

Prof. Dr. K. Bienefeld, Dr. A. Spötter, P.Gupta
Länderinstitut für Bienenkunde Hohen Neuendorf e.V.
Friedrich-Engels-Str. 32
D-16540 Hohen Neuendorf
Telefon: 03303 2938-30
Email: Kaspar.Bienefeld@rz.hu-berlin.de

Forschungsvorhaben Nr.: 514-06.01-2808HS009

Markergestützte Selektion der Honigbiene auf Varroa- toleranz mittels Feinkartierung und Identifizierung von ursächlichen Genen auf relevanten Genomabschnitten

Laufzeit: 01.12.2008 bis 31.07.2012

Berichtszeitraum: 15.01.2009 bis 31.07.2012

Projektpartner:

Prof. Dr. N. Reinsch
Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN)
Referat Genetik und Biometrie
Wilhelm - Stahl - Allee 2
D-18196 Dummerstorf
Deutschland

Hohen Neuendorf, 30.07.2012

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Gesamtziel des Projektes

Honigbienen sind die viertwichtigste Nutztierspezies in Deutschland. Das ist weniger auf die bis zu 125 Millionen Euro pro Jahr zurückzuführen, die durch die Honigproduktion erwirtschaftet werden, sondern vor allem an der Bestäubungsleistung der Honigbiene, die oft unterschätzt und in Deutschland in der Regel nicht honoriert wird. Der volkswirtschaftliche Wert der Bestäubung an landwirtschaftlichen Kulturen wird auf ca. 2,5 Milliarden Euro geschätzt.

Die Entwicklung der Honigbienen in Deutschland ist besorgniserregend. Im Durchschnitt sinkt der Besatz an Bienenvölkern um ca. 2 % pro Jahr. Ein wichtiger Grund für die Probleme ist die seit den siebziger Jahren in Deutschland vorkommende ektoparasitische Bienenmilbe *Varroa destructor*. Aufgrund der hohen Anfälligkeit der Honigvölker gegenüber der Milbe ist die Varroose die einzige Bienenkrankheit, gegen die in Deutschland Medikamente eingesetzt werden dürfen. Die Anwendung von Akariziden ist allerdings mit Nachteilen verbunden. Zum einen bilden sich Rückstände in den Bienenprodukten (Wallner, 1999), zum anderen können die Milben Resistenzen gegenüber den Medikamenten bilden (Milani, 1999).

Auch den letzten Winter haben ca. 20 - 25% der Völker in Deutschland nicht überlebt. Um die Völkerverluste in Zukunft ohne Schadstoffrückstände und Resistenzentwicklung zu verringern, erscheint als sinnvollste Alternative eine Selektion varroatoleranter Bienen.

Die traditionelle Selektion von Zuchttieren basiert nach Goddard und Hayes (2002) auf Pedigree-Daten und Phänotyp-Informationen, die in die Zuchtwertschätzung eingehen. Molekulargenetische Informationen können die Selektionseffizienz steigern, auch wenn die beteiligten Gene noch unbekannt sind. Die Nutzung solcher DNA-Marker-Informationen, ist nach Fries & Thaller (2003) insbesondere bei solchen Merkmalen vielversprechend, die schwer oder nur unter hohem Kostenaufwand zu messen sind. Die Varroatoleranz von Honigbienen erfüllt diese Voraussetzungen. Unter Anwendung von Verfahren, die genetische Markerinformationen in Form von SNP (Single Nucleotid Polymorphism) -Genotypisierungen nutzen, soll ein SNP-Array entwickelt und zur Feinkartierung des Genoms bezüglich des Hygieneverhaltes gegenüber varroainfizierten Brutzellen eingesetzt werden. Das Ziel der Untersuchungen ist die Entdeckung von Genen, die das untersuchte Verhalten steuern und die Anwendung dieses Wissens zur Verbesserung der Zucht varroatoleranter Honigbienen mittels genomischer Selektion, die ebenfalls auf SNP-Array Daten basiert. Ein solcher SNP-Array stellt also ein molekulargenetisches Werkzeug dar, das eine deutliche Verbesserung der Zucht varroatoleranter Honigbienen, unter Einbeziehung der imkerlichen Praxis

ermöglicht. Andere wichtige Eigenschaften der Bienenvölker, wie Honigleistung, Verhalten und Schwarmneigung können berücksichtigt werden.

Wissenschaftliche und technische Arbeitsziele des Projekts

Ein zentrales Problem der Bienenzüchtung resultiert aus der Tatsache, dass die Selektionseinheit ein aus der Königin und unterschiedlich verwandten Arbeitsbienen zusammengesetztes Bienenvolk ist. Resistenzfaktoren, die im individuellen Verhalten begründet sind und zudem in sehr geringer Frequenz vorkommen, sind durch Selektion auf Volksebene sehr schwer erfolgreich zu verbessern.

Im beantragten Projekt wird das Varroatoleranzmerkmal „Erkennen und Ausräumen varroaparasitierter Brut“ verwendet, da es erstens eine zentrale Position bei der Varroatoleranz einnimmt (Boecking et al. 2000, Harbo & Harris 2005, Ibrahim and Spivak (2006) und zweitens mit einer am Länderinstitut für Bienenkunde (LIB) entwickelten Methode an Einzelbienen beobachtbar ist. Dieses Merkmal hat sich bei der Selektion auf erhöhtes Ausräumverhalten auf varroainfizierte Brut als erfolgreich erwiesen. Es ist jedoch aufgrund des erheblichen Zeit- und Materialaufwands bei seiner Erfassung nicht in die praktische Züchtung integrierbar. Es ist Imkern nicht zuzumuten, jährlich ebenso aufwendige Analysen durchzuführen, wie sie am LIB seit Jahren stattfinden. Durch die Identifizierung von merkmalsgekoppelten Markern bzw. des/ der zugrunde liegenden Hauptgens(e) kann auf die aufwendige und umweltabhängige phänotypische Merkmalerfassung in der Praxis verzichtet werden. Die Identifizierung der Vererbungsgrundlage ermöglicht eine schnellere und gezieltere Verbesserung des Merkmals, indem nur noch Tiere mit hohem Varroatoleranzpotential zur Zucht zugelassen werden. Nach Schaefer (2006) sind genombasierte Selektionsmethoden unter Verwendung von SNPs noch deutlich effizienter einzuschätzen als die Markergestützte Selektion (MAS) unter Verwendung von Mikrosatelliten.

Ziel des Projektes ist die Feinkartierung von QTL für Varroaabwehrverhalten mittels der SNP-Array-Technik. Sollten sich nur wenige Genorte mit einem jeweils großen Effekt auf das Hygieneverhalten darstellen lassen, so ist die Charakterisierung der verantwortlichen Gene und die Entwicklung von auf deutlich preiswerteren RFLP basierten Selektionsstrategien sinnvoll. Zeigen jedoch die Ergebnisse die Einflußnahme vieler Genorte mit jeweils kleinem Einfluß, so ist die Genomische Selektion unter Verwendung eines SNP-Arrays deutlich effizienter. Die im Verlauf des Projektes erfassten Daten sind auch für diese Alternative eine ideale Voraussetzung.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die zur Erreichung der Projektziele notwendigen Untersuchungen wurden in drei Phasen gegliedert. Aufgrund methodischer und technischer Fortschritte in der Molekulargenetik, wurde der ursprünglich beantragte experimentelle Ansatz während des ersten Projektjahres einigen kostenneutralen Änderungen unterworfen. Die Ziele des Projekts bezüglich einer Verbesserung der Zucht auf Varroatoleranz wurden dadurch jedoch nicht berührt. Ebenfalls unangetastet blieb die grundlegende Strategie des Projekts, die auf der Entwicklung eines SNP-Arrays und der Nutzung der mittels dieses Arrays generierten Daten zur Identifizierung von Genomabschnitten beruhte, die an der Steuerung des Varroatoleranzmerkmals „Erkennen und Ausräumen varroaparasitierter Brut“ beteiligt sind.

Im Folgenden werden der ursprüngliche experimentelle Ansatz und die daran vorgenommenen Änderungen beschrieben.

Ursprünglich bewilligter experimenteller Ansatz bei der Genotypisierung:

Genotypisierung von insgesamt 700 DNAs während der Jahre 2009, 2010, 2011 mit zwei verschiedenen Illumina Golden Gate Assays („Honigbienen-Standard-SNP-Chip“ und „Honigbienen-Hygiene-SNP-Chip“).

Der „Honigbienen-Standard-SNP-Chip“ wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Charles W. Whitfield (University of Illinois at Urbana–Champaign, Urbana) entwickelt und bereits verwendet.

Der „Honigbienen-Hygiene-SNP-Chip“ wird von uns aufgrund der Ergebnisse aus den Genotypisierungen mit Assay 1 entwickelt und zwar durch Erhöhung der Markerdichte in den identifizierten QTL-Bereichen.

Phase 1 (2009):	1536 SNPs („Honigbienen-Standard-SNP-Chip“) genotypisiert an 200 DNAs
Phase 2 (2010):	1536 SNPs („Honigbienen-Standard-SNP-Chip“) genotypisiert an 100 DNAs 1536 SNPs („Honigbienen-Hygiene-SNP-Chip“) genotypisiert an 100 DNAs
Phase 3 (2011):	1536 SNPs („Honigbienen-Standard-SNP-Chip“) genotypisiert an 150 DNAs 1536 SNPs („Honigbienen-Hygiene-SNP-Chip“) genotypisiert an 150 DNAs

Auswerten der Genotypisierungsdaten hinsichtlich bestehender Assoziationen zwischen genetischen Markern und dem untersuchten Merkmal.

Änderungen im ersten Berichtszeitraum

Beantragte Änderung des experimentellen Ansatzes bei der Genotypisierung:

Phase 1 (2009): Eine Identifizierung von SNPs, die in den von uns untersuchten Populationen polymorph sind und darüber hinaus, eine Identifizierung von SNPs mit unterschiedlichen Allelfrequenzen zwischen drei DNA Pools A, B und C durch Next Generation Sequencing. Pool A besteht aus DNAs von 50 verschiedenen Individuen, die Ausräumverhalten gegenüber varroabefallenen Brutzellen zeigten; Pool B besteht aus DNA von 50 verschiedenen Individuen, die dieses spezifische Verhalten nicht zeigten und Pool C besteht wie Pool B aus Individuen, die kein Ausräumverhalten gegenüber varroainfizierter Brut zeigten. Im Unterschied zum B-Pool wurden für diesen Pool jedoch gänzlich unverwandte Individuen verwendet. Da die verwendeten Individuen aus Völkern des gesamten Bundesgebiets stammen, ergeben sich durch die Analyse des Pools C zusätzlich wertvolle Hinweise auf Allelverteilung und Polymorphiegrad der in Deutschland relevanten Carnica-Populationen. Diese Informationen werden bei der SNP-Auswahl für den zu entwickelnden Honigbienen-Hygiene-SNP-Chip und der genomischen Selektion berücksichtigt

Phase 2 (2009 bis 2010): Design eines SNP Arrays unter Verwendung der durch das Sequenzieren identifizierten SNPs.

Phase 3 (2010 bis 2011): Genotypisierung von ca. 100 Individuen mit dem neu entwickelten SNP Array.

Genotypisierung von ca. 150 Individuen mit dem neu entwickelten SNP Array.

Auswerten der Genotypisierungsdaten hinsichtlich bestehender Assoziationen zwischen genetischen Markern und dem untersuchten Merkmal.

Begründungen und Ausführungen zur beantragten Änderung:

Die Neubeantragung betrifft hauptsächlich die erste Projektphase. Diese ist von entscheidender Bedeutung für das Projekt, denn hier werden die Grundlagen für eine erfolgreiche Durchführung gelegt. Die erste Phase des Projekts bestand nach Bewilligung des Änderungsantrages aus der Identifizierung von SNPs in gepoolten Proben von Merkmalsträgern und Nicht-Merkmalsträgern durch Next Generation Sequencing und dem Design eines SNP Arrays unter Verwendung dieser SNPs. Dafür wurden die Analysen des „Honigbienen-Standard-SNP-Chip“ in allen Projektphasen gestrichen. Nach Einholung von Vergleichsangeboten wurde die Firma IMAGENES GmbH, Robert-Roessle-Straße 10, 13125 Berlin mit der Sequenzierung der drei Proben beauftragt. Durch diese Änderungen ergaben sich folgende Vorteile für das Projekt:

- Die Möglichkeit für den zu entwickelnden SNP-Chip nur solche SNPs zu berücksichtigen, die in den im Rahmen dieses Projekts zu untersuchenden Populationen polymorph sind.
Bei Verwendung des „Honigbienen-Standard-SNP-Chip“ wäre damit zu rechnen gewesen, dass ein großer Teil der darauf enthaltenen SNPs in den während dieses Projekts zu analysierenden Populationen nicht polymorph ist, was durch Untersuchungen von Whitfield et al. (2006) bestätigt wird. In diesen Analysen konnten nur 1136 der auf dem Chip enthaltenen 1536 SNPs (74%) berücksichtigt werden.
- Eine Identifizierung von SNPs, die unterschiedliche Allelfrequenzen zwischen den beiden Pools aufweisen. Dies stellt, ebenso wie eine mittels SNP-Chip-Assay nachgewiesene Assoziation, ein Indiz für die räumliche Nähe dieser SNPs zu merkmalsbeeinflussenden Genen dar.
- Durch diesen Ansatz wird es möglich einen sehr spezifischen, auf unser Projekt zugeschnittenen SNP-Chip zu entwickeln.
- Die Gesamtzahl an identifizierten SNPs, die aus diesem veränderten Versuchsansatz zu erwarten sind, wird als wesentlich höher eingeschätzt, als die Anzahl der SNPs, die mit den beiden Assays des ursprünglichen Ansatzes (je 1536) analysiert werden könnten.

Die beantragten Änderungen waren trotz der genannten Vorteile nicht mit einer Erhöhung der bewilligten Projektkosten verbunden.

Änderungen im zweiten Berichtszeitraum

Im ersten Projektabschnitt des Forschungsvorhabens (Zwischenbericht vom Februar 2010) wurden durch Next-Generation-Sequencing von drei Pool-Stichproben und anschließende statistische Auswertung rund 36.212 polymorphe SNPs in unseren Stichproben identifiziert, von denen 12.454 eine Assoziation mit dem Merkmal Varroatoleranz bei Bienen aufweisen. Ursprünglich beantragt und bewilligt wurde die Entwicklung eines Illumina Golden Gate Honigbienen-Hygiene-SNP-Assays, der 1536 SNPs umfasst. Im bisherigen Projektverlauf stellte sich nach Gesprächen mit Anbietern entsprechender Genotypisierungsdienstleistungen heraus, dass sich mit den zur Verfügung stehenden Projektmitteln möglicherweise ein größerer Assay realisieren lässt, was die Chancen zur Erreichung der Projektziele erheblich steigern würde. Die Firma Aros applied biotechnology aus Aarhus, Dänemark hat uns ein aus wissenschaftlicher Sicht zukunftsweisendes und preislich äußerst attraktives Angebot für einen SNP-Chip der Firma Affymetrix mit 44.000 SNPs unterbreitet. Es ist damit zu rechnen, dass dieser Chip auf großes, weltweites Interesse seitens der bienenwissenschaftlichen Gemeinschaft trifft, insbesondere, weil sich mit einem Chip dieser Dimension nicht ausschließlich auf die Varroatoleranz bezogene Fragestellungen bearbeiten lassen. Vielmehr können alle möglichen denkbaren Merkmale der Biene auf eine Assoziation mit den auf dem Chip repräsentierten SNPs untersucht werden. Dies ist möglich, da nicht nur die 12.454 im ersten Projektabschnitt identifizierten SNPs mit Bezug zur Varroatoleranz Bestandteil dieses Chips sind, sondern zusätzlich noch 23.758 ebenfalls in der ersten Projektphase validierte SNPs, die in sich in der untersuchten Stichprobe als heterozygot herausgestellt haben und 7.788 weitere SNPs, die aus einer Liste des „Honey Bee Genome Project“ ausgewählt wurden. Die Gesamtzahl an SNPs führt zu einer – besonders in Relation zur Größe des Bienengenoms – hohen Genomabdeckung. Es gibt momentan in der Bienenforschung keinen Assay vergleichbarer Größe.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Stand der Wissenschaft und Technik, Informationsrecherchen

Nach Swalve (2003) ist eine Absicherung des Effektes einzelner Gene auf bestimmte Eigenschaften nur bei möglichst exakt festgestellten Phänotypdaten möglich. Die phänotypische Erfassung hygienischer Honigbienen stellt nach wie vor ein Problem dar. Aufgrund der Biologie von Varroamilben, Honigbienen und der Art des Zusammenlebens

wurden in den letzten Jahren folgende Selektionskriterien oder züchterischen Strategien diskutiert bzw. angewendet:

Selektionskriterien in der imkerlichen Praxis

Über mehrere Jahre wurden in einigen Ländern im Rahmen der Leistungsprüfung von Bienenvölkern folgende Hilfsmerkmale erfasst, von denen eine Beziehung zur Varroatoleranz angenommen wird (Büchler, 1994). Im wesentlichen sind dies:

- a) der Prozentanteil ausgeräumter Brutzellen nach Anstich der Puppen durch den Zelldeckel (Pintest),
- b) die Anzahl Milben nach Abschluss einer einjährigen Leistungsprüfung nach Akarizidbehandlung,
- c) der Prozentanteil verletzter Milben im natürlichen Totenfall der Völker.

Diese Merkmale werden im Rahmen der Zuchtwertschätzung erfasst. Neueste Heritabilitätsschätzungen im LIB haben eine Heritabilität von 0,29 ($\pm 0,02$) für das Varroatoleranzmerkmal „Ausräumrate nach Pintest“ ergeben (Ehrhardt et al., 2006).

Selektionskriterien in wissenschaftlichen Versuchen

Wegen der zeit- und materialaufwendigen Erfassung der im Folgenden genannten Merkmale, können diese nur sehr eingeschränkt als Selektionskriterien von der Praxis übernommen werden. Daraus folgt, dass die züchterische Bearbeitung effektiver Populationsgrößen nur in Instituten bei sehr hohem Personal- und Sachmittelaufwand erfolgen kann.

- a) Selektion auf ein verstärktes Ausräumverhalten varroabefallener Brutzellen (Peng et al., 1987); Boecking & Drescher 1992; Thakur et al., 1997)
- b) Selektion auf eine kürzere Zeitdauer der verdeckelten Brutphase, die den Entwicklungsstadien des Parasiten weniger Zeit zur Ausreifung lässt (Moritz, 1985; Wilde & Koeniger, 1992; Harbo, 1992; Bienefeld & Zautke, 2007)
- c) Selektion auf Brut des Wirtes, der für den Parasiten weniger attraktiv ist bzw. Unfruchtbarkeit bei den Varroa-Weibchen auslöst (Rosenkranz & Engels, 1994; Bienefeld et al., 1998; Arechavaleta-Velasco et al., 2001; Grandi-Hofman et al., 2002).

Die Selektion auf verstärktes Ausräumverhalten hat sich als Erfassungsmerkmal klar durchgesetzt. Hingegen ist z.B. die Selektion auf eine verkürzte Zeitdauer der verdeckelten Brutphase mit Nachteilen verbunden. Die kürzere Brutphase führt sowohl dazu, dass geschlüpfte adulte Tiere kürzer leben als auch dazu, dass viele bereits als Puppen sterben. Dadurch verlängert sich die Reproduktionszeit der Milben bis Arbeitsbienen die Zellen von außen öffnen (Bienefeld und Zautke, 2007). Selektion auf verstärktes Ausräumverhalten

stellt keinen Nachteil für die Bienen dar und das Merkmal lässt sich durch die im LIB angewendete Videoanalyse (siehe Material und Methoden) gut nachvollziehen. Auch Harbo & Harris (2005) sowie Ibrahim and Spivak (2006) haben Linien erzeugt und getestet, die eindeutig belegen, dass Ausräumverhalten erblich ist und in der Lage, die Varroapopulation im Volk zu dezimieren.

Dieser Ansatz hat einen weiteren großen Vorteil: Alle ökonomisch wichtigen Krankheiten der Bienen wie die Varroose (Milbe: *Varroa destructor*), die Amerikanische Faulbrut (Bakterium: *Paenibacillus larvae*) oder die Kalkbrut (Pilz: *Ascosphaera apis*) sind Brutkrankheiten. Krankheiten der adulten Bienen spielen bei dieser Spezies nur eine untergeordnete Rolle. Übereinstimmend wird von allen relevanten Arbeitsgruppen das frühzeitige Erkennen und Ausräumen kranker Brut als effektivste Bekämpfungsstrategie gegenüber Brutkrankheiten angesehen. Das frühzeitige Ausräumen der befallenen Brut führt dazu, dass der Erreger/Parasit nie eine Schadschwelle überschreitet, die für den Wirt zum Problem wird. Bezüglich der weltweit größten Bedrohung der Honigbiene, der Varroamilbe, liegen Ergebnisse vor, dass die unterschiedliche Sensitivität gegenüber dem Duftstoffbouquet kranker Brut eine zentrale Rolle beim Hygieneverhalten gegenüber kranker Brut spielt. Untersuchungen im Länderinstitut für Bienenkunde (LIB) zeigten, dass sich das Ausräumen von Brut durch hygienische Bienen eher an der Reaktion der Brut auf den Erreger als an der Erregerpräsenz selbst orientiert (Bienenfeld & Zautke 2006). Die Varroose bewirkt im Vergleich zur Amerikanischen Faulbrut und zur Kalkbrut nur geringe Schäden an der Brut. Die Ausrichtung der Selektion auf eine Krankheit mit geringer und allgemeingültiger Schwelle lässt erwarten, dass generell die Resistenz gegenüber allen wichtigen Krankheiten in den Bienenpopulationen verbessert wird.

Anwendung molekulargenetischer Techniken bei der Zucht

In der konventionellen Tierzucht basiert Selektion ausschließlich auf den Merkmalswerten der Tiere selbst oder ihrer Verwandten. Die für die unterschiedliche Merkmalsausprägung verantwortlichen DNA-Abschnitte (Gene) sind in der Regel nicht bekannt. Die Erfolge der konventionellen Tierzucht der letzten Jahrzehnte belegen, dass auch in Unkenntnis der ursächlichen DNA-Abschnitte durch Zuchtwertschätzung Fortschritte erzielt werden können. Bei Merkmalen, bei denen die Erfassung sehr aufwendig oder mit den Anforderungen des Tierschutzes heute nicht mehr vereinbar ist, bieten sich molekulargenetische Methoden an und sind z. T. unverzichtbar geworden. Z. B. ist durch die Identifizierung des für das Stresssyndrom des Schweins verantwortliche Halothangens (Fuji et al., 1991) und die eingeführte DNA-basierte Diagnose die Zahl stressbedingter Tierverluste deutlich zurückgegangen.

Die molekulargenetische Analyse von polygenen Merkmalen ist deutlich schwieriger als die Identifizierung von Hauptgenen, bei denen spezielle Gene einen dominierenden Einfluss auf eine Merkmalsvariation haben. Zur Kartierung von Loci mit Einfluss auf polygene Merkmale kommen QTL (quantitative trait locus) -Analysen zur Anwendung, bei denen nicht die verursachenden Gene direkt, sondern die mit diesen Genen assoziierten Marker detektiert werden. Genetische Marker in Zuchtprogrammen ermöglichen die Nachvollziehbarkeit der Vererbung ganzer Chromosomensegmente von Eltern auf ihre Nachkommen. Sofern ein bestimmtes Chromosomensegment ein oder mehrere Gene umfasst, die signifikant zur Variation zwischen Tieren beitragen, kann auf eine Verbindung zwischen dem geerbten Chromosomenabschnitt des Tieres und seiner Leistung geschlossen werden. Dieses ermöglicht eine Selektion sowohl auf der Basis der geerbten Chromosomenabschnitte als auch auf Basis ihrer Leistungen und verwandtschaftlichen Beziehungen zu anderen Tieren (Visscher und Haley, 1998). Zwischen 1995 und 2003 wurden innerhalb des Projektes „Genomanalyse Rind“ auf der Grundlage spezieller Familiendesigns und 265 Mikrosatelliten-Markern, die das gesamte Genom abdeckten, eine Vielzahl von QTL beim Deutschen Holstein-Rind kartiert (Kühn et al., 2003; Hiendleder et al., 2003).

Auch wenn die effektverursachenden Gene noch unbekannt sind, lässt sich durch individuelle QTL-Information die Selektionseffizienz steigern. Besonders bei schwierig zu messenden Merkmalen bringt die Markergestützte Selektion Vorteile (Boichard et al., 2002). Lande und Thompson (1990) zeigten, dass die Markergestützte Selektion auch bei Merkmalen mit geringer Heritabilität die Genauigkeit und die Effizienz von Zuchtprogrammen deutlich erhöht. In der deutschen Milchrinderzucht werden bereits seit 2003 QTL in die Zuchtwertschätzung einbezogen. In Deutschland handelt es sich um 3 chromosomale Regionen und ein Set von 13 Markern. In Frankreich wird bei Milchrindern schon seit 2000 erfolgreich Markergestützte Selektion durchgeführt (Boichard et al., 2002; Boichard et al., 2006; Gautier et al., 2006).

In der Tierzuchtforschung wird bei Rind, Schwein und Geflügel intensiv und erfolgreich an der molekularen Charakterisierung von QTL gearbeitet (Deeb und Lamont, 2002; Grisart et al. 2002 etc.). In einigen Fällen ist es sogar gelungen, ausgehend von QTL, die kausalen Mutationen zu detektieren. Beim Rind z.B. *DGAT1* (Diacylglycerol-Acyltransferase1) (Grisart et al., 2002; Thaller et al., 2003), *GHR* (Growth Hormone Receptor) (Blott et al., 2003), *ABCG2* (Cohen-Zinder et al., 2005) und nahe bei *ABCG2* das Gen *OPN* (Osteopantin) (Schnabel et al., 2005), alle vier Gene haben einen starken Effekt auf Milchmenge und Milchzusammensetzung.

Auch bei Honigbienen konnten bereits mehrere QTL-Regionen für verschiedene Merkmale detektiert werden. Hunt et al. (1999) fanden QTL, die das Verteidigungsverhalten beeinflussen. Chandra et al. (2001) detektierten QTL, die das Lernverhalten beeinflussen.

Humphries et al. (2005) berichten von QTL, die das Pollensammelverhalten beeinflussen. Lapidge et al. (2002) kartierten sechs mutmaßliche und einen signifikanten QTL für allgemeines Hygieneverhalten. Der Test dauerte 48 Stunden und wurde unter Verwendung von Brut durchgeführt die durch Tiefgefrieren getötet wurde.

Die markergestützte Selektion beruht im wesentlichen auf Mikrosatelliten Markern, deren Anzahl aber bei den meisten Tierarten begrenzt ist. Bei der Honigbiene sind aktuell nur ca. 500 Mikrosatelliten beschrieben. Das führt dazu, dass oft interessierende QTL durch weit entfernt liegende Marker charakterisiert werden müssen. Dazu kommt, dass selbst eine vergleichsweise grobe Abdeckung des Genoms mit Mikrosatelliten sehr teuer ist. Zunehmend haben daher SNP-basierte Verfahren Einzug in die Tierzucht gehalten. SNPs kommen im Genom sehr häufig vor. Ein weiterer Vorteil ist, dass mit entsprechenden Miniaturierungsverfahren (SNP-Arrays) in einer Reaktion tausende von SNPs pro Tier gleichzeitig getestet werden können. Für Mensch, Rind, Schwein, Maus werden bereits kommerzielle SNP-Arrays angeboten, was sehr kostengünstige Hochdurchsatz-Typisierungen ermöglicht. König und Simianer (2008) schätzen, dass bei entsprechenden Angeboten von kommerziellen SNP-Arrays und bezogen auf eine vergleichbare Informationsausbeute, der SNP-basierte Ansatz etwa 50 bis 100 mal preiswerter ist, als über eine Mikrosatelliten-Typisierung. Seit kurzem steht auch für die Honigbiene ein SNP-Array zur Verfügung (Whitfield et al., 2006), auch wenn dessen SNP-Umfang (ca. 1500) für aktuelle und zukünftige Anwendungen möglicherweise nicht mehr ausreicht.

2. Material und Methoden

DNA-Präparation (Proben aus Vorprojekt für Next Generation Sequencing gepoolter Stichproben)

Aus 70 in einem Vorprojekt identifizierten „Beginnern“ (Bienen, die Initiatoren bei der Öffnung varroaparasitierter Brutzellen waren und damit für die folgenden Analysen als besonders geeignet eingeschätzt werden) und 140 Kontrolltieren (Bienen, die im Verlauf der Untersuchungen keinerlei Reaktion gegenüber varroaparasitierten Brutzellen zeigten) verschiedener Herkünfte wurde hochmolekulare und reine genomische DNA präpariert.

Herstellung der DNA-Pools A,B, und C für das Next Generation Sequencing gepoolter Stichproben

Für den A-Pool wurden die 50 Individuen mit den meisten Beginner-Aktionen gegenüber infizierten Zellen und keiner Aktion gegenüber Kontrollzellen ausgewählt. Für den B-Pool wurde für jedes Individuum des A-Pools ein Geschwister ohne Beginner-Aktionen

ausgewählt. Für den C-Pool wurden 50 Individuen aus unverwandten Völkern der deutschen Carnica-Population verwendet, in denen im Rahmen der im Vorprojekt durchgeführten Verhaltensversuche nie Abwehrverhalten gegenüber varroaparasitierter Brut auftrat (Ähnliche Versuche wurden auch im Rahmen dieses Forschungsvorhabens durchgeführt. Diese werden später detailliert beschrieben). Die Konzentration der DNA-Pools wurde gemäß Absprache mit Imagenes auf 20 ng/µl eingestellt. Das Gesamtvolumen jedes Pools betrug 1000 µl, die Gesamt-DNA-Menge pro Pool lag somit bei 20µg (400 ng pro Individuum).

Identifizierung von SNPs mit unterschiedlichen Allelfrequenzen zwischen drei DNA Pools A, B und C durch Next Generation Sequencing (70K SNP-Assay)

Bei einer Stichprobengröße von 50 Tieren wurde eine 112-fache Coverage gewählt. Durch diese beiden Parameter und die zur Verfügung stehenden Projektmittel für den ersten Projektabschnitt (Phase 1), ergab sich eine Anzahl von genomweit ca. 70.000 SNPs für die Überprüfung auf eine Assoziation mit dem Merkmal „Hygieneverhalten gegenüber varroaparasitierter Brut“. Bei Verfolgung des ursprünglich bewilligten Ansatzes hätte diese Zahl bei lediglich 1536 SNPs („Honigbienen-Standard-SNP-Chip“) gelegen.

Die insgesamt 70.000 SNPs wurden zufällig aus der Liste des „Honey Bee Genome Project“ ausgewählt, wobei in den Bereichen, die in einem Vorgängerprojekt als QTL identifiziert wurden (detailliert beschrieben im Antrag dieses Projekts unter Punkt 4.2) die Genomabdeckung mit einem SNP pro 1936 bp doppelt so hoch gewählt wurden, wie im restlichen Genom (ein SNP pro 3872 bp).

Mit der Durchführung der Sequenzierungsarbeiten zur Feststellung der Allelfrequenzen von 70.000 SNPs dreier DNA Pools A, B und C (70 K SNP-Assay) wurde nach Einholung von Vergleichsangeboten die Firma IMAGENES GmbH, Robert-Roessle-Straße 10, 13125 Berlin beauftragt, wie wir ihnen mit Schreiben vom 31.08.2009 mitgeteilt haben.

Um für die statistischen Analysen Berücksichtigung zu finden, mussten die von IMAGENES gelieferten SNP-Daten zwei Kriterien erfüllen: Erstens mussten die SNPs polymorph sein und zwei Allele aufweisen; monomorphe SNPs mit einem Allel wurden ebenfalls berücksichtigt, falls die Allele zwischen den Pools nicht identisch waren. Zweitens musste die über die drei verschiedenen Pools gemittelte Anzahl analysierter Sequenzen pro SNP (Coverage) bei mindestens 15 liegen, da die Aussagekraft der Daten mit abnehmender Coverage sinkt. Diese Kriterien sollen sicherstellen, dass nur SNPs hoher Qualität für den zu entwickelnden SNP-Chip berücksichtigt werden.

Statistischen Analyse der 70 K SNP-Assay Daten zur Identifizierung von SNPs mit Bezug zur Varroatoleranz

Die Bestimmung signifikanter Unterschiede in den SNP-Allelfrequenzen zwischen den DNA-Pools A und B sowie A und C geschah durch Anwendung des Vierfeldertests für den Vergleich dichotomer Werte in zwei unabhängigen Stichproben.

Die Nullhypothese lautet:

$$H_0: p_1 - p_2 = 0$$

Es besteht keine Abhängigkeit zwischen den SNP-Allelfrequenzen und der Zugehörigkeit zur Stichprobe.

Die Alternativhypothese lautet:

$$H_1: p_1 - p_2 \neq 0$$

Es besteht eine Abhängigkeit zwischen den SNP-Allelfrequenzen und der Zugehörigkeit zur Stichprobe.

Vierfeldertafel:

	Allel 1	Allel 2	Zeilensumme
Stichprobe A	a	b	a+b
Stichprobe B	c	d	c+d
Spaltensumme	a+c	b+d	n

Formel für das Prüfmaß:

$$\chi^2 = \frac{(a \times d - b \times c)^2 n}{(a+c)(b+d)(a+b)(c+d)}$$

Die χ^2 -Werte wurden mit Hilfe der Statistik-Software SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC) in p-Werte transformiert. H_0 wurde verworfen, wenn $\alpha < 0,05$ war.

Biostatistische Auswertung der Genotypisierungsdaten aus dem 70K SNP-Assay

Die Anzahl polymorpher SNPs mit einer Mindestcoverage von 15 lag genomweit bei 36212. Einen Bezug zum untersuchten Merkmal wiesen signifikante SNPs auf. Die Anzahl SNPs, deren Allelfrequenzen zwischen den DNA-Pools A und B signifikant ($\alpha=0,05$) voneinander abwichen betrug genomweit 5278. Zwischen den DNA-Pools A und C betrug die Anzahl dieser SNPs 9377. Die Anzahl SNPs, deren Allelfrequenzen sowohl zwischen A und B als auch zwischen A und C signifikant voneinander abwichen betrug genomweit 2201.

Ein weiteres Indiz für eine Assoziation zwischen Marker und untersuchtem Merkmal war, dass der für einen Marker gefundene Effekt zwischen den Pools A und B sowie A und C auf dem gleichen Allel beruht, dass also das Allel mit der größeren und das Allel mit der kleineren Frequenz zwischen den Pools B und C identisch waren. Genomweit wurden 1763 solcher Marker identifiziert.

Entwicklung eines Honigbienen-Hygiene SNP-Chips (44 K SNP-Array)

SNPs, die eine Assoziation zu dem untersuchten Merkmal aufweisen, deren Allelfrequenzen also zwischen den DNA-Pools A und B oder A und C signifikant voneinander abwichen wurden bevorzugt zur Entwicklung des Honigbienen-Hygiene-SNP-Arrays herangezogen. Hierbei handelte es sich um 5278 SNPs für den Vergleich zwischen den DNA-Pools A und B und 9377 SNPs für den Vergleich zwischen den Pools A und C. Hiervon waren 2201 SNPs sowohl zwischen A und B als auch zwischen A und C signifikant, während 3077 SNPs ausschließlich zwischen A und B und 7176 SNPs ausschließlich zwischen A und C signifikant waren. Diese drei verschiedenen SNP-Subsets lassen sich später bei der Analyse der Genotypisierungsdaten sowohl separat als auch gemeinsam auswerten. Eine solche separate Auswertung ist auch für andere SNP-Subsets möglich, wie z.B. die für dieses Projekt als besonders bedeutsam einzuschätzenden 1763 SNPs, die einen Effekt zwischen den DNA-Pools A und B sowie A und C zeigten, der in beiden Fällen auf dem selben Allel beruhte.

Insgesamt enthält der Array somit 12.454 SNPs, die nach ihrer Validation eine Assoziation zur Varroatoleranz in den von uns untersuchten Populationen aufweisen und somit für das Projekt von großer Bedeutung sind.

Wie unter 1.1 (Änderung im zweiten Berichtszeitraum) dargestellt, bot sich die Möglichkeit einen wesentlich größeren Array zu entwickeln, als ursprünglich abzusehen war. Das aus wissenschaftlicher Sicht zukunftsweisende und preislich äußerst attraktive Angebot der Firma Aros umfasste die Entwicklung eines SNP-Chips der Firma Affymetrix mit 44.000 SNPs, inklusive DNA-Extraktion und Genotypisierung von 285 Honigbienen.

Zusätzlich wurden für den Array alle validierten SNPs berücksichtigt, die sich bei der Analyse der drei DNA-Pools im ersten Projektabschnitt als polymorph herausstellten (innerhalb oder zwischen den Pools). Hierbei handelte es sich um 23.758 SNPs.

Um die verbleibende Kapazität des 44K Affymetrix Arrays auszunutzen, wurden weitere 7788 von uns nicht validierte SNPs aus der SNP-Liste des Honey Bee Genome Project (<ftp://ftp.hgsc.bcm.tmc.edu/pub/data/Amellifera/snp/>) ausgewählt und zwar derart, dass insgesamt eine möglichst gleichmäßige Verteilung über das Genom erreicht wurde.

Die Entwicklung des SNP-Arrays wurde bereits publiziert (Spötter et al., 2012).

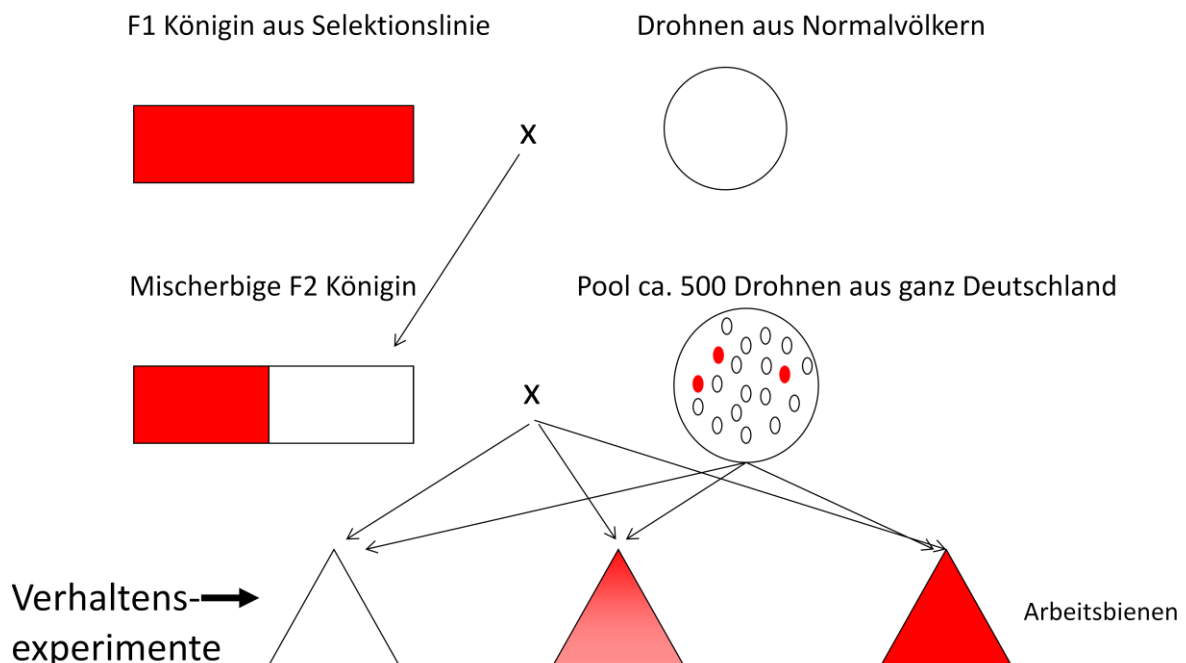
Erzeugung der neuen Kreuzungsgeneration (Versuchstiere für Verhaltensexperimente und nachfolgende Array-Analyse in 2009 und 2010)

Ab 05/2009 wurden aus 10 unterschiedlichen Völkern der Selektionslinie des LIB, welche im Vergleich zu anderen Linien eine höhere Varroatoleranz aufweisen, Jungköniginnen (F1) gezogen und diese mit Spermia von Völkern besamt, die kein oder nur ein geringes Hygieneverhalten gegenüber varroaparasitierter Brut zeigen. Die aus dieser Verpaarung

hervorgegangenen Jungköniginnen (F2) wurden in 07/2009 mit einem Spermagemisch (ca. 250 Drohnen) aus 38 verschiedenen Völkern besamt, die mit identischen Anteilen zum Spermepool beitrugen. Von den Völkern waren 11 nicht auf Varroaresistenz selektiert, bei 15 handelte es sich um varroaresistente Linien des LIB und bei 12 um varroaresistente Linien anderer Züchter. Die besamten F2-Königinnen wurden zur Gründung von Kolonien herangezogen, in deren Nachkommen unterschiedliche Allele für das Ausräumverhalten gegenüber varroainfizierte Brut segregierten.

Abb. 1

Paarungsdesign für MOVA- Projekt



Aus diesen 10 Kolonien rekrutierten sich die Arbeiterinnen, an denen die Verhaltensexperimente (Videoaufnahmen) durchgeführt wurden. Die pro Durchgang (insgesamt 5) benötigten 200 Arbeiterinnen von jeder Kolonie wurden durch Isolierung der Brutwaben kurz vor dem Schlupf der jungen Bienen gewonnen. Kurz nach dem Schlupf wurden die Bienen von der Wabe abgesammelt und individuell markiert, um sie bei den Verhaltensexperimenten unterscheiden zu können.

Dieses speziell auf das Projekt abgestimmte Anpaarungsdesign ermöglicht in den entsprechenden biostatistischen Analysen die gleichzeitige Ausnutzung von Kopplungsinformationen (mütterliche Chromosomen) und Ungleichgewichtsinformationen

(väterliche Chromosomen), um eine ausreichende Reduzierung der Kartenintervallgröße zu erreichen.

Durchführung der Verhaltensexperimente (Videoanalyse 2009/2010)

Die 2000 individuell markierten Bienen pro Durchlauf wurden auf eine in einem Käfig befindliche Brutwabe gesetzt, deren beobachtbarer Ausschnitt 169 Brutzellen umfasste. Von diesen 169 Zellen wurden ca. 24% künstlich mit Varroa infiziert. Diese wurde in der Kolonie eines Pflegevolkes vor einer Infrarot Videokamera angebracht und die Aktivität der Bienen über 7 Tage lang aufgezeichnet.

Dieses Verhaltensexperiment wurde im Zeitraum zwischen 07/2009 und 09/2009 fünf Mal durchgeführt, also an insgesamt 10.000 Tieren.

Im Zeitraum zwischen 06/2010 und 08/2010 wurden die Experimente sechs Mal durchgeführt, also an insgesamt 12.000 Tieren.



Abb. 2: Markierung der Bienen



Abb. 3: Markierte Biene



Abb. 4: Öffnen einer Brutzelle



Abb. 5: Infizieren einer Brutzelle mit einer Varroamilbe

Auswertung der Verhaltensexperimente (Videoanalysen 2009/2010)

Die Auswertung der Videoanalysen erfolgt durch das Anschauen der Aufnahmen und die Bestimmung der Bienen, welche Zellen geöffnet oder bei der Öffnung assistiert haben.



Abb. 6: Versuchsaufbau mit Kamera und Wabe

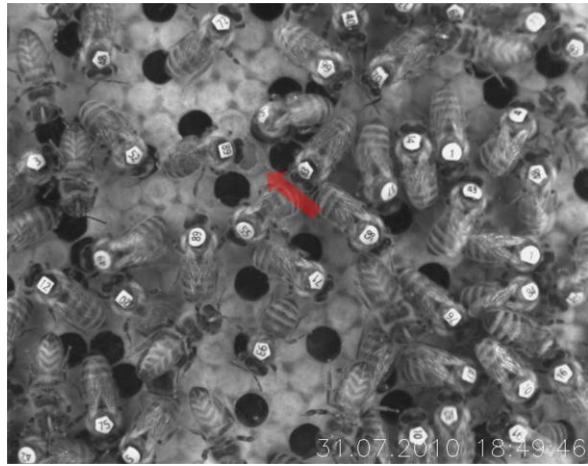


Abb. 7: Biene beim Öffnen einer infizierten Zelle

DNA Präparation für Array-Analysen in 2009 und 2010 (Proben aus neu erstellter Kreuzungsgeneration, Verhaltensexperimente (Videoanalyse 2009/2010) und zusätzliche Proben aus Völkern mit extrem guten und extrem schlechten Zuchtwerten)

Aus den in den Verhaltensassays von 2009 identifizierten „Beginnern“ (2009: 64 und 2010: 58) und Negativkontrollen (2009: 64 und 2010: 58) jeweils gleicher Abstammung wurde hochmolekulare und reine genomische DNA präpariert. Die DNA-Extraktion wurde auf dringendes Anraten von Aros nun von der Firma selbst durchgeführt, da durch den dort herrschenden stärkeren Grad an labortechnischer Automatisierung mit einer höheren und gleichmäßigeren DNA-Qualität zu rechnen ist, welche für die folgenden Experimente von essenzieller Bedeutung ist.

Der entwickelte SNP-Array soll im letzten Jahr des Forschungsvorhabens zusätzlich an einer ausgewählten Stichprobe von Völkern, getestet werden, die im Rahmen der Zuchtwertschätzung extreme Zuchtwerte bezüglich ihrer Varroatoleranz zeigen. Für diese Analysen wurden 10 Einzelbienen mit sehr hohen und 10 Einzelbienen mit sehr niedrigen Zuchtwerten für dieses Merkmal ausgewählt.

Insgesamt ergibt sich also eine Zahl von 264 (Tiere aus Verhaltensexperimenten 2009/2010 und Tiere mit extremen Zuchtwerten) zu analysierenden Proben.

Genotypisierung mit 44 K SNP-Array

Die DNA der 264 zu analysierenden Honigbienen wird an dem neu entwickelten Honigbienen-Hygiene-SNP-Chip genotypisiert. Die Genotypisierungen werden von der Firma Aros durchgeführt.

Es folgt eine kurze Beschreibung der von Aros durchgeführten Arbeitsschritte: Die DNA der einzelnen Bienen wird zuerst durch Whole Genome Amplification (WGA) vervielfältigt, um eine ausreichende Ausgangsmenge für die Genotypisierung zu erlangen. Ein Teil dieser DNA wird dann fragmentiert, mit Biotin markiert und schließlich mit je einem Honigbienen-Hygiene-SNP-Chip hybridisiert. Die hybridisierten Proben werden gewaschen, mit Streptavidin-Phycoerythrin markiert und mit einem konfokalen Laser gescannt.

Die primäre Datenanalyse, d.h. die Ermittlung der SNP Genotypen, erfolgt mit Hilfe der Affymetrix PowerTools Software (Affymetrix, Inc. Santa Clara, CA).

Genomweite Assoziationsstudie zur Varroatoleranz der Honigbiene

Die SNP-Array Daten werden auf eine Assoziation mit dem Merkmal „Hygieneverhalten gegenüber varroaparasitierter Brut“ untersucht. Die Berechnungen werden mit der statistischen Software R (<http://www.r-project.org/>) durchgeführt.

SNPs werden von der Analyse ausgeschlossen, wenn sie eines der folgenden Kriterien nicht erfüllen: 1) Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht (HWG P-Wert < 0,05, Fishers Exact Test). 2) Affymetrix Genechip call rate unter 95%, d.h. Genotypisierungsdaten für einen gegebenen SNP müssen mindestens für 95% der Stichprobe vorliegen. 3) Der SNP darf in der Stichprobe nicht monomorph sein, d.h. in der Stichprobe müssen zwei Allele vorkommen. Assoziationen auf Genotyp- und Allelebene werden mittels Fishers Exact Test geschätzt. Die resultierenden P-Werte werden durch Berechnung der False Discovery Rate korrigiert (Benjamini und Hochberg, 1995), da ein multiples Testproblem vorliegt.

Um die Qualität der Daten zu prüfen werden Quantil-Quantil (Q-Q) Plots erzeugt. Die tatsächlich geschätzten P-Werte aus der Assoziationsstudie werden der Größe nach geordnet. Als Vergleich dienen die Quantile der theoretischen Verteilung, die den entsprechenden P-Werten zugehören. Eine gute Anpassung der theoretischen Verteilung an die beobachteten Werte zeigt sich in diesem Plot dadurch, dass die geplotteten Werte auf einer Diagonalen liegen. Hierzu wurde das R package "snpMatrix" verwendet (Clayton und Leung, Hum Hered 2007;64:45–5).

Identifizierung potentieller funktioneller Kandidatengene für die Varroatoleranz der Honigbiene in der Umgebung merkmalsassoziierter SNPs

In der Datenbank Dryad wurde eine Datei mit Informationen zu den auf dem Array enthaltenen SNPs hinterlegt (DRYAD entry doi:10.5061/dryad.8635cs4h). Aus dieser Datei

werden die flankierenden Sequenzen solcher SNPs entnommen, die eine signifikante Assoziation mit dem Merkmal „Hygieneverhalten gegenüber varroaparasitierter Brut“ aufweisen. Mit diesen Sequenzen werden BLAST-Searches durchgeführt, um die Regionen im Genom der Bienen zu ermitteln, in denen die merkmalsassoziierten SNPs liegen. Die SNP-Positionen werden in beiden Richtungen auf eine Länge von ca. 100 kbp auf funktionelle Kandidatengene untersucht. Dies geschieht mit Hilfe des NCBI Map Viewers (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=7460), der das Genom der Honigbiene grafisch darstellt, inklusive aller bisher annotierten Gene.

Mutationsanalyse von Kandidatengenen für die Varroatoleranz der Honigbiene

Gene, die in der Nähe (bis 100 kbp Entfernung) eines signifikant merkmalsassoziierten SNPs liegen und einen potentiellen funktionalen Zusammenhang mit dem „Hygieneverhalten gegenüber varroaparasitierter Brut“ aufweisen (z.B. Gene die an der Chemosensorik beteiligt sind) werden einer Mutationsanalyse unterzogen, d.h. ihre Exons werden sequenziert und auf Polymorphismen untersucht, die das kodierte Protein verändern. Solche Veränderungen sind ein starkes Indiz für eine Funktion des jeweiligen Gens bei der Ausprägung der Varroatoleranz. Zusätzliche Kriterien für die Auswahl von Genen zur Mutationsanalyse sind, eine Clusterung merkmalsassoziierten SNPs in ihrer unmittelbaren Nähe und ihre Nähe zu solchen SNPs, die bereits bei der Auswahl von SNPs für den Array mit dem untersuchten Merkmal assoziiert waren (siehe: Identifizierung von SNPs mit unterschiedlichen Allelfrequenzen zwischen drei DNA Pools A, B und C durch Next Generation Sequencing (70K SNP-Assay)).

Die Mutationsanalysen werden an zwei Stichproben von je 15 Arbeiterinnen-Bienen durchgeführt, deren Hygieneverhalten extrem voneinander abweicht.

Konzepterarbeitung „Genomische Selektion bei der Honigbiene“

Daten und Ergebnisse, die mit Hilfe des entwickelten Honigbienen-Hygiene-SNP-Chips erzeugt werden, sollen in Form der genomischen Selektion zur Zucht genutzt werden. Entsprechende Methoden und Modelle sind für zahlreiche Nutz- und Haustierarten etabliert. Die Besonderheiten bei der Fortpflanzung der Honigbiene machen jedoch eine Anpassung dieser Methoden notwendig. Entsprechende Modifikationen sollen, z.B. anhand von Simulationsstudien, auf ihre Eignung für das Projekt geprüft werden.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Entwicklung eines Honigbienen-Hygiene SNP-Chips (44 K SNP-Array)

Die Entwicklung eines Honigbienen-Hygiene SNP-Chips (44 K SNP-Array) wurde bereits unter Material und Methoden beschrieben, da es sich hierbei um ein molekulargenetisches Werkzeug handelt, auf dem die weiteren Experimente aufbauen. Nichtsdestotrotz ist dieser Array ebenso als ein äußerst wichtiges Ergebnis zu betrachten.

Insgesamt enthält der Array 12.454 SNPs, die nach ihrer Validation eine Assoziation zur Varroatoleranz in den von uns untersuchten Populationen aufweisen und somit für das Projekt von großer Bedeutung sind.

Ein Indiz für die tatsächliche Identifizierung merkmalsbeeinflussender SNPs in der untersuchten Stichprobe liefert die Verteilung von p-Werten in Klassen (siehe Abb. 8 und 9). Diese ist nicht gleichmäßig, wie bei einer zufälligen Verteilung zu erwarten wäre. P-Werte < 0,05 sind im Vergleich zu jeder anderen Klasse mindestens zweifach überrepräsentiert.

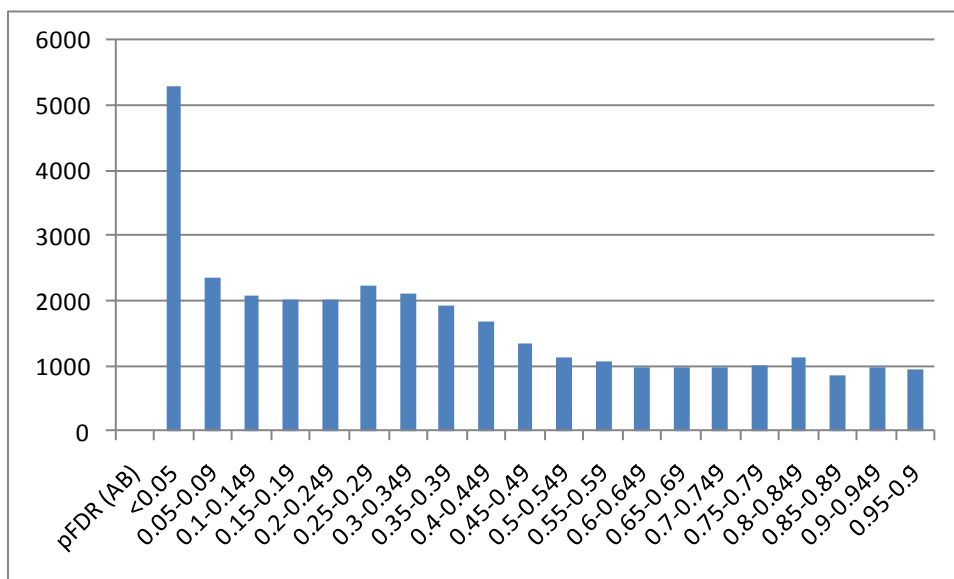


Abb. 8: Number of SNPs per pFDR-value class for the comparison of DNA pools A and B

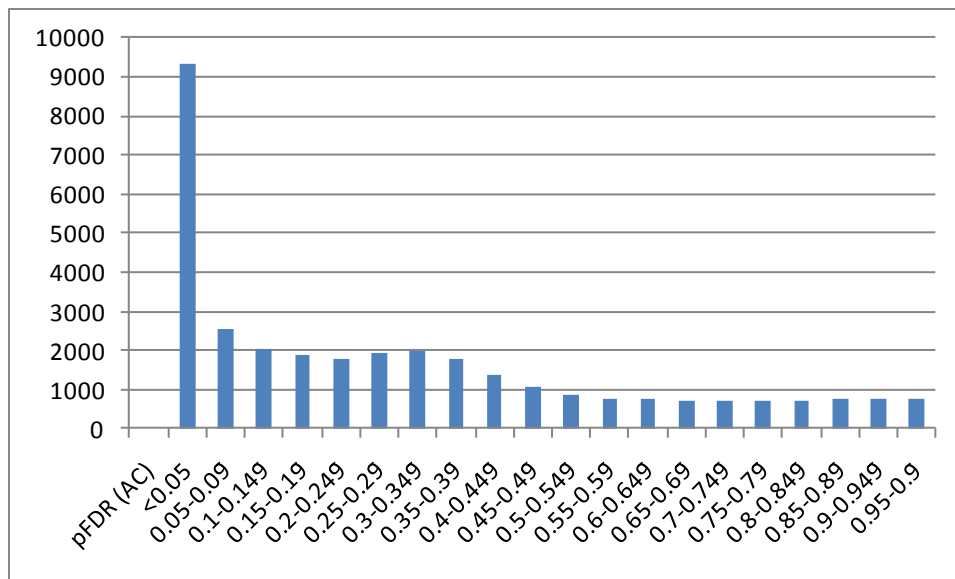


Abb. 9: Number of SNPs per pFDR-value class for the comparison of DNA pools A and C

Zusätzlich wurden für den Array alle validierten SNPs berücksichtigt, die sich bei der Analyse der drei DNA-Pools im ersten Projektabschnitt als polymorph herausstellten (innerhalb oder zwischen den Pools). Hierbei handelte es sich um 23.758 SNPs.

Um die verbleibende Kapazität des 44K Affymetrix Arrays auszunutzen, wurden weitere 7788 von uns nicht validierte SNPs aus der SNP-Liste des Honey Bee Genome Project (<ftp://ftp.hgsc.bcm.tmc.edu/pub/data/Amellifera/snp/>) ausgewählt und zwar derart, dass insgesamt eine möglichst gleichmäßige Verteilung über das Genom erreicht wurde.

Der Array wurde im letzten Projektabschnitt zur Genotypisierung von insgesamt 284 Honigbienen DNAs eingesetzt. Ziel dieser Genotypisierungen war eine Identifizierung genomischer Regionen, die eine Rolle bei der Regulierung der Varroatoleranz spielen und der Einsatz dieses Wissens zu Zuchtzwecken, wie unter 3.2 beschrieben.

Genomweite Assoziationsstudie - Identifizierung von Genen mit Einfluss auf die Varroatoleranz

Die SNP-Array Daten wurden auf eine Assoziation mit dem Merkmal „Hygieneverhalten gegenüber varroaparasitierter Brut“ untersucht. Die Analysen erfolgten sowohl am gesamten Datensatz als auch an Teildatensätzen (Teilstichprobe aus 2009, Teilstichprobe aus 2010, Teilstichprobe mit extremen Zuchtwerten). Nach Anwendung der unter „Material und Methoden, Genomweite Assoziationsstudie zur Varroatoleranz der Honigbiene“ beschriebenen Qualitätskriterien zur Auswahl zuverlässig valider Genotypisierungsdaten wurde die Assoziationsanalyse des gesamten Datensatzes mit 1561 SNPs durchgeführt. Bei der Analyse der Teilstichproben 2009, 2010 und extreme Zuchtwerte waren 3445, 5762 und 17885 SNPs genotypisierbar. Bei der Beurteilung dieser Zahlen muss berücksichtigt werden,

dass grundsätzlich insgesamt 32632 der 44000 auf dem Chip enthaltenen SNPs genotypisierbar sind, jedoch nicht bei allen analysierten Proben. Die unterschiedlichen und geringen Zahlen analysierter SNPs ergeben sich aus einem Zusammenspiel aus der unterschiedlichen Größe der Teilstichproben, den von uns angelegten, sehr hohen Qualitätskriterien und, einer nicht optimalen DNA-Qualität der untersuchten Proben. Es besteht also ein dringender Bedarf nach Isolierungsmethoden, die genomische DNA in geeigneter Qualität und Quantität liefern. Das Auffinden einer geeigneten Methode ist bei der Biene nicht trivial. Dieses Problem muss vor dem weiteren Einsatz des Chips in Genotypisierungsprojekten gelöst werden.

Im Gesamtdatensatz wurden nach Korrektur der Daten durch Berechnung der False Discovery Rate 2 genomweit signifikante Assoziationen auf Genotypebene identifiziert und zwar die SNPs mit den IDs AMB-00805602 und AMB-00484462. In den Teilstichproben 2009 und 2010 betrug die Zahl genomweit assoziierter SNPs auf Genotypebene 9 und 0. In der Teilstichprobe mit extremen Zuchtwerten wurde 1 signifikant assoziierter SNP auf Allelebene gefunden.

Identifizierung potentieller funktioneller Kandidatengene für die Varroatoleranz der Honigbiene in der Umgebung merkmalsassoziierter SNPs

Die Regionen um alle signifikant assoziierten SNPs wurden in beiden Richtungen auf eine Länge von ca. 100 kbp auf funktionelle Kandidatengene untersucht. Es wurden auch Kandidatengene in der unmittelbaren Nähe zu SNPs ausgewählt, die nur annähernd signifikante Assoziationen zum untersuchten Merkmal aufweisen, wenn starke funktionelle Aspekte für die Auswahl von Kandidatengenen in ihrer Nähe sprachen, wie z.B. das Vorkommen von Genen, die an der Chemorezeption beteiligt sind.

Des Weiteren wurden in der Nähe signifikanter und annähernd signifikanter SNPs insgesamt 5 Gene entdeckt, die eine Funktion im Notch-Signaltransduktionsweg bei *Drosophila* innehaben. Eine Rolle dieses Transduktionsweges bei der Chemosensorik ist für die Biene zwar nicht nachgewiesen, aber es gibt Indizien, die auf eine solche Rolle hinweisen, wie die differentielle Exprimierung des *Fringe*-Gens (Navajas et al., 2008) bei *Varroa*-sensitiven und *Varroa*-toleranten Bienen. *Fringe* ist ein positiver Regulator im Notch-Signaltransduktionsweg. Jedenfalls ist eine solche Häufung von Notch-Genen in der Umgebung signifikant merkmalsassoziierter SNPs als Indiz für einen Zusammenhang zwischen dem Transduktionsweg und dem untersuchten Merkmal zu werten.

Zusätzliche Kriterien für die Auswahl von Genen zur Mutationsanalyse waren, eine Clusterung merkmalsassoziierter SNPs in ihrer unmittelbaren Nähe und ihre Nähe zu solchen SNPs, die bereits bei der Auswahl von SNPs für den Array mit dem untersuchten Merkmal assoziiert waren.

Die ausgewählten Gene und die Gründe für ihre Auswahl sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 1: Gene, die für eine Mutationsanalyse ausgewählt wurden

SNP-ID	P-Wert	Zur Sequenzierung ausgewähltes Kandidatengen	Chromosom	Grund für die Auswahl
			Anzahl der Exons	
AMB-00805602	0,03564^{1,2}	Ser (Serrate)	5	CLS, FKT (Notch), POS
			6	
AMB-00484462	0,03564¹	Axo (Axotactin)	8	FKT, POS
			26	
”	”	Sli (Slit)	8	FKT, POS
			31	
AMB-00053753	0,00013 ²	Nle (Notchless)	6	POS, FKT (Notch)
“	“	Rogdi (Rogdi)	“	
AMB-00620071	0,0002 ²	Acj6 (Abnormal chemosensory jump 6)	16	FKT, POS
			3	
AMB-00468851	0,002 ²	Syt14 (Synaptotagmin 14)	5	CLS, FKT, POS
			8	
AMB-00731603	0,003 ²	Rrp46 (exosome complex exonuclease RRP46)	5	CLS, POS
			6	
AMB-00042956	0,01 ²	Cdk5alpha (Cyclin- dependent kinase 5 activator)	3	FKT, POS
			4	
AMB-01002501	0,0007 ²	Gr1 (Gustatory receptor 1)	5	FKT, POS
			11	
AMB-00989316	0,007 ²	Syt1 (Synaptotagmin 1)	1	FKT, POS, TOP
			8	
AMB-00047653	0,03 ²	Mib (ubiquitin ligase protein mind-bomb)	16	FKT (Notch), POS
			10	
AMB-00068451	0,05 ²	Hs3st-B (Heparan sulfate 3-O sulfotransferase-B)	11	FKT (Notch), POS, TOP
			4	
AMB-00014916	0,08 ²	H (Hairless)	5	FKT (Notch), POS
			3	
AMB-00074367	0,09 ²	Antp (Antennapedia)	16	TOP, (POS, FKT)
			2	
AMB-00155754	0,116 ³	Syn1 (beta-1- syntrophin)	10	TOP, FKT, (POS)
			7	
AMB-00374794	0,07 ⁴	Or2 (Odorant receptor 2)	1	FKT, POS
			8	

¹ Assoziationsanalyse des vollständigen Datensatzes

² Assoziationsanalyse der Teilstichprobe aus 2009

³ Assoziationsanalyse der Teilstichprobe aus 2010

⁴ Assoziationsanalyse der Teilstichprobe mit extremen Zuchtwerten

TOP: Übereinstimmung mit bzw. in unmittelbarer Nachbarschaft zu SNPs, die bei der Vorauswahl eine signifikante Assoziation zu dem Merkmal aufwiesen

POS: Positionelles Kandidatengen

FKT: Funktionelles Kandidatengen

CLS: Cluster von mehreren signifikanten SNPs in unmittelbarer Nachbarschaft

Um die Qualität der Daten zu prüfen wurden Quantil-Quantil (Q-Q) Plots erzeugt. Eine gute Datenqualität ist an einer guten Anpassung der theoretischen Verteilung an die beobachteten Werte erkennbar. In einem solchen Fall liegen im Diagramm die geplotteten Werte auf einer Diagonalen. Dies ist für unsere Daten der Fall, sowohl auf Allel- als auch auf Genotypebene.

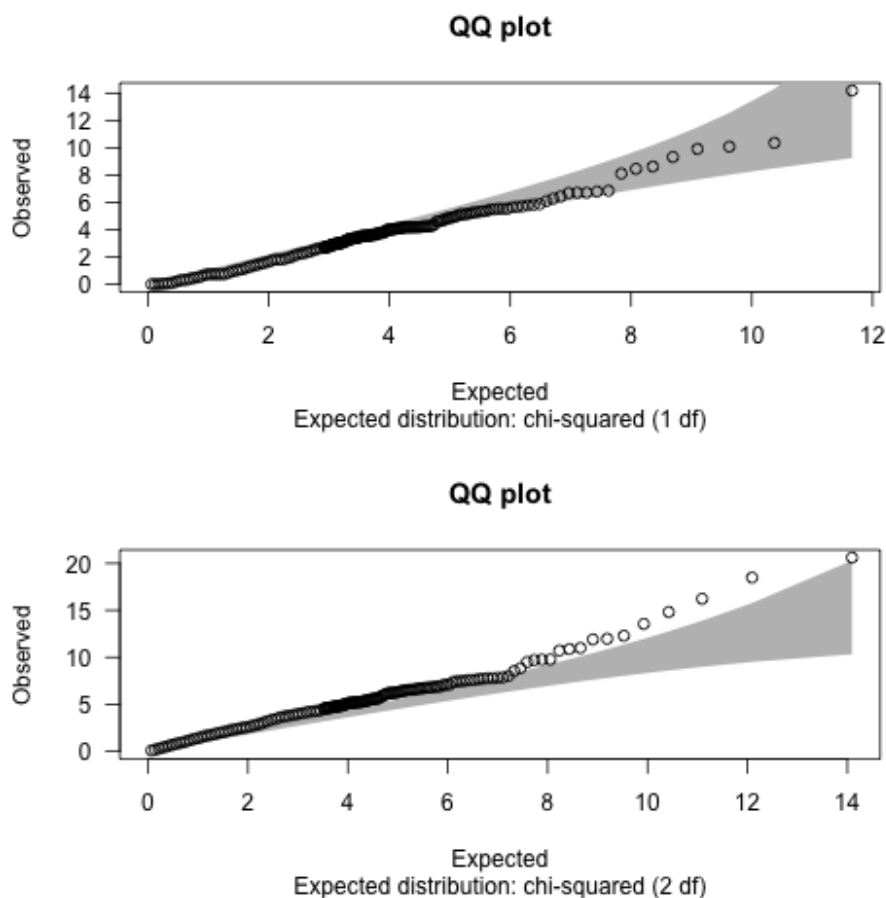


Abb. 10: Quantil-Quantil (Q-Q) Plots zur Dokumentierung der Datenqualität.

Mutationsanalyse - Identifizierung von möglicherweise ursächlichen Polymorphismen in Genen mit Einfluss auf die Varroatoleranz

Die Sequenzierungen wurden nach Einholung von Vergleichsangeboten von der Firma IMG M Laboratories GmbH, Lochamer Str. 29, 82152 Martinsried durchgeführt.

Die durchschnittliche Coverage der Sequenzen betrug 89,62 und lag damit nur knapp unterhalb des angestrebten Wertes von 100, was nicht als problematisch zu bewerten ist. Über die Anzahl identifizierter Polymorphismen (SNPs und In/Dels) pro Gen und insgesamt, informiert die folgende Tabelle. Es wurden nicht nur Basenaustausche (SNPs) gefunden, sondern auch zahlreiche Insertionen/Deletionen (In/Dels), also Basen, die in der Sequenz entweder vorkommen oder ersatzlos wegfallen. In Tab. 2 wird außerdem noch nach Qualität bzw. Zuverlässigkeit des jeweiligen Polymorphismus unterschieden (Polymorphismen ohne, mit weniger als 6 und mit mehr als 6 Fehltypisierungen bei den 30 untersuchten Tieren).

Die Qualität der Sequenzierungen zwischen den einzelnen Amplikons (ein Amplikon kann ungefähr mit einem Exon gleichgesetzt werden) war stark schwankend. Im Durchschnitt kann man die Qualität aber als befriedigend bis gut bezeichnen. Die Gründe dafür, dass sie nicht noch besser war, sind zum einen in Sequenzunterschieden zu suchen, die in jeder Art vorkommen und in einigen Bereichen das Primerdesign stark erschwerten, z.B. durch das Vorkommen repetitiver Sequenzen. Zum anderen ist die Qualität der Sequenzen auf die moderate DNA-Qualität zurückführbar. Dieses Problem wurde bereits im Zusammenhang mit der SNP-Chip-Genotypisierung erwähnt und die bei den meisten anderen Tierarten reibungslos funktionierende Methodik bedarf für die Honigbiene dringend einer Optimierung.

Tab. 2: Anzahl der entdeckten Polymorphismen pro Gen

Gen	Polymorphismen pro Gen	Exons (Anzahl, Größe CDS in bp)	Polymorphismen ohne Fehltypisierung	Polymorphismen mit weniger als 6 Fehltypisierungen	Polymorphismen mit 6 und mehr Fehltypisierungen
Acj6	11	3, 1092	0	10	1
Antp	23	2, 1057	0	8	15
Axo	77	26, 5719	33	41	3
Cdk5alpha	15	4, 1079	7	3	5
Gr1	12	11, 1357	1	11	0
H	7	3, 1176	2	5	0
Hs3st-B	11	4, 1110	5	5	1
LOC100576129	11	3, 1464	1	9	1
Mib	48	9, 1832	13	24	11
Nle	5	6, 1424	1	3	1
Or2	13	8, 1426	1	10	2
Rogdi	2	6, 795	0	1	1
Rrp46	6	6, 684	0	1	5
Ser	17	6, 3606	11	5	1
Slit	114	31, 4303	20	82	12
Syn1	13	7, 1733	2	4	7
Syt1	15	8, >1410	4	6	5
Syt14	10	8, 1489	1	5	4
Gesamt	410		102	233	75

Die Anzahl an SNPs und In/Dels, die Aminosäureaustausche verursachen sind in der nachstehenden Tabelle, für Tiere ohne Fehltypisierung und Tiere mit weniger als 6 Fehltypisierungen, angegeben. Außerdem wurden diese Polymorphismen auf signifikante Unterschiede zwischen den 15 Merkmalsträgern und 15 Kontrollen untersucht. Hierzu wurde Fishers exact test ($P < 0,05$) verwendet. Die Tests wurden sowohl auf Allel- als auch auf Genotypebene durchgeführt.

Tab. 3: Polymorphismen, die Proteinveränderungen bewirken und/oder zwischen Merkmalsträgern und Kontrollen signifikante Frequenzunterschiede auf Allel- bzw. Genotypebene aufweisen

Gen	Aminosäureaustausche		Insertion/Deletion		Signifikanz auf Allelebene (Fishers exact test; P<0,05)	Signifikanz auf Genotypebene (Fishers exact test; P<0,05)
	Polymorphismen ohne Fehltypisierung	Polymorphismen mit weniger als 6 Fehltypisierungen	Polymorphismen ohne Fehltypisierung	Polymorphismen mit weniger als 6 Fehltypisierungen		
Acj6	0	0	0	3	0	0
Antp	0	1	0	0	0	0
Axo	7	6	5	1	1	2
Cdk5alpha	0	0	1	0	0	0
Gr1	0	0	0	1	0	0
H	1	3	0	0	0	0
Hs3st-B	1	4	1	0	0	0
LOC100576129	0	0	0	0	0	0
Mib	0	0	3	2	0	0
Nle	1	1	0	0	0	0
Or2	0	0	0	1	0	0
Rogdi	0	0	0	0	0	0
Rrp46	0	0	0	0	0	0
Ser	5	1	0	0	0	1
Slit	1	3	1	20	0	0
Syn1	0	1	1	0	0	0
Syt1	2	1	0	2	0	0
Syt14	0	0	0	0	0	0
Gesamt	18	21	9	30	1	3

Signifikante Unterschiede wurden für die Gene Axotactin (1x Allelebene, 2x Genotypebene) und Serrate (1x Genotypebene) identifiziert. Dies ist hochinteressant, da hierdurch die Assoziationsstudie bestätigt wird. Im Gesamtdatensatz wurden hier zwei signifikant mit der Varroatoleranz assoziierte SNPs entdeckt. In der unmittelbaren Nähe des SNPs AMB-00805602 wurde das Gen Serrate entdeckt und in der Nähe des SNPs AMB-00484462 die Gene Slit und Axotactin. Unsere Ergebnisse machen eine Beteiligung dieser Gene an der Steuerung der Varroatoleranz sehr wahrscheinlich, da Genotypisierungen und Sequenzierungen konsistent sind und sich gegenseitig bestätigen. Für eine tatsächliche Beteiligung der Gene Axotactin und Serrate sprechen also Indizien aus verschiedenen

Quellen. Weitere Indizien würden diese Ergebnisse weiter erhärten. Solche könnten z.B. durch Expressionsstudien und Assoziationsstudien an neuen Stichprobe erbracht werden.

Die von uns erbrachten experimentellen Ergebnisse werden außerdem durch Informationen zur Funktion der Gene Axotactin und Serrate in anderen Insekten gestützt.

Axotactin ist ein Neurexin-ähnliches Protein, dass von Gliazellen produziert und nachfolgend in Axon-Trakte transportiert wird (Yuan & Ganetzky, 1999). Es beeinflusst die Auslösung von Aktionspotentialen. Mutationen in Axotactin bewirken bei *Drosophila* temperatursensitive Lähmungen und den Verlust der Fähigkeit Aktionspotentiale auszulösen (Huang & Stern, 2002; Yuan & Ganetzky, 1999). Wenn man bedenkt, dass beim Hygieneverhalten gegen *Varroa* die Auslösung von Aktionspotentialen in Abhängigkeit von der Intensität bestimmter Pathogen-assoziiierter Düfte erfolgt, kann man durchaus funktionale Parallelen und eine Mitwirkung des Axotactins bei der Varroatoleranz annehmen.

Bei Serrate handelt es sich um ein Protein mit einer Kalzium-bindenden EGF-ähnlichen Domäne. Bei *Drosophila* wird Serrate für die Ausbildung der Synapsen-Struktur und die Ausbildung neuromuskulärer Verbindungen im Larvenstadium benötigt (Bolos et al., 2007, Royet et al., 1998). Bei *Tribolium castaneum*, dem Rotbraunen Reismehlkäfer spielt Serrate eine Rolle bei der Antennenentwicklung (Dawson, 1966). Die Antennen sind auch bei Honigbienen die primären chemosensorischen Organe, ohne die ein Aufspüren von *Varroa* befallener Brutzellen nicht möglich wäre.

Die durchgeführte Mutationsanalyse hat neue, aufregende Ergebnisse erbracht, die einen erheblichen Beitrag zur Aufklärung der genetischen Grundlagen der Varroatoleranz geleistet haben. Diese Ergebnisse sollten jedoch durch weitere Experimente abgesichert werden.

Konzepterarbeitung „Genomische Selektion bei der Honigbiene“

Es wurden mathematisch-theoretische und bioinformatische Voraussetzungen für die Nutzung von SNP-Daten zu Zuchtzwecken geschaffen. Die Integrierbarkeit solcher Daten in die Zuchtwertschätzung wurde erforscht. Zuchtwerte lassen sich zur genomischen Selektion von Zuchttieren nutzen. Über Simulationen wurden zwei Methoden zur Ermittlung von Zuchtwerten verglichen. Zum einen die UNI_BLUP Methode, die sowohl phäno- als auch genotypische Daten nutzt und zum anderen der herkömmliche PED_BLUP Ansatz, der ausschließlich auf Phänotyp-Informationen basiert.

Der erste Schritt hierbei war die Entwicklung einer Software, die realistische genomische und Pedigree-Datensets simuliert, wobei einige reproduktionsspezifische Eigenarten der Honigbiene (Diplo-Haploidie, Polyandrie) zu berücksichtigen waren (Gupta et al., 2012). Bei der genomischen Selektion werden Zuchtwerte anhand von Markereffekten geschätzt, unter der Grundannahme, dass einige der über das gesamte Genom verteilten Marker im Kopplungsungleichgewicht mit den das untersuchte Merkmal beeinflussenden QTL liegen.

Um ein solches Kopplungsungleichgewicht zu erzeugen, wurde eine Population mit einer effektiven Populationsgröße (N_e) von 500 Individuen simuliert durch 2000 Generationen zufälliger Verpaarung von 100 Mutter-Königinnen mit 2000 Vater-Königinnen. Da die Fortpflanzung bei Honigbienen polyandrisch ist, wurde jede Mutter-Königin mit 10 zufällig ausgewählten Vater-Königinnen verpaart. Gemäß des Fisher-Wright Populationsmodells wurde N_e konstant bei 500 gehalten. Da das Verhältnis männlicher und weiblicher Geschlechtstiere nicht gleich ist, wurde N_e nach folgender Formel kalkuliert: $N_e = \frac{4N_m N_f}{N_m + N_f}$.

In zahlreichen Studien beim Hausrind konnte nachgewiesen werden, dass die genomische Selektion die Schätzung präziserer Zuchtwerte ermöglicht, als dies allein mithilfe phänotypischer Daten möglich wäre. Anhand der simulierten realistischen Datensets wurden bei der Honigbiene nun zum ersten Mal zwei verschiedene Ansätze zur Erreichung von Zuchtfortschritten miteinander verglichen: 1. Der herkömmliche PED_BLUP Ansatz und 2. die UNI_BLUP Methode. Ansatz 2 entspräche einer Implementierung der genomischen Selektion in die Honigbienezucht. Dies wurde simuliert unter Berücksichtigung verschiedener Werte für maternale Heritabilität, direkte Heritabilität und genetische Korrelationen zwischen direkten und maternalen Effekten. Folgendes an die Eigenheiten der Honigbiene angepasstes BLUP-Tier Modell mit maternalen und direkten Effekten wurde für die Studien verwendet:

$$y = Xb + Z_1u_1 + Z_2u_2 + e$$

y ist der Vektor für die Merkmalerhebungen aus den Kolonien, b ist der Vektor für fixe Effekte, u_1 ist der Vektor für zufällige (direkte) Arbeiter-Effekte, u_2 ist der Vektor für zufällige (maternale) Königinnen-Effekte, e ist der Vektor für zufällige residuale Effekte, X ist die Inzidenz-Matrix, die die Beobachtungen mit der entsprechenden Umwelt in Beziehung setzt, Z_1 ist die Inzidenz-Matrix, die die Beobachtungen mit den entsprechenden Arbeiter-Effekten in Beziehung setzt, Z_2 ist die Inzidenz-Matrix, die die Beobachtungen mit den entsprechenden Königinnen-Effekten in Beziehung setzt.

Die Genauigkeit der durch beide Ansätze ermittelten Zuchtwerte wurden verglichen. In unseren Simulationen zeigte Ansatz 2 einen klaren Vorteil gegenüber Ansatz 1 bezüglich der Genauigkeit der geschätzten Zuchtwerte. Je nach Heritabilität des simulierten Merkmals und in Abhängigkeit des Vorliegens bzw. der Abwesenheit einer Korrelation zwischen maternalen und direkten Effekten, betrugen die geschätzten Genauigkeitsvorteile zwischen 4 und 29%. Dieses Ergebnis ist als klares Argument für eine Etablierung der genomischen Selektion bei der Honigbiene zu werten.

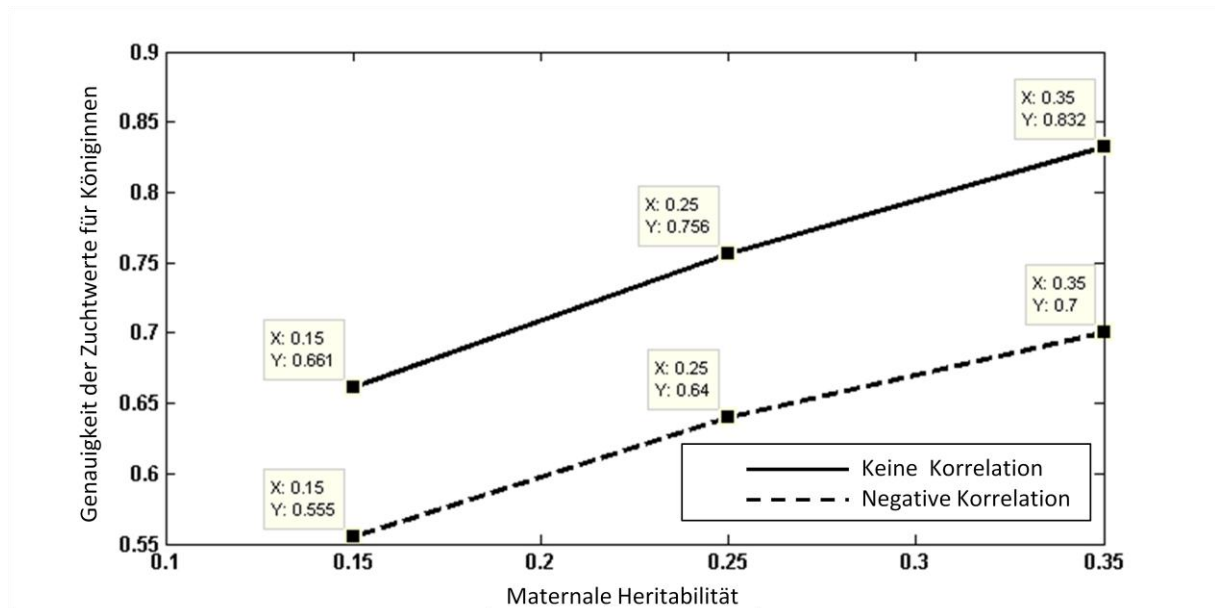


Abb. 11: Effekt einer Korrelation zwischen maternalen und direkten Effekten sowie der Heritabilität auf die Genauigkeit der Zuchtwerte für Königinnen.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Es ist damit zu rechnen, dass der von uns entwickelte Array (Spötter et al., 2012) auf großes, weltweites Interesse seitens der bienenwissenschaftlichen Gemeinschaft trifft, insbesondere, weil sich mit einem Chip dieser Dimension nicht ausschließlich auf die Varroatoleranz bezogene Fragestellungen bearbeiten lassen. Vielmehr können alle möglichen denkbaren Merkmale der Biene auf eine Assoziation mit den auf dem Chip repräsentierten SNPs untersucht werden. Das liegt darin begründet, dass nicht nur die 12.454 im ersten Projektabschnitt identifizierten SNPs mit Bezug zur Varroatoleranz Bestandteil dieses Chips sind, sondern zusätzlich noch 23.758 ebenfalls in der ersten Projektphase validierte SNPs, die in sich in der untersuchten Stichprobe als heterozygot herausgestellt haben und 7.788 weitere SNPs, die aus einer Liste des „Honey Bee Genome Project“ ausgewählt wurden. Dies führt zu einer – besonders in Relation zur Größe des Bienengenoms – besonders hohen Genomabdeckung. Es gibt momentan in der Bienenforschung keinen SNP-Chip vergleichbarer Größe. In den meisten anderen Haus- und Nutztierassen existieren bereits große SNP-Assays zur Merkmalsanalyse. Dieser Chip wird für die gesamte Bienenforschung von allerhöchstem Nutzen sein und durch seine Größe eine Investition in die Zukunft darstellen.

Ziel des Projektes war die Feinkartierung von QTL für Varroaabwehrverhalten mittels der SNP-Array-Technik und die Nutzung dieses Wissens zur züchterischen Verbesserung der Varroatoleranz. Es wurden Gene entdeckt, die wahrscheinlich einen direkten Effekt auf die Varroatoleranz ausüben. Hier ist insbesondere das Gen Axotactin zu nennen. Auch das

Serrate-Gen sollte bei zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden. Die entsprechenden Genvarianten können nun in der züchterischen Praxis auf ihren Einfluss in verschiedenen Populationen getestet werden.

Die Konzepterarbeitung für die „Genomische Selektion bei der Honigbiene“ belegt den großen potentiellen Nutzen von SNP-Daten für die Bienenzucht und bildet die Grundlage für ihre Integrierung in entsprechende Zuchtprogramme.

4. Zusammenfassung

Das Forschungsvorhaben „Markergestützte Selektion der Honigbiene auf Varroatoleranz mittels Feinkartierung und Identifizierung von ursächlichen Genen auf relevanten Genomabschnitten“ hatte zum Ziel, genetische Marker (SNPs) im Genom der Honigbiene zu identifizieren, die mit dem Merkmal „Ausräumverhalten gegenüber varroaparasitierter Brut“ im Kopplungsungleichgewicht stehen und diese genetischen Marker nach Bestätigung ihres Effekts auf das Merkmal zur Zucht auf Varroatoleranz der Honigbiene einzusetzen.

Im Rahmen des Vorhabens werden aktuelle, auf höchstem Niveau konkurrenzfähige Technologien genutzt und zu einem neuen, vielversprechenden Ansatz zur Erreichung der formulierten Ziele kombiniert.

Die Identifizierung der Marker erfolgte aus einem Set von 70.000 SNPs aus der Liste des „Honey Bee Genome Project“, die, unter Berücksichtigung von Ergebnissen eines Vorprojekts, über das Bienengenom verteilt ausgewählt wurden und geschah durch vergleichende Genotypisierung (per Next-Generation-Sequencing) eines Merkmalsträger-DNA-Pools (A) und zweier Negativkontrollen-DNA-Pools (B und C).

Der entwickelte Affymetrix 44K Honigbienen-Hygiene SNP-Chip enthält ca. 36.000 validierte SNPs, die teilweise bereits eine Assoziation mit dem untersuchten Merkmal aufwiesen und 8.000 unvalidierte SNPs. Dieser Chip wurde im Projektzeitraum an 132 Merkmalsträgern und 132 Negativkontrollen genotypisiert, um die in der ersten Projektphase per Next-Generation-Sequencing identifizierten SNPs zu veri- bzw. falsifizieren, so dass am Ende des Projekts ein anwendbares SNP-Set zur Verfügung steht, das die Zucht varroatoleranter Honigbienen deutlich und unter Einbeziehung der imkerlichen Praxis zu verbessern in der Lage ist. Andere wichtige Eigenschaften der Bienenvölker, wie Honigleistung, Sanftmut und Schwarmneigung sind hierbei selbstverständlich zu berücksichtigen. Diese Verbesserung soll unter Anwendung der genomischen Selektion geschehen, für die im Verlaufe dieses Projekts mit der Erarbeitung der theoretischen Grundlagen begonnen wurde.

Im Gesamtdatensatz wurden zwei genomweit signifikante Assoziationen auf Genotypebene identifiziert. In den Teilstichproben 2009 und 2010 betrug die Zahl genomweit assoziierter SNPs auf Genotypebene 12 und 0.

Die Regionen um alle signifikant assoziierten SNPs wurden auf funktionelle Kandidatengene untersucht. Es wurden auch Kandidatengene in der unmittelbaren Nähe zu SNPs ausgewählt, die nur annähernd signifikante Assoziationen zum untersuchten Merkmal aufweisen, wenn starke funktionelle Aspekte für die Auswahl von Kandidatengenen in ihrer Nähe sprachen.

Die kodierenden Sequenzen dieser Gene wurden einer Mutationsanalyse an 15 Merkmalsträgern und 15 Kontrollen unterzogen. Zahlreiche potentiell proteinverändernde Mutationen wurden entdeckt. Merkmalsträger und Kontrollen wurden mittels Fishers exact test auf signifikant ($P < 0,05$) unterschiedliche Genotyp- und Allelfrequenzen überprüft. Signifikante Unterschiede wurden lediglich für die Gene Axotactin und Serrate gefunden. Diese Gene liegen in der Nähe der SNPs, die im Gesamtdatensatz als einzige eine signifikante Assoziation mit dem Hygieneverhalten zeigten. Die Ergebnisse der Mutationsstudie bestätigen also in dieser Hinsicht die Resultate der Assoziationsstudie. Da Indizien aus verschiedenen Analysen auf diese Gene hinweisen, sind sie im Zusammenhang mit der Varroatoleranz als hoch interessant einzustufen. Weitere Hinweise auf ihre Beteiligung an der Steuerung des untersuchten Merkmals könnten durch weitere Assoziationsstudien an neuen Stichproben und durch Gen-Expressionsstudien gewonnen werden.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Das Projekt wurde teilweise neu konzeptioniert und an den aktuellen technologischen Stand angepasst. Änderungen in der Zielsetzung haben sich dadurch nicht ergeben.

Im Projektzeitraum kam es zu Verzögerungen bei der Entwicklung und Etablierung des SNP-Chips, für die jedoch nicht das Länderinstitut für Bienenkunde verantwortlich ist, sondern die Firma Aros applied biotechnology aus Aarhus, Dänemark. Es ist jedoch zu betonen, dass trotz dieser Schwierigkeiten, die im Projektantrag formulierten Ziele und Erwartungen nicht bloß erfüllt, sondern bei weitem übertroffen wurden. Ursprünglich sollte der zu entwickelnde Chip 1.536 SNPs umfassen. Durch Ausnutzung des rasanten technischen Fortschritts auf dem Gebiet der molekulargenetischen Methodik war es jedoch möglich einen Array zu entwickeln, der die simultane Genotypisierung von 44.000 SNPs erlaubt. Es wurde nachgewiesen, dass hiervon insgesamt 32632 SNPs grundsätzlich funktionsfähig sind. Um diese wertvolle Ressource voll nutzen zu können, ist eine bessere DNA-Qualität nötig, als sie

für unsere Analysen zur Verfügung stand. Hier muss eine geeignete Methode gefunden oder eine bestehende Methode soweit optimiert werden, dass die resultierende genomische DNA für eine Genotypisierung mit dem SNP-Chip geeignet ist.

Durch eine Assoziationsstudie wurden SNPs identifiziert, die einen signifikanten Effekt auf die Varroatoleranz ausüben. In der Umgebung dieser SNPs wurden Gene entdeckt, für die eine Beteiligung bei der Steuerung des Merkmals „Ausräumen varroaparasitierter Brut“ plausibel erscheint. Diese Gene wurden auf proteinverändernde Sequenzunterschiede zwischen „Beginnern“ und Kontrollen untersucht. Solche wurden in 14 von 18 untersuchten Genen gefunden. Das Gen Axotactin wird aufgrund der Sequenzierungsergebnisse als besonders aussichtsreicher Kandidat für eine Beteiligung an der Steuerung der Varroatoleranz bewertet. Das Serrate-Gen wird ebenfalls als vielversprechender Kandidat eingeschätzt. Die Beteiligung der genannten Gene bei der Kontrolle der Varroatoleranz ist sehr wahrscheinlich, da Indizien aus zwei unterschiedlichen Analysen dafür sprechen. Deshalb kann mit einiger Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass tatsächlich wenigstens ein ursächliches Gen (Axotactin) entdeckt wurde. Eine Absicherung der Resultate durch weitere Experimente ist jedoch notwendig.

Des Weiteren wurden erste mathematisch statistische Grundlagen zur Verbesserung der Zucht varroatoleranter Honigbienen über die genomische Selektion geschaffen, welche auf den Daten des entwickelten SNP-Arrays basieren soll.

Damit wurden alle Ziele des Forschungsvorhabens vollumfänglich erreicht. Dies wird durch Publikationen sowie Vorträge und Poster auf Fachtagungen dokumentiert:

Publikationen:

Spötter A, Gupta P, Reinsch N, Zautke F, Bienefeld K (2010) Development of a SNP-Assay for varroa tolerance in the honey bee *Apidologie* 41: 685

Spötter A, Gupta P, Nürnberg G, Reinsch N, Bienefeld K. (2012) Development of a 44K SNP assay focussing on the analysis of a varroa-specific defence behaviour in honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Molecular Ecology Resources* 12: 323-332.

Gupta P, Conrad T, Spötter A, Reinsch N, Bienefeld K (2012) Simulating a base population in honey bee for molecular genetic studies. *Genet Sel Evol* 44: 14.

Spötter A, Gupta P, Schauser L, Bienefeld K. (2012) Genome-wide association study of a varroa specific defense behavior in honey bees (*Apis mellifera*). Eingereicht bei *Molecular Ecology*.

Gupta P, Reinsch N, Ehrhardt K, Spötter A, Conrad T, Bienefeld K (2012) Genomic prediction in honey bee (*Apis mellifera*) based on the unified approach. Eingereicht bei *Genetics*.

Spötter A, Gupta P, Bienefeld K. (2012) Axotactin and Serrate – two genes implicated in varroa tolerance of honey bees. In Vorbereitung zur Einreichung bei *Nature*.

Vorträge:

Bienefeld, K. (2011) Möglichkeiten der Genomischen Selektion bei der Honigbiene. Züchtertagung des Deutschen Imkerbundes (D.I.B.) vom 08 -10.4.2011, Zwickau.

Bienefeld, K.(2012) Aktueller Stand und Zukunftsperspektiven bei der Zucht der Honigbiene. Niedersächsische Züchtertagung am 26.02.2012, Celle.

Bienefeld, K. (2012) Molekulargenetische Untersuchungen zur Varroatoleranz. Züchtertagung des Deutschen Imkerbundes (D.I.B.) vom 23 -25.3.2012, Bodenwerder..

Bienefeld, K. (2012) Strategien für den Erhalt der Biodiversität bei der Honigbiene Auftaktveranstaltung für das Projekt Carnica-Land Kärnten am 01.06.2012, Klagenfurt Österreich)

Bienefeld, K. (2012)Anwendung molekulargenetischer Methoden bei der Zucht varroaresistenter Honigbienen. Informationsveranstaltung Imkerverein Bremen 1875. Am 03.07.2012, Bremen

Gupta P, Spötter A, Conrad T, Reinsch N, Bienefeld K (2011) Zuchtwertschätzung bei Honigbienen (*Apis mellifera*) unter Verwendung von pedigree-, genomischen und phänotypischen Informationen. 58. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung vom 29.03. - 31.03.2012, Berlin.

Spötter A, Gupta P, Reinsch N, Zautke F, Bienefeld K (2012) Candidate Genes for Varroa Tolerance in Honey Bees (Kandidatengene für die Varroatoleranz bei Honigbienen) 59. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung vom 27.03. - 29.03.2012, Bonn

Gupta P, Spötter A, Reinsch N, Bienefeld K (2012) The unified approach of genetic evaluation in the honey bee (Ein allumfassender Ansatz für die Zuchtwertschätzung der Honigbiene). 59. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung vom 27.03. - 29.03.2012, Bonn.

Poster:

Gupta P, Spötter A, Conrad T, Reinsch N, Bienefeld K (2010) Expected Advantages of Genomic Selection in the Honeybee. 57. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung, Herne

Spötter A, Gupta P, Reinsch N, Zautke F, Bienefeld K (2010) Entwicklung eines SNP-Assays zur Varroatoleranz der Honigbiene. 57. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung, Herne

Spötter A, Gupta P, Reinsch N, Zautke F, Bienefeld K (2011) Anwendung eines 44K SNP-Arrays für Assoziationsstudien zur Varroatoleranz bei Honigbienen. 58. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung vom 29.03. - 31.03.2012 Berlin.

6. Literaturverzeichnis

Arechavaleta-Velasco, M. E. und Guzman-Nova, E. (2001): Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* 32: 157-174.

Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* 57: 289–300.

Berger KH, Kong EC, Dubnau J, Tully T, Moore MS, Heberlein U (2008) Ethanol sensitivity and tolerance in long-term memory mutants of *Drosophila melanogaster*. *Alcohol Clin Exp Res* 32, 895-908.

Bienefeld, K.; Haberl, M.; Radtke, J. (1998) Does the genotype of honeybee brood influence the attractiveness for *Varroa jacobsoni* and/or reproduction of this parasite? *Hereditas* 129: 125-129.

Bienefeld, K.; Zautke, F. (2006) What triggers hygienic behaviour against *Varroa* infested cells? *Apidologie* 37: 642-643.

Bienefeld, K.; Zautke, F. (2007) Untersuchungen zur Eignung des Merkmals Entwicklungsdauer der Brut bei der Zucht varroaresistenter Honigbienen. *Züchtungskunde* 79: 209-218.

Blott S, Kim JJ, Moio S, Schmidt-Küntzel A, Cornet A, Berzi P, Cambisano N, Ford C, Grisart B, Johnson D, Karim L, Simon P, Snell R, Spelman R, Wong J, Vilkki J, Georges M, Farnir F, Coppieters W (2003) Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics* 163: 253-266.

Boecking, O. und Drescher, W. (1992): Response of *Apis mellifera* L. colonies infested with *jacobsoni* Oud. *Apidologie* 22: 237-241.

Boecking, O.; Bienefeld, K.; Drescher, W. (2000) Heritability of the *Varroa*-specific hygienic behaviour in honeybees (Hymenoptera: Apidae). *J. Animal. Breed. Genet.* 117: 417-424.

Boichard D, Fritz S, Rossignol MN, Boscher MY, Malafosse A, Colleau JJ (2002) Implementation of marker-assisted selection in french dairy cattle. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 19-23, Montpellier, France.

Boichard, D.; Fritz, S.; Rossignol, M.N.; Guillaume, F.; Colleau, J.J. und Druet, T. (2006): Implementation of marker-assisted selection: practical lessons from dairy cattle. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13 -18, Belo Horizonte, Brasil

Bolós V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL (2007) Notch signaling in development and cancer. *Endocr Rev* 28: 339-363.

Büchler, R. (1994): Varroa tolerance in honey bees – occurrence, characters and breeding. *Bee World* 75, 54-70.

Chandra, S.B.C.; Hunt, G.J.; Cobey, S. und Smith, B.H. (2001): Quantitative trait loci associated with reversal learning and latent inhibition in honeybees (*Apis mellifera*). *Behavior Genetics* 31: 275-285.

Clayton, D. und Leung, H.T. (2007) An R Package for Analysis of Whole-Genome Association Studies. *Human Heredity* 64:45–51.

Cohen-Zinder, M.; Seroussi, E.; Larkin, D.M.; Looor, J.J. ; Everts-van der Wind, A.; Lee, J.-H.; Drackley, J.K.; Band, M.R. ;Hernandez, A.G.; Shani, M. ; Lewin, H.A.; Weller, J.I. and Ron, M. (2005): Identification of a missense mutation in the bovine *ABCG2* gene with major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Research* 15: 936-944

Dawson PS (1966) Insect antennal development and the serrate gene in *Tribolium castaneum*. *J Theor Biol* 12: 133-139.

Deeb N, Lamont SJ (2002) Genetic architecture of growth and body composition in unique chicken population. *J Hered* 93: 107–118.

Ehrhardt, K.; Reinsch N.; Büchler R.; Garrido C.; Bienefeld K. (2006) Genetic Parameters of Varroa Mite Tolerance Traits in the Honey Bee. *Apidologie* 37: 636 – 637.

Fries, R. und Thaller, G. (2003): Aktueller Stand und Perspektiven der molekularen Tierzucht. Züchtungskunde 75: 324-335.

Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., Leon, S., Khanna, V., Weiler, J.E., O'Brien, P.J. and MacLennan, D.H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science 253: 448-451.

Gautier, M.; Druet, T.; Fritz, S.; Eggen, A. und Boichard (2006): QTL fine-mapping: experience in French dairy cattle. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18, Belo Horizonte, Brasil.

Grisart, B.; Coppieters, W.; Farnir, F.; Karim, L.; Ford, C.; Berzi, P.; Cambisano, N.; Mni, M.; Reid, S.; Simon, P.; Spelman, R.; Georges, M. and Snell, R. (2002): Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the Bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition. Genome Research 12: 222-231.

Goddard, M.E. und Hayes, B.J. (2002): Optimisation of response using molecular data. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 19-23, Montpellier, Frankreich

Grandi-Hofman de G.; Page Jr., R.E.; Martin, J. und Fondrk, M.K. (2002): Can the frequency of reduced *Varroa destructor* fecundity in honey bee (*Apis mellifera*) pupae be increased by selection? Apidologie 33: 563-570.

Gupta P, Conrad T, Spötter A, Reinsch N, Bienefeld K. (2012) Simulating a base population in honey bee for molecular genetic studies. Genet Sel Evol 44: 14.

Harbo, J.R. (1992) Breeding honey bees (Hymenoptera: Apidae) for more rapid development of larvae and pupae. J. Econ. Entomol. 85: 2125-2130.

Harbo, J.R. und Harris, J.W. (2005): Suppressed mite reproduction explained by the behaviour of adult bees. *J Apicult Res* 44: 21-23.

Hiendleder, S.; Thomsen, H.; Reinsch, N.; Bennewitz, J.; Leyhe-Horn, B.; Looft, C.; Xu, N.; Medjugorac, I.; Russ, I.; Kühn, C.; Brockmann, G.A.; Blümel, J.; Brenig, B.; Reinhardt, F.; Reents, R.; Averdunk, G.; Schwerin, M.; Förster, M.; Kalm, E. und Erhardt, G. (2003): Mapping of QTL for body conformation and behaviour in cattle. *J Hered* 94: 496-506.

Huang Y, Stern M (2002) In vivo properties of the *Drosophila* inebriated-encoded neurotransmitter transporter. *J Neurosci* 22: 1698-708.

Humphries, M.A.; Fondrk, M.K. und Page Jr. R.E. (2005): Locomotion and the pollen hoarding behavioral syndrome of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 191: 669-674.

Hunt, G.J.; Collins, A.M; Rivera, R; Page Jr. R.E. und Guzmán-Novoa (1999): Quantitative trait loci influencing honeybee alarm pheromone levels. *J Hered* 90: 585-589.

Ibrahim, A. und Spivak, M. (2006): The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie* 37: 31-40.

König, S. und Simianer, H. (2008): Genomische Selektion – Grundlagen und Perspektiven in der Milchrinderzucht. *Züchtungskunde* 80: 50-60.

Kühn, C.; Bennewitz, J.; Reinsch, N.; Xu, N.; Thomsen, H.; Looft, C.; Brockmann, G.A.; Schwerin, M.; Weimann, C.; Hiendleder, S.; Erhardt, G.; Medjugorac, I.; Förster, M.; Brenig, B.; Reinhardt, F.; Reents, R.; Russ, I.; Averdunk, G.; Blümel, J. und Kalm, E. (2003): Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. *J Dairy Sci* 86: 360-368.

Lande R, Thompson R (1990) Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124: 743–756.

Lapidge, K.L.; Oldroyd, B.P. und Spivak, M. (2002): Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. *Naturwissenschaften* 89: 565-568.

Milani, N. (1999): The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* 30: 229-302.

Moritz RFA (1985) Heritability of the postcapping stage in *Apis mellifera* and its relation to varroa resistance. *J Hered* 76: 267 -270

Navajas M, Migeon A, Alaux C, Martin-Magniette M, Robinson G, Evans J, Cros-Arteil S, Crauser D, Le Conte Y (2008) Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC Genomics*, 25, 301.

Peng, Y.S.; Fang, Y.; Xu, S.; Ge, L. und Nasr, M.E. (1987): Response of Foster Asian honeybee (*Apis cerana* Fabr.) colonies to the brood of European honeybee (*Apis mellifera* L.) infested with parasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans, J. *Invertebr. Pathol.* 49, 259-264.

Rosenkranz, P. und Engels, W. (1994): Infertility of *Varroa jacobsoni* females after invasion into *Apis mellifera* workers brood as a tolerance factor against varroa. *Apidologie* 25: 402-411.

Schnabel, R.D.; Kim, J.-J.; Ashwell, M.S.; Sonstegard, T.S.; Van Tassell, C.P.; Connor, E.E. und Taylor, J.F. (2005): Fine-mapping milk production quantitative trait loci on BTA6: Analysis of the bovine osteopontin gene. *PNAS* 102: 6896-6901

Schaefer, L.R. (2006) Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *J Anim Breed Genetics* 123: 218-223.

Spötter A, Gupta P, Nürnberg G, Reinsch N, Bienefeld K. (2012) Development of a 44K SNP assay focussing on the analysis of a varroa-specific defence behaviour in honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Molecular Ecology Resources* 12: 323-332.

Royet J, Bouwmeester T, Cohen SM (1998) Notchless encodes a novel WD40-repeat-containing protein that modulates Notch signaling activity. *EMBO J* 17: 7351–7360.

Swalve, H.H. (2003): Neue Ansätze in der züchterischen Bearbeitung funktionaler Merkmale. Arch. Tierz., Dummerstorf 46, Sonderheft: 63-71.

Thakur, R.K.; Bienefeld, K.; Keller, R. (1997) Varroa defense behavior in *Apis mellifera carnica*. American Bee Journal 137: 143-148

Thaller G, Kühn C, Winter A, Ewald G, Bellmann O, Wegner J, Zühlke H, Fries R (2003) DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. Anim Genet 34: 354-357.

Visscher, P.M. und Haley, C.S. (1998): Strategies for marker-assisted selection in pig breeding programmes. Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Armidale, Australien 23: 503-510.

Wallner K (1999) Varroacides and their residues in bee products. Apidologie, 30: 235-247.

Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, Clark AG, Johnston JS, Sheppard WS, Smith DR, Suarez AV, Weaver D, Tsutsui ND (2006) Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. Science, 314: 642-645.

Wilde, J. und Koeniger, N. (1992): Verkürzung der Zellverdecklungsdauer der Arbeiterinnenbrut von *Apis mellifera carnica* durch Einkreuzung von *Apis mellifera capensis*. Apidologie 23: 354-357.

Yuan LL, Ganetzky B (1999) Searching for molecules mediating glial-neuronal communication. Mol Psychiatry. 4: 408-409.