

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Schlussbericht zum Thema

„Etablierung von *Ex-situ*- Erhaltungsstrukturen (Kryokonservierung) für die Honigbiene“

FKZ: 2817BM021

**Projektnehmer: Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen – Bieneninstitut
Kirchhain**

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) auf Grund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gemäß der Richtlinie des BMEL zur Förderung von Modell- und Demonstrationsvorhaben im Bereich der Erhaltung und innovativen, nachhaltigen Nutzung der biologischen Vielfalt.

Abschlussbericht

Modell- und Demonstrationsvorhaben

„Etablierung von *Ex-situ*- Erhaltungsstrukturen (Kryokonservierung) für die Honigbiene“

Verbundpartner:

Länderinstitut für Bienenkunde Hohen Neuendorf e.V. (LIB)

Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen (LLH)

Förderkennzeichen:

2817BM020 (LIB)

2817BM021 (LLH)

Laufzeit: 15.2.2019 – 31.7.2023

Autoren:

Dr. Andreas Hoppe (LIB)

Dr. Jakob Wegener (LIB)

Victoria Viert (LIB)

Prof. Dr. Kaspar Bienefeld (LIB)

Dr. Marina Meixner (LLH)

Inhaltsverzeichnis

1. Kurzfassung	5
2. Aufgabenstellung und Ziel des Vorhabens	7
2.1 Aufgabenstellungen.....	7
2.2 Wissenschaftlich-technische Ziele.....	8
3. Stand des Wissens.....	10
3.1 Die deutsche Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere als möglicher Rahmen für eine Kryoreserve von Honigbienen-Ressourcen.....	10
3.2 Die „dunkle“ Biene, <i>A. m. mellifera</i>	10
3.3 Die Krainer oder Kärntner Biene, <i>A. m. carnica</i>	12
3.4 Kryokonservierung von Drohnensperma	13
3.5 Rahmenbedingungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde	14
4. Arbeitsverlauf	16
4.1 Festlegung der Regeln zum Access and Benefit Sharing	16
4.2 Bildung und Arbeit des Auswahlgremiums	16
4.3 Einholung des Einverständnisses von Materialspendern und Behörden.....	17
4.4 Festlegung des Protokolls für morphometrische Analysen	18
4.5 Erarbeitungen von Routinen zur Genotypisierung	18
4.6 Erarbeitung von Standards zur Probenverpackung und Portionierung	18
4.7 Dokumentation der Begleitinformationen und Protokolle zur Durchführung der Kryokonservierung.....	19
4.8 Probenentnahme und Drohnenaufzucht.....	19
4.9 Spermaabnahme.....	21
4.10 Untersuchung auf Bienenviren	22
4.11 Demonstration der praktischen Einbindung von Kryo-Proben in die Zuchtarbeit.....	22
4.12 Einlagerung der Proben in die Deutsche Genbank Landwirtschaftlicher Nutztiere..	22
5. Ergebnisse des Vorhabens	23
5.1 Drohnenversandversuche	23
5.1.1 Erster Versandversuch.....	23
5.1.2 Zweiter Drohnenversandversuch.....	27
5.2 Voruntersuchungen zur Spermaqualität	30
5.3 Übersicht über die kryokonservierten Probensätze.....	30
5.4 Ergebnisse der Spermienqualitätskontrolle	35
5.5 Ergebnisse der Virusuntersuchungen der Pool- und Einzelproben	40
5.6 Überprüfung der Rassereinheit mit morphometrischen Untersuchungen.....	41
5.7 Überprüfung der Rassereinheit mit Genotypisierungen	43
5.8 Überführung von Sperma und Analysematerial in die Genbanken.....	43
5.9 Referenzierung der genotypisierten Proben in BeeBreed.....	44

5.10	Dokumentation der Proben.....	46
6.	Diskussion der Ergebnisse des Vorhabens	52
6.1	Technische Ergebnisse	52
6.2	Prozedere zur Nutzung der Ressourcen.....	52
6.3	Auswirkungen auf die Gesamtsituation genetischer Reserven	53
6.4	Welche Verbesserungen konnten im Rahmen des Vorhabens für die Praxis erzielt werden?.....	53
6.5	Wurden Grenzen der Einsetzbarkeit der angewandten Methoden identifiziert?	54
6.6	Bewertung der Umsetzbarkeit in anderen Ländern.....	54
6.7	Über das Vorhaben hinaus gewonnene Erkenntnisse	54
6.8	Wissenstransfer der im Vorhaben gewonnen Erkenntnisse.....	55
6.8.1	Vorträge	55
6.8.2	Veröffentlichungen	55
6.8.3	Schulungsvideo zur Kryokonservierung von Drohnensperma.....	55
6.8.4	Praxiskurs zur Schulung interessierter Imker, Züchter und Bienenwissenschaftler.....	55
7.	Abschließende Evaluierung des Vorhabens	57
7.1	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den erreichten Zielen	57
7.1.1	Erarbeitung eines Konzepts zum „Access and Benefit Sharing“ für die einzulagernden Ressourcen (III.1.1).....	57
7.1.2	Erarbeitung von Standards für die Vorkontrolle, Dokumentation und Probennahme (III.1.2)	57
7.1.3	Identifizierung von 10 einzufrierenden Unterpopulationen innerhalb der deutschen Bienenpopulation für die Kryokonservierung (III.1.3)	57
7.1.4	Entwicklung von Methoden zum Postversand junger Drohnenbrut (III.1.4).....	57
7.1.5	Erarbeitung eines Konzepts zur Referenzierung der Proben in der Datenbank der Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere und FABIS (III.1.5)	57
7.1.6	Entnahme und Einlagerung der genetischen Ressourcen (III.1.6).....	57
7.1.7	Einbeziehung von ausländischen Ökotypen/Unterarten, die für die Nachhaltigkeit der deutschen Bienenzucht essentiell sind (III.1.7).....	58
7.1.8	Modellhafter Einsatz von Kryo-Material in einem <i>in situ</i> -Zucht/Erhaltungsprogramm (III.1.8).....	58
7.1.9	Schulung von Erhaltungszüchtern bezüglich der Verwendung von Kryosperma (III.1.9)	58
7.2	Forschungsbedarf, der sich aufgrund der Umsetzung des Vorhabens ergeben hat.....	58
7.3	Weiterführung der Kryokonservierung	58
8.	Protokolle und Methoden.....	60
8.1	Auswahl der einzulagernden Ressourcen	60
8.2	Vorbereitung der Probennahme	60
8.3	Probennahme.....	60

8.4	Drohnenaufzucht.....	61
8.5	Sperma-Abnahme	62
8.6	Kryokonservierung	63
8.7	Qualitätskontrolle des Spermas.....	65
8.8	Übersicht über die zu erstellenden Proben.....	66
8.9	Übersicht über die zu erstellenden/einzufordernden Dokumente:.....	67
8.10	Protokoll zur Probenentnahme und Kryokonservierung.....	68
8.11	Formular zur Probenentnahme.....	69
8.12	Fragen zu den Aufzuchtbedingungen der Drohnenbrut	71
8.13	Technische Anleitung zur Vorbereitung der Drohnenwaben	72
8.14	Besitzübergabe-Vertrag	73
8.15	Regionen und Verantwortlichkeiten	74
8.16	Zuständigkeitsbereich der Gremiumsmitglieder.....	74
9.	Literaturliste.....	75
10.	Abbildungsverzeichnis	79
11.	Tabellenverzeichnis	80

1. Kurzfassung

Die genetische Struktur der Bienenpopulation in Deutschland ist im stetigen Wandel begriffen. Die Eingriffe des Menschen haben sich seit dem 19. Jahrhundert stark intensiviert, zum einen durch den verstärkten Handel mit Bienen über immer weitere Distanzen, zum anderen durch die zunehmend effektivere züchterische Arbeit. Es besteht kein Zweifel daran, dass die gegenwärtigen Bienen sich erheblich von vor 100 Jahren lebenden Bienen unterscheiden, und man kann prognostizieren, dass auch die in 100 Jahren lebenden Bienen sich von den heutigen Bienen stark unterscheiden werden. Das Verständnis des bisherigen Wandlungsprozesses wird dadurch erschwert, dass keine konservierten Bienen aus der damaligen Zeit verfügbar sind, die einen direkten Vergleich ermöglichen würden, und sogar als genetische Reserve für die heutigen Herausforderungen hätten dienen können. Dieses Projekt wurde initiiert, um für die Zukunft eine bessere Situation zu hinterlassen.

Es wurden wegweisende Erst-Standards für die Konservierung und Dokumentation zum Cryobanking von Honigbienen-Ressourcen erarbeitet und umgesetzt. Die Kryokonservierung des Spermas wird in diesem Konzept um Referenzproben, verschiedene Qualitätskontrollen, insbesondere der Auftaukontrolle, und der Dokumentierung der Herkünfte ergänzt, um so die Erfolgsaussichten einer späteren Nutzung zu erhöhen. Der Definition des Begriffs „einheimisch“ im Tierzuchtgesetz entsprechend wurden nur die Unterarten *A. m. mellifera* und *A. m. carnica* berücksichtigt. Während erstere die autochthone Honigbienenunterart darstellt, kann letztere als hinreichend eingebürgert gelten, weil sie seit über 100 Jahren verwendet wird und die Unterart ist, die von den meisten Imkern und Züchtern gehalten wird. Ausgeschlossen wurden wenig verwendete anderen Unterarten sowie zufällige und absichtliche Vermischungen zwischen Unterarten.

Nach Abschluss des Projekts ist eine Sammlung mit Sperma von 216 Honigbienen-Herkünften aus Deutschland, Norwegen, Polen, Belgien, Österreich und Slowenien in der Deutschen Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere am Friedrich-Loeffler-Institut Mariensee eingelagert. Jeder Sperma-Probe wurde zusätzlich Material zur genomischen Analyse beigegeben, und zwar eine Arbeiterinnenprobe, eine Drohnenprobe und eine Gewebeprobe, um im Falle einer Nutzung der Ressource eine molekulare Analyse vorschalten zu können, bevor das Lebend-Material verbraucht wird. Die mit Abstand meisten Proben stammen von deutschen Carnica-Züchtern, gefolgt von den Proben deutscher Mellifera-Züchter und ergänzt um Proben ausländischer Züchter beider Rassen. Sehr gut repräsentiert ist die derzeit in Deutschland anzutreffende Vielfalt innerhalb der züchterisch überformten Carnica, einschließlich vieler Herkünfte, die sich in Resistenz-Zuchtprogrammen bewährt haben. Die in vieler Hinsicht ursprünglichere slowenische Population der *A. m. carnica* ist mit 18 Proben gut vertreten. Die Dunkle Biene (*A. m. mellifera*) ist mit immerhin etwa 21 Proben repräsentiert, welche sowohl die an mildere Winter angepasste belgisch-niederländische Population als auch Typen aus Norwegen und den eher kontinentalen Klimaten Polens umfassen. Die österreichische Carnica-Population ist durch einen Krankheitsbefall von Proben nur schwach in der Sammlung vertreten, womit die alpinen Ökotypen, die in Süddeutschland prägend waren, fehlen. Insgesamt haben wir unseren Plan, die Vielfalt innerhalb der beiden für Deutschland aufgrund der Definition des Begriffs im Tierzuchtgesetz als „einheimisch“ anzusehenden Unterarten der Honigbiene in der Sammlung abzubilden, weitgehend erfüllen können.

Die derzeit eingelagerten Proben stellen jedoch nur den augenblicklichen Stand einer nach heutigen Gesichtspunkten ausgewählten Sammlung dar. Neue Erkenntnisse und Erfordernisse werden dazu führen, dass weitere Proben ergänzt werden müssen. Die

Voraussetzung dafür ist, dass Imker und Wissenschaftler die Sinnhaftigkeit der Anlage von *ex situ*-Reserven erkennen und die technischen Fähigkeiten dazu leicht erwerben können. Hierzu haben wir durch die Schulung und Schaffung von Schulungsmaterialien eine Grundlage gelegt.

Auch wenn das vorliegende Projekt primär den Erhalt innerartlicher Vielfalt in Deutschland zum Ziel hatte, hat es international sehr viel Beachtung gefunden. Durch die Spiegelung der eingelagerten ausländischen Proben in ihren Herkunftsländern wurde in Slowenien und Norwegen die Einlagerung erster Ressourcen vor Ort initiiert, Polen könnte bald folgen. Für die Imkerei in Deutschland brächte ein solches Netzwerk von Kryobanken große Vorteile — nicht nur wäre durch die Spiegelung das Risiko von Verlusten durch technische Zwischenfälle geringer, auch die insgesamt verfügbare Vielfalt könnte um ein Vielfaches gesteigert werden.

2. Aufgabenstellung und Ziel des Vorhabens

2.1 Aufgabenstellungen

Die innerartliche Vielfalt der Honigbiene *Apis mellifera* mit ca. 30 Subspezies und zahllosen Ökotypen bietet ein großes Reservoir an Anpassungen an unterschiedliche Klimazonen, Nahrungsquellen und imkerliche Wirtschaftsweisen, sowie an Resistenz-/Toleranzmechanismen gegenüber Krankheiten und Parasiten. Lokal angepasste Herkünfte sind eingeführt in Bezug auf ihre Vitalität z.T. deutlich überlegen (Meixner *et al.* 2015; Bächler *et al.* 2014). Die Honigbienen-Biodiversität ist akut bedroht, vor allem durch die massive Verbreitung weniger, züchterisch stark bearbeiteter Rassen und die Vernichtung wildlebender Bienenpopulationen durch die eingeschleppte parasitische Milbe *Varroa destructor* (De la Rúa 2009). Auch die in Deutschland ursprünglich verbreiteten Honigbienen (Ökotypen der „dunklen Biene“, *Apis mellifera mellifera*) sind bereits so gut wie vollständig verloren (Ruttner 1988). Deutsche Imker halten in der Mehrzahl die zentraleuropäische *A. m. carnica* oder die aus verschiedenen Subspezies entstandene (und weiter in der Entwicklung befindliche) Hybridrasse Buckfast, einige auch re-importierte dunkle Bienen aus anderen Ländern. Dennoch war für die deutsche Bienenhaltung die Anlage genetischer *ex situ*-Reserven von vitalem Interesse, weil

- es in Nachbarländern wie Polen, Dänemark und der Schweiz noch — ihrerseits stark bedrohte (Soland-Reckeweg 2006; Jensen & Pedersen 2005) — Restpopulationen der dunklen Biene gibt, die den ursprünglich hier verbreiteten vermutlich verhältnismäßig stark ähneln (Garnery *et al.* 1998).
- die Ursprungs-Populationen der in Deutschland nicht heimischen, aber seit über 80 Jahren mit bislang großem Erfolg gezüchteten Carnica-Bienen in ihrer eigenen Herkunftsregionen (v.a. in Österreich, Slowenien, Ungarn) — z. T. trotz gesetzlicher Schutzbestimmungen — ebenfalls durch Introgression bedroht sind (Péntek-Zakar *et al.* 2015). Diese Bienen bilden eine wichtige Rückversicherung der deutschen Carnica-Züchter gegen eine mögliche Einengung der genetischen Diversität durch fortschreitende Selektion.
- speziell die von vielen Berufsimkern bevorzugte Hybridrasse Buckfast auch in Zukunft auf die Einkreuzung anderer Rassen angewiesen sein wird, was durch den zunehmenden Verlust an reinrassigen genetischen Ressourcen immer schwieriger werden wird.
- die in Deutschland besonders intensive Zuchtarbeit der letzten Jahrzehnte zahlreiche lokal angepasste Zuchtpopulationen von *A. m. carnica* hervorgebracht hat, die aber zum großen Teil nur mit sehr geringen Völkerzahlen existieren und daher von Verlust durch extreme Wetterereignisse, Krankheitsepisoden oder schlicht durch den Tod des Züchters bedroht sind.
- der Klimawandel die Bienenzucht bereits jetzt betrifft, und die zur Abpufferung der Folgen auch in Deutschland wichtigen genetischen Ressourcen erhalten werden sollten, auch wenn sie derzeit außerhalb unseres Landes anzutreffen sind.

Ziel des Vorhabens war es deshalb, Deutschland als erstes europäisches Land mit einer Kryoreserve von Honigbienen-Sperma zu Erhaltungszwecken auszustatten. Diese sollte Vorbild und Anknüpfungspunkt für ähnliche Initiativen in anderen EU-Staaten werden. Die

2016 von Bund und Ländern am Friedrich-Loeffler-Institut gegründete Nationale Genreserve Landwirtschaftlicher Nutztiere bot dafür die ideale institutionelle Basis. Die technischen Methoden zur Gefrierlagerung von Drohnensperma konnte unser Institut gemeinsam mit Partnern im Rahmen eines durch das BMEL / die BLE geförderten Projektes erarbeiten und validieren (Wegener *et al.* 2012; Wegener & Bienefeld 2012a; Wegener *et al.* 2014; Wegener *et al.* 2014a). Weiteres Ziel des Vorhabens war es, die Einbindung der gefriergelagerten Reserven in die Erhaltungszucht zu vereinfachen und umzusetzen, mit dem Anspruch, eine „lebendige Reserve“ zu schaffen.

2.2 Wissenschaftlich-technische Ziele

Die Einbindung von *ex situ*-Reserven in Zuchtprogramme wird häufig behindert durch eine mangelhafte Dokumentation des eingefrorenen Materials – wenn nicht genau bekannt ist, was eingefroren wurde, ist eine Anpaarung kostbarer Zuchttiere mit aufgetautem Sperma oft einfach zu riskant. Im vorliegenden Projekt sollte dieses Hemmnis verringert werden, indem möglichst zu jeder Probe nicht nur detaillierte Informationen zur Rassereinheit/Morphometrie, sondern auch bekannte ökologisch/ökonomisch relevante Anpassungen erfasst werden. Dazu wurde jede Probe sowohl morphometrisch untersucht (Ruttner 1988, Meixner *et al.* 2013) als auch mit den im Rahmen des SmartBees-Projektes entwickelten diagnostischen Markern einer Bestimmung der Unterart unterzogen (Momeni *et al.* 2021). Zudem wurden neben den Gameten auch DNA-Proben sowie ganze Bienen/Drohnen konserviert. Damit wird eine nachträgliche Beurteilung vielleicht einmal relevant werdender Merkmale möglich, ohne die eigentliche Probe (das eingefrorene Sperma) zerstören zu müssen. Möglichkeiten zur nachträglichen züchterischen Bewertung von Genotypen bietet etwa der seit 2022 erhältliche Illumina DNA-Chip HONEYBEE2021, der vom LIB im Rahmen des Innovationsprojekts GeSeBi entwickelt wurde.

In Übereinstimmung mit den Zielen, die Bund und Länder mit der Gründung der nationalen Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere verfolgen, sollte die zu schaffende Kryoreserve Biene

- die *in situ*-Erhaltung bedrohter Honigbienen-Ressourcen unterstützen,
- im Falle des Verlusts von genetischen Ressourcen deren Regeneration ermöglichen (wobei einschränkend zu bemerken ist, dass bisher lediglich Sperma und keine Embryonen eingefroren werden können; eine Regeneration wäre deshalb nur unvollständig möglich),
- genetische Vielfalt im Bienensektor langfristig züchterisch nutzbar machen, etwa im Hinblick auf Klimawandel oder veränderte sanitäre Bedrohungen, und
- wissenschaftliche Untersuchungen zur Variabilität innerhalb der Art *Apis mellifera* sowie zu deren ökologischer und züchterischer Bedeutung erleichtern.

Dazu wurde

- ein Konzept zum „Access and Benefit Sharing“ in Zusammenarbeit mit den Urhebern/Sachwaltern der genetischen Ressourcen im In- und Ausland entwickelt,
- eine Liste vorrangig einzulagernder Ressourcen erstellt,
- Standards für die Vorkontrolle, Dokumentation und Probennahme entwickelt,

- die Einbindung kryokonservierten Drohnenspermas für Erhaltung und genetische Weiterentwicklung einer begrenzten Bienenpopulation demonstriert, und
- das zur Nutzung der eingelagerten Ressourcen erforderliche technische Know How durch die Erarbeitung einer technischen Dokumentation und die Durchführung von Schulungen für Züchter verbreitet.

Obwohl das Projekt als Modell- und Demonstrationsvorhaben in erster Linie der praktischen Umsetzung wissenschaftlicher Ergebnisse diene, sind in begrenztem Umfang auch neue Erkenntnisse erzielt worden. Diese betreffen z.B. die Einsetzbarkeit kryokonservierten Spermas, neue Methoden zum Transport von lebender Drohnenbrut, sowie die Bestimmung des Einflusses von Inzucht auf Spermaqualität und Einfrierfähigkeit.

3. Stand des Wissens

3.1 Die deutsche Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere als möglicher Rahmen für eine Kryoreserve von Honigbienen-Ressourcen

Die Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere wurde im März 2016 am Institut für Nutztiergenetik, einer Abteilung des Friedrich-Loeffler-Instituts, gegründet. Sie beruht auf einer Bund-Länder-Vereinbarung, der allerdings nicht alle Bundesländer beigetreten sind. Die Entscheidung über die Einlagerung bestimmter Ressourcen liegt beim Fachbeirat Tiergenetischer Ressourcen, formal ein Ausschuss der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde, in dem Wissenschaft, Bund und Länder vertreten sind. Obwohl die Honigbiene nicht unter den ursprünglich benannten Zielarten der Genbank ist, wurde ihre Aufnahme vom Fachbeirat befürwortet.

Zweck der nationalen Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere ist die Sammlung von genetischen Ressourcen bedrohter, in Deutschland einheimischer „Rassen“. Der Begriff der Rasse ist im imkerlichen Sprachgebrauch zwar üblich, da die im züchterischen Sinn als Einheiten aufgefassten Populationen aber in ihrer Mehrzahl auf natürlich entstandene geografisch orientierte Unterarten zurückgehen und mit diesen namensidentisch sind, wird im Folgenden von Unterarten gesprochen (Ruttner 2003). Was im Sinne der Bund-Länder-Vereinbarung zur Genbank als „einheimisch“ zu gelten hat, ist für die Honigbiene nicht genau geregelt. Paragraph 3 des Tierzuchtgesetzes, das nur für die wichtigsten Nutztier-Vertebraten gilt, bezeichnet als „einheimisch“ solche Rassen, die entweder erstmals oder ausschließlich in Deutschland gezüchtet werden, oder für die seit mindestens 1949 aufgrund hier vorhandener Tierbestände ein Zuchtbuch geführt und ein eigenständiges Zuchtprogramm durchgeführt wird. Wenn man diese Kriterien auf die Biene anwendet, treffen sie auf die Unterarten *A. m. mellifera* und *A. m. carnica* zu. Alle anderen Unterarten werden/wurden in Deutschland höchstens sporadisch gezüchtet. Die aus Hybridzucht hervorgegangene „Buckfast“-Biene wird zwar intensiv auch von inländischen Züchtern bearbeitet, wurde aber erst deutlich nach 1949 aus Großbritannien übernommen (Adam 1982).

3.2 Die „dunkle“ Biene, *A. m. mellifera*

In Deutschland autochthon ist ausschließlich die Unterart *A. m. mellifera* („Dunkle“ oder gelegentlich auch „Deutsche“ Biene), deren Verbreitungsgebiet ursprünglich von Südfrankreich über West- und Teile Zentraleuropas sowie Teile von Skandinavien bis nach Russland hinein reichte (Ruttner 1988). Obwohl dies von heutigen Züchtern der dunklen Biene gelegentlich behauptet wird, ist *A. m. mellifera* in sich keineswegs „genetisch homogen“. Zwar ist die Diversität bestimmter molekularer Marker aufgrund der für die meisten Gebiete relativ kurz zurückliegenden Ausbreitung (nach der letzten Eiszeit) innerhalb von *A. m. mellifera* im Vergleich zu anderen Unterarten gering (Garnery *et al.* 1998; Soland-Reckeweg *et al.* 2009). Entsprechend dem riesigen Verbreitungsareal bestehen aber zahlreiche distinkte Ökotypen mit stark differenzierter lokaler Anpassung. So sind auch innerhalb des deutschsprachigen Raums mehrere Zucht- und/oder Ökotypen historisch belegt (z.B. die — zeitweise als eigene Unterart geführte — „Heidebiene“ und die „Nigra“), die sich zum Teil auch morphologisch, vor allem aber in Verhalten, Brutverlauf und Trachtenanpassung stark unterscheiden/unterschieden (Ruttner 2003; Ludwig 1937).

Die Verdrängung der *A. m. mellifera* in der Imkerei und Bienenzucht geschah verstärkt ab den 1930er Jahren, insbesondere zugunsten der Kärntner Biene (*A. m. carnica*) (Maul & Hähnle 1994). Ein häufig gegen die dunkle Biene gebrauchtes Argument war die weniger effiziente Nutzung von frühblühenden Massentrachten (z.B. Raps) und ihr nach damaliger Einschätzung

stärker ausgeprägtes Abwehrverhalten. Zeitweise wurde ihre Verdrängung durch Imkerverbände und öffentliche Stellen stark gefördert. Dabei spielte die Paarungsbiologie der Honigbiene eine große Rolle — da Reinpaarungen in der Regel nur möglich sind, wenn alle Völker eines großen Gebiets der gewünschten Genetik entsprechen, wurde z. T. erheblicher Druck auf die verbliebenen *Mellifera*-Halter ausgeübt. Dennoch ließ sich der genetische Einfluss der *A. m. mellifera* in Teilen der deutschen Bienenpopulation noch 1991 deutlich nachweisen (Reinsch *et al.* 1991). Reine Populationen, die sich direkt auf bei uns autochthone Bienen zurückführen ließen, existieren heute allerdings mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nicht mehr. Die in jüngerer Zeit wieder auflebende Zucht der dunklen Biene in Deutschland stützt sich deshalb auf eingeführte Zuchttiere der Unterart aus anderen Teilen ihres Verbreitungsgebietes, vor allem aus der Schweiz, Belgien, Dänemark und Norwegen. Derzeit sind schätzungsweise weniger als 1 % der in Deutschland gehaltenen Bienenvölker dieser Unterart zuzuordnen. Auch in vielen anderen Teilen ihres Verbreitungsgebietes ist die dunkle Biene durch Introgression importierter Bienen stark bedroht. Außerhalb Deutschlands existieren mehrere Schutzgebiete, die jedoch alle durch ungeplante Hybridisierung und/oder Inzucht-Probleme in unterschiedlichem Maß betroffen sind (Soland-Reckeweg 2006; Jensen & Pedersen 2005; Soland-Reckeweg *et al.* 2009; Jensen *et al.* 2005; Pinto *et al.* 2014). Mehrere Vereine bemühen sich um den Erhalt der dunklen Biene in Deutschland (s. z.B. www.dunkle-biene.com; www.dunklebiehen.de) und bieten sich somit als Partner bei der Auswahl genetischer Ressourcen dieser Unterart an.

Wie ähnlich die heute von *Mellifera*-Züchtern gehaltenen Bienen den ursprünglich in Deutschland verbreiteten Typen von *A. m. mellifera* sind, ist bislang schlecht untersucht. Reste der norddeutschen Heide-Biene finden sich möglicherweise in skandinavischen Populationen, da über viele Jahrzehnte intensiv Heideschwärme in bestimmte Gebiete Skandinaviens exportiert wurden (Ludwig 1937). Für die Identifizierung von rezenten *Mellifera*-Herkünften, die den ursprünglich bei uns verbreiteten ähneln, kann die geographische Nachbarschaft eine erste Orientierung liefern. Da der deutschsprachige Raum wohl zu Recht als Ursprungsgebiet der systematischen Bienenzucht gelten darf, ist über die ursprünglich in diesem Gebiet vorhandenen Bienen zudem ein sehr umfangreiches Schrifttum überliefert, das selbst lokale Anpassungen sowie Zeitraum und Umfang von Einkreuzungen/Exporten teilweise nachvollziehen lässt. Schließlich existieren auch — leider wenig umfassende — historische Bienensammlungen, die zumindest einen morphologischen Abgleich in Teilen ermöglichen.

Im Vergleich zu anderen heute in Deutschland gezüchteten Bienen gilt *A. m. mellifera* als widerstandsfähiger gegenüber Wetterextremen und geringem Trachtangebot (Ruttner 2003), Eigenschaften, die heute im Hinblick auf den Klimawandel von erneuerter Relevanz sein könnten. Da Deutschland zum natürlichen Ausbreitungsgebiet dieser Biene zählt, ist davon auszugehen, dass sie wertvolle genetische Anpassungen an unser Klima und die heimische Vegetation bietet. Der Grad der lokalen Anpassung beeinflusst bei der Honigbiene nachweislich die Vitalität, insbesondere auch in Bezug auf die Widerstandsfähigkeit gegenüber Krankheiten wie der Varroose (Meixner *et al.* 2015; Büchler *et al.* 2014), die in Deutschland als Hauptursache für Völkerverluste gilt (Genersch *et al.* 2010). Die dunkle Biene ist auch eine der Ursprungs-Unterarten der vor allem von Berufsimkern geschätzten „Buckfast-Biene“. Da die Buckfast auch zukünftig auf Einkreuzungen angewiesen sein wird, bedeutet der Schutz der verbliebenen *Mellifera*-Populationen auch einen Beitrag zur Nachhaltigkeit der Buckfast-Zucht.

3.3 Die Krainer oder Kärntner Biene, *A. m. carnica*

Die ursprünglich nur in Teilen Zentral- und Südost-Europas verbreitete *A. m. carnica* wird bereits seit dem 19. Jahrhundert in Deutschland gehalten. Gründe ihrer Beliebtheit lagen/liegen in der raschen Frühjahrsentwicklung der Völker, die dem Wandel der Fruchtfolgen in der Landwirtschaft entgegenkamen. Weiterhin wurde die Friedfertigkeit der Carnica im Vergleich zur „Landbiene“ in Deutschland als höher eingeschätzt. Es wird darüber gestritten, ob dies wirklich auf den Eigenschaften der Unterarten beruhte oder darin begründet war, dass die aus Österreich importierten Carnica-Stämme bereits intensiv vorselektiert waren, wohingegen die in der so genannten „Landrasse“ aufgegangenen Reste der Dunklen Biene durch jahrzehntelange unkontrollierte Einkreuzungen sehr heterogene Merkmale zeigten. Der Ursprung der Zucht der Carnica in Deutschland liegt eindeutig vor dem für die Anwendung des Begriffes „einheimisch“ möglicherweise relevanten Zeitpunkt 1949. Goetze bezeichnet die Carnica bereits 1939 als „zweite Hauptrasse der deutschen Zuchtbestrebungen“ (Goetze 1937), erste Carnica-Belegstellen gab es spätestens seit 1926, und sogar die aktuelle Carnica-Zuchtdatenbank in Deutschland (www.beebreed.de) führt als ältesten Eintrag eine Königin des Jahrgangs 1947. Im Jahr 2016 waren im Deutschen Imkerbund 318 Carnica-Reinzüchter organisiert. Dabei hat die intensive Zuchtarbeit in Deutschland zur Selektion distinkter Unterpopulationen geführt, die international z.T. hohes Ansehen genießen. Gegenwärtig sind nach Schätzungen mehr als 70% der in Deutschland gehaltenen ca. 820.000 Bienenvölker ganz oder überwiegend dieser Unterart zuzuordnen. Damit ist *A. m. carnica* bei uns eindeutig keine gefährdete Rasse. Gefährdet ist aber die genetische Vielfalt innerhalb der deutschen Carnica-Population, da beinahe die gesamte Zucht dieser Unterart in Deutschland historisch bedingt auf Importe aus einem geographisch eng umgrenzten Gebiet in Österreich zurückgeht, und dabei wiederum überwiegend auf wenige „Reinzuchtlinien“ (v.a. Peschetz, Troiseck, Sklenar). Der mittlere Inzucht-Koeffizient der in der Datenbank beebeed.eu referenzierten Zuchtpopulation stieg in den letzten 20 Jahren langsam, aber kontinuierlich an (Berechnungen aufgrund der Eintragungen in der Zuchtdatenbank). Inzucht hat bei der Honigbiene einen besonders starken Einfluss auf Leistungsmerkmale (Bienefeld *et al.* 1989). Zwar gibt es derzeit noch keine Anzeichen für negative Auswirkungen verringerter genetischer Variabilität auf die deutsche Carnica-Population als Ganzes (Bienefeld 2016); das Beispiel der nordamerikanischen Honigbienen-Populationen zeigt aber, dass solche Effekte durchaus auch in sehr individuenstarken Populationen auftreten (Oldroyd 2007) und zu schwerwiegenden ökonomischen Konsequenzen führen könnten.

- viele der in jahrzehntelanger Zucht erzeugten deutschen Carnica-Zuchten aufgrund der geringen Größe vieler Zuchtbetriebe auf z.T. extrem niedrigen Völkerzahlen beruhen. Diese Entwicklung ist nicht nachhaltig und ist zurzeit Anlass für Simulationsstudien über sehr lange Zeiträume im LIB (Plate *et al.*; DGFZ Tagung Stuttgart). Auch in der Folge von Todesfällen unter den Züchtern sind zahlreiche Linien bereits verloren gegangen, was Zuchterfolge zunichtemacht und der Gesamtvariabilität der Population schadet.
- Die außerhalb Deutschlands gelegenen Hotspots natürlicher Biodiversität innerhalb der Carnica z.T. stark von Introgression bedroht oder bereits betroffen sind (Péntek-Zakar *et al.* 2015; Susnik *et al.* 2004; Munoz *et al.* 2009). Diese bilden eine wichtige Rückversicherung der deutschen Carnica-Zucht und könnten als genetisches Reservoir für züchterische Anpassungen an zukünftige Herausforderungen eine bedeutende Rolle spielen.

3.4 Kryokonservierung von Drohnensperma

Die Lagerung von männlichen Honigbienen-Gameten wird schon seit Jahrzehnten erforscht. Schon in einer ersten Phase (etwa 1976 – 1984) gelang es, Methoden zu entwickeln, die den Erhalt der Lebensfähigkeit eines großen Teils der Spermien nach dem Auftauen ermöglichten (Melnichenko *et al.* 1975; Harbo 1979; Harbo 1977; Harbo 1983; Kaftanoglu & Peng 1984). Nach der Besamung mit solchem Sperma verlief die Einwanderung in die Spermatheka (Samenblase) der Königin jedoch häufig unbefriedigend, und die Fruchtbarkeit des Spermas – ablesbar am Anteil weiblicher, also aus Befruchtungen hervorgegangener, Puppen im Brutnest – war für eine zuverlässige Regeneration der eingefrorenen Haplotypen noch unzureichend (Harbo 1983; Wang *et al.* 2010; Harbo 1981). Das zunehmende (Wegener *et al.* 2012) Interesse an Methoden zum Biobanking genetischer Ressourcen führte ab ca. 2008 zu einer Wiederaufnahme der Forschungen. Vor allem durch Zusatz großer Mengen an Hühner-Eigelb zum Einfriermedium gelang es amerikanischen Kollegen, ein auf dem klassischen Ansatz des „slow freezing“ beruhendes, verbessertes Protokoll zu entwickeln. Königinnen, die mit so konserviertem Sperma besamt werden, erzeugen recht zuverlässig einen Anteil von im Mittel rund 50% weiblicher Brut, aus der sich wieder Jungköniginnen ziehen lassen. Diese sind dann mit der Königin, die die verwendeten Drohnen lieferte, mit einem Koeffizienten von 0,5 verwandt, so dass die konservierten Erbanlagen züchterisch weiterverwendet werden können (Hopkins *et al.* 2012; Hopkins *et al.* 2010). Parallel wurde am LIB in Zusammenarbeit mit einem Industriepartner (AMP-Lab GmbH) ein anderes Kryoprotokoll entwickelt, bei dem das erforderliche Gefrierschutzmittel dem Sperma durch Dialyse zugesetzt wird. Dadurch muss das Sperma nicht verdünnt werden, und die in nativem Sperma vorliegenden dichten Spermien-Cluster bleiben teilweise erhalten. So wird die vorzeitige Aktivierung des Spermas durch den Einfrier/Auftau-Prozess vermindert, so dass die Anzahl der nach Besamung in die Spermatheka einwandernden Spermien gegenüber früheren Methoden stark erhöht werden konnte (Wegener *et al.* 2014a).

Ein Vergleich einer leicht abgewandelten Form des LIB-Protokolls mit demjenigen der amerikanischen Kollegen, durchgeführt in deren Labor, ergab keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Anteil lebender Spermien, die Anzahl Spermien in der Spermatheka, oder den Anteil weiblicher Brut in der Nachkommenschaft (Gül *et al.* 2017). Allerdings scheint die Zeitdauer, während der besamte Königinnen befruchtete Eier erzeugen, mit dem LIB-Protokoll wesentlich höher zu sein, denn solche Königinnen konnten wiederholt überwintert werden, wo hingegen die mit nach amerikanischem Protokoll konservierten Spermien besamten Königinnen nach wenigen Monaten starben (Wegener *et al.* 2014a; Hopkins *et al.* 2012). Ein weiterer Vorteil des LIB-Protokolls ist, dass es ohne Eigelb auskommt. Die Verwendung von Eigelb wird aufgrund seiner variablen Zusammensetzung und des Risikos von bakteriellen oder viralen Kontaminationen für Biobanking-Zwecke möglichst vermieden (Aires *et al.* 2003; Forouzanfar 2010). Außerdem gibt es nur für das LIB-Protokoll systematisch erhobene Daten zu möglichen unerwünschten Nebenwirkungen der Kryokonservierung. Danach zeigen morphometrische Messungen an Arbeitsbienen, die von Kryo-Sperma abstammen, keine Hinweise auf Entwicklungsstörungen. Die Häufigkeit von DNA-Strangbrüchen ist in Zellkernen kryokonservierter Spermien zwar minimal erhöht, jedoch scheint diese Erhöhung vernachlässigbar im Vergleich zu natürlichen Schwankungen dieses Parameters zwischen Spermaproben verschiedener Herkunft (Wegener *et al.* 2014).

Schutzrechte, die der Anwendung der beschriebenen Verfahren im Rahmen des Projektes im Wege stünden, bestehen nicht.

Effiziente Methoden zur Konservierung von Honigbienen-Embryonen existieren derzeit nicht, obwohl durchaus Versuche dazu durchgeführt wurden (Collins & Mazur 2006; Collins 2002) und werden. Die Lagerung von weiblichen Gameten im befruchtungsfähigen Stadium wurde bislang nicht versucht, wohl da diese im Vergleich zu Embryonen schwer zu beschaffen sind und zudem keine zuverlässigen Methoden zu einer späteren Fertilisation existieren.

Eine erste Sammlung kryokonservierten Drohnenspermas beinhaltet die nationale Genreserve der USA. Nach Auskunft eines der Mitinitiatoren dieser Sammlung, Prof. W. S. Sheppard (Washington State University), beinhaltet diese auch eine Auswahl an Proben verschiedener Populationen von *A. m. carnica* und *A. m. mellifera*. Der Zweck dieser Sammlung liegt dabei aber nicht im Erhalt von ursprünglichen Populationen im Herkunftsgebiet, sondern vor allem in der Auffrischung der durch jahrzehntelange genetische Isolation und Inzucht geschwächten amerikanischen Zuchtpopulationen (Wegener *et al.* 2014).

Auch die nationale Genbank Sloweniens beinhaltet in sehr begrenztem Umfang Honigbienen-Ressourcen, allerdings bislang weder Embryonen noch Gameten. Das slowenische Landwirtschaftsinstitut plant für 2018 den Beginn der Anlage von Spermareserven, wofür slowenische Kollegen am LIB geschult wurden.

Experten des LLH waren und sind wesentlich an der Charakterisierung der Innerartlichen Diversität von *Apis mellifera* beteiligt (Uzunov *et al.* 2014; Delaney *et al.* 2009; Zammit-Mangion *et al.* 2017), und zwar auch im Hinblick auf die für das Projekt wesentlichen Unterarten *A. m. mellifera* und *A. m. carnica* (Nedić *et al.* 2014; Meixner *et al.* 2007). Sie waren und sind auch maßgeblich an der Entwicklung von Methoden zur molekulargenetischen und morphometrischen Charakterisierung und Diagnose von Bienenpopulationen beteiligt (Meixner *et al.* 2013; Momeni *et al.* 2021), und sind damit qualifiziert, diese Arbeiten im Rahmen des vorliegenden Projekts durchzuführen. Die Charakterisierung von Interaktionen zwischen Genotyp und Umwelt, die für die Beurteilung des Anpassungswerts und damit für die Auswahl der einzulagernden Ressourcen eine Rolle spielen wird, bildet einen weiteren Forschungs-Schwerpunkt am LLH (Meixner *et al.* 2015). Schließlich beteiligt sich der LLH auch intensiv an Programmen zum *in situ*-Erhalt lokal angepasster Bienenpopulationen in Europa, etwa durch Einrichtung und Betreuung von Zuchtprogrammen vor Ort (Uzunov *et al.* 2017). Damit sind optimale Voraussetzungen für eine enge Verzahnung von *in situ*- und *ex situ*-Erhaltung gegeben.

Am LIB wurden unter anderem im Rahmen eines BLE/BMEL-geförderten Innovationsprojekts Methoden zur Kryokonservierung von Drohnensperma entwickelt und getestet (Wegener *et al.* 2017; Wegener *et al.* 2014). Weiterhin wurden Verfahren zur Qualitätskontrolle von Drohnensperma verbessert und validiert (Wegener *et al.* 2012), die Giftigkeit von Kryoprotektiva für Sperma und Königin untersucht (Wegener & Bienefeld 2012a), und Methoden zur Entfernung von Kryoprotektiva nach dem Auftauen optimiert (Wegener *et al.* 2014; Wegener *et al.* 2014a). Damit ist das Institut weltweit mit führend bei der Kryokonservierung von Honigbienen-Ressourcen. Wie der LLH ist das LIB zudem intensiv an der *in situ*-Erhaltung europäischer Bienen beteiligt und koordinierte das bislang europaweit größte Forschungsprojekt zu diesem Thema (www.smartbees-fp7.eu).

3.5 Rahmenbedingungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde

Erfolg und Nutzen von Kryoreserven hängen von der Zusammenarbeit und dem guten Willen vieler Akteure ab. Um die Möglichkeiten zu einer internationalen Kooperation bei der Anlage

von *ex situ*-Reserven für den Bienensektor auszuloten, fand im Frühjahr 2017 ein Treffen mit Vertretern der internationalen Bienenzüchter-Vereinigung APIMONDIA, der FAO, der BLE sowie von LIB und LLH statt. Anwesend waren auch mehrere interessierte Vertreter anderer Forschungseinrichtungen, darunter Prof. W. S. Sheppard, der maßgeblich an der Einrichtung der Honigbienen-Kryobank in den USA beteiligt war. Die APIMONDIA unterstützt die Einrichtung von Honigbienen-Reserven nachdrücklich. Das für Tiergenetische Ressourcen zuständige Büro der FAO (Frau Dr. Baumung) hat uns bezüglich Access- and Benefit Sharing und Dokumentation der Proben beraten. Der Deutschen Imkerbund (D.I.B.) wurde intensiv in den Auswahlprozess der zu beprobenden Herkünfte einbezogen. Beratungen im Vorfeld des Projektes mit Frau Dr. Henning vom Friedrich-Loeffler-Institut in Mariensee und des Fachbeirats Tiergenetische Ressourcen haben die Probenauswahl und die Eingliederung in die nationale Genbank vorbereitet. In die Probenauswahl wurden auch internationale Kooperationspartner einbezogen, die in ihren Ländern mit der Pflege endemischer Populationen von *A. m. mellifera* oder *A. m. carnica* befasst sind, so etwa Vertretern der österreichischen und slowenischen Carnica-Zucht, sowie der Mellifera-Zucht in der Schweiz und Norwegen. In Slowenien und Norwegen besteht zudem ein eigenes Interesse an der Einlagerung von Kryoreserven der lokalen Bienen, so dass gute Voraussetzungen zu einer Zusammenarbeit gegeben waren.

4. Arbeitsverlauf

4.1 Festlegung der Regeln zum Access and Benefit Sharing

Im Rahmen des Projektes wurde ein Konzept zum „Access and Benefit Sharing“ für die einzulagernden Ressourcen erstellt. Hierbei sollte sich auf die im Zuge der Umsetzung des Nagoya-Protokolls geschaffenen Muster-Vereinbarungen zwischen Urhebern und Nutzern genetischer Ressourcen gestützt werden. Wir haben deshalb die Animal Genetic Resources-Abteilung der Vereinten Nationen (Frau Dr. Baumung) kontaktiert. Es existieren jedoch zu diesem Zeitpunkt offenbar noch keine Muster-Vereinbarungen zum Access and Benefit Sharing basierend auf dem Nagoya-Protokoll. Bis auf Slowenien, das nicht Unterzeichner des Nagoya-Abkommens ist, wurden bisher die „National Focal Points“ aller zu beprobenden Länder kontaktiert: Niederlande, Schweiz, Österreich, Norwegen, Schweden, Belgien. Mit Ausnahme der Schweiz haben alle diese Länder bestimmt, dass ihre genetischen Ressourcen allgemein zugänglich sein sollen. Damit entfällt für uns die Notwendigkeit, eine gesonderte Genehmigung einzuholen. In der Schweiz gibt es eine Meldepflicht ausschließlich für die Ausfuhr genetischer Ressourcen. Eine Bewilligung wird nicht benötigt. Es werden jedoch Verträge mit allen Züchtern geschlossen werden, die genetisches Material liefern. Weiterhin ist geplant, die genetischen Ressourcen gegen eine finanzielle Beteiligung auch in die jeweiligen ausländischen Genbanken zu integrieren (soweit vorhanden). In diesem Fall wird ebenfalls ein Vertrag über die Handhabung und Eigentümerschaft der Proben geschlossen werden. Im Fall der Niederlande, Österreichs, Sloweniens und Norwegens besteht hieran ein erklärtes Interesse seitens der kontaktierten Stellen. Die entsprechenden Vereinbarungen sind derzeit in Bearbeitung und werden je nach Land in die jeweilige Sprache übersetzt werden. Auf Schweizer Seite herrscht noch Uneinigkeit über die Frage einer Spiegelung von Ressourcen im Herkunftsland.

4.2 Bildung und Arbeit des Auswahlgremiums

Vom 05.04 bis 07.04.2019 fand in Wenden die Züchtertagung des Deutschen Imkerbundes (DIB) statt. Auf der Tagung haben sich Vertreter des DIBs, des Zuchtverbandes Dunkle Biene Deutschland, des Landesbetriebs Landwirtschaft Hessen (LLH), der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) und des Länderinstituts für Bienenkunde Hohen Neuendorf (LIB) zusammengefunden und ein Auswahlgremium der Ressourcen für die Genbank Honigbiene beschlossen. Die Mitglieder des Auswahlgremiums weisen Expertise über die Züchter ihrer regionalen Zuständigkeitsbereiche auf. Von allen anwesenden Personen wurde ein Übereinkommen unterzeichnet, welches der Genbank als Vorschlag für die Vorgehensweise der Ressourcenauswahl übermittelt wurde. Diesem Vorgehen wurde zugestimmt. Das Auswahlgremium besteht aus Herrn Tiesler, Herrn Famulla, Herrn Günthner und Herrn Götze. Herr Götze sollte die Auswahl in Sachsen-Anhalt, Thüringen, Sachsen, Brandenburg, Berlin und Mecklenburg-Vorpommern vornehmen. Da Herr Götze aber auf Grund seiner Spezialisierung auf Bienen der Sklenar-Linie einen Überblick über die Sklenar-Züchter aufweist, jedoch nicht über alle Züchter in Ostdeutschland, wurden in Absprache mit den Beteiligten nachträglich drei weitere Züchter für die Auswahl in Ostdeutschland bestimmt: Herr Hohmuth (Sachsen), Herr Stoß (Thüringen), Herr Biermann (Mecklenburg-Vorpommern) (Abschnitt 8.16). Die Auswahl der Züchter wurde im Vorfeld der jeweiligen Sammeltouren geplant, siehe Abschnitt 8.15.

Um das Auswahlgremium bei seiner Entscheidung zu unterstützen und eine breite genetische Abdeckung zu erreichen, wurde aus den Verwandtschaftsdaten der Züchter-Datenbank

BeeBreed eine Analyse der eingetragenen Königinnen erstellt. Hierbei kam uns zugute, dass diese Datenbank am LIB geführt wird. Es wurden alle verfügbaren Königinnen in Verwandtschaftscluster unterteilt. Diese Analyse wurde für die deutsche und österreichische *A. m. carnica* Population sowie die schweizerische *A. m. mellifera* Population erstellt. Für *A. m. carnica* ergaben sich 44 Verwandtschaftscluster. Die Liste führt zu jedem Cluster Beispiel-Züchter auf und wurde den Mitgliedern des Gremiums zur Verfügung gestellt. Sie erhielten eine speziell für ihren Zuständigkeitsbereich gefilterte Version. Die Gremiumsmitglieder sollten den Dringlichkeitsgrad der Einlagerung des Materials dieser Züchter anhand der in Wenden vereinbarten Kriterien bewerten und an das LIB weiterleiten. Es wurde stets betont, dass Bienenzüchter, die nicht in der Cluster-Analyse enthalten sind, aber interessantes Zuchtienen-Material aufweisen, ebenfalls vorgeschlagen werden können. Es sollten jedoch möglichst viele der Verwandtschaftscluster abgedeckt werden.

Die Auswahl der ausländischen Ressourcen wurde im Falle der *A. m. carnica* im Plenum des Auswahlgremiums besprochen. Danach ist eine Probennahme in Österreich und Slowenien vorgesehen. Im Fall von *A. m. mellifera* fanden später weitere Gespräche mit Herrn Ullrich statt. Beschlossen wurde, eine Beprobung der Populationen in Norwegen, den Niederlanden (Texel), Belgien, Schweden, der Schweiz und Österreich anzustreben (Abbildung 1). Die schwedischen Ressourcen werden, nach Absprache mit Herrn Ullrich, von ausgewählten deutschen *A. m. mellifera* Züchtern mit schwedischem Material gesammelt.

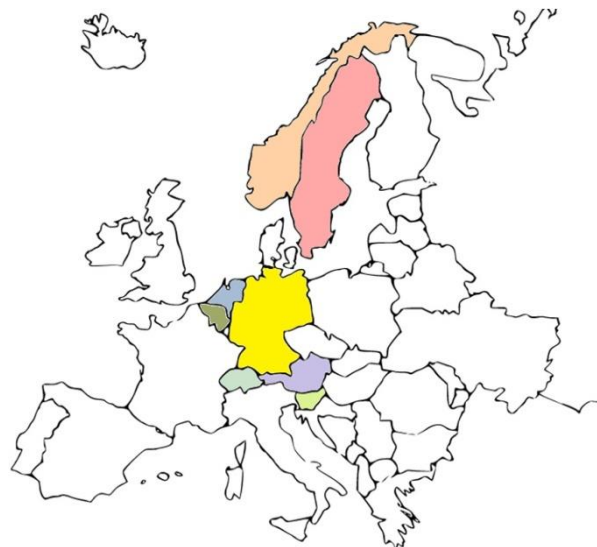


Abbildung 1: Auswahl der einzulagernden genetischen Ressourcen.

4.3 Einholung des Einverständnisses von Materialspendern und Behörden

Die Einholung des Einverständnisses der innerdeutschen Spender von Drohnenwaben erfolgte in Form eines entsprechenden Formulars. Zusätzlich wurden insgesamt ca. 24 Königinnen aus Norwegen und Slowenien eingeführt, von denen im Folgejahr am LIB Drohnen gewonnen werden sollen. Dabei haben wir die im Zuge des Nagoya-Protokolls einzuhaltenden Regularien berücksichtigt. Die Transporte wurden in Kooperation mit den lokal zuständigen Institutionen durchgeführt (Norwegen: Norges Birøkterlag, Prof. B. Dahle; Slowenien: Kmitijski Institut Slovenije, Dr. J. Presern). Dabei wurde auf die beabsichtigte Verwendung für die Kryobank hingewiesen. Zudem wurde entsprechend der Projektplanung eine Erzeugung

zusätzlicher Kryo-Proben von diesen Herkünften vereinbart, die in die Herkunftsländer zur dortigen Lagerung überführt werden.

4.4 Festlegung des Protokolls für morphometrische Analysen

Die morphometrische Analyse der Proben erfolgt nach der sogenannten „Standardmorphometrie“, die ein in der Bientaxonomie etabliertes und anerkanntes Verfahren darstellt (Ruttner 1988, Meixner *et al.* 2013). Messungen an ca. 38 morphologischen Merkmalen von mehreren (bis zu 10) Arbeiterinnen einer Probe werden mithilfe eines digitalen Mikroskops und spezieller Software durchgeführt. Durch die Merkmale werden die Kategorien Körpergröße, Pigmentierung, Behaarung und Flügelgeäder abgebildet. Die Mittelwerte der Arbeiterinnen gehen als repräsentatives Abbild des Bienenvolks in multivariate statistische Analysen, vor allem Hauptkomponentenanalyse und Diskriminanzanalyse, ein. Über in die Analysen einbezogene publizierte und anerkannte Referenzdaten aus der Datenbank des Instituts für Bienenkunde in Oberursel werden die Proben den Unterarten *A. m. carnica* oder *A. m. mellifera* zugeordnet.

4.5 Erarbeitungen von Routinen zur Genotypisierung

Die taxonomische Unterartenbestimmung der Proben erfolgt mit Hilfe eines SNP-Chips, der aus repräsentativen Referenzgenomen zahlreicher europäischer Bienenpopulationen entwickelt wurde (Momeni *et al.* 2021) und eine unmittelbare Diagnose der relevanten Unterarten erlaubt. Diese Genotypisierung wurde nach Rücksprache mit den Projektpartnern vom Dienstleister Eurofins anhand eines Pools von DNA aus Drohnenköpfen durchgeführt. Dabei wurden Drohnen verwendet, deren Sperma tatsächlich für die Erzeugung der Spermareserven genutzt wurde. So ist sichergestellt, dass das Ergebnis der Analyse das eingelagerte Material optimal abbildet. Für jede zu genotypisierende Probe wurden beide Antennen von mehreren (mindestens 6) Drohnen in eine Allflex Tissue Sampling Unit (TSU) verbracht, dokumentiert und zum Dienstleister Eurofins nach Dänemark geschickt. Die TSUs sowie die notwendige Gewebebezüge wurden von Eurofins zur Verfügung gestellt. Da ein Genotypisierungslauf 96 Proben enthält, wurde das Material zunächst in Kirchhain gesammelt, bis genügend Proben für die jeweiligen Läufe zusammengekommen waren.

4.6 Erarbeitung von Standards zur Probenverpackung und Portionierung

Dieser Schritt erfolgte in Absprache mit Frau Dr. Henning vom Friedrich-Loeffler-Institut, die dort unter anderem mit der technischen Implementierung der Deutschen Genbank Landwirtschaftlicher Nutztiere betraut ist. Beraten wurden wir außerdem von Herstellern von Verpackungssystemen für Kryoproben. Es stellte sich unter anderem die Frage, ob Probengefäße anhand von 2D-Codes markiert und damit automatisiert erkennbar sein sollten. In der Deutschen Genbank ist ein solches System derzeit noch nicht implementiert, über eine Einführung wird aber nachgedacht. Für die Erkennung und Verarbeitung der Codes gibt es verschiedene Systeme. Da wir durch unsere Wahl keine Vorfestlegung für die Genbank treffen konnten, haben wir einen Mittelweg gewählt. Die von uns verwendeten Kryogegefäße sind - bis auf die Straws, bei denen dies nicht möglich ist – mit 2D-Codes versehen. Wir haben diese dokumentiert und in einer Tabelle mit den in Klarschrift auf den Proben angebrachten Nummern verknüpft. Da die Codes selbst genormt sind, können diese Daten dann später nach dem dort zu etablierenden System in die Datenbank der deutschen Genbank eingepflegt werden.

4.7 Dokumentation der Begleitinformationen und Protokolle zur Durchführung der Kryokonservierung

Im Zuge des Projektverlaufs wurden diverse Erfassungsbögen zur Dokumentation von Begleitinformationen der beprobten Herkünfte erstellt. Die Aufnahme von Begleitinformationen beginnt mit der Dokumentation des Einsetzens des Drohnenbaurahmens in das ausgewählte Volk. Die Züchter dokumentieren den Zeitpunkt des Einsetzens und die Zuchtbuchnummer des jeweiligen Volkes. Weiterhin werden die Informationen der Züchter und Zusatzinformationen der Völker erfragt (Abschnitt 8.11).

Weiterhin wurden ein Protokoll und ein Erfassungsbogen für den Prozess der Kryokonservierung erstellt (Abschnitt 8.12). Das Protokoll beschreibt im Detail welche Proben entnommen werden, wie die Proben gesammelt werden sowie den Prozess der Spermaabnahme und Kryokonservierung. Weiterhin wird der Vorgang der Qualitätskontrolle des Drohnenspermas erläutert. Im Erfassungsbogen werden Informationen zur Spermaabnahme, Kryokonservierung und Spermaqualität vor und nach der Kryokonservierung festgehalten. Alle Daten werden in einer Excel-Tabelle erfasst und dokumentiert.

4.8 Probenentnahme und Drohnenaufzucht

Die Entnahme der Proben geschah entweder durch die Projektbeteiligten (LIB- Herkünfte) oder durch Helfer (Züchter der Herkünfte). Entnommen werden pro zu beprobendes Volk:

- 5-10 junge Arbeitsbienen im Versandkäfig (lebend; bei Ankunft am LIB umverpackt in 2mL Cryotube
- 20 junge Arbeitsbienen für Morphometrie und Genotypisierung
- Eine ganze bis eine halbe vorzugsweise verdeckelte Drohnenwabe. Falls das Rähmchenmaß nicht „deutsch normal“ ist, muss die Wabe umgeschnitten werden.

Alle Züchter mussten eine Kopie der Seuchenfreiheitsbescheinigung zur Verfügung stellen. Die Kopie wurde im LIB archiviert. Weiterhin wurden die auszufüllenden Dokumente wieder eingesammelt. Das Dokument „Überlassungsvertrag“ wurde vom Besitzer des Materials und dem Vertreter des Instituts (LIB/LLH) unterzeichnet. Beide Parteien erhalten ein Exemplar zur Archivierung. Der Transport der Drohnenwabe erfolgte in einem mitgeführten Bienenvolk (zweiräumig, weiselrichtig, mit Gitterdeckel; vorzugsweise in der oberen Zarge).

Die Aufzucht erfolgte auf einem Stand abseits des LIB-Geländes in weisellosen, Drohnen- und Drohnenbrut-freien Ablegern. Diese wurden standardmäßig mit zwei verdeckelten Brutwaben und den ansitzenden sowie ca. 400 g weiteren Bienen, einer Futterwabe und einer Pollenwabe gebildet. Die Ablegerbeuten wurden mit Absperrgitter-Böden versehen und hatten ansonsten kein Flugloch, sodass die Drohnen während der Reifung kein Licht sahen. Nach der Bildung wurde das Aufzuchtvolk mit einer unbegatteten Königin im Iltis-Käfig versehen. Die Völker wurden während der Aufzucht mindestens einmal wöchentlich kontrolliert. Zugaben/Entnahmen von Drohnenmaterial sowie imkerliche Arbeitsschritte wurden in eigenen Stockkarten der Aufzuchtvölker dokumentiert.



Abbildung 2: Bienen und Drohnen (markiert) auf einer Wabe.

Im Projektjahr 2020 wurden fünf Sammeltouren durch Nordwestdeutschland, Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Sachsen/Thüringen und Bayern durchgeführt. Die Einschränkungen durch die COVID19-Pandemie beeinträchtigten die inländischen Brutsammel-Touren kaum, da eine Übergabe der Brut auch im Freien und praktisch ohne persönlichen Kontakt möglich war. Die ausländischen Sammeltouren mussten hingegen Pandemie-bedingt zurückgestellt werden. Stattdessen wurden ca. 35 Königinnen aus Norwegen und Slowenien verschickt, die freundlicherweise von Kollegen aus den Herkunftsländern per Flugzeug/Zug bis nach Deutschland gebracht wurden, um einen sicheren Transport zu gewährleisten.

Von den im Jahr 2020 beschafften norwegischen und slowenischen Königinnen konnten insgesamt 21 Probensätze generiert werden. Dabei wurden wie angekündigt doppelte Probensätze genommen und im Herbst 2021 jeweils ein Duplikat in die jeweiligen Ursprungsländer transportiert. Die Spermaproben wurden in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten „Dry Shipper“ und die zusätzlichen Probensätze (Arbeiterinnen, Drohnen und Drohnenköpfe) auf Trockeneis überführt. Somit besitzt die slowenische Genbank nun 18 kryokonservierte Spermaproben und die norwegische Genbank drei Spermaproben.



Abbildung 3: Anordnung der Ablegerbeuten.

Im Projektjahr 2021 wurden drei Sammeltouren in Südwestdeutschland, Hamburg und Österreich durchgeführt. Vereinzelt konnten uns auch Drohnenwaben direkt ans Institut geliefert werden. Hier wurde die Methodik des Postversands von Drohnenwaben, die in den Projektjahren 2019 und 2020 entwickelt und erprobt wurde, erfolgreich angewendet. Es wurden uns Drohnenwaben von insgesamt drei verschiedenen Herkünften zugeschickt und erfolgreich in die Genbank aufgenommen. Im Projektjahr 2021 wurden somit 95 Probensätze kryokonserviert und an die Genbank für Landwirtschaftliche Nutztiere übergeben.

Leider gingen jedoch die in Österreich gesammelten Brutwaben verloren. Trotz der Einholung von Gesundheitsnachweisen von allen Züchtern vor der Abholung der Brutwaben, wurden in den Transportvölkern nach Ankunft auf unserem Quarantäne-Stand Sporen der Bienenkrankheit Amerikanische Faulbrut nachgewiesen. Amerikanische Faulbrut ist in Deutschland eine anzeigepflichtige Tierseuche. Nach Rücksprache mit dem zuständigen Veterinäramt wurde die eingeführte Drohnenbrut deshalb mitsamt der für deren Pflege verwendeten Ableger und Transportvölker abgetötet und fachgerecht entsorgt, um eine weitere Verbreitung der Krankheit zu vermeiden. So gingen sechs österreichische Mellifera-Herkünfte und 13 österreichische Carnica-Herkünfte verloren. Insgesamt wurden 29 Bienenvölker vernichtet.

4.9 Spermaabnahme

Die Spermaabnahme erfolgte ausschließlich am LIB. Zum Zeitpunkt der Abnahme waren die Drohnen zwischen 20 und 35 Tage alt. Von jeder Herkunft wurden 150 μ L Sperma abgenommen. Hierbei wurde die Anzahl der benötigten Drohnen erfasst, auch derjenigen, die

kein Sperma gaben. Nach der Abnahme wurde das Sperma innerhalb von zwei Tagen nach Protokoll kryokonserviert.

4.10 Untersuchung auf Bienenviren

Die Untersuchung der gesammelten Proben auf die wichtigsten Bienenviren begann im März 2021. Dabei wurden Pools aus jeweils zehn Einzelproben auf die Viren Flügeldeformationsvirus (DWV), Akutes Bienen-Paralyse-Virus (ABPV) und Chronisches Bienen-Paralyse-Virus (CBPV) untersucht. Dabei war geplant, nur für Virus-positive Pools Einzeluntersuchungen der konstituierenden Spermaherkünfte durchzuführen. Aus Spermaproben von 100 der gesammelten Herkünfte wurden somit 10 Pool-Proben generiert und auf die Viren getestet. Die Mehrheit der Pools wurde jedoch wider Erwarten positiv auf DWV und CBPV getestet. Für eine Einzeluntersuchung aller Proben aus positiven Pools reichten die bewilligten Ressourcen nicht aus. Somit wurden vorerst mit den übrigen Mitteln zur Virusuntersuchung 39 Einzelproben untersucht. Da die Dokumentation der Virusbelastung der eingelagerten Ressourcen jedoch unabdinglich ist, wurden im August 2021 weitere Mittel für die Virusuntersuchung jeder Probe beantragt und auch bewilligt. Die Untersuchungen der restlichen Proben fanden dann ab Februar 2022 statt.

4.11 Demonstration der praktischen Einbindung von Kryo-Proben in die Zuchtarbeit

Die Einbindung des kryokonservierten Spermas in die Zucht wurde bereits in den Projektjahren 2019 und 2020 erprobt. Das 2019 kryokonservierte Sperma wurde im Jahr 2020 am LIB zur Besamung von Jungköniginnen verwendet. Aus den Brutnestern der besamten Königinnen wurden dann Weiseln herangezogen, mit hochwertigem Zuchtsperma besamt und 2021 eingeweiselt. Die daraus entstandenen Völker wurden 2022 erfolgreich ausgewintert, womit die Ausübung einer Genreserve demonstriert wurde.

4.12 Einlagerung der Proben in die Deutsche Genbank Landwirtschaftlicher Nutztiere

Die 2021 erzeugten Proben wurden in zwei Chargen am 13. Juli und am 28. September 2021 in die Genbank aufgenommen. Die slowenischen Kopien wurden am 19. Oktober 2021 nach Slowenien geschickt und wurden dort erfolgreich in die Genbank eingelagert. Weiterhin wurden die norwegischen Kopien des kryokonservierten Spermas am 23. November nach Norwegen versandt.

5. Ergebnisse des Vorhabens

5.1 Drohnenversandversuche

Nicht alle Herkünfte konnten persönlich abgeholt werden. Um einen sicheren Versand zu gewährleisten, wurde ein Drohnenversandversuch durchgeführt, und weil das Ergebnis unbefriedigend verlaufen ist, wurde ein zweiter durchgeführt.

5.1.1 Erster Versandversuch

Der Postversand von Drohnenbrut wurde mit speziellen temperaturkontrollierten Versandboxen durchgeführt, im Folgenden mit ihrem Marktnamen „Benjamin“ benannt. Diese Boxen enthalten PCM-Elemente (phase-change-material) des Typs BC000206 va-Q-proof 16 standard +22G (16L). Die Materialeigenschaften dieser PCM-Elemente sorgen für eine Wärme- bzw. Kältespeicherung über einen langen Zeitraum (bis zu 96h). Der Temperaturverlauf in den Boxen wurde am LIB in Vorversuchen unter Bedingungen großer Wärme und Kälte getestet.

In einem weiteren Vorversuch wurde die Wabenintegrität bei einem Fall von verschiedenen Höhen getestet. Es wurden drei verschiedene Szenarien getestet. Der Fall der Transportbox aus 0,5 m Höhe, der Fall aus 1 m Höhe und der Fall aus 1 m Höhe auf die Seite. Die Drohnenbrutwaben haben bei diesen Fall-Tests keinen äußerlichen Schaden genommen.

Nach den Vorversuchen wurde ein Transport von Drohnenwaben via Post getestet. Verschiedene Institutsvölker wurden auf Drohnenbrut untersucht und dokumentiert. Es wurden 5 Waben für den Versuch ausgewählt. Zwei Waben dienten als Kontrolle und wurden nicht versandt. Drei Waben wurden für den Transportversuch ausgewählt. Die PCM-Elemente der drei Transportkisten wurden auf 30°C erwärmt und die drei Waben in jeweils einer Transportbox verstaut. Als Füllmaterial dienten Zellstoff und Zeitungspapier. Zwei der drei Transportboxen wurden via 24h-Express über die Firma DHL von Oranienburg und von Berlin aus ans LIB verschickt. Die dritte Transportbox wurde in demselben Zeitraum mit dem Auto über eine Strecke von 140 km transportiert.



Abbildung 4: Präparation und Verpackung der Drohnenwaben für den Postversand.



30.04.19



02.05.19



06.05.19



09.05.19



13.05.19



Boden der Ablegerbeute 19.05.09



Boden der Ablegerbeute 13.05.19

Abbildung 5: Präparation und Verpackung der aus Berlin versandten Drohnenwabe.

Bei der Ankunft am LIB hatten alle Transportboxen noch eine Innenraumtemperatur von 30°C und wiesen kaum sichtbare Schäden auf. Die Drohnenwaben des Transportversuchs und auch

die Kontrollwaben wurden in separaten Ablegerbeuten verstaut. Im Abstand von drei Tagen wurden alle geschlüpften Drohnen von den Waben gesammelt und zur Altersbestimmung mit verschiedenen Farben markiert. Sobald die Drohnen geschlechtsreif waren, wurden sie je nach farblicher Markierung gesammelt. Es wurde dokumentiert, wie viele der ursprünglich markierten Drohnen wiedergefunden wurden.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Drohnen des Postversandes zum einen weniger gut schlüpften, also die verdeckelte Brut von den Pflegebienen ausgeräumt wurde. Zum anderen wiesen sie eine sehr hohe Sterberate nach dem Schlupf auf. Es wurden stets extrem viele tote Drohnen auf den Böden der Ablegerbeuten dokumentiert (Siehe Abbildung 5). Weiterhin war vor allem die Spermaqualität der aus Berlin versandten Drohnen wesentlich schlechter als die der Kontroll-Drohnen (Siehe Abbildung 6).

In der nach Drohnenalter aufgeschlüsselten Untersuchung der Überlebensrate (Abbildung 7) zeigt sich keine Eindeutige Abhängigkeit. Im ungünstig verlaufenden Versandversuch Berlin (Benjamin 3) zeigt sich eine akzeptable Überlebensrate bei den jüngsten Drohnen (gelb).

Begründung der schlechteren Qualität der Drohnenbrut nach dem Transport könnte sein, dass die Drohnenwabe zu fest in der Transportkiste gelagert war. Die Wabe steckte diagonal in der Transportkiste und hatte nahezu keinen Spielraum und somit keine Möglichkeit starke Erschütterungen zu kompensieren.

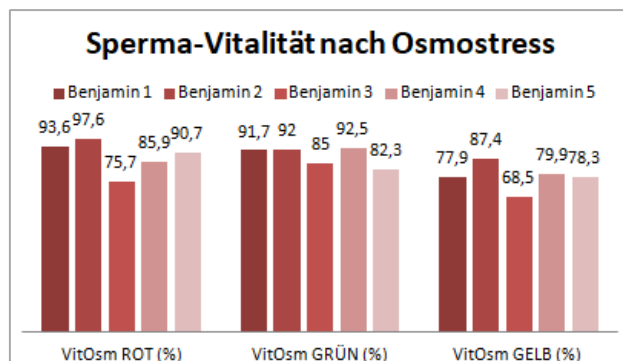
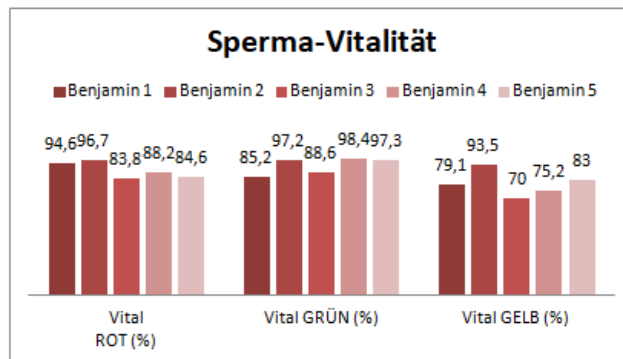
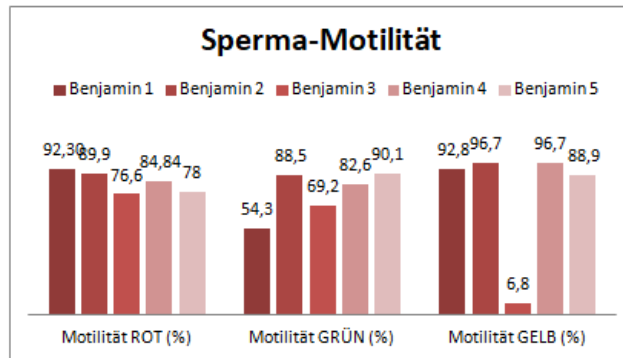


Abbildung 6: Spermaqualität im Drohnenversandversuch. Benjamin 1 - Kontrolle; Benjamin 2 - Autotransport; Benjamin 3 - Versand von Berlin; Benjamin 4 - Kontrolle; Benjamin 5 - Versand von Oranienburg

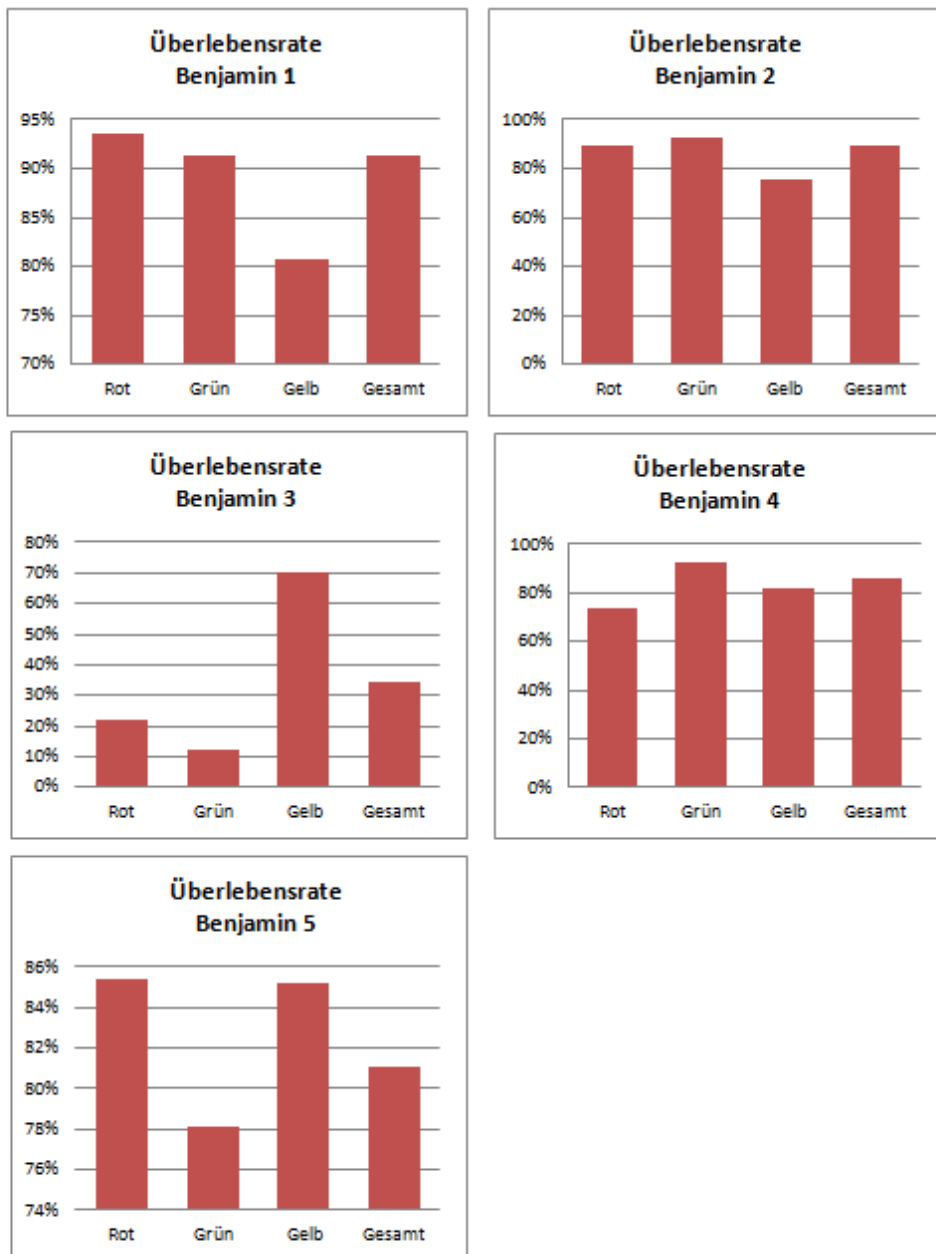


Abbildung 7: Überlebensraten im Versandversuch nach Drohnenalter. Zur Berechnung der Überlebensrate wurde die Anzahl der zur Spermaabnahme geeigneten Drohnen mit der Anzahl der markierten Drohnen verglichen. Benjamin 1 - Kontrolle; Benjamin 2 - Autotransport; Benjamin 3 - Versand von Berlin; Benjamin 4 - Kontrolle; Benjamin 5 - Versand von Oranienburg. Farben markieren unterschiedliche Alterskohorten der Drohnen, wobei „Rot“ die als erste markierte Drohnen darstellt, „Gelb“ die als letzte markierte Drohnen.

5.1.2 Zweiter Drohnenversandversuch

In einem neuen Versandversuch im Frühjahr 2020 wurden die Transportkisten mit modifizierten Drohnenwaben getestet. Dabei wurden kleinere Wabenstücke in einer maßangefertigten Wabentasche in der Transportkiste verschickt. Die kleineren Waben ermöglichen eine effizientere Polsterung und somit einen höheren Schutz vor Erschütterungen der Drohnenbrut.



Abbildung 8: Durch vertikale Teilung modifizierte Wabe. Links: Zwei modifizierte Waben in einem Baurahmen im DNM (Deutsch Normal-Maß). Rechts: Wabentasche mit eingeschobener halber DNM Wabe.

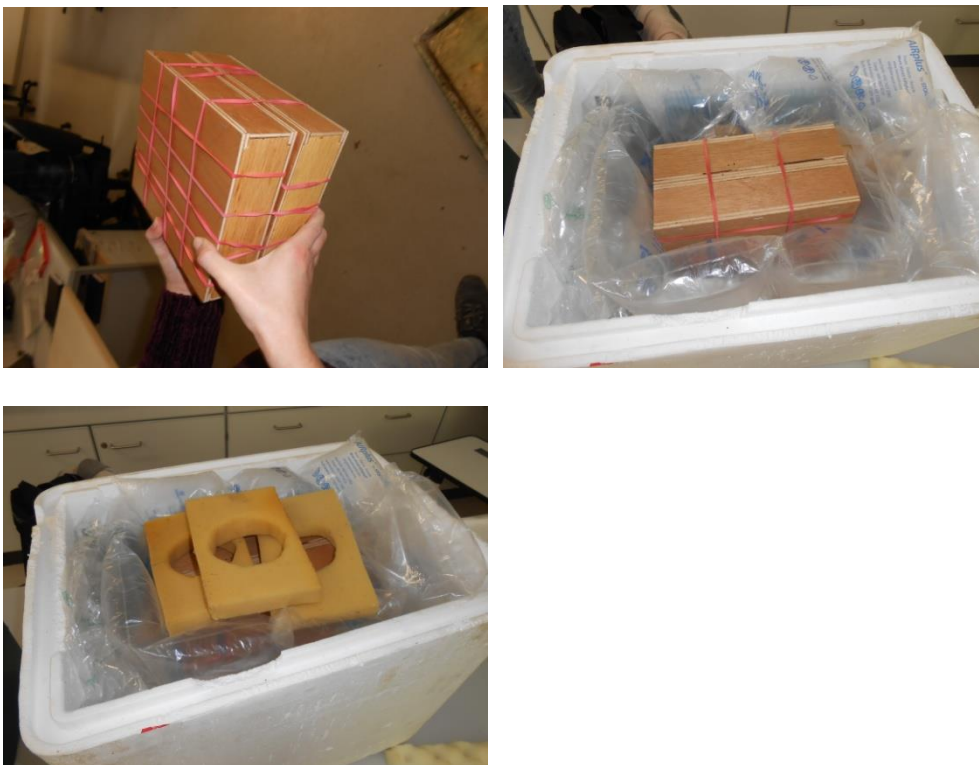


Abbildung 9: Versandverpackung der modifizierten Drohnenwaben. Oben links: mit Gummis aneinander befestigte Wabentaschen. Oben rechts: Transportbox mit Polsterung und zwei Wabentaschen. Unten: Polsterung der Wabentaschen kurz vor dem Verschluss der Transportbox.

Tabelle 1: Auswertung des Drohnenversandversuchs 2020 (Spermaqualität und Drohnenüberlebensrate).

	Drohnen Benjamin „Alt“	Drohnen Benjamin „Jung“	Drohnen Benjamin Kontrolle „Alt“	Drohnen Benjamin Kontrolle „Jung“
Motilität in %	92,35	84,47	88,39	93,9
Vitalität in %	77,94	89,92	97,62	75
Bemerkung (Marion Schröder)	Haben gut gestülpt, viele hatten gut Sperma; 20 Drohnen gesamt (3 kein Sperma; 1 nicht gestülpt; 3 explodiert; 13 gut Sperma)	Haben gut gestülpt, hatten weniger Sperma pro Drohn als Kontrolle Jung	Ähnlich wie Drohnen Benjamin „Alt“; 20 Drohnen gesamt (3 kein Sperma; 1 nicht gestülpt; 3 explodiert; 1 wenig Sperma; 12 gut Sperma)	Kackig, weich, nicht viele die man verwenden konnte, Drohnen hatten aber viel Sperma

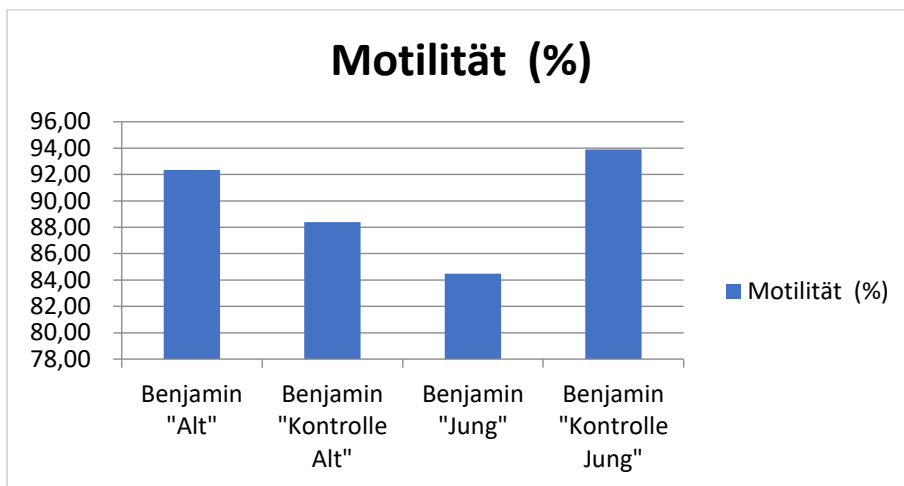


Abbildung 10: Auswertung der Motilität des Spermias der versandten Waben und der Kontrollwaben.

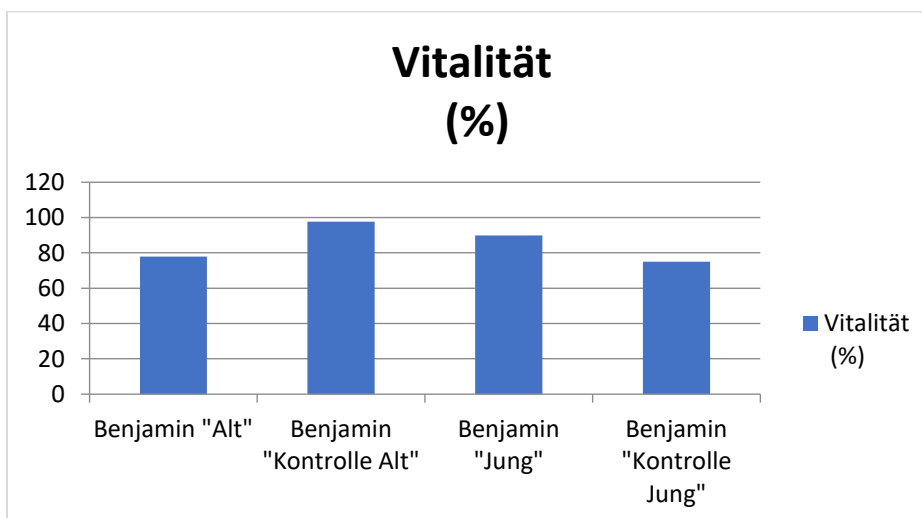


Abbildung 11: Auswertung der Vitalität des Spermias der versandten Waben und der Kontrollwaben.

5.2 Voruntersuchungen zur Spermaqualität

Über den 2020 zusätzlich eingeführten Fragebogen zu den Erzeugungsbedingungen bei den Züchtern konnte ein wahrscheinlicher negativer Einfluss später Kälteeinbrüche ermittelt werden (Abbildung 12).

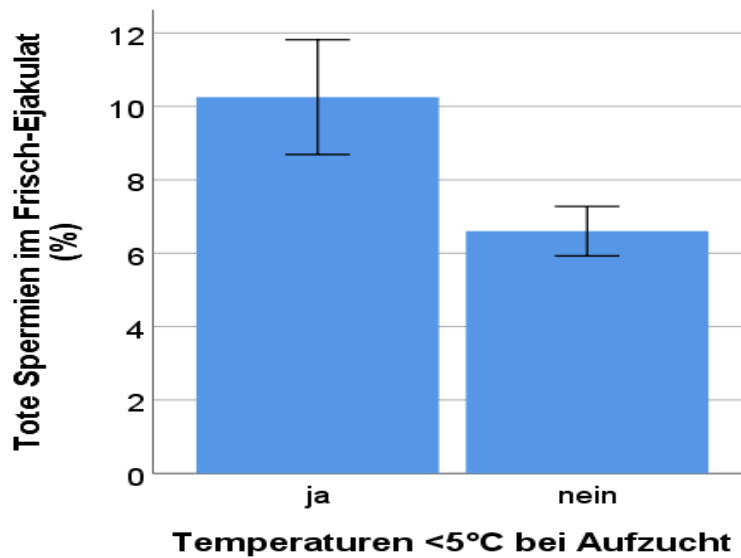


Abbildung 12: Einfluss später Kälte-Einbrüche auf die Qualität von Drohnensperma.

Den Lieferanten der Drohnenwabe wurde folgende Frage vorgelegt: „Gab es während der Aufzucht der Drohnenflug auf Ihrem Bienenstand Außentemperaturen unter 5 °C?“. Der Unterschied ist statistisch signifikant ($P < 0,05$).

5.3 Übersicht über die kryokonservierten Probensätze

Letztendlich wurden 216 Spermienproben in der Genbank eingelagert, die im Folgenden näher charakterisiert werden.

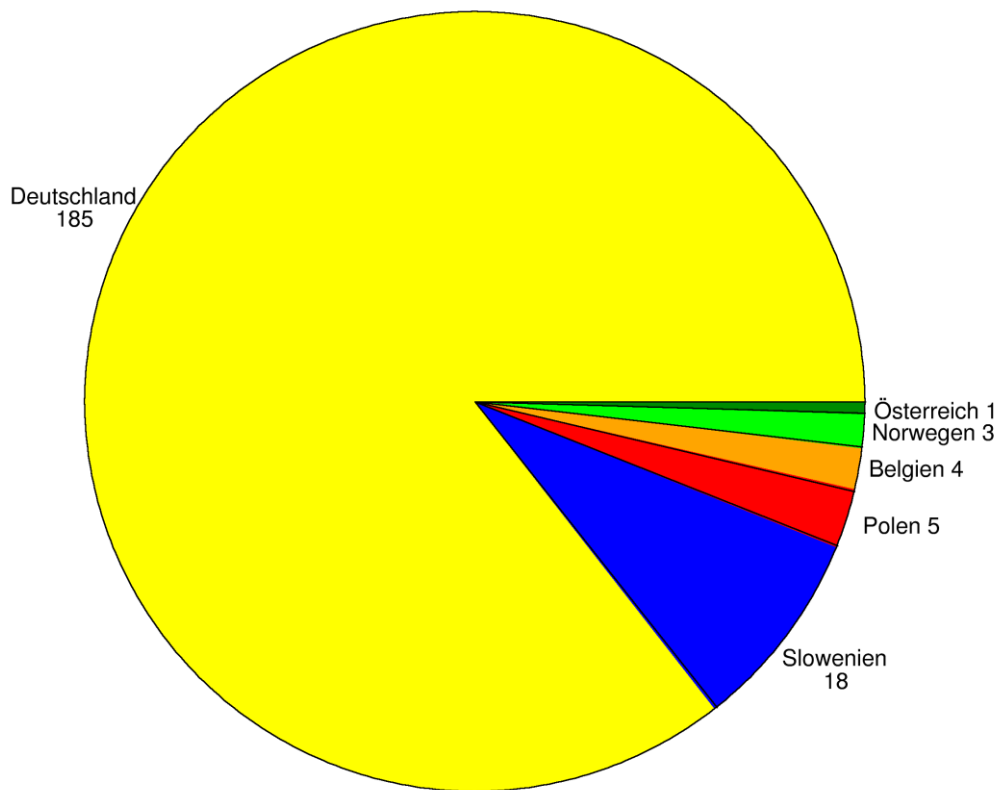


Abbildung 13: Herkunftsland der kryokonservierten Proben.

Die meisten der Proben stammen aus Deutschland (siehe Abbildung 13: Herkunftsland der kryokonservierten Proben.). Slowenien als Ursprungsland der in Deutschland am meisten verbreitete Bienenrasse ist auch stark vertreten, vereinzelte Proben stammen aus Polen, Belgien, Norwegen und Österreich. Die meisten österreichischen Proben sind leider durch einen Faulbrutnachweis unbrauchbar geworden.

Probenverteilung Genbank Honigbiene

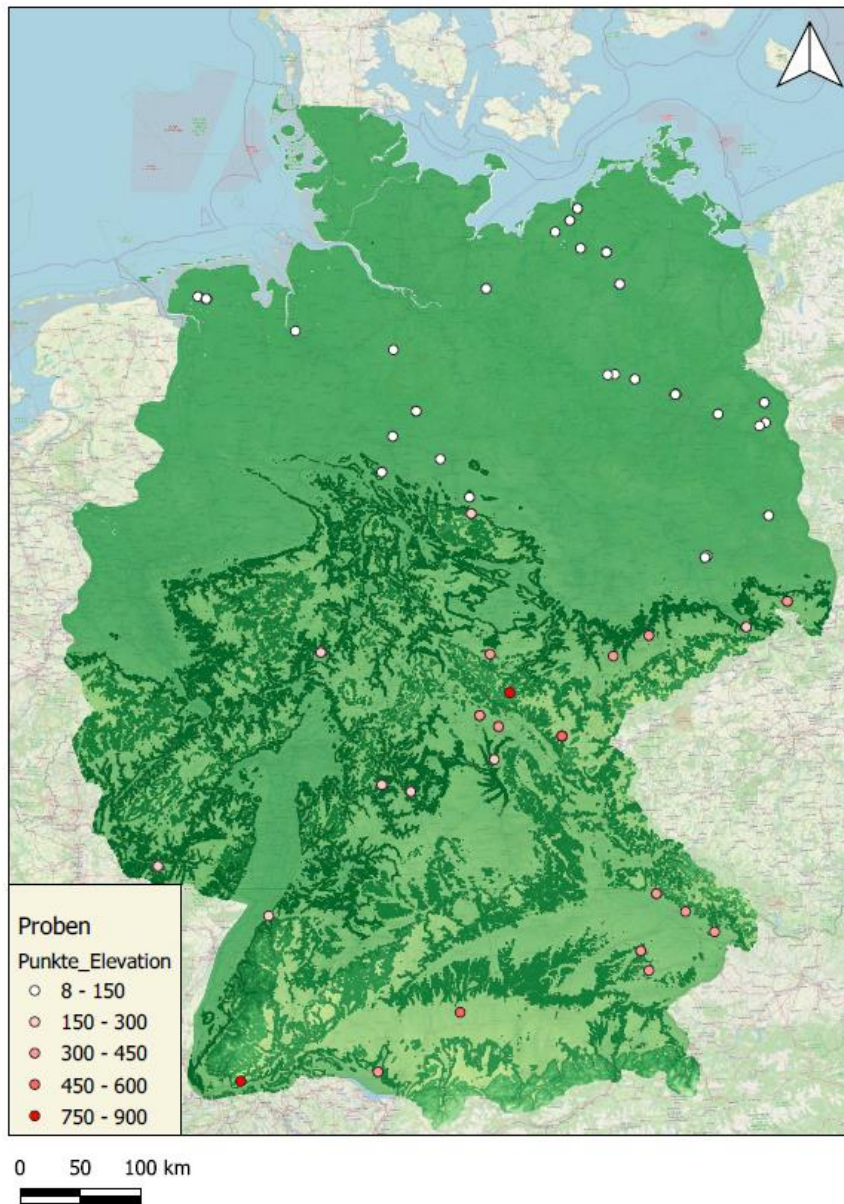


Abbildung 14: Orte beprobter Völker in Deutschland.

Die deutschen Proben verteilen sich relativ gleichmäßig über Deutschland (Abbildung 14 und Abbildung 15). Lediglich Brandenburg ist überrepräsentiert, weil eine Reihe von Proben des LIB, die zur technischen Weiterentwicklung angefertigt wurden, letztendlich kryokonserviert werden, weil die zugesicherte Kapazitätsgrenze nicht ausgeschöpft wurde.

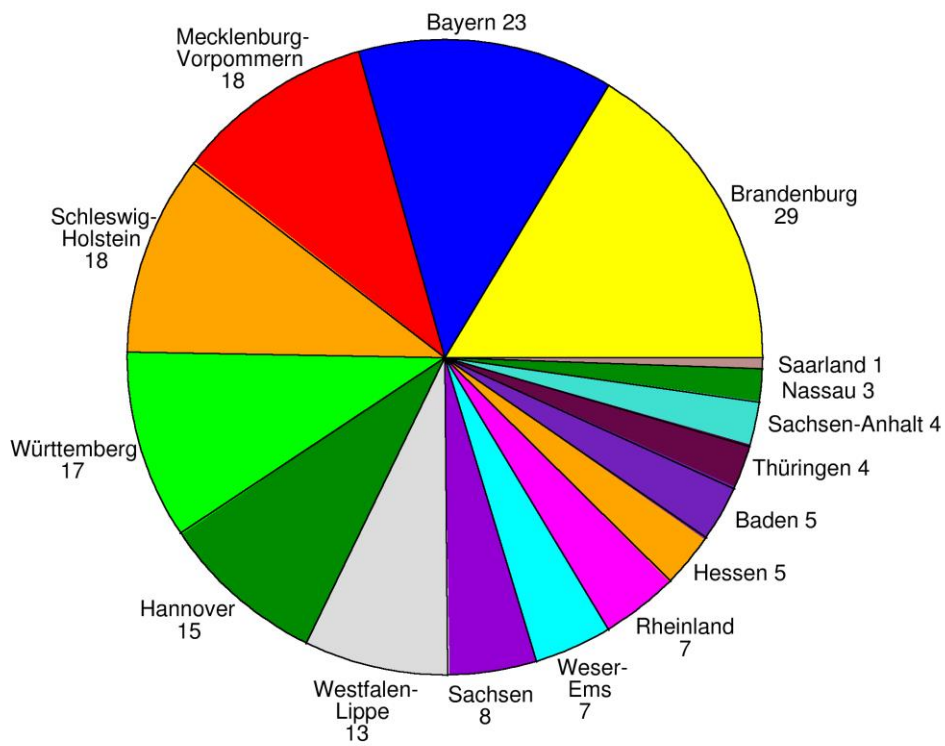


Abbildung 15: Zahlenmäßige Verteilung der eingelagerten Proben der deutschen Carnica-Zucht nach D.I.B.-Landesverbänden (die teilweise historischen deutschen Verwaltungseinheiten entsprechen).

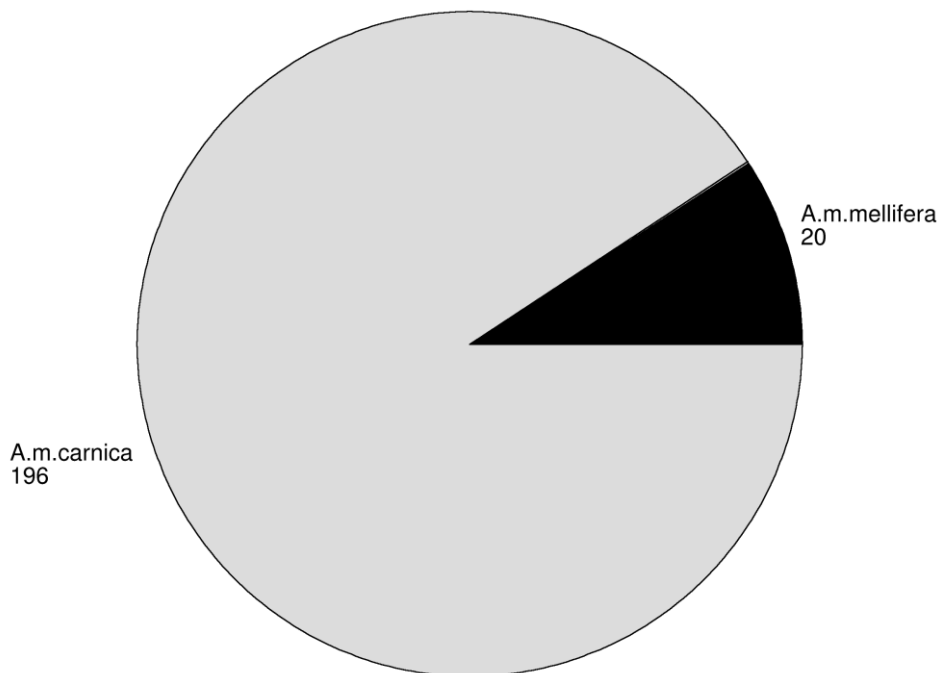


Abbildung 16: Rasseverteilung der eingelagerten Proben.

Die meisten Proben gehörten zur Bienenrasse *A. m. carnica*, wobei hier die eine als *A. m. mellifera* eingereichte Probe mit hinzugezählt wird (Abbildung 16). Für einem Teil der deutschen Carnica-Proben wurde auch eine Linienbezeichnung im Zuchtbuch auf BeeBreed hinterlegt, die in Tabelle 2 wiedergegeben wird.

Tabelle 2: Linien der deutschen Carnica.

Linie	Proben-Nummern
30 -P	28, 27
AGT Toleranz	40, 203, 202, 164, 44, 49, 12, 13, 11, 10, 62, 76
Bergperle	51
C302	52, 53
C-5	96, 95, 91, 90
Ca	16
Carnica 03	63, 201
Carnika	17, 167
C-Funke	106
C-Kroiß	39
C-Mayen	81
CP-Dauß	207
CP-Diskus	186
CP-Fehling2	191
CP-Holdorf	189, 192
CP-J.Petersen	190
CP-Krokus	184
L2	156
L3	179
Lattbusch	25
LIB	56, 58, 57, 55
LIB Hygiene	218, 216, 217, 4, 2, 18, 59, 1
M	177
NPW	22
Peschetz	100, 163, 151, 160, 103, 116, 115, 65, 70, 69, 79, 71, 199
Sklenar 47/9/15	176, 173, 170, 159
Sklenar 47/9/24	61
Sklenar 47/9/26	172, 171, 155, 154
Sklenar 47/G/10	175, 168
Sklenar	6, 7
T88	94
TLW 01	141, 139, 140
TLW 04	143
Troiseck 1075	183, 77
Troiseck	223, 19, 20
Troiseck Celle	85, 84, 83, 89, 88
Troiseck Hoffmann	72, 67, 74, 73
TWS68	101, 82
Wäbs	99

5.4 Ergebnisse der Spermienqualitätskontrolle

Jede in die Genbank eingelagerte Probe mit Ausnahme der 5 in der letzten Projektphase aus Polen angekommenen Proben wurden sowohl vor als auch nach der Kryokonservierung auf Spermienqualität untersucht. Diese Untersuchung schließt sowohl die Motilität (Abbildung 17), der Prozentsatz an beweglichen Spermien, als auch die Untersuchung auf den Prozentsatz lebendiger Spermien ein (Abbildung 18). Generell geht die Qualität des Spermias durch den Einfrierprozess zurück (Abbildung 19), aber das ist nicht in jedem Einzelfall so (Abbildung 20).

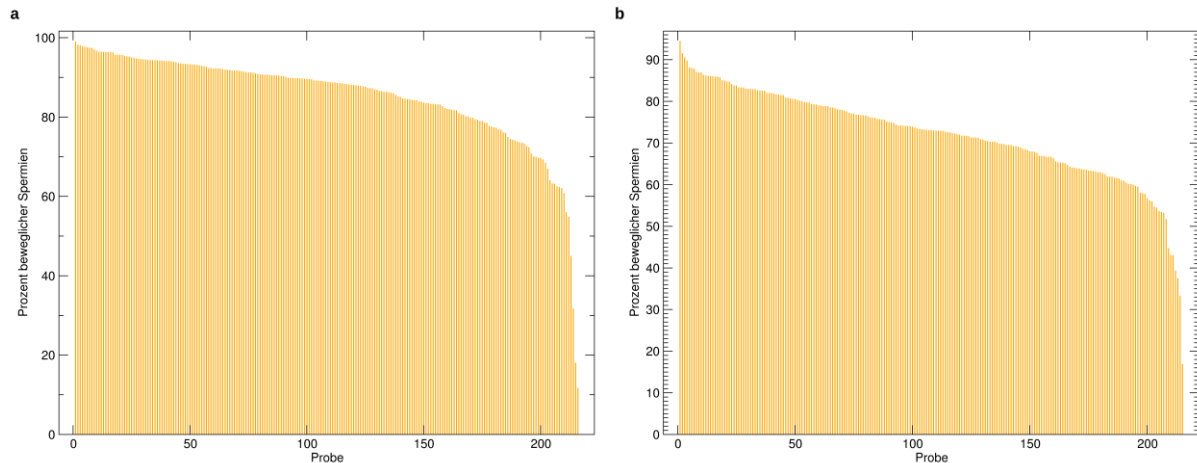


Abbildung 17. Motilität der Spermien vor (a) und nach (b) der Kryokonservierung.

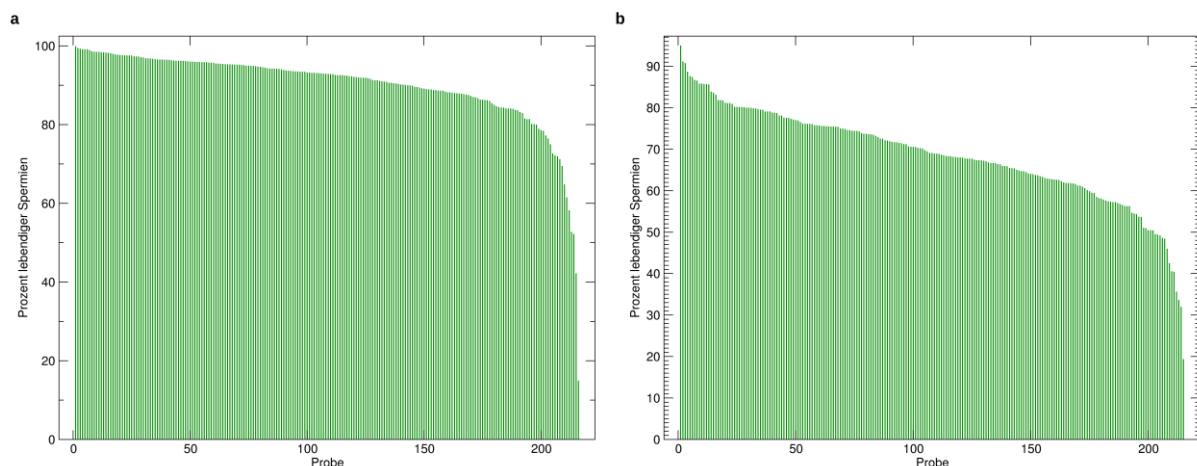


Abbildung 18: Anteil lebendiger Spermien vor (a) und nach (b) der Kryokonservierung.

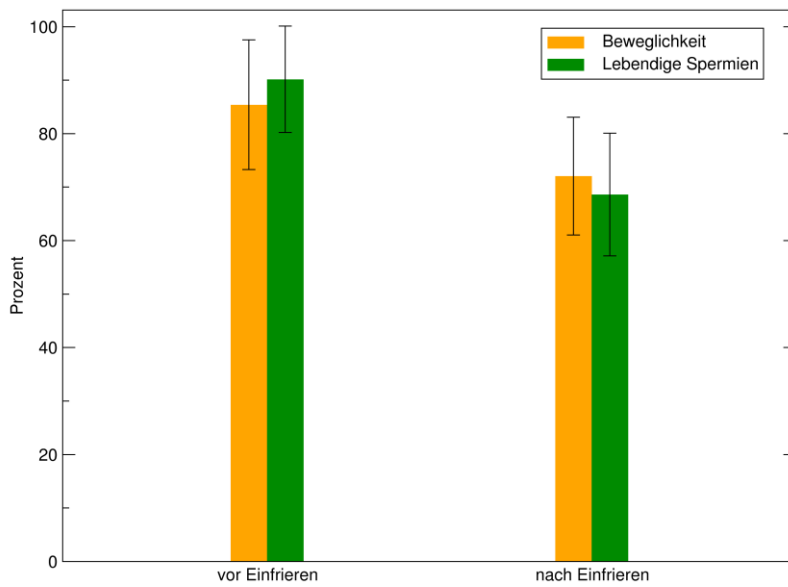


Abbildung 19: Durchschnitt der Beweglichkeit und dem Anteil lebendiger Spermien vor und nach der Kryokonservierung mit Standardabweichung.

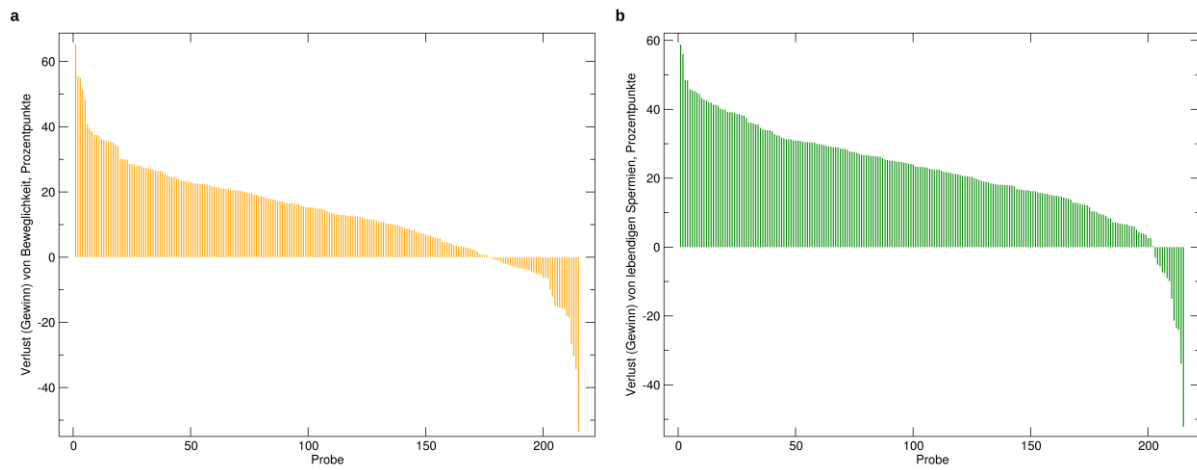


Abbildung 20: Vergleich von Motilität (a) und Anteil lebendiger Spermien vor und nach der Kryokonservierung.

Tabelle 3: Ergebnisse der Spermaqualitätsuntersuchungen.

Nr	ZBNr	Beweglichkeit		Lebendigkeit	
		vor	nach	vor	nach
1	DE-4-1-90642-18	79 %	71 %	81 %	32 %
2	DE-4-1-90598-18	45 %	15 %	79 %	67 %
4	DE-4-1-90578-18	92 %	82 %	58 %	69 %
6	DE-14-21-101-18	86 %	58 %	73 %	82 %
7	DE-14-21-145-18	82 %	65 %	17 %	19 %
10	DE-7-45-508-2017	91 %	94 %	76 %	73 %
11	DE-7-45-494-2017	71 %	72 %	76 %	81 %
12	DE-7-45-179-2017	18 %	84 %	45 %	42 %
13	DE-7-45-333-2016	91 %	89 %	72 %	79 %
14	DE-19-9-3217-2017	84 %	86 %	83 %	68 %
15	DE-19-9-4317-2017	55 %	89 %	70 %	60 %
16	DE-1-30-15-2017	92 %	94 %	95 %	63 %
17	DE-1-5-6-2017	88 %	85 %	39 %	41 %
18	DE-4-1-90599-2018	63 %	52 %	79 %	76 %
19	DE-4-7-23-2018	93 %	92 %	63 %	54 %
20	DE-4-7-6-2018	95 %	98 %	60 %	68 %
21	DE-4-279-15-2018	73 %	88 %	62 %	61 %
22	DE-4-304-90-2018	91 %	93 %	52 %	51 %
23	DE-4-320-18-2019	92 %	96 %	54 %	51 %
24	DE-4-320-17-2019	94 %	97 %	84 %	70 %
25	DE-4-301-26-2019	95 %	92 %	88 %	86 %
26	DE-4-263-10-2019	82 %	80 %	83 %	86 %
27	DE-2-136-8006-2018	90 %	53 %	69 %	68 %
28	DE-2-136-8003-2018	94 %	42 %	71 %	76 %
30	DE-2-196-384-2018	88 %	97 %	73 %	74 %
31	DE-2-211-876-2018	93 %	89 %	38 %	40 %
32	DE-2-736-74-2018	89 %	88 %	79 %	66 %
33	DE-2-365-1976-2019	94 %	95 %	66 %	68 %
35	DE-2-736-80-2018	83 %	76 %	72 %	73 %
37	DE-2-233-72-2018	89 %	97 %	61 %	71 %
38	DE-2-211-894-2018	70 %	90 %	74 %	50 %
39	DE-2-198-38-2018	93 %	98 %	70 %	57 %
40	DE-2-221-57-2018	90 %	93 %	71 %	63 %
41	DE-2-281-24-2019	64 %	93 %	61 %	50 %
43	DE-2-70-59-2018	94 %	96 %	69 %	80 %
44	DE-2-221-22-2019	72 %	96 %	62 %	73 %
45	DE-2-211-962-2019	92 %	87 %	70 %	48 %
46	DE-2-305-204-2018	12 %	72 %	65 %	58 %
47	DE-2-70-17-2019	80 %	84 %	70 %	58 %
48	DE-2-305-201-2018	83 %	90 %	83 %	95 %
49	DE-2-221-60-2019	96 %	92 %	73 %	61 %
50	DE-4-296-3-2017	96 %	88 %	76 %	81 %
51	DE-4-263-11-2018	91 %	84 %	73 %	77 %
52	DE-4-302-25-2018	97 %	94 %	79 %	78 %
53	DE-4-302-6-2018	75 %	90 %	79 %	88 %
54	DE-4-292-8-2018	70 %	84 %	67 %	63 %
55	DE-4-301-15-2018	88 %	95 %	79 %	80 %
56	DE-4-1-383-2019	89 %	93 %	85 %	63 %
57	DE-4-1-416-2019	91 %	94 %	70 %	67 %
58	DE-4-1-405-2019	95 %	92 %	83 %	36 %
59	DE-4-1-90636-2018	84 %	84 %	63 %	57 %
61	DE-14-118-19-2018	89 %	83 %	81 %	79 %
62	DE-6-11-1-2019	78 %	97 %	81 %	87 %
63	DE-17-85-1-2018	96 %	96 %	81 %	62 %
65	DE-17-159-47-2017	86 %	93 %	73 %	81 %
66	DE-8-1-8353-2018	85 %	97 %	72 %	80 %
67	DE-6-39-851-2018	89 %	98 %	65 %	49 %
68	DE-8-1-8219-2018	88 %	89 %	66 %	57 %
69	DE-17-213-54-2018	99 %	94 %	62 %	70 %
70	DE-17-213-49-2018	93 %	94 %	69 %	84 %
71	DE-6-11-5-2018	97 %	97 %	70 %	61 %
72	DE-6-36-1198-2018	83 %	92 %	67 %	76 %
73	DE-6-90-84-2018	98 %	94 %	68 %	54 %
74	DE-6-90-68-2018	94 %	93 %	88 %	86 %
75	DE-14-118-13-2018	83 %	85 %	83 %	69 %
76	DE-7-45-916-2018	94 %	95 %	86 %	80 %
77	DE-6-198-74-2018	73 %	96 %	70 %	75 %
78	DE-8-1-10344-2018	56 %	86 %	74 %	67 %
79	DE-17-213-09-2017	88 %	93 %	86 %	80 %
80	DE-17-213-06-2017	87 %	98 %	87 %	91 %
81	DE-17-213-36-2018	94 %	69 %	80 %	91 %
82	DE-16-75-3114-2018	90 %	79 %	65 %	63 %
83	DE-6-1-1935-2018	86 %	87 %	76 %	80 %
84	DE-6-1-0157-2018	94 %	95 %	86 %	79 %
85	DE-6-1-0124-2018	96 %	88 %	75 %	84 %
86	DE-8-198-034-2018	87 %	95 %	72 %	65 %
87	DE-8-198-948-2017	84 %	93 %	58 %	63 %
88	DE-8-170-56-2018	96 %	94 %	84 %	56 %
89	DE-8-170-55-2018	90 %	95 %	78 %	71 %
90	DE-8-120-471-2018	98 %	98 %	75 %	74 %
91	DE-8-120-469-2018	92 %	96 %	71 %	69 %
92	DE-8-198-813-2016	87 %	95 %	80 %	66 %
93	DE-8-198-010-2018	92 %	99 %	79 %	71 %
94	DE-8-216-14-2017	84 %	73 %	86 %	80 %
95	DE-8-120-467-2018	91 %	99 %	64 %	69 %
96	DE-8-120-465-2018	93 %	96 %	79 %	82 %
97	DE-8-219-46-2019	96 %	98 %	60 %	68 %
98	DE-8-219-18-2019	94 %	93 %	83 %	69 %
99	DE-8-7-64-2017	91 %	93 %	67 %	75 %
100	DE-8-7-79-2018	93 %	98 %	77 %	80 %
101	DE-16-75-3040-2017	95 %	98 %	56 %	54 %
102	DE-4-299-16-2018	92 %	92 %	71 %	72 %
103	DE-13-430-70-2019	96 %	91 %	82 %	73 %
104	DE-13-417-19-2019	88 %	89 %	33 %	46 %
105	DE-2-227-846-2018	91 %	96 %	71 %	67 %
106	DE-13-400-1-2017	92 %	99 %	83 %	80 %
107	DE-4-299-23-2018	84 %	99 %	75 %	74 %
109	DE-13-430-29-2017	95 %	93 %	43 %	72 %

110	DE-13-430-44-2018	81 %	96 %	64 %	57 %
111	DE-13-417-31-2019	84 %	96 %	72 %	71 %
112	DE-16-310-69-2017	86 %	99 %	82 %	64 %
113	DE-2-227-827-2018	96 %	95 %	77 %	57 %
114	DE-2-293-870-2018	96 %	99 %	77 %	67 %
115	DE-13-90-571-2018	92 %	91 %	68 %	68 %
116	DE-13-90-568-2018	90 %	97 %	87 %	75 %
117	DE-16-310-195-2018	89 %	95 %	64 %	63 %
118	DE-2-227-882-2018	91 %	98 %	69 %	75 %
119	34186/2020	76 %	97 %	83 %	78 %
120	55582/2020	93 %	96 %	80 %	56 %
121	55579/2020	93 %	97 %	73 %	78 %
122	31874/2020	98 %	94 %	77 %	79 %
123	161.1820.332	83 %	88 %	68 %	61 %
124	47104/2020	86 %	89 %	77 %	80 %
125	31873/2020	90 %	89 %	77 %	75 %
126	31875/2020	93 %	96 %	58 %	57 %
127	34183/2020	82 %	96 %	76 %	68 %
128	34184/2020	88 %	96 %	71 %	71 %
129	55580/2020	98 %	91 %	82 %	79 %
130	55581/2020	95 %	96 %	70 %	77 %
131	41923/2020	92 %	91 %	92 %	89 %
132	34185/2020	89 %	86 %	55 %	57 %
133	31877/2020	87 %	95 %	64 %	71 %
134	128.1820.132	79 %	92 %	43 %	34 %
135	69.1820.386	79 %	93 %	82 %	68 %
136	41925/2020	91 %	97 %	85 %	76 %
137	Brane Kozinc II	93 %	88 %	74 %	70 %
138	Brane Kozinc I	91 %	95 %	76 %	70 %
139	DE-19-40-29-2019	87 %	91 %	91 %	75 %
140	DE-19-40-30-2019	74 %	93 %	65 %	86 %
141	DE-19-40-137-2018	94 %	94 %	80 %	76 %
142	DE-19-9-1119-2019	91 %	96 %	86 %	83 %
143	DE-19-40-141-2019	92 %	95 %	63 %	54 %
144	DE-19-142-86-2018	86 %	95 %	73 %	77 %
145	DE-19-1-6419-2019	80 %	90 %	84 %	82 %
146	DE-19-142-08-2018	98 %	98 %	70 %	68 %
147	DE-19-142-91-2019	94 %	95 %	74 %	72 %
148	DE-19-1-1419-2019	92 %	90 %	69 %	69 %
149	DE-19-9-2619-2019	78 %	84 %	78 %	75 %
150	DE-18-501-5-2019	90 %	95 %	62 %	64 %
151	DE-18-104-03-2020	90 %	92 %	73 %	63 %
152	47106/2020	77 %	96 %	74 %	76 %
153	DE-1-5-100-2020	67 %	88 %	83 %	76 %
154	DE-18-306-44-2019	63 %	85 %	78 %	80 %
155	DE-18-306-30-2019	74 %	88 %	69 %	60 %
156	DE-19-170-32-2018	81 %	88 %	77 %	78 %
157	DE-19-9-6819-2019	98 %	98 %	86 %	79 %
159	DE-11-70-1535-2018	95 %	93 %	73 %	68 %
160	DE-18-104-04-2020	81 %	98 %	64 %	77 %
161	DE-18-501-9-2019	90 %	88 %	83 %	72 %

162	DE-9-2-1932-2019	90 %	95 %	80 %	80 %
163	DE-9-2-4023-2019	96 %	90 %	74 %	66 %
164	DE-9-2-1687-2019	92 %	93 %	86 %	73 %
165	DE-19-142-92-2019	94 %	93 %	65 %	87 %
166	DE-18-501-5-2018	79 %	98 %	78 %	74 %
167	DE-1-7-17-2019	77 %	81 %	83 %	75 %
168	DE-11-70-1032-2019	70 %	96 %	67 %	62 %
169	DE-44-2020-004	83 %	91 %	86 %	76 %
170	DE-11-70-1528-2018	77 %	94 %	76 %	65 %
171	DE-18-206-42-2019	82 %	90 %	85 %	75 %
172	DE-18-206-15-2020	94 %	98 %	64 %	72 %
173	DE-11-70-1526-2019	89 %	97 %	72 %	59 %
174	DE-18-801-28-2020	74 %	98 %	72 %	66 %
175	DE-11-70-1018-2018	91 %	89 %	63 %	58 %
176	DE-11-70-1518-2019	61 %	80 %	73 %	65 %
177	DE-18-901-11-2018	87 %	98 %	60 %	63 %
178	DE-18-801-22-2020	62 %	93 %	63 %	65 %
179	DE-19-170-59-2020	32 %	89 %	62 %	67 %
180	DE-18-801-40-2020	82 %	92 %	64 %	76 %
181	DE-1-5-18-2019	69 %	95 %	87 %	67 %
183	DE-6-198-70-2018	80 %	95 %	54 %	49 %
184	DE-15-222-11-2020	69 %	79 %	74 %	87 %
185	DE-15-222-29-2019	79 %	97 %	83 %	74 %
186	DE-15-57-23-2020	92 %	62 %	73 %	71 %
187	DE-15-57-03-2020	70 %	89 %	85 %	77 %
188	DE-15-110-01-2019	90 %	84 %	63 %	62 %
189	DE-15-57-12-2020	90 %	81 %	73 %	81 %
190	DE-15-114-71-2020	93 %	87 %	80 %	69 %
191	DE-15-57-28-2020	84 %	84 %	75 %	72 %
192	DE-15-57-17-2020	97 %	95 %	79 %	72 %
193	DE-15-106-76-2019	89 %	87 %	82 %	66 %
194	DE-15-106-051-2019	92 %	100 %	57 %	55 %
195	DE-15-223-94-2020	79 %	95 %	64 %	64 %
196	DE-15-223-38-2019	91 %	92 %	53 %	56 %
197	DE-15-223-19-2020	87 %	90 %	73 %	74 %
198	DE-15-63-10-2019	74 %	86 %	81 %	65 %
199	DE-6-131-66-2019	85 %	94 %	82 %	68 %
201	DE-6-209-7-2019	89 %	96 %	67 %	62 %
202	DE-6-209-8-2019	88 %	97 %	68 %	62 %
203	DE-6-131-1-2019	83 %	75 %	88 %	78 %
204	DE-15-63-1-20219	85 %	96 %	72 %	64 %
205	DE-15-114-77-2019	74 %	98 %	79 %	80 %
206	AT-99-99-24-2020	77 %	84 %	78 %	75 %
207	DE-15-114-90-2020	80 %	78 %	90 %	74 %
210	DE-4-268-109-2020	82 %	95 %	71 %	65 %
211	DE-4-268-107-2020	90 %	96 %	74 %	67 %
212	DE-005-018-2019	95 %	91 %	77 %	76 %
213	DE-44-3-2020 (Mel)	75 %	83 %	62 %	49 %
214	DE-44-4-2020 (Mel)	94 %	93 %	73 %	59 %
215	DE-12-2020-001 (Mel)	90 %	80 %	60 %	62 %
216	DE-4-1-90453-2020	88 %	99 %	68 %	68 %

217	DE-4-1-90468-2020	91 %	90 %	63 %	58 %
218	DE-4-1-90419-2020	90 %	92 %	61 %	50 %
219	BE-2-11-78-2020	94 %	91 %	53 %	62 %
220	BE-2-15-12-2019	88 %	93 %	78 %	76 %
221	BE-2-999-38-2020	96 %	88 %	73 %	64 %
222	BE-2-999-93-2021	62 %	94 %	56 %	60 %
223	DE-11-1-10504-2020	85 %	77 %	69 %	69 %
225	JS-27-2021	89 %	96 %	81 %	74 %
226	JS-81-2021	83 %	91 %		

227	JS-66-2021	89 %	93 %	71 %	67 %
228	JS-35-2021	84 %	92 %	81 %	86 %
233	PL-804/20	95 %	89 %	74 %	74 %
234	PL-817/20	95 %	90 %	60 %	50 %
235	PL-826/20	89 %	86 %	76 %	64 %
236	PL-96/2019	63 %	90 %	67 %	65 %
237	PL-44/2021	76 %	94 %	60 %	67 %

5.5 Ergebnisse der Virusuntersuchungen der Pool- und Einzelproben

Die Untersuchung von möglicher Transmission von Viren durch Drohnensperma kann durch die Untersuchung der Drohnen durchgeführt werden (Yue *et al.* 2006). Um bei einer möglicherweise niedrigen Belastung Analysen zu sparen, wurden antragsgemäß zunächst gepoolte Bienenproben auf Viren untersucht, siehe Tabelle 4: Ergebnisse der Untersuchung der Poolproben. Weil alle Pools Viren enthielten, wurden zusätzlich Einzeluntersuchungen durchgeführt.

Tabelle 4: Ergebnisse der Untersuchung der Poolproben. Die Zusammensetzung der Pools spielt keine Rolle mehr, weil alle Pools Viren enthielten, und somit die Einzeluntersuchung notwendig wurde.

Pool	DWV	ABPV	CBPV
1	positiv	negativ	negativ
2	positiv	negativ	positiv
3	positiv	negativ	positiv
4	positiv	negativ	positiv
5	positiv	negativ	positiv
6	positiv	positiv	positiv
7	positiv	negativ	positiv
8	positiv	positiv	positiv
9	positiv	negativ	positiv
10	positiv	negativ	positiv
11	positiv	negativ	positiv

Entsprechend wurde der qualitative Nachweis dreier wichtiger pathogener Bienenviren in Proben des abgenommenen Spermas im Verlängerungszeitraum des Projekts auf alle verbliebenen Herkünfte in der Genbank ausgeweitet. Dabei konnte das Flügeldeformationsvirus (DWV) in insgesamt 58 % der seit Projektbeginn eingelagerten Herkünfte nachgewiesen werden, das Akute Bienenparalyse-Virus (ABPV) in 3 % und das Chronische Bienenparalyse-Virus (CBPV) in 20 % (Abbildung 21).

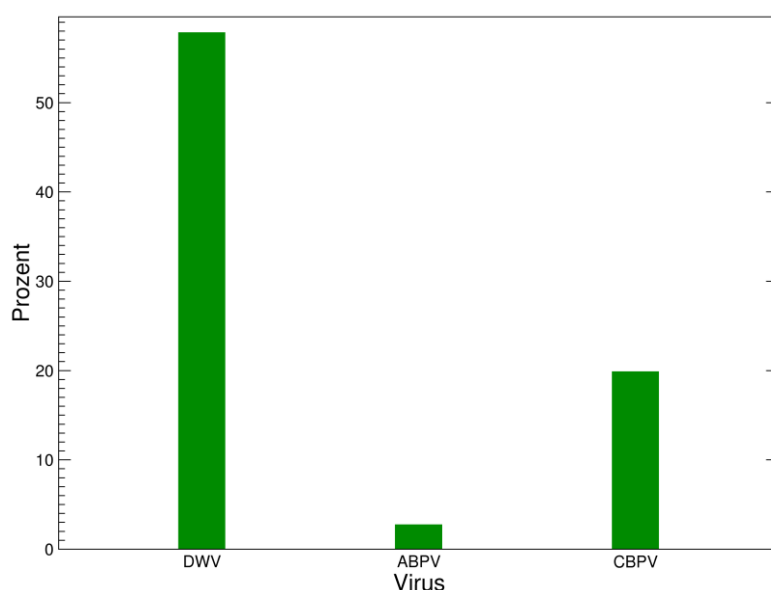


Abbildung 21: Prozentuale Anteile der Proben mit positiven Virenbefunden.

Ähnlich hohe Prävalenzen sind zumindest im Hinblick auf DWV und ABPV auch an anderen Orten gefunden worden (Prodelalova *et al.* 2019) und sind also nicht ungewöhnlich. Für CBPV liegen vergleichbare Daten nicht vor. Damit stehen zukünftigen Nutzern der eingelagerten Proben Informationen zu allen vertretenen Herkünften zur Verfügung. Die Ergebnisse der Virusuntersuchungen wurden den Haltern der beprobten Herkünfte gemäß der Ankündigung im Überlassungsvertrag mitgeteilt.

Tabelle 5: Ergebnisse der Virenuntersuchungen. DWV: Deformierte Flügel-Virus, ABPV: Akute Bienenparalyse-Virus, CBPV: Chronische Bienenparalyse-Virus

DWV	ABPV	CBPV	Anzahl	Probennummern
pos	pos	pos	1	25
pos	pos	neg	5	23, 62, 85, 186, 217
pos	neg	pos	29	19, 20, 26, 27, 37, 39, 40, 47, 61, 83, 88, 89, 93, 94, 100, 111, 114, 139, 144, 153, 156, 167, 170, 187, 188, 190, 194, 205, 211
pos	neg	neg	90	1, 2, 4, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 24, 30, 33, 41, 43, 44, 45, 46, 48, 50, 52, 53, 72, 75, 86, 87, 90, 91, 96, 97, 98, 99, 102, 103, 106, 107, 109, 110, 112, 113, 115, 116, 118, 119, 120, 122, 123, 133, 140, 141, 142, 143, 145, 148, 149, 151, 154, 157, 159, 161, 166, 169, 171, 172, 175, 177, 178, 180, 181, 185, 195, 196, 197, 202, 207, 210, 214, 215, 216, 219, 220, 221, 222, 223, 225, 226, 227, 228
neg	neg	pos	13	22, 55, 68, 73, 92, 134, 137, 162, 163, 164, 173, 183, 204
neg	neg	neg	73	6, 7, 13, 28, 31, 32, 35, 38, 49, 51, 54, 56, 57, 58, 59, 63, 65, 66, 67, 69, 70, 71, 74, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 84, 95, 101, 104, 105, 117, 121, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 135, 136, 138, 146, 147, 150, 152, 155, 160, 165, 168, 174, 176, 179, 184, 189, 191, 192, 193, 198, 199, 201, 203, 206, 212, 213, 218
Keine Analyse			5	233, 234, 235, 236, 237

Der häufigste Befund war, dass lediglich DWV gefunden wurde (siehe Tabelle 5). Virenfrei (zumindest in Bezug auf die untersuchten 3 Viren) waren 73 Proben. Alle Viren wurden lediglich in einer Probe gefunden.

5.6 Überprüfung der Rassereinheit mit morphometrischen Untersuchungen

Die Rassezuordnung der Züchter wurde für die meisten Proben durch die morphometrische Analyse bestätigt und wich nur in Einzelfällen davon ab (siehe Abbildung 22). Die in Abschnitt 5.7 erwähnte Probe aus Polen, die in der Genotypisierung nicht als Mellifera eingeordnet werden konnte, ist in Abbildung 22 orange markiert; die genotypisch nicht zugeordnete Probe aus Deutschland ist blau markiert. Probe 135 aus Norwegen, die sich in der genotypischen Analyse als Carnica erwies, wird in der morphometrischen Analyse ebenfalls als Carnica zugeordnet (in Abbildung 22 markiert).

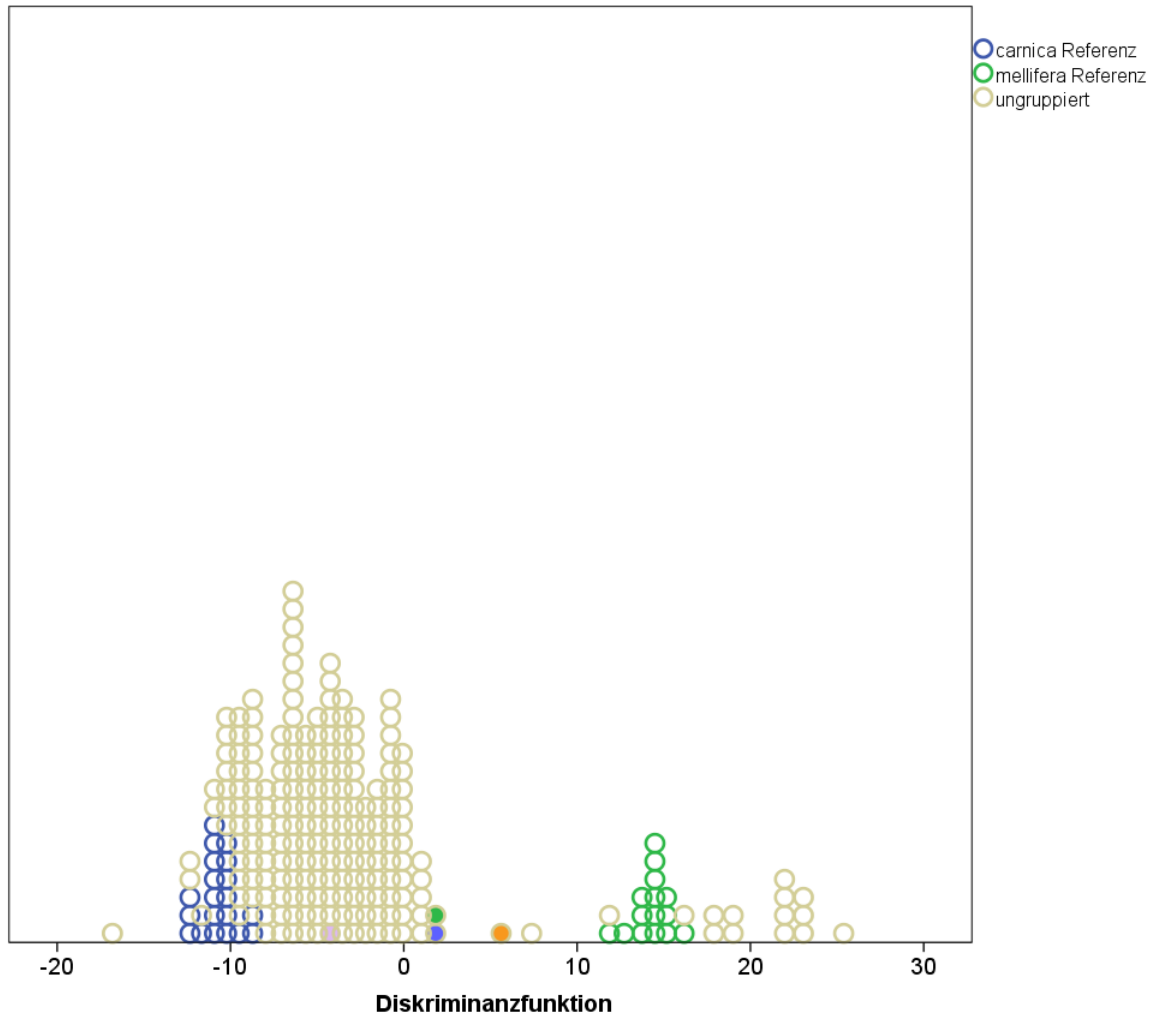


Abbildung 22: Ergebnis der Diskriminanzanalyse mit Referenzproben. Die von der eigenen Zuordnung der Züchter abweichenden Proben sind farblich markiert: pink – Probe Nr. 135 aus Norwegen; grün – Probe Nr. 237 aus Polen; blau – Probe Nr. 205 aus Deutschland, orange – Probe Nr. 235 aus Polen.

5.7 Überprüfung der Rassereinheit mit Genotypisierungen

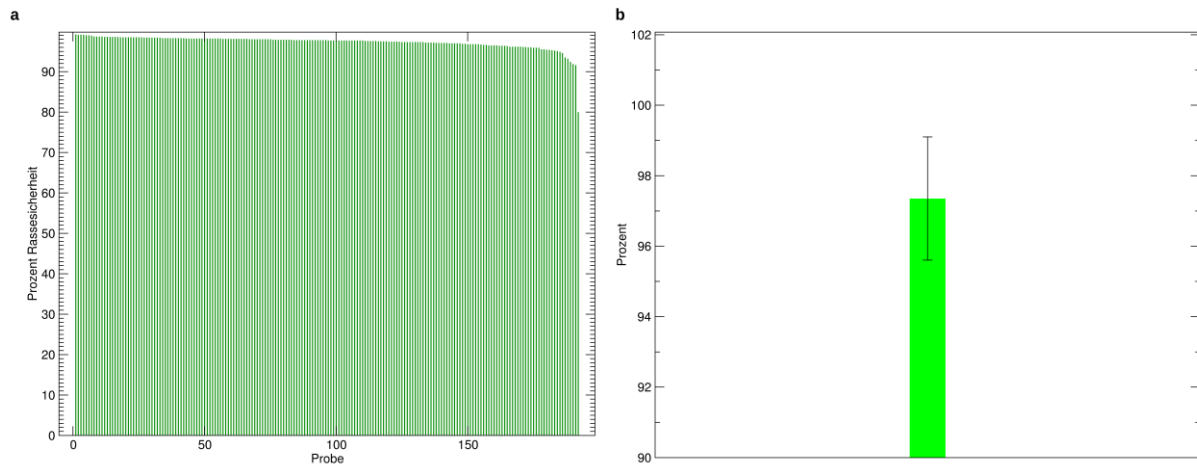


Abbildung 23: Ergebnisse der Rassereinheitsprüfung (a) Darstellung aller Einzelproben, (b) zusammengefasste Darstellung mit Standardabweichung.

Bis auf wenige Fälle wurde die Rassezuordnung der Züchter durch die Genotypisierung bestätigt. Bei einem Ausnahmefall handelte es sich um Probe Nr. 135, Nachkomme einer 2004 aus der norwegischen Mellifera-Zuchtpopulation, die als 97% *A. m. carnica* eingestuft wurde. Offenbar gab es in der Zwischenzeit eine unbeabsichtigte Carnica-Einkreuzung. Auch Probe Nr. 237 aus Polen erwies sich in der genetischen Analyse mit hoher Sicherheit (96%) als Carnica.

Eine Bestätigung mit lediglich 80 % Sicherheit stellt die Probe 205 aus der deutschen Carnica-Zuchtpopulation dar. Hier liegt offenbar auch eine Einkreuzung mit einer nicht näher bezeichneten Rasse vor. Diese Probe liegt allerdings in der morphometrischen Analyse am Rand des Carnica-Clusters (siehe Abbildung 22) und könnte hier noch als Carnica angesprochen werden. Eine Mellifera-Probe aus Polen (Nr. 235) sowie eine Mellifera-Probe aus Belgien konnten mit 79% bzw. 77% ebenfalls nicht sicher zugeordnet werden. Die Probe aus Polen konnte auch in der morphometrischen Analyse nicht zugeordnet werden, für die Probe aus Belgien liegen keine morphometrischen Daten vor.

5.8 Überführung von Sperma und Analysematerial in die Genbanken

Bisher konnte das Sperma von insgesamt 216 Bienenvölkern erfolgreich kryokonserviert werden. Folgende Proben wurden je Herkunft in die Deutsche Genbank aufgenommen:

- Ca. 150 µl Drohnensperma
- 5 Arbeiterbienen
- 5 Drohnen
- 40 Drohnenköpfe

Die kryokonservierten Proben wurden zunächst im institutseigenen Flüssigstickstoff-Lagertank eingelagert. Die kryokonservierten Proben wurden in mehreren Sendungen überführt, und zwar am 13.07.2021 via Post und am 28.09.2021 persönlich an die Genbank für landwirtschaftliche Nutztiere überführt.

Die slowenischen Kopien wurden am 19.10.2021 nach Slowenien geschickt und wurden dort erfolgreich in die Genbank eingelagert. Weiterhin wurden die norwegischen Kopien des kryokonservierten Spermias am 23.11.2021 nach Norwegen versandt.

Alle Begleitinformationen und Auswertungsergebnisse (Spermaqualität) wurden ebenfalls an die jeweilige Genbank weitergeleitet.

Im ersten Projektjahr wurden 18, im zweiten 91, im dritten 95 und im vierte Projektjahr konnten 14 Proben in die Genbank eingelagert werden.

5.9 Referenzierung der genotypisierten Proben in BeeBreed

Für alle Proben von deutschen und österreichischen Carnica-Züchtern, deren Zuchtbücher in Beebreed repräsentiert sind, ist auf BeeBreed der Hinweis auf die Kryokonservierung einschließlich der Nummer sichtbar (Abbildung 24).

Stammbaum-Browser DE-4-1-90578-2018

Körung	keine	
Züchter	Code	DE-4-1
	Name	Länderinstitut für Bienkunde
	Wohnort	Hohen Neuendorf
	Landesverband	Landesverband Brandenburgischer Imker e.V.
	Land	Deutschland
Vom Züchter selbst geprüft.		
	Prüfstand	3
	Prüfjahr	2019
Status	Leistungsprüfung erfolgt	
Population	Carnica - Hauptpopulation	
	eingefroren zur Konservierung der genetischen Information	4

Abbildung 24: Informationsfeld im BeeBreed-Stammbaum-Browser einer kryokonservierten Königin.

In den öffentlich zugänglichen Listen ist in der Spalte „eingefroren“ ebenfalls die Probennummer zu finden. Über die Sortierfunktion der Spalten sind die kryokonservierten Königinnen systematisch auffindbar (Abbildung 25).

Zuchtwertergebnisse für ausgewählte Königinnen

Stand vom 15.2.2023
 Suchkriterien: Länderkürzel=DE, Landesverband=4, Züchter=1.
 Anzahl der gefundenen Datensätze: 5285

[Als CSV \(Excel\) herunterladen](#)

Königin	Prüfstand	Inzuchtwerte (in %)		Zuchtwerte (Durchschnitt der letzten 5 Jahre = 100)										Krankheitsanfälligkeit			Körung	eingefroren ▼	genotypisiert	
		Königin	Arbeiterin	Honig	Sanftmut	Wabensitz	Schwarmneigung	Varroa-Index	Gesamt-Zuchtwert	Leistungsindex	Volksstärke	Frühjahrsentwickl.	Winterfestigkeit	Kalkbrut	Kalkbrut	CPV				Nosemose
				Wichtung in %																
				15	15	15	15	40	--											
DE-4-1-90642-2018	DE-4-1-2-2019	11.59	8.45	98,53	65,64	46,65	100,50	124,60	96	74,53	78,48	79,52	76,44	102,31	●	●	●	1		
DE-4-1-90599-2018	DE-4-1-2-2019	7.90	10.01	77,55	69,69	54,70	93,50	119,64	91	69,55	82,47	77,52	72,45	104,31	●	●	●	18		
DE-4-1-90598-2018	DE-4-1-1-2019	7.90	1.66	93,46	84,59	78,59	106,40	116,54	102	89,46	91,39	87,44	91,35	100,27	●	●	●	2		
DE-4-1-90453-2020	DE-4-1-1-2021	1.83	0.00	96,32	86,52	81,53	92,33	114,46	100	87,33	88,26	84,32	65,24	100,05	●	●	●	216		
DE-4-1-90468-2020	DE-4-1-2-2021	16.75	0.00	94,35	77,52	69,53	96,43	118,47	98	81,35	83,31	81,36	79,29	101,11	●	●	●	217		
DE-4-1-90419-2020	DE-4-1-1-2021	13.55	22.26	89,62	60,74	37,74	108,61	133,69	98	69,62	67,56	64,61	59,52	103,31	●	●	●	218		
DE-4-1-90578-2018	DE-4-1-3-2019	1.31	4.50	85,48	76,61	60,61	100,42	122,56	97	77,48	81,42	83,47	94,38	101,28	●	●	●	4		
DE-4-1-383-2019	DE-4-1-1-2020	8.42	11.55	87,67	98,76	101,76	103,73	111,73	104	97,67	85,63	84,67	88,55	97,35	●	●	●	Av	56	
DE-4-1-416-2019	DE-4-1-1-2020	2.73	6.11	91,53	99,62	101,62	106,57	108,57	105	99,53	96,49	92,52	99,45	101,29	●	●	●	Av	57	
DE-4-1-405-2019	DE-4-1-1-2020	8.42	11.55	85,69	98,79	106,78	109,76	109,77	105	100,69	89,68	84,72	84,60	97,40	●	●	●	Av	58	
DE-4-1-90636-2018	DE-4-1-2-2019	8.36	7.12	84,49	65,62	55,63	96,45	122,57	94	71,49	83,43	75,47	78,40	102,31	●	●	●	59		

Abbildung 25: Zuchtwertliste in BeeBreed, sortiert nach Spalte „eingefroren“

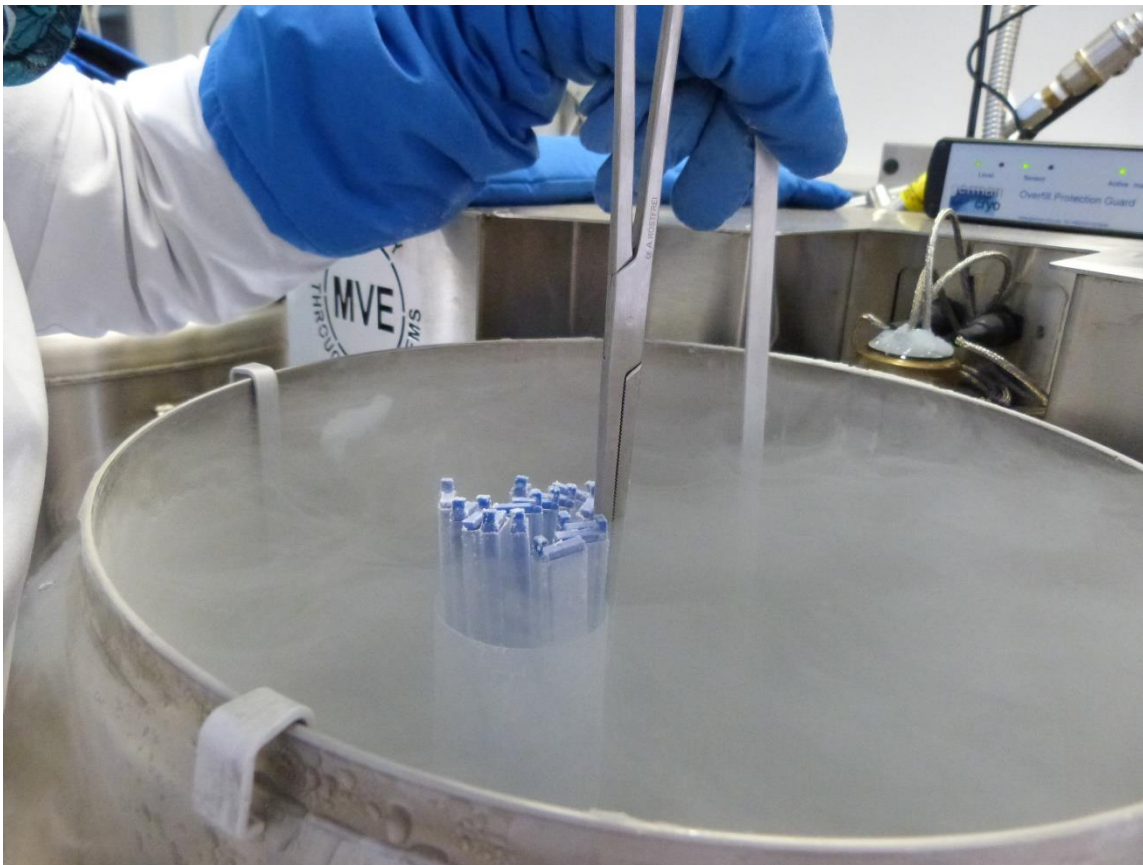


Abbildung 26: Einlagerung der Proben in die Genbank Landwirtschaftlicher Nutztiere am Friedrich-Loeffler-Institut Mariensee.

5.10 Dokumentation der Proben

Tabelle 6: Carnica-Proben aus Deutschland mit Zuchtbuchnummern, Züchtern und Standorten.

Nr.	ZBNr	Züchter	Standort
1	DE-4-1-90642-18	Länderinstitut für Bienenkunde	Hohen Neuendorf
2	DE-4-1-90598-18	Länderinstitut für Bienenkunde	Hohen Neuendorf
4	DE-4-1-90578-18	Länderinstitut für Bienenkunde	Hohen Neuendorf
6	DE-14-21-101-18	Wilfried Götze	Gurten
7	DE-14-21-145-18	Wilfried Götze	Ütschenteich
10	DE-7-45-508-2017	Bieneninstitut Kirchhain	Kirchhain
11	DE-7-45-494-2017	Bieneninstitut Kirchhain	Kirchhain
12	DE-7-45-179-2017	Bieneninstitut Kirchhain	Kirchhain
13	DE-7-45-333-2016	Bieneninstitut Kirchhain	Kirchhain
14	DE-19-9-3217-2017	Martin Rimmele	Meckenbeuren
15	DE-19-9-4317-2017	Martin Rimmele	88361 Altshausen-Ingenhardt
16	DE-1-30-15-2017	Herbert Siebold	79725 Laufenburg
17	DE-1-5-6-2017	Martin Böhler	Malsch
18	DE-4-1-90599-2018	Länderinstitut für Bienenkunde	Hohen Neuendorf
19	DE-4-7-23-2018	Heinz Dehn	Vogelsdorf
20	DE-4-7-6-2018	Heinz Dehn	Vogelsdorf
21	DE-4-279-15-2018	Oliver Schulze	
22	DE-4-304-90-2018	Klaus Brockmann	
23	DE-4-320-18-2019	Birgit Brockmann	Fehrbellin/
24	DE-4-320-17-2019	Birgit Brockmann	Fehrbellin/
25	DE-4-301-26-2019	Jürgen Hundertmark	15306 Gusow
26	DE-4-263-10-2019	Wilfried Jank	Cottbus
27	DE-2-136-8006-2018	Franz Krieger	Georgenschwimmbach/Frontenhausen
28	DE-2-136-8003-2018	Franz Krieger	Georgenschwimmbach/Frontenhausen
30	DE-2-196-384-2018	Werner Zwillich	Maintal
31	DE-2-211-876-2018	Rüdiger Wintersperger	Laupertshausen
32	DE-2-736-74-2018	Angela Tholen	Coburg
33	DE-2-365-1976-2019	Josef Strobel	Wald (Bienenhaus)
35	DE-2-736-80-2018	Angela Tholen	Coburg
37	DE-2-233-72-2018	Franz Karl Reitberger	84389 Postmünster, Nussing
38	DE-2-211-894-2018	Rüdiger Wintersperger	Laupertshausen
39	DE-2-198-38-2018	Günter Schmid	Oberfrohnhstetten
40	DE-2-221-57-2018	Dirk Ahrens	Hubland
41	DE-2-281-24-2019	Emma Hoisl	94113 Tiefenbach
43	DE-2-70-59-2018	Martin Perner	Marktheidenfeld,
44	DE-2-221-22-2019	Dirk Ahrens	Hubland
45	DE-2-211-962-2019	Rüdiger Wintersperger	Laupertshausen
46	DE-2-305-204-2018	Josef Kerscher	Hunderdorf
47	DE-2-70-17-2019	Martin Perner	Marktheidenfeld, am Erlenbach
48	DE-2-305-201-2018	Josef Kerscher	Hunderdorf
49	DE-2-221-60-2019	Dirk Ahrens	Hubland
50	DE-4-296-3-2017	Ronald Wenzel	Falkenhagen
51	DE-4-263-11-2018	Wilfried Jank	Cottbus
52	DE-4-302-25-2018	Peter Grafe	Elsterwerda
53	DE-4-302-6-2018	Peter Grafe	Elsterwerda
54	DE-4-292-8-2018	Jörg Bredow	155518 Briesen
55	DE-4-301-15-2018	Jürgen Hundertmark	15306 Gusow

56	DE-4-1-383-2019	Länderinstitut für Bienenkunde	Hohen Neuendorf
57	DE-4-1-416-2019	Länderinstitut für Bienenkunde	Hohen Neuendorf
58	DE-4-1-405-2019	Länderinstitut für Bienenkunde	Hohen Neuendorf
59	DE-4-1-90636-2018	Länderinstitut für Bienenkunde	Hohen Neuendorf
61	DE-14-118-19-2018	Gerhard Frenzel	Osterwieck im Fallstein
62	DE-6-11-1-2019	Beate + Ludwig Schweitzer	Duttenstedt Kippe
63	DE-17-85-1-2018	Georg Macha	Bremen Burglesum
65	DE-17-159-47-2017	Hinrich Lengert	Südbrookmerland
66	DE-8-1-8353-2018	Bienenzuchtzentrum Bantin/ Harm Biermann	BZZ Bantin
67	DE-6-39-851-2018	Aribeit Prill	Eldagsen
68	DE-8-1-8219-2018	Bienenzuchtzentrum Bantin/ Harm Biermann	BZZ Bantin
69	DE-17-213-54-2018	Helmut Gerken	Aurich-Rohe
70	DE-17-213-49-2018	Helmut Gerken	Aurich-Rohe
71	DE-6-11-5-2018	Beate + Ludwig Schweitzer	Duttenstedt Kippe
72	DE-6-36-1198-2018	Reinhard Andritschke	31832 Springe
73	DE-6-90-84-2018	Horst Schäfer	Großburgwedel,
74	DE-6-90-68-2018	Horst Schäfer	Großburgwedel,
75	DE-14-118-13-2018	Gerhard Frenzel	Osterwieck im Fallstein
76	DE-7-45-916-2018	Helmut Gerken	Aurich-Rohe
77	DE-6-198-74-2018	Horst Greve	Schneverdingen
78	DE-8-1-10344-2018	Bienenzuchtzentrum Bantin/ Harm Biermann	Bantin
79	DE-17-213-09-2017	Helmut Gerken	Aurich-Kirchdorf
80	DE-17-213-06-2017	Helmut Gerken	Aurich-Kirchdorf
81	DE-17-213-36-2018	Helmut Gerken	Aurich-Kirchdorf
82	DE-16-75-3114-2018	Frank Nieser	
83	DE-6-1-1935-2018	Bieneninstitut Celle/ Carl Rosenau	Celle
84	DE-6-1-0157-2018	Bieneninstitut Celle/ Carl Rosenau	Celle
85	DE-6-1-0124-2018	Bieneninstitut Celle/ Carl Rosenau	Celle
86	DE-8-198-034-2018	Gerhard Bork	Sembzin bei Warren
87	DE-8-198-948-2017	Gerhard Bork	Sembzin bei Warren
88	DE-8-170-56-2018	Resi Auerbach	Rostock
89	DE-8-170-55-2018	Resi Auerbach	Rostock
90	DE-8-120-471-2018	Christoph Schröder	Neu Wolkern
91	DE-8-120-469-2018	Christoph Schröder	Neu Wolkern
92	DE-8-198-813-2016	Gerhard Bork	Waren
93	DE-8-198-010-2018	Gerhard Bork	Waren
94	DE-8-216-14-2017	Andreas Krusen	
95	DE-8-120-467-2018	Christoph Schröder	Neu Wolkern
96	DE-8-120-465-2018	Christoph Schröder	Neu Wolkern
97	DE-8-219-46-2019	Stefan Köhler	Groß-Stove
98	DE-8-219-18-2019	Stefan Köhler	Groß-Stove
99	DE-8-7-64-2017	Harald Wäbs	18279 Reinshagen
100	DE-8-7-79-2018	Harald Wäbs	18280 Reinshagen
101	DE-16-75-3040-2017	Albrecht Stoß	
102	DE-4-299-16-2018	Roland Dietrich	Elsterwerda
103	DE-13-430-70-2019	Jörg Schubert	01796 Dohma
104	DE-13-417-19-2019	Armin Schmaus	

105	DE-2-227-846-2018	Alfred Ott	Solg
106	DE-13-400-1-2017	Thomas Funke	Reudnitz
107	DE-4-299-23-2018	Roland Dietrich	Elsterwerda
109	DE-13-430-29-2017	Jörg Schubert	01796 Dohma
110	DE-13-430-44-2018	Jörg Schubert	01796 Dohma
111	DE-13-417-31-2019	Armin Schmaus	
112	DE-16-310-69-2017	Uwe Lindemann	Meuselbach
113	DE-2-227-827-2018	Alfred Ott	Solg
114	DE-2-293-870-2018	Alfred Ott	Solg
115	DE-13-90-571-2018	Gerd Seidel	02681 Crostau
116	DE-13-90-568-2018	Gerd Seidel	02681 Crostau
117	DE-16-310-195-2018	Uwe Lindemann	Meuselbach
118	DE-2-227-882-2018	Alfred Ott	Solg
139	DE-19-40-29-2019	Thomas Leukhardt	72336 Balingen
140	DE-19-40-30-2019	Thomas Leukhardt	72336 Balingen
141	DE-19-40-137-2018	Thomas Leukhardt	72336 Balingen
142	DE-19-9-1119-2019	Martin Rimmele	88361 Althausen
143	DE-19-40-141-2019	Thomas Leukhardt	72336 Balingen
144	DE-19-142-86-2018	Manfred Wangler	78739 Hardt
145	DE-19-1-6419-2019	Dr. Frank Neumann	88326 Aulendorf.
146	DE-19-142-08-2018	Manfred Wangler	78739 Hardt
147	DE-19-142-91-2019	Manfred Wangler	78739 Hardt
148	DE-19-1-1419-2019	Dr. Frank Neumann	88326 Aulendorf.
149	DE-19-9-2619-2019	Martin Rimmele	88361 Althausen
150	DE-18-501-5-2019	Manfred Bolick	46499 Hamminkeln
151	DE-18-104-03-2020	Frank Keller	57223 Kreuztal
153	DE-1-5-100-2020	Martin Böhrer	79111 Freiburg, St. Georgen
154	DE-18-306-44-2019	Gerhard Burkamp	32312 Lübbecke
155	DE-18-306-30-2019	Gerhard Burkamp	32312 Lübbecke
156	DE-19-170-32-2018	Friedrich Pfaff	78713 Schramberg
157	DE-19-9-6819-2019	Martin Rimmele	88361 Althausen
159	DE-11-70-1535-2018	Eckhard Uhlenbruck	46569 Hünxe
160	DE-18-104-04-2020	Frank Keller	57223 Kreuztal
161	DE-18-501-9-2019	Manfred Bolick	46499 Hamminkeln
162	DE-9-2-1932-2019	Siegfried Heuzeroth	57629 Mörsbach
163	DE-9-2-4023-2019	Siegfried Heuzeroth	57629 Mörsbach
164	DE-9-2-1687-2019	Siegfried Heuzeroth	57629 Mörsbach
165	DE-19-142-92-2019	Manfred Wangler	78739 Hardt
166	DE-18-501-5-2018	Manfred Bolick	46499 Hamminkeln
167	DE-1-7-17-2019	Roswitha Wildauer	76316 Malsch
168	DE-11-70-1032-2019	Eckhard Uhlenbruck	46569 Hünxe
170	DE-11-70-1528-2018	Eckhard Uhlenbruck	46569 Hünxe
171	DE-18-206-42-2019	Friedrich Blase	32312 Lübbecke
172	DE-18-206-15-2020	Friedrich Blase	32312 Lübbecke
173	DE-11-70-1526-2019	Eckhard Uhlenbruck	46569 Hünxe
174	DE-18-801-28-2020	Heinz-Josef Klein-Hitpaß	46499 Hamminkeln
175	DE-11-70-1018-2018	Eckhard Uhlenbruck	46569 Hünxe
176	DE-11-70-1518-2019	Eckhard Uhlenbruck	46569 Hünxe
177	DE-18-901-11-2018	Bernhard Krasenbrink	46395 Bocholt
178	DE-18-801-22-2020	Heinz-Josef Klein-Hitpaß	46499 Hamminkeln
179	DE-19-170-59-2020	Friedrich Pfaff	78713 Schramberg

180	DE-18-801-40-2020	Heinz-Josef Klein-Hitpaß	46499 Hamminkeln
181	DE-1-5-18-2019	Martin Böhler	79111 Freiburg, St. Georgen
183	DE-6-198-70-2018	Horst Greve	Wichhorst
184	DE-15-222-11-2020	Karl-Heinz Güldner	21371 Tosterglope
185	DE-15-222-29-2019	Karl-Heinz Güldner	21371 Tosterglope
186	DE-15-57-23-2020	Hans-Joachim Totzek	21521 Dassendorf
187	DE-15-57-03-2020	Hans-Joachim Totzek	21521 Dassendorf
188	DE-15-110-01-2019	Jörg Schulz	24113 Kiel
189	DE-15-57-12-2020	Hans-Joachim Totzek	Hohenhorn
190	DE-15-114-71-2020	Stephan Krug	24113 Kiel
191	DE-15-57-28-2020	Hans-Joachim Totzek	Hohenhorn
192	DE-15-57-17-2020	Hans-Joachim Totzek	21521 Dassendorf
193	DE-15-106-76-2019	Horst-Ulrich Boehmer	24220 Flintbek
194	DE-15-106-051-2019	Horst-Ulrich Boehmer	24220 Flintbek
195	DE-15-223-94-2020	Georg Petrausch	22525 Hamburg
196	DE-15-223-38-2019	Georg Petrausch	22525 Hamburg
197	DE-15-223-19-2020	Georg Petrausch	22525 Hamburg
198	DE-15-63-10-2019	Hans-Joachim Burmester	23881 Bälau
199	DE-6-131-66-2019	Andreas Rohe	Hamburg
201	DE-6-209-7-2019	Clemens Tandler	21224 Rosengarten
202	DE-6-209-8-2019	Clemens Tandler	Hamburg
203	DE-6-131-1-2019	Andreas Rohe	Hittfeld
204	DE-15-63-1-20219	Hans-Joachim Burmester	23881 Bälau
205	DE-15-114-77-2019	Stephan Krug	24113 Kiel
207	DE-15-114-90-2020	Stephan Krug	24113 Kiel
210	DE-4-268-109-2020	Fred Zautke	17509 Wusterhusen/ OT Gubin
211	DE-4-268-107-2020	Fred Zautke	17509 Wusterhusen/ OT Gubin
216	DE-4-1-90453-2020	Länderinstitut für Bienenkunde	16540 Stolpe/ Hohen Neuendorf
217	DE-4-1-90468-2020	Länderinstitut für Bienenkunde	16567 Mühlenbeck
218	DE-4-1-90419-2020	Länderinstitut für Bienenkunde	16540 Stolpe/ Hohen Neuendorf
223	DE-11-1-10504-2020	Fachzentrum für Bienen und Imkerei Mayen	Mayen/Kuhtrift

Tabelle 7: Proben Carnica außer Deutschland.

Nr.	Land	ZBNr	Züchter	Standort
119	Slowenien	34186/2020	Vasja Jug	Schmachtenhagen
120	Slowenien	55582/2020	Darko Grm	Schmachtenhagen
121	Slowenien	55579/2020	Darko Grm	Schmachtenhagen
122	Slowenien	31874/2020	Jozef Tratnjek	Schmachtenhagen
124	Slowenien	47104/2020	Janko Bukovsek	Schmachtenhagen
125	Slowenien	31873/2020	Jozef Tratnjek	Schmachtenhagen
126	Slowenien	31875/2020	Jozef Tratnjek	Schmachtenhagen
127	Slowenien	34183/2020	Vasja Jug	Schmachtenhagen
128	Slowenien	34184/2020	Vasja Jug	Schmachtenhagen
129	Slowenien	55580/2020	Darko Grm	Schmachtenhagen
130	Slowenien	55581/2020	Darko Grm	Schmachtenhagen
131	Slowenien	41923/2020	Ladislav Vozelj	Schmachtenhagen
132	Slowenien	34185/2020	Vasja Jug	Schmachtenhagen
133	Slowenien	31877/2020	Jozef Tratnjek	Mühle
136	Slowenien	41925/2020	Ladislav Vozelj	Schmachtenhagen
137	Slowenien	Brane Kozinc II	Brane Kozinc	Schmachtenhagen
138	Slowenien	Brane Kozinc I	Brane Kozinc	Schmachtenhagen
152	Slowenien	47106/2020	Janko Bukovsek	
206	Österreich	AT-99-99-24-2020	Andreas Rohe	Moor (Hamburg)

Tabelle 8: Mellifera-Proben mit Zuchtbuchnummern, Züchtern und Standorten.

Nr.	Land	ZBNr	Züchter	Standort	Bemerkung
123	Norwegen	161.1820.332	Björn Dahle	Schmachtenhagen	Nachkomme von NO-1-78-332-2018, deren Mutter (NO-1-999-3-2017) aus Irland stammt
134	Norwegen	128.1820.132	Björn Dahle	Schmachtenhagen	Nachkomme von NO-1-999-4-2017 aus Irland
135	Norwegen	69.1820.386	Björn Dahle	Schmachtenhagen	Nachkomme einer norwegischen Zuchtkönigin aus 2004
169	Deutschland	DE-44-2020-004			
212	Deutschland	DE-005-018-2019	Hartmut Skerka	14641 Wustermark/ OT Priort	
213	Deutschland	DE-44-3-2020	Klaus Albiez	73252 Lenningen	
214	Deutschland	DE-44-4-2020	Klaus Albiez	73252 Lenningen	
215	Deutschland	DE-12-2020-001	Melanie Klatt	85353 Glött	
219	Belgien	BE-2-11-78-2020	Dylan Elen	Schmachtenhagen	Stammen von VSH-Linie ab
220	Belgien	BE-2-15-12-2019	Dylan Elen	Schmachtenhagen	Stammen von VSH-Linie ab
221	Belgien	BE-2-999-38-2020	Dylan Elen	Schmachtenhagen	Stammen von VSH-Linie ab
222	Belgien	BE-2-999-93-2021	Dylan Elen	Schmachtenhagen	Stammen von VSH-Linie ab
225	Deutschland	JS-27-2021	Jörg Schock	Pförtzheim	Abstammung - Altai (Zentralsibirien)
226	Deutschland	JS-81-2021	Jörg Schock	Pförtzheim	Abstammung - Bjornholm (Schweden)
227	Deutschland	JS-66-2021	Jörg Schock	Pförtzheim	Abstammung - Tjörhammer (Island)
228	Deutschland	JS-35-2021	Jörg Schock	Pförtzheim	Abstammung - Skaulunt (Schweden)
233	Polen	PL-804/20	Małgorzata Bieńkowska	Puławy	
234	Polen	PL-817/20	Małgorzata Bieńkowska	Puławy	
235	Polen	PL-826/20	Małgorzata Bieńkowska	Puławy	
236	Polen	PL-96/2019	Małgorzata Bieńkowska	Puławy	
237	Polen	PL-44/2021	Małgorzata Bieńkowska	Puławy	

6. Diskussion der Ergebnisse des Vorhabens

6.1 Technische Ergebnisse

Durch die erstmalige Anwendung der Kryokonservierung im Rahmen der Erhaltung genetischen Materials wurden viele Methoden erstmalig in der Praxis umgesetzt. Der Prozess der Kryokonservierung war zwar in Vorläuferstudien etabliert, und zwar vor allem im Projekt LaBis (Entwicklung von Kryotechniken für die Zucht von Honigbienen, 2009-2012), ohne die tatsächliche Umsetzung der Einlagerung in eine nationale Genbank war aber lediglich das Technologierealisierungslevel (TLR) der Stufe 4 erreicht. Durch das Projekt wurde das Verfahren auf Stufe 8 gehoben, weil qualitätsgeprüftes Material die Deutsche Genbank eingelagert wurde, wobei insbesondere die flächendeckende Überprüfung der Spermaqualität, der Virenanalyse, der Reinrassigkeit und der Auftaufähigkeit von entscheidender Bedeutung sind.

Die Dokumentation der Proben unterliegt einem klar umrissenen „Access and Benefit Sharing“, was den tatsächlichen späteren erfolgreichen Einsatz der Proben verbessert. Durch die entwickelten Standards in Vorkontrolle, Dokumentation und Probennahme wurden die bereits etablierten technischen Methoden um die prozessorientierte Dimension erweitert.

Die Stufe 9 kann als erreicht betrachtet werden, wenn eine Notlage einer genetischen Verengung eingetreten ist, die unter Verwendung der Genbank abgewendet wird. Das kann naturgemäß erst nach vielen Jahren erreicht werden. Die Stufe kann ebenfalls als erreicht gelten, wenn es kommerzielle Käufer von kryokonservierten Proben gibt, was ebenfalls ungewiss ist. Auch wenn Zucht- oder Erhaltungsverbänden die Kryokonservierung als Dienstleistung nachfragen.

6.2 Prozedere zur Nutzung der Ressourcen

Die Erstellung des Prozederes zur eventuellen zukünftigen Nutzung der Ressourcen in der Genbank war nicht Bestandteil des Projektes und ist derzeit noch nicht festgelegt.

In den Übergabeprotokollen der Drohnenproben (siehe Abschnitt 8.14) ist festgelegt, dass die Entscheidung über Verwendung des Materials dem Leitungsgremium der Genbank obliegt, sich dabei aber mit dem LIB und dem D.I.B. abspricht.

Daraus ergibt sich, dass die Genbank das Prozedere in Form einer Vereinbarung festlegt. Wichtige Bestandteile dieser Vereinbarung sind:

1. die genauere Spezifizierung einer Situation, die die Ausschöpfung der Genreserve erfordert
2. die Festlegung eines Entscheidungsgremiums, das über den Eintritt der Ausübungssituation befindet
3. die Festlegung des Ablaufs der Probenreaktivierung
4. die Festlegung, wie mit den Bienenvölkern, die aus der Besamung mit den konservierten Spermienproben hervorgehen, verfahren wird, und
5. die Festlegung, was mit den Daten geschehen soll, die aus den ebenfalls eingelagerten Referenz-Proben gewonnen werden.

6.3 Auswirkungen auf die Gesamtsituation genetischer Reserven

Die Sicherung der genetischen Vielfalt landwirtschaftlicher Nutztiere ist international wie national ein erklärtes Ziel. Folgerichtig ist die Erhaltung der genetischen Vielfalt im Nationalen Fachprogramm zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung tiergenetischer Ressourcen in Deutschland als auch im Tierzuchtgesetz hinterlegt. Unterstützend zur Lebenderhaltung spielt die Kryokonservierung von Keimzellen eine erhebliche Rolle bei der Erhaltung der biologischen Vielfalt. Dieser Aufgabe trägt die Deutsche Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere Rechnung, die im Jahre 2016 als Bund-Länder Vereinbarung gegründet wurde. Die Geschäftsführung und die Führung eines Kernbestandes jeder Nutztierart wurde dem Institut für Nutztiergenetik des Friedrich-Loeffler-Instituts übertragen. Seit Gründung der Deutschen Genbank wurde reproduktionsfähiges Material der Tierarten Rind, Schaf, Ziege, Schwein und Pferd sowie der Tierart Huhn eingelagert. Die aus dem ReBiS hervorgegangenen Proben der Honigbiene stellt eine wertvolle Ergänzung des Genbankbestandes dar, da diese Tierart bis dahin nicht in der Genbank vertreten war. Es trägt der hohen Bedeutung der Bienen in der landwirtschaftlichen Produktion Rechnung, deren Vielfalt durch vielfältige Faktoren ebenso wie bei anderen Nutztierarten bedroht ist.

Mit dem hier beschriebenen Projekt wurde erstmalig eine Kryokonservierung von Bienen durchgeführt. In der Zukunft wurde damit ein neuer Zweig des Erhalts von genetischen Ressourcen eröffnet, der die konventionellen Wege wie Refugien, Schutzgebiete und Erhaltungszuchten ergänzt.

6.4 Welche Verbesserungen konnten im Rahmen des Vorhabens für die Praxis erzielt werden?

Die Kryokonservierung stellt einen umfassenden Prozess dar, der neben den technischen auch imkerliche, administrative, logistische, soziale, agrarwissenschaftliche, biologische und juristische Elemente enthält. Durch die praktische Umsetzung der Kryokonservierung wurden alle diese Bereiche berührt, die sich nun ihrerseits auf den Impuls dieses Projektes hin weiterentwickeln.

So wurde ein umfassender Diskussionsprozess in den Bienenzuchtverbänden in Gang gesetzt, welche Zuchtlinien überhaupt erhaltenswert sind. Naheliegender Weise sind Bienen erhaltenswert, die besondere, für den Imker nützliche Eigenschaften aufweisen, die möglicherweise in der Weiterzucht verlorengehen können. Allerdings sind auch Bienen erhaltenswert, die ursprüngliche Ressourcen darstellen, auch wenn sie imkerlich weniger wünschenswert sind, weil sie genetische Eigenschaften aufweisen, die in Kombination mit sich weiter entwickelnden Bienen irgendwann einmal wieder gebraucht werden können. Daraus ergibt sich die Frage, welche Bienen denn nicht erhaltenswert sind. Diese Frage hat keine allgemeingültige Antwort, allerdings fallen überzüchtete, in eine genetische Sackgasse geratene Zuchtlinien darunter, die auch keine imkerlich sinnvollen Eigenschaften mehr aufweisen.

Die logistischen Herausforderungen zeigten sich erst in der praktischen Umsetzung. Mit Sicherheit ist die persönliche Abholung von Drohnenwaben die sicherste Art des Transports, ist aber mit großem Aufwand verbunden. Der postalische Versand ist mit Unsicherheiten verbunden, die aber durch spezielle Vorkehrungen verringert werden können. All das sind praktische Ergebnisse, die wertvolle Informationen für verwandte Projekte liefern.

Während vor dem Projekt die Kryokonservierung lediglich eine theoretische Möglichkeit darstellte, existieren nun praktisch einsetzbare Proben in der deutschen Genbank. Der unmittelbare Verlust von genetischen Linien ist damit abgewendet, zumindest für die in der Genbank eingegangenen Linien.

6.5 Wurden Grenzen der Einsetzbarkeit der angewandten Methoden identifiziert?

Durch den hohen Anteil von Viren in den eingefrorenen Proben wurde deutlich, dass hier noch Forschungsbedarf besteht, denn mit dem Einsatz der kryokonservierten Proben in der Zukunft werden auch diese Viren aktiviert. Dieser Umstand limitiert unter Umständen die Bereitschaft zur Nutzung der Ressourcen, denn deformierte-Flügel-Virus und Akute Bienenparalyse-Virus gehen mit erhöhter Völkersterblichkeit einher (Meixner *et al.* 2014). Das spielt dann eine Rolle, wenn die allgemeine Verbreitung der entsprechenden Viren zurückgegangen sein wird und sie durch den Einsatz der Probe wieder reaktiviert werden.

Der Gesamtaufwand für eine einzelne Kryokonservierung ist noch relativ hoch. Durch die kontrollierte Haltung der Pflegevölker, der Spermaabnahme und den Einfrierprozess bedingt müssen an der Institution, die die Kryokonservierung vornimmt, bauliche Voraussetzungen geschaffen werden. Insbesondere die Qualitätskontrolle ist aufwändig. Auf dem derzeitigen Stand ist also die Kryokonservierung noch keine Routinetätigkeit, die jährlich wiederholt werden kann, und in den Zuchtprozess integriert werden kann.

6.6 Bewertung der Umsetzbarkeit in anderen Ländern

Das Projekt hat international sehr viel Beachtung gefunden. Durch die Spiegelung der eingelagerten ausländischen Proben in ihren Herkunftsländern wurde in Slowenien und Norwegen erstmalig genetische Ressourcen eingelagert, in Polen ist das gleiche in Vorbereitung. Aus der Teilnahme eines Wissenschaftlers von der Universität Saragossa an unserem Kurs für Kryokonservierung ergab sich, dass auch in Spanien eine Probensammlung und Kryokonservierung vorbereitet wird. Durch ein internationales Netzwerk von Kryobanken wäre durch die Spiegelung das Risiko von Verlusten durch technische Zwischenfälle geringer, auch die insgesamt verfügbare Vielfalt ist höher. Der Umsetzung in weiteren Ländern steht nichts im Wege.

6.7 Über das Vorhaben hinaus gewonnene Erkenntnisse

Die postalische Versendung von Drohnenbrut ist im Rahmen der Reduktion des Fahraufwandes getestet und praktiziert worden. Dabei wurden einige Verbesserungen eingeführt, welche die Erfolgsrate erhöht haben. Diese Erkenntnisse sind auch für die Durchführung von Besamungsaktionen von Interesse.

Die fehlgeschlagene Österreichische Probenübernahme ist im Rahmen von sanitären Kontrollen interessant, da vor dem Versand die Seuchenfreiheit geprüft und amtlich bestätigt wurde, bei der Ankunft hingegen Faulbrut nachgewiesen wurde. Dieser Umstand wirft einige Fragen auf, deren Beantwortung von hoher Relevanz für die Verhinderung der Ausbreitung von Bienenkrankheiten ist.

6.8 Wissenstransfer der im Vorhaben gewonnen Erkenntnisse

6.8.1 Vorträge

Viert, V. *et al.*, via Zoom am 24.03.2021. Genbank Honigbiene: Bisheriger Stand und Ergebnisse. Züchertagung des Deutschen Imkerbundes

Viert, V. *et al.*, via Zoom am 24.03.2021. Genbank Honigbiene: Anlage einer Genreserve für den deutschen Bienensektor. 68. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V.

Viert, V. *et al.*, LIB am 05.11.2021 . Genbank Honigbiene: Anlage einer Genreserve für den deutschen Bienensektor. Tagung des Zuchtverbands „Dunkle Biene Deutschland“

Wegener, J. *et al.*, Weimar am 09.10.2021. Drohnensperma, künstliche Besamung und Honigbienen-Samenbanken. Praxistag des Landesverbands Thüringischer Imker

Sitzung des Fachbeirats tiergenetische Ressourcen, Köllitsch (Sachsen)

Die Projektmitarbeiterin des LIB, Frau V. Viert, präsentierte die Ergebnisse des Projekts sowie die Einfriermethode im Juli 2022 einem hochkarätigen Fachpublikum im Rahmen eines Workshops über Reproduktionsbiologische Techniken in der Bienenzucht an der Washington State University (Pullman, USA).

6.8.2 Veröffentlichungen

Viert, V., Wegener, J. & Bienefeld, K. (2021): Europe's First Gene Bank for Honey Bees, Bee World, DOI: 10.1080/0005772X.2021.1927576

6.8.3 Schulungsvideo zur Kryokonservierung von Drohnensperma

Mit diesem Auftrag wurde die Produktionsfirma Thissen (Berlin) betreut, welche auch die Lehrfilme im parallel am LIB durchgeführten MuD-Projekt BieDiv drehte. Durch diese Mehrfach-Beauftragung kam es zu erheblichen Synergien bei den Dreharbeiten, da viele Aufnahmen für beide Projekte am selben Tag und am gleichen Ort gedreht werden konnten. Das erzeugte Video ist ca. 14 Minuten lang und zeigt von der Aufzucht der Drohnen über Sperma-Abnahme und Kryokonservierung bis zur Besamung mit dem aufgetauten Sperma alle Techniken und alle nötigen Arbeiten im Detail. Zusammen mit einer ausführlichen schriftlichen Anleitung inklusive Materiallisten findet sich das Video auf der Webseite des Instituts unter „Allgemeine Informationen“ / „Zucht“. Damit sollte es nun auch anderen Akteuren möglich sein, die eingelagerten Proben der Genbank Landwirtschaftlicher Nutztiere zu nutzen, oder die Sammlung zu ergänzen.

6.8.4 Praxiskurs zur Schulung interessierter Imker, Züchter und Bienenwissenschaftler

Dieser Kurs fand vom 13. bis zum 16.07.2022 am LIB statt. Da für jede/n Teilnehmer/in große Mengen Drohnenspermas sowie unbegattete Königinnen bereitgestellt werden mussten, mussten wir die Teilnehmerzahl niedrig halten. Insgesamt acht Personen wurden schließlich geschult. Da die beantragten Mittel für den Reisekostenzuschuss nicht bewilligt worden waren, wurden die Kosten für Reise und Unterkunft von den entsendenden Verbänden und Instituten übernommen, was das große Interesse an den Projektergebnissen illustriert. Es handelte sich um zwei Vertreter der deutschen Carnica-Zucht, zwei Vertreterinnen der österreichischen Carnica-Zucht, zwei Vertreterinnen des polnischen Instituts, welches die Einrichtung einer eigenen Genbank plant, sowie um je eine Vertreterin/Vertreter aus Instituten in Spanien und Italien, die ebenfalls bald mit der Einlagerung eigener genetischer Ressourcen beginnen möchten. Ein Vertreter der deutschen Mellifera-Zucht musste leider aufgrund einer plötzlichen

Erkrankung absagen. In sehr angenehmer Atmosphäre erhielten die Anwesenden die Gelegenheit, selbst Sperma für das Einfrieren vorzubereiten, einzufrieren und später auch wieder aufzutauen. Auch die wichtigsten Qualitätstests an frischem und aufgetautem Sperma wurden demonstriert. Den meisten gelang es auch, mit dem aufgetauten Material selbst Königinnen zu besamen.

7. Abschließende Evaluierung des Vorhabens

7.1 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den erreichten Zielen

In der folgenden Aufstellung werden die Elemente des Arbeitsplans der Vorhabensbeschreibung mit den entsprechenden Gliederungspunkten referenziert und die Umsetzung bewertet.

7.1.1 Erarbeitung eines Konzepts zum „Access and Benefit Sharing“ für die einzulagernden Ressourcen (III.1.1)

Das Konzept zum „Access and Benefit Sharing“ für die einzulagernden Ressourcen wurde erarbeitet und umgesetzt.

7.1.2 Erarbeitung von Standards für die Vorkontrolle, Dokumentation und Probennahme (III.1.2)

Die Standards für die Vorkontrolle, Dokumentation und Probennahme wurde erarbeitet und auch umgesetzt.

7.1.3 Identifizierung von 10 einzufrierenden Unterpopulationen innerhalb der deutschen Bienenpopulation für die Kryokonservierung (III.1.3)

Die Identifizierung der geplanten 10 einzufrierenden Unterpopulationen innerhalb der deutschen Bienenpopulation wurde nicht streng umgesetzt, weil es außer den Unterschieden zwischen *A. m. carnica* und *A. m. mellifera* keine stark abgegrenzten Unterpopulationen gibt. Es wurde vielmehr den Empfehlungen des Auswahlgremiums gefolgt, das konkrete Züchter zur Probennahme vorgeschlagen hat, von denen der größte Teil der Proben genommen wurde.

7.1.4 Entwicklung von Methoden zum Postversand junger Drohnenbrut (III.1.4)

Es wurde zwei umfangreiche Versuche zum Postversand durchgeführt. Es zeigten sich Probleme, die verdeutlichten, dass hier vor Projektbeginn tatsächlich Forschungsbedarf bestand. Am Ende wurde jedoch eine Lösung etabliert, die sich als tragfähig erwiesen hat.

7.1.5 Erarbeitung eines Konzepts zur Referenzierung der Proben in der Datenbank der Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere und FABIS (III.1.5)

Das Konzept wurde umgesetzt, indem ein Code aus 4 Elementen erstellt wurde. Die erste Komponente ist eine fortlaufende Nummer der Kryokonservierung. Die zweite Komponente markiert der Probentyp als Sperma, Arbeiterin, Drohne und Gewebeprobe. Die dritte Komponente ist die Zuchtbuchnummer in BeeBreed oder dem entsprechenden nationalen Verzeichnis.

7.1.6 Entnahme und Einlagerung der genetischen Ressourcen (III.1.6)

Die Drohnenwaben wurden auf zahlreichen Sammeltouren gesammelt. Im Ausland lebende Spender versendeten Königinnen, aus deren Völkern die Drohnen im LIB oder einen Kooperationsstand in Schmachtenhagen entnommen wurden. Das Sperma wurde im LIB abgenommen und eingefroren. Zur Einlagerung wurden die Proben mit einem Spezialversand nach Mariensee überführt, wo sie eingelagert wurden.

7.1.7 Einbeziehung von ausländischen Ökotypen/Unterarten, die für die Nachhaltigkeit der deutschen Bienenzucht essentiell sind (III.1.7)

Es wurden Bienen aus Slowenien, Norwegen, Belgien, Polen und Österreich eingefroren, einzelne Proben gehen auch auf Herkünfte aus Irland zurück. Während die Bienen aus Slowenien und Österreich die ursprüngliche Herkunft der *A. m. carnica* darstellen, sind die Bienen aus Norwegen, Belgien, Polen und Irland teilweise Refugien der ursprünglichen *A. m. mellifera*, teilweise auch Bienenpopulationen, die von der deutschen autochthonen *A. m. mellifera* beeinflusst wurde.

7.1.8 Modellhafter Einsatz von Kryo-Material in einem *in situ*-Zucht/Erhaltungsprogramm (III.1.8)

Die Spermaproben der Varroa-Selektionslinie wurden erfolgreich in Königinnen besamt, die nachzuchtfähige Völker aufgebaut haben. Damit ist der prinzipielle Weg, kryokonservierte Proben praktisch einzusetzen, etabliert.

7.1.9 Schulung von Erhaltungszüchtern bezüglich der Verwendung von Kryosperma (II.1.9)

Der geplante Kurs wurde durchgeführt. Einer der Teilnehmer aus Spanien hat unmittelbar danach ein nationales Kryokonservierungsprogramm eingeleitet. Um zu einer noch größeren Verbreitung der Idee der Kryokonservierung beizutragen, wurde ein Film erstellt.

7.2 Forschungsbedarf, der sich aufgrund der Umsetzung des Vorhabens ergeben hat

Aus dem hohen Anteil der Proben, die Viren enthalten ergeben sich eine Reihe von Fragestellungen: Ist es möglich und realisierbar, in einer Vorabuntersuchung auf Virenfreiheit zu untersuchen? Ist das auch wünschenswert, d. h. ist die Wiedereinführung einer alten Virengenetik ein relevantes Problem? Wie lässt sich das Übertragungsrisiko von Viren auf die Zielvölker durch die Besamung bestimmen? Haben die „virenfreien“ Spermaproben einen Vorteil in Bezug auf den Begattungserfolg und die Nutzbarkeit der Genreserve?

Trotz der Ergebnisse des Diskussionsprozesses mit den Verbänden ist es eine weiterhin offene Frage, wie sich die Erhaltungswürdigkeit von Bienenherkünften objektiv bemessen lässt. Naturgemäß gibt es darüber die unterschiedlichsten Ansichten darüber, was der Wert einer Zuchtlinie ist, und in den meisten Fällen haben Bienenhalter gute Gründe für die Auswahl ihrer Bienen und gleichermaßen für die Erhaltungswürdigkeit. Objektive Maßstäbe lassen sich nur aus Gesamtschau der genetischen Struktur der Gesamtpopulation gewinnen. Trotz aller Unterschiedlichkeit gibt es einen Minimalkonsens, der sich aus dem Erhalt der ursprünglichen Unterarten, der historischen Zuchtlinien, und der Bevorzugung von robusten Bienen im Sinne der Anpassbarkeit an zukünftige Herausforderungen ergibt. Allerdings besteht hier ein Deutungsspielraum der Charakterisierung, wann eine Biene robust und anpassbar ist, oder zu welcher Unterart, Zuchtrasse und Zuchtlinie sie gehört. Diese Uneindeutigkeit hat in der Vielfalt der Züchterschaft keine so große praktische Bedeutung wie in der Frage, welche Biene in der stark begrenzten Kapazität einer Genbank Platz findet.

7.3 Weiterführung der Kryokonservierung

Wegen des großen Aufwandes aller Arbeitsschritte — Einsammeln der Herkünfte, Drohnenaufzucht, Absamen, Einfrieren des Spermas und Referenzproben, Qualitätskontrollen — ist die direkte Fortführung aus Mitteln der Verbände und Institute nicht möglich auch wenn das wünschenswert wäre. Es ist weiterer Entwicklungsbedarf an der Verstetigung des

Verfahrens notwendig, um sie zu einer regulären Dienstleistung mit einem festen Preis zu etablieren.

Im internationalen Maßstab hat Deutschland mit der erstmaligen Einlagerung einer bedeutsamen Anzahl von Herkünften Maßstäbe gesetzt, die in verschiedenen Ländern zu vergleichbaren Aktivitäten geführt hat. So wird beispielsweise im EU-Projekt BeeGuards eine Arbeitsgruppe an der Universität Saragossa gefördert, die eine Genreserve von Bienensperma in Spanien anlegen wird. In dem Rahmen sich an unterschiedlichen Orten Prozesse der Anlage von Genreserven etablieren, werden auch die Erkenntnisse gewonnen, die wiederum auf die deutsche Genreserve zurückwirken, und die Einlagerung von Bienensperma oder gar Bienenembryonen zu einer permanenten Aktivität der Ausschöpfung, Umlagerung und Neukonservierung von Genreserven weiterentwickeln.

8. Protokolle und Methoden

8.1 Auswahl der einzulagernden Ressourcen

- Das Vorschlagsrecht für einzulagernde Ressourcen liegt bei dem auf der DIB-Züchtertagung im April 2019 in Wenden hierzu berufenen Gremium
- Die Mitglieder des Gremiums sind für unterschiedliche Teile der abzubildenden Population zuständig:
 - Herr Tiesler: DE-5, DE-6, DE-7, DE-15, DE-17, DE-18
 - Herr Famulla: DE-1, DE-9, DE-10, DE-11, DE-12, DE-19
 - Herr Götze: DE-3, DE-4, DE-8, DE-13, DE-14, DE-16
 - Herr Günthner: DE-2
 - Herr Ullrich: *A. m. mellifera* (Deutschland und Ausland)
- Um eine breite genetische Abdeckung zu erreichen, hat das LIB aufgrund der in der Zuchtdatenbank beebreed.eu hinterlegten Verwandtschaftsdaten eine Cluster-Analyse erstellt. Diese führt zu jedem Cluster Beispiel-Züchter auf. Die Gremiumsmitglieder bewerten den Dringlichkeitsgrad der Einlagerung des Materials dieser Züchter anhand der in Wenden vereinbarten Kriterien und teilen diesen dem LIB mit. Auch zusätzliche Vorschläge (z.B. Züchter, die in beebreed.eu nicht referenziert sind) sind willkommen.

8.2 Vorbereitung der Probennahme

- LIB oder LLH kontaktieren die vom Gremium vorgeschlagenen Züchter, vorzugsweise nach vorheriger „Kontakt-Anbahnung“ durch das zuständige Gremiumsmitglied. Dabei informieren sie über
 - Sinn der Kryoreserve
 - Notwendigkeit der Besitzübergabe des Materials an das LIB und Mitspracherechte bei einer späteren Verwendung
- Bei Bereitschaft zur Mitarbeit erkundigen sie sich nach Vorhandensein der interessierenden Königinnen. Alternativ kommen auch deren Töchter oder Schwestern in Betracht.
- Beschriftungen auf allen Probengefäßen entweder eingravieren/ritzen oder mit Wasser-+Ethanol-festem Marker vornehmen!
- Zur Vorbereitung der Probennahme versenden LIB oder LLH
 - pro Königin einen Nicot-Versandkäfig (Best.-Nr. Holtermann 4947 o.ä.) für Ganzkörper-Präparat Arbeiterinnen, vorbereitet mit festem Futterteig, vorbeschriftet mit Zuchtbuchnummer (falls bekannt)
 - pro Königin ein 50mL-Plastikgefäß (Best.-Nr. N462.1, Carl Roth, o.ä.) mit EtOH (>=96%; Reinheit Ph.Eur. oder höherwertig) für Morphometrie und Genotypisierung, vorbeschriftet mit Zuchtbuchnummer (falls bekannt)
 - Dokument „technische Anleitung zur Probennahme“
 - Dokument „Dokumentation der Probenentnahme“

8.3 Probennahme

- Die Entnahme kann entweder direkt durch Projektbeteiligte oder durch Helfer geschehen

- entnommen werden pro zu beprobendem Volk:
 - 5-10 junge Arbeitsbienen im Versandkäfig (lebend; bei Ankunft am LIB umverpackt in 2mL Cryotube
 - 20 junge Arbeitsbienen für Morphometrie und Genotypisierung
 - Eine ganze bis eine halbe vorzugsweise verdeckelte Drohnenwabe. Falls das Rähmchenmaß nicht „deutsch normal“ ist, muss die Wabe umgeschnitten werden.
- Ohne eine gültige Seuchenfreiheitsbescheinigung darf kein Material entnommen werden. Eine Kopie der Bescheinigung wird im LIB archiviert.
- Das zuvor verschickte Dokument „Dokumentation der Probenentnahme“ wird ausgefüllt wieder eingesammelt.
- Das Dokument „Überlassungsvertrag“ wird von Urheber/Besitzer des Materials und dem Vertreter des Instituts (LIB/LLH) unterzeichnet. Beide Parteien erhalten ein Exemplar.
- Der Transport der Drohnenwabe erfolgt vorzugsweise in einem mitgeführten Bienenvolk (zweiräumig, weiselrichtig, mit Gitterdeckel; vorzugsweise in der oberen Zarge). Bis zu 3 Waben können auch in bienenfreien Transportboxen (Va-Q-Proof, >24h vortemperiert auf 30°C) im Auto mitgeführt werden.

8.4 Drohnenaufzucht

- die Aufzucht erfolgt auf einem Stand abseits des LIB-Geländes („Briese“)
- die Drohnenaufzucht erfolgt in Ablegerbeuten in weisellosen Einheiten. Diese werden standardmäßig gebildet mit 2 verdeckelten Brutwaben und den ansitzenden sowie ca. 400g weiteren Bienen, 1 Futterwabe, 1 Pollenwabe. Sie werden schattig aufgestellt.
- Vor Einhängen der Drohnenwabe müssen diese Drohnen- und Drohnenbrut-frei gemacht werden.
- Die Ablegerbeuten sind mit Absperrgitter-Böden versehen und haben ansonsten kein Flugloch, sodass die Drohnen während der Reifung kein Licht sehen.
- Nach Bildung wird das Aufzuchtvolk mit einer unbegatteten Königin im Iltis-Käfig versehen, entweder aus einer eigenen Nachschaffungszelle oder aus anderen Quellen.
- Während der Aufzucht werden die Völkchen mind. 1x wöchentlich kontrolliert. Bei Arbeitsbienen-Mangel wird verstärkt, bei übermäßigem Besatz mit Drohnen wird die Drohnenwabe vor Ende des Schlupfes aller Tiere entnommen. Das Absperrgitter unter der Beute wird von toten Drohnen befreit.
- Zugaben/Entnahmen von Drohnenmaterial sowie imkerliche Arbeitsschritte werden in eigenen Stockkarten der Aufzuchtvölker dokumentiert.

8.5 Sperma-Abnahme



Abbildung 27: Sperma in den Besamungsspritzen. Übertragung des Spermas in die Kryo-Straws.

Die Sperma-Abnahme erfolgt in der Regel am LIB (bei Herkünften, deren Drohnen auch am LIB aufgezogen werden). Falls die Sperma-Abnahme ausnahmsweise durch Dritte geschieht, sollte zumindest sichergestellt sein, dass Glaskapillaren von 0,5-2mm Außendurchmesser verwendet werden (keine Winkler-Kapillaren), da sonst ein Umfüllen des Spermas erforderlich würde.

- Zur Abnahme sollten die Drohnen 20-35 Tage alt sein
- Zur Abnahme wird Kiev-Puffer (Taylor *et al.*, 2009) verwendet.
- Von jeder Herkunft werden ca. 150 μ L Sperma abgenommen. Dabei wird die Anzahl der dafür getöteten Drohnen erfasst (einschließlich derer, die kein Sperma geben).
- Das Sperma wird so schnell wie möglich, jedoch maximal 2 Tage nach der Abnahme weiter verarbeitet. Bis zur Verwendung wird es dunkel und nach Möglichkeit bei 15°C gelagert.
- Gleich beim Absamen werden folgende Proben genommen:
 - 30 Drohnenköpfe in 0,5mL-Eppi für Virus-Untersuchung (Beschriftung: Probennummer+“VK“+Zuchtbuchnummer)
 - 5 μ L Sperma mit 20 μ L BSS (ohne Antibiotika) in 0,5 mL – Eppi für Virusuntersuchung (Beschriftung: Probennummer+“VS“+Zuchtbuchnummer)
 - 40 Drohnenköpfe in 2 mL Cryotube für Einlagerung in Kryobank (Beschriftung: Probennummer+“G“+Zuchtbuchnummer)
 - Alle Proben werden protokolliert und bei -80° lagern

8.6 Kryokonservierung



Abbildung 28: Kryo-Straws mit Sperma vor dem Kryokonservieren.

- Materialien:
 - K++ - Lösung (Wegener *et al.*, 2014); mind. 12h vor Benutzung ansetzen
 - BSS-Lösung (Wegener *et al.*, 2014); mind. 12h vor Benutzung ansetzen und steril filtern. Kurz vor Verwendung mit 0,1% Streptomycin-Sulfat und 0,2% Penicillin-G-Kaliumsalz versetzen.
 - Mikrodialysekammern, MWCO (molecular weight cut-off) = 3.500; Carl Roth No. 4766.1
 - Pipettierhilfe für Kapillaren (Carl Roth No. T749.1)
 - Pailletten 250µl (röhrchenförmiges Spermabehältnis der Minitüb GmbH, auch Straw genannt, Artikelnummer Minitüb 13407/3010) mit Glas-Verschlusskugeln. Die Pailletten sind vor der Benutzung wie folgt vorzubereiten:

Dochtverschluss 4mm langer Silikonanschluß (d_{außen} = 2 mm)

60 mm
 - Goblets (Aufbewahrungsröhrchen für Pailletten des Kryokonservierungssystems der Minitüb GmbH) d = 10mm und d = 13mm. Die 13mm-Goblets sind auf 5cm Länge einzukürzen, und dienen als Deckel für die kleineren. Die 10mm-Goblets sind seitlich mit Fenstern für den Einstrom von Flüssigstickstoff zu versehen und mit einer Hülse aus Zellstoff auszukleiden:

Deckel (13mm) Zellstoff-Hülse Goblet (10mm) mit Öffnungen
 - Goblet-Canes (Halter von Goblets, Minitüb GmbH)
 - DMSO (Carl Roth A994.2)
 - Einfriergerät, Flüssigstickstoff, Dewar-Gefäß
 - 100µL MicroMan-Direktverdrängungs-Pipette für Transfer des Spermas in/aus Dialysekammer/Straws
 - Sperma (max. 3 Tage alt; gelagert am besten bei 15-20°C)
 - zwei sterile Schnappdeckel-Gläschen 20mL
 - Laborschüttler
- Ablauf:
 - Klimaschrank auf 22,5°C einregeln

- DMSO-Lösung herstellen:
 - 38,75 mL BSS mit Antibiotika
 - 11,25 mL DMSO
- vier Straws vorbeschriftet mit Probennummer+“S“+Zuchtbuchnummer der Königin, von der die Drohnen stammen
- zwei Goblets ebenso vorbeschriftet, Probennummer+“S“+Zuchtbuchnummer (+A für Qualitätskontrolle)
- Die zwei Schnappdeckelgläschen mit je ca. 17mL DMSO-Lösung füllen und bei 22,5°C vorinkubieren
- zwei Dialyse-Kammern vorweichen lassen (mind. 50 Minuten in H₂O bidest.; dieses auch in die Kammer füllen)
- Ein 2 mL-Eppi mit 1,5 mL K++ befüllen und bei 35°C im Heizblock vorwärmen
- Schüttler im Klimaschrank aufstellen, auf mittlere Geschwindigkeit regeln (ca. 120 U/Min.)
- Mit MicroMan-Pipette Dialysekammer leeren und 1x mit der DMSO-Lösung durchspülen, wieder leeren
- Mit der Pipettierhilfe das Sperma aus den Abnahme-Kapillaren („Besamungsspitzen“) in die Dialysekammer drücken. Dabei auf Blasenfreiheit achten! Dabei aus jeder Kapillare aus der Mitte der Spermasäule ca. 1µL in das vorgewärmte K++ - Eppi geben für Kontrolle der Spermaqualität „vor Einfrieren“ (s. Abschnitt „Qualitätskontrolle des Spermas“).
- Dialysekammern mit Sperma in die vortemperierten Schnappdeckelgläschen auf den Schüttler stellen, für 35 Minuten im Klimaschrank schütteln
- in dieser Zeit Einfriergerät hochfahren und auf 20°C vorregeln
- Die vorbereiteten Straws mithilfe des MicroMan mit 20µL BSS (ohne DMSO) vorbegefüllen; ca. 10µL Luft nachdrücken, damit das Sperma nicht direkt mit dem BSS in Kontakt kommt
- Sperma aus den Dialysekammern saugen, den dabei zunächst austretenden Schaum verwerfen und nur die solide Säule verwenden.
- Sperma in die Straws drücken (mind. 2 Straws mit ca. 40µL/Straw, sowie ein Straw mit ca. 10µL für die Qualitätskontrolle nach Einfrieren), hinter das Sperma wieder 10µL Luft, sichergehen, dass die erste BSS-Portion in den Dochtabschnitt gesaugt wurde (für gasdichten Verschluss), versiegeln mit Glasperle
- Straws in Goblets geben (Straws für die Genbank in einen Goblet und Straw mit Qualitätskontrolle in zweiten Goblet, mit „A“ gekennzeichnet)
- Goblets in Goblet-Cane stecken
- Ein Dewar-Gefäß (Tiefe mind. 20 cm) mit Flüssigstickstoff füllen
- Goblets im Einfriergerät zunächst für 5 Minuten bei 20°C vortemperieren, dann für 20 Minuten mit 3°/Minute abkühlen (End-Temperatur in der Kammer -40°C). Genau nach Ende der 20 Minuten Goblet entnehmen und sofort in das Dewar-Gefäß tauchen (ganz eintauchen!).
- Goblet-Canes stecken im Lagertank einlagern; Position des Goblets auf der Liste am Tank verzeichnen.

8.7 Qualitätskontrolle des Spermas

Die Qualitätskontrolle erfolgt sowohl an der Spermaprobe vor der Dialyse sowie auch an einer Kleinstprobe aufgetauten Spermas. Zum Auftauen wird die 10 μ L-Probe für 25 Sekunden in flüssiges Paraffinöl (35°C) getaucht. Die Ergebnisse werden auf dem Erfassungsbogen „Daten zur Einlagerung“ protokolliert und im Projektordner abgelegt.

- Materialien:
 - Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33342 (Sigma Nr. B2261; Stammlösung 1mg/mL in Wasser; Kühlschrank, dunkel)
 - Propidiumjodid (Sigma P4864; fertig gekaufte Lösung mit 1 mg/mL)
 - Objektträger, Deckgläschen 18x18mm
 - Mikroskop mit PhaKo 200x sowie Fluoreszenzfiltern für die Detektion von H33342 und Propidiumjodid
 - Handzähler

- Durchführung:
 - Sperma mit vorgewärmter K⁺⁺ -Lösung (35°C) in 2 mL-Eppi auf ca. 1 μ L/mL vorverdünnen
 - von dieser Verdünnung ca. 100 μ L in ein 0,5 mL-Eppi umfüllen und mit Farbstoffen versetzen:
 - 1 μ L H33342-Lösung
 - 2 μ L Propidiumjodid-Lösung
 - mit Pipittenspitze kurz verrühren
 - abgedunkelt im Heizblock bei 35°C inkubieren
 - Motilitätsmessung (aus dem ungefärbten 2 mL-Eppi) nach 1h
 - tot-lebend-Färbung nach 30min
 - Tot-lebend-Färbung:
 - aus dem gefärbten 0,5 mL-Eppi 10 μ L auf Objektträger geben, mit 18x18mm-Deckglas bedecken
 - zunächst mit Filter für H33342 die Gesamtzahl aller Zellen in einem Gesichtsfeld erfassen (Handzähler! Gesamtvergrößerung 200x)
 - anschließend für das gleiche Gesichtsfeld die Anzahl toter (=Propidiumjodid-positiver) Zellen erfassen.
 - für weitere Gesichtsfelder wiederholen, bis Summe aller Gesamtzahlen > 100
 - Motilitätsmessung:
 - nach mind. 1h Inkubation (max. 2h)
 - 10 μ L der Spermien suspension aus dem 2 mL-Eppi auf Objektträger bringen und mit 18x18mm-Deckgläschen bedecken
 - zunächst in einem Gesichtsfeld alle Zellen erfassen, deren Köpfe im Feld liegen
 - anschließend für das selbe Gesichtsfeld diejenigen Zellen erfassen, die IRGENDEINE Form aktiver Bewegung zeigen (es wird nicht unterschieden zwischen „regelrechter“ und „schwacher“ Bewegung).
 - für weitere Gesichtsfelder wiederholen, bis insgesamt >100 Zellen beobachtet wurden.

8.8 Übersicht über die zu erstellenden Proben.



Abbildung 29: Entnommene Drohnenköpfe für die Gewebeprobe.

Tabelle 9: Übersicht über die zu erstellenden Proben.

Bezeichnung	Umfang	Verpackung	Beschriftung	Zwischenlagerung
Spermaproben	2 x 40µL für Lagerung sowie 1 x 10µL für Qualitätskontrollen	0,25mL-Straws; diese werden für Zwischenlagerung am LIB in 10 mm-Goblets verpackt und für die Übergabe an die Kryobank in Kassetten verpackt (Minitube Nr. 16980/0602)	Probennummer+“S“+ Zuchtbuchnummer auf den Straws, Goblets, Kassetten	LIN
Drohnenköpfe für Virusuntersuchung	1x30 Stück	im Standard-Eppi (RNase-free; 1,5 mL)	Probennummer+“VK“+ Zuchtbuchnummer	-80°C
Sperma für Virus-Untersuchung	1x10 µL, verdünnt mit 20µL BSS	im Standard-Eppi (RNase-free)	Probennummer+“VS“+ Zuchtbuchnummer	-80°C
Gewebeproben (Drohnenköpfe) für spätere DNA-Aufreinigung	1x40 Stück	im 2 mL-Cryotube	Probennummer+“G“+ Zuchtbuchnummer	-80°C
Ganzkörper-Proben	1 x 5 Arbeitsbienen 1 x 4 Drohnen	im 5 mL-Cryotube	Probennummer+“A“ bzw. “D“+ Zuchtbuchnummer	-30°C
Arbeiterinnen für Morphometrie + Genotypisierung	1 x 20 Arbeitsbienen	in 50 mL-Falcon in 96% Ethanol Ph. Eur.	Züchter+ Zuchtbuchnummer, mit Ethanol-festem Stift	-30°C



Abbildung 30: Fertig vorbereitete Proben für die Genbank.

8.9 Übersicht über die zu erstellenden/einzufordernden Dokumente:

- Kopie Seuchenfreiheitsbescheinigung des Herkunfts-Standes
- Überlassungsvertrag
- Dokumentation der Probensammlung
- Dokumentation der Einlagerung und Qualitätskontrolle
- Tabelle mit Untersuchungsergebnissen zur Virusbelastung

8.10 Protokoll zur Probenentnahme und Kryokonservierung

Protokoll zur Probenentnahme und Kryokonservierung

Probennummer:	
Zuchtbuchnummer:	
Datum Spermaentnahme:	
Datum Kryokonservierung:	
Alter der Drohnen:	
Anzahl der benötigten Drohnen (einschließlich Drohnen ohne Sperma):	
µl Sperma abgenommen:	
Drohnenaktivität:	

Vollständigkeit des Probensatzes:

Typ	Name	Vorhanden
Ca. 5 Arbeiterinnen („A“)		
Ca. 5 Drohnen („D“)		
15 Drohnenköpfe („VK“)		
10 µl Sperma („VS“)		
40 Drohnenköpfe („G“)		
150µl Sperma („S“)		

Spermaqualitätstests:

Datum:

Motilitätstest		Tot-/lebend- Färbung	
Gesamt	Motil	Blau	Rot

Auftautest:

Datum:

Motilitätstest		Tot-/lebend- Färbung	
Gesamt	Motil	Blau	Rot

8.11 Formular zur Probenentnahme

Dokumentation der Probenentnahme

für die Honigbienen-Sammlung der Deutschen Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere

Allgemein

Züchter:

Telefon:

E-Mail:

Anschrift:

.....
.....

Zu beprobende Königinnen

Zuchtbuch Nummer:

Standort:

Bekannte Krankheitsanfälligkeiten der Vorfahren:

.....
.....
.....

Bekannte weitere Eigenschaften:

(Eigenschaften, die über die in der normalen Zuchtwertschätzung erfassten hinausgehen)

.....
.....
.....

Drohnenbrutrahmen

Eingesetzt am:	
Entnommen am:	
Entnommen durch:	

Weitere Auffälligkeiten:

Arbeiterinnen im Alkohol-Gefäß

Entnommen am:
Entnommen durch:

Arbeiterinnen im Sammelkäfig

Entnommen am:
Entnommen durch:

8.12 Fragen zu den Aufzuchtbedingungen der Drohnenbrut

Fragen zu den Aufzuchtbedingungen der Drohnenbrut

Hintergrund:

Man weiß bis jetzt relativ wenig über die Ursachen von Schwankungen in der Drohnenqualität. Am Länderinstitut für Bienenkunde wollen wir deshalb die Brutsammlung für die Kryobank zu einer kleinen Begleituntersuchung nutzen. Für die Kryobank wird die Qualität der Drohnen (Stülpfähigkeit, Spermamenge) und des Spermas bewertet, und wir möchten nun zusätzlich herausfinden, ob diese mit den Bedingungen im Aufzuchtvolk zusammenhängen. Deshalb wären wir für die Beantwortung der folgenden Fragen sehr dankbar.

(Rückfragen und Fragen nach den Ergebnissen (ab Herbst 2020) bitte an wegenerj@hu-berlin.de (Jakob Wegener))

Bitte ankreuzen:

Auf wie vielen Waben saß das Volk, in dem die Drohnen angelegt wurden, zum Zeitpunkt der Bestiftung des Drohnenrahmens? (Schätzwert genügt!)	
--	--

Welches Wabenmaß wurde im Herkunftsvolk der Drohnen verwendet?	
--	--

	üppig (>ca. 500 cm ² Wabenfläche mit Pollen)	normal (ca. 200-500 cm ² Wabenfläche mit Pollen)	schlecht (0 – ca. 200 cm ² Wabenfläche mit Pollen)
Wie schätzen Sie die Pollenversorgung des Volkes während des Larvenstadiums der Drohnen ein? (Schätzwert genügt!)			

	nein	ja, und zwar (Datum, Dauer, Extremwert)
Traten zwischen Bestiftung und Entnahme der Drohnenwabe Außentemperaturen von unter 5°C oder über 30°C auf?		

Gab es während der Entwicklung der Drohnenbrut andere Einwirkungen, die Ihrer Meinung nach die Entwicklung beeinflusst haben könnten, und wenn ja, welche?	
--	--

8.13 Technische Anleitung zur Vorbereitung der Drohnenwaben

Technische Anleitung

für die Vorbereitung der Drohnenrahmen zur Kryokonservierung für die Deutsche Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere

Wir, das Länderinstitut für Bienenkunde Hohen Neuendorf e. V. und das Bieneninstitut Kirchhain, wurden von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung beauftragt, eine Genbank „Honigbiene“ einzurichten. Im Zuge dessen sollen relevante Bienenvölker in ganz Deutschland und benachbarten europäischen Ländern beprobt und in die nationale Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere aufgenommen werden.

Um die Honigbienen-Biodiversität und die genetische Vielfalt im Bienen Sektor langfristig nutzbar zu machen, werden dafür bedrohte, genetisch vielfältige und züchterisch wertvolle Honigbienen-Ressourcen zusammenzutragen. Es ist geplant, Völker der *A. m. carnica* und *A. m. mellifera* zu beproben.

Folgende Proben werden benötigt und eingelagert:

- **300µl – 400µl Drohnensperma (kryokonserviert).** Hierfür bitten wir Sie, einen Drohnenrahmen bzw. ein Baurahmen für das Länderinstitut für Bienenkunde Hohen Neuendorf e. V. zur Abholung vorzubereiten. Es werden Drohnenrahmen von Völkern der im Vorfeld besprochenen Königinnen benötigt. Falls diese nicht mehr verfügbar sein sollten, kann auch ein Drohnenrahmen eines Tochter- oder Geschwistervolkes vorbereitet werden. Es wird mindestens eine halbe Wabe mit Drohnenbrut benötigt. Die Drohnenwabe sollte vorzugsweise dem **Deutsch Normalmaß** entsprechen. Sollte das nicht realisierbar sein, teilen Sie uns dies bitte im Vorfeld mit. Wir werden dann Materialien zum Zuschneiden der Waben mitbringen. Sobald eine mögliche Abholroute bekannt ist, wird diese mit den beteiligten Züchtern besprochen und ein genauer Zeitplan aufgestellt. Zum Zeitpunkt der Abholung sollte die **Drohnenbrut ca. 16-22 Tage alt** sein. Für das Kryokonservieren des Drohnenspermas wird eine **Seuchenfreiheitsbescheinigung** benötigt.
- **Arbeiterinnen-Proben** zum Test der genetischen Eigenschaften am Bieneninstitut Kirchhain sowie für die Einlagerung von Ganzkörper-Proben in die Genbank. Hierfür werden Ihnen zwei verschiedene Behälter zugeschickt, ein Schraubdeckel-Gefäß mit Alkohol sowie ein Versandkäfig für lebende Bienen, die Sie bitte wie folgt befüllen:
 - Alkohol-Gefäß: 20 junge Arbeitsbienen.
 - Versand-Käfig: 5 junge Arbeitsbienen, lebend.Die Abholung erfolgt dann gemeinsam mit der Drohnenwabe durch das LIB.

Als kleine Entschädigung für Ihre Mühen erhalten Sie von uns die Ergebnisse aus den Analysen ihrer Tiere, also eine Auskunft zur Rassereinheit nach molekulargenetischer und morphometrischer Untersuchung sowie zur Belastung mit Viren.

Wir danken für Ihre Mühen und Mithilfe!

8.14 Besitzübergabe-Vertrag

Besitzübergabe-Vertrag

Datum:

Übergabeobjekt:

____ Drohnenbrutrahmen

____ ca. 20 Arbeiterinnen im Alkohol-Gefäß,

____ ca. 5 Arbeiterinnen im Sammelkäfig

der Königinnen mit den folgenden Zuchtbuchnummern:

.....
.....

Beteiligte:

a) Geber/ Geberin

.....
.....

b) Empfänger

Länderinstitut für Bienenkunde Hohen Neuendorf e. V.

Die Empfänger führen im Auftrag des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft eine Sammlung von genetischem Material von Honigbienen für die Deutsche Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere durch. Im Rahmen der Einlagerung wird das gesammelte Material auf eine Belastung mit bienenpathogenen Viren untersucht. Weiterhin wird die Rassezugehörigkeit mit morphometrischen und molekularen Methoden bestimmt. Dafür stellt die Geberin/der Geber die oben genannten Objekte unentgeltlich bereit. Die Empfänger verpflichten sich

- die Objekte nicht ohne Genehmigung des Gebers für andere als den bezeichneten Zweck zu verwenden sowie gegebenenfalls für anonymisierte Veröffentlichungen.
- die Objekte der geplanten Genbank zuzuführen, sofern sie den Anforderungen in Bezug auf Rassezugehörigkeit genügen (technische Unwägbarkeiten vorbehalten)
- den Geber über die Ergebnisse der geplanten Virusuntersuchung sowie der morphometrischen/molekularen Bestimmung der Rassezugehörigkeit in Kenntnis zu setzen
- die in die Genbank eingelagerten Ressourcen mit der BeeBreed Datenbank zu referenzieren

Entsprechend der Bund-Länder-Vereinbarung zur Deutschen Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere obliegt die Entscheidung über eine Verwendung des eingelagerten Materials dem Leitungsgremium der Genbank, unter Absprache mit den Empfängern sowie mit dem Deutschen Imkerbund e. V. Eine Verwendung für kommerzielle Zwecke ist nicht vorgesehen. Die Geberin/ Geber sind einverstanden, dass Informationen zum eingelagerten Material sowie zu ihrer Person (Name, Adresse) ausschließlich für die Zwecke der Genbank gespeichert werden.

Ort, Datum:

Geber/ Gerberin:

Für den Empfänger:

8.15 Regionen und Verantwortlichkeiten

Tabelle 10: Regionen, Sammeltouren, Kontaktpersonen und internationale Genbanken.

Region	Kontaktperson	Unterart	Vorgehensweise	Einlagerung der Proben in internationale Genbanken
Bayern	Herr Günthner	<i>A. m. carnica</i>	Sammeltour 2020	-
Norddeutschland	Herr Tiesler	<i>A. m. carnica</i>	Sammeltour 2020	-
Südwestdeutschland	Herr Famulla	<i>A. m. carnica</i>	Sammeltour 2019/2021	-
Thüringen	Herr Stoß	<i>A. m. carnica</i>	Sammeltour 2020	-
Sachsen	Herr Hohmuth	<i>A. m. carnica</i>	Sammeltour 2020	-
Mecklenburg-Vorpommern	Herr Biermann	<i>A. m. carnica</i>	Sammeltour 2021	-
Ganz Deutschland	Herr Ullrich	<i>A. m. mellifera</i>	Sammeltour (in Verbindung mit anderen Sammeltouren)	-
Norwegen	Herr Dahle	<i>A. m. mellifera</i>	Versand von ausgewählten Königinnen ans LIB (2020)	Ja
Slowenien	Herr Presern	<i>A. m. carnica</i>	Versand von ausgewählten Königinnen ans LIB (2020)	Ja
Österreich	Herr Reiter	<i>A. m. mellifera</i>	Sammeltour 2020	Nein
Österreich	Herr Kärcher	<i>A. m. carnica</i>	Sammeltour 2020	Nein
Schweiz	Herr Schütz	<i>A. m. mellifera</i>	Spermaabnahme vor Ort	Nein
Belgien	Herr Elen	<i>A. m. mellifera</i>	Sammeltour 2020	Nein
Niederlande	Herr Ullrich/ Herr Van de Ree	<i>A. m. mellifera</i>	Sammeltour 2020	Nein
Schweden	Herr Ullrich	<i>A. m. mellifera</i>	Sammeltour (in Verbindung mit anderen Sammeltouren)	Nein

8.16 Zuständigkeitsbereich der Gremiumsmitglieder

Tabelle 11: Gremiumsmitglieder und Zuständigkeitsbereiche.

Gremiumsmitglied	Zuständigkeitsbereich	Imkerverband	Unterart
Herr Tiesler	Niedersachsen Schleswig-Holstein Hamburg Hessen Bremen Nordrhein-Westfalen	DE-5, DE-6, DE-7, DE-15, DE-17, DE-18	<i>A. m. carnica</i>
Herr Günthner	Bayern	DE-2	<i>A. m. carnica</i>
Herr Famulla	Baden-Württemberg Rheinland-Pfalz Saarland	DE-1, DE-9, DE-10, DE-11, DE-12, DE-19	<i>A. m. carnica</i>
Herr Götze	Sklenar Linie		<i>A. m. carnica</i>
Herr Hohmuth	Sachsen	DE-13	<i>A. m. carnica</i>
Herr Stoß	Thüringen	DE-16	<i>A. m. carnica</i>
Herr Biermann	Mecklenburg-Vorpommern	DE-8	<i>A. m. carnica</i>
Herr Ullrich	Deutschlandweit		<i>A. m. mellifera</i>

9. Literaturliste

Adam, B. Züchtung der Honigbiene (Delta-Verlag, 1982).

Aires, V. A. *et al.* In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 60, 269-279, doi: 10.1016/S0093-691X(02)01369-9 (2003).

Bienefeld, K., Reinhardt, F. & Pirchner, F. Inbreeding effects of queen and workers on colony traits in the honey bee. *Apidologie* 20, 439-450 (1989).

Bienefeld, K. Breeding Success or Genetic Diversity in Honey Bees? *Bee World* 93, 40-44, doi:10.1080/0005772X.2016.1227547 (2016).

Büchler, R. *et al.* The influence of genetic origin and its interaction with environmental effects on the survival of *Apis mellifera* colonies in Europe. *Journal of Apicultural Research* 53, 205-214 (2014).

Collins, A. M. & Mazur, P. Chill sensitivity of honeybee, *Apis mellifera*, embryos. *Cryobiology* 52, 22-27 (2006).

Collins, A. M. Collection of honey bee eggs for cryopreservation. *J Apic Res* 41, 89-95 (2002).

Delaney, D. A., Meixner, M. D., Schiff, N. M. & Sheppard, W. S. Genetic characterization of commercial honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations in the United States by using mitochondrial and microsatellite markers. *Annals of the Entomological Society of America* 102:666-673. Vol. 102 (2009).

De la Rúa, P., Jaffé, R., Dall'Olio, R., Munoz, I. & Serrano, J. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie* 40, 263-284 (2009).

Forouzanfar, M. *et al.* In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 73, 480-487, doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.10.005 (2010).

Garnery, L. *et al.* Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) II. Microsatellite loci. *Genetics Selection Evolution* 30, S49, doi:10.1186/1297-9686-30-S1-S49 (1998).

Goetze, G. in VII. Internationaler Kongreß für Entomologie 1792-1801 (G. Uschmann, Weimar, Berlin, 1937).

Genersch, E. *et al.* The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41, 332-352, doi:10.1051/apido/2010014 (2010).

Gül, A., Hopkins, B. K. & Sheppard, W. S. in 45th APIMONDIA-Conference 45 (Turkish Association of Beekeepers and APIMONDIA, Istanbul, 2017).

Harbo, J. R. Viability of honey bee (Hymenoptera, Apidae) eggs from progeny of frozen spermatozoa. *Ann Entomol Soc Am* 74, 482-486 (1981).

Harbo, J. R. Storage of honeybee spermatozoa at -196 degrees C. *J Apic Res* 18, 57-63 (1979).

- Harbo, J. Survival of honey bee spermatozoa in liquid nitrogen. *Ann Entomol Soc Am* 70, 257-258 (1977).
- Harbo, J. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa after two years in liquid nitrogen (-196°C). *Ann Entomol Soc Am* 76, 890-891 (1983).
- Hopkins, B. K., Herr, C. & Sheppard, W. S. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reproduction, Fertility and Development* 24, 1079-1083 (2012).
- Hopkins, B. K. & Herr, C. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie* 41, 548-556 (2010).
- Jensen, A. B. & Vest Pedersen, B. in *Beekeeping and conserving biodiversity of honeybees* (ed Cecilia Costa Marco Lodesani) 142-164 (Northern Bee Books, 2005).
- Jensen, A. B., Palmer, K. A., Boomsma, J. J. & Pedersen, B. V. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Mol Ecol* 14, 93-106, doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02399.x (2005).
- Kaftanoglu, O. & Peng, Y. C. Preservation of honeybee spermatozoa in liquid nitrogen. *J Apic Res* 23, 157-163 (1984).
- Ludwig, A. *Unsere Bienen*. 4 edn, (Verlag von Fritz Pfennigstorff, 1937).
- Maul, V. & Hähnle, A. Morphometric studies with pure bred stock of *Apis mellifera carnica* Pollmann from Hessen. *Apidologie* 25, 119-132 (1994).
- Meixner, M. D., Worobik, M., Wilde, J., Fuchs, S. & Koeniger, N. *Apis mellifera mellifera* in eastern Europe - morphometric variation and determination of its range limits. *Apidologie* 38, 191-197 (2007).
- Meixner, M. D. *et al.* Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *J Apic Res* 52, 1-28, doi:10.3896/IBRA.1.52.4.05 (2013).
- Meixner, M. D. *et al.* Occurrence of parasites and pathogens in honey bee colonies used in a European genotype-environment interactions experiment. *J Apic Res* 53, 215-229, doi:10.3896/IBRA.1.53.2.04 (2014).
- Meixner, M. D., Kryger, P. & Costa, C. Effects of genotype, environment, and their interactions on honey bee health in Europe. *Current Opinion in Insect Science* 10, 177-184 (2015).
- Melnichenko, A. N. & Vavilov, I. L. in *Proc 25th Int'l Cong Apimondia*. Prague, Apimondia. 311 – 314 (1975).
- Momeni J., *et al.* Authoritative subspecies diagnosis tool for European honey bees based on ancestry informative SNPs. *BMC Genomics* 22, 101. doi:10.1186/s12864-021-07379-7 (2021).
- Munoz, I., Dall'Olio, R., Lodesani, M. & De la Rua, P. Population genetic structure of coastal Croatian honeybees (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie* 40, 617-626 (2009).

- Nedić, N. *et al.* Detecting population admixture in honey bees of Serbia. *J Apic Res* 53, 303-313, doi:10.3896/IBRA.1.53.2.12 (2014).
- Oldroyd, B. P. What's killing American honey bees? *PLoS Biology* 5, 1195-1199 (2007).
- Péntek-Zakar, E., Oleksa, A., Borowik, T. & Kusza, S. Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies. *Ecology and Evolution* 5, 5456-5467, doi:10.1002/ece3.1781 (2015).
- Pinto, M. A. *et al.* Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations: a genome-wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data. *J Apic Res* 53, 269-278, doi:10.3896/IBRA.1.53.2.08 (2014).
- Prodělalová, J. & Moutelíková, R. & Titera, D. Multiple virus infections in Western honeybee (*Apis mellifera* L.) ejaculate used for instrumental insemination. *Viruses*. 11. 306. 10.3390/v11040306 (2019).
- Reinsch, N., Schuster, H., Bienefeld, K. & Pirchner, F. Morphologischer Vergleich von Völkern der "Landbiene" in Niedersachsen mit typischer *Apis mellifera carnica* und *Apis mellifera mellifera*. *Apidologie* 22, 75-80 (1991).
- Ruttner, F. Biogeography and taxonomy of honeybees. (Springer-Verlag, 1988).
- Ruttner, F., 2003, Naturgeschichte der Honigbiene. 2 edn, (Kosmos).
- Soland-Reckeweg, G. Genetic differentiation and hybridization in the honeybee (*Apis mellifera* L.) in Switzerland doctoral thesis, Universität Bern, (2006).
- Soland-Reckeweg, G., Heckel, G. & Neumann, P. e. a. Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honeybee, *Apis mellifera*. *J Insect Conserv* 13, 317 (2009).
- Susnik, S., Kozmus, P., Poklukar, J. & Meglic, V. Molecular characterisation of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia. *Apidologie* 35, 623-636 (2004).
- Taylor, M.A., Guzmán-Novoa, E., Morfin, N. and Buhr, M. M. Improving Viability of Cryopreserved Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Sperm with Selected Diluents, Cryoprotectants, and Semen Dilution Ratios." *Theriogenology* 72, no. 2 (2009): 149-159.
- Uzunov, A. *et al.* Genetic structure of *Apis mellifera macedonica* in the Balkan Peninsula based on microsatellite DNA polymorphism. Vol. 53 (2014).
- Uzunov, A. *et al.* in 45th APIMONDIA-Conference 48 (Turkish Beekeeper Association and Apimondia, Istanbul, 2017).
- Wang, Y. J., Kaftanoglu, O., Siegel, A., Page, R. E. & Amdam, G. Surgically increased ovarian mass in the honey bee confirms link between reproductive physiology and worker behavior. *J Insect Physiol* 56, 1816-1824 (2010).
- Wegener, J., May, T., Knollmann, U., Kamp, G. & Bienefeld, K. In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honeybee semen. *Cryobiology* 65, 126-131 (2012).

Wegener, J. & Bienefeld, K. Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology* 77, 600-607 (2012a).

Wegener, J., May, T., Kamp, G. & Bienefeld, K. New methods and media for the centrifugation of honey bee (Hymenoptera: Apidae) drone semen. *J Econ Entomol* 107, 47-53 (2014).

Wegener, J., May, T., Kamp, G. & Bienefeld, K. A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology* 69, 236-242 (2014a).

Wegener, J., May, T., Kamp, G. & Bienefeld, K. in 45th APIMONDIA Conference 110 (Turkish Beekeeper Association and Apimondia, Istanbul, 2017).

Yue, C., Schröder, M., Bienefeld, K. & Genersch, E. Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): Evidence for vertical transmission of viruses through drones. *J Invertebr Pathol* 92, 93-96 (2006).

Zammit-Mangion, M., Meixner, M., Mifsud, D., Sammut, S. & Camilleri, L. Thorough morphological and genetic evidence confirm the existence of the endemic honey bee of the Maltese Islands *Apis mellifera ruttneri*: recommendations for conservation. Vol. 56 (2017).

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Auswahl der einzulagernden genetischen Ressourcen	17
Abbildung 2: Bienen und Drohnen auf einer Wabe	20
Abbildung 3: Anordnung der Ablegerbeuten	21
Abbildung 4: Präparation und Verpackung der Drohnenwaben für den Postversand	23
Abbildung 5: Präparation und Verpackung der aus Berlin versandten Drohnenwabe	24
Abbildung 6: Spermaqualität im Drohnenversandversuch	26
Abbildung 7: Überlebensraten im Versandversuch nach Drohnenalter	27
Abbildung 8: Durch vertikale Teilung modifizierte Wabe	28
Abbildung 9: Versandverpackung der modifizierten Drohnenwaben.	28
Abbildung 10: Auswertung der Motilität des Spermias der versandten Waben und der Kontrollwaben.....	29
Abbildung 11: Auswertung der Vitalität des Spermias der versandten Waben und der Kontrollwaben.....	29
Abbildung 12: Einfluss später Kälte-Einbrüche auf die Qualität von Drohnensperma.....	30
Abbildung 13: Herkunftsland der kryokonservierten Proben.	31
Abbildung 14: Orte beprobter Völker in Deutschland.	32
Abbildung 15: Zahlenmäßige Verteilung der eingelagerten Proben der deutschen Carnica- Zucht.	33
Abbildung 16: Rasseverteilung der eingelagerten Proben.	33
Abbildung 17. Motilität der Spermien vor und nach der Kryokonservierung.	35
Abbildung 18: Anteil lebendiger Spermien vor und nach der Kryokonservierung.	35
Abbildung 19: Durchschnitt der Beweglichkeit und dem Anteil lebendiger Spermien vor und nach der Kryokonservierung mit Standardabweichung.	36
Abbildung 20: Vergleich von Motilität und Anteil lebendiger Spermien vor und nach der Kryokonservierung.	36
Abbildung 21: Prozentuale Anteile der Proben mit positiven Virenbefunden.....	40
Abbildung 22: Ergebnis der Diskriminanzanalyse mit Referenzproben.	42
Abbildung 23: Ergebnisse der Rassereinheitsprüfung.	43
Abbildung 24: Informationsfeld im BeeBreed-Stammbaum-Browser einer kryokonservierten Königin.	44
Abbildung 25: Zuchtwertliste in BeeBreed, sortiert nach Spalte „eingefroren“	44
Abbildung 26: Einlagerung der Proben in die Genbank Landwirtschaftlicher Nutztiere	45
Abbildung 27: Besamungsspritzen und Übertragung des Spermias in die Kryo-Straws.....	62
Abbildung 28: Kryo-Straws mit Sperma for dem Kryokonservieren.....	63
Abbildung 29: Entnommene Drohnenköpfe für die Gewebeprobe.	66
Abbildung 30: Fertig vorbereitete Proben für die Genbank.	67

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswertung des Drohnenversandversuchs 2020 (Spermaqualität und Drohnenüberlebensrate).....	29
Tabelle 2: Linien der deutschen Carnica.....	34
Tabelle 3: Ergebnisse der Spermaqualitätsuntersuchungen.....	37
Tabelle 4: Ergebnisse der Untersuchung der Poolproben.....	40
Tabelle 5: Ergebnisse der Virenuntersuchungen.....	41
Tabelle 6: Carnica-Proben aus Deutschland mit Zuchtbuchnummern, Züchtern und Standorten.....	46
Tabelle 7: Proben Carnica außer Deutschland.....	50
Tabelle 8: Mellifera-Proben mit Zuchtbuchnummern, Züchtern und Standorten.....	51
Tabelle 9: Übersicht über die zu erstellenden Proben.....	66
Tabelle 10: Regionen, Sammeltouren, Kontaktpersonen und internationale Genbanken.....	74
Tabelle 11: Gremiumsmitglieder und Zuständigkeitsbereiche.....	74