, PO Box 5003 NMBU, NO- 1432, Kløfta, Ås, Norway. 5)J.J. Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agriculture, 31000, Osijek, Croatia. 6)INRA, UR 406 Abeilles et Environnement, Avignon, France. 7)Department of Ecology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 750 07, Sweden. 8)Agroscope, Schwarzenburgstrasse 161, 3003, Bern, Switzerland. Melissa Oddie and Ralph Buechler contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.O. (email: melissa.oddie@vetsuisse.unibe.ch) or R.B. (email: ralph.buechler@ilh.hessen.de)

Diese Populationen (bezeichnet von nun an als "Überlebensvölker"), welche *V. destructor*- Befall natürlich und ohne Behandlungen überleben, stammen von ursprünglich milbenanfälligen, nicht resistenten Beständen, welche über mehrere Generationen hinweg die Überlebensfähigkeit entwickelt haben^{3,19-23}. Es ist bekannt, dass regelmäßige Behandlungen durch die Imker die natürliche Selektion der Honigbienen einschränken²⁴, und da *V. destructor* eine erst kürzlich erfolgte Invasion ist^{10,25}, deutet dies auf eine schnelle Wirtsanpassung hin, die in all diesen Populationen fast gleichzeitig stattfand. Frühere Studien haben gezeigt, dass der Fortpflanzungserfolg der Milbe bei diesen Populationen so weit reduziert ist, dass ein Überleben der Kolonien möglich ist^{22,23}. Allerdings gibt zum jetzigen Zeitpunkt keine klare Antwort auf die Ursache der reduzierten Milbenvermehrung bei solchen überlebenden Bienenvölkern, seien sie natürlicherweise angepasst oder selektiv gezüchtet^{3,26}.

Es gibt zwei Stadien, in denen die soziale Immunität auf Milben einwirken kann: während sie umherwandern und sich aktiv von erwachsenen Bienen ernähren oder während der Reproduktionsphase, wenn sie in den verdeckelten Wirtsbrutzellen sind²⁷. Ausgewachsene Arbeiterinnen entfernen Milben von sich selbst und/oder von Nestmitgliedern durch besonders ausgeprägtes Pflegeverhalten "Grooming", dies trägt auch nachweislich zur Reduzierung des Milbenbefalls bei *A. mellifera* bei²⁸.

Bei den bisher untersuchten, natürlich überlebenden Honigbienen Populationen war dieses Merkmal jedoch nur in geringer Häufigkeit ausgeprägt^{3,22,23,29} und trägt nicht zu einem verminderten Reproduktionserfolg der Milbe bei. Die soziale Immunität, die auf die Brutzellen abzielt (Abb. 1), beinhaltet die Entfernung von milbenbefallener Brut mit einer bemerkenswerten Treffsicherheit für Zellen mit sich darin vermehrenden Muttermilben, ein Verhalten, das im Rahmen der varroa-sensitiven Hygiene (VSH)^{27,30} definiert ist. Durch die Verringerung des Anteils sich erfolgreich reproduzierender Milben in der Kolonie kann die Befallsrate gesenkt werden^{30,31}.

Die Entfernung von Arbeiterinnenbrut ist jedoch nur bis zu einem gewissen Grad nachhaltig und setzt voraus, dass die Kolonie über ausreichende Ressourcen verfügt, um sie zu ersetzen. Wenn die Arbeiterinnen schneller verloren gehen als sie ersetzt werden, gerät die Kolonie in eine negative Spirale und verendet^{7,10}. Selbst kleinere Verluste können die Konkurrenzfähigkeit beeinträchtigen.

Über natürliche Auslese wird daher mit größerer Wahrscheinlichkeit eine weniger kostspielige Lösung entwickelt, da sie das Sterblichkeitsrisiko verringert und die Konkurrenzfähigkeit der Kolonien erhöht^{10,13}. Da *V. destructor* empfindlich auf subtile Verschiebungen der vom Wirt stammenden [Kairomone](#), der Temperatur und der Feuchtigkeit reagiert³²⁻³⁴, kann das einfache Öffnen der Brutzellen ausreichen, um die Reproduktion der Milbe zu beeinträchtigen.

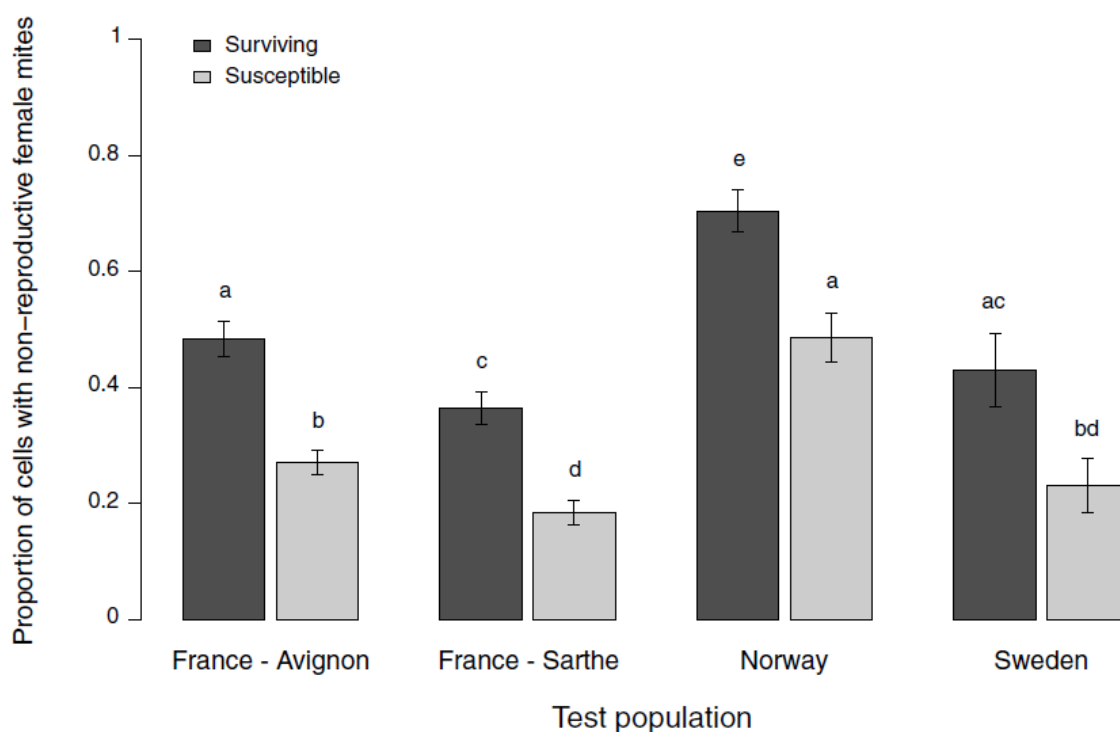
Dieses Öffnen ("Uncapping") von verdeckelten Brutzellen ohne das Ausräumen der Brut, gefolgt vom Wieder-Verdeckeln ("Recapping", Abb. 1), ist weit verbreitet bei allen Honigbienen-Populationen, die auf dieses Verhalten speziell untersucht wurden^{30,35-37} und ist mit geringen Kosten für die Kolonie verbunden, weil dadurch keine Brut geopfert wird.

Videoaufnahmen³⁸ bestätigen das Öffnen- (Abb. 1d) und Wiederverdeckelungs- Verhalten (Abb. 1e) sowie die sichtbaren Anzeichen, die es im Inneren des Zelldeckels erkennbar hinterlässt (Abb. 1f).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen Recapping und dem reduzierten Reproduktionserfolg der Milbe wurde von einer für VSH31 gezüchteten Population berichtet. Die Anwesenheit und die

möglichen Auswirkungen von Recapping auf den Reproduktionserfolg der Milbe sind bei den Honigbienen-Populationen, die den Milbenbefall durch natürliche Selektion überleben, noch nicht untersucht worden.

Wenn Recapping die Fitness von Honigbienenvölkern verbessert, indem es den Fortpflanzungserfolg der Milben verringert, dann können wir adaptive Unterschiede dieses Verhaltens in denjenigen überlebenden Populationen erwarten, die natürlicher Selektion unterworfen sind: Häufigeres Recapping und ein verbessertes Abzielen auf milbenbefallene Zellen, verglichen mit konventionell geführten, auf Milben anfällig reagierenden Kontrollvölkern.



(Beschreibung links: Anteil von Zellen mit nicht- reproduzierenden Muttermilben)

Abbildung 2. Statistisch bereinigte, durchschnittliche Anteile (+/-SE) von verschlossenen Brutzellen, die von einer einzigen Muttermilbe *V. destructor* befallen sind, welche sich nicht reproduziert haben in überlebenden sowie lokalen, anfälligen Honigbienenvölkern *A. mellifera*, in Norwegen, Schweden und Frankreich (Avignon und Sarthe). Die Anteile von nicht-reproduzierenden Milben waren in den überlebenden Völkern signifikant und beständig höher als in den anfälligen (GLMM, $n = 74$ Kolonien, siehe Tabelle 1, Ergänzende Informationen Tabelle 3). Die verschiedenen Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hin ($p < 0,05$). Es gab auch signifikante Unterschiede zwischen den Testpopulationen (GLMM: $\chi^2 = 48,72$, $p < 0,001$, $n = 74$).

Tabelle 1

Response variable	Explanatory variable	<i>n</i>	DF	χ^2	<i>P</i> Value
Rate of non-reproduction	Population	74	3	48.72	1.49 e 10 ⁻¹⁰
	Resistance level		1	51.14	8.58 e 10 ⁻¹³
	Brood stage		1	1.19	0.28

Faktoren für die Parameter der Fortpflanzung ektoparasitischer Milben, *V. destructor*, innerhalb überlebender sowie anfälliger Wirtspopulationen der europäischen Honigbienen-Unterart *A. mellifera*. Die Nicht- Reproduktionsrate wurde über die Anzahl der befallenen Zellen ermittelt, die keine lebensfähigen weiblichen Nachkommen produzieren konnten. Als Population bezeichnen wir Gruppen von unabhängigen Kolonien, die in verschiedenen Regionen beprobt wurden: Frankreich (Avignon, Sarthe), Norwegen und Schweden.

Das Resistenzniveau wird als Populationen überlebender oder anfälliger Bienen innerhalb derselben Untersuchungsregion beschrieben. Das Brutstadium war das mittlere geschätzte Alter der pro Volk untersuchten, mit einem Deckel versehenen Brut. Ein GLMM wurde an die Daten angepasst, wobei ein Volk als Individuum gilt und die Kolonie-ID zufällig ist. Eine Binomialverteilung mit einem Response-Vektor wurde verwendet, um den Anteil der Nicht-Reproduktion zu ermitteln.

Hierzu führten wir eine Studie durch, um die Häufigkeit von Recapping, das selektive Abzielen auf milbenbefallene Zellen und den Effekt auf den Anteil erfolgreich vermehrungsfähiger Milben in vier natürlich überlebenden Honigbienen-Populationen zu untersuchen: zwei in Frankreich, eine in Norwegen und eine in Schweden, im Vergleich zu anderen lokalen, nicht angepassten Bienenpopulationen.

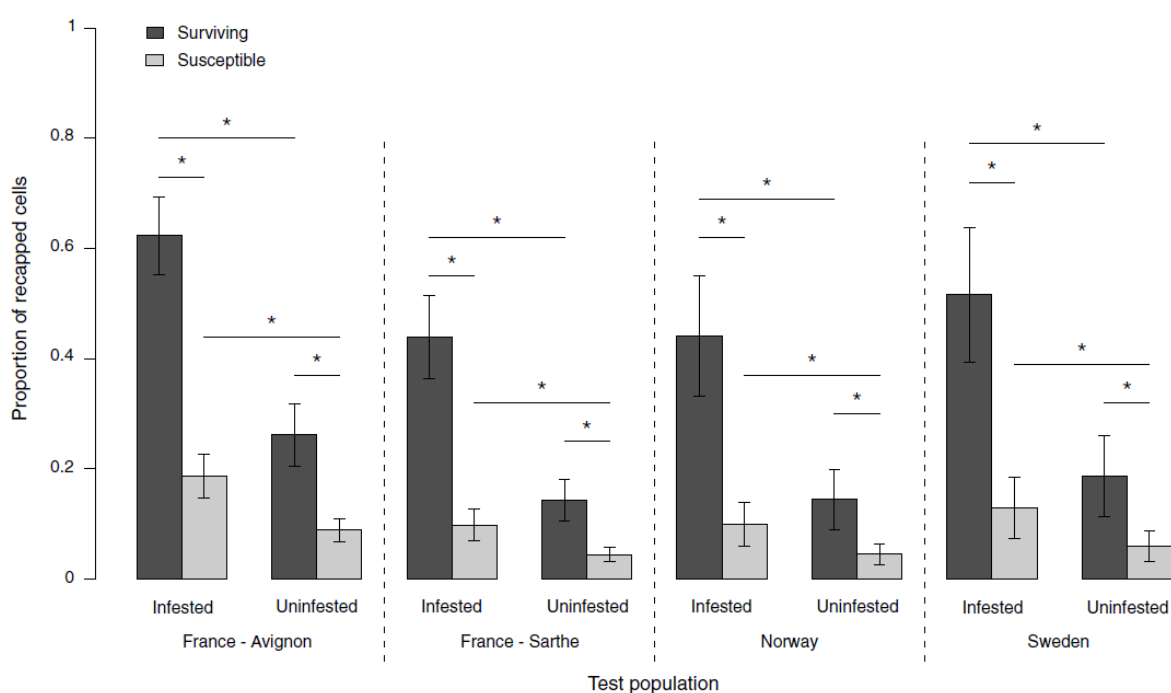
Es wurden Zellen geöffnet und ihr Inhalt erfasst, einschließlich der Entwicklungsstadien der Honigbienenpuppen und aller Milben. Die Anzahl der untersuchten, infizierten/geöffneten Zellen in jeder Population war wie folgt: Frankreich-Avignon (686/23.362); Frankreich-Sarthe (726/20.954); Norwegen (833/3.430); Schweden (116/868).

Von den Arbeiterinnen, die das Uncapping- Verhalten (Anm. d. Übers.: Öffnen des Brutzeldeckels) zeigen, ist bekannt, dass sie gezielt befallene Zellen mit sich reproduzierenden Milben herausuchen³¹. Dies führt zu einer tendenziellen Ausrichtung der Selektion, weil Zellen mit nicht-reproduktiven Milben ignoriert werden (nicht geöffnet). Um dieser möglichen Verzerrung durch den Einfluss der Bienen Rechnung zu tragen, haben wir die Uncapping- Studie bei den natürlich überlebenden Populationen um ein künstliches Uncapping- Experiment ergänzt (29 Brutproben mit insgesamt 1905 einzelnen befallenen Zellen, 769 von den Bienen wieder geöffneten Zellen und 1136 Kontrollzellen). Der Versuch wurde konzipiert, um die direkte Auswirkung des Öffnens des Zelldeckels auf den Reproduktionserfolg der Milbe ohne jegliche Selektionsverzerrung durch die Pflegebienen zu ermitteln. Durch diese kausale Überprüfung wurde die korrelierende Studie für Recapping als ein Mechanismus zur Verringerung des Reproduktionserfolgs der Milbe ergänzt.

Ergebnisse

Reproduktionserfolg der Milbe. Die Forschungsdaten zeigen, dass der Anteil der sich nicht reproduzierenden weiblichen Milben bei allen natürlich überlebenden Honigbienen-Populationen im Vergleich zu lokalen, anfälligen Völkern signifikant erhöht waren, der Reproduktionserfolg war um 10-30% reduziert (Abb. 2, Tabelle 1, $\chi^2 = 51,14$, $p < 0,001$).

Von allen untersuchten Populationen hatte die norwegische, Varroa- überlebende Population den höchsten Anteil an nicht reproduktiven weiblichen Milben, mit einer durchschnittlichen Anzahl lebensfähiger weiblicher Nachkommen von 0,84 pro Muttermilbe (Abb. 2, Tabelle 1, ergänzende Informationen in Tabelle 3).



(Beschreibung links: Anteil der erneut verdeckelten Zellen)

Abbildung 3. Bereinigte durchschnittliche Anteile (+/-SE) von natürlich, erneut verdeckelten Arbeiterinnen Brutzellen, die mit *V. destructor*-Milben befallen oder nicht befallen sind, in lokalen Völkern überlebender und anfälliger europäischer Honigbienen, *A. mellifera*, in Norwegen, Schweden und Frankreich (Avignon und Sarthe) (n = 74 Völker).

In allen Populationen wiesen die überlebenden Bienenvölker sowohl eine signifikant höhere Häufigkeit von Recapping, als auch eine signifikante Zielgenauigkeit auf milbenbefallene Zellen im Vergleich zu den lokalen, anfälligen Bienenvölkern auf (GLMM, siehe Tabelle 2, Ergänzende Informationen Tabelle 4). Sternchen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hin ($p < 0,05$). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testpopulationen (GLMM: $\chi^2 = 5,43$, $p = 0,143$, $n = 74$).

Tabelle 2

Response variable	Explanatory variable	<i>n</i>	DF	χ^2	<i>P</i> Value
Recapping	Population	74	3	5.43	0.14
	Resistance level		1	23.11	1.52 e 10 ⁻⁶
	Cell type		1	439.8	<2.2 e 10 ⁻¹⁶
	Brood stage		1	4.96	0.026
	Cell type × Resistance level		1	34.54	4.19 e 10 ⁻⁹

Faktoren für die Häufigkeit des Recapping-Verhaltens innerhalb überlebender und anfälliger Populationen der Europäischen Honigbienen Unterart, *A. mellifera*. Recapping wurde über die Anzahl der erneut verdeckelten Zellen ermittelt, die sich zwischen den präparierten Zellen in jeder Kolonie befanden. Als Population wird eine Gruppe von unabhängigen Kolonien beschrieben, die in verschiedenen Regionen beprobt wurden: Frankreich (Avignon, Sarthe), Norwegen und Schweden. Das Resistenzniveau (Resistance level) beschreibt Populationen von überlebenden oder anfälligen Bienen innerhalb derselben Untersuchungsregion. Der Zelltyp (Cell type) wird beschrieben als Zustand von befallenen oder nicht befallenen Brutzellen. Das Brutstadium (Brood stage) war das in jedem Volk untersuchte, durchschnittliche geschätzte Alter der verdeckelten Brut. Ein GLMM wurde an die Daten angepasst, wobei ein Volk als Individuum gilt und die Kolonie-ID zufällig ist. Eine Binomialverteilung mit einem Response-Vektor wurde verwendet, um den Anteil des Recapping zu ermitteln.

Recapping

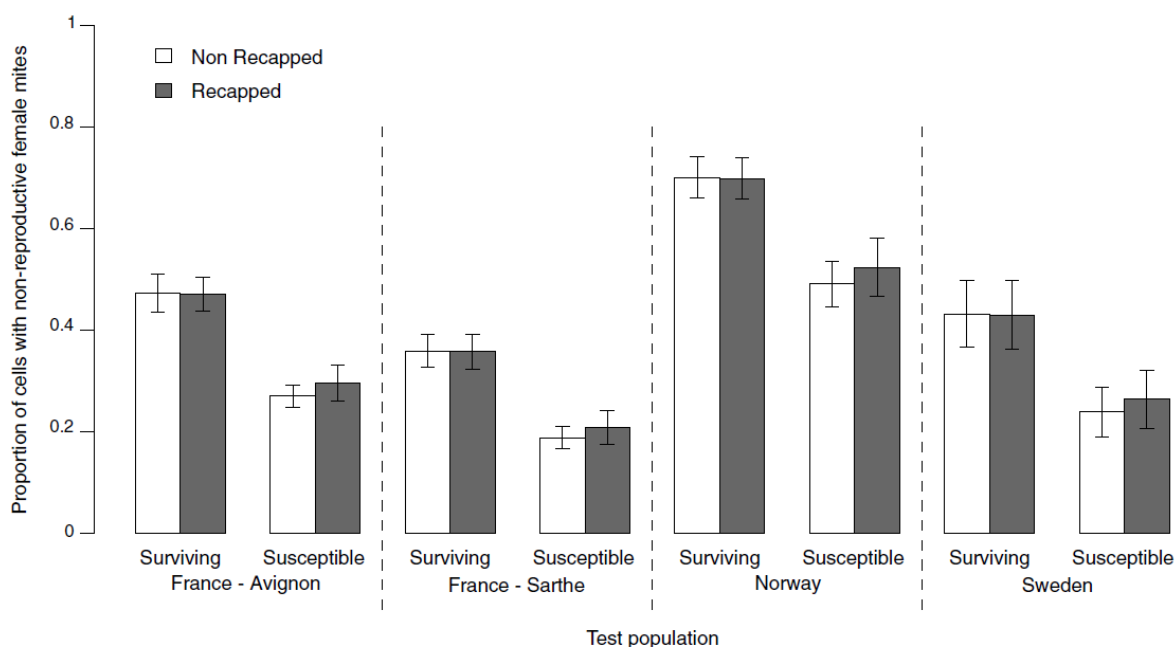
Die Häufigkeit des Recapping und das spezifische Abzielen auf milbenbefallenen Zellen waren in überlebenden Kolonien signifikant höher als in den lokal anfälligen Kontrollgruppen (Abb. 3, Tabelle 2, Zusatzinformationen Tabelle 4, Häufigkeit: $\chi^2 = 23,11$, $P < 0,001$, Zielgröße: $\chi^2 = 34,54$, $p < 0,001$). Die Recapping-Raten unter den überlebenden Populationen haben sich statistisch nicht voneinander unterschieden und die Raten unter den anfälligen Populationen waren ebenfalls vergleichbar (Tabelle S3). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den erneut verdeckelten und den unberührten Zellen in Bezug auf den Anteil der nicht reproduktiven Milben in überlebenden oder lokalen, anfälligen Populationen (Abb. 4). Im Gegensatz dazu hat das experimentelle Öffnen der Zelldeckel (da es wahllos erfolgte) gezeigt, dass Recapping die Fortpflanzungsfähigkeit der Milbe signifikant reduziert (Abb. 5, $\chi^2 = 50,231$ $p < 0,001$).

Diskussion

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen deutlich, dass Recapping in all jenen untersuchten Populationen, die aufgrund von natürlicher Selektion überleben, sowohl häufiger auftritt, als auch gezielter auf milbenbefallene Zellen ausgerichtet ist verglichen mit lokalen, anfälligen Kontrollgruppen. Die Raten von sich nicht reproduzierender *V. Destructor* waren in allen

überlebenden Populationen durchweg höher, was die Ergebnisse früherer Studien^{22,23} bestätigt und aufzeigt, dass die Anteile des reduzierten Reproduktionserfolgs nicht unähnlich sind im Vergleich zu anderen, bekannten überlebenden Populationen von europäischen und afrikanisierten Honigbienen^{3,12,39}. Die Reproduktionsrate lag bei etwa 0,84 Nachkommen pro Muttermilbe in der norwegischen Population, was übereinstimmt mit früheren Studien über natürlicherweise Varroa-überlebende, afrikanisierte Honigbienen¹¹ (0,79) und europäische Honigbienen auf einer brasilianischen Insel⁴⁰ (0,54).

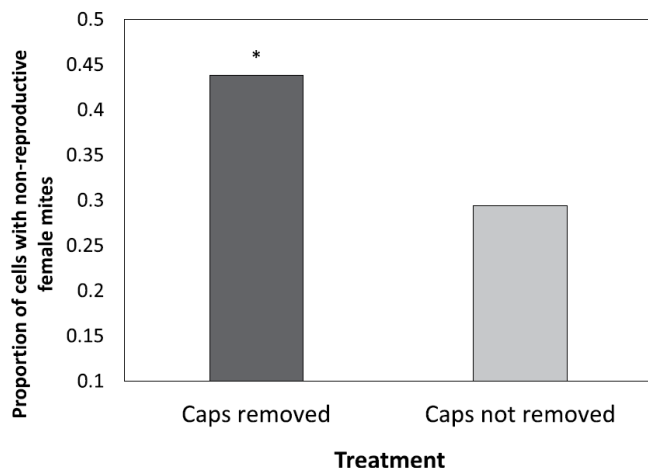
Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen an Varroa-überlebenden afrikanischen und afrikanisierten Honigbienenpopulationen überein, die ein "kahles Brutbild" mit großen Mengen ungedeckelter Brutzellen aufweisen^{11,35,38,39}.



Beschreibung links: Anteil von Zellen mit sich nicht-reproduzierenden Muttermilben

Weiß: unberührt; Grau: erneut verdeckelt; Surviving: Überlebensvölker; Susceptible: anfällige Völker

Abbildung 4. Verhältnis von nicht-reproduzierenden Milben, *V. destructor*, in natürlicherweise erneut verdeckelten („recapped“), gegenüber unberührten Arbeiterinnen-Brutzellen der vier überlebenden *A. mellifera*- Populationen und lokalen, anfälligen Populationen. Bereinigte durchschnittliche Anteile (+/-SE) nicht reproduzierender Milben in natürlich geöffneten/erneut verdeckelten Arbeiterinnen Brutzellen im Vergleich zu ungezielten Arbeiterinnen Brutzellen der vier überlebenden und lokalen, anfälligen *A. mellifera*-Populationen (n = 74 Kolonien). Es gab signifikante Unterschiede zwischen den Testpopulationen (GLMM: $\chi^2 = 50,84$, $p < 0,001$, n = 74).



Beschreibung links: Anteil von Zellen mit sich nicht-reproduzierenden Muttermilben

Unten: Treatment = Behandlung (Anm.: damit ist das experimentelle Öffnen der Zelldeckel gemeint)

Abbildung 5. Anteile der nicht reproduzierenden Milben *V. destructor*, in einzeln befallenen, künstlich geöffneten Arbeiterinnen Brutzellen der Honigbiene, *A. mellifera*. Signifikant weniger Milben konnten sich vermehren, wenn die Zelldeckel experimentell entfernt wurden (GLMM: $\chi^2 = 50,231$ $p < 0,001$, $n = 1905$ Zellen).

Dies unterstützt auch die Idee, dass Uncapping/Recapping durch erwachsene Bienen ein Verhaltensmechanismus ist, der den Milbenbefall mildert. Die Sterblichkeit der Milbennachkommen wurde in dieser Studie nicht im Detail untersucht. Es wurde jedoch bereits früher festgestellt, dass sie bei erneut verdeckelten Zellen³¹ höher ist, was die Annahme unterstützt, dass Recapping einen wirksamen Mechanismus darstellt zur Steigerung der Überlebensfähigkeit mit *V. destructor* Befall. Die Untersuchung zeigte keine Unterschiede beim Reproduktionserfolg der Milben zwischen erneut verdeckelten und unberührten Zellen, was ähnlich wie bei den für VSH31 gezüchteten Honigbienen ist. Intuitiv würde man erwarten, dass die Zahl der sich nicht vermehrenden Milben in den erneut verdeckelten Zellen steigen würde, wenn Recapping einen direkten Einfluss auf den Reproduktionserfolg der Milbe hätte.

Mit dem Wissen jedoch, dass Bienen bei der Bekämpfung von befallenen Zellen selektiv vorgehen³¹, wenn die Arbeiterinnen beim Entdeckeln ihre Bemühungen auf die Zellen mit der höchsten Milbenvermehrung konzentrieren und die Zellen mit einer geringeren Vermehrung ignorieren, können die beobachteten Vermehrungsraten der erneut verdeckelten Zellen im Vergleich zu unberührten Zellen ähnlich werden, jedoch durch andere Mechanismen.

Erneut verdeckelte Zellen hätten aufgrund der direkten Wirkung des Recapping eine niedrigere Reproduktionsrate der Milben, während Zellen mit von Natur aus niedrigen oder nicht reproduktiven Milben von den Bienen, die die befallenen Zellen öffnen, ignoriert würden und folglich in der erneut verdeckelten Kohorte unterrepräsentiert wären. Daher ist die Abwesenheit von Unterschieden im Reproduktionserfolg der Milbe zwischen erneut verdeckelten und unangetasteten Zellen aufgrund der von den Bienen verursachten Selektionsverzerrung nicht aussagekräftig.

Das experimentelle Öffnen von Brutzellen zeigte jedoch, dass Recapping den Reproduktionserfolg der Milben direkt reduzieren kann, ohne dass die Bienen dabei ihre Nestgefährten opfern müssen.

Die Wirksamkeit von Recapping als natürlichem Mechanismus zur Reduzierung des Erfolges der Milbenreproduktion konnte nur durch die Kombination der Erhebungsdaten mit der experimentellen Öffnung der Brutzellendeckel Erfolg zeigen, da letztere eine einseitige Ausrichtung auf milbenbefallene Zellen ausschloss. Unser Experiment hat gezeigt, dass das Recapping-Verhalten den Reproduktionserfolg von Milben auf Kolonieebene reduzieren kann und nicht nur damit korreliert ist.

Die Daten liefern daher klare Beweise dafür, dass Recapping ein kosteneffektiver, sozialer Immunitätsmechanismus ist, was teilweise dazu beiträgt, das natürliche Überleben der europäischen Honigbienen mit unkontrolliertem *V. destructor* -Befall zu erklären.

Wir können nicht ausschließen, dass die Entfernung der befallenen Brut³⁰ und andere Faktoren ebenfalls zum natürlichen Überleben dieser Populationen beigetragen haben könnten.

Tatsächlich ist der Phänotyp der *V. destructor* -Befall natürlicherweise überlebenden Honigbienenvölker höchstwahrscheinlich bestimmt durch eine Reihe von Wirtsmerkmalen^{19,28-30,41,42}, lokale Genotyp-Umwelt-Interaktionen⁴³, Erregervariationen⁴⁴, Ressourcenverfügbarkeit⁴⁵ sowie Bienenhaltungs- und Zuchtmanagement²⁴.

Aufgrund der raschen und parallelen Entwicklung in den vier untersuchten überlebenden Populationen und der signifikanten Auswirkungen auf den Reproduktionserfolg der Milbe scheint Recapping jedoch ein häufiger und bisher übersehener Schlüsselmechanismus für das Überleben von Kolonien zu sein.

Die Entfernung der Brut, obwohl sie möglicherweise mit Recapping verbunden ist, dürfte kein primärer Mechanismus sein, da der Verlust von Individuen die Wettbewerbsfähigkeit der Kolonie beeinträchtigen würde⁴⁶. Darüber hinaus zeigt die untersuchte norwegische Population bekanntermaßen kein gesteigertes Ausräumen der Brut²³, was darauf hindeutet, dass dies zumindest für diese Population kein bevorzugt selektierter Mechanismus für das Überleben darstellt. In scharfem Gegensatz dazu erfordert Recapping nur die Zeit und Energie, um die Wachsdeckel zu manipulieren. Es scheint daher ein viel kosteneffizienterer Mechanismus zu sein als die Entfernung der Brut, um ähnliche Ziele zu erreichen.

Um das Überleben des Bienenvolkes zu sichern, muss die Vermehrung der Milben nicht vollständig unterbunden, sondern nur soweit reduziert werden, dass ein ausreichendes Wachstum möglich wird.

Der Zeitpunkt, zu dem milbenanfällige Bienen einen überlebenden Phänotyp des Bienenvolkes entwickeln, kann derzeit auf mindestens 17 Jahre^{3,22,23,29} geschätzt werden, wobei dieser Zeitraum in der Tat kürzer sein kann. Die Geschwindigkeit der Anpassung lässt sich mit vier Punkten erklären:

(1) Das Merkmal stammt sehr wahrscheinlich aus einer Voradaptation, da das Uncapping-/Recapping Verhalten in allen bisher untersuchten Honigbienenpopulationen beobachtet wurde^{23,30,35-37,40},

(2) Verstärktes Recapping Verhalten und die gezielte Milbenbekämpfung lassen sich durch einfache Verschiebungen der Verhaltensschwellen der Arbeiterinnen erklären⁴⁷. Verhaltensänderungen in

einem sozialen Immunitätsrepertoire können schrittweise optimiert werden mit erheblichen Auswirkungen auf Ebene der Kolonie.

(3) Die „Strafe“ für das Öffnen des Deckels einer nicht befallenen Zelle ist für die Brut nicht tödlich, wodurch unvermeidliche Fehler eine viel geringere Auswirkung haben.

(4) Die Verhaltensabfolge: Auffinden/ Öffnen des Deckels/ Untersuchung/ Entfernen oder das erneute Schließen des Deckels (Abb. 1), kann von verschiedenen Arbeiterinnen durchgeführt werden, was reichlich Gelegenheit für unabhängige, nicht verknüpfte Anpassungsmöglichkeiten bietet.

Es ist wahrscheinlich, dass Recapping ein gemeinsames Merkmal vieler, wenn nicht aller Honigbienen-Populationen ist und dass die Vorfahren unserer derzeit überlebenden Populationen einzelne Kolonien waren, die sowohl eine hohe Recapping-Häufigkeit als auch Sensitivität für die Gesundheit ihrer Brut aufwiesen.

Im Lichte unserer Erkenntnisse und der Ubiquität des Recapping -Verhaltens bei Honigbienen-Populationen^{31,35-37}, scheint diese Verhaltenssequenz ein integraler Bestandteil der Brutpflege und Abwehr von Pathogenen bei *A. mellifera* zu sein. Recapping würde theoretisch für andere eusoziale Insekten mit versiegelten Brutzellen, wie z.B. die asiatischen Honigbienen, Hummeln, stachellose Bienen und soziale Wespen⁴⁹, ähnliche gesundheitliche Vorteile mit sich bringen, dies bleibt jedoch eine zu überprüfende Hypothese. Trotz vergleichsweise langer Generationsintervalle⁵⁰ ist es für eusoziale Insektenkolonien möglich, kostengünstige soziale Immunitätsmerkmale zu entwickeln durch einfache qualitative und quantitative Anpassungsänderungen im Verhalten der Arbeiterinnen. Diese verhaltensbedingte Anpassungsfähigkeit der Arbeiterinnen kann den allgemeinen Erfolg eusozialer Insekten⁶ erklären, indem die Homöostase auf Kolonieebene in Zeiten schneller Umweltveränderungen befördert wird. Mit dem Ziel einer nachhaltigen, globalen Bienenzucht scheint es klug, evolutionäres Denken anzuwenden und beim Management von Infektionskrankheiten die vorteilhaften, effizienten Mechanismen, die durch natürliche Selektion besonders begünstigt entwickelt werden, zu nutzen^{23,24}.

Methoden

Studie: Natürliches Recapping-Verhalten. *Standorte und Zeitplanung.* Folgende Kolonien der vier unabhängig voneinander überlebenden Honigbienen Populationen (*A. mellifera*) wurden seit >17 Jahren ohne Milbenbehandlung gehalten (Schweden: 18 Jahre¹⁹, Frankreich: 23 Jahre²⁰ und Norwegen: <20 Jahre²³). Ähnlich viele überlebende und lokale, anfällige Bienenvölker (Kontrollgruppen) wurden an jedem Standort untersucht. Alle Studien wurden zwischen dem örtlichen Spätsommer und Herbst durchgeführt (August bis September), wenn die lokalen *V. destructor* -Milbenpopulationen im Allgemeinen am höchsten sind. Die Königinnen aller Kolonien in der Studie waren natürlich verpaart (Standbegattung). Der Fortpflanzungserfolg der Milben und das Recapping -Verhalten wurden in den lokalen überlebenden und anfälligen Kolonien in allen vier Populationen mit ähnlichen, unten beschriebenen Methoden erfasst.

Norwegen: Es wurden Experimente mit überlebenden und anfälligen *A. m. carnica*- Kolonien an getrennten Bienenständen durchgeführt, 60 km voneinander entfernt in der Nähe von Oslo zwischen August und September 2015, wobei sich die anfälligen Kontrollgruppen innerhalb eines Imkereischutzgebietes befinden. Fünf anfällige und fünf Überlebensvölker wurden nach dem Zufallsprinzip aus ihren jeweiligen Imkereien ausgewählt. Aufgrund der Knappheit von Milben in den überlebenden

Kolonien wurden Bruträhmchen von zehn hochgradig befallenen Spendervölkern aus 50 km Entfernung zu den Versuchs- Bienenständen in die Überlebensvölker eingesetzt, um die verschiedenen Parameter erfassen zu können.

Schweden: Alle Versuchskolonien waren in Uppsala angesiedelt und wurden dort untersucht. Die anfälligen Kontrollvölker stammten aus einer lokalen Buckfast- Population, die geographisch von der Milben- überlebenden Bienenpopulation auf der Insel Gotland isoliert war. Die in dieser Studie verwendeten, Milben- überlebenden Völker enthielten Königinnen, die in der isolierten Population auf Gotland aufgezogen und dort standbegattet wurden, bevor sie in die Versuchskolonien in Uppsala eingeweiselt wurden. Vier überlebende und vier anfällige Kolonien wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt, um die Häufigkeit von Recapping und den Erfolg der Milben-Reproduktion gegen Ende September 2016 zu erfassen.

Frankreich: Zwei verschiedene überlebende und anfällige Populationen wurden in die INRA- Imkereien in Avignon, sowie in Sarthe aufgenommen und dort gehalten. Alle Beobachtungen fanden zwischen August und September in den Jahren 2015 und 2016 statt. Anfällige Königinnen stammten von gemischten lokalen *A. m. carnica* - *A. m. ligustica* oder Buckfast- Völkern. In Avignon wurden 12 Überlebensvölker und 21 anfällige Völker nach dem Zufallsprinzip aus drei verschiedenen Bienenbeständen der Region ausgewählt. Aufgrund der räumlichen Nähe von überlebenden und anfälligen Kolonien, hatten die Königinnen des überlebenden Bestandes die Möglichkeit zur Kreuzung mit anfälligen Drohnen, so dass das Überlebensmerkmal nur in der mütterlichen Linie gesichert auftreten konnte. Bei Sarthe wurden 12 überlebende und 11 anfällige Bienenvölker zufällig aus drei verschiedenen Imkereien dieser Region ausgewählt. Bei den anfälligen Völkern fand Standbegattung in Imkereien statt, die sich in einem Umkreis von mehreren Kilometern von denjenigen Imkereien befanden, in denen die Überlebensvölker angesiedelt sind.

Kontrollgruppen: Die Standortanpassung ist bekanntlich ein signifikanter Faktor für die Gesundheit und den Erfolg von Honigbienenvölkern, und sollte öfter als wichtiger Faktor berücksichtigt werden als die genetische Herkunft⁴³. Alle Kontrollgruppen wurden aufgrund ihrer geografischen Nähe zu den überlebenden Populationen ausgewählt. Von den Kontrollvölkern war bekannt, dass sie regelmäßig gegen *V. Destructor* behandelt werden mussten, weil sonst schwere Verluste zu befürchten waren.

Identifizieren erneut verdeckelter (recapped) Zellen. Das Recapping-Verhalten kann leicht als Loch im gesponnenen Kokon der verpuppten Larven erkannt werden, es reicht von der Größe eines Millimeters bis zur gesamten Fläche des Zelldeckels. Das Loch wird anschließend durch die erwachsenen Bienen mit Wachs überzogen. Dieses dann reparierte Loch ist als dunkler, matter Fleck auf der Unterseite des Zelldeckels deutlich zu erkennen, anstelle der glänzenden Beschichtung eines Kokons. Die Zellen wurden entsprechend früherer Protokolle identifiziert^{27,31}. Die verdeckelten Arbeiterinnen - Brutzellen (Abb. 1a) wurden vorsichtig mit einer Pinzette geöffnet, so dass der Zelldeckel als Ganzes erhalten blieb. Der Zelldeckel wurde dann verkehrt herum unter ein Seziernmikroskop gelegt und sorgfältig untersucht. Wenn der Kokon intakt war (Abb. 1b), wurde die Zelle als "unberührt" markiert, wenn es ein auffälliges Loch im Seidenkokon gab (Abb. 1f), wurde die Zelle als "recapped" markiert. Jede geöffnete Zelle erhielt eine binäre Einordnung im Sinne von "befallen" oder "nicht befallen".

Messung des Reproduktionserfolgs von Milben. Nachdem aller Inhalt aus der Zelle entfernt worden war, wurden die Entwicklungsstadien der Bienenbrut und aller Milben festgestellt^{22,51,52}. Es wurden nur einzelne, von einer Muttermilbe befallene Zellen in diesen Analysen berücksichtigt. Das Maß für die Reproduktion der Muttermilbe basiert auf der "effektiven Reproduktionsrate", die interpretiert wird als die potenzielle Anzahl lebensfähiger weiblicher Nachkommen pro Muttermilbe⁵². Die Nachkommen wurden nur als lebensfähig berücksichtigt, wenn sie ein ausreichendes Entwicklungsstadium hatten, um beim Schlüpfen der Wirtsbienen zu überleben, und wenn mindestens ein Männchen in der Zelle war^{52,53}. Alle Zellen, die keine Tochtermilben hatten, die diese Anforderungen erfüllten, erhielten den Wert Null; alle Zellen, die diese Anforderungen erfüllten, erhielten den Wert Eins. Die Anteile der sich erfolgreich reproduzierenden Zellen der Kolonie wurden ermittelt. Wenn keine Hinweise auf Nymphen oder Eier gefunden werden konnten, wurde die in der Zelle enthaltene Muttermilbe markiert als „nicht-reproduzierend“ und auch mit einem Wert von Null angegeben. Bienenbrut, die älter als <170 h geschätzt wurde, ist nicht berücksichtigt worden.

Präparation der Rähmchen und Analyse der Zellen. Ein Bereich von 150-300 Zellen wurde auf jedem Rähmchen seziiert mit einer Anzahl an befallenen Zellen von 10-50 pro Kolonie. Alle Kolonien trugen ein einzelnes Rähmchen zur Studie bei, während die norwegischen Kolonien jeweils zwei Rähmchen beisteuerten. Für alle Populationen wurden die Brutbefallsraten, die Häufigkeit von Recapping und der Reproduktionserfolg der Milben mit etablierten Methoden ermittelt^{22,31,52}. Die Zellen wurden mit feinen Pinzetten sorgfältig geöffnet und die Puppen vorsichtig entfernt. Am Körper haftende Milben wurden mit einem kleinen Pinsel abgebürstet. Das Zellinnere wurde ebenfalls sorgfältig ausgebürstet, um die jüngeren, weicheren Milben und Eier unbeschädigt zu erhalten. Der gesamte Inhalt der Zellen wurde sorgfältig unter dem Seziermikroskop untersucht^{22,52}. Von den schwedischen und französischen Populationen wurden frisch aus den Völkern gezogene Rähmchen untersucht. In den norwegischen Populationen wurden Bruträhmchen in überlebende und anfällige Empfänger- Völker übertragen und in der Mitte des Brutnestes platziert, kurz nachdem der Großteil der Brut verdeckelt war. Die Rähmchen wurden vor dem Einhängen kartiert und fotografiert sowie ~10 Tage danach, als der Großteil der Brut kurz vor dem Schlüpfen der erwachsenen Honigbienen stand⁵⁰. Die Rähmchen wurden dann vor dem Sezieren eingefroren.

Experimentelles Recapping. Das Experiment wurde in einer Imkerei in der Nähe von Kirchhain, Deutschland, durchgeführt. Im August 2013 wurden fünf Brutproben aus vier Völkern und im August 2014 weitere 24 aus vier Völkern entnommen. Während die Königinnen in den 2013 beprobten Kolonien ihre Eier frei legen konnten, wurden die Königinnen 2014 nacheinander für zwei Tage auf einzelnen Waben gekäfigt, um eine definierte und einheitliche Alterskohorte der Brut zu erzeugen. Das Brutstadium wurde bei der statistischen Modellbildung berücksichtigt.

Waben mit verdeckelter Arbeiterinnenbrut wurden geöffnet durch Auflegen von in geschmolzenem Wachs getränkten Leinenstreifen auf die Zelldeckel, die nach dem Anhaften wieder entfernt wurden⁵⁴. Wenn die Deckel der einzelnen Zellen nicht vollständig durch die Wachstreifen entfernt wurden, sind sie mit einer Pinzette vollständig geöffnet worden. Daher wurden alle Zellen in einem behandelten Bereich geöffnet. Die freigelegten Zellen (Behandlung) und eine ähnliche Anzahl von unberührten, versiegelten Brutzellen (Kontrolle) wurden auf Plastikfolien markiert. Unmittelbar nach dem Öffnen der Zelldeckel wurden die Waben wieder an ihre ursprüngliche Position ins Brutnest der Muttervölker gesetzt und wurden von den erwachsenen Bienen erneut verdeckelt (Recapping). Die Waben blieben in ihren Völkern, bis sich die Bienen nahe zu ihrem natürlichen Schlupfzeitpunkt

entwickelt hatten⁵⁰. Daher variierte der Zeitraum, in dem diese Zellen unverschlossen blieben, bis zu fast einer Woche. Dies entspricht natürlichen Bedingungen, weil es sehr wahrscheinlich ist, dass Recapping zu jedem Zeitpunkt vom Verdeckeln bis zum Schlüpfen auftreten kann und bei einigen Zellen sogar mehrfach vorkommen kann. Je nach dem Alter der Brut zum Zeitpunkt der experimentellen Öffnung der Zelldeckel wurden die Waben nach 4-10 Tagen entnommen und sofort in einen Tiefkühler (-18 °C) gebracht, wo sie bis zum Sezieren verblieben.

Die einzelnen Brutzellen wurden geöffnet und unter einem Mikroskop mit etwa 10-facher Vergrößerung inspiziert. Nur ältere Puppen mit violetten oder schwarzen Augen (170+ Stunden nach dem Verschließen)⁵⁰ wurden berücksichtigt und sorgfältig auf *V. destructor*- Befall und Reproduktionserfolg untersucht. Die Brutbefallsrate wurde berechnet als die Anzahl der befallenen Zellen geteilt durch die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen. Zellen, die von einer einzelnen Muttermilbe befallen waren, wurden als fortpflanzungsfähig eingestuft, wenn mindestens eine weibliche Deutonymphe oder eine erwachsene Tochter-Milbe vorhanden war. Andernfalls wurden sie als nicht reproduktiv eingestuft. Die Rate der nicht-reproduktiven Zellen wurde berechnet als die Anzahl der nicht-reproduktiven Zellen geteilt durch die Gesamtzahl der einzelnen befallenen Zellen.

Statistische Analysen. Alle statistischen Analysen und Zahlen wurden in der R-Umgebung erstellt (Version 3.3.1)⁵⁵. Für die Beschreibung von Recapping und Nicht-Reproduktion in den vier europäischen Populationen, wurden die Bienenvölker als statistisches Individuum betrachtet, da die Merkmale von Interesse auf der Ebene der Kolonie zum Ausdruck kommen. Aufgrund der Art der Versuchsanordnungen wurden Analysen mit allgemeinen linearen Modellen mit gemischten Effekten durchgeführt (GLMEM®) - Paket *lme4*)⁵⁶. Der Anteil der erneut verdeckelten oder Zellen mit nicht-reproduzierenden Milben wurde durch einen Response-Faktor dargestellt und eine Binomialverteilung (Link: logit). Zu den festen erklärenden Variablen gehörte die Population (Frankreich Avignon, Frankreich Sarthe, Norwegen, Schweden), die Resistenzstufe (überlebend oder anfällig), der Befallsstatus (befallen oder nicht - nur für das Recapping) und das Brutstadium, die Kolonie-ID wurde als ein Zufallsfaktor betrachtet. Restbestände und Überdispersion wurden mit dem *RVAideMemoire*-Paket⁵⁷ analysiert. Paarweiser Vergleich zwischen Gruppen und Schätzungen der bereinigten Mittelwerte wurden mit dem *lsmeans*-Paket⁵⁸ durchgeführt.

Verfügbarkeit von Materialien und Daten. Alle gesammelten Daten sind in den Zusatzinformationen oder auf Anfrage bei den entsprechenden Autoren erhältlich.

Literaturhinweise

1. Moritz, R. & Southwick, E. E. *Bees as superorganisms: an evolutionary reality*. (Springer Science & Business Media, 2012).
2. Cremer, S., Armitage, S. A. & Schmid-Hempel, P. Social immunity. *Curr. Biol.* 17, R693–R702 (2007).
3. Locke, B. Natural Varroa mite-surviving *Apis mellifera* honeybee populations. *Apidologie* 47, 467–482 (2016).
4. Evans, J. D. & Spivak, M. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S62–S72 (2010).
5. Mondet, F. *et al.* Specific cues associated with honey bee social defence against *Varroa destructor* infested brood. *Sci. Rep.* 6, 25444 (2016).
6. Nowak, M. A., Tarnita, C. E. & Wilson, E. O. The evolution of eusociality. *Nature* 466, 1057 (2010).

7. Sumpter, D. J. & Martin, S. J. The dynamics of virus epidemics in *Varroa*-infested honey bee colonies. *J. Anim. Ecol.* 73, 51–63 (2004).
8. Meunier, J. Social immunity and the evolution of group living in insects. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370, 20140102 (2015).
9. Rothenbuhler, W. C. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F 1 and backcross generations to diseasekilled brood. *Am. Zool.* 4, 111–123 (1964).
10. Rosenkranz, P., Aumeier, P. & Ziegelmann, B. Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S96–S119 (2010).
11. Martin, S. J. & Medina, L. M. Africanized honeybees have unique tolerance to *Varroa* mites. *Trends Parasitol.* 20, 112–114 (2004).
12. Camazine, S. Differential reproduction of the mite, *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae), on Africanized and European honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79, 801–803 (1986).
13. Neumann, P. & Carreck, N. L. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 49, 1–6 (2010).
14. Nazzi, F. & Le Conte, Y. Ecology of *Varroa destructor*, the major ectoparasite of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Annu. Rev. Entomol.* 61, 417–432 (2016).
15. Kraus, B. & Page, R. E. Jr. Effect of *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae) on feral *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in California. *Environ. Entomol.* 24, 1473–1480 (1995).
16. Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L. & Neumann, P. Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 981–987 (2012).
17. Martin, S. J. *et al.* Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* 336, 1304–1306 (2012).
18. Neumann, P., Yañez, O., Fries, I. & de Miranda, J. R. *Varroa* invasion and virus adaptation. *Trends Parasitol.* 28, 353–354 (2012).
19. Fries, I., Imdorf, A. & Rosenkranz, P. Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. *Apidologie* 37, 564–570 (2006).
20. Le Conte, Y. *et al.* Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*. *Apidologie* 38, 566–572 (2007).
21. Seeley, T. D. Honey bees of the Arnot Forest: a population of feral colonies persisting with *Varroa destructor* in the northeastern United States. *Apidologie* 38, 19–29 (2007).
22. Locke, B., Conte, Y. L., Crauser, D. & Fries, I. Host adaptations reduce the reproductive success of *Varroa destructor* in two distinct European honey bee populations. *Ecol. Evol.* 2, 1144–1150 (2012).
23. Oddie, M. A., Dahle, B. & Neumann, P. Norwegian honey bees surviving *Varroa destructor* mite infestations by means of natural selection. *PeerJ* 5, e3956 (2017).
24. Neumann, P. & Blacquière, T. The Darwin cure for apiculture? Natural selection and managed honeybee health. *Evol. Applic.* 10, 226–230 (2017).
25. Griffiths, D. A. & Bowman, C. World distribution of the mite *Varroa jacobsoni*, a parasite of honeybees. *Bee World* 62, 154–163 (1981).
26. Rinderer, T. E., Harris, J. W., Hunt, G. J. & De Guzman, L. I. Breeding for resistance to *Varroa destructor* in North America. *Apidologie* 41, 409–424 (2010).
27. Boecking, O. & Spivak, M. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30, 141–158 (1999).

28. Guzman-Novoa, E., Emsen, B., Unger, P., Espinosa-Montaño, L. G. & Petukhova, T. Genotypic variability and relationships between mite infestation levels, mite damage, grooming intensity, and removal of *Varroa destructor* mites in selected strains of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Invertebr. Pathol.* 110, 314–320 (2012).
29. Locke, B. & Fries, I. Characteristics of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Sweden surviving *Varroa destructor* infestation. *Apidologie* 42, 533–542 (2011).
30. Harris, J. W., Danka, R. G. & Villa, J. D. Honey bees (Hymenoptera: Apidae) with the trait of Varroa sensitive hygiene remove brood with all reproductive stages of Varroa mites (Mesostigmata: Varroidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 103, 146–152 (2010).
31. Harris, J. W., Danka, R. G. & Villa, J. D. Changes in infestation, cell cap condition, and reproductive status of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in brood exposed to honey bees with Varroa sensitive hygiene. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 105, 512–518 (2012).
32. Le Conte, Y. & Arnold, G. Etude du thermopreferendum de *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 19, 155–164 (1988).
33. Le Conte, Y., Arnold, G. & Desenfant, P. Influence of brood temperature and hygrometry variations on the development of the honey bee ectoparasite *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *Environm. Entomol.* 19, 1780–1785 (1990).
34. Kraus, B. & Velthuis, H. High humidity in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brood nest limits reproduction of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Naturwissenschaften* 84, 217–218 (1997).
35. Corrêa-Marques, M.-H. & De Jong, D. Uncapping of worker bee brood, a component of the hygienic behavior of Africanized honey bees against the mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Apidologie* 29, 283–289 (1998).
36. Kirrane, M. J. *et al.* Phenotypic and genetic analyses of the varroa sensitive hygienic trait in Russian honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *PLoS One* 10, e0116672 (2015).
37. Villegas, A. J. & Villa, J. D. Uncapping of pupal cells by European bees in the United States as responses to *Varroa destructor* and *Galleria mellonella*. *J. Apic. Res.* 45, 203–206 (2006).
38. Boecking, O. The removal behavior of *Apis mellifera* colonies towards mite-infested brood cells as a defense mechanism against the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud, Ph. D. thesis, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, (1994).
39. Ritter, W. & De Jong, D. Reproduction of *Varroa jacobsoni* Oud. In Europe, the middle East and tropical South America. *J. Appl. Entomol.* 98, 55–57 (1984).
40. Brettell, L. & Martin, S. Oldest Varroa tolerant honey bee population provides insight into the origins of the global decline of honey bees. *Sci. Rep.* 7, 45953 (2017).
41. Loftus, J. C., Smith, M. L. & Seeley, T. D. How honey bee colonies survive in the wild: testing the importance of small nests and frequent swarming. *PLoS One* 11, e0150362 (2016).
42. Panziera, D., van Langevelde, F. & Blacquièrre, T. Varroa sensitive hygiene contributes to naturally selected varroa resistance in honey bees. *J. Apic. Res.* 56, 635–642 (2017).
43. Büchler, R. *et al.* The influence of genetic origin and its interaction with environmental effects on the survival of *Apis mellifera* L. colonies in Europe. *J. Apic. Res.* 53, 205–214 (2014).
44. Locke, B., Forsgren, E. & de Miranda, J. R. Increased tolerance and resistance to virus infections: a possible factor in the survival of *Varroa destructor*-resistant honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS One* 9, e99998 (2014).
45. Annoscia, D. *et al.* Elucidating the mechanisms underlying the beneficial health effects of dietary pollen on honey bees (*Apis mellifera*) infested by Varroa mite ectoparasites. *Sci. Rep.* 7, 6258 (2017).
46. Vandame, R., Morand, S., Colin, M.-E. & Belzunces, L. P. Parasitism in the social bee *Apis mellifera*: quantifying costs and benefits of behavioral resistance to *Varroa destructor* mites. *Apidologie* 33, 433–445 (2002).

47. Page, R. E. Jr., Robinson, G. E. & Fondrk, M. K. Genetic specialists, kin recognition and nepotism in honey-bee colonies. *Nature* 338, 576 (1989).
48. Boecking, O. & Drescher, W. In Recent research on bee pathology. *International symposium of the International Federation of Beekeepers Associations, Gent (Belgium), 5–7 Sep 1990*.
49. Wilson, E. O. *The insect societies*. (Harvard University Press, 1971).
50. Winston, M. L. *The biology of the honey bee*. (Harvard University Press, 1991).
51. Martin, S. J. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. In worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Exp. Appl. Acarol.* 18, 87–100 (1994).
52. Dietemann, V. *et al.* Standard methods for varroa research. *J. Apic. Res.* 52, 1–54 (2013).
53. Corrêa-Marques, M. H., Medina, L. M., Martin, S. J. & De Jong, D. Comparing data on the reproduction of *Varroa destructor*. *Genet. Mol. Res.* 2, 1–6 (2003).
54. Siceanu, A. The artificial decapping of honey bee brood for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. parasite. *Apicata* 31, 45–50 (1996).
55. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria., <http://www.R-project.org> (2008).
56. Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. & Walker, S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv preprint arXiv:1406.5823* (2014).
57. Hervé, M. RVAideMemoire: Diverse basic statistical and graphical functions. R package version 0.9-45-2. *Computer software*, <https://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire> (2015).
58. R. Length, M. H. M. lsmeans: least-squares means. R package version 2.13. <http://CRAN.R-project.org/package=lsmeans> (2014).

Danksagungen

Die Autoren möchten den Imkern für den Zugang zu den überlebenden Bienen danken.

Anders Lindström vom schwedischen Veterinärinstitut (SVA) sei gedankt für die Bereitstellung der in Abb. 1 verwendeten Fotos. In Frankreich danken wir den Mitgliedern des BeeStrong-Konsortiums. Finanzielle Unterstützung wurde M.O. und P.N. von der Ricola Foundation - Natur und Kultur gewährt, an F.M. und Y.L.C. durch das französische Landwirtschaftsministerium (P3A BeeStrong-Stipendium) sowie vom Persephone Charitable and Environmental Trust, an B.D. vom Norwegischen Forschungsrat (MAT-SLF), und an B.L. durch den Schwedischen Forschungsrat FORMAS (Dnr. 2016-00481) und das Schwedische Landwirtschaftsministerium (Nationella honungsprogrammet, Dnr. 3.2.18-4638/16).

Beiträge der Autoren

M.O., R.B., B.D., M.K., Y.L.C., B.L., J.D.M., F.M. und P.N. konzipierten und gestalteten die Experimente. M.O., R.B., M.K., B.L., Y.L.C., B.D. und F.M. führten die Experimente durch. M.O. und F.M. analysierten die Daten und bereiteten die Abbildungen vor. M.O., R.B., J.D.M., F.M. und P.N. haben die Abhandlung geschrieben. Alle Autoren haben die Entwürfe der Veröffentlichung überprüft.

Zusätzliche Informationen

Ergänzende Informationen zu dieser Veröffentlichung finden Sie unter <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26001-7>.

Interessenskonflikte: Die Autoren bekunden keine Interessenskonflikte.

Anmerkung des Verlags: Springer Nature bleibt neutral gegenüber gerichtlichen Ansprüchen in Bezug auf veröffentlichte Karten und institutionelle Zugehörigkeiten.

Open Access Der Artikel steht unter einer Creative Commons Attribution 4.0 International-Lizenz, welche die Nutzung, Teilen, Anpassung, Verbreitung und Vervielfältigung in jedem Medium oder Format erlaubt, solange Sie den/die Originalautor(en) und die Quelle angemessen würdigen, ein Link zur Creative Commons-Lizenz beifügen, und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die Bilder oder anderes Material von Dritten sind in der Creative-Commons-Lizenz des Artikels eingeschlossen, es sei denn, es wird in einem entsprechenden Hinweis anders angegeben. Wenn das Material nicht in der Creative-Commons-Lizenz des Artikels enthalten ist und Ihre beabsichtigte Verwendung nicht erlaubt ist durch die gesetzliche Regelung oder über die erlaubte Nutzung hinausgeht, müssen Sie die Genehmigung direkt beim Urheberrechtsinhaber beantragen. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, besuchen Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© Der/die Autor(en) 2018

Anm. d. Übers. – Anmerkung der Übersetzerin: bei den Grafiken und Tabellen habe ich die Übersetzung der Legende unten angefügt. Bitte beachten Sie auch die original Publikation mit einer Fülle an Links zu den Autoren und deren anderen Publikationen.