

Fugapis – Funktionelle Genom Analyse auf Krankheitsresistenzen bei der Honigbiene

In den letzten Jahrzehnten erlebte die Honigbiene (*Apis mellifera*) in Deutschland wie auch in anderen europäischen Ländern einen dramatischen Rückgang der Völkerzahlen. Davon betroffen waren sowohl von Imkern gehaltene als auch freilebende Bienenvölker. Dieser europaweite Verlust von Honigbienen ist nicht nur ein Problem für die Imkerei sondern auch für viele Nutz- und Wildpflanzen, deren Bestäubung direkt von der Honigbiene abhängt. Als ursächlich für dieses Verluste wurden vor allem Erkrankungen der Bienenbrut identifiziert. Alle Versuche krankheitsresistente Honigbienen zu züchten haben allerdings bisher keine befriedigenden Ergebnisse erzielen können. Das liegt zum einen an der sehr zeitaufwendigen Auswahl von resistenten Phänotypen, und zum anderen an dem nur schwer zu kontrollierenden Paarungssystem der Honigbiene: Königin und Drohnen paaren sich im Flug weitab des Bienenstandes. Ziel von Fugapis ist es mittels funktioneller Analyse des Honigbienen-genoms jene Gene zu identifizieren welche maßgeblich an der Resistenzbildung beteiligt sind. Die identifizierten Gene und Genkaskaden werden dann die Zucht von resistenten Honigbienen entscheidend erleichtern und beschleunigen.

F. Bernhard Kraus, Peter Rosenkranz, Eva Frey, Jürgen Tautz und R.F.A. Moritz



Imkerei, Völkerverluste und Bienenkrankheiten

Imkerei, ob als Beruf oder Hobby ausgeübt, ist eine Tätigkeit, die sowohl für den Einzelnen als auch für die gesamte Gesellschaft von großer Bedeutung ist. Der direkte finanzielle Gewinn der Bienenhaltung wird häufig unterschätzt und übersteigt z.B. den Ertrag aus der Schaf- und Ziegenhaltung um 20%. Zusätzlich steigern Honigbienen auch die Produktivität der Landwirtschaft durch ihre Bestäubungsleistung. Insgesamt profitieren über 80% aller Kulturpflanzen von der Bestäubung durch Bienen¹. Von mindestens ebenso großer Bedeutung ist auch, dass die Honigbiene unzählige Wildpflanzen bestäubt und damit wesentlich zur Aufrechterhaltung der Funktion ganzer Ökosysteme beiträgt (Abb. 1).

Der massive Rückgang der Imkerei in den zurückliegenden Jahrzehnten hat somit direkte Auswirkungen sowohl auf Gesellschaft als auch auf die gesamte Umwelt. Die Dichte an Honigbienen-völkern ist, trotz Imkerei, momentan sogar niedriger als sie unter natürlichen Bedingungen in ungestörten Habitaten zu erwarten wäre. Eine Hauptursache für diesen dramatischen Rückgang der Honigbiene in ganz Europa sind die hohen Völkerverluste durch neue und alte Pathogene der Honigbiene². Ganze Bienenstände und imkerliche Betriebe wurden aufgelöst weil Imker nicht mehr in der Lage oder Willens sind, weiterhin mit anhaltend hohen Völkerverlusten und chemischen Behandlungsmethoden zu arbeiten.

Als Reaktion auf den europaweiten Rückgang der Honigbiene wurde nun schon seit mehreren Jahrzehnten der Versuch

unternommen, krankheitsresistente Honigbienen durch klassische Zuchtprogramme heranzuziehen. Leider waren die Ergebnisse dieser Bemühungen bisher nicht sehr vielversprechend. Ursache für die geringen Erfolge sind die langen Zeitintervalle, die benötigt werden um den Phänotyp eines Bienenvolkes zu testen. Die Leistungsprüfung eines Bienenvolkes erfordert zwei Jahre, ein langer Zeitraum wenn es darum geht auf neu eingebrachte Krankheiten durch Zucht zu reagieren. Ein weiteres Problem, das bei der Züchtung von Honigbienen auftritt ist, dass das Honigbienen-volk eine äußerst komplexe genetische Struktur darstellt, deren Eigenschaften aus der Interaktion tausender einzelner Arbeiterinnen resultieren. Diese Arbeiterinnen sind zwar alle die Nachkommen einer einzigen Königin haben aber 20 oder mehr verschiedene Väter, da sich die Königin mit vielen Männchen paart. Diese genetische Komplexität des Bienenvolkes reduziert die Genauigkeit von Zuchtwahl erheblich und klassische Zuchtprogramme haben sich deshalb oft als ungeeignet oder schwer durchführbar erwiesen.

Honigbienen haben ein breites Verhaltensrepertoire zum Aufspüren und Entfernen erkrankter Bienenbrut, allerdings tritt dieses Verhalten auf Kolonieebene natürlich erst dann zutage, wenn das Bienenvolk bereits stark infiziert ist. Folglich ist es für



Arbeitsmaterial **Modul 2** Lebenssystem Nutztier

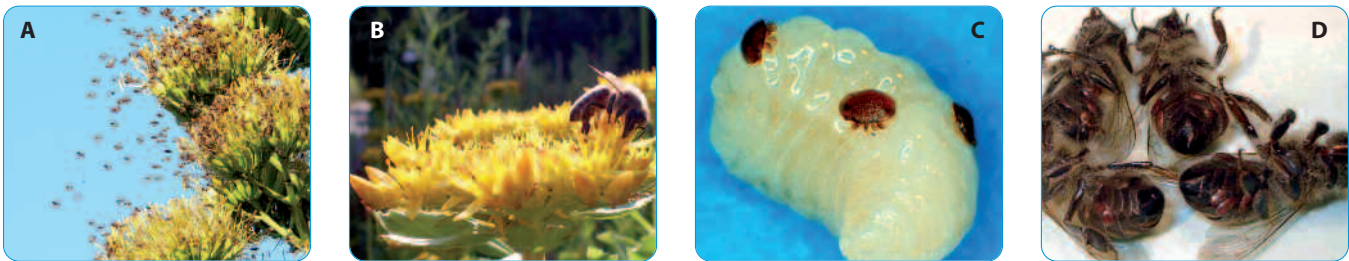


Abb. 1: Fotos A und B zeigen blütenbesuchende Honigbienen; C und D zeigen eine Bienenlarve bzw. adulte Bienen, die von Varroa Milben befallen sind. (Fotos A und C Peter Rosenkranz, Foto B Richard Odemer, Foto D von Frank Neumann)

die Praxis von großem Interesse solche immunologischen Mechanismen auf der Ebene des Individuums zu kennen, die Infektionen von vornherein verhindern. Die genetischen Grundlagen des Immunsystem bei Insekten sind gut untersucht und mehrere Gene, die die Immunabwehr bei der Fruchtfliege *Drosophila* kontrollieren sind bereits identifiziert worden. Da seit kurzer Zeit auch das Genom der Honigbiene komplett sequenziert zur Verfügung steht sind neue, DNA basierte Zuchtkonzepte für die Honigbiene möglich, die direkt auf der Identifizierung spezifischer Immungene beruhen.

Zielsetzung von Fugapis

Ziel von Fugapis ist es, Gene der Honigbiene zu identifizieren, die bei der Krankheitsresistenz eine signifikante Rolle spielen und diese Gene dann funktionell zu charakterisieren. Dies beinhaltet sowohl Gene, die spezifisches Verhalten kontrollieren, als auch solche die Einfluss auf physiologische Mechanismen haben. Um dieses Ziel zu erreichen wird eine genetische Besonderheit der Honigbiene genutzt, die sie für genetische Studien geradezu prädestiniert: Drohnen der Honigbiene sind haploide Organismen und sind daher, im Vergleich zu diploiden Organismen wie den Arbeiterinnen, genetisch sehr einfach zu charakterisieren. Auch wenn Arbeiterinnen die allermeisten Aufgaben im Bienenstaat erledigen, sind sowohl Drohnen wie Arbeiterinnen gleichermaßen von Krankheiten und Parasiten der Bienenbrut betroffen. Drohnen sind deshalb aufgrund ihres haploiden

Genoms bei gleichzeitigen identischen Selektionsdrücken durch Krankheiten, der Organismus der Wahl für die Selektion resistenter Phänotypen³.

In Fugapis werden zunächst Hybrid-Königinnen aus entsprechenden Honigbienen Zuchtlinien herangezogen, die dann resistente, beziehungsweise krankheitsanfällige Drohnen erzeugen. Dies erfolgt unter Einbeziehung des deutschlandweiten Monitoring Projekts, das 125 Bienenstände und mehr als 1500 Bienenvölker umfasst und somit ein sehr breites Spektrum an Koloniephänotypen abdeckt. Die von den Hybridköniginnen produzierten Drohnenlarven werden dann einzeln infiziert und in resistente oder krankheitsanfällige Individuen kategorisiert, welche dann als Grundlage für entsprechende DNA Pools dienen (Abb. 2). Die Pathogene/Parasiten die in Fugapis als wichtigste Erkrankungen der Bienenbrut im Fokus stehen sind zum einen die brutparasitische Milbe *Varroa destructor* (Abb. 1) als auch das Bakterium *Paenibacillus larvae*, welches die amerikanische Faulbrut verursacht. Ein weiteres Merkmal auf das die Drohnen Larven untersucht werden ist die generelle Immunkompetenz, hier werden Unterschiede und die Stärke der Immunantwort kategorisiert. Nach dem Erhalt entsprechender Genpools aus den resistenten und anfälligen Drohnen werden die Regionen des Honigbienen-genoms, die mit Krankheitsresistenzen gekoppelt sind, mittels 500 DNA Markern (Mikrosatelli-

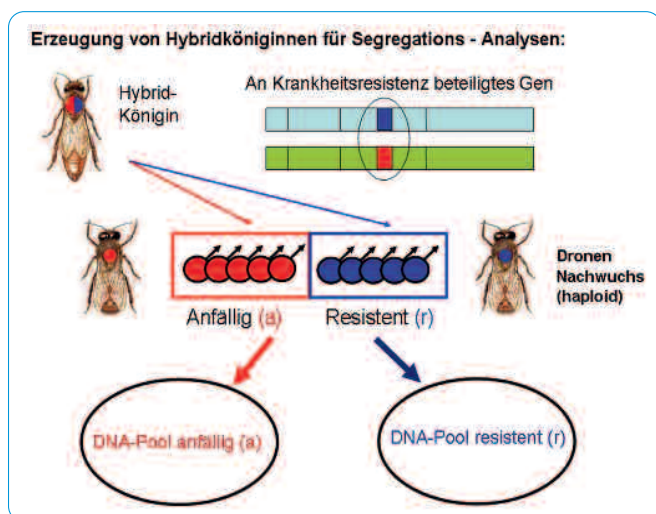
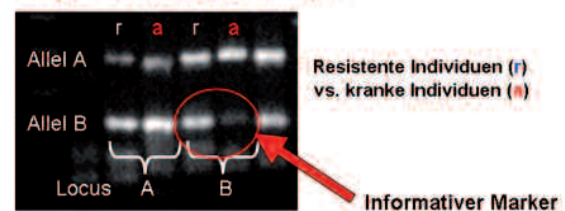


Abb. 2 Erzeugung von Hybridköniginnen und Drohnen für die Segregationsanalyse

Bulk segregation analysis (BSA)

- DNA-Pools aus definierten Phänotypen von Drohnen
 1. Varroa Tolleranz
 2. Faulbrut Resistenz
 3. Generelle Immunkompetenz
- Detektierung von unterschiedlichen Amplifikationsmustern von 400 Mikrosatelliten Markern:



➔ Identifizierung von Kopplungsgruppen für Resistenzen

Abb 3: Prinzip einer Segregationsanalyse (BSA) an resistenten (r) und anfälligen (a) Individuen

Arbeitsmaterial

Modul 2 Lebenssystem Nutztier

ten) in einer Segregationsanalyse (*Bulk Segregation Analysis*) kartiert (Abb. 3). Da das gesamte Honigbienenengenom bereits bekannt ist und die gesamte DNA Sequenzinformation zur Verfügung steht, ist es anschließend möglich, die so identifizierten genomische Regionen einer weiteren Feinkartierung zu unterziehen. Diese Verfahren erlaubt es dann, einzelne Gene, die an der Resistenzbildung maßgeblich beteiligt sind, zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Komplementär zu der Genkartierung werden auch vergleichende Genexpressionsstudien zwischen resistenten und krankheitsanfälligen Drohnenlarven mittels Microarrays durchgeführt, um die an der Resistenz beteiligten Genkaskaden zu identifizieren.

Nach der erfolgreichen Identifizierung von Resistenzgenen der Honigbiene ist die Entwicklung von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) innerhalb dieser Gene geplant. Für jedes Gen kann so ein Set von SNPs entwickelt werden, das resistente bzw. krankheitsanfällige Allele des jeweiligen Gens eindeutig charakterisiert. Kombinationen dieser SNPs Sets sollen zu einem DNA basierten Zuchtwerkzeug entwickelt werden, das es ermöglicht, mit bisher unerreichter Präzision und minimalem Aufwand, unterschiedlichste Zuchtlinien der Honigbiene auf Krankheitsresistenzen zu screenen.

Referenzen

1 Carreck NL, Williams IH 1998 *The economic value of bees in the UK*. *Be World* 79:115-123 2 Moritz RFA et al. 2007. *The size of wild honeybee populations (Apis mellifera) and implications for the conservation of honeybees*. *J Insect Conserv* (2007) 11:391–3973 3 Behrens et al. 2007 *Infection of drone larvae with American Foulbrood*. *Apidologie*, *Apidologie* 38 (2007) 281–288

Glossar

Diploid: mit doppeltem Chromosomensatz ausgestattet.

Haploid: mit einfachem Chromosomensatz ausgestattet.

Mikrosatelliten: Kurze, nicht kodierende repetitive DNA Sequenzen im Genom eines Organismus.

Phänotyp: Summe aller morphologischen, physiologischen und Verhaltens-Eigenschaften eines Organismus.

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs): Variationen einzelner Basen eines DNA Stranges.

Kontakt

Dr. Bernhard Kraus
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Institut für Biologie
E-mail: Kraus@zoologie.uni-halle.de



Varroa Milben, Foto: Helga R. Heilmann

Arbeitsaufträge

1. Veranschaulichen Sie sich den Umfang der „Bienen – Problematik“ in einer Stoffsammlung oder als Mind Map.
2. Diskutieren Sie die Aussage: „Ohne Honigbienen – kein funktionsfähiges Ökosystem“. Nutzen Sie Ihr Mind Map als Grundlage.
3. Welche Probleme, Ziele bzw. Fragen stehen vor den Wissenschaftlern?
4. Halten Sie einen Kurzvortrag über einen speziellen Bereich des Themas. Mögliche Vorträge könnten vergeben werden:
 - a. Verhalten der Bienen
 - b. immunologische Mechanismen
 - c. Sequenzierungsmethoden
 - d. Michael Lattorff – Portrait (www.genomxpress.de)
5. Beschreiben Sie die Erzeugung von Hybridköniginnen und Drohnen.