

# Blick in die Vergangenheit mittels Genomanalyse von Museumsbienen

Am Beispiel der Schweizer Honigbienen wurde in einem Forschungsprojekt des ZBF in Zusammenarbeit mit der Universität Bilbao untersucht, inwiefern die Veränderungen der imkerlichen und landwirtschaftlichen Praxis sowie der Umwelt die genetische Vielfalt im Laufe des letzten Jahrhunderts beeinflusst und welche Spuren diese auf dem Genom der Bienen hinterlassen haben.

MELANIE PAREJO<sup>A,B</sup> UND JEAN-DANIEL CHARRIÈRE<sup>B</sup>

<sup>A</sup> LAB. GENETICS, UNIVERSITY OF THE BASQUE COUNTRY (UPV/EHU), LEIOA, SPANIEN;

<sup>B</sup> ZENTRUM FÜR BIENENFORSCHUNG, AGROSCOPE, 3003 BERN

Die Honigbiene musste sich im Verlauf des letzten Jahrhunderts an neue Umwelteinflüsse und Betriebsweisen anpassen. Ohne Zweifel war die grösste Herausforderung die Ankunft der Varroamilbe in den 1980er Jahren, welche nicht nur die Imkerpraxis stark verändert hat, da befallene Völker eine jährliche Behandlung benötigen, sondern sogar wilde Honigbienen in ganz Europa praktisch auslöschte oder zumindest stark dezimierte. Der damit verbundene Populationsrückgang und die alljährlich wiederkehrenden, teils hohen Völkerverluste könnten möglicherweise zu einem genetischen Engpass in der verbleibenden Honigbienenpopulation geführt haben. Solch ein Populationskollaps kann zum Verlust der genetischen Vielfalt führen und damit das langfristige Anpassungspotenzial an zukünftige Umweltveränderungen erheblich beeinträchtigen.

Die Landwirtschaft erlebte in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts eine umfassende Intensivierung, die

mit drastischen Landnutzungsänderungen und der häufigeren Nutzung von Pflanzenschutzmitteln verbunden war und in der Folge einen signifikanten Rückgang der Artenvielfalt von Insekten auslöste.<sup>1</sup> Es intensivierte sich auch die Imkerei, in welcher vermehrt Chemikalien zum Einsatz kamen, insbesondere in der Bekämpfung gegen die Varroamilbe. Sowohl Wirkstoffe, welche im Bienenstock angewendet werden, als auch Agrochemikalien können sich im Bienenwachs über viele Jahre akkumulieren und dadurch langfristig die Gesundheit der Bienenvölker beeinflussen. Zudem hat die Bienenzucht im gleichen Zeitraum eine rasche Professionalisierung erfahren, einschliesslich Wanderimkerei, verstärkter Züchtungsbemühungen sowie Königinnen- und Völkerimporte aus anderen Regionen.

Es ist anzunehmen, dass dieser drastische Rückgang wildlebender Honigbienen und die Intensivierung der Landwirtschaft und Imkerei in den letzten Jahrzehnten die genetische Vielfalt und Identität einheimischer

Honigbienenpopulationen beeinflusst und Selektionspuren auf dem Genom hinterlassen hat. Eine ideale Möglichkeit, diese Veränderungen im Genom zu studieren ist, Proben vor dieser Zeit zu untersuchen. Museumsexemplare bieten hier eine hervorragende Gelegenheit dazu. Dank der technischen Fortschritte ist es nämlich heutzutage möglich, genügend Erbgut (DNA) für die genetische Analyse (Sequenzierung) historischer Proben zu gewinnen.

## Fallstudie Schweiz:

### Dunkle Biene, *Apis mellifera mellifera*

Für diese Studie<sup>2</sup> konnten wir Museumsbienen vom Naturhistorischen Museum in Bern aus den Jahren 1879 bis 1959 untersuchen. Diese wurden uns freundlicherweise vom Kurator Hannes Baur zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Exemplare der Dunklen Biene (*Apis mellifera mellifera*), da vor den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts Carnica und andere Bienenrassen auf der Alpennordseite der Schweiz noch



Museumsbienen aus dem Naturhistorischen Museum in Bern.

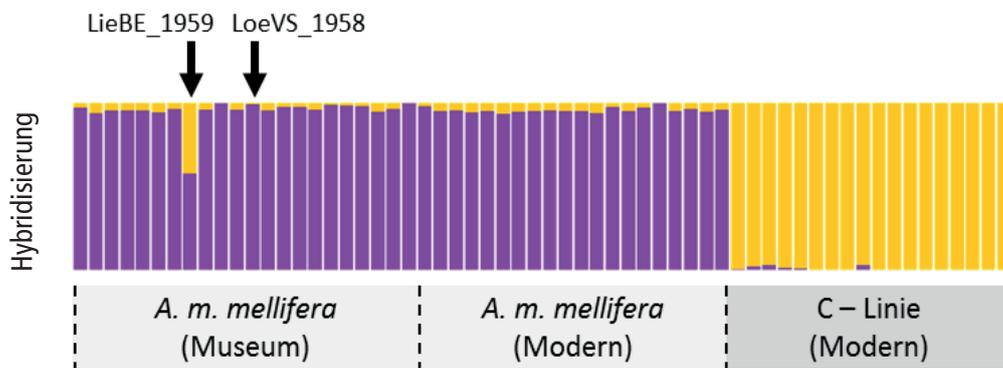


Diagramm 1. Hybridisierungswerte basierend auf dem ganzen Genom. Jeder Balken repräsentiert eine Biene und die Farbe die anteilige genetische Zugehörigkeit der Linien M (violett) und C (gelb). Zum Beispiel ist der Balken ganz gelb, wenn die Biene zu 100% der C-Gruppe zugeordnet wird. *A. m. carnica* und *A. m. ligustica* sind nah verwandt und gehören beide der Linie C an.

wenig verbreitet waren. Die DNA haben wir lediglich aus den Hinterbeinen der Biene extrahiert, um die wertvolle Sammlung der Bienenexemplare zu bewahren. Dabei ist es uns gelungen, von insgesamt 22 Bienen genügend Material für die Sequenzierung zu erhalten. Die Sequenzdaten der Museumsbienen wurden dann mit den Daten der *A. m. mellifera*-Bienen aus dem Jahr 2014, die wir in unserer vorherigen Studie (SBZ 04/2017) vorgestellt haben, verglichen. Unser Ziel war, Unterschiede in der genetischen Vielfalt mütterlicher Abstammung (mitochondriale DNA), Hybridisierung (Kreuzung mit anderen Rassen) und Selektionssignale zu untersuchen. Die historischen und modernen Populationen unterscheiden sich durch natürliche und anthropogene Faktoren: vorherrschende Krankheitserreger, Imkerei- oder Landwirtschaftspraktiken wie z. B. dem Einsatz von Pestiziden. Heutzutage sind die Honigbienen stark vom menschlichen Management abhängig und ihre genetische Zusammensetzung wird daher durch die Haltung, den Handel und die Zucht beeinflusst. Darüber hinaus sind sie den grossen Landnutzungsänderungen und den landwirtschaftlichen Praktiken der letzten Zeit ausgesetzt. Vielerorts war die Imkerei bis in die 1950er-Jahre viel weniger intensiv und näher an den natürlichen Umweltbedingungen mit wenig Selektion, grösstenteils Schwarmbienenzucht und somit in ständigem Genfluss mit der Wildpopulation, die viel grösser war als heute.

### Hybridisierung und mütterliche Abstammung

Mit den Sequenzdaten der Museumsbienen und moderner Proben wurde als erstes eine Hybridisierungsanalyse gemacht (siehe Diagramm 1). Es

zeigt sich, dass alle Museumsbienen, ausser eine, reinrassige *A. m. mellifera* sind. Eine Probe, welche 1959 in der Umgebung von Liebefeld gesammelt wurde (LieBE\_1959), ist ein Hybrid mit der C-Linie. Die Analyse der mütterlichen Abstammung (mitochondriale DNA) ergab, dass zwei Museumsbienen eine mütterliche Abstammung der C-Linie aufweisen. Eine dieser Bienen ist LieBE\_1959, welche bereits im Genom hybridisiert ist (Vorhandensein von Genen einer anderen Rasse). Die andere Probe wurde 1958 im Lötschental in den Walliser Alpen beprobt (LoeVS\_1958) (siehe Pfeile im Diagramm 2). Das Lötschental liegt an der traditionellen Nord-Süd-Transitrouten durch die Schweizer Alpen. Die mütterliche C-Abstammung in der Probe könnte daher aus Italien stammen. Bei der Hybridisierungsanalyse des Genoms ist die Probe LoeVS\_1958 allerdings reinrassig *A. m. mellifera*, was suggeriert, dass die Einwanderung mehrere Generationen früher geschehen ist.

Dass die einzige hybridisierte Probe (LieBE\_1959) aus Liebefeld stammt, überrascht nicht, da es am Zentrum für Bienenforschung ab Ende der 1950er-Jahre Programme zur Züchtung und Selektion verschiedener Rassen gab. Es gibt bereits frühere Berichte von Testbienenständen und Einführungen von nicht-einheimischen Königinnen. Jedoch konnten wir in den restlichen Museumsbienen keine weiteren Hybridisierungen erkennen. Das deutet darauf hin, dass die Einführung nicht-einheimischer Rassen noch nicht weit verbreitet war und deren Einfluss angesichts der viel höheren Dichte der *A. m. mellifera* wahrscheinlich keinen signifikanten Einfluss auf die genetische Struktur und Integrität einheimischer Bienen darstellte.

### Genetische Diversität

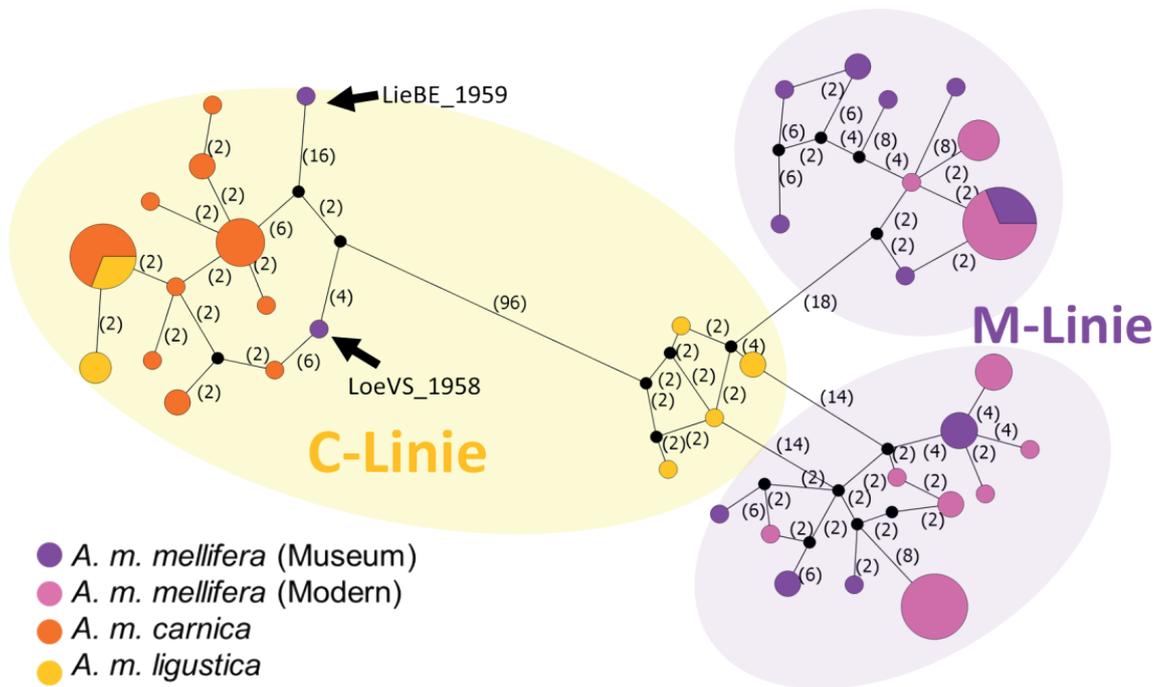
Für die Gesundheit und Vitalität von Honigbienenvölkern ist eine hohe genetische Diversität wichtig, um eine gute Anpassungsfähigkeit der Bienen an ihre Umwelt zu gewährleisten. Die Hypothese in unserer Studie war deshalb, dass die Museumsbienen im Vergleich zur heutigen *A. m. mellifera*-Population eine grössere genetische Vielfalt haben. Dies erwarteten wir, da aufgrund der Ankunft der Varroamilbe die wilden Honigbienenvölker praktisch verschwunden sind und es deshalb einen Bevölkerungsrückgang gab. Zudem gab es zum damaligen Zeitpunkt noch geringere Zuchtbestrebungen. Das Verstärken von erwünschten Eigenschaften und das Wegzüchten von unerwünschten Eigenschaften ist das Ziel der Nutztierzucht. Sämtliche Zuchtbestrebungen gehen deshalb unweigerlich mit einem Rückgang der genetischen Vielfalt innerhalb der Population einher. Entgegen unseren Erwartungen finden wir keine Hinweise auf einen signifikanten Verlust der genetischen Diversität der Schweizer Honigbienen und stellen fest, dass die genetische Vielfalt nicht nur gleich, sondern sogar geringfügig höher ist, höchstwahrscheinlich aufgrund moderner Imkereipraktiken. Das heisst, der Bevölkerungsrückgang hat nicht zu einem genetischen Engpass in der aktuellen Schweizer *A. m. mellifera* Population geführt, welche somit noch immer das genetische Anpassungspotenzial für zukünftige Umweltveränderungen besitzt. Allerdings ist dabei zu beachten, dass wir nur 22 Museumsbienen sequenzieren konnten und diese Aussage deshalb auf einer begrenzten Stichprobe basiert.

### Selektionssignaturen zwischen modernen und Museumsbienen

Durch den Vergleich der Sequenzdaten der modernen und der Museumsbienen entlang des gesamten Genoms lassen sich Unterschiede zwischen den beiden Populationen in bestimmten Genen oder Genregionen feststellen. Solche Unterschiede können sich durch Selektionsdruck ergeben, sei es durch natürliche Selektion oder von Menschen herbeigefügt



Diagramm 2. Mütterliche Abstammung basierend auf der mitochondrialen DNA. Zwei Museumsbienen LieBE\_1959 und LoeVS\_1958 haben eine mütterliche Abstammung, welche der C-Linie zuzuordnen ist. Die Zahlen in Klammern zeigen die Anzahl Unterschiede (Basenpaare) zwischen zwei Proben. Ein kleiner Punkt repräsentiert eine Probe, ein grösserer Punkt repräsentiert mehrere Proben.



Selektion (Zucht). Bei dieser Analyse konnten wir eine Vielzahl von Genen identifizieren, welche signifikant unterschiedlich sind und verschiedene wichtige molekulare und biologische Funktionen erfüllen.

Die am stärksten vertretene Gruppe enthält Proteine der Immunglobulin-Superfamilie. Diese Proteine können andere Zellen erkennen und an ihnen haften. Sie sind an einer Vielzahl von Funktionen beteiligt, darunter der Zell-Zell-Erkennung, der Muskelstruktur, der Zelloberflächenrezeptoren und dem Immunsystem. Es konnte gezeigt werden, dass Mitglieder dieser Genfamilie in anderen Insekten bei einer Infektion hochreguliert, das bedeutet vermehrt gebildet, werden. Es könnte also sein, dass diese Selektionssignatur in den Schweizer Honigbienen auf das Aufkommen neuer Parasiten und Krankheitserreger zurückzuführen ist, von welchen es viele gibt. Zum Beispiel sind durch die *Varroa* neue virulente Viren eingeführt worden. Auch der Darmparasit *Nosema ceranae* ist erst vor relativ kurzer Zeit in Europa angekommen. In der Schweiz ist zudem die Europäische Faulbrut seit einigen Jahrzehnten wieder relativ weit verbreitet. Es ist deshalb gut möglich, dass sich die Bienen an diese neuen Herausforderungen anpassen mussten und dies im Genom nun ersichtlich ist.

Eine weitere stark vertretene Gruppe, bei welcher sich signifikante Unterschiede zwischen den modernen und den Museumsbienen zeigen, ist die Gruppe der sogenannten Neurotransmittergene und Gene, die mit dem Nervensystem assoziiert sind. Darunter sind fünf nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChRs), ein Gamma-Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptor und zwei Glutamatrezeptoren. Diese Proteine sind Angriffspunkte mehrerer Insektizide, die als Pflanzenschutzmittel oder Biozide in Verwendung sind: Neonicotinoide binden an die nAChRs; GABA-Rezeptoren sind Zielstellen von Chlorkohlenwasserstoffen (z. B. Endosulfan, Dieldrin), sowie von Fipronil, das auch auf Glutamatrezeptoren abzielt. In der Schweiz wurde Dieldrin 2004 verboten und Chlorkohlenwasserstoffe werden nicht mehr verwendet, wurden jedoch in den 1950er- und 1960er-Jahren aufgrund ihrer Wirksamkeit stark in der Landwirtschaft eingesetzt und könnten daher möglicherweise einen starken Selektionsdruck auf die Bienen ausgeübt haben. Die erste Generation der Neonicotinoide wurde in den 1990er Jahren in der Landwirtschaft eingesetzt. Die EU und die Schweiz haben die Verwendung der drei für Honigbienen toxischsten Neonicotinoide mit wenigen Ausnahmen mittlerweile verboten. Bezüglich der GABA-Kanäle

konnte in Studien gezeigt werden, dass auch Thymol mit GABA-Rezeptoren in Insekten interagiert. Wenn Thymol im Bienenstock angewendet wird, stehen Honigbienen in direktem Kontakt mit dem Wirkstoff, und dies kann ebenfalls einen Selektionsdruck ausüben.

Insgesamt deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass sich unsere Bienen rasch an neue Herausforderungen anpassen mussten, insbesondere dem vermehrten Einsatz von Chemikalien in der modernen Landwirtschaft und Bienenhaltung und der Ankunft neuer Krankheiten und Parasiten. Diese Anpassungen hinterliessen Spuren im Genom der untersuchten *A. m. mellifera*-Population. Mittels Genomsequenzierung können wir heute diesen kleinen Schritt der Evolution beobachten – wie spannend! ☐

**Literatur**

1. Sánchez-Bayo, F.; Wyckhuys, K. A. G. (2019) Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation* 232: 8–27 (<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>).
2. Parejo, M.; Wragg, D.; Henriques, D.; Charrière, J.-D.; Estonba, A. (2020) Digging into the genomic past of Swiss honey bees by whole-genome sequencing museum specimens. *Genome Biology and Evolution* (<https://doi.org/10.1093/gbe/evaa188>).