

Genetische Untersuchung von *Apis mellifera* hinsichtlich deren Toleranzeigenschaften bezüglich Varroamilben

Cindy Moeller, Lisa Prudnikow, Röbbbe Wünschiers

Hochschule Mittweida, Biotechnologie und Chemie

cmoelle1@hs-mittweida.de

Abstract

Varroamilben gelten weltweit als die größte Bedrohung für die Imkerei, da keine andere Bienenkrankheit einen so großen Schaden und so hohe wirtschaftliche Kosten verursacht³. *Varroa destructor* ist verantwortlich für verheerende Verluste von mehr als tausenden Honigbienenpopulationen auf der ganzen Welt¹. Ein alternativer Ansatz zur aktuell notwendigen, aber problembehafteten Akarizidbehandlung gegen die Milbe ist die gezielte Züchtung von Honigbienen entsprechend natürlicher, vererbbarer Resistenz- oder Toleranzmerkmale gegen einen Varroa Befall⁵. Hierfür soll mit der Hilfe von bereits vorhandenem genetischen Wissen⁵ hinsichtlich der Toleranz-Eigenschaften von Honigbienen ein genetischer Test entwickelt werden, um anhand der DNA des Nympenhütchens von Bienenköniginnen deren Einsetzbarkeit für die Varroaresistenzzucht zu evaluieren.

1. Motivation

Weltweit hängen bis zu 35 % der Nahrung des Menschen von verschiedenen Honigbienenarten als Bestäuber ab¹. Mitte des 20. Jahrhunderts wurde erstmalig ein Befall mit der Varroamilbe *Varroa destructor* in Völkern der westlichen Honigbiene *Apis mellifera* detektiert². Dies geschah nachdem in Folge eines Kontaktes unterschiedlicher Honigbienenarten, die Varroamilbe von ihrem ursprünglichen Wirt, der asiatischen Honigbiene *Apis cerana*, auf *Apis mellifera* übergesprungen ist³. Mittlerweile haben sich Varroamilben durch den Transport von Bienenvölkern und Königinnen außerhalb ihrer natürlichen Lebensräume in allen Bereichen der Erde ausgebreitet¹. Eine *Varroose*, die den Milbenbefall eines Bienenvolkes bezeichnet, hat verschiedene negative pathologische Auswirkungen auf eine Honigbienen-Population. Das wohl größte Problem ist die Übertragung von Viren, wie beispielsweise dem Flügeldeformationsvirus durch Varroamilben⁴. Ohne eine Behandlung mit Akariziden führt der Milbenbefall innerhalb von ein bis vier Jahren zum Zusammenbruch des gesamten Bienenvolkes. Die Verwendung von Akariziden zur Behandlung von Bienenvölkern gegen einen Varroa-Befall stellt jedoch keine permanente Lösung dar, da sie unter anderem zur Verunreinigung von Bienenprodukten, wie beispielsweise Honig führen können. Weiterhin besteht die Gefahr, dass die Milben Resistenzen gegen die häufig verwendeten Chemikalien entwickeln, sodass für eine effektive Varroabehandlung immer höhere Konzentrationen notwendig werden, welche im schlimmsten Fall auch die Bienen schädigen². Demnach wird dringend nach einer Alternative gesucht.

Ein möglicher Ansatz ist die gezielte Züchtung von Honigbienen entsprechend natürlicher, vererbbarer Resistenz- oder Toleranzmerkmale gegen einen Varroa Befall⁵. Im Fokus stehen die sogenannten SMR-Eigenschaften (Supressed Mite Reproduction) von Varroa-resistenten Bienenvölkern, die es den Bienen ermöglichen selbstständig die Anzahl an Milben im Volk unter einer gewissen Schadschwelle zu halten, sodass sich für das Bienenvolk keine negativen Auswirkungen durch den Varroa Befall ergeben. Zum SMR-Verhalten gehören die Varroa-sensitive Hygiene (VSH) und das Recapping. In beiden Fällen sind Arbeiterbienen in der Lage mit Varroamilben befallene Brutzellen ausfindig zu machen. VSH zeichnet sich dadurch aus, dass Arbeiterbienen befallene Zellen öffnen und die beschädigte Larve inklusive der Milbe ausräumen, während beim Recapping lediglich die Brutzelle mit der betroffenen Larve geöffnet wird. Dadurch wird die Reproduktion der Milbe unterbrochen. Nach Entfliehen der Milbe wird die entsprechende Brutzelle durch Arbeiterinnen neu verdeckelt und die Larve ist in der Lage sich bis hin zur adulten Biene zu entwickeln⁶. Es gibt bereits einige Honigbienen-Populationen auf der Welt, die aufgrund ihrer SMR-Eigenschaften in wesentlich geringerem Ausmaß von Varroamilben befallen sind, wie beispielsweise Völker in Schweden oder Frankreich. Diese Völker und deren genetische, evolutionäre und epidemiologische Mechanismen stellen die Grundlage für Untersuchungen hinsichtlich einer Varroa-Toleranz dar¹.

2. Partner

Das Projekt findet in Kooperation mit dem Landesverband Sachsen für Varroaresistenzzucht e.V. (LSV) statt. Ziel des Vereins ist es, durch natürliche Selektion varroaresistente Bienen zu züchten. Durch die künstliche Besamung ausgewählter Bienenköniginnen sollen Resistenz- bzw. Toleranzeigenschaften gegen einen Varroa-Befall gefestigt werden. Gegenwärtig findet die Beurteilung der SMR-Eigenschaften von Bienenvölkern mit Hilfe aufwändiger Auszählaktionen der Milben statt⁷. Hierbei werden Brutzellen unter dem Mikroskop mit einer Pinzette geöffnet, die Puppe herausgezogen und geprüft, ob sich eine Milbe in der Zelle befindet. Beurteilt wird vor Allem das VSH- und Recapping-Verhalten der Bienen, welche das Ausräumen befallener Brutzellen bzw. das Wiederverdeckeln milbenfreier Brutzellen bezeichnet. Zukünftig sollen die Zuchterfolge genetisch evaluiert werden. Hierbei könnte ein Verfahren im Sinne eines genetischen Schnelltests, der bereits vor der künstlichen Besamung einer Königin stattfindet, für Züchter abschätzbar machen, ob sich eine Bienenkönigin für die Varroa-Toleranzzucht und zur Festigung der Resistenzeigenschaften eignet.

3. Ziel und Methodik

Ziel des Projektes ist es mit Hilfe bereits vorhandenen genetischen Wissens zu SMR-Eigenschaften bei Honigbienen einen solchen genetischen Test zu entwickeln, mit dem die Einsetzbarkeit von Bienenköniginnen für die Varroaresistenzzucht evaluiert werden kann. Dieser soll für Imker und Züchter zugänglich sein und aufwändige Auszählaktionen zur Beurteilung der Varroa-Resistenz- und Toleranzeigenschaften zukünftig ablösen. Mittels der Isolation von DNA aus dem Nymphenhäutchen einer frisch geschlüpften Königin der Gattung *Apis mellifera* und einer darauffolgenden Nanoporesequenzierung soll die jeweilige Bienenkönigin auf ihr SMR-Verhalten untersucht werden. Dafür wurden von den Imkern des LSV Weiselzellen von Königinnen für eine genetische Untersuchung bereitgestellt, aus denen die Nymphenhäutchen isoliert werden können. Nymphenhäutchen stellen eine chitinartige Haut (Kokon) dar, welche die Bienenkönigin nach dem

Schlüpfen in der wachshaltigen Weiselzelle zurücklässt. Dieses Probenmaterial eignet sich besonders für die Untersuchung, da die Königin weder verletzt noch getötet werden muss und somit weiterhin für die Zucht eingesetzt werden kann. Die extrahierte DNA soll anschließend sequenziert werden. In Folge dessen können die DNA-Sequenzen mittels eines Abgleichs mit Sequenz-Datenbanken analysiert werden. Im weiteren Verlauf stehen genetische Marker und Einzelnukleotidaustausche, sogenannte SNPs, die mit einem Resistenzverhalten gegen *Varroa destructor* assoziiert sind⁵, im Fokus. Mit bioinformatischen Methoden werden die Daten untersucht und es wird eine digitale Pipeline entwickelt, welche zukünftig Aussagen über das Vorhandensein von SMR-Eigenschaften der untersuchten Königinnen liefern soll. Zuchtdaten über das vom LSV bereitgestellte Probenmaterial stehen hierfür ebenfalls zur Verfügung⁸.

4. Bisherige Ergebnisse und Diskussion

Die genetische Analyse von Honigbienen-Nymphenhäutchen ist in der uns zugänglichen Literatur bisher nicht beschrieben. Demzufolge wurden zunächst Optimierungsversuche hinsichtlich der DNA-Isolation durchgeführt. Es konnte bereits erfolgreich DNA aus den zur Verfügung gestellten Nymphenhäutchen der Königinnen des Varroaresistenz-Zuchtprogramms des LSV mittels einer Isopropanolfällung isoliert werden. Für die Analyse der erzeugten Sequenzdaten aus den Nymphenhäutchen der Bienenköniginnen wurde zunächst eine Datenbank aller bekannten DNA-Sequenzen der Gattung *Apis* erstellt. Hierfür wurden von NCBI GenBank alle *Apis*-assoziierten Sequenzen im FASTA Format heruntergeladen und zu einer eigenen Datenbank zusammengefasst. Diese soll in Zukunft auf bisher bekannte Varroa-Resistenz-assoziierte Genbereiche gefiltert werden. Nach den ersten Sequenzierungsdurchgängen konnten DNA-Sequenzen der Gattung *Apis* sowie verschiedener Mikroorganismen detektiert werden. Gefundene *Apis*-Sequenzen wurden im weiteren Verlauf auf bereits entdeckte Varroaresistenz-assoziierte Gene und Genbereiche⁵ untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass bereits einige dieser Markergene unter den Sequenzen nachweisbar sind. Durch einen zusätzlichen Enzymverdau mit einer Chitinase, welche den Abbau der β -1 \rightarrow 4-Bindungen von Chitin katalysiert, konnte die Zelllyse der chitinhaltigen Nymphenhäutchen verbessert und die Ausbeute an isolierter DNA gesteigert werden. Hierbei ist es sehr wahrscheinlich, dass sich die Steigerung der DNA-Menge, die in die Sequenzierung eingebracht werden kann, auch positiv auf die Anzahl der resultierenden Sequenzen auswirken wird. Dies würde eine noch umfassendere genetische Analyse auf Varroa-Resistenzmerkmale ermöglichen.

Endnoten

¹ Zakar, E.; Javor, A.; Kusza, Sz. (2014): Genetic bases of tolerance to *Varroa destructor* in honey bees (*Apis mellifera* L.). In: *Insectes Sociaux* (61), S. 207–215.

² Kaskinova, M. D.; Gaifullina, L. R.; Saltykova, E. S.; Poskryakov, A. V.; Nikolenko, A. G. (2020): Genetic markers for the resistance of honey bee to *Varroa destructor*. In: *Vavilov Zeitschrift für Genetik und Zucht* (24), Artikel 8, S. 853–860.

³ Boecking, O.; Genersch, E. (2008): Varroosis – the Ongoing Crisis in Bee Keeping. In: *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* (3), S. 221–228.

⁴ Rosenkranz, P.; Aumeier, P.; Ziegelmann, B. (2010): Biology and control of *Varroa destructor*. In: *Journal of Invertebrate Pathology* (103), S. 96–119.

⁵ Mondet, F.; Beaufrepaire, A.; McAfee, A.; Locke, B.; Alaux, C.; Blanchard, S. et al. (2020): Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: a systematic review of phenotypic and genomic research efforts. In: *International Journal for Parasitology* (50), S. 433–447.

⁶ Boecking, O., Spivak, M. (1999) Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud., *Apidologie* 30, 141–158.

⁷ Prudnikow, L. (2022): Auf der Suche nach der Varroaresistenten Honigbiene. Hochschule Mittweida. Online verfügbar unter <https://www.cb.hs-mittweida.de/>, zuletzt geprüft am 26.01.2023.

⁸ www.pedigree.gdeb.eu



Abbildung 1: Eine Milbe der Gattung *Varroa destructor*, welche auf dem Abdomen von *Apis mellifera* sitzt [www.abc.net.au].



Abbildung 2: Von den Imkern bereitgestellte Weiselzelle einer Königin aus der das Nymphenhäutchen isoliert werden kann.



Abbildung 3: MinION Sequencer von Oxford Nanopore Technologies, der für den genetischen Test auf Varroaresistenzigenschaften verwendet werden soll.

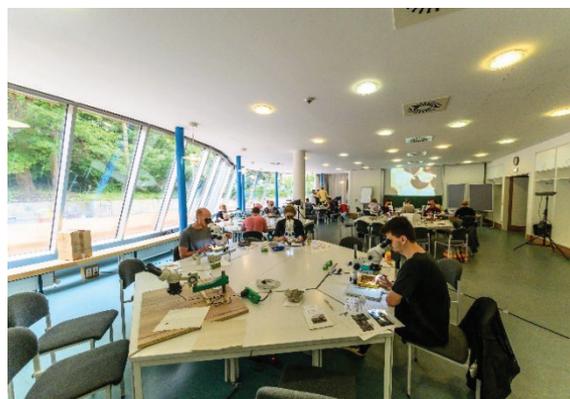


Abbildung 4: Auszählaktion des LSV an der Hochschule Mittweida zur Evaluierung der Varroaresistenz-Eigenschaften einiger Königinnen⁷.