

# Genetische Untersuchung von Honigbienenbrut in Bezug auf deren Varroaresistenz-assoziierte Gene und Genbereiche

Tom Schmidt, Lisa Prudnikow, Röbbe Wünschiers

Hochschule Mittweida, Biotechnologie und Chemie

## Abstract

Ziel des Projekts ist es, Bienenpuppen genetisch auf ihr Varroamilbenresistenzverhalten zu untersuchen, indem deren DNA mit dem MinION-Sequenzer entschlüsselt wird. Die erhaltenen Daten können im Anschluss mit aus der bisherigen Forschung bekannten Genbereichen verglichen werden, die mit dem Resistenzverhalten assoziiert sind. Diese Daten sollen gemeinsam mit Informationen aus der imkerlichen Zucht zur Entwicklung eines genetischen Schnelltest beitragen, um die Last der Varroamilbe einzudämmen.

## 1. Einleitung

Eine Vielzahl von Pflanzen ist von Bestäubern abhängig (*Pires and Maués, 2020*). Eine besondere Rolle spielt dabei die Honigbiene (*Apis mellifera*), da sie einen Großteil der wildwachsenden Pflanzen bestäubt (*Hung et al., 2018*). Seit Jahrzehnten wird sie neben der abnehmenden Landfläche und der zunehmenden landwirtschaftlichen Nutzung von Pestiziden auch von der Varroamilbe (*Varroa destructor*) bedroht. Diese, ursprünglich von der östlichen Honigbiene (*Apis cerana*) abstammenden Parasiten schwächen nicht nur die Biene, sondern sind zudem ein Vektor für Viren. Die traditionelle Behandlung mit chemischen Mitteln kann einen negativen Einfluss auf die Biene (*Adjlane et al., 2016*) und die Qualität des Honigs haben. Die Honigbiene selbst besitzt jedoch natürliche Abwehrmechanismen, welche eine Bekämpfung oder zumindest Eindämmung des Befalls bewirken. Zu diesen Mechanismen gehören die Varroa-sensitive-Hygiene (VSH), die unterdrückte Milbenreproduktion (SMR) und das Grooming (*Noël et al., 2020*). VSH beschreibt dabei das gezielte Öffnen von Brutzellen und das anschließende Ausräumen der Brut, welche mit Milben befallen sind (*Mondet et al., 2016*). Unter SMR versteht sich die fehlgeschlagene Reproduktion von weiblichen Milben, also dass sie keine männliche oder befruchtete weibliche Nachkommen zeugen (*Mondet et al., 2020b*). Unter dem Begriff des Grooming versteht sich das Entfernen der Milbe von einer Biene durch sich selbst (autogrooming) oder durch eine andere Biene (allogrooming) (*Cini et al., 2020; Danka and Villa, 2003; Sakamoto et al., 2020*), dabei nutzt sie ihre Beine oder den Unterkiefer (*Pritchard, 2016*). Allerdings sind diese Mechanismen unregelmäßig ausgeprägt in den verschiedenen Populationen (*Alphen, 2020*). Durch die seit Jahren bekannte Bedrohung wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt, welche mögliche genetische Marker aufzeigen (*Mondet et al., 2020a; Trapp et al., 2017; Tsuruda et al., 2012*). Durch die geringe Übereinstimmung der Studien konnten aber noch keine eindeutigen alleinstehenden Marker bestimmt werden.

## 2. Zielstellung und Partner

Das Projekt zielt darauf ab, von Honigbienenpuppen aus der SMR-Zucht DNA mithilfe der Nanoporen-Technologie zu sequenzieren, um Varroaresistenz assoziierte Gene und Genbereiche zu identifizieren. Diese Daten sollen die Entwicklung eines zukünftigen genetischen Tests zur Zucht resistenter Bienenvölker ermöglichen. Das Projekt wird vom Landesverband Sachsen für Varroaresistenzzucht e.V. (LSV) unterstützt, aus dessen SMR-Zucht (URL 1) die Proben stammen. Die zu untersuchenden Puppen stammen von Königinnen ab, die positiv auf SMR-Verhalten getestet wurden. Diese Tests erfolgen im Rahmen des Zuchtprogramms des LSV, die die Bienenwaben auf die Milbenanzahl untersuchen. In Zukunft soll dieses aufwendige Mikroskopieverfahren ersetzt werden durch einen Schnelltest, der die Varroaresistenztauglichkeit von Honigbienenköniginnen vorhersagen soll. Für diesen werden im Rahmen des Projekts Daten gesammelt.

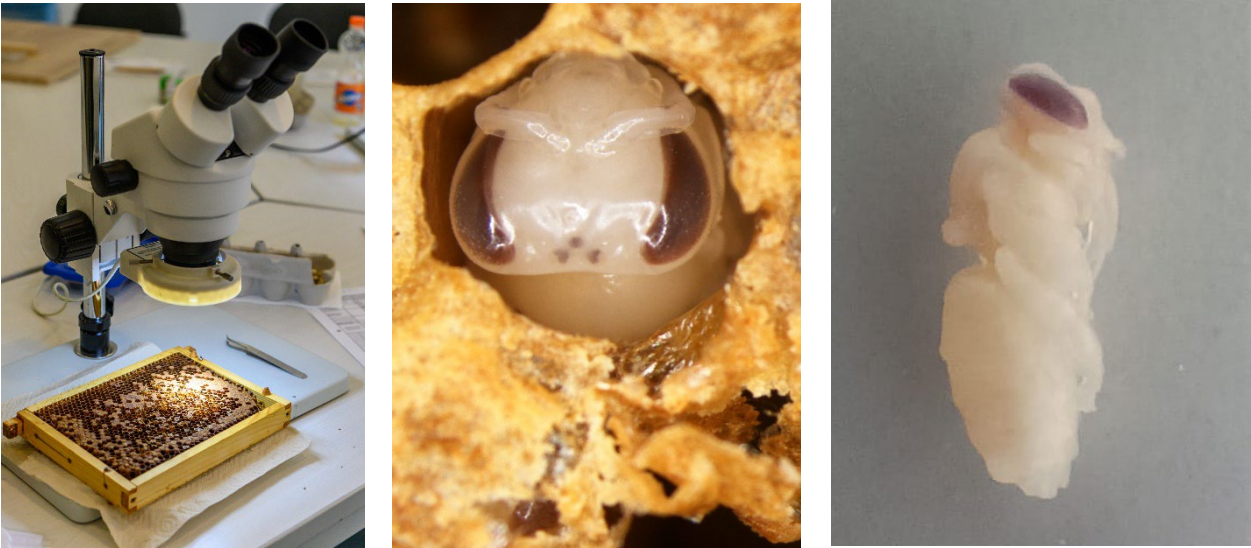


Abbildung 1: links: Mikroskop und Brutwabe bei Auszählung des LSV © Hochschule Mittweida, mitte: geöffnete Brutwabe mit Bienenpuppe © Hochschule Mittweida, rechts: Bienenpuppe für den Versuch

### 3. Methoden

Am Beginn des Versuches steht die Bienenpuppe. Aus dieser muss DNA gewonnen werden, welche die benötigten Informationen für eine Resistenz enthält. Um nun die DNA bioinformatisch auswerten zu können, muss sie sequenziert werden. In der Abbildung 2 ist dieser Workflow vereinfacht dargestellt.

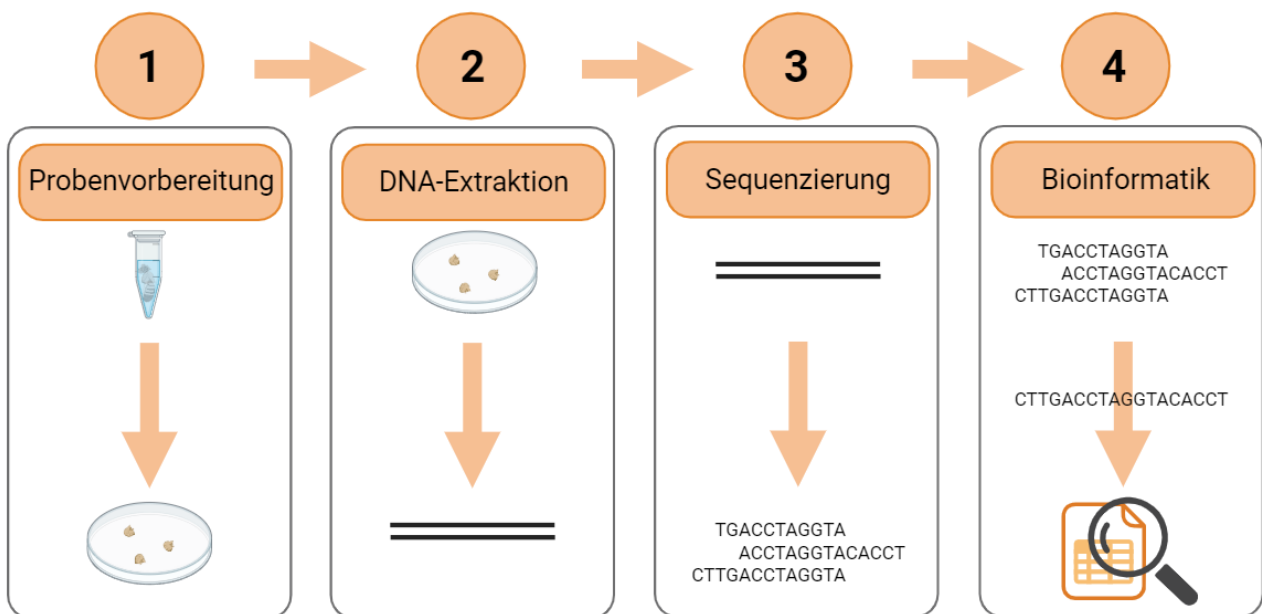


Abbildung 2: Workflow

Für diesen Versuch wurden *Apis mellifera* Puppen vom Landesverband Sachsen Varroaresistenzzucht e.V. aus dem Jahr 2022 zur Verfügung gestellt. Die Puppen, welche sich in verschiedenen Entwicklungsstadien (zu erkennen an der Augenfarbe weiß oder lila) befanden, wurden aus den Brutzellen entnommen und in 70%igen unvergällten Ethanol gelagert. Dies erfolgte bei den Testungen der Milbenanzahl in den einzelnen Völkern. Die DNA-Extraktion im Anschluss wurde nicht mit der gesamten Puppe, sondern nur mit einzelnen Teilen durchgeführt, um das empfohlene Gewicht der verwendeten DNA-Extraktionskits nicht zu überschreiten

(Abbildung 1: Schritt 1). Des Weiteren soll so die Verunreinigung durch Darmbakterien im Abdomen verhindert werden. Dazu wurden Kopf, Thorax, Abdomen und Beine voneinander getrennt. Für die Homogenisierung der Einzelproben wurden verschiedene Methoden verwendet, darunter Mörser und Pistill sowie Mikropistills, um das Probenmaterial effektiv zu homogenisieren und für die DNA-Extraktion vorzubereiten. Darauf folgend wurden zwei Extraktionskits, das NucleoSpin Food Kit und Monarch Genomic DNA Purification Kit, beprobt, um die beste Ausbeute zu erzielen (Abbildung 1: Schritt 2). Aus der isolierten DNA wurde eine sogenannte „Sequenzier-Bibliothek“ vorbereitet, bei welcher an die DNA-Enden weitere benötigte Teilstücke ligiert werden (Abbildung 1: Schritt 3). Diese sorgen dafür, dass die zu untersuchende DNA von den Nanoporen im Sequenzer erkannt werden (Hess et al., 2020). Nanoporen sind Tunnelproteine, die in eine Membran eingebettet sind und durch die ein Ionenstrom fließt. Werden diese Nanoporen von der DNA durchquert, wird der Ionenstrom charakteristisch gestört. Das entstehende Signal ist detektierbar und kann in die Sequenzinformation umgewandelt werden (Wang et al., 2021). Mit Hilfe von Barcodes lassen sich parallel mehrere Proben bearbeiten, sodass die Kosten pro Probe gesenkt und in kurzer Zeit mehr bearbeitet werden können. Die Sequenzierung wurde mittels des Oxford Nanopore Technologies MinION-Sequenzer und Flongle-Adapter und -Flowcells durchgeführt. Die Proben wurden nach ihrem SMR-Verhalten in LP1 (100 % und höher), LP2 (40–50 %) und LP3 (0–17 %) eingeteilt, um das gesamte Spektrum abzudecken und Vergleiche zu ermöglichen. Den letzten und umfangreichsten Teil stellt die bioinformatische Auswertung dar (Abbildung 1: Schritt 4). Die bioinformatische Analyse erfolgte in mehreren Schritten. Mittels Bash-Programmierung wurden die entstandenen Sequenzdaten mit den Tools Porechop, Nanoplot und NanoComp (De Coster and Rademakers, 2023; Wick, 2018) qualitativ prozessiert. Nachdem dann die Fastq-Sequenzdateien in Fasta-Dateien umgewandelt wurden, konnten diese mittels BLAST-Algorithmus gegen eine Datenbank aligniert werden, welche alle bisher bekannten Sequenzinformationen der Gattung *Apis* enthält (Stand 02.02.2024). Aus den Treffern wurden diejenigen mit einer Identität von mindestens 95 % übernommen, damit diese noch einmal gegen eine Varroaresistenz-Sequenzdatenbank geBLASTed werden konnten. Dieser Zwischenschritt erfolgte, um falsch-positive Treffer im nächsten Schritt zu verhindern. Diese Varroaresistenzdatenbank umfasst dabei 610 Gene und genetische Bereiche, welche durch verschiedene Studien in den Bereichen der „Omics“ mit einer Varroaresistenz assoziiert werden konnten (Behrens et al., 2011; Bianchi et al., 2023; Bourgeois et al., 2015; Conlon et al., 2019; Gebremedhn et al., 2023; Kaskinova et al., 2020; Mondet et al., 2020a; Oxley et al., 2010; Scannapieco et al., 2017; Spötter et al., 2016; Tsuruda et al., 2012; Zakar et al., 2014) und zusammengefasst wurden.

#### **4. Ergebnisse**

Es zeigt sich, dass aus den Thoraxproben die größere Menge an DNA extrahiert werden konnte (Abbildung 3). Abhängig ist dies vom höheren nutzbaren Ausgangsgewicht, da der Thorax im Mittel 0.0326 g und der Kopf 0.0142 g wog. Dies spiegelt sich auch in den Daten wider. Der Bienenkopf besitzt ein Mediengewicht der extrahierten DNA von 1415 ng, der Thorax 3345 ng und das Abdomen 2147.5 ng. Abdomen wurden dabei nur genutzt, wenn der Kopf und Thorax durch die Lagerung bereits zersetzt waren. In ähnlichen Studien, in denen auch DNA aus Bienen extrahiert wird, werden sowohl der Kopf, als auch Thorax benutzt (Al-Ameri and Alhasan, 2020; Wragg et al., 2022).

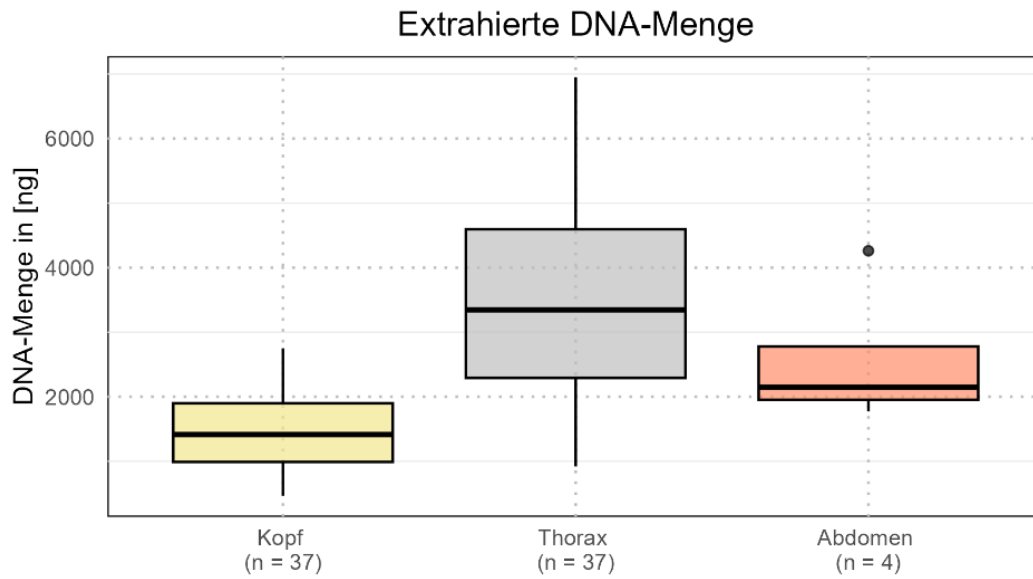


Abbildung 3: Extrahierte Menge an DNA in [ng] in Abhängigkeit vom verwendeten Teil (Kopf, Thorax, Abdomen) der Puppen

Es konnten in allen bisher prozessierten Proben Resistenzmarker nachgewiesen werden, unabhängig des SMR-Verhaltens (Abbildung 4). Ein Grund dafür liegt darin, dass eine Varroaresistenz nicht aus dem Vorhandensein eines oder mehrerer speziellen Gene hervorgeht, sondern aus deren Variation (Mondet et al., 2020a). Bisher ist lediglich zu erkennen, dass je mehr Basen sequenziert werden, desto mehr Resistenzmarker können gefunden werden. In Zukunft sollen diese Daten tiefer auf Variabilität untersucht werden.

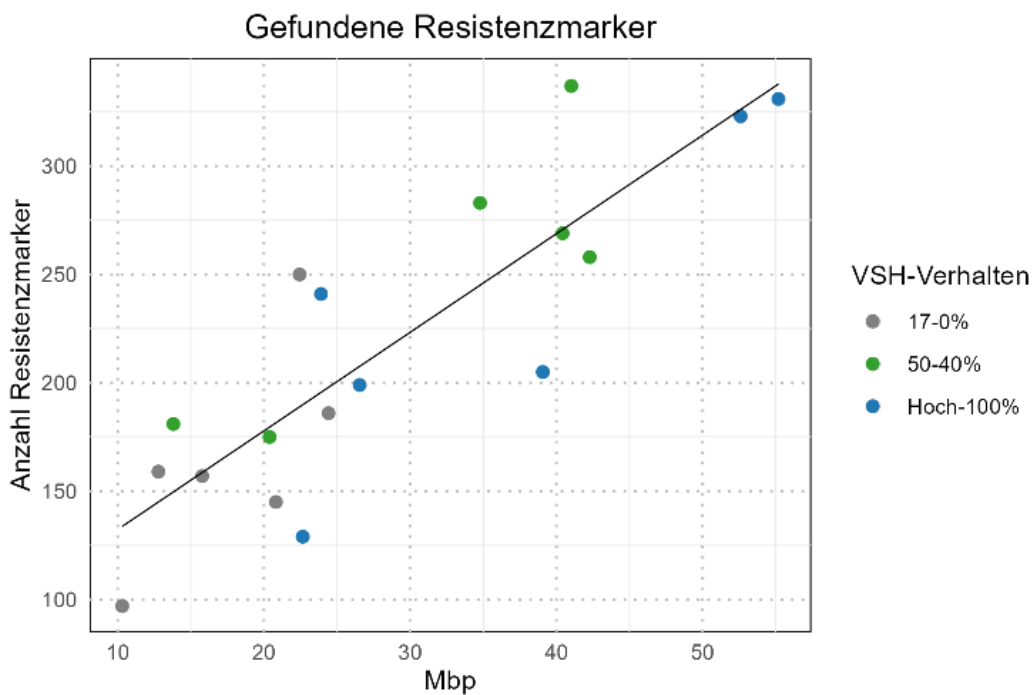


Abbildung 4: Anzahl der gefundenen Resistenzmarker in Abhängigkeit der sequenzierten Mbp

## 5. Ausblick

Da das Ziel, ein für Imker anwendbarer Test der Zuchttauglichkeit von Bienenköniginnen ist, wird dieser Teil des Projekts genutzt, um mehr über die Vererbung von Varroaresistenz-eigenschaften zu lernen und die gewonnenen Daten für die Entwicklung einzusetzen. Um signifikante Schlussfolgerungen zu erlangen, müssen im Laufe des Projekts noch mehr Daten generiert werden. Vor allem ist die Variation der gefundenen genetischen Bereiche interessant, da diese für die Ausprägung der Eigenschaften von Bedeutung ist (Jones et al., 2020). Diese Ergebnisse sollen mit den vom Imkerverein erhobenen SMR-Messwerten in Beziehung gesetzt werden.

Das Nymphenhäutchen der Bienenkönigin ist ein Gespinnst, welches die Königin nach Schlupf zurücklässt und stellt somit Genmaterial dar, welches einen nicht-invasiven Gentest ermöglicht. Durch die Zuchtinformationen des LSV und weiteren Bienenprobenmaterial (Nymphenhäutchen von Königinnen, Arbeiterinnenpuppen der Nachfolgeneration sowie Drohnen, die zur instrumentellen Begattung verwendet wurden) soll ein Datenset generiert werden, welches genügend Informationen für die Testentwicklung hergibt. Somit soll der Imker in Zukunft das Nymphenhäutchen der geschlüpften Königin in ein Labor einschicken können, damit eine Aussage über ein prozentuales Vorhandensein von Varroaresistenz-eigenschaften getroffen werden kann.

## 6. Kontaktdaten (optional)

Anschrift:

Tom Schmidt

Am Schwanenteich 4b

09648 Mittweida

E-Mail:

tschmi14@hs-mittweida.de

## 7. Literaturverzeichnis

- Adjlane, N., Tarek, E.-O., Haddad, N., 2016. Evaluation of Oxalic Acid Treatments against the Mite *Varroa destructor* and Secondary Effects on Honey Bees *Apis mellifera*. *J Arthropod Borne Dis* 10, 501–509.
- Al-Ameri, D.T., Alhasan, A.S., 2020. Study of the Genetic Diversity of Iraqi Honeybee (*Apis mellifera* L.) Populations utilizing the mtDNA COI region. *International Journal of Agricultural and Statistical Sciences*.
- Alphen, J.J.M., 2020. Natural selection, selective breeding, and the evolution of resistance of honeybees (*Apis mellifera*) against *Varroa*.
- Behrens, D., Huang, Q., Geßner, C., Rosenkranz, P., Frey, E., Locke, B., Moritz, R.F.A., Kraus, F.B., 2011. Three QTL in the honey bee *Apis mellifera* L. suppress reproduction of the parasitic mite *Varroa destructor*. *Ecology and Evolution* 1, 451–458. <https://doi.org/10.1002/ece3.17>
- Bianchi, E.M., Ferrari, C., Aguirre, N.C., Filippi, C.V., Vera, P.A., Puebla, A.F., Gennari, G.P., Rodríguez, G.A., Scannapieco, A.C., Acuña, C.V., Lanzavecchia, S.B., 2023. Phenotypic and genetic characterization of Africanized *Apis mellifera* colonies with natural tolerance to *Varroa destructor* and contrasting defensive behavior. *Front. Insect Sci.* 3, 1175760. <https://doi.org/10.3389/finsc.2023.1175760>
- Bourgeois, A.L., Rinderer, T.E., De Guzman, L.I., Holloway, B., 2015. Molecular genetic analysis of *Varroa destructor* mites in brood, fallen injured mites, and worker bee longevity in honey bees. *Journal of Apicultural Research* 54, 328–334. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1160635>
- Cini, A., Bordoni, A., Cappa, F., Petrocelli, I., Pitzalis, M., Iovinella, I., Dani, F.R., Turillazzi, S., Cervo, R., 2020. Increased immunocompetence and network centrality of allogroomer workers suggest a link between individual and social immunity in honeybees. *Sci Rep* 10, 8928. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65780-w>
- Conlon, B.H., Aurori, A., Giurgiu, A., Kefuss, J., Dezmirean, D.S., Moritz, R.F.A., Routtu, J., 2019. A gene for resistance to the *Varroa* mite (Acari) in honey bee (*Apis mellifera*) pupae. *Molecular Ecology* 28, 2958–2966. <https://doi.org/10.1111/mec.15080>

- Danka, R.G., Villa, J.D., 2003. Autogrooming by resistant honey bees challenged with individual tracheal mites. *Apidologie* 34, 591–596. <https://doi.org/10.1051/apido:2003050>
- De Coster, W., Rademakers, R., 2023. NanoPack2: population-scale evaluation of long-read sequencing data. *Bioinformatics* 39, btad311. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btad311>
- Gebremedhn, H., Claeys Bouuaert, D., Asperges, M., Amssalu, B., De Smet, L., De Graaf, D.C., 2023. Expression of Molecular Markers of Resilience against *Varroa destructor* and Bee Viruses in Ethiopian Honey Bees (*Apis mellifera simensis*) Focussing on Olfactory Sensing and the RNA Interference Machinery. *Insects* 14, 436. <https://doi.org/10.3390/insects14050436>
- Hess, J.F., Kohl, T.A., Kotrová, M., Rönsch, K., Paprotka, T., Mohr, V., Hutzenlaub, T., Brüggemann, M., Zengerle, R., Niemann, S., Paust, N., 2020. Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies. *Biotechnology Advances* 41, 107537. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107537>
- Hung, K.-L.J., Kingston, J.M., Albrecht, M., Holway, D.A., Kohn, J.R., 2018. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proc. R. Soc. B.* 285, 20172140. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2140>
- Jones, J.C., Du, Z.G., Bernstein, R., Meyer, M., Hoppe, A., Schilling, E., Ableitner, M., Juling, K., Dick, R., Strauss, A.S., Bienefeld, K., 2020. Tool for genomic selection and breeding to evolutionary adaptation: Development of a 100K single nucleotide polymorphism array for the honey bee. *Ecology and Evolution* 10, 6246–6256. <https://doi.org/10.1002/ece3.6357>
- Kaskinova, M.D., Gaifullina, L.R., Saltykova, E.S., Poskryakov, A.V., Nikolenko, A.G., 2020. Genetic markers for the resistance of honey bee to *Varroa destructor*. *Vestn. VOGiS* 24, 853–860. <https://doi.org/10.18699/VJ20.683>
- Mondet, F., Beaurepaire, A., McAfee, A., Locke, B., Alaux, C., Blanchard, S., Danka, B., Le Conte, Y., 2020a. Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: a systematic review of phenotypic and genomic research efforts. *International Journal for Parasitology* 50, 433–447. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.005>
- Mondet, F., Kim, S.H., De Miranda, J.R., Beslay, D., Le Conte, Y., Mercer, A.R., 2016. Specific Cues Associated With Honey Bee Social Defence against *Varroa destructor* Infested Brood. *Sci Rep* 6, 25444. <https://doi.org/10.1038/srep25444>
- Mondet, F., Parejo, M., Meixner, M.D., Costa, C., Kryger, P., Andonov, S., Servin, B., Basso, B., Bieńkowska, M., Bigio, G., Căuia, E., Cebotari, V., Dahle, B., Dražić, M.M., Hatjina, F., Kovačić, M., Kretavicius, J., Lima, A.S., Panasiuk, B., Pinto, M.A., Uzunov, A., Wilde, J., Büchler, R., 2020b. Evaluation of Suppressed Mite Reproduction (SMR) Reveals Potential for *Varroa* Resistance in European Honey Bees (*Apis mellifera* L.). *Insects* 11, 595. <https://doi.org/10.3390/insects11090595>
- Noël, A., Le Conte, Y., Mondet, F., 2020. *Varroa destructor*: how does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it? *Emerging Topics in Life Sciences* 4, 45–57. <https://doi.org/10.1042/ETLS20190125>
- Oxley, P.R., Spivak, M., Oldroyd, B.P., 2010. Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology* 19, 1452–1461. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04569.x>
- Pires, C.S.S., Maués, M.M., 2020. Insect Pollinators, Major Threats and Mitigation Measures. *Neotrop Entomol* 49, 469–471. <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00805-7>
- Pritchard, D.J., 2016. Grooming by honey bees as a component of varroa resistant behavior. *Journal of Apicultural Research* 55, 38–48. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1196016>
- Sakamoto, Y., Maeda, T., Yoshiyama, M., Konno, F., Pettis, J.S., 2020. Differential autogrooming response to the tracheal mite *Acarapis woodi* by the honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera*. *Insect. Soc.* 67, 95–102. <https://doi.org/10.1007/s00040-019-00732-w>
- Scannapieco, A.C., Mannino, M.C., Soto, G., Palacio, M.A., Cladera, J.L., Lanzavecchia, S.B., 2017. Expression analysis of genes putatively associated with hygienic behavior in selected stocks of *Apis mellifera* L. from Argentina. *Insect. Soc.* 64, 485–494. <https://doi.org/10.1007/s00040-017-0567-6>
- Spötter, A., Gupta, P., Mayer, M., Reinsch, N., Bienefeld, K., 2016. Genome-Wide Association Study of a *Varroa*-Specific Defense Behavior in Honeybees (*Apis mellifera*). *JHERED* 107, 220–227. <https://doi.org/10.1093/jhered/esw005>
- Trapp, J., McAfee, A., Foster, L.J., 2017. Genomics, transcriptomics and proteomics: enabling insights into social evolution and disease challenges for managed and wild bees. *Molecular Ecology* 26, 718–739. <https://doi.org/10.1111/mec.13986>

- Tsuruda, J.M., Harris, J.W., Bourgeois, L., Danka, R.G., Hunt, G.J., 2012. High-Resolution Linkage Analyses to Identify Genes That Influence Varroa Sensitive Hygiene Behavior in Honey Bees. *PLoS ONE* 7, e48276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048276>
- URL 1 (12.03.2024): Landesverband Sachsen Varroaresistenzucht e.V., URL: <https://varroaresistenzucht.de/ueber-unseren-verein/smr-vsh-zucht-in-sachsen>
- Wang, Yunhao, Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Yuru, Au, K.F., 2021. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol* 39, 1348–1365. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>
- Wick, R., 2018. Porechop.
- Wragg, D., Eynard, S.E., Basso, B., Canale-Tabet, K., Labarthe, E., Bouchez, O., Bienefeld, K., Bieńkowska, M., Costa, C., Gregorc, A., Kryger, P., Parejo, M., Pinto, M.A., Bidanel, J., Servin, B., Le Conte, Y., Vignal, A., 2022. Complex population structure and haplotype patterns in the Western European honey bee from sequencing a large panel of haploid drones. *Molecular Ecology Resources* 22, 3068–3086. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13665>
- Zakar, E., Jávora, A., Kusza, Sz., 2014. Genetic bases of tolerance to Varroa destructor in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insect. Soc.* 61, 207–215. <https://doi.org/10.1007/s00040-014-0347-5>