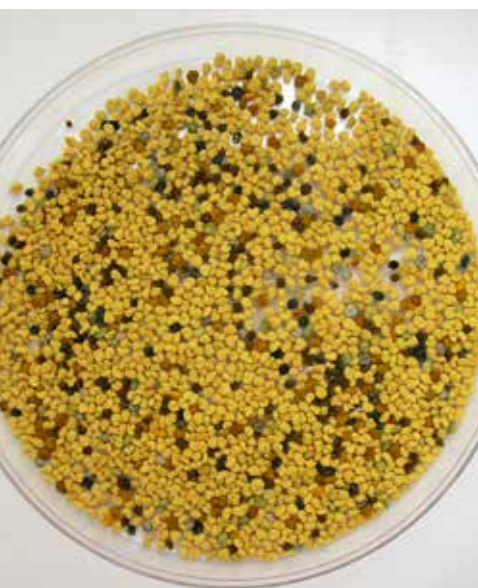


Inventering av risken för förgiftning av bin med växtskyddsmedel av typen neonicotinoider under svenska förhållanden

Slutrapport 2015



- Vi såg inga negativa effekter på honungsbinas samhällstillväxt, hälsa och överlevnad.
- För vilda bin (jordhumlor och röda murarbin) såg vi negativa effekter på samhällstillväxt och reproduktion.
- Honungsbin var i vårt fall ingen representativ art för att avgöra om växtskyddsmedlet har en negativ påverkan på andra arter av bin.

Foto: Maj Rundlöf

Inventering av risken för förgiftning av bin med växtskyddsmedel av typen neonikotinoider under svenska förhållanden

EU har sedan 2013 begränsat användningen av tre neonikotinoider i grödor som är attraktiva för bin. En stor del av den kunskap vi har idag om hur bin påverkas av neonikotinoider kommer från laboratoriestudier av framförallt honungsbin som har matats med växtskyddsmedel. I ett forskningsprojekt har forskare från Lunds universitet och SLU i samarbete med Jordbruksverket undersökt hur ett växtskyddsmedel i gruppen neonikotinoider påverkar både honungsbin och vilda bin ute i jordbrukslandskapet. Den här rapporten sammanfattar projektets resultat.

Författare

Maj Rundlöf¹, Riccardo Bommarco², Ingemar Fries², Henrik G. Smith^{1,3}
och Thorsten Rahbek Pedersen⁴

¹ Lunds universitet, Biologiska institutionen, 223 62 Lund

² Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för ekologi, 750 07 Uppsala

³ Lunds universitet, Centrum för miljö- och klimatforskning, 223 62 Lund

⁴ Jordbruksverket, 551 82 Jönköping

Sammanfattning

I det här forskningsprojektet har vi undersökt hur ett växtskyddsmedel i gruppen neonikotinoider påverkar både honungsbin och vilda bin ute i jordbrukslandskapet. Studien kunde inte påvisa negativa effekter av neonikotinoiden på honungsbin, men fann negativa effekter på vilda bin. Det är allvarligt eftersom vilda bin är viktiga för pollineringen av både grödor och vilda växter. Vilda bin är i Sverige humlor och solitärbin.

Växtskyddsmedel används för att skydda till exempel raps mot insektsskadegörare. Neonikotinoider är sådana växtskyddsmedel mot insekter. De är systemiska, vilket betyder att de tas upp av växten och sprids till alla dess delar, även till pollen och nektar som är den huvudsakliga födan för bin. Neonikotinoider har visat sig kunna påverka bins hälsa och EU har sedan 2013 begränsat användningen av tre neonikotinoider i grödor som är attraktiva för bin. En stor del av den kunskap vi har idag om hur bin påverkas av neonikotinoider kommer från laboratoriestudier av framförallt honungsbin som har matats med växtskyddsmedel.

Stora kunskapsluckor om hur växtskyddsmedel påverkar bin

Några av de viktigaste frågorna är hur dessa växtskyddsmedel påverkar bin, och vilda bin i synnerhet, i verkliga jordbrukslandskap. För att fylla den här kunskapsluckan undersökte vi hur användningen av neonikotinoiden klotianidin (Elado FS 480, Bayer CropScience) i vårrapsfält i Skåne, Halland och Blekinge, påverkar tre arter av bin. Av de 16 vårrapsfälten valdes hälften av fälten slumpmässigt ut för att bli sådda med utsäde med växtskyddsmedlet, medan den andra hälften av fälten inte var behandlade.

Vi undersökte:

- honungsbi- och humlesamhällens utveckling
- honungsbisamhällens honungsproduktion
- honungsbisamhällens vinteröverlevnad
- parasiter och sjukdomar hos honungsbin
- humlors flygturer vid födosök
- reproduktion hos jordhumlor och röda murarbin
- de olika biarternas användning av rapspollen
- halten av klotianidin i pollen, nektar och bin.

Resultaten blev olika för de undersökta arterna

Vi såg en tydligt negativ påverkan på de vilda binas tillväxt och förmåga till reproduktion vid behandlade rapsfält. Dessutom fanns det färre vilda bin i de behandlade rapsfälten. Vi såg inte motsvarande påverkan på honungsbin. Pollenprover från de tre biarterna bekräftade att alla använde rapspollen som mat. Prover på pollen, nektar och bin från de betade fälten innehöll i genomsnitt 2-14 miljarddelar klotianidin. Vid de behandlade fälten var halten av klotianidin ungefär dubbelt så hög 2013 som 2014. Skillnaderna i halten mellan åren visar varför det är viktigt med fleråriga försök i samband med riskbedömning. I de flesta fallen hittade vi inte något klotianidin i proverna från fält som inte var behandlade.

Vilda bin

Humlesamhällena växte mycket sämre vid behandlade fält jämfört med de obehandlade fälten. De producerade också färre nya drottningar och hanar eller arbetare. Speciellt de nya drottningarna är viktiga, eftersom det endast är dessa drottningar som övervintrar och bildar nya samhällen på våren.

De utplacerade röda murarbihonorna byggde bon och födde upp nya bin vid sex av de åtta kontrollfälten, men inte vid något av de behandlade fälten. Dock var det endast ett litet antal röda murarbin som placerades ut vid varje fält, vilket gör att det finns en stor osäkerhet i detta resultat.

Honungsbin

Honungsbisamhällena växte sig lika stora, producerade lika mycket honung och överlevde vintern lika bra, oavsett rapsfältets behandling. Det fanns inga synbara indikationer på att klotianidinbehandlingen i fälten hade en negativ påverkan på honungsbina genom parasiter och sjukdomar.

Våra resultat har betydelse för regleringen av användningen av neonikotinoider och för bedömningen av miljöriskerna.

Summary

Neonicotinoid insecticides are used to treat seeds, for example in oilseed rape, to protect young plants from pest insects. The neonicotinoids are systemic, which means that they are taken up by the plant and spread to all its parts, including pollen and nectar which are major foods for bees. Sublethal doses of neonicotinoid insecticides have previously been shown to negatively impact the health of bees, with most studies focusing on honey bees and artificially feeding bees the compounds. The European Union has, because of suspected negative effects on bees, introduced a moratorium on three neonicotinoids as seed coating in crops that attract bees, to allow for further studies on their environmental impacts. One of the key questions is how neonicotinoids influence bees, and wild bees in particular, in real agricultural landscapes. To address this knowledge gap, we designed a study system of 16 spatially separated (>4 km) spring oilseed rape fields in southern Sweden during 2013. Eight of the fields were randomly assigned to be sown with seeds coated with Elado FS 480 (Bayer CropScience), containing the systemic neonicotinoid clothianidin and the non-systemic pyrethroid beta-cyfluthrin, and the other eight fields were used as untreated controls, to assess neonicotinoid residues and impacts on three bee species. Six equally sized *Apis mellifera* colonies, six commercially bred *Bombus terrestris* colonies, and 27 cocoons of *Osmia bicornis* were placed at each field. Ten of the farmers and an additional new field were included in follow up studies 2014. During 2014, four equally sized *A. mellifera* colonies, from the year before, were placed at each field, with colonies placed at the same treatment both years. Colony development was monitored for honey bees and bumble bees, honey production, winter survival and pathogens and diseases for honey bees, foraging efficiency for bumble bees and reproduction for bumble bees and solitary bees. Exposure to clothianidin was estimated by the amount of oilseed rape pollen collected by all three bee species and by the clothianidin concentrations detected in honey bee collected pollen and nectar and bumble bee collected nectar. All three bee species collected oilseed rape pollen, to varying degrees. Five neonicotinoids, including clothianidin, were detected in the samples. Samples of pollen, nectar and bees from the treated fields contained on average 2-14 ppb clothianidin. At the treated fields the clothianidin concentrations were approximately twice as high 2013 compared to 2014. Samples from control fields contained no detectable clothianidin in most cases. Honey bee colonies grew equally large, produced equal amount of honey and survived the winter equally well, independent of the seed treatment in the oilseed rape fields. There was no indication that the insecticide seed treatment in the field had a negative influence on the honey bees through pathogens and diseases. In contrast, the bumble bee colonies at treated fields grew much less compared to colonies at control fields and produced fewer new queens and workers/males. Bumble bees had longer foraging trips at control fields, compared to treated fields, but the evidence is weak because we were able to collect very little foraging data. *O. bicornis* built brood cells at six of eight control sites, but at none of the treated sites. We conclude that seed treatment with the neonicotinoid clothianidin in oilseed rape can have strong negative influences on wild bee species, but appears not to affect honey bees. Because we assessed impacts on bees under field conditions, our findings have implications for policies regulating the use of neonicotinoids as well as for environmental risk assessments of pesticides.

Innehåll

1	Bakgrund.....	1
2	Studiens utformning.....	3
2.1	Studiens utformning: material och metoder.....	3
2.2	Studiens utformning: resultat och diskussion	4
2.3	Statistiska analyser	6
3	Honungsbiet.....	7
3.1	Honungsbiet: material och metoder.....	7
3.2	Honungsbiet: resultat och diskussion.....	8
3.2.1	Samhällstillväxt och honungsproduktion under somrarna 2013-2014	8
3.2.2	Vinterdödlighet och bistryrka våren 2014.....	10
3.2.3	Parasiter och sjukdomar hos honungsbin.....	11
4	Den mörka jordhumlan	20
4.1	Jordhumlan: material och metoder	20
4.2	Jordhumlan: resultat och diskussion.....	21
4.2.1	Samhällstillväxt	21
4.2.2	Födosökstid	23
4.2.3	Reproduktion	24
4.2.4	Humlesamhällen 2014.....	25
5	Det röda murarbiet.....	27
5.1	Murarbiet: material och metoder	27
5.2	Murarbiet: resultat och diskussion	27
6	Binas exponering	30
6.1	Exponering: material och metoder.....	30
6.2	Exponering: resultat och diskussion.....	30
6.2.1	Nyttjande av rapspollen.....	30
6.2.2	Kvantifiering av klotianidin och andra neonikotinoider	31
7	Slutsatser och konsekvenser för bedömningen av riskerna med klotianidinbetning.....	33
8	Tack	34
9	Referenser.....	35

1 Bakgrund

Jordbruksverket genomförde 2009 en litteraturstudie om orsaker till förlusten av honungsbisamhällen, de potentiella samhällsekonomiska konsekvenserna och möjliga åtgärder för att förhindra förluster (Pedersen 2009). Utredningen visade bland annat att bekämpningsmedel kan utgöra en risk för bishälsa. Detta har aktualiserats av flera nya studier som visar att exponering för mycket låga doser av bekämpningsmedel inom gruppen neonikotinoider kan påverka bins hälsa (till exempel Gill et al. 2012, Henry et al. 2012 och Whitehorn et al. 2012). I Sverige har neonikotinoider bland annat använts vid odling av höst- och vårraps, både som utsädesbetning (klotianidin, imidakloprid och tiametoxam) och vid direkt besprutning av den växande grödan (acetamiprid och tiakloprid) (Andersson et al. 2009). Rapsutsäde betat med neonikotinoiden klotianidin importerades från bl.a. Tyskland, eftersom appliceringen av medlet inte har varit godkänt i Sverige (Gunnarson 2013). Betat utsäde räknas som en handelsvara och inte som ett bekämpningsmedel och regleras därför under annan lagstiftning. Från och med 1 december 2013 är dock användningen av klotianidin, tillsammans med imidakloprid och tiametoxam, begränsad för utsädesbetning i biattraktiva grödor inom EU (EC 2013).

Påverkan av neonikotinoider på honungsbin under fältförhållanden är dåligt kända. Kunskapen om eventuell påverkan på vilda bin är ännu sämre. Endast en fältstudie fanns tillgänglig när vårt projekt startade. Där utvärderades påverkan av klotianidin genom exponering för betad vårraps på honungsbin i Kanada (Cutler & Scott-Dupree 2007). Ingen påverkan av neonikotinoiden observerades i fältstudien på yngelutveckling, livslängd hos arbetare, bidödlighet, samhällets viktuppgång eller mängden producerad honung mellan samhällen vid behandlade fält jämfört med obehandlade fält (Cutler & Scott-Dupree 2007). Klotianidinrester hittades i både pollen och nektar från samhällena vid de behandlade fälten, men i koncentrationer under de som förväntas ge en skadlig effekt (Schmuck & Keppler 2003 citerad i Cutler & Scott-Dupree 2007). Fälten var dock endast en hektar stora, vilket är en sjundedel av ett genomsnittligt vårrapsfält i Skåne under åren 2007-2011 (7.0 ± 7.3 ha (medel \pm sd), data från Jordbruksverkets databas Integrated Administration and Control System (IACS)). Vidare var avståndet mellan behandlat och obehandlat fält som minst 295 m (Cutler & Scott-Dupree 2007), vilket är betydligt mindre än honungsbins födosöksområde. Honungsbin kan vid behov födosöka upp emot 10 km från sin kupa (Steffan-Dewenter & Kuhn 2003, Greenleaf et al. 2007). Klotianidinrester återfanns också i en del av de nektarprov som tagits från samhällen i obehandlade kontrollfält, vilket indikerar att bin från sådana samhällen kan ha födosökt även i de behandlade fälten (Cutler & Scott-Dupree 2007). Framtida studier bör utformas så att försöksfälten är tillräckligt stora, ligger tillräckligt långt från varandra och från andra källor till klotianidin, samt har tillräckligt många oberoende upprepningar för att kunna dra tillförlitliga slutsatser. Nyligen presenterades en ny, mer väl utformad studie av hur honungsbin påverkas av utsädesbetning med klotianidin i raps (Cutler et al. 2014). Inte heller i den studien fann forskarna någon påverkan av betningen på honungsbin eller deras samhällen. En kunskapslucka som dock återstår att fyllas är hur andra biarter än honungsbiet påverkas av att exponeras för klotianidin genom betning i raps. Den stora majoriteten av studier som undersöker hur bin påverkas av neonikotinoider har gjorts på honungsbiet (Godfray

et al. 2014, Lundin et al. 2015). Vår kunskap om hur andra arter av bin påverkas av neonicotinoider är mycket begränsad och det finns idag inga publicerade resultat från någon väl utformad studie med tillräckligt antal upprepningar där detta har undersökts. Både honungsbin och vilda bin pollinerar våra grödor och bidrar till ökade skördar av högre kvalitet (Klein et al. 2007, Garibaldi et al. 2013, Bartomeus et al. 2014). Det är därför av extra vikt att säkerställa att användningen av neonicotinoider inte utgör en oacceptabel risk för bin.

Syftet med det här beskrivna projektet var att undersöka hur neonicotinoiden klotianidin påverkade honungsbin och vilda arter av bin under fältförhållanden i Sverige. Vi har genomfört ett världsunikt projekt ur ett ekotoxikologiskt perspektiv. Vi har studerat påverkan av ett växtskyddsmedel på en landskapsskala relevant för flera arter av rörliga organismer i terrester miljö i ett kontrollerat och slumpat experiment med tillfredsställande antal upprepningar och med fokus på flera arter. Detta hade varit helt omöjligt att utföra utan ett aktivt deltagande av och engagemang hos biodlare, rapsodlare, lantbrukare, myndigheter, forskare och studenter från två universitet och finansiering från flera källor. Resultaten från vårt experiment är precis den typ av information som efterfrågas för att kunna utreda frågan om användandet av neonicotinoider utgör en oacceptabel risk för bin. Stora delar av forskningsresultaten är publicerade i Rundlöf et al. (2015) och har därmed granskats av andra forskare med relevant kompetens. Alla experiment har dock sina brister och vi diskuterar dessa, så att läsaren ska kunna bedöma värdet av informationen vi presenterar i den här rapporten.

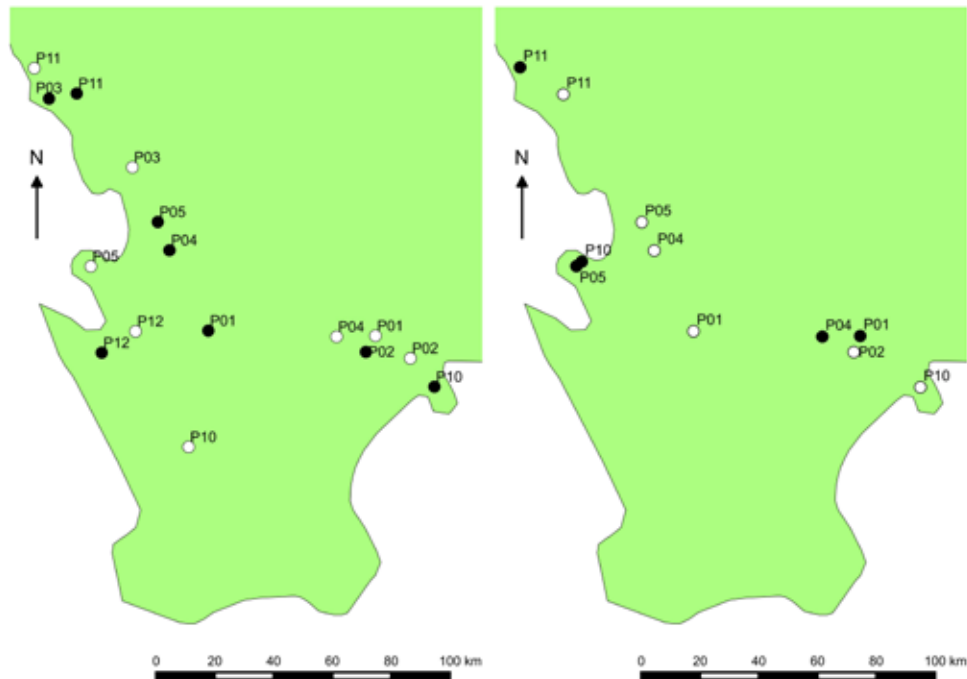
2 Studiens utformning

2.1 Studiens utformning: material och metoder

Ytterligare beskrivning av material och metoder finns i bilaga 1 och i Rundlöf et al. (2013, 2015).

Vi utformade under 2013 en studie som bestod av 16 vårrapsfält (fältstorlek 8.9 ± 1.4 ha (medel \pm se)) i södra Sverige (figur 1). Samtliga fält var sådda med utsäde av samma sort (hybriden Majong, Lantmännen SW) och kom från samma utsädesparti. Hälften av fälten (8 fält) var sådda med vårraps betad med Elado (Bayer CropScience), där klotianidin och beta-cyflutrin är de verksamma ämnena, och resten av fälten (8 fält) var sådda med obetat utsäde och fungerade som kontrollfält. Betningen gjordes med 25 ml Elado (400 g/l klotianidin + 80 g/l beta-cyflutrin; Bayer CropScience 2013a) per kg utsäde, vilket var tillverkarens rekommenderade behandlingsdos för både höst- och vårsådd raps innan EU:s moratorium (Bayer CropScience 2011, 2013b). Allt utsäde var behandlat med svampbekämpningsmedlet tiram (3,92 g/kg utsäde). Odlarna instruerades att inte använda andra neonikotinoider i försöksfälten under odlingssäsongen, för att därmed kunna härleda eventuell effekt till betningen. Fälten utgjorde par, med ett fält med betning och ett fält utan betning inom ett par. Paren matchades så att markanvändningen i landskapen som omgav försöksfälten var så lika som möjligt inom paret (tabell S1 i bilaga 1). Paren fördelade sig längs en gradient i landskapsheterogenitet, från homogen slättbygd som dominerades av åkrar med ettåriga grödor till mer heterogen mellanbygd där det fanns en blandning av åkrar, betesmarker och skog.

Under 2014 inkluderade vi de tio odlare som planerade att odla vårraps under en andra odlingssäsong. År 2014 fick odlarna byta behandling. Det innebar att odlare med behandlat utsäde 2013 fick obehandlat utsäde 2014 och tvärt om. Vi inkluderade även ett nytt kontrollfält, så att vi för humledelen av studien hade fem kontrollfält att jämföra med de sex betade fälten.



Figur 1. Karta över de 16 utvalda vårrapsfälten 2013 (vänster) och de 11 fälten 2014 (höger) i södra Sverige och matchning av fälten i par (P01-P12). Matchningen baserar sig på markanvändningen i de omgivande landskapen vägt tillsammans med geografisk närhet mellan fält inom ett par. Cirklarna visar landskap med radien 2 km runt fälten och färgerna indikerar de två behandlingarna; insekticidbetning och kontrollfält.

För att undvika att datainsamlingen omedvetet påverkades av personerna som planerade studien och samlade in data har vi så långt det varit möjligt låtit slumpen bestämma och undanhållit informationen om fältens behandling. Vi lät slumpen avgöra vilka platser som skulle vara behandlade eller vara kontroller och vilka samhällen och bin som skulle stå vid de olika fälten. Vi har undanhållit informationen om vilka fält som var betade respektive kontrollfält från de personer som samlade in prover från honungsbisamhällena och bedömde deras bityrka, vägde och undersökte humlesamhällena och hanterade murarбина.

2.2 Studiens utformning: resultat och diskussion

Vi uppnådde målsättningen att under 2013 anlägga 16 vårrapsfält (8 par), där hälften av fälten har fått Elado-behandling och den andra hälften är obehandlade kontroller (figur 1). Vi uppnådde även målsättningen om likvärdig markanvändning inom ett fältpar i landskapen om omger fälten (tabell S1 i bilaga 1). Den geografiska utbredningen av studiesystemet innebar vissa logistiska utmaningar, men gjorde också att studien har oberoende fältplatser (utan utbyte av bin mellan fälten) och att studien omfattar en naturligt förekommande variation i landskapstyper och miljöförhållanden.

Vi valde att beta utsädet med Elado, där de verksamma ämnena är neonicotinoiden klotianidin och pyretroiden beta-cyflutrin, eftersom det var ett agronomiskt realistiskt scenario för hur klotianidin användes för växtskydd i Sverige när vi planerade studien. Även om Elado innehåller både klotianidin och beta-cyflutrin, exponeras bina endast för klotianidin och inte beta-cyflutrin genom den

blommande vårropsen eftersom beta-cyflutrin inte är systemiskt (EFSA 2010a) och därför inte tas upp av växter (Lodhi et al. 2000). Vid analyser av pollen insamlat av honungsbin vid fälten med insekticidbetat utsäde detekterades inget beta-cyflutrin över detektionsgränsen på 1,0 ng/g (se tabell S4 i bilaga 1). Vid en analys av vårt Elado-betade utsäde från 2013 innehöll det 8,8 g klotianidin per kg utsäde, vilket är något lägre än den förväntade halten på 10 g/kg vid betning med 25 ml Elado per kg utsäde.

För några faktorer lyckades vi inte uppfylla den ambitiösa målsättning vi hade. Dels fanns det i två fall annan vårrops inom 1 km från vårt vårropsfält och dels såddes fälten inom två fältpar inte vid motsvarande tidpunkter, vilket komplicerar jämförelser inom de paren. Dessutom användes växtskyddsmedlet Biscaya, där neonikotinoiden tiaklopid är det verksamma ämnet, i ett av kontrollfälten 2013 och i ett betat fält 2014.

Målsättningen var att det inte skulle finnas annan vårrops inom 1 km från honungsbisamhällena vid försöksfälten. Det uppnåddes för 14 av 16 platser, men vid två av fälten fanns det ett annat vårropsfält på 0,9 respektive 1,0 km avstånd från honungsbinas uppställningsplats. Det är väl inom honungsbinas potentiella flygradie (Steffan-Dewenter & Kuhn 2003), men eftersom kuporna placerades intill det vårropsfält som ingick i studien bedömde vi sannolikheten att bina väljer att flyga till det andra fältet som liten. För att minska risken ytterligare flyttades bina från dessa lokalpar till övervintringsplatsen så fort vårropsen i försöksfälten hade blommat över.

I två av fältparen 2013 såddes de insekticidbetade fälten tidigare (båda 21 april) än kontrollfälten (6 respektive 7-8 maj). Det resulterade i en skillnad i hur långt rapsen hade kommit i sin utveckling mellan fälten (fenologisk asynkroni). Skillnaden minskade visserligen med tiden, men fanns fortfarande kvar när rapsen började blomma. Den här skillnaden gjorde att vi valde att placera ut honungsbi- och humlesamhällena vid olika tidpunkter inom dessa två par och att samhällenas utveckling inte följdes samtidigt. Vi anser att detta är mindre problematiskt för humlesamhällena, som vi kunde beställa i olika omgångar och sedan placera ut (tabell S2). Honungsbisamhällena var dock skapade samtidigt och tillväxte starkt över säsongen, så det var viktigt att ta hänsyn till bedömnings-tidpunkten. Vi valde att hantera det här problemet genom att jämföra honungs-bisamhällenas tillväxthastighet i form av vuxna bin i samhällena över säsongen, baserat på de upprepade bistyrkebedömningarna.

Enligt instruktion fick lantbrukarna inte använda andra neonicotinoider för att bekämpa rapsbaggar i fälten, men däremot fick de efter behov använda fyra andra växtskyddsmedel mot insekter; Avaunt (aktiv ingrediens: indoxacarb), Mavrik (tau-fluvalinate), Plenum (pymetrozine) och Steward (indoxacarb). I två fält, ett kontrollfält 2013 och ett betat fält 2014, användes dock Biscaya, innehållande neonicotinoiden tiaklopid (tabell S3). Tiaklopid har väsentligt lägre akut toxicitet för bin än klotianidin, imidaklopid eller tiametoxam (Mommaerts et al. 2010, Blacquiére et al. 2012, Pisa et al. 2015) och vi testade att utesluta det Biscayabehandlade fältet 2013 från analyserna, vilket kvalitativt inte påverkade effekten av insekticidbetningen på bina (Rundlöf et al. 2015).

2.3 Statistiska analyser

Den insamlade informationen har i huvudsak analyserats med linjära statistiska modeller, där en beroende variabel (till exempel antal bin i ett samhälle eller vikten hos ett humlesamhälle) relateras till en eller flera förklarande variabler (till exempel behandlingen i vårrapsfälten eller tidpunkten för mätningen). I modellerna har vi också, när så är lämpligt, tagit med så kallade slumpfaktorer (random factors) för att ta hänsyn till det statistiska beroende som uppstår av att vi har provtagit flera gånger i samma par eller fält (till exempel vägt 6 humlesamhällen vid varje fält). Vi har valt statistiska tester som är lämpliga beroende på hur data (eller egentligen residualerna från modellerna) uppfyller vissa villkor, till exempel att residualerna är normalfördelade och att varianserna är liknande mellan olika nivåer av den förklarande variabeln. I vissa fall har vi behövt transformera data för att uppfylla villkoren. Då har vi till exempel log-transformerat data genom att ta värdet plus ett och sedan värdets logaritm med basen 10 ($\log_{10}(x + 1)$).

Resultaten från de statistiska modellerna presenteras i form av F-, Z- eller chi²-värden och P-värden, tillsammans med antalet provenheter (N) eller antalet frihetsgrader (df). F-, Z- och chi²-värdena är relaterade till olika sannolikhetsfördelningar och gör att man kan hitta ett signifikansvärde (P). Vi har använt den vanligaste signifikansnivån (5 %) som gräns för när nollhypotesen kan förkastas och den alternativa hypotesen stöds. I den här studien är nollhypotesen normalt att det inte finns någon skillnad i den beroende variabeln mellan kontrollfält och betade fält och den alternativa hypotesen är att det finns en skillnad. När P-värdet är lägre än 0,05 förkastar vi nollhypotesen.

För att visa relationen mellan en beroende variabel (till exempel humlesamhällens vikt) och en förklarande variabel (till exempel vårrapsfältens behandling) kan man presentera nivån på den beroende variabeln för de olika nivåerna på den förklarande variabeln eller göra figurer, där ett medel- eller medianvärde presenteras tillsammans med ett variansmått. I den här rapporten använder vi medelvärdets standardavvikelse (se) eller 95-procentigt konfidensintervall (ci, till exempel felstaplarna i de flesta figurer) som huvudsakliga variationsmått. Värdena i figurerna bygger antingen på rådata eller på resultat från de statistiska modellerna. Vilket som har använts står i figurtexterna.

3 Honungsbiet

3.1 Honungsbiet: material och metoder

Samhällen av det europeiska honungsbiet (*Apis mellifera*) består under sommaren av tre typer av individer; en reproducerande hona, drottningen, tiotusentals arbetsbin (sterila honor) och några hundratal hannar, de s.k. drönarna (Winston 1987). Arbetsbin bildas genom att de får en diet utspädd med nektar och pollen under larvstadiet. Drottningens enda uppgift är att lägga ägg. När äggen kläckts till larver matas de av unga arbetsbin med ett proteinrikt sekret, fodersaften, som bina producerar själva efter att ha konsumerat stora mängder proteinrikt pollen. När bisamhället når sin maximala storlek kring 40-60 000 individer, ofta runt midsommar, vill samhället reproducera sig, vilket sker genom fysisk delning. Är det fysiska utrymmet begränsat kan svärmningen ske tidigare. Arbetsbina föder då upp nya drottningar och samhället delar sig genom att ungefär hälften av arbetsbina flyger iväg med den gamla drottningen och etablerar en ny boplats. I det gamla bisamhället blir så småningom en ung drottning kvar, som parar sig i luften med traktens drönare och sedan börjar lägga ägg. På eftersommaren reduceras äggläggningen och bisamhället går ner i bistryka. Under vintern sitter bisamhället i ett vinterklot och förbränner insamlad honung för att hålla värmen i klotets perifera delar över +7 °C och expanderar eller reducerar klotets diameter allt efter yttertemperaturen. På våren har ett väl övervintrat samhälle ofta 10 000 arbetsbin eller mer, och utgör då en massiv pollineringsresurs redan innan andra pollinerare finns tillgängliga (Winston 1987).

Honungsbisamhällen placerades ut vid vårrapsfälten vid starten av blomningen (tabell S2). Vid varje fält placerades sex samhällen 2013 och fyra samhällen 2014. Samhällen som stod vid betade fält 2013 placerades vid betade fält även 2014 och motsvarande gjordes vid kontrollfälten. Samhällen inom ett fältpar hade samma härstamning, men fördelades annars slumpmässigt mellan fälten. Samhällena skapades i maj 2013 av en professionell biodlare, med ett- och tvååriga drottningar av känd härstamning. Samhällena utjämnades för att inkludera en drottning, två fulla honungsramar (med bin), två ramar med täckt yngel (med bin), bin från två ramar som skakas ner i kupan, en utbyggd ram och fem ramar med mellanväggar. Målsättningen var att ge avläggarna en normal balans mellan yngel och vuxna bin vid försökets start och att avläggarna skulle vara tillräckligt starka för att överleva den kommande vintern, men inte växa ur sin låda under sommaren.

Honungsbisamhällenas styrka bedömdes av en tränad observatör, tillsammans med en assistent, med Liebefeld-metoden (Imdorf et al. 1987, Delaplane et al. 2013). Bedömningar gjordes före utplacering vid vårrapsfälten, vid rapsens toppblom och vid den gemensamma övervintringsplatsen. Under 2013 gjordes dessutom ytterligare 1-2 bedömningar vid vårrapsfälten. Samhällena övervintrades på en gemensam plats. Under våren 2014 gjordes en ytterligare bistrykebedömning och genomgång av samhällena för att bedöma vinteröverlevnad.

Under rapsens toppblom försågs tre samhällen per fält med pollenfälla och minst 25 ml pollen samlades in. Vid samma tillfälle samlades prover på minst 50 flygbin på flustren till samhällena, pollen från fem honungsbin som flög i vårrapsfälten och honungsblåsor från minst fem bin utan pollen som flög i fältet in för kvantifiering av neonikotinoidrester.

Innan utplacering vid vårrapsfälten och före invintringen vägdes samhällena för att beräkna honungsproduktionen. Vid samma tillfällen togs prov på 100 bin från de yttre ramarna i varje samhälle för analys av parasiter och sjukdomar. På de yttre ramarna förväntas en dominans av lite äldre bin. Provet togs på dessa bin, för att vid den andra provtagningen få med bin som har varit ute och födosökt i vårrapsfälten. De provtagna bina användes för att uppskatta förekomst (prevalens) och mängd (titrar) av varroakvalster (*Varroa destructor*) och mikrosporidier (*Nosema apis* och *N. ceranae*) och de åtta virussjukdomarna deformed wing virus (DWV), sacbrood virus (SBV), black queen cell virus (BQCV), chronic bee paralysis virus (CBPV), acute bee paralysis virus (ABPV), Kashmir bee virus (KBV), Israeli acute paralysis virus (IAPV) och slow bee paralysis virus (SBPV).

Samhällena fick ingen extrautfodring under exponeringstiden. Däremot fick de sockerlösning i samband med invintringen. I samband med den sista bistyrkebedömningen 2013 togs så många foderramar som möjligt bort och ersattes med tomma ramar, för att efterlikna biodlarens skattning av honung. Därefter behandlades samhällena med 60-procentig myrsyra för att kontrollera varroakvalstret. Samhällena matades sedan med 20 kg socker upplöst i vatten (55-60 % socker) per samhälle. En ytterligare behandling med oxalsyra mot varroakvalstret genomfördes i början av december.

3.2 Honungsbiet: resultat och diskussion

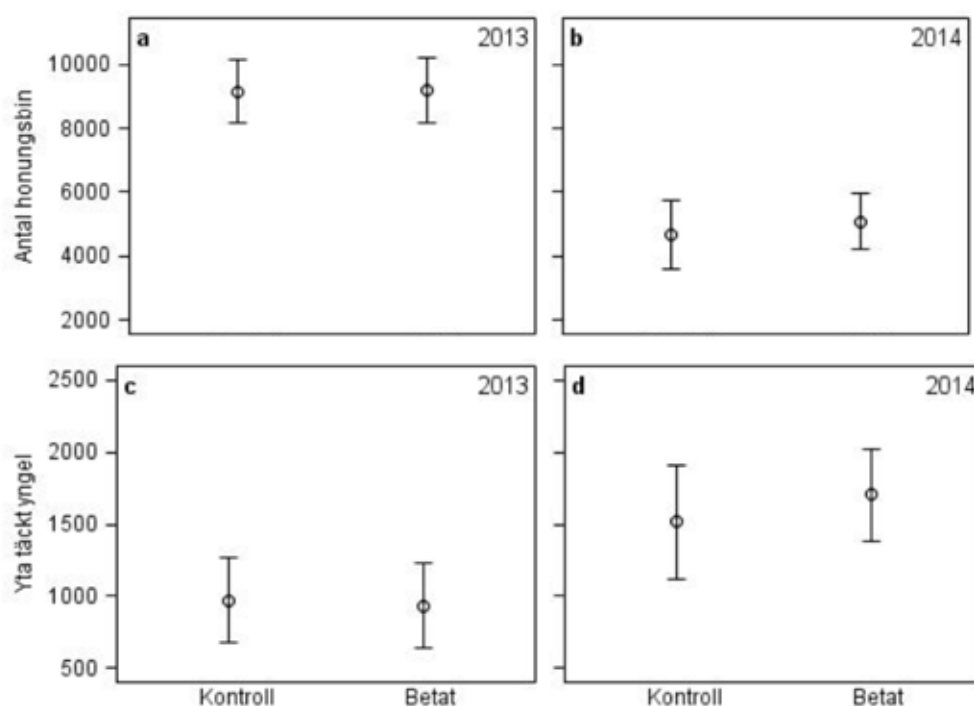
3.2.1 Samhällstillväxt och honungsproduktion under somrarna 2013-2014

Under försökets gång, från första bistyrkebedömningen innan utplacering vid försöksfälten till sista bistyrkebedömningen före invintringen 2013, svärmade 18 samhällen, 8 som stod vid kontrollfält och 10 som stod vid betade fält. Av de svärmade samhällena bedömdes 12 av samhällena som döda vid tredje och sista fodergivan i början av september 2013, sex som stått vid kontrollfält och sex som stått vid betade fält. Under sommaren 2014 svärmade tre samhällen, ett vid kontrollfält och två vid betade fält. Samhällen som svärmade har uteslutits från de statistiska analyserna av antal bin, yta täckt yngel och honungsproduktion. Dessutom uteslöts 2013 ett samhälle (vid ett betat fält), som förlorade sin drottning vid transporten ut till fältet.

Vi utvärderade antalet bin och ytan täckt yngel efter placeringen vid fälten i relation till den initiala bistyrkan eller yngelmängden och behandlingen i det intilliggande vårrapsfältet. Den initiala mängden bin och ytan yngel hade ett svagt värde för att förutsäga mängden bin och ytan yngel efter placeringen vid vårrapsfälten (tabell 1). Det fanns ingen statistisk skillnad i mängden bin eller ytan täckt yngel mellan behandlingarna under något av åren (tabell 1, figur 2).

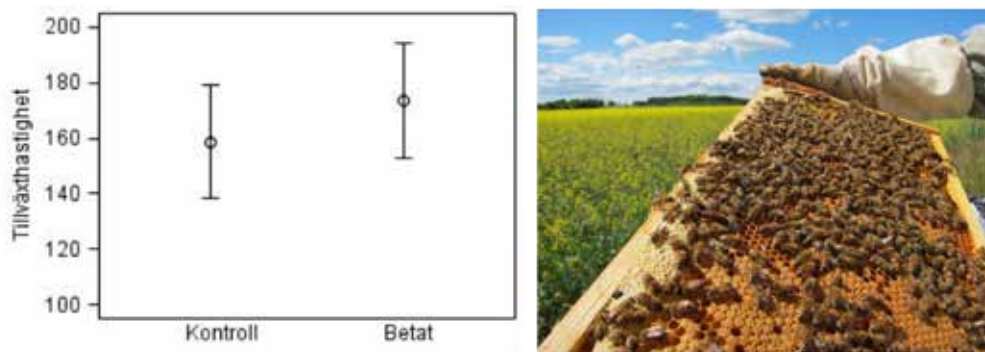
Tabell 1. Resultat av statistiska tester av antalet bin och ytan täckt yngel i relation till bistryka eller yngelmängden innan utplacering vid vårrapsfälten och vårrapsfältens behandling (kontroll eller insekticidbetning) under åren 2013-2014. Se figur 2.

	Antal bin		Yta täckt yngel	
	F_{df}	P	F_{df}	P
2013				
Initial bistryka/yngelmängd	1,67 _{1,64}	0,20	0,13 _{1,66}	0,72
Behandling	0,01 _{1,7}	0,94	0,12 _{1,6}	0,75
2014				
Initial bistryka/yngelmängd	0,07 _{1,33}	0,80	0,11 _{1,37}	0,74
Behandling	0,45 _{1,8}	0,52	0,66 _{1,9}	0,44



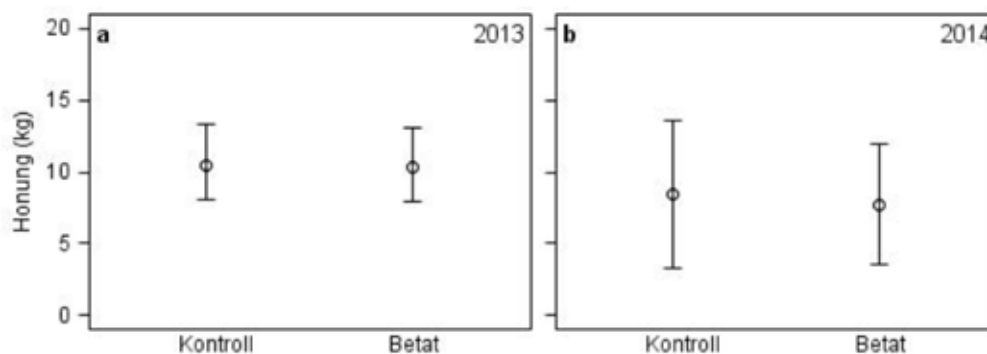
Figur 2. Antal honungsbin (a, b) och yta (cm²) täckt yngel (c, d) per samhälle i relation till behandlingen (kontroll eller insekticidbetning) av vårrapsfältet efter placeringen vid fälten under åren 2013 (a, c) och 2014 (b, d). Figurerna bygger på modellestimat och cirklarna visar medelvärden och felstaplarna 95-procentigt konfidensintervall. N = 8 fält per behandling 2013 och N = 4 för kontrollfält och 6 för betade fält 2014. Panel a är modifierad från Rundlöf et al. (2015).

Då vi under sommaren 2013 kontinuerligt följde samhällena och gjorde bistrykebedömningar med ungefär två veckors mellanrum kunde vi för det året också statistiskt utvärdera bistrykans tillväxt i relation till behandlingen i det intelligande fältet. Det fanns ingen statistisk skillnad i bistrykans (antal bin) tillväxthastighet hos samhällena placerade vid betade fält jämfört med kontrollfält under 2013 ($F_{1,7} = 1,45$, $P = 0,27$; figur 3).



Figur 3. Den beräknade tillväxthastigheten hos bistyrkan (antal bin per dag) över sommaren 2013 i relation till behandlingen i vårrapsfälten (kontroll eller insekticidbetning). Figuren bygger på modellestimat och cirkarna visar medelvärden och felstaplarna 95-procentigt konfidensintervall. N = 8 fält per behandling och tidpunkt. Bilden visar en ram med täckt yngel i cellerna och vuxna bin.

Det fanns ingen statistisk skillnad i mängden producerad honung under något av åren mellan samhällen som hade varit placerade vid betade fält jämfört med de som hade varit placerade vid kontrollfält (2013: $F_{1,7} = 0,04$, $P = 0,84$; 2014: $F_{1,8} = 0,06$, $P = 0,81$; figur 4).



Figur 4. Honungsproduktion (kg per samhälle) i relation till behandlingen i vårrapsfälten (kontroll eller insekticidbetning) där samhällena har varit placerade under somrarna 2013-2014. Figuren bygger på modellestimat och cirkarna visar medelvärden och felstaplarna 95-procentigt konfidensintervall. N = 8 fält per behandling 2013 och N = 4 för kontrollfält och 6 för betade fält 2014.

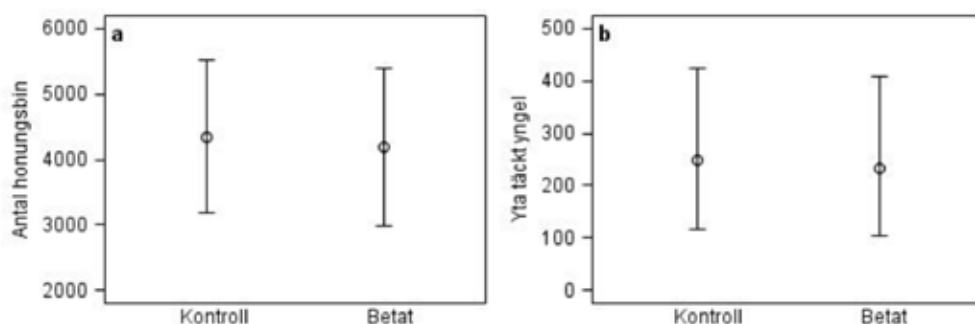
3.2.2 Vinterdödlighet och bistyrka våren 2014

Totalt fanns 79 samhällen med i studien efter tredje och sista fodergivan i början av september 2013, varav 41 samhällen hade stått vid kontrollfält och 38 samhällen vid betade fält. Vid inspektionen i början av april 2014 var sju samhällen helt döda och tre ytterligare samhällen saknade drottning och yngel, men hade fortfarande en del vuxna bin. Tre av de tio samhällena hade svärmat under sommaren 2013, ett samhälle från kontrollfält och två samhällen från betade fält. Tre ytterligare av de tio samhällena hade bytt drottning utan att svärma (stilla drottningbyte), två samhällen från kontrollfält och ett samhälle från betat fält. I ett fall av de tio drabbades bina i samhället av diarré och lämnade

avföring inne i kupan (från ett kontrollfält). I de tre resterande samhällena förlorades drottningen under vintern från ett av samhällena (från betat fält), ett samhälle bedömdes som svagt i början av december (från betat fält) och i det sista samhället är orsaken till samhällsförlusten okänd (från kontrollfält).

De tio samhällena räknar vi som förlorade under vintern, vilket ger en vinterförlust på 12,7 %. Hälften av de förlorade samhällena hade stått vid kontrollfält och resten vid betade fält, vilket ger vinterförluster på 12,2 % respektive 13,2 %. Dessa siffror kan jämföras med den totala vinterförlusten i Sverige på 9,6 % under vintern 2013/2014 (Kristiansen 2014a). I de län som vår studie täckte in har vinterförlusten varit 8,7 % (Skåne), 6,7 % (Halland) och 8,7 % (Blekinge) av det totala antalet invintrade samhällena under vintern 2013/2014 (Kristiansen 2014b). Vinterförlusten är något högre i vår studie jämfört med genomsnittet för regionen. Det skulle kunna förklaras av att vi medvetet skapade små samhällena i starten av studien, för att de skulle kunna vara i en och samma kupa under hela försökstiden. Små samhällena gjorde det också enklare att registrera förändringar i bistrykan.

De kvarvarande bisamhällena hade likvärdig mängd bin ($F_{1,7} = 0,05$, $P = 0,82$; figur 5a) och yta täckt yngel ($F_{1,7} = 0,03$, $P = 0,87$; figur 5b) oavsett om de hade stått vid betade fält eller kontrollfält. I dessa analyser uteslöts de tio samhällena som räknades som förlorade under vintern. Resultaten var dock kvalitativt de samma oavsett om de tre samhällena utan drottning och yngel, men med bin, inkluderades i analyserna.



Figur 5. Antal honungsbin (a) och yta (cm²) täckt yngel (b) per samhälle under vårbedömningen av samhällena i början av april 2014, i relation till behandlingen (kontroll eller insekticidbetning) av vårrapsfältet de var placerade vid 2013. Figurerna bygger på modellestimat (tillbakatransformerade sådana för ytan yngel) och cirkelarna visar medelvärden och felstaplarna 95-procentigt konfidensintervall. N = 8 fält per behandling.

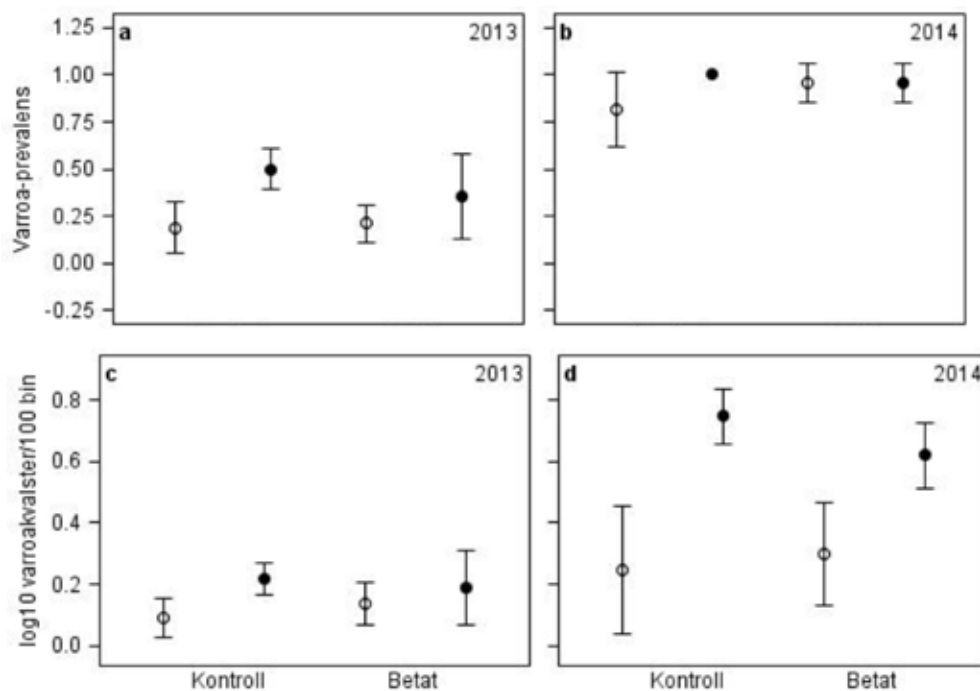
3.2.3 Parasiter och sjukdomar hos honungsbin

Vi redovisar förekomst (prevalens) och mängd (titrar) av varroakvalster och nosemasporer, fördelningen mellan de två nosemaarterna *Nosema apis* och *N. ceranae* och förekomst (prevalens) och mängd (titrar) av de fyra virussjukdomarna deformed wing virus (DWV), sacbrood virus (SBV), black queen cell virus (BQCV) och acute bee paralysis virus (ABPV) över de två åren och i relation till behandlingen (kontroll eller betat med Elado) av vårrapsfältet som samhällena var placerade vid. De andra fyra virussjukdomarna detekterades inte i något samhälle (Kashmir bee virus (KBV) och Israeli acute paralysis virus (IAPV)) eller i endast ett fåtal samhällena (chronic bee paralysis virus (CBPV), 1 samhälle, och slow bee paralysis virus (SBPV), 3 samhällena) 2013, så de analyserades inte 2014.

Det finns ett positivt samband mellan varroakvalster och virusinfektion (Bowen-Walker et al. 1999, Di Prisco et al. 2011, de Miranda 2012, 2013), vilket gör att den ena variabeln måste hållas konstant för att den andra ska kunna studeras. Honungsbisamhällena behandlades därför med myr- och oxalsyra för att kontrollera varroakvalstret, så att det inte skulle finnas stora skillnader i kvalsterförekomst eller mängd mellan de två behandlingarna av vårrapsfälten. På så sätt kunde en eventuell direkt påverkan av betningsbehandlingen av fälten på virussjukdomar hos bina studeras. Under 2013 fanns det ingen statistisk skillnad mellan förekomsten av varroakvalster i samhällena oavsett behandling och det fanns ingen interaktion mellan behandling och provtagningstidpunkt (tabell 2; figur 6a). Däremot var förekomsten av varroakvalster högre på hösten än på våren (tabell 2; figur 6a). Antalet varroakvalster 2013 visade på ett liknande mönster som förekomsten, med likvärdiga nivåer oavsett behandling, ingen interaktion mellan behandling och provtagningstidpunkt och fler kvalster på hösten än på våren (tabell 2; figur 6c). Under 2014 var förekomsten hög, oavsett behandling eller provtagningstidpunkt (figur 6b), och ingen skillnad mellan behandlingarna var detekterbar (tabell 2; figur 6b). För antalet varroakvalster fanns det under 2014 en icke-signifikant tendens till en interaktion mellan behandling och provtagningstidpunkt (tabell 2; figur 6d). Vid det första provtagningstillfället, innan utplacering vid vårrapsfälten, fanns det likvärdiga nivåer av varroakvalster oavsett behandling ($F_{1,8} = 0,30$, $P = 0,60$). Vid det andra provtagningstillfället, efter placeringen vid vårrapsfälten, fanns det däremot en tendens till fler varroakvalster vid kontrollfält jämfört med vid betade fält ($F_{1,8} = 4,93$, $P = 0,057$). Oavsett vårrapsfältens behandling fanns det fler varroakvalster vid den andra provtagningen jämfört med vid den första (kontroll $F_{1,8} = 56,36$, $P < 0,0010$; betat $F_{1,8} = 35,11$, $P < 0,0010$). Tendensen till fler varroakvalster vid kontrollfält skulle kunna innebära att varroakvalstren påverkas negativt av insekticidbetningen, men för en fullständig utvärdering av hur betningen påverkar kvalstren krävs ett försöksupplägg avsett att klarlägga sådana samband. Avsikten med att provta för varroakvalster har varit att säkerställa om angreppsnivån av varroakvalster varit så stor att man kunnat förvänta sig mätbara effekter på virusinfektioner, på grund av hög angreppsnivå av kvalster, vilket inte varit fallet. Om varroakvalstrets populationsdynamik påverkas av att bisamhällena utsätts för oljevaxter där utsädet betats med klotianidin bör bisamhällena med högre angreppsgrad och större provmängder bin användas. Replikeringen av fält är betydligt lägre 2014 än 2013, vilket gör att resultaten från det andra året är mer osäkra.

Tabell 2. Resultat av statistiska tester av förekomst (prevalens) och mängd (antal kvalster) av varroakvalstret i honungsbisamhällena i relation till behandlingen (kontroll eller insekticidbetning) av vårrapsfältet som samhällena var placerade vid och tidpunkten (före eller efter placeringen vid fälten) för provtagningen under åren 2013-2014. För prevalens 2014 användes Friedmans ickeparametriska test, eftersom datas residualer här inte uppfyllde antagandena för den linjära modellen. Se figur 6.

	Prevalens		Antal kvalster/100 bin	
	F_{df}/χ^2	P	F_{df}	P
2013				
Behandling	0,38 _{1,7}	0,56	0,05 _{1,7}	0,83
Tidpunkt	11,18 _{1,14}	0,0048	16,78 _{1,14}	0,0011
Behandling × tidpunkt	1,20 _{1,14}	0,29	3,10 _{1,14}	0,10
2014				
Behandling	1,14	0,29	0,30 _{1,8}	0,60
Tidpunkt			91,44 _{1,8}	<0,0010
Behandling × tidpunkt			4,27 _{1,8}	0,073



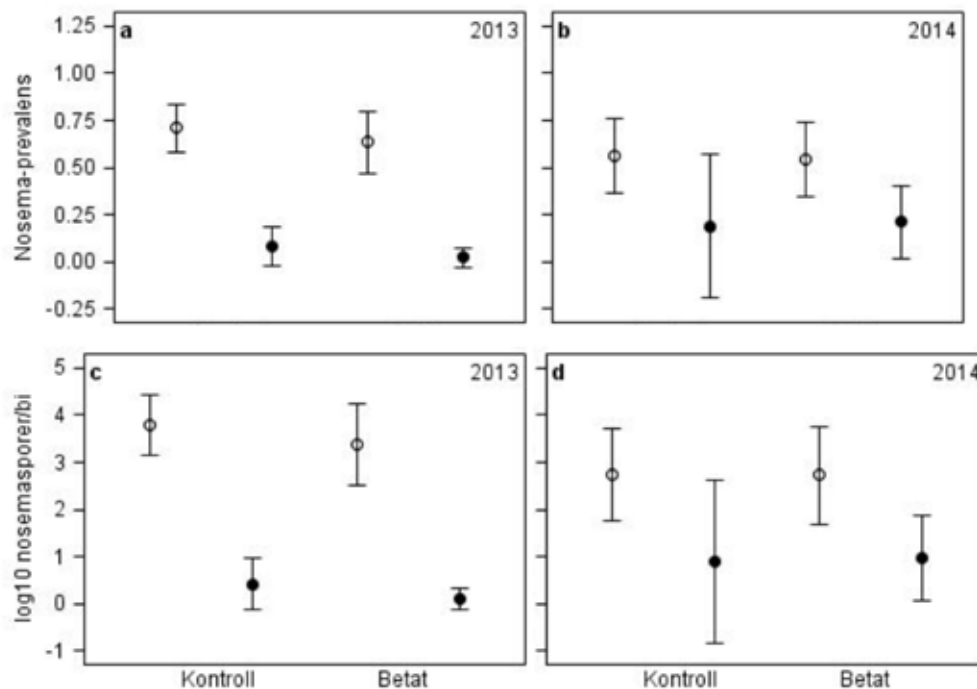
Figur 6. (a, b) Andel samhällena med förekomst av varroakvalstret (*Varroa destructor*) och (c, d) antal varroakvalster (logaritmskt transformerat med 10 som bas, $\log_{10}(x + 1)$) per 100 bin i relation till behandlingen av vårrapsfälten (kontroll eller insekticidbetning) som samhällena var placerade vid och tidpunkten för provtagningen (före (öppna cirklar) eller efter (fyllda cirklar) placeringen vid fälten) under åren 2013-2014. Figuren bygger på rådata och cirkelarna visar medelvärden per samhälle och fält och felstaplarna 95-procentigt konfidensintervall. N = 8 fält per behandling 2013 och N = 4 för kontrollfält och 6 för betade fält 2014.

Vid likvärdiga nivåer av varroakvalster i samhällena vid båda behandlingarna av rapsfälten kan vi jämföra hur vår behandling av vårrapsfältet påverkar mikrosporidier (*nosema*) och virusinfektioner hos honungsbin utan att det finns en samvariation mellan varroakvalstret och behandlingen. Eftersom det 2014 fanns en indikation på att betningen skulle kunna påverka varroakvalstret negativt, är det bra att ha det i åtanke när resultaten för mikrosporidier och virus granskas.

Förekomsten av *nosema* 2013 var likvärdig mellan behandlingarna (tabell 3; figur 7). För både förekomsten och mängden sporer 2014 och mängden sporer 2013 fanns ingen påvisbar skillnad mellan behandlingarna och ingen interaktion mellan behandling och provtagningstidpunkt (tabell 3; figur 7). Däremot var det högre förekomst och mängd sporer vid den första provtagningen jämfört med den andra provtagningen (tabell 3; figur 7). Av de två arterna var *N. ceranae* vanligare i försöket än *N. apis* (andel *N. ceranae* DNA $81,1 \pm 3,1$ % (medel \pm se)), oavsett vårrapsfältets behandling (kontroll $80,9 \pm 4,1$ %, betat $81,3 \pm 4,8$ %). Neonikotinoiden imidakloprid har i en tidigare studie kopplats till ökad *nosema*-infektion hos enskilda honungsbin (Pettis et al. 2012) och i en annan studie har *nosema*-infektion kopplats till exponering för svampbekämpningsmedel (Pettis et al. 2013). Vi fann inte motsvarande påverkan på *nosema*-infektion hos honungsbin samhällena av vår behandling med klotianidin. Det finns en positiv samvariation mellan andel infekterade bin och sporer per bi när det gäller *N. apis* (Fries et al. 1984) och motsvarande förhållande kan antas gälla även för *N. ceranae*. Påverkan på samhällena från *nosema*-infektion beror på hur stor andel av de vuxna bin som är infekterade (de Miranda 2014), vilket vi inte kan se utifrån våra analyser. Däremot ser vi att nivån av *nosema*-infektion i vår studie är låg till moderat och sannolikt haft liten påverkan på bin samhällenas kondition och utveckling.

Tabell 3. Resultat av statistiska tester av förekomst (prevalens) och mängd (antal sporer) av *nosema*-mikrosporidier (*Nosema apis* och *N. ceranae*) i honungsbin samhällena i relation till behandlingen av vårrapsfältet (kontroll eller insekticidbetning) som samhällena var placerade vid och tidpunkten för provtagningen (före eller efter placeringen vid fälten) under åren 2013-2014. För prevalens 2013 användes Friedmans ickeparametriska test, eftersom analysens residualer här inte uppfyllde antagandena för den linjära modellen. Se figur 7.

	Prevalens		Antal sporer/bi	
	F _{df} /chi2	P	F _{df}	P
2013				
Behandling	1,80	0,18	1,87 _{1,7}	0,21
Tidpunkt			171,06 _{1,14}	<0,0010
Behandling × tidpunkt			0,03 _{1,14}	0,87
2014				
Behandling	<0,01 _{1,8}	0,96	0,01 _{1,8}	0,95
Tidpunkt	12,04 _{1,8}	0,0085	20,01 _{1,8}	0,0021
Behandling × tidpunkt	0,05 _{1,8}	0,82	0,02 _{1,8}	0,88



Figur 7. (a, b) Andel samhällen med förekomst av nosema-mikrosporidier (*Nosema apis* och *N. ceranae*) och (c, d) antal nosemasporer ($\log_{10}(x + 1)$ -transformerat) per bi i relation till behandlingen av vårrapsfälten (kontroll eller insekticidbetning) som samhällena var placerade vid och tidpunkten för provtagningen (före (öppna cirklar) eller efter (fyllda cirklar) placeringen vid fälten) under åren 2013-2014. Figuren bygger på rådata och cirklarna visar medelvärden per samhälle och fält och felstaplarna 95-procentigt konfidensintervall. N = 8 fält per behandling 2013 och N = 4 för kontrollfält och 6 för betade fält 2014.

Både förekomst och infektionsgrad av virussjukdomar i vår studie motsvarar i stort de förväntade för honungsbisamhällen i södra Sverige (de Miranda 2014). DWV är starkt knutet till varroainfektion, eftersom varroakvalstret är en vektor för viruset (de Miranda & Genersch 2010). DWV-infektionen ökar gradvis med ökande varroaangrepp (jämför figur 6 och tabell 4). Förekomsten av SBV och BQCV var konstant hög genom hela försöket (tabell 4). ABPV är ganska ovanligt i Sverige och hittas generellt bara i södra Sverige (de Miranda 2014). Förekomsten var låg 2013, men ökade markant 2014 (tabell 4).

Tabell 4. Förekomst av fyra virus; deformed wing virus (DWV), sacbrood virus (SBV), black queen cell virus (BQCV) och acute bee paralysis virus (ABPV) i provtagna honungs-bisamhällen, uppdelat på behandlingen av vårrapsfälten (kontroll eller insekticidbetning) som samhällena var placerade vid och tidpunkten för provtagningen (före eller efter placeringen vid fälten) under åren 2013-2014. Ett prov motsvarar ett honungsbisamhälle.

	Antal positiva prover							
	Före				Efter			
	Kontroll		Betat		Kontroll		Betat	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
DWV	3	2	1	3	20	15	3	23
SBV	48	16	46	24	44	14	46	20
BQCV	48	16	47	24	48	16	47	22
ABPV	0	11	0	18	8	9	1	15
Totalt antal prover	48	16	47	24	48	16	47	24

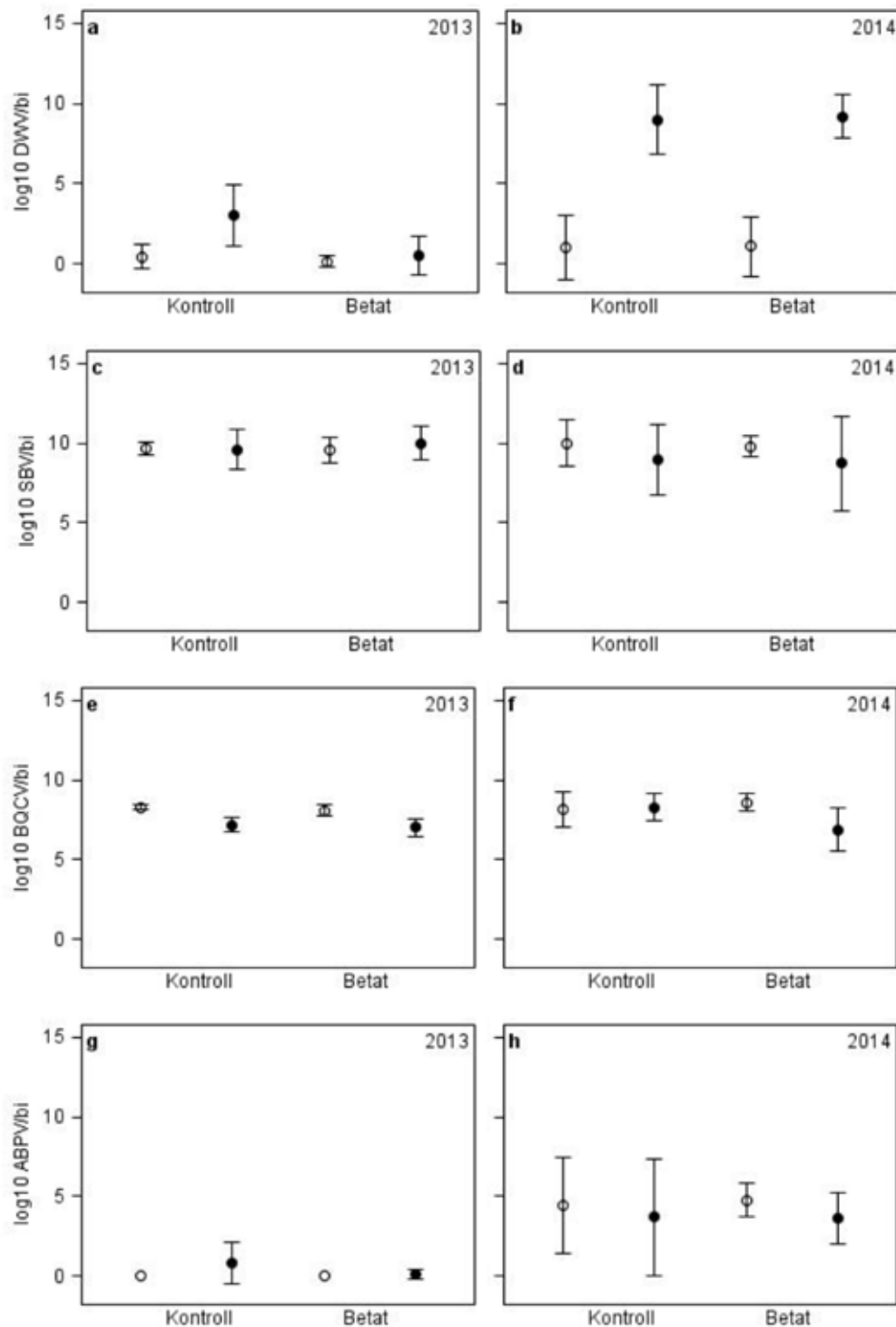
Under 2013 fanns det en interaktion mellan behandling och provtagningstidpunkt för infektionsgraden (mängd virus-RNA) av DWV (tabell 5). Vid det första provtagningstillfället skilde sig inte infektionsgrad mellan de två behandlingarna ($F_{1,14} = 0,24$, $P = 0,63$), men vid det andra tillfället var infektionsgraden högre i samhällena vid kontrollfält jämfört med samhällena vid betade fält ($F_{1,14} = 17,42$, $P < 0,0010$) (figur 8a). På motsvarande sätt var infektionsgraden vid kontrollfält högre vid andra provtagningstillfället jämfört med det första ($F_{1,14} = 18,28$, $P < 0,0010$; figur 8a). För betade fält fanns ingen skillnad i infektionsgrad mellan de två provtagningstillfällena ($F_{1,14} = 0,35$, $P = 0,56$; figur 8a). Dessa skillnader beror till största delen på att fler samhällena var infekterade snarare än att infektionsnivån i infekterade samhällena var högre (tabell 4; Goss 2014). Under 2014 skilde sig inte infektionsgraden av DWV mellan de två behandlingarna och det fanns ingen interaktion mellan behandling och provtagningstidpunkt (tabell 5; figur 8b). Däremot var infektionsgraden högre vid andra provtagningstillfället jämfört med första provtagningstillfället (tabell 5; figur 8b). En jämförelse mellan figur 6 och figur 8a-b verkar bekräfta en samvariation mellan varroakvalstret och DWV-infektion.

Infektionsgraden av SBV och ABPV var likvärdig mellan behandlingarna och provtagningstidpunkterna och det fanns ingen interaktion mellan behandling och provtagningstidpunkt (tabell 5; figur 8c-d, g-h).

Under 2013 var infektionsgraden av BQCV likvärdig mellan behandlingarna och det fanns ingen interaktion mellan behandling och provtagningstidpunkt (tabell 5; figur 8e). Däremot var infektionsgraden högre vid första provtagningstidpunkten jämfört med andra provtagningstidpunkten (tabell 5; figur 8e). Under 2014 fanns det en tendens till en interaktion mellan behandling och provtagningstidpunkt för infektionsgraden av BQCV (tabell 5). Vid det första provtagningstillfället var infektionsgraden likvärdig mellan de två behandlingarna ($F_{1,8} = 0,48$, $P = 0,51$), men vid det andra tillfället var infektionsgraden lägre i samhällena vid betade fält jämfört med samhällena vid kontrollfält ($F_{1,8} = 6,23$, $P = 0,037$) (figur 8f). För kontrollfält var det ingen skillnad i infektionsgrad mellan de två provtagningstillfällena ($F_{1,8} = 0,02$, $P = 0,87$; figur 8f). Vid betade fält var infektionsgraden lägre vid det andra provtagningstillfället, jämfört med vid det första provtagningstillfället ($F_{1,8} = 11,29$, $P = 0,0099$; figur 8f).

Tabell 5. Resultat av statistiska tester av mängd virus-RNA ($\log_{10}(x + 1)$ -transformerat) per honungsbi (*Apis mellifera*) för fyra virus; deformed wing virus (DWV), sacbrood virus (SBV), black queen cell virus (BQCV) och acute bee paralysis virus (ABPV) i relation till behandlingen av vårrapsfälten (kontroll eller insekticidbetning) som samhällena var placerade vid och tidpunkten för provtagningen (före eller efter placeringen vid fälten) under åren 2013-2014. Se figur 8. För ABPV 2013 och SBV 2014 användes Friedmans ickeparametriska test, eftersom residualerna här inte uppfyllde antagandena för de linjära modellerna.

	Behandling		Tidpunkt		Behandling* tidpunkt	
	F _{df} /chi2	P	F _{df}	P	F _{df}	P
2013						
DWV	10,86 _{1,7}	0,013	11,84 _{1,14}	0,0040	6,79 _{1,14}	0,021
SBV	0,08 _{1,7}	0,78	0,28 _{1,14}	0,60	0,60 _{1,14}	0,45
BQCV	1,16 _{1,7}	0,32	41,79 _{1,14}	<0,0010	0,01 _{1,14}	0,94
ABPV	1,38	0,24				
2014						
DWV	0,02 _{1,8}	0,88	142,12 _{1,8}	<0,0010	0,01 _{1,8}	0,93
SBV	0,09	0,76				
BQCV	1,63 _{1,8}	0,24	3,98 _{1,8}	0,081	5,09 _{1,8}	0,054
ABPV	0,02 _{1,8}	0,88	2,96 _{1,8}	0,12	0,12 _{1,8}	0,74



Figur 8. Mängd virus-RNA ($\log_{10}(x + 1)$ -transformerat) per honungsbi (*Apis mellifera*) för fyra virus; (a, b) deformed wing virus (DWV), (c, d) sacbrood virus (SBV), (e, f) black queen cell virus (BQCV) och (g, h) acute bee paralysis virus (ABPV) i relation till behandlingen av vårrapsfälten (kontroll eller insekticidbetning) som samhällena var placerade vid och tidpunkten för provtagningen (före (öppna cirklar) eller efter (fyllda cirklar) placeringen vid fälten) under åren 2013-2014. Figuren bygger på rådata och cirklarna visar medelvärden per samhälle och fält och felstaplarna 95-procentigt konfidensintervall. N = 8 fält per behandling 2013 och N = 4 för kontrollfält och 6 för betade fält 2014.

I den här studien användes förekomst (prevalens) och infektionsgrad (titrar) av parasiter och sjukdomar som ett indirekt mått på honungsbinas hälsa. Inga resultat från parasit- och sjukdomsanalyserna i den här studien tyder på att honungsbinas hälsa påverkas negativt av att deras samhällen placeras vid vårraps betad med klotianidin, åtminstone inte när varroakvalstret kontrolleras. Vi kan inte avfärda att en påverkan på patogener i bisamhällen kan förekomma från exponering i fält av klotianidin. Men om sådan påverkan finns är den inte tillräckligt stor för att bli synlig i det genomförda försöket.

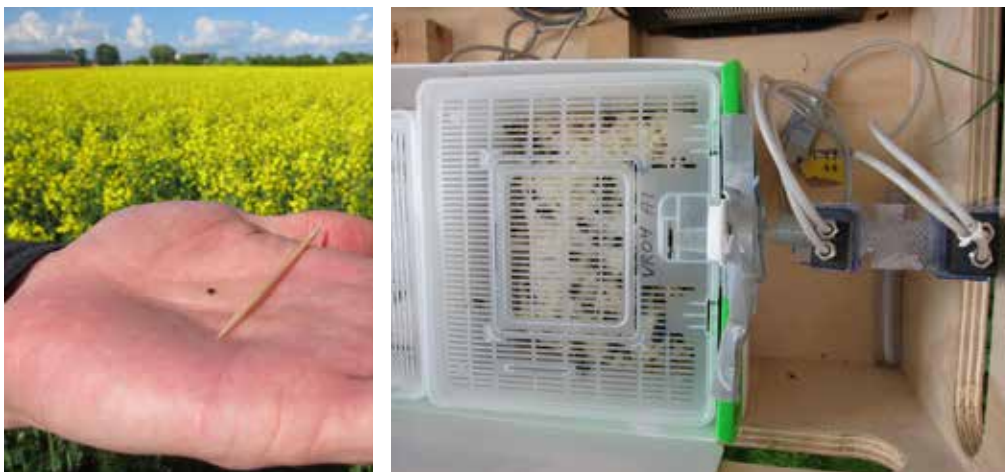
4 Den mörka jordhumlan

4.1 Jordhumlan: material och metoder

Sex kommersiellt uppfödda jordhumlesamhällen (*Bombus terrestris*; Natupol N, Koppert Biological Systems) placerades vid varje vårrapsfält i början av blomningen 2013 och 2014 (tabell S2). Vid den här tidpunkten var samhällena ungefär tio veckor gamla och skulle innehålla en drottning, ungefär 50 arbetare och yngel i olika stadier. Tillgång till den medföljande sockerlösningen hindrades under 2013 genom att sätta på ett plastlock och samhällena matades inte artificiellt under försökets gång. Under 2014 medförde en miss i kommunikationen inom projektet att tillgången till sockerlösningen inte hindrades helt, vilket gjorde att den utnyttjades av humlorna. Vi har därför valt att inte använda data insamlade från humlesamhällena 2014, eftersom vi inte vet i vilken grad humlorna har nyttjat sockerlösning och i vilken grad de har födosökt från vårrapsfältet och därmed exponerats för klotianidinet i vårrapsens nektar.

Jordhumlan är precis som honungsbiet en social insekt, som lever i samhällen med en drottning och många arbetare. Till skillnad från honungsbiets fleråriga samhällen, med flera tusentals arbetare per samhälle, bygger humlor upp ettåriga samhällen med arbetare som kan räknas i tiotal eller hundratal per samhälle. Humlesamhällena förväntas tillväxa i arbetarstyrka och sedan övergå till att producera nya drottningar och hanar, vilket gör att samhällstillväxten först ökar och sedan minskar (Whitehorn et al. 2012). Humlesamhällenas tillväxt övervakades genom vägning. Samhällena vägdes innan utplacering vid vårrapsfälten och därefter med ungefär två veckors mellanrum.

Humlor är, liksom både honungsbin och det röda murarbiet, ”central place foragers”. Det betyder att de utgår från och ska komma tillbaka till sitt centrala bo när de flyger ut för att samla in pollen och nektar för att mata sina larver med och för att äta själva. Själva flygturen innebär en kostnad i energi och flygtid för humlan, men om den hittar näringsrik föda av bra kvalitet innebär födosökturen en nettovinst för samhället (Jha & Kremen 2013, Olsson & Bolin 2014). RFID-teknik (Radio Frequency Identification) användes för att registrera den tid humlorna låg på att födosöka. Tekniken bygger på mycket små passiva transpondrar med unika id-nummer, som kan registreras av antenner när transpondern kommer inom antennens räckvidd. Informationen lagras sedan på en datavärd, som antennen är kopplad till. Vi satte upp tunnlar med två antenner fastsatta vid in- och utgången till ett humlesamhälle per fält. Genom att använda två antenner kan vi avgöra om humlan är på väg ut eller in i samhället.



Den vänstra bilden visar en transponder tillsammans med en tandpetare och den högra bilden visar tunneln med två antenner, som sitter monterade på in- och utgången till ett humlesamhälle.

Vid första observation av nya drottningar i något av de 12 samhällen som stod placerade vid fälten inom ett par avslutades försöket genom att samhällena samlades in och frystes ner (-20 °C). Det skedde mellan 7 juli och 5 augusti 2013, 23-38 dagar efter utplacering vid fälten, och mellan 29 juli och 6 augusti 2014, 42 dagar efter utplacering. Vid de tidsmässigt asynkrona fälten 2013 samlades samhällena in på olika datum, för att tillåta samma antal dagar från utplaceringsdatumet.

Humlesamhällen måste varje år producera nya drottningar och hanar, för att överleva, eftersom deras samhällen är ettåriga. Det är endast de nya drottningarna som överlever vintern och lägger grunden för nästa års humlepopulation. I fyra samhällen per fält räknades antalet kokonger med drottningar och arbetare/hanar, för att ge en uppskattning av reproduktionsframgången. Dessutom vägdes kokonger, larver och bostrukturen och antalet celler som användes för lagring av nektar och pollen räknades.

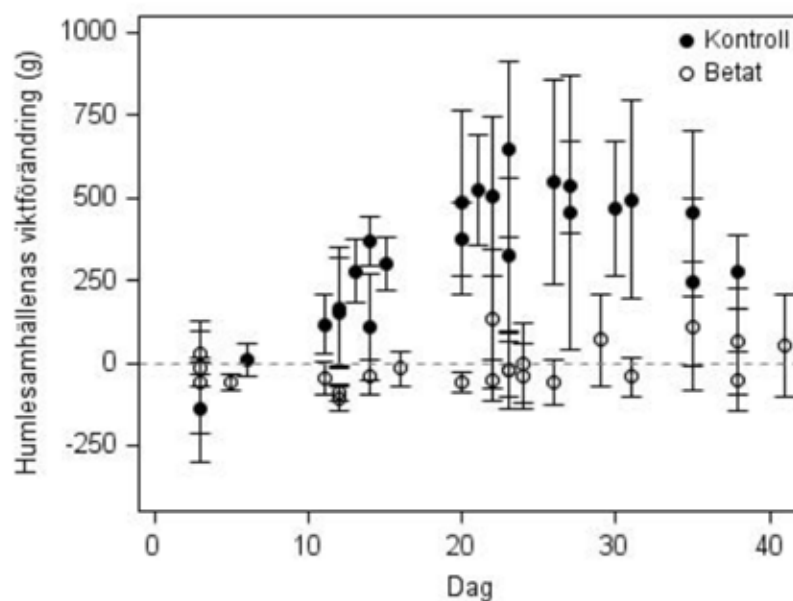
4.2 Jordhumlan: resultat och diskussion

4.2.1 Samhällstillväxt

Placeringen vid betade fält hade en negativ påverkan på humlesamhällenas tillväxt, jämfört med placeringen vid kontrollfält (tabell 6, figur 9). Humlesamhällen vid kontrollfält hade en stark både linjär och icke-linjär tillväxt över tiden (dag: $F_{1,31} = 129,10$, $P < 0,0010$, dag \times dag: $F_{1,28} = 114,70$, $P < 0,0010$; figur 9). Vid betade fält hade samhällena en mycket svagare tillväxt, om ens någon (dag: $F_{1,16} = 0,92$, $P = 0,35$, dag \times dag: $F_{1,14} = 10,78$, $P = 0,0055$; figur 9).

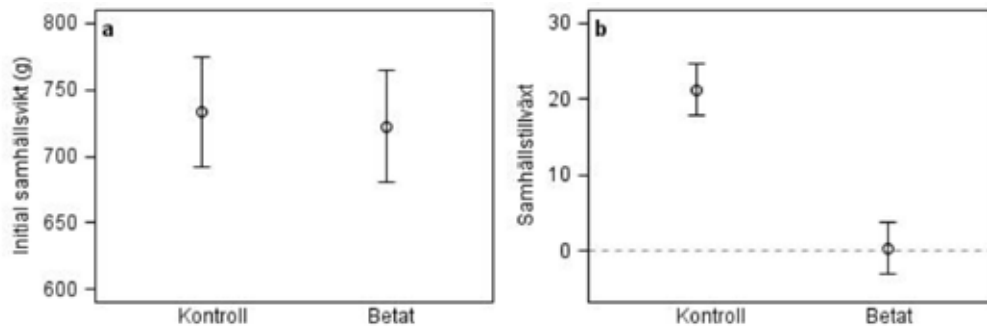
Tabell 6. Tillväxtmodell för jordhumlesamhällena, som användes för att testa hur samhällenas viktförändring påverkades av vårrapsfältens behandling (kontroll eller insekticidbetning) från utplaceringsdagen (dag = 0) och fram till terminering.

	Estimat	F _{df}	P
Intercept	-51,07		
Behandling	-434,27	51,41 _{1, 18}	<0,0010
Dag	0,23	144,31 _{1, 21}	<0,0010
Dag × behandling	72,50	143,00 _{1, 21}	<0,0010
Dag × dag	0,08	102,52 _{1, 19}	<0,0010
Dag × dag × behandling	-1,40	130,62 _{1, 19}	<0,0010



Figur 9. Jordhumlesamhällenas tillväxt över tiden från utplacering vid vårrapsfälten (dag = 0) och fram till terminering, i relation till vårrapsfältens behandling (kontroll eller insekticidbetning). Cirklarna visar medelvärden för de sex samhällena vid varje fält och vägningstillfälle och felstaplarna 95-procentigt konfidensintervall. Två samhällen vid olika fält (ett kontrollfält och ett betat fält) vägdes inte vid ett tillfälle, vilket ger ett medelvärde baserat på fem samhällen vid de fälten och vägningstillfällena. Den streckade linjen indikerar utebliven tillväxt i relation till initial samhällsvikt. Figuren är modifierad från Rundlöf et al. (2015).

Variabler som ingår i en signifikant interaktion, som behandling som interagerar med dag × dag (tabell 6), ska tolkas med försiktighet. Därför har vi också jämfört tillväxthastigheten hos humlesamhällen vid kontrollfält och betade fält under deras förväntade positiva tillväxtfas. Vi fann att trots en jämförbar initial samhällsvikt ($F_{1,7} = 0,99$, $P = 0,35$; figur 10a), så var tillväxthastigheten i humlesamhällena vid betade fält betydligt lägre än i samhällena vid kontrollfält ($F_{1,7} = 115,80$, $P < 0,0010$; figur 10b). Påverkan på samhällstillväxten kan bero på bland annat att de födosökande humlornas vilja eller förmåga att samla in pollen försämras eller att det finns färre amhumlor som kan ta hand om ynglet (Mommaerts et al. 2010, Gill et al. 2012, Feltham et al. 2014, Gill & Raine 2014).



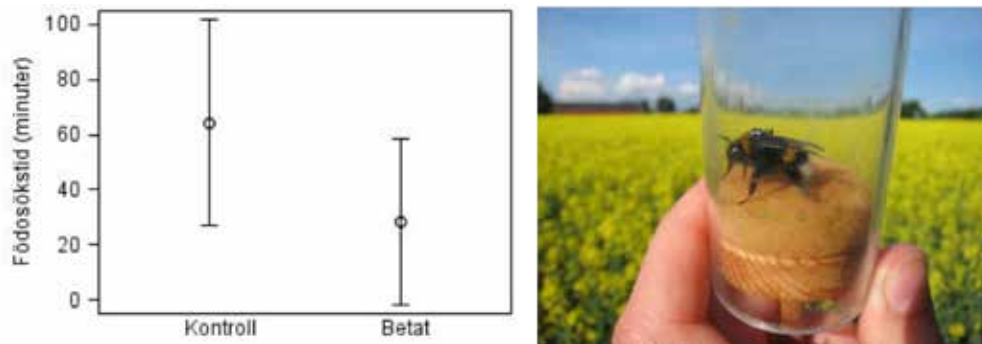
Figur 10. (a) Jordhumlesamhällenas initiala vikt (g) just innan utplacering vid vårrapsfälten och (b) tillväxthastigheten (gram per dag) under sommaren 2013 i relation till vårrapsfältens behandling (kontroll eller insekticidbetning). Figureerna bygger på modellestimat och cirkelarna visar medelvärden och felstaplarna 95-procentigt konfidensintervall. Den streckade linjen i panel b indikerar utebliven tillväxt i relation till initial samhällsvikt. N = 8 fält per behandling.

4.2.2 Födosökstid

Vi hade en hel del tekniska problem med RFID-utrustningen, vilket är bra att ha i åtanke när man granskar resultaten för den delen av undersökningen. Födosöksövervakningen gjordes baserat på ett schema där information skulle samlas in samtidigt från fält inom par. På grund av de stora avstånden mellan rapsfälten var det en stor utmaning att hinna fånga humlor, limma på transpondrar och flytta utrustningen mellan de olika fältparen. Under den halva dag per fält inom par, som var avsatt för att fånga humlor och limma transpondrar på deras ryggar, var det svårt att få ihop de önskade tio humlorna per fält. Födosöksstudien inkluderade de sex fältparen med fenologiskt synkron raps och information samlades in under två omgångar. Under omgång ett limmades transpondrar på 67 humlor (4-6 humlor per fält) och under omgång två limmades vi transpondrar på 68 humlor (6-9 humlor per fält, utom i ett fall då endast tre humlor fick en transponder). Dessutom hade vi problem med att en av de två enheterna som lagrar information om vilka transpondrar som passerar igenom antennerna inte alltid fungerade som den skulle utan slutade lagra information efter 28 kB, vilket som mest motsvarar ett par födosöksturer.

Data vi använde för att undersöka om födosökstiden påverkades av behandlingen inkluderade födosökande humlor som varit ute längre än fem minuter och gjort minst tre födosöksrundor, för att utesluta humlor som inte födosökte utan istället t.ex. var ute på en första orienteringstur eller transporterade bort avfall från boet. I det slutgiltiga datasetet fanns det födosöksinformation registrerad från fem fältpar, med totalt åtta humlor under omgång ett (1-3 humlor per fält) och 18 humlor under omgång två (1-5 humlor per fält). Det betyder att materialet inkluderar väldigt få humlor. Av de registrerade humlorna under omgång ett fanns fyra vid betade fält och fyra vid kontrollfält. Under omgång två var motsvarande siffra för betade fält sex och kontrollfält 12. Varje registrerad humla genomförde mellan tre och 52 födosöksrundor, med ett genomsnitt på $14,6 \pm 4,5$ (medel \pm se) födosöksrundor per humla. Den genomsnittliga födosökstiden var $48,5 \pm 9,9$ minuter per födosöksrunda.

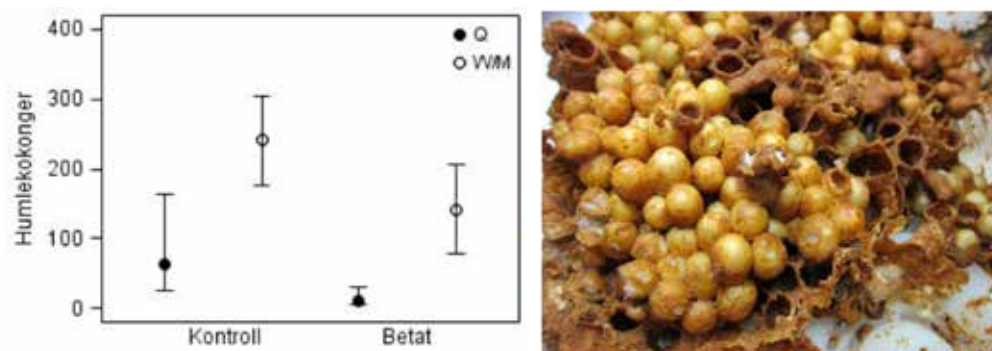
Det fanns en tendens till att humlorna hade längre genomsnittlig födosökstid vid kontrollfält jämfört med betade fält ($F_{1,2} = 15,59$, $P = 0,059$; figur 11). Om all data inkluderades och en viktning av antalet födosöksturer som en humla gjorde inkluderades i modellen visade resultaten på längre genomsnittlig födosökstid vid kontrollfält jämfört med betade fält ($F_{1,9} = 6,69$, $P = 0,028$). Det går delvis mot den tidigare studie, där man registrerade längre födosökstider för humlor som hade exponerats för en pyretroid och ingen skillnad i födosökstid mellan kontroll och exponering för neonikotinoiden imidaklopid (Gill & Raine 2014). Däremot ökade födosökstiden med tiden för alla behandlingarna. I samma studie fann man att humlor som exponerats för neonikotinoiden samlade in mindre pollen (Gill & Raine 2014). Eftersom våra resultat baserar sig på så få observerade humlor och det finns få andra studier att jämföra med, är det svårt att dra generella slutsatser om hur exponering för neonikotinoider under fältförhållanden påverkar humlors födosökstider.



Figur 11. Födosökstid (minuter) per födosöksrunda i relation till vårrapsfältets behandling (kontroll eller betat med Elado). Figuren bygger på modellestimat och cirkelarna visar medelvärden och felstaplarna 95-procentigt konfidensintervall. $N = 5$ fält per behandling. Bilden visar en jordhumla med en transponder på ryggen.

4.2.3 Reproduktion

När vi i slutet av vårt experiment gick igenom humlesamhällena kunde vi konstatera att det hade producerats färre drottningkokonger ($F_{1,7} = 7,78$, $P = 0,027$) och färre han-/arbetarkokonger ($F_{1,7} = 8,09$, $P = 0,025$) i samhällen som stått vid betade fält jämfört med samhällen som stått vid kontrollfält (tabell 7, figur 12). Den reducerade reproduktionsframgången är i linje med tidigare fynd av en 85-procentig minskning i drottningproduktion när humlesamhällen matats med låga doser av neonikotinoiden imidaklopid och sedan fått födosöka i ett verkligt jordbrukslandskap (Whitehorn et al. 2012). Produktionen av nya drottningar är nödvändig för samhällets fortlevnad, eftersom det endast är de nya drottningarna som övervintrar och bildar grunden för nästa års humlepopulation. Även vikten av kokongerna och bostrukturens vikt var lägre vid betade fält jämfört med kontrollfält (tabell 7). Däremot fanns det ingen statistisk skillnad i larvernans vikt eller antalet nektar- eller pollenceller mellan behandlingarna (tabell 7).



Figur 12. Antal drottningkokonger (Q) och kokonger med arbetare/hanar (W/M) i relation till vårrapsfältets behandling (kontroll eller insekticidbetning). Figuren bygger på modell-estimat och cirkelarna visar medelvärden och felstaplarna 95-procentigt konfidensintervall. N = 8 fält per behandling. Bilden visar nekar-/pollen-, ägg- och larvceller och kokonger i olika stadier av utveckling i ett humlesamhälle. Figuren är modifierad från Rundlöf et al. (2015).

Tabell 7. Resultat av statistiska test av skillnaden i antal drottningkokonger, kokonger med arbetare eller hanar, totala vikten kokonger, larver och bostrukturen, samt antalet nektar- och pollenceller i humlesamhällen i relation till behandlingen (kontroll eller insekticidbetning) i vårrapsfältet som de har varit placerade vid under sommaren 2013.

	F _{df}	P	Kontroll (medel ± se)	Betat (medel ± se)
Antal drottningkokonger	7,78 _{1,7}	0,027	70,0 ± 12,3	20,6 ± 8,3
Antal kokonger med arbetare/hanar	8,09 _{1,7}	0,025	241,0 ± 29,8	142,0 ± 29,8
Kokongernas vikt (g)	14,77 _{1,7}	0,0061	172,0 ± 32,3	54,0 ± 18,7
Larvernas vikt (g)	0,15 _{1,7}	0,71	15,5 ± 6,0	13,6 ± 5,7
Bostrukturens vikt (g)	12,34 _{1,7}	0,0098	261,0 ± 24,7	139,4 ± 24,7
Antal nektarceller	2,43 _{1,7}	0,16	59,4 ± 23,7	23,5 ± 10,4
Antal pollenceller	0,60 _{1,7}	0,46	5,5 ± 2,1	3,6 ± 1,4

4.2.4 Humlesamhällen 2014

Studier av humlesamhällena 2014 avbröts, eftersom samhällen vid alla fält utom två (ett betat och ett kontrollfält; tabell 8) definitivt har haft tillgång till sockerlösning, på grund av en felaktig tillslutning av behållaren. Det gör att vi inte kan säkerställa att samhällena har utnyttjat vårrapsen för att samla nektar och vi vet därför inte i vilken grad humlorna har exponerats för klotianidin. Vi verifierade tillgången på sockerlösning genom att vid försökets slut inspektera samhällena, väga påsen med sockerlösning och gradera tillgången till sockerlösningen i skalan 0-2, där 0 = ingen tillgång till sockerlösningen, 1 = sannolik tillgång och 2 = definitiv tillgång. Alla 66 samhällen graderades, men endast 34 av påsarna med sockerlösning kunde vägas (tabell 8), eftersom några hade gått sönder eller så satt påsen fast i ytterkartongen. Tillgången på sockerlösning graderades på samhällsnivå och summerades på fältnivå. Tillgången på fältnivå baserades på bedömningen av samtliga samhällen vid ett fält. Om något samhälle vid fältet haft tillgång till sockerlösning, bedömdes alla samhällen ha kunnat komma åt sockerlösning. Vid samtliga fält hade samhällena sannolikt eller definitivt haft tillgång till sockerlösning (tabell 8).

Tabell 8. Antal humlesamhällen utan tillgång (0), sannolik tillgång (1) och definitiv tillgång (2) till sockerlösning i okänd omfattning under försökets gång, antal av samhällen där sockerlösningspåsen kunde vägas och vikten hos sockerlösningspåsen. Tillgången på sockerlösning graderades på samhällsnivå och summerades sedan på fältnivå.

	N	N vägda samhällen	Vikt socker (g) (medel ± se)
Samhällsnivå (N = antal samhällen)			
<i>Kontroll</i>			
Ej tillgång (0)	6	2	1997 ± 93
Sannolik tillgång (1)	11	7	1533 ± 132
Definitiv tillgång (2)	13	3	1378 ± 37
<i>Betat</i>			
Ej tillgång (0)	10	9	2050 ± 32
Sannolik tillgång (1)	12	10	1449 ± 121
Definitiv tillgång (2)	14	3	1491 ± 181
Fältnivå (N = antal fält)			
<i>Kontroll</i>			
Ej tillgång (0)	0		
Sannolik tillgång (1)	1		
Definitiv tillgång (2)	4		
<i>Betat</i>			
Ej tillgång (0)	0		
Sannolik tillgång (1)	1		
Definitiv tillgång (2)	5		

5 Det röda murarbiet

5.1 Murarbiet: material och metoder

Det röda murarbiet (*Osmia bicornis*) är till skillnad från honungsbin och jordhumlor inte socialt, utan lever ensamt och kallas därför för solitärbin. När övervintrade röda murarbin kryper ur sina kokonger på våren flyger de först iväg för att para sig (Raw 1972). Därefter börjar honan bygga celler i rörformiga hål, gärna i samma hål som hon själv kröp ut från (Torchio 1984, Bosch & Kemp 2002). I cellerna lägger hon en klump med insamlad pollen uppblött med nektar och på den ett ägg (Raw 1972).



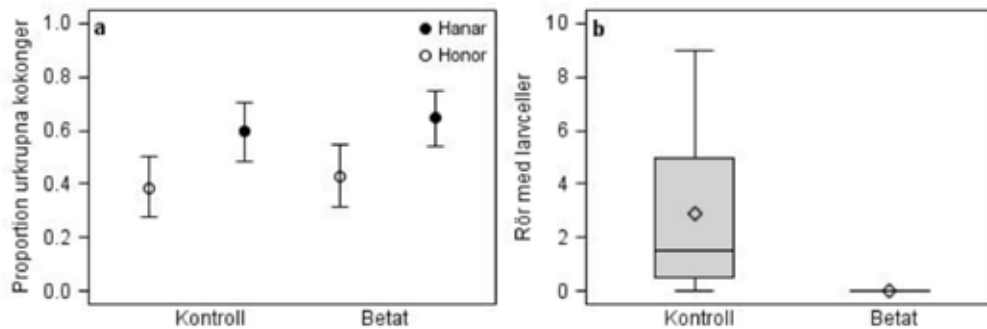
Den vänstra bilden visar röda murarbin på väg ur sina kokonger och den högra bilden visar en stolpe med pappror, där honorna kan bygga nya larvceller, i en plastbehållare framför ett av vårrapsfälten.

Tre boplatser, som var och en innehöll 29 pappersrör med en inre diameter på 6 mm, monterades på stolpar som placerades vid vårrapsfälten ungefär en vecka innan det senaste fältet inom ett fältpar beräknades börja blomma (tabell S2). Varje boplatz innehöll nio kokonger med röda murarbin, fyra honor och fem hanar, med totalt 27 kokonger vid varje fält (12 honor och 15 hanar). Papprören samlades in 36-43 dagar efter att kokongerna placerades ut. Boaktivitet bestämdes genom att räkna antalet rör med larvceller och antalet larvceller. Proportionen av urkrupna kokonger beräknades genom att räkna antalet öppna kokonger.

Resultaten som presenteras för det röda murarbiet var en del av ett examensarbete (Yourstone 2014). Ytterligare ett examensarbete på solitärbin genomfördes 2014, men materialet är fortfarande under bearbetning.

5.2 Murarbiet: resultat och diskussion

En större andel av hanarna, jämfört med honorna, kröp ur sina kokonger ($F_{1,14} = 14,97$, $P = 0,0017$; figur 13a). Däremot var det lika stor andel av murarbina som kröp ur sina kokonger oberoende av behandling ($F_{1,7} = 0,71$, $P = 0,43$) och det fanns ingen interaktion mellan kön och behandling ($F_{1,14} = 0,01$, $P = 0,94$) (figur 13a).



Figur 13. (a) Andelen urkrupna kokonger för honor (12 per fält) och hanar (15 per fält) av det röda murarbiet och (b) antal rör med larvceller i relation till behandlingen (kontroll eller insekticidbetning) i vårrapsfältet som de har varit placerade vid under sommaren 2013. Värdena i panel a bygger på modellestimat och cirkelarna visar medelvärden och felstaplarna 95-procentigt konfidensintervall. I panel b indikerar den horisontella linjen i boxen medianvärdet, diamanten indikerar medelvärdet och boxen och felstaplarna visar 25-75 percentilen respektive minimum- och maximumvärden. N = 8 fält per behandling. Figuren är modifierad från Rundlöf et al. (2015).

Vid sex av de åtta kontrollfälten började murarbihonorna att bygga larvceller i 1-9 rör av de tillgängliga 87 rören som fanns vid varje fält. Honorna byggde i genomsnitt $3,5 \pm 0,3$ (medel \pm se) larvceller per rör. Som kontrast började ingen av de totalt 96 honor som släpptes ut vid de betade fälten att bygga larvceller i de rör vi placerade ut. Det betyder att det fanns en skillnad i antalet rör med larvceller mellan kontrollfält och betade fält ($Z = 2,84$, $P = 0,0045$; figur 13b). De röda murarbin som byggde larvceller i våra boplatser är sannolikt de bin vi placerade ut, eftersom vårrapsens blomningstid är i slutet av artens aktivitetsperiod i södra Sverige (se bilaga 1).

Honungsbin som har utsatts för låga doser av neonicotinoiden tiametoxam har reducerad förmåga att hitta hem till sitt samhälle efter en födosöksrunda om man jämför med bin som inte har exponerats (Henry et al. 2012). En sådan minskad förmåga att hitta hem har föreslagits ha större konsekvenser för populationer av solitärbin, jämfört med honungsbin, efter honungsbisamhällen kan överleva trots att de förlorar en del av sin arbetarstyrka (Henry et al. 2012). Vi vet inte orsaken till varför våra röda murarbin inte lyckades återvända eller undvek de boplatser vi placerade ut vid de betade fälten, men en förklaring skulle kunna vara minskad förmåga att navigera.

Det finns mycket få studier som fokuserar på hur neonicotinoider påverkar solitärbin och det saknas helt studier där solitärbin exponerats genom växter som odlats från frön betade med neonicotinoider. I en burstudie har överlevnad och reproduktionsframgång hos det röda murarbiet undersökts, efter att bina har erbjudits sockerlösningar innehållande 2,87 ng/g av tiametoxam och 0,45 ng/g av klotianidin eller en oförorenad kontrollsockerlösning (Sandrock et al. 2014). Ingen skillnad i honornas överlevnad kunde ses mellan behandling och kontroll. Däremot gjorde honorna färre bon och larvceller i den behandlade buren jämfört med kontrollburen. Även larvdödigheten var högre i den behandlade buren. Det är dock svårt att säga hur generella resultaten från den här studien är, eftersom endast en bur per behandling inkluderades och det finns därför ingen replikering i studien. Eftersom inga larvceller byggdes i boplatserna vid insekticidbetade

fält i vår studie, kan vi inte dra några slutsatser om hur betning med klotianidin påverkar reproduktionsförmågan utifrån vår studie.

6 Binas exponering

6.1 Exponering: material och metoder

Vi utvärderade binas exponering för klotianidin genom att kvantifiera i hur hög grad de nyttjade rapspollen och hur mycket klotianidinrester som återfanns i bin, pollen och nektar.

Vi samlade in pollenprover från pollenfällor monterade på tre honungsbi-samhällen, från jordhumlor som födosökte i rapsfälten och från det röda murarbiets larvceller. Pollenfällorna var monterade på honungsbisamhällena under rapsens toppblom (BBCH-stadie 65-67 (Meier 2001)) och minst 25 ml pollen samlades in per fält. Proverna sorterades efter färg på pollenklumparna och fraktionerna vägdes. Sedan togs ett litet prov ut från fraktioner med gul färg på pollenklumparna för vidare analys. Ett till fem pollenprov från jordhumlor samlades in per fält ($2,9 \pm 0,3$ (medel \pm se)), vilket gav totalt 47 pollenprov. Pollen från det röda murarbiet kunde samlas in från 17 larvceller, fördelade över de sex fälten med boaktivitet. Ungefär 100 pollenkorn per prov räknades sedan och bedömdes till antingen rapstyp eller ej rapstyp med hjälp av ett ljusmikroskop och ett pollenreferensbibliotek.

Bi-, pollen- och nektarprover samlades in för att kvantifiera mängden klotianidin, tillsammans med de fyra andra neonikotinoiderna som används i Sverige (tabell S4). Ingången till honungsbisamhällena täpptes igen och minst 50 flygbin vid ingången till samhällena samlades in per fält. Dessa bin är sannolikt sådana som återvänt efter en födosökstur. Fem honungsbin med pollen och minst fem honungsbin utan pollenklumpar fångades när de födosökte i vårrapsfältet och användes för pollenprovet respektive nektarprovet från binas honungsmage. Vid två kontrollfält kunde inga honungsbin med pollen hittas. Fem jordhumlor fångades per vårrapsfält, togs till labbet och nektarn från nektarmagen kunde extraheras från 3-5 humlor per fält, utom vid ett fält där endast en humla bar med sig nektar. Nektarproverna hanterades kvantitativt med kapillär mikroprovtagningsteknik (Jonsson et al. 2012a, b, Jonsson 2013).

Neonikotinoiderna analyserades med vätskekromatografi tillsammans med tandemmasspektrometri (Jonsson et al. 2013). De beräknade gränserna för att kvantifiera klotianidin var 0,25 ng/g i bin, 1,5 ng/g i pollen och 0,50 ng/ml i nektar. Motsvarande gränser för detektering av klotianidin var 0,080 ng/g, 0,50 ng/g och 0,17 ng/ml. Beta-cyflutrin analyserades med gaskromatografi tillsammans med masspektrometri, med en detekteringsgräns på 1,0 ng/g pollen.

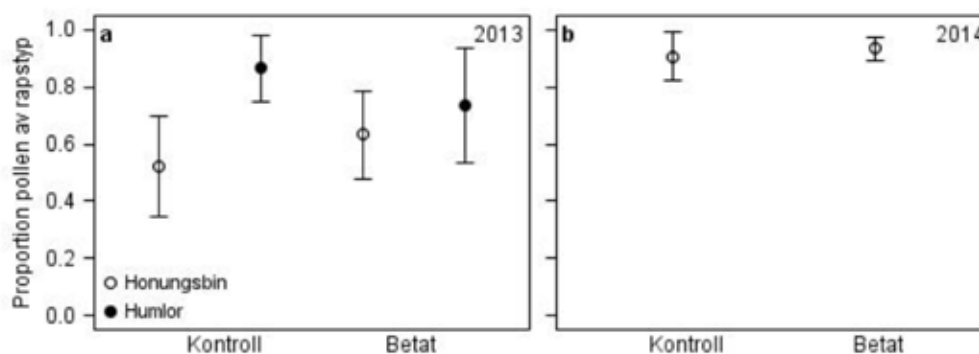
6.2 Exponering: resultat och diskussion

6.2.1 Nyttjande av rapspollen

Honungsbisamhällena samlade i genomsnitt $57,8 \pm 5,0$ % (medel \pm se) pollen av rapstyp under vårrapsens toppblom 2013. Motsvarande siffra för 2014 var $92,2 \pm 1,4$ %. Jordhumlorna som födosökte i vårrapsfälten och bar med sig pollen samlade i genomsnitt $80,1 \pm 5,0$ % pollen av rapstyp. Vi fann varierande mängd pollen

av rapstyp i nio av de 17 larvceller som innehöll pollenrester, vilka fördelade sig med 1-5 celler över de sex kontrollfälten med bosättningsaktivitet. De röda murarbihonorna samlade pollen av rapstyp i genomsnitt $35,1 \pm 17,0$ % per fält.

Varken 2013 ($F_{1,7} = 1,09$, $P = 0,33$; figur 14a) eller 2014 ($F_{1,7} = 0,98$, $P = 0,36$; figur 14b) fanns det någon statistisk skillnad i mängden pollen av rapstyp som honungsbisamhällena samlade mellan de två behandlingarna (kontroll eller betat med Elado). Inte heller jordhumlor samlade olika mängder pollen av rapstyp beroende på vårrapsfältets behandling ($F_{1,8} = 3,70$, $P = 0,092$; figur 14a).



Figur 14. Andelen pollen av rapstyp fångat i pollenfällor monterade på honungsbikuporna och från humlor som födosöker i vårrapsfälten under åren 2013-2014 i relation till behandlingen i vårrapsfältet (kontroll eller insekticidbetning). Figuren bygger på rådata och cirkel visar medelvärden och felstaplar 95-procentigt konfidensintervall. $N = 8$ fält per behandling 2013 och $N = 4$ för kontrollfält och 5 för betade fält 2014. Resultat från ett pollenprov (från ett betat fält) saknas 2014, eftersom det blev blött under insamlingen.

Vi kan konstatera att alla biarterna, i olika utsträckning, utnyttjade rapspollen. Eftersom vårt vårrapsfält i de flesta fallen var det enda rapsfält som blommade inom 1 km från bina vid provtagning, bekräftar detta att bina sannolikt hade födosökt i vårrapsfälten. I hur hög grad bina har utnyttjat vårrapsfälten för att samla nektar vet vi inte.

6.2.2 Kvantifiering av klotianidin och andra neonikotinoider

Fem olika neonikotinoider kvantifierades i de insamlade proverna; klotianidin, acetamiprid, imidakloprid, tiakloprid och tiametoxam (tabell S4). Klotianidin fanns i alla fyra matriserna 2013; honungsbin, pollen från honungsbin, nektar från honungsbin och nektar från jordhumlor, och i honungsbin och pollen och nektar från honungsbin 2014, ibland från båda behandlingarna (tabell 9). Klotianidin kunde detekteras i samtliga 50 prov från betade fält och i fyra av 42 prov från kontrollfält, i honungsbin och deras nektar från 2013. Dock var koncentrationerna betydligt högre i prover från betade vårrapsfält än där det detekterades vid kontrollfält (tabell 9).

Tabell 9. Koncentrationen av klotianidin i honungsbin (ng/g), pollen (ng/g) och nektar (ng/ml) insamlad av honungsbin och nektar insamlad av humlor (ng/ml) från kontrollfält och insekticidbetade vårrapsfält under åren 2013-2014, samt test av skillnader i koncentrationer mellan behandlingarna. <LOD = under detekteringsgränsen (se tabell S4 i bilaga 1).

	Kontroll (K)		Betat (B)		Wilcoxon-test för skillnad mellan behandlingarna		
	Intervall	Medel ± se	Intervall	Medel ± se	Z	P	N(K, B)
2013							
Honungsbin	<LOD-0,89	0,13 ± 0,11	0,35-4,9	2,4 ± 0,50	-3,29	0,0010	8, 8
Pollen från honungsbin	<LOD	<LOD	6,6-23	14 ± 1,8	-3,16	0,0016	6, 8
Nektar från honungsbin	<LOD-0,61	0,11 ± 0,080	6,7-16	10 ± 1,3	-3,40	<0,0010	8, 8
Nektar från humlor	<LOD	<LOD	<LOD-20	4,4 ± 0,74	-3,53	<0,0010	8, 8
2014							
Honungsbin	<LOD	<LOD	0,15-1,5	1,1 ± 0,20	-2,53	0,011	4, 6
Pollen från honungsbin	<LOD	<LOD	2,4-16	6,1 ± 2,0	-2,53	0,011	4, 6
Nektar från honungsbin	<LOD	<LOD	2,6-9,8	4,9 ± 1,1	-2,53	0,011	4, 6

Elado innehåller både neonicotinoiden klotianidin och pyretroiden beta-cyflutrin som sina aktiva ingredienser, men vi förväntar oss bara att våra bin exponerats för klotianidin och inte beta-cyflutrin. Klotianidin förväntas tas upp av växterna och fördela sig i alla växtens delar, för att skydda mot angrepp från skadegörande insekter (Elbert et al. 2008). Beta-cyflutrinet förväntas istället skydda fröet och rötter under marken och medlet är inte systemiskt och tas därför inte upp av växten (Lodhi et al. 2000, EFSA 2010a). Vid analyser av pollen insamlat av honungsbin vid fälten med insekticidbetat utsäde detekterades inget beta-cyflutrin över detektionsgränsen på 1,0 ng/g (se tabell S4 i bilaga 1).

Utifrån kvantifieringen av neonicotinoider i bin, pollen och nektar kan vi se att den systematiska skillnaden mellan kontrollfält och Elado-betade fält finns i halterna av klotianidin (tabell 9). Det bekräftar att vi har en behandlingseffekt av klotianidin genom Elado-betningen och att bina vid betade fält har exponerats för betydligt högre halter av klotianidin än vid kontrollfält. Klotianidin detekterades i prover från tre kontrollfält, men i betydligt lägre koncentrationer än vi de Elado-betade fälten (tabell 9). Det visar på hur svårt det är att genomföra kontrollerade experiment med mobila organismer i terrestra miljöer.

7 Slutsatser och konsekvenser för bedömningen av riskerna med klotianidinbetning

Vi drar tre huvudsakliga slutsatser från vår studie. Den första slutsatsen är att i vår studie kan vi inte se en statistiskt säkerställd påverkan på honungsbi-samhällena från klotianidinbetningen. Det stöds av andra mer eller mindre väl designade och replikerade fältstudier som undersöker hur utsädesbetning med neonicotinoider påverkar honungsbisamhällena (till exempel Cutler & Scott-Dupree 2007, Pilling et al. 2013, Cutler et al. 2014). Det betyder att det sannolikt, vid de halter som förekommer i naturen efter utsädesbetning, inte finns detekterbar påverkan på honungsbisamhällens hälsa av neonicotinoider.

Den andra slutsatsen är att utsädesbetning med klotianidin i en blommande gröda kan ha negativ påverkan på vilda biarter, med sannolika konsekvenser för deras populationer. Vi grundar slutsatsen framför allt på den obefintliga tillväxten hos humlesamhällena och deras starkt reducerade reproduktionsframgång vi kunde se i vår studie, som bekräftar liknande fynd av Whitehorn et al. (2012), men även på avsaknaden av bosättningsaktivitet hos de röda murarbina. Det senare är dock mer osäkert, eftersom studien inkluderade få bin och vi inte kunde göra en jämförelse av reproduktionsframgången hos honorer som var aktiva i våra boplatser. Den starka påverkan på jordhumlesamhällenas produktion av nya drottningar indikerar dock att utsädesbetning med klotianidin kan innebära en negativ påverkan på humlepopulationen. Jordhumlan är en humleart som har klarat sig relativt bra i dagens jordbrukslandskap (Rundlöf et al. 2008, Dupont et al. 2011) och det vore mycket intressant att undersöka konsekvenserna för andra humlearter. Vid en kartering av de vilda bin, humlor och solitärbin, som födosökte i rapsfälten såg vi att det fanns färre bin i de betade fälten (Hederström 2014, Rundlöf et al. 2015). Den skillnaden kvarstod om jordhumlor och humlor som inte kunde bestämmas till art utslöts från analyserna. Det indikerar att även andra arter än jordhumlorna troligtvis påverkas negativt. Det återstår också att undersöka hur utsädesbetning med neonicotinoider påverkar humlepopulationer i ett mer långsiktigt perspektiv. Det nuvarande kunskapsläget är att bin påverkas negativt av neonicotinoidanvändning (Godfray et al. 2014) och att det kan finnas konsekvenser även för andra organismer och ekosystemtjänster (EASAC 2015).

Den tredje slutsatsen vi drar är att det finns en skillnad i hur olika biarter påverkas av exponeringen för klotianidin under realistiska förhållanden. Vi kan se en statistiskt säkerställd påverkan på humlorna och murarbina, men inte på honungsbin. Vi grundar vår tredje slutsats på framför allt de skillnader i hur tillväxten hos honungsbisamhällena och humlesamhällena påverkas av exponering av klotianidin, tillsammans med andra (fältrealistiska) studier på honungsbin och humlor (främst Whitehorn et al. 2012 och Cutler et al. 2014) och deras olika förmåga att avgifta sig när de fått i sig neonicotinoider (Cresswell 2012, 2014). Konsekvensen är att de nuvarande metoder som används för att bedöma risker med bekämpningsmedelsanvändning för bin, som baserar sig främst på kortsiktiga undersökningar av dödlighet hos enskilda individer av modellorganismen honungsbiet (EPPO 2003, EFSA 2010b), inte alltid kan användas för att bedöma konsekvenser för vilda bipopulationer ute i naturen.

8 Tack

Ett stort tack till Myndigheten för samhällsskydd och beredskap (MSB), Carl Tryggers stiftelse, Kungliga fysiografiska sällskapet och Vetenskapsrådet för ekonomiskt stöd, alla lantbrukare som ställt upp som försöksvärdar, Albin Gunnarsson för kontakt med lantbrukare och utsädeshantering, Juliana Dänhardt, Martin Stjernman och SAPES för lantbrukarkontakter och markanvändningsdata, Bengt Andréasson och Johan Bergstrand för arbetet med att ta fram så många likvärdiga bisamhällen och sköta dem under försöket, Albin Andersson, Tomas Carling och Alanna Main för övervakningen av bisamhällena och insamling av prover, Preben Kristiansen för råd om skadegörelsebekämpning, Joachim de Miranda, Julia Goss och Dimitry Wintermantel för sjukdomsanalyser av honungs-bina, Monika Ahlström-Olsson, Monika Almlöf och Lindesro AB för råd runt och leverans av humlesamhällen, Albin Andersson, Georg Andersson, Morgan Boch, Shuqi Chen, Julius Jonasson, Annelie Jönsson, Jonatan Kjellin, Björn Klatt och Christopher du Rietz för arbetet med humlesamhällena, Albin Andersson, Outi Ekroos, Veronica Hederström, Lina Herbertsson, Björn Klatt och Johanna Yourstone för arbetet med solitärbin och humlor, Veronica Hederström för pollen-analyser och Ove Jonsson och Jenny Kreuger för diskussioner om provtagning och resthaltsanalyser, samt projektgruppen och många fler för goda råd och funderingar som har bidragit till att studien har blivit väl genomförd.

9 Referenser

- Andersson, G., Berg, G., Djurberg, A., Ewaldz, T., Gustafsson, G., Lerenius, C., Mellqvist, E., Sandström, M. & Wærn, P. (2009) Bekämpningsrekommendationer. Svampar och insekter 2009. Jordbruksverket, Jönköping.
- Bartomeus, I., Potts, S.G., Steffan-Dewenter, I., Vassière, B.E., Woyciechowski, M., Krewenka, K.M., Tscheulin, T., Roberts, S.P.M., Szentgyörgyi, H., Westphal, C. & Bommarco, R. (2014) Contribution of insect pollinators to crop yield and quality varies with agricultural intensification. *PeerJ* 2:e328.
- Bayer CropScience (2011) Brugsanvisning Elado FS 480 export bejdse. Webbadress: https://middeldatabasenpdf.dlbr.dk/etikette/Elado_FS_480_b%E5_18-556_Etikette_20130612.pdf
- Bayer CropScience (2013a) Säkerhetsdatablad enligt Förordning (EG) nr 1907/2006: Elado FS 480. Revisions- och tryckdatum: 2013-03-25.
- Bayer CropScience (2013b) Elado® für die Inkrustierung von Rapssaatgut.
- Bosch, J. & Kemp, W.P. 2002. Developing and establishing bee species as crop pollinators: the example of *Osmia* spp. (Hymenoptera: Megachilidae) and fruit trees. *Bulletin of Entomological Research* 92, 3-16.
- Bowen-Walker, P.L., Martin, S.J. & Gunn, A. (1999) The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J. Inverte. Pathol.* 73: 101-106.
- Cresswell, J.E., Page, C.J., Uygun, M.B., Holmbergh, M., Li, Y., Wheeler, J.G., Laycock, I., Pook, C.J., Hempel de Ibarra, N., Smirnoff, N. & Tyler, C.R. (2012) Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid). *Zoology* 115: 365-371.
- Cresswell, J.E., Roberts, F.-X.L., Florance, H. & Smirnoff, N. (2014) Clearance of ingested neonicotinoid pesticide (imidacloprid) in honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *Pest Manag. Sci.* 70: 332-337.
- Cutler, G.C. & Scott-Dupree, C.D. (2007) Exposure to clothianidin seed-treated canola has no long-term impact on honey bees. *Journal of Economic Entomology* 100: 765-772.
- Cutler, G.C., Scott-Dupree, C.D., Sultan, M., McFarlane, A.D. & Brewer, L. (2014) A large-scale field study examining effects of exposure to clothianidin seed-treated canola on honey bee colony health, development, and overwintering success. *PeerJ* 2:e652.
- Delaplane, K.S., van der Steen, J. & Guzman-Novoa, E. (2013) Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *J. Apicult. Res.* 52: 03.
- de Miranda, J.R. & Genersch, E. (2010) Deformed wing virus. *J. Invertebr. Pathol.* 103: 548-561.
- de Miranda, J.R. (2012) Vad gör virus och hur kan vi bekämpa dem? *Bitidningen* 3: 12-13.
- de Miranda, J.R., Bailey, L., Ball, B.V., Blanchard, P., Budge, G.E., Chejanovsky, N., Chen, Y.-P., Gauthier, L., Genersch, E. & de Graaf, D. (2013) Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *J. Apicult. Res.* 52: 1-55.
- de Miranda, J.R. (2014) Honeybee pathogen analyses – BINEO project. Internal project report. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Di Prisco, G., Pennacchio, F., Capiro, E., Boncristiani, Jr, H.F., Evans, J.D. & Chen, Y. (2011) *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Gen. Virol.* 92: 151-155.
- Dupont, Y.L., Damgaard, C. & Simonsen, V. (2011) Quantitative historical change in bumblebee (*Bombus* spp.) assemblages of red clover fields. *PLoS ONE* 6, e25172.
- EASAC (2015) Ecosystem services, agriculture and nonicotinoids. EASAC policy report 26. Webbadress: <http://www.easac.eu/home/reports-and-statements/detail-view/article/ecosystem-se.html>

- EC (2013) Regulation (EU) No 485/2013. Official Journal of the European Union 139: 12-26.
Webbaddress: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:139:0012:0026:EN:PDF>
- EFSA (2010a) Reasoned opinion. Modification of the existing MRLs for cyfluthrin in various commodities of plant and animal origin. EFSA Journal 8: 1618.
- EFSA (2010b) Scientific opinion on the development of specific protection goal options for environmental risk assessment of pesticides, in particular in relation to the revision of the guidance documents on aquatic and terrestrial ecotoxicology (SANCO/3268/2001 and SANCO/10329/2002). EFSA J. 8: 1821.
- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W. & Nauen, R. (2008) Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. Pest Manag. Sci. 64: 1099-1105.
- Feltham, H., Park, K. & Goulson, D. (2014) Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. Ecotoxicology 23: 317-323.
- Fries, I., Ekbohm, G. & Villumstad, E. (1984) *Nosema apis*, sampling techniques, and honey yield. J. Apicult. Res. 23: 102-105.
- Garibaldi, L.A. et al. (2013) Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. Science 339: 1608-1611.
- Gill, R.J. & Raine, N.E. (2014) Chronic impairment of bumblebee natural foraging behaviour induced by sublethal pesticide exposure. Func. Ecol. 28, 1459-1471.
- Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O. & Raine, N.E. (2012) Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. Nature 491: 105-108.
- Godfray, H.C.J., Blacquière, T., Field, L.M., Hails, R.S., Petrokofsky, G., Potts, S.G., Raine, N.E., Vanbergen, A.J. & McLean, A.R. (2014) A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. Proc. Biol. Sci. 281: 20140558.
- Goss, J. (2014) Neonicotinoids and honeybee health: the effect of the neonicotinoid clothianidin, applied as a seed dressing in *Brassica napus*, on pathogen and parasite prevalence and quantities in free-foraging adult honeybees (*Apis mellifera*). Master thesis, Department of Ecology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Greenleaf, S.S., Williams, N.M., Winfree, R. & Kremen, C. (2007) Bee foraging ranges and their relationship to body size. Oecologia 153: 589-596.
- Hederström, V. (2014) Impacts of neonicotinoids on pollinators - are wild bees exposed to harmful amounts of residues and is their abundance affected? Master thesis, Department of Biology, Lund University, Lund.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S. & Decourtye, A. (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. Science 336: 348-350.
- Imdorf, A., Buehlmann, G., Gerig, L., Kilchenmann, V. & Wille, H. (1987) A test of the method of estimation of brood areas and number of worker bees in free-flying colonies. Apidologie 18: 137-146.
- Jha, S. & Kremen, C. (2013) Resource diversity and landscape-level homogeneity drive native bee foraging. Proc. Natl Acad. Sci. USA 110: 555-558.
- Jonsson, O., Villar, R.P., Nilsson, L.B., Eriksson, M. & Königsson, K. (2012a) Validation of a bioanalytical method using capillary microsampling of 8 µl plasma samples: application to a toxicokinetic study in mice. Bioanalysis 4: 1989-1998.
- Jonsson, O. et al. (2012b) Capillary microsampling of 25 µl blood for the determination of toxicokinetic parameters in regulatory studies in animals. Bioanalysis 4: 661-674.
- Jonsson, O. (2013) Capillary Microsampling. in Microsampling in Pharmaceutical Bioanalysis, eds. Zane, P. & Emmons, G. T., Future Science Ltd, London.

- Jonsson, O., Fries, I. & Kreuger, J. (2013) Utveckling av analysmetoder och screening av växtskyddsmedel i bin och pollen. Institutionen för vatten och miljö, Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala.
- Klein, A.M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C. & Tscharntke, T. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B.* 274: 303-313.
- Kristiansen, P. 2014a. Övervintringen 2013-2014. *Gadden* 4, 28-29.
- Kristiansen, P. 2014b. Enkät om övervintringen. *Bitidningen* 7, 26-27.
- Lodhi, A., Malik, N.N. & Azam, F. (2000) Movement, persistence and uptake by plants of 14C-labelled cyfluthrin. *Pak. J. Biol. Sci.* 3: 104-109.
- Lundin, O., Rundlöf, M., Smith, H.G., Fries, I. & Bommarco, R. 2015. Neonicotinoid insecticides and their impacts on bees: a systematic review of research approaches and identification of knowledge gaps. *PLoS ONE* 10: e0136928.
- Meier, U. (2001) *Entwicklungsstadien Mono- Und Dikotylar Pflanzen*. BBCH Monografie. 2nd edn, Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft, Braunschweig and Berlin.
- Mommaerts, V., Reynders, S., Boulet, J., Besard, L., Sterk, G. & Smagghe, G. (2010) Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology* 19: 207-215.
- Olsson, O. & Bolin, A. (2014) A model for habitat selection and species distribution derived from central place foraging theory. *Oecologia* 175: 537-548.
- Pedersen, T.R. (ed) (2009) *Massdöd av bin – samhällsekonomiska konsekvenser och möjliga åtgärder*. Swedish Board of Agriculture, Jönköping. Webbadress: http://www2.jordbruksverket.se/webdav/files/SJV/trycksaker/Pdf_rapporter/ra09_24.pdf
- Pettis, J.S., vanEngelsdorp, D., Johnson, J & Dively, G. (2012) Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99: 153-158.
- Pettis, J.S., Lichtenberg, E.M., Andree, M., Stizinger, J., Rose, R. & vanEngelsdorp, D. (2013) Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PloS One* 8: e70182.
- Pilling, E., Campbell, P., Coulson, M., Ruddle, N. & Tornier, I. (2013) A four-year field program investigating long-term effects of repeated exposure of honey bee colonies to flowering crops treated with thiamethoxam. *PloS One* 8: e77193.
- Raw, A. (1972) The biology of the solitary bee *Osmia rufa* (L.) (Megachilidae). *T. Roy. Ent. Soc. London* 124: 213-229.
- Rundlöf, M., Nilsson, H. & Smith, H.G. (2008) Interacting effects of farming practice and landscape context on bumble bees. *Biol. Conserv.* 141: 417-426.
- Rundlöf, M., Fries, I., Gunnarson, A., Jonsson, O., Pedersen, T.R., Smith, H.G. & Bommarco, R. (2013) Inventering av risken för förgiftning av bin med växtskyddsmedel av typen neonicotinoider under svenska förhållanden. Delrapport 2013. Lunds universitet, Lund, och Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala.
- Rundlöf, M., Andersson, G.K.S., Bommarco, R., Fries, I., Hederström, V., Herbertsson, L., Jonsson, O., Klatt, B.K., Pedersen, T.R., Yourstone, J. & Smith, H.G. (2015) Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature* 521: 77-80.
- Sandrock, C., Tanadini, L.G., Pettis, J.S., Biesmeijer, J.C., Potts, S.G. & Neumann, P. (2014) Sublethal neonicotinoid insecticide exposure reduces solitary bee reproductive success. *Agr. Forest Entomol.* 16: 119-128.
- Schmuck, R., & J. Keppler. (2003) Clothianidin: ecotoxicological profile and risk assessment. *Pflanzenschutz.-Nachr. Bayer* 56: 26-58.

- Steffan-Dewenter, I. & Kuhn, A. (2003) Honeybee foraging in differentially structured landscapes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 569-575.
- Torchio, P. F. 1984. Field experiments with the pollinator species, *Osmia lignaria propinqua* Cresson (Hymenoptera, Megachilidae) in apple orchards: III, 1977 studies. *J. Kansas Entomol. Soc.* 57, 517-521.
- Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L. & Goulson, D. (2012) Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* 336: 351-352.
- Winston, M. (1987) *The biology of the honey bee*. Cambridge, USA, Harvard University Press.
- Yourstone, J. (2014) Does clothianidin affect cavity nesting solitary bees and wasps? Bachelor thesis, Department of Biology, Lund University, Lund.

Bilaga 1. Ytterligare beskrivning av material och metoder.

Studiedesign 2013

Studiedesignen bestod av 16 vårrapsfält, minst 4 km från varandra, i Skåne, Halland och Blekinge (figur 1), som blommade under sommaren 2013. Hälften av fälten (8 fält) var sådda med vårraps betad med Elado, där klotianidin och beta-cyflutrin är de verksamma ämnena, och resten av fälten (8 fält) var sådda med obetat utsäde. Fälten var $8,9 \pm 1,4$ (medel \pm se) ha stora och alla fält utom ett kontrollfält på 27 ha låg inom intervallet 4-11 ha.

Ursprungligen valdes tjugo kommande vårrapsfält ut och dessa matchades till par baserat på markanvändningen 2011 i det omgivande landskapet (radie = 2 km, se tabell S1) vägt tillsammans med geografisk närhet. Valet av landskapsradie och avstånd mellan vårrapsfält baserade sig på den uppskattade födosöksradie som honungsbiet har när det utgår från sin centrala kupa, i genomsnitt 1500 m, men variationen i födosöksavstånd är stor med ett spann på 60 till 10 000 m (Steffan-Dewenter & Kuhn 2003). Andra vilda biarter har ofta en kortare födosöksradie (Walther-Hellwig & Frankl 2000, Greenleaf et al. 2007). Markanvändningsdatan var rumsligt explicit data från Jordbruksverkets databas IACS och SMD (Svenska MarktäckeData) från Lantmäteriet.

Tabell S1. Fältstorlek hos de utvalda vårrapsfälten 2013 och markanvändningen 2011 och 2013 i de omgivande landskapen (r = 2 km), för kontrollfält och insekticidbetade fält.

	Kontroll (n = 8)		Betat (n = 8)		Test av skillnad mellan behandlingarna	
	medel \pm se	min-max	medel \pm se	min-max	F (df = 1, 7)	P
Vårrapsfältets storlek (ha)	9,4 \pm 2,6	4,0-27,0	8,4 \pm 0,9	4,0-11,0	0,11	0,75
Jordbruksmark (%)	58,2 \pm 10,6	9,5-88,2	55,8 \pm 9,8	5,9-83,3	0,29	0,61
Årligen plöjd mark (%)	38,8 \pm 9,6	3,0-70,9	34,3 \pm 8,8	0,3-74,5	0,64	0,45
Okultiverade gräsmarker (%)	3,1 \pm 1,0	0,2-7,4	4,1 \pm 1,2	0,2-9,4	0,16	0,70
Längd okultiverad åkerkant (km)	14,2 \pm 1,9	3,5-18,5	14,9 \pm 2,3	3,2-25,7	0,11	0,75
Majs 2011 (%)	1,4 \pm 0,5	0-3,9	1,7 \pm 0,8	0-6,5	0,02	0,88
Majs 2013 (%)	1,3 \pm 0,4	0-3,6	1,3 \pm 0,7	0-5,6	0,42	0,54
Vårraps 2011 (%)	0,8 \pm 0,7	0-5,7	0,6 \pm 0,2	0-1,5	0,05	0,83
Vårraps 2013 (%) – inklusive vårt fält	1,8 \pm 0,7	0,3-6,2	1,5 \pm 0,4	0,3-2,7	<0,01	0,98
Höstraps 2011 (%)	1,4 \pm 0,8	0-6,8	1,6 \pm 1,0	0-8,2	<0,01	0,96
Höstraps 2013 (%)	1,5 \pm 0,7	0-5,2	2,5 \pm 1,2	0-8,6	0,34	0,58
Massblommande grödor* 2013 (%)	8,2 \pm 2,8	0,3-23,6	7,5 \pm 2,1	0,8-17,8	0,01	0,93
Skog (%)	25,3 \pm 10,6	1,8-74,8	24,0 \pm 8,6	0,5-67,2	0,23	0,64
Urban (%)	2,7 \pm 1,1	0-8,6	3,3 \pm 1,0	0-9,0	0,53	0,49

*Massblommande grödor inkluderar raps (46%), potatis (28%), ärtor (18%), bönor (4%), frukt och bär (4%), örter och fröodling (<1%).

Ett fält inom varje par blev slumpmässigt utvalt att sås med utsäde betat med 25 ml Elado FS 480 (400 g/l klotianidin + 80 g/l beta-cyflutrin; Bayer CropScience 2013) per kg frö och fungiciden tiram (3,92 g/kg utsäde). Det andra fältet inom paret såddes med utsäde endast betat med tiram (3,92 g/kg utsäde) och fungerade som kontrollfält. Tiram används i raps för att bekämpa jord- och utsädesburen svamp (EC 2003), vilken kan orsaka etableringsproblem som består genom hela växtsäsongen (t.ex. resulterande i ojämn blomning). Betningen 2013 utfördes av Lantmännen SW Seed i Tyskland. Alla fälten såddes med vårraps hybrid Majong, med allt utsäde från samma utsädesparti. Mängden utsäde motsvarade 150 plantor/m², vilket är den rekommenderade utsädesmängden för en vårraps hybrid (Gunnarson 2013), och motsvarar 7,5 kg/ha för tiram-betat utsäde och 7,7 kg/ha för Elado + tiram-betat utsäde. Såtidpunkten valdes och sådden utfördes av odlarna under perioden 6 april till 18 maj (tabell S2). I två av de slutgiltiga åtta paren såddes de insekticidbetade fälten avsevärt tidigare (båda 21 april) än deras kontrollfält (sådda 6 och 7-8 maj), vilket resulterade i en asynkron fenologi mellan fält inom par.

Tabell S2. Sådatum för vårrapsen, leveransdatum för de olika omgångarna av humlesamhällen och utplaceringsdatum för murarbinokonger, jordhumlesamhällen och honungsbisamhällen i relation till rapsens utvecklingsstadium (BBCH (Meier 2001)) och fältens behandling (K = kontrollfält, B = insekticidbetade fält) under de två åren 2013-2014.

Fältpar	Behandling	Sådatum	Utplacering av murarbin (BBCH)	Leveransdatum för humlesamhällen (batch)	Utplacering humlesamhällen (BBCH)	Utplacering honungsbisamhällen (BBCH)
P01	K	23 april 2013	13 juni (59)	18 juni (2)	20 juni (65)	19 juni (65)
P01	B	28 april 2013	13 juni (57)	18 juni (2)	20 juni (61)	19 juni (61)
P02	K	7-8 maj 2013*	13 juni (50)	20 juni (3)	26 juni (63)	25 juni (63)
P02	B	21 april 2013*	13 juni (61)	18 juni (2)	18 juni (63)	18 juni (63)
P03	K	18 maj 2013	24 juni (52)	25 juni (4)	28 juni (60)	2 juli (61)
P03	B	11 maj 2013	24 juni (57)	25 juni (4)	28 juni (61)	2 juli (63)
P04	K	6 maj 2013*	13 juni (50)	20 juni (3)	26 juni (65)	25 juni (65)
P04	B	21 april 2013*	13 juni (61)	18 juni (2)	18 juni (63)	18 juni (63)
P05	K	29 april 2013	15 juni (57)	18 juni (2)	20 juni (63)	20 juni (63)
P05	B	25 april 2013	15 juni (61)	18 juni (2)	18 juni (63)	18 juni (63)
P10	K	1 maj 2013	13 juni (57)	18 juni (2)	19 juni (63)	19 juni (63)
P10	B	25-26 april 2013	13 juni (53)	18 juni (2)	19 juni (63)	19 juni (63)
P11	K	4 maj 2013	15 juni (55)	20 juni (3)	24 juni (63)	24 juni (63)
P11	B	2 maj 2013	15 juni (57)	20 juni (3)	24 juni (64)	24 juni (64)
P12	K	6 april 2013	10 juni (61)	11 juni (1)	14 juni (65)	14 juni (65)
P12	B	16 april 2013	10 juni (61)	11 juni (1)	14 juni (63)	14 juni (63)
P01	K	26-27 april 2014		17 juni (1)	19 juni (63)	19 juni (63)
P01	B	20 april 2014		17 juni (1)	19 juni (61)	19 juni (61)
P02	B	16-18 maj 2014		24 juni (2)	25 juni (60)	25 juni (60)
P04	K	17 april 2014		17 juni (1)	19 juni (63)	18 juni (63)
P04	B	25-26 april 2014		17 juni (1)	18 juni (60)	18 juni (60)
P05	K	29-30 april 2014		17 juni (1)	18 juni (65)	16 juni (63)
P05	B	26-27 april 2014		17 juni (1)	18 juni (65)	16 juni (64)
P10**	K	28 april 2014		17 juni (1)	18 juni (63)	ej honungsbin
P10	B	30 april 2014		17 juni (1)	19 juni (63)	19 juni (63)
P11	K	23-26 april 2014		17 juni (1)	17 juni (65)	17 juni (65)
P11	B	29-30 april 2014		17 juni (1)	17 juni (65)	17 juni (65)

*asynkron fenologi, **ny odlare 2014

Eftersom matchningen baserades på markanvändning från 2011, så inspekterades fälten och deras omgivning för att bedöma vårrapsens etablering och hitta andra blommande grödor i omgivningen (inklusive annan vårraps) vid ett fältbesök 27-28 maj 2013. Efter fältinspektionen exkluderades fyra fält, eftersom det i tre fall fanns flera andra vårrapsfält i närheten och i det fjärde fallet fanns en rödklöverfrödling intill vårt vårrapsfält. Vårrapsfält som såddes 2013 omfattades inte av moratoriet, så de var potentiella källor för neonicotinoidexponering. Rödklöverfrödlingar är mycket attraktiva födosökshabitat för humlor och kan påverka tätheten av humlor i det omgivande landskapet (Rundlöf et al. 2014), vilket var anledningen till att det intilliggande vårrapsfältet uteslöts ur studien.

I två fall beslutade vi att acceptera ett annat vårrapsfält, som låg 0,9 respektive 1,0 km från den planerade uppställningsplatsen för våra honungsbin, för att inte riskera för låg replikering. Nu inkluderade studiesystemet sex ursprungliga fältpar och fyra fält som hade förlorat sin parkamrat. Markanvändningen runt de fyra ensamma fälten och det geografiska avståndet gjorde att vi bestämde att de kunde matchas ihop till två nya fältpar (P11 och P12 i figur 1).

Den slutgiltiga studiedesignen bestod av åtta fältpar. Det fanns ingen statistisk skillnad i markanvändningen i det omgivande landskapet mellan insekticidbetade fält och kontrollfält och landskapen låg utspridda längs en gradient i mängden jordbruksmark, från 6 till 88 % (tabell S1). Odlarna instruerades att inte använda andra neonikotinoider i försöksfälten under odlings säsongen, för att därmed kunna härleda eventuell effekt till betningsmedlet. Däremot kunde de använda andra typer av bekämpningsmedel, för att kontrollera skadegörare. De rekommenderade bekämpningsmedlen var Avaunt (aktiv ingrediens: indoxacarb), Mavrik (aktiv ingrediens: tau-fluvalinat), Plenum (aktiv ingrediens: pymetrozin) och Steward (aktiv ingrediens: indoxacarb) (tabell S3). Trots det användes Biscaya, där neonikotinoiden tiakloprid är den aktiva ingrediensen, i ett kontrollfält 2013 (tabell S3a) och i ett betat fält 2014 (tabell S3b). Tiakloprid anses dock vara mindre giftigt än klotianidin, imidakloprid och tiametoxam (Mommaerts et al. 2010, Blacquièrre et al. 2012, Pisa et al. 2015).

Tabell S3a. Användning av bekämpningsmedel för att kontrollera rapsbaggar i vårrapsfälten, för både kontrollfält (K) och insekticidbetade fält (B), under odlings säsongen 2013.

Fältpar	Behandling	Datum 1	Produkt 1	Dos 1	Datum 2	Produkt 2	Dos 2
P01	K	4 juni 2013	Mavrik	0,25 l/ha			
P01	B	6 juni 2013	Plenum	150 g/ha	15 juni 2013	Steward	85 g/ha
P02	K	31 maj 2013	Plenum	160 g/ha	10 juni 2013	Mavrik	0,20 l/ha
P02	B	4 juni 2013	Plenum	150 g/ha	10 juni 2013	Steward	85 g/ha
P03	K	ingen besprutning					
P03	B	12 juni 2013	Avaunt	170 g/ha			
P04	K	16 juni 2013	Avaunt	160 g/ha			
P04	B	7 juni 2013	Plenum	150 g/ha			
P05	K	12 juni 2013	Plenum	150 g/ha			
P05	B	30 maj 2013	Plenum	150 g/ha			
P10	K	12 juni 2013	Biscaya	0,30 l/ha	19 juni 2013	Mavrik	0,25 l/ha
P10	B	7 juni 2013	Avaunt	170 g/ha			
P11	K	4 juni 2013	Avaunt	170 g/ha	8 juni 2013	Plenum	150 g/ha
P11	B	31 maj 2013	Plenum	150 g/ha			
P12	K	30 maj 2013	Avaunt	170 g/ha			
P12	B	4 juni 2013	Plenum	150 g/ha	14 juni 2013	Avaunt	120 g/ha

Tabell S3b. Användning av bekämpningsmedel för att kontrollera rapsbaggar i vårrapsfälten, för både kontrollfält (K) och insekticidbetade fält (B), under odlings säsongen 2014.

Fältpar	Behandling	Datum 1	Produkt 1	Dos 1	Datum 2	Produkt 2	Dos 2	Datum 3	Produkt 3	Dos 3
P01	K	31 maj 2014	Mavrik	0,30 l/ha	6 juni 2014	Avaunt	0,20 l/ha			
P01	B	15 juni 2014	Mavrik	0,25 l/ha						
P02	B	29 juni 2014	Biscaya	0,30 l/ha						
P04	K	28 maj 2014	Plenum	150 g/ha	9 juni 2014	Mavrik	0,20 l/ha			
P04	B	14 juni 2014	Avaunt	170 g/ha						
P05	K	24 maj 2014	Mavrik	0,25 l/ha	2 juni 2014	Plenum	150 g/ha	10 juni 2014	Mavrik	0,25 l/ha
P05	B	5 juni 2014	Plenum	150 g/ha	8 juni 2014	Mavrik	0,20 l/ha			
P10	K	3 juni 2014	Plenum	150 g/ha						
P10	B	10 juni 2014	Avaunt	170 g/ha	18 juni 2014	Mavrik	0,20 l/ha			
P11	K	24 maj 2014	Plenum	150 g/ha	31 maj 2014	Avaunt	0,20 l/ha	9 juni 2014	Plenum	150 l/ha
P11	B	30 maj 2014	Avaunt	170 g/ha	8 juni 2014	Plenum	150 g/ha	17 juni 2014	Mavrik	0,25 l/ha

Studiesystem 2014

Under 2014 genomförde vi ytterligare studier för att med större statistisk styrka undersöka om betning av vårraps med klotianidin påverkar honungsbin och studera födosöksbeteende hos jordhumlor. Studiesystemet 2014 inkluderade de tio odlare som planerade att odla vårraps under en andra odlings säsong. I studiesystemet 2014 fick odlarna byta behandling. Det innebar att odlare med insekticidbetat utsäde 2013 fick obetat utsäde 2014 och vice versa. Vi inkluderade även ett nytt kontrollfält, så att vi hade fem kontrollfält att jämföra med de sex betade fälten (figur 1). Betningen 2014 utfördes av Hushållningssällskapet (HS Fröteknologi) på Elitreneriet i Svalöv. Utgångspunkten var obetat utsäde, där frö som skulle till de behandlade fälten betades med 25 ml Elado (400 g/l klotianidin + 80 g/l beta-cyflutrin; Bayer CropScience 2013) per kg frö. Till skillnad från 2013 behandlades inte utsädet med tiram. Raps hybrid var den samma som 2013 (Majong). Fälten var $8,6 \pm 1,6$ (medel \pm se) ha stora och låg inom intervallet 3-20 ha. Alla fält utom ett såddes 17-30 april 2014 (tabell S2). Det sena fältet, ett betat fält, såddes 16-18 maj 2014. Fälten inspekterades 26-28 maj, för att bedöma utvecklingsstadium inför utplaceringen av bina.

Honungsbin

Likstora samhällen av det europeiska honungsbiet (*Apis mellifera*) placerades ut vid varje vårrapsfält vid starten av blomningen (tabell S2), sex samhällen 2013 och fyra samhällen 2014. Samhällena skapades 27-31 maj 2013 av en professionell biodlare, med 1- och 2-åriga drottningar av känd härstamning. Samhällena utjämnades för att inkludera en drottning, två fulla honungsramar (med bin), två ramar med täckt yngel (med bin), bin från två ramar som skakas ner i kupan, en utbyggd ram och fem ramar med mellanväggar. Drottningarna i de nya samhällena var friparade och kom från tre olika mödrar och bestod av fyra grupper beroende på moder och ålder. Drottningursprung och ålder matchades mellan fält inom par, men samhällena fördelades annars slumpmässigt över fälten. Ramstorleken var hel Langstroth, med en yta på 880 cm² per ramsida och uppskattningsvis 1,25 bi per cm² när en ramsida var fullbesatt (totalt 1100 bin per full sida) (Imdorf & Gerig 2001). Målsättningen var att ge avläggarna en normal balans mellan yngel och vuxna bin vid försökets start och att avläggarna skulle vara tillräckligt starka för att överleva den kommande vintern, men inte växa ur sin låda under sommaren. Både ursprungssamhällen och de nyskapade likstora samhällena stod 2013 vid ett 60 ha stort ekologiskt odlat höstrapsfält fram till samhällena kunde placeras ut vid vårrapsfälten, för att minska risken för bekämpningsmedelsexponering.

Honungsbisamhällenas styrka bedömdes av en tränad observatör med Liebefeld-metoden (Imdorf et al. 1987, Delaplane et al. 2013). Bedömningar gjordes innan utplacering vid vårrapsfälten (6-7 juni 2013 och 9-10 juni 2014), vid rapsens toppblom (BBCH-stadie 65-67 (Meier 2001); 24 juni-17 juli och 23 juni-9 juli 2014) och vid den gemensamma övervintringsplatsen (5-9 augusti 2013 och 28-29 juli 2014). Under 2013 gjordes dessutom ytterligare en till två bedömningar vid vårrapsfälten. Samhällena flyttades från vårrapsfälten till en gemensam övervintringsplats 2-31 juli 2013 och 14-23 juli 2014. Under våren 2014, 3 och 10 april, gjordes en ytterligare bistyrkebedömning och genomgång av samhällena för att bedöma vinteröverlevnad. Dessutom inspekterade biodlaren samhällena vid upprepade tillfällen under höst till vår.

Under rapsens toppblom försågs tre samhällen per fält med pollenfälla och minst 25 ml pollen samlades in. Pollenproverna förvarades i 50 ml Falconrör i kylväska och sedan fryses (-20 °C). Vid samma tillfälle samlades prover på minst 50 flygbin på flustren till samhällena, pollen från fem honungsbin som flög i vårrapsfälten och honungsblåsor från minst fem bin utan pollen som flög i fältet in för kvantifiering av neonicotinoidrester. Proverna förvarades i plaströr, i fält i kylväskor med frysta kylelement och sedan i fryses (-20 °C) innan de skickades iväg för analys.

Innan utplacering vid vårrapsfälten och innan invintringen vägdes samhällena för att beräkna honungsproduktionen. Under försökets gång byttes honungsramar ut vid behov, för att ge samhällena utrymme att växa och för att minska risken för att samhällena skulle svärma. Både gamla och nya ramar vägdes, för att användas vid uträkningen av honungsproduktionen. I samband med den sista bistyrkebedömningen togs så många foderramar som möjligt bort (max 10 % av ytan med täckt yngel) och ersattes av tomma ramar, för att efterlikna biodlarens skattning av honung. Vid samma tillfällen togs även prov på 100 bin från varje samhälle för analys av sjukdomar och parasiter. De fyra provtagningstidpunkterna var 6-7 juni

2013, 29 juli-5 augusti 2013, 11 juni 2014 och 31 juli 2014. Proverna förvarades i pappkartonger, i fält i kylväskor med frysta kylelement och sedan i frys (-20 °C) innan de skickades iväg för analys.

Bisamhällena flyttades till övervintringsplatsen när vårrapsen i försöksfälten hade blommat över (71+ på BBCH-skalan (Meier 2001)), under perioden 2-31 juli. Samhällen från fält inom ett par flyttades samtidigt till övervintringsplatsen och precis som vid utsättningen flyttades samhällena antingen under tidig morgon eller sen kväll. För att kontrollera skadegörare behandlades samhällena den 10 augusti med 20 ml 60-procentig myrsyra enligt "Wettex-metoden" (Kristiansen 2011) med applicering ovanifrån. Behandlingen genomfördes under förmiddagen då väderleken var lämplig; sol, en temperatur kring 20 °C och en relativ luftfuktighet på ca 60 % som sedan sjönk nedåt 50 % under dagen. Bina reagerade inte särskilt kraftigt. En ytterligare behandling utfördes den 4 december, med 60 g oxalsyra per liter vatten.

Samhällena matades med 20 kg socker per samhälle i form av 55-60 procentig vattenlösning i lådor ovanpå kuporna under invintringen. Fodergivan fördelades över 3 tillfällen; 17 augusti, 24 augusti och 4 september. Efter andra fodergivan inspekterades samhällena där det tidigare funnits en misstanke om drottningförlust och där det saknades tecken på uppfödning av ny drottning. Samhällena utan drottning eller tecken på att föda upp en ny drottning uteslöts från fortsatta mätningar, eftersom de ändå inte skulle kunna överleva.

Honungsbin: parasit- och sjukdomsanalyser

De provtagna honungsbina användes för att uppskatta förekomst (prevalens) och mängd (titrar) av varroakvalster (*Varroa destructor*) och mikrosporidier (*Nosema apis* och *N. ceranae*) (Fries et al. 2013) och de åtta virussjukdomarna deformed wing virus (DWV), sacbrood virus (SBV), black queen cell virus (BQCV), chronic bee paralysis virus (CBPV), acute bee paralysis virus (ABPV), Kashmir bee virus (KBV), Israeli acute paralysis virus (IAPV) och slow bee paralysis virus (SBPV) (de Miranda et al. 2013) (figur S1).



Figur S1. Arbetsgång vid analyserna av parasiter och sjukdomar hos honungsbina (från de Miranda 2014).

Varroakvalster

Prover om ca 100 bin mixades i 5 minuter i tvålatten med en elektrisk mixer. Bin och kvalster separerades genom ett nätfilter och räknades.

Nosemasporer

Av de 100 bina togs 60 bin ut för homogenisering i 30 ml sterilt vatten. 1 ml extrakt frystes in direkt, för att senare användas till Dna- och RNA-extraktioner. 0,5 ml av extraktet användes för att räkna nosemasporer i en haemocytometer genom mikroskopi.

DNA-extraktion

DNA extraherades från 0,5 ml av biextraktet, för DNA-baserad kvantifiering av de två nosemaarterna; *N. apis* och *N. ceranae*. Extraktionsprotokollet inkluderade centrifugering av extraktet, inkubation av den resulterande pelleten tillsammans med proteaser och därefter en kolonbaserad rening av DNA:et från det proteasbehandlade pelleterade materialet. DNA-koncentrationen bestämdes med NanoDrop. Alla DNA-prover späddes ut till 10 ng/μl och förvarades vid -20 °C fram till analys.

RNA-extraktion

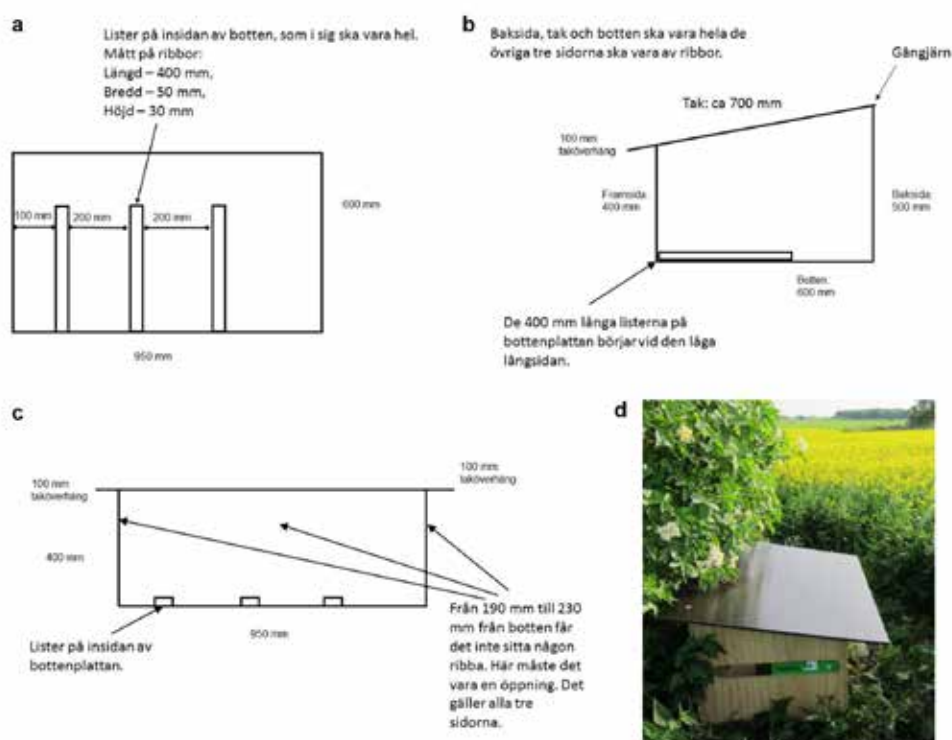
RNA extraherades direkt från 100 μl av biextraktet, med hjälp av en kolonbaserad rening. RNA-koncentrationen bestämdes med NanoDrop. Alla RNA-prover späddes ut till 20 ng/μl och förvarades vid -20 °C fram till analys.

(RT-)qPCR-analyser

Quantitative real-time qPCR användes för att uppskatta mängden *N. apis*- och *N. ceranae*-DNA i varje DNA-prov. Quantitative real-time Reverse Transcription qPCR användes för att uppskatta mängden RNA från åtta olika honungsdivirus. Absoluta kvantifieringar gjordes genom att använda externa kvantifieringsstandarder med kända koncentrationer för varje specifik DNA/RNA-analys. Datan konverterades så att den representerade den uppskattade mängden nosema-DNA eller virus-RNA per bi och $\log_{10}(x + 1)$ -transformerades, eftersom honungsdivirustitrar ofta är exponentiellt fördelade.

Jordhumlor

Sex kommersiellt uppfödda jordhumlesamhällen (*Bombus terrestris*; Natupol N, Koppert Biological Systems) placerades vid varje vårrapsfält i början av blomningen, 14-28 juni 2013 och 17-25 juni 2014 (tabell S2). Vid den här tidpunkten var samhällena ungefär tio veckor gamla och skulle innehålla en drottning, ungefär 50 arbetare och yngel i olika stadier. Humlesamhällena beställdes i olika omgångar, för att matcha vårrapsfältens fenologi (tabell S2). Samhällena placeras i två Tripol-lådor med tre kolonier i varje. Lådorna, med dimensionerna 21 × 29 × 80 cm (höjd × bredd × längd), placerades i en ventilerad trälåda (figur S2) för att skydda dem från väder och rovdjur. Lådorna placerades i en skuggad obrukad kantzon i närheten av fälten.



Figur S2. (a-c) Konstruktion och dimensioner hos trälådorna som skyddade humlesamhällen från väder och rovdjur och (d) exempel på trälådornas placering vid ett av vårrapsfälten.

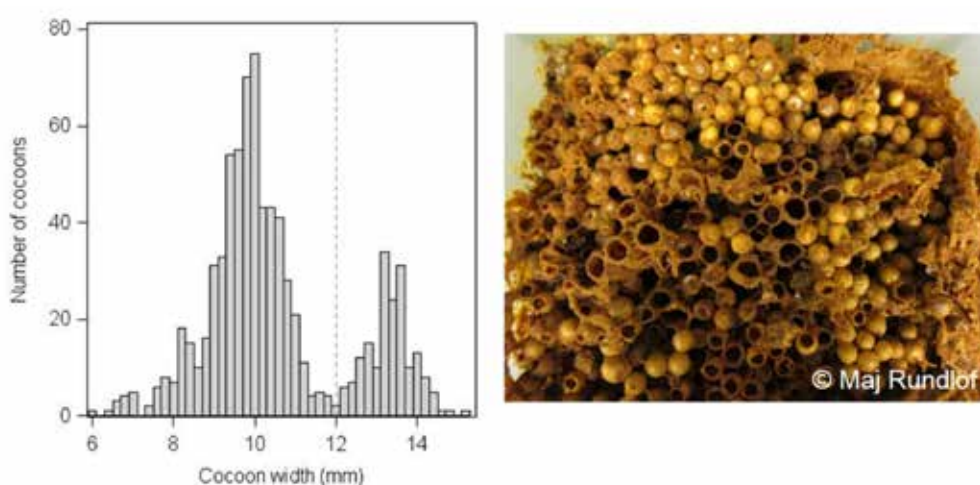
Tillgång till den medföljande sockerlösningen hindrades under 2013 genom att sätta på ett plastlock och samhällena matades inte artificiellt under försökets gång. Under 2014 blev det en miss i kommunikationen och tillgången till sockerlösningen hindrades inte helt, vilket gjorde att den utnyttjades av humlorna. Vi har därför valt att inte använda data insamlade från humlesamhällena 2014, eftersom vi inte vet i vilken grad humlorna har nyttjat sockerlösning och i vilken grad de har födosökt från vårrapsfältet. Genom att använda sockerlösningen kan humlorna ha undvikit att exponeras för klotianidinet i vårrapsens nektar.

Samhällena vägdes innan utplacering vid vårrapsfälten och därefter med ungefär två veckors mellanrum. Samhällena stängdes innan vägningen, så att humlorna inte kunde flyga ut, men de kunde flyga in, och vägdes totalt 3-5 gånger (inklusive den första vägningen innan utplacering). Två samhällen (ett vid varje behandling) kunde inte vägas, eftersom de inte kunde stängas för utflygande humlor. Samtliga samhällen vid ett fältpar terminerades genom infrysning (-20°C) vid första observation av nya drottningar i något av de 12 samhällena i paret. Vid de asynkrona fälten, där humlesamhällena placerades ut vid olika tillfällen (tabell S2), skedde termineringen efter samma antal dagar i fält. Termineringen skedde 7 juli-5 augusti, 23-38 dagar efter att samhällena hade placerats vid vårrapsfälten.

Radio Frequency Identification-teknik (RFID-teknik) användes för att övervaka arbetarnas födosökseffektivitet (till exempel hos humlor Stelzer et al. 2010, Gill et al. 2012 och hos honungsbin Henry et al 2012, Schneider et al 2012). Tekniken bygger på mycket små transpondrar med unika id-nummer, som kan registreras av

antennor när transpondern kommer inom antennens räckvidd. Utrustning bestod av två datalagringsenheter, fyra avläsarantennor, två bilbatterier, kablar och en dator. Två RFID-chipläsare monterades vid ingången samhället för att kunna avläsa om humlorna går ut eller in. RFID-taggar limmas med superlim och en härdande katalysator TAB2000 (Kerr Nordic) på mellankroppen av ca 10 humlor per samhälle innan övervakningen.

De yttre två samhällena i tripletterna undersöktes för att uppskatta antalet kokonger med drottningar och arbetare/hanar, vikten av kokonger, larver och bostrukturen och antalet celler som användes för lagring av nektar och pollen. Kokonger med drottningar och arbetare/hanar separerades genom bredden på kokongerna (figur S3).



Figur S3. Fördelningen i bredd hos den mörka jordhumlans (*Bombus terrestris*) kokonger från fyra olika samhällen (två från olika kontrollfält och två från olika betade fält), som initialt undersöktes för att bestämma gränsen mellan drottningkokonger och arbetar/hankokonger. Den streckade vertikala linjen visar den valda gränsen på 12 mm (det lägsta värdet mellan de två topparna), med drottningkokonger större och arbetar/hankokonger mindre. Bilden till höger visar ett humlesamhälle som undersöks, för att räkna antalet kokonger med drottningar och arbetare/hanar, vikten av kokonger, larver och bostrukturen och antalet celler som användes för lagring av nektar och pollen. Figuren kommer från Rundlöf et al. (2015).

Röda murarbin

Tre boplatser, som var och en innehöll 29 pappersrör med en inre diameter på 6 mm, monterades på stolpar som placerades vid vårrapsfälten ungefär en vecka innan det senaste fältet inom ett fältpar beräknades börja blomma, mellan 10 och 24 juni 2013 (tabell S2). Varje boplatz innehöll 9 kokonger med röda murarbin (*Osmia bicornis*), fyra honor och fem hanar, med totalt 27 kokonger vid varje fält (12 honor och 15 hanar).

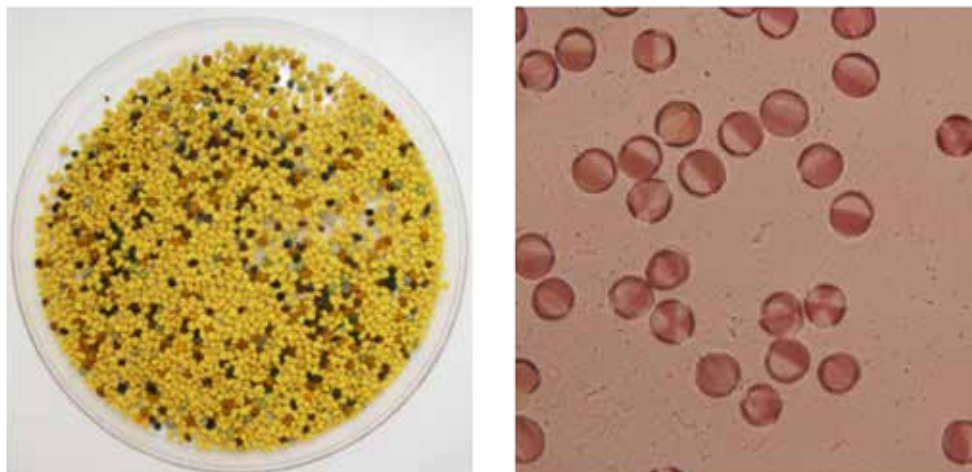
Vi försenade binas tidpunkt för att krypa ur kokongerna genom att förvara dem vid 2-5 °C, för att matcha vårrapsens fenologi. I södra Sverige indikerar observationer från ArtPortalen från 1990 och framåt att maj (255 observationer)

är den huvudsakliga aktivitetsperioden, följt av april (94), juni (83), juli (2) och mars (1) (Artportalen 2014). Eftersom vår studie gjordes från mitten av juni och framåt, då de flesta naturligt förekommande röda murarbin redan slutat flyga, har de flesta röda murarbin som vi återfinner i boplatserna sannolikt sitt ursprung från de kokonger som vi placerade ut.

Stolparna med boplatser placerades så att de stod med ingången åt söder och var skyddade med lägvande vegetation mot norrsidan. Papprören samlades in 36-43 dagar efter att kokongerna placerades ut. Boaktivitet bestämdes i oktober 2013, genom att räkna antalet rör med larvceller och antalet larvceller. Proportionen av utkrupna kokonger beräknades genom att räkna antalet öppna kokonger.

Pollenanalys

För honungsbin togs ett delprov om 15 g från varje fälts samlingsprov, skräp rensades bort från provet innan vägningen. Delproven sorterades efter färg i petriskålar (figur S3). Enskilda färger skiljdes ut och gavs en färgkod. Pollenklumpar med mer än en sorts pollenfärg separerades ut för sig och andelen av de olika färgkoderna uppskattades. Vikten för varje färgkod noterades i gram. För varje fält förvarades pollen med olika färgkod i separata provrör.



Figur S3. Ett prov på pollenklumpar insamlade med pollenfälla monterad på honungsbinahällen (till vänster) och pollenkorn av rapstyp infärgade med fuksin och förstorade under mikroskop (till höger).

För alla delprov från honungsbin togs från fraktioner med gult pollen, och därmed potentiellt från raps, ett litet pollenprov ut från fem pollenklumpar. För prover från jordhumlor och murarbin togs en fraktion per prov ut för samtliga prover. Pollenprovet placerades på ett objektglas, tillsammans med en liten kub av glyceringelatin som färgats med fuksin (Kerns & Inouye 1993, Kleijn & Raemakers 2008). Gelatinklumpen smältes försiktigt över en värmeplatta och täcktes med ett täckglas.

Pollenkornen identifierades till rapstyp respektive annan växtart med hjälp av ett referensbibliotek (uppbyggt av Anna Persson vid Biologiska institutionen, Lunds universitet). Pollenkornens struktur och storlek används för att bestämma växtart. Vid artbestämning och räkning användes ett ljusmikroskop med 10-40 gångers förstoring (figur S3). Från varje delprov identifieras 100 slumpmässigt utvalda pollenkorn.

Kvantifiering av neonicotinoidrester

De kemiska analyserna utfördes på laboratoriet för organisk miljökemi (OMK) vid Institutionen för vatten och miljö, Sveriges lantbruksuniversitet i Uppsala. Laboratoriet är ackrediterat av Swedac för analys av växtskyddsmedel i en mängd olika matriser som vatten, luft och sediment, och ansvarar bland annat för det nationella miljöövervakningsprogrammet för dessa substansklasser. Analysmetoderna för bin, pollen och nektar är dock nyutvecklade och ännu inte ackrediterade.

Provberedning bin

Av de insamlade bina vägdes 24 bin in och homogeniserades med torkmedel. Från detta homogenat togs en fraktion motsvarande fyra bin (0,37-0,47 g bi) ut för den faktiska analysen. Efter tillsatts av internstandardlösning, som används vid den efterföljande koncentrationsberäkningen, extraherades proverna med en blandning av aceton och etylacetat under kraftigt ultraljud. Extrakten renades vidare med dispersiv fastfasextraktion och dunstades sedan in vid 40°C i vattenbad under kvävgasflöde. Indunstningsresten återlöstes i acetonitril och analyserades med vätskekromatografi kopplat till tandem-masspektrometri (LC-MS/MS).

För att bekräfta att homogeniseringen av de 24 bina var effektiv, och därmed delprovet representativt, utfördes extra analyser av delprov från två av homogenaten (n = 4). Detta visade på en relativ standardavvikelse (%RSD) på 4,6 % respektive 8,5 % för klotianidin.

Provberedning pollen

Vid ankomst till OMK labbet vägdes rören med pollen för att fastställa mängden pollen per prov, som varierade mellan 0,025 g och 0,10 g. Då provmängderna var extremt små användes hela provet för analysen. Den påföljande extraktionen och provreningen utfördes på samma sätt som för biproverna fast i något nedskalad format.

Provberedning nektar

På OMK-laboratoriet fördes nektar från de insamlade honungsblåsorna över till små glaskapillärer med en exakt volym av 16 µL. För tre av proverna var volymen för liten och 8 µL kapillärer användes istället. Kapillärerna placerades i 1 ml PP provrör, till vilka även internstandard i 32 µL acetonitril och en extra 32 µL spädvolym acetonitril sattes. Efter kraftig mixning, följt av centrifugering kunde en volym om ca 50-60 µL föras över till LC-vialer för LC-MS/MS bestämning. Kalibreringsprover (sju nivåer, n = 2) och kvalitetskontrollprover (två nivåer, n = 3) tillverkades på samma sätt genom att tillsätta blank nektar (fri från neonicotinoider) med kapillären och lämpliga halter substans i acetonitril via den extra spädvolymen.

Provberedning utsäde

Halten klotianidin i rapsutsäde bekräftades med LC-MS/MS analys efter att ha extraherat betat utsäde (1,0 g, d.v.s. ca 200 rapsfrön per prov, n = 4) och obetat utsäde (n = 2) med 8+8+4 ml etylacetat under kraftigt ultraljud och sedan spätt extrakten 125000 ggr med acetonitril för betat utsäde och 125 ggr för obetat utsäde.

LC-MS/MS kvantifiering och kvalitetskontroll

LC-MS/MS metoden för bestämning av neonikotinoiderna acetamiprid, imidakloprid, klotianidin, tiakloprid och tiametoxam i extrakt från bin, pollen, nektar och utsäde var en modifiering av den multimetod för bestämning av växtskyddsmedel i vatten (Jansson & Kreuger 2010) som används rutinmässigt i de ackrediterade analyserna av yt-, regn-, och grundvattenprover vid OMK laboratoriet. Modifieringarna bestod i att 10 µl acetonitrilextrakt injicerades på LC-MS/MS systemet istället för 500 µl vatten, samt att nya, deuteriuminmärkte, internstandarder (D3-klotianidin och D4-imidakloprid) köpts in för att maximera den analytiska kvalitén. För kvantifiering av acetamiprid, tiakloprid och tiametoxam användes D6-isoproturon som internstandard. De stamlösningar med blandningar av pesticider som användes vid analysarbetet var certifierade från tillverkarna och spädningar kontrollerade enligt rådande standard operating procedure för OMK laboratoriet.

För kvantifiering av neonikotinoider i bi- och pollenprover användes en kalibreringskurva i acetonitril (sju nivåer, dubbla injektioner) tillsammans med tillsattsprover i aktuell matris (två nivåer, n = 3). Från kalibreringskurvans värden och de nominella halterna i tillsattsproverna erhöles en faktor för vardera substansen, som tillsammans med provvikten användes för att beräkna halterna i proverna.

För nektarproverna erhöles den faktiska provkoncentrationen direkt från kalibreringskurvan eftersom studieprover och kalibreringsprover hanterades exakt lika. Kvalitetskontrollproverna visade på en riktighet av 89-101 % och en spridning (relativ standardavvikelse (%RSD)) på 1,1-8,2 % för de båda koncentrationsnivåerna och alla neonikotinoiderna.

Tabell S4. Antal fynd och den högsta uppmätta koncentrationen av de fem neonikotinoiderna och pyretroiden beta-cyflutrin i honungsbin insamlade vid experiment-samhällena och pollen och nektar från honungsblåsan från honungsbin insamlade i försöksfälten, separerat för insekticidbetade fält och kontrollfält. N = 8 per behandling och matris 2013, utom för pollen där N = 6 för kontrollfälten eftersom det inte gick att hitta bin med pollen i två fält. N = 4 för kontrollfält och 6 för betade fält 2014. LOD = detekteringsgränsen, LOQ = kvantifieringsgränsen.

	Kontroll		Betat			
	Detekterat i N prover	Högsta koncentrationen	Detekterat i N prover	Högsta koncentrationen	LOD*	LOQ*
2013						
Honungsbin (ng/g)						
acetamiprid	1	0,012**	0		0,020	0,060
klotianidin	2	0,89	8	4,9	0,080	0,25
imidaklopid	0		0		0,040	0,12
tiaklopid	2	0,058	2	1,1	0,030	0,090
tiametoxam	1	0,19	0		0,070	0,20
Pollen från honungsbin (ng/g)						
acetamiprid	1	0,34	0		0,080	0,24
klotianidin	0		8	23	0,50	1,5
imidaklopid	1	0,23**	0		0,30	0,90
tiaklopid	3	1,4	4	0,29	0,070	0,21
tiametoxam	0		0		0,10	0,30
beta-cyflutrin	0		0		1,0	
Nektar från honungsbin (ng/ml)						
acetamiprid	0		0		0,033	0,10
klotianidin	2	0,61	8	16	0,17	0,50
imidaklopid	3	0,35	0		0,17	0,50
tiaklopid	2	0,35	2	0,044	0,033	0,10
tiametoxam	1	0,19	0		0,17	0,50
2014						
Honungsbin (ng/g)						
acetamiprid	0		1	0,026	0,020	0,060
klotianidin	0		6	1,5	0,080	0,25
imidaklopid	1	0,57	0		0,040	0,12
tiaklopid	1	0,043	3	6,9	0,030	0,090
tiametoxam	0		0		0,070	0,20
Pollen från honungsbin (ng/g)						
acetamiprid	1	0,18	0		0,10	0,30
klotianidin	0		6	16	0,25	0,75
imidaklopid	0		1	0,39	0,20	0,60
tiaklopid	3	1,3	2	358	0,025	0,075
tiametoxam	0		0		0,060	0,20
Nektar från honungsbin (ng/ml)						
acetamiprid	0		1	0,68	0,033	0,10
klotianidin	0		6	9,8	0,17	0,50
imidaklopid	0		1	1,3	0,17	0,50
tiaklopid	1	0,06	2	15	0,033	0,10
tiametoxam	0		1	0,2	0,17	0,50

*Pollen: uppskattat från spikningsexperiment på den genomsnittliga provvolymen 0,056 g. Nektar: uppskattat från provvolymen på 0,016 ml.

**Större provvikt förklarar värden strax under uppskattad LOD.

Referenser

- Artportalen (2014) Rapportsystem För Småkrup. Besökt: 2014-02-09. Webbadress: www.artportalen.se
- Bayer CropScience (2013) Säkerhetsdatablad enligt Förordning (EG) nr 1907/2006: Elado FS 480. Revisions- och tryckdatum: 2013-03-25.
- Blacquiére, T., Smagghe, G., Van Gestel, C.A.M. & Mommaerts, V. (2012) Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21: 973-992.
- Delaplane, K.S., van der Steen, J. & Guzman-Novoa, E. (2013) Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *J. Apicult. Res.* 52: 03.
- de Miranda, J.R., Bailey, L., Ball, B.V., Blanchard, P., Budge, G.E., Chejanovsky, N., Chen, Y.-P., Gauthier, L., Genersch, E. & de Graaf, D. (2013) Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *J. Apicult. Res.* 52: 1-55.
- EC (2003) Review report for the active substance thiram, finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 4 July 2003 in view of the inclusion of thiram in Annex I of Directive 91/414/EEC. Thiram 6507/VI/99 - Final 27 June 2003. Webbadress: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list_thiram_en.pdf
- Fries, I., Chauzat, M.-P., Chen, Y.-P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D.P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., Paxton, R.J., Tanner, G., Webster, T.C. & Williams, G.R. (2013) Standard methods for *Nosema* research. *J. Apicult. Res.* 52(1): 1-28.
- Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O. & Raine, N.E. (2012) Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature* 491: 105-108.
- Greenleaf, S.S., Williams, N.M., Winfree, R. & Kremen, C. (2007) Bee foraging ranges and their relationship to body size. *Oecologia* 153: 589-596.
- Gunnarson, A. Färre frön med hybrider. *Svensk Frötidning* 2, 9-10 (2013).
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S. & Decourtye, A. (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336: 348-350.
- Imdorf, A., Buehlmann, G., Gerig, L., Kilchenmann, V. & Wille, H. (1987) A test of the method of estimation of brood areas and number of worker bees in free-flying colonies. *Apidologie* 18: 137-146.
- Imdorf, A. & Gerig, L. (2001) Course in determination of colony strength. Swiss Federal Dairy Research Institute, Liebefeld CH-3003 Bern Switzerland.
- Jansson, C. & Kreuger, J. (2010) Multiresidue analysis of 95 pesticides at low nanogram/liter levels in surface waters using online preconcentration and high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 93: 1732-1747.
- Kearns, C.A. & Inouye, S.W. (1993) Techniques for pollination biologists. University Press of Colorado, Colorado, US.
- Kleijn, D. & Raemakers, I. (2008) A retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumble bee species. *Ecology* 89: 1811-1823.
- Kristansen, P. (2011) Behandling med myrsyra. Sveriges biodlares riksförbund. Senast uppdaterad: 2011-07-04. Besökt: 2013-06-12. Webbadress: <http://www.biodlarna.se/website1/1.0.1.0/1007/1/>
- Meier, U. (ed.) (2001) Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. BBCH Monograph. 2nd edition. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Berlin & Brunswick. Webbadress: <http://www.bba.de/veroeff/bbch/bbcheng.pdf>
- Mommaerts, V., Reynders, S., Boulet, J., Besard, L., Sterk, G. & Smagghe, G. (2010) Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology* 19: 207-215.

- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatton, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Van der Sluijs, J.P., Van Dyck, H. & Wiemers, M. (2015) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 68-102.
- Rundlöf, M., Fries, I., Gunnarson, A., Jonsson, O., Pedersen, T.R., Smith, H.G. & Bommarco, R. (2013) Inventering av risken för förgiftning av bin med växtskyddsmedel av typen neonicotinoider under svenska förhållanden. Delrapport 2013. Lunds universitet, Lund, och Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala.
- Rundlöf, M., Persson, A.S., Smith, H.G. & Bommarco, R. (2014) Late-season mass-flowering red clover increases bumble bee queen and male densities. *Biol. Conserv.* 172: 138-145.
- Steffan-Dewenter, I. & Kuhn, A. (2003) Honeybee foraging in differentially structured landscapes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 569-575.
- Walther-Hellwig, K. & Frankl, R. (2000) Foraging habitats and foraging distances of bumblebees, *Bombus* spp. (Hym., apidae), in an agricultural landscape. *J. Appl. Entomol.* 124: 299-306.

Rapporten kan beställas från

Jordbruksverket • 551 82 Jönköping • Tfn 036-15 50 00 (vx) • Fax 036-34 04 14
E-post: jordbruksverket@jordbruksverket.se
www.jordbruksverket.se