Genom-Analyse: weitere Schritte in Richtung eines zielgerichteten Selektionsprozesses

Die Genomanalyse von Honigbienen lieferte in den letzten Jahren bereits wichtige Informationen über die Herkunft und genetische Vielfalt von Honigbienen.[1,2] Doch auch für die Identifikation von Genen, welche die Ausprägung von Zuchtmerkmalen beeinflussen, ist sie eine wertvolle Methode, die den Selektionsprozess in Zukunft zielgerichtet verbessern kann.

MATTHIEU GUICHARD (*matthieu.guichard@agroscope.admin.ch*)[1,2], BENJAMIN DAINAT[1] UND MARKUS NEUDITSCHKO[2]
[1]AGROSCOPE, ZENTRUM FÜR BIENENFORSCHUNG, SCHWARZENBURGSTRASSE 161, 3003 BERN
[2]AGROSCOPE, ANIMAL GENOPHENOMICS, RTE DE LA TIOLEYRE 4, 1725 POSIEUX

Bei der Honigbiene wie auch bei anderen Nutztieren wird die Ausprägung von Zuchtmerkmalen durch deren Genom beziehungsweise Erbgut beeinflusst. Durch die Entschlüsselung des gesamten Genoms anhand einer vollständigen Sequenzierung ist es möglich, einzelne Gene zu identifizieren, die an der Ausprägung eines wichtigen Zuchtmerkmals beteiligt sind. Anhand dieser Information ist es möglich, die genetischen Grundlagen eines Zuchtmerkmals besser zu verstehen und Honigbienenvölker effizient zu selektieren. In der Populationsgenetik interessieren wir uns deshalb vor allem für die Genorte, welche einen signifikanten Einfluss auf den Phänotyp (gemessenen Leistungswert) eines Zuchtmerkmals haben. Diese Genorte werden auch Quantitative Trait Loci (QTL) genannt und bestimmen messbare Zuchtmerkmale wie die Honigproduktion, die Sanftmut oder das Hygieneverhalten.

Methode

Um die QTLs in Schweizer Honigbienenvölkern zu identifizieren, haben wir pro Bienenvolk 500 Arbeiterinnen für die Erbgutanalyse entnommen. Diese grosse Anzahl an Arbeiterinnen ermöglicht die Erfassung der gesamten genetischen Vielfalt eines Bienenvolkes, welches aus der wiederholten Befruchtung der Königin mit 10 bis 20 Drohnen entsteht. Um die DNA, den Träger der Erbinformation, für jedes der beprobten Völker zu extrahieren, wurden die entnommenen Arbeiterinnen im Labor entsprechend präpariert. Diesen Vorgang bezeichnet man als «Pool-Sequenzierung», da die Genominformation eines Honigbienenvolkes anhand einer Gruppe von Individuen (die entnommenen Arbeiterinnen = der Pool) abgeleitet wird. Das Genom der Honigbiene setzt sich aus 16 aufeinanderfolgenden Chromosomen zusammen.

Abbildung 1: Ein SNP-Beispiel: Die beiden oben gezeigten Genomabschnitte zeigen eine Variation eines einzigen Nukleotids (G kann in der Population durch C ersetzt werden). G und C sind die beiden Allele (Versionen), die in der Population beobachtet werden.

Für die erfolgreiche Identifikation von QTLs werden in einer sogenannten genomweiten Assoziationsanalyse (GWAS) die phänotypischen und genotypischen Informationen von Bienenvölkern miteinander verglichen. Dabei werden in der Regel nur Genorte berücksichtigt, welche eine Variation innerhalb einer Population (z. B. *Apis mellifera mellifera*) zeigen. Solche Genorte werden häufig auch als SNPs («Single Nucleotide Polymorphism») bezeichnet und beziehen sich auf die Variation eines einzelnen Nukleotids (= A-, T-, C- und G-Basen) in einem Genom (Abbildung 1).

Im Vergleich zur Genomsequenzierung von einzelnen Individuen kann bei einer Pool-Sequenzierung (z. B. eines Honigbienenvolkes) nicht eindeutig ein SNP-Genotyp abgeleitet werden (siehe Abbildung 1 Genotyp GC). Aus diesem Grund berechnet man für jeden SNP eine Allelfrequenz, um eine GWAS-Studie durchführen zu können. Durch dieses Vorgehen kann es zu starken genetischen Unterschieden zwischen den Honigbienenvölkern kommen. Zum Beispiel ist es möglich, dass ein Arbeiterinnenpool eines Volkes eine 85 % G-Allelfrequenz und eine 15 % C-Alllelfrequenz aufweist und der Arbeiterinnenpool eines weiteren Volkes für den gleichen SNP eine 20 % G-Allelfrequenz und eine 80 % C-Allelfrequenz zeigt. Unterscheiden sich diese Völker nun auch stark bei der phänotypischen Beobachtung und bestätigt sich diese Tendenz in weiteren Völkern, handelt es sich bei diesem SNP um einen QTL, der einen signifikanten Einfluss auf das Zuchtmerkmal hat. Anhand dieser SNP-Marker-Information können Honigbienenvölker frühzeitig und effizient auf das entsprechende Merkmal selektiert werden. Dieses Vorgehen wird in der Tierzucht auch als markergestützte Selektion (MAS) bezeichnet.

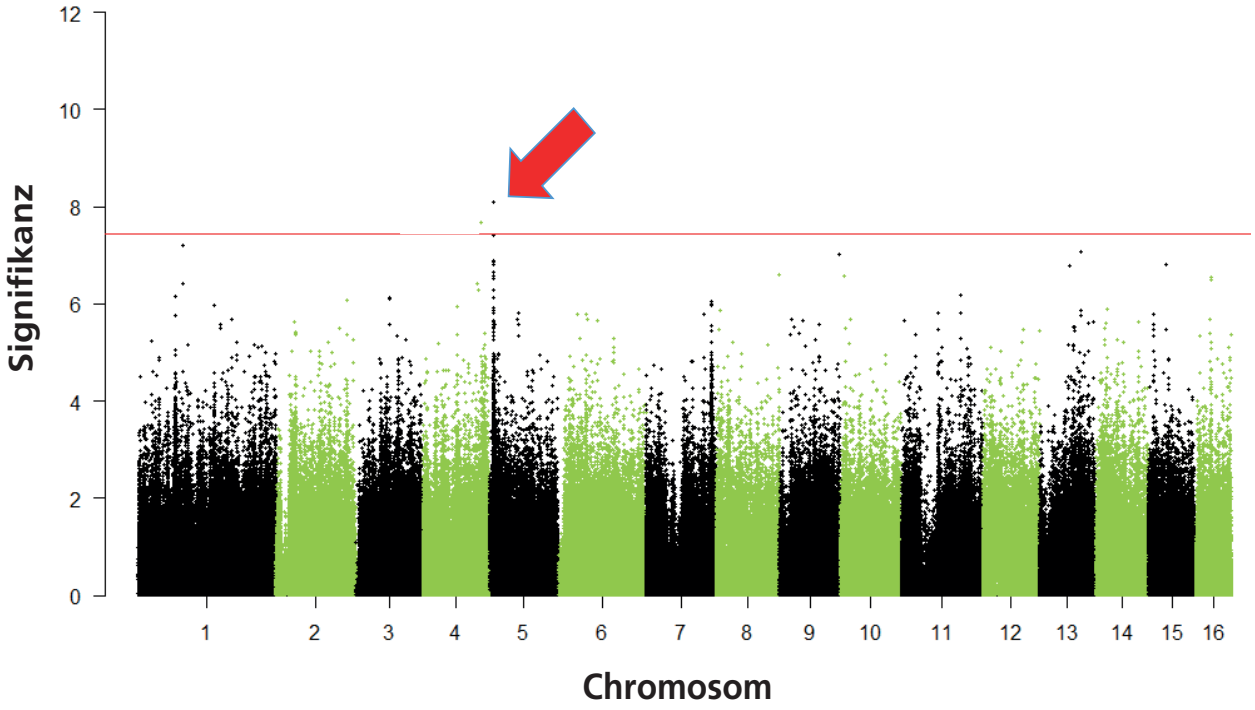

Abbildung 2: Ergebnis der GWAS-Studie für das Merkmal Recapping anhand von 155 Völkern der Dunklen Honigbiene. Jeder Punkt stellt einen SNP dar, dessen Allelfrequenz mit der phänotypischen Variation in der Population verglichen wurde. Die genomweiten SNPs verteilen sich auf 16 Chromosomen (abwechselnd grün und schwarz dargestellt, horizontale Achse); ihre Position in Bezug auf die vertikale Achse zeigt ihren Einfluss auf den Phänotyp. Insgesamt wurden 1,3 Millionen genomweite SNPs in der Studie berücksichtigt. Die rote Linie stellt die Signifikanzschwelle dar, oberhalb derer ein Einfluss der SNP-Allele auf das Merkmal zu mehr als 95 % wahrscheinlich ist. Der SNP mit dem stärksten Einfluss auf das Merkmal befindet sich auf Chromosom 5 und ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet.

Anwendungsbeispiel

Im Jahr 2018 wurden am Zentrum für Bienenforschung (ZBF) in Zusammenarbeit mit der neuen Forschungsgruppe Animal GenoPhenomics die Genome von 155 Völkern der Dunklen Biene (*Apis mellifera mellifera*), die in der Schweiz und Frankreich beprobt wurden, untersucht. In den durchgeführten GWAS-Studien konnten dabei folgende Merkmale berücksichtigt werden: Volksgrösse, Sanftmut, Wabensitz, Hygieneverhalten, Varroabefall und das Wiederverdeckeln von varroabefallenen Brutzellen (Recapping).

Aufgrund des relativ kleinen Datensatzes (155 Völker) konnten mit Ausnahme von Sanftmut, Wabensitz und Recapping keine QTL identifiziert werden. Die Ergebnisse zu den drei zuvor erwähnten Merkmalen wurden in zwei wissenschaftlichen Studien zusammengefasst und sind bereits öffentlich verfügbar.[3, 4]

Nachfolgend werden die genetischen Ergebnisse für das Recapping, welches ein potenzielles Merkmal für die Varroa-Resistenz darstellt, zusammengefasst. Für dieses Merkmal konnten zwei QTL, die sich auf den Chromosomen 4 und 5 der Honigbiene befinden, identifiziert werden (Abbildung 2).

Die zwei erfolgreich identifizierten QTLs befinden sich in Genregionen, die bereits mit anderen Resistenzmerkmalen wie dem Putzverhalten der Honigbiene oder dem Entfernen befallener Brut (VSH) assoziiert wurden. Unsere Studie bestätigt somit die bereits veröffentlichten Ergebnisse anderer Forschungsgruppen und zeigt, dass die aktuellen Resistenzmerkmale der Honigbiene scheinbar eine gemeinsame genetische Komponente besitzen.

Die Darstellung der Allelfrequenz des am besten assoziierten QTLs auf Chromosom 5 zeigt, dass das A-Allel positiv mit dem Recapping korreliert. Beträgt die Frequenz des A-Allels mehr als 50 %, ist das Wiederverdeckeln der befallenen Brut signifikant höher (Abbildung 3). Dies könnte darauf hindeuten, dass Bienenvölker mit einer hohen A-Allelfrequenz besser für das Recapping von befallener Brut geeignet sind.

Welche Auswirkung hat die Genomanalyse auf die Selektion?

Vor allem bei Milchrindern (z. B. den Holsteinern) wird die genomische Selektion routinemässig durchgeführt. Das heisst, die Selektion erfolgt anhand von SNP-Genotypen, die positiv mit einem Zuchtmerkmal korrelieren. Zuchtmodelle in der Rinderzucht haben gezeigt, dass abhängig von der Erblichkeit der einzelnen Merkmale mehrere Tausend bis mehrere Hunderttausend Rinder genotypisiert / sequenziert werden müssen, um einen genauen genomischen Zuchtwert berechnen zu können. Auch können nur wenige Merkmale anhand eines QTL (MAS) effizient verbessert werden. Übertragen auf die Honigbiene bedeutet dies, dass noch wesentlich mehr Honigbienenvölker untersucht werden müssen, um die aktuellen Ergebnisse zu bestätigen und die entsprechenden Zuchtmodelle für die Honigbiene auszuarbeiten.

Unsere ersten Ergebnisse stellen dennoch eine zeitnahe Perspektive dar, da sie eine erste frühzeitige Selektion von Honigbienenvölkern

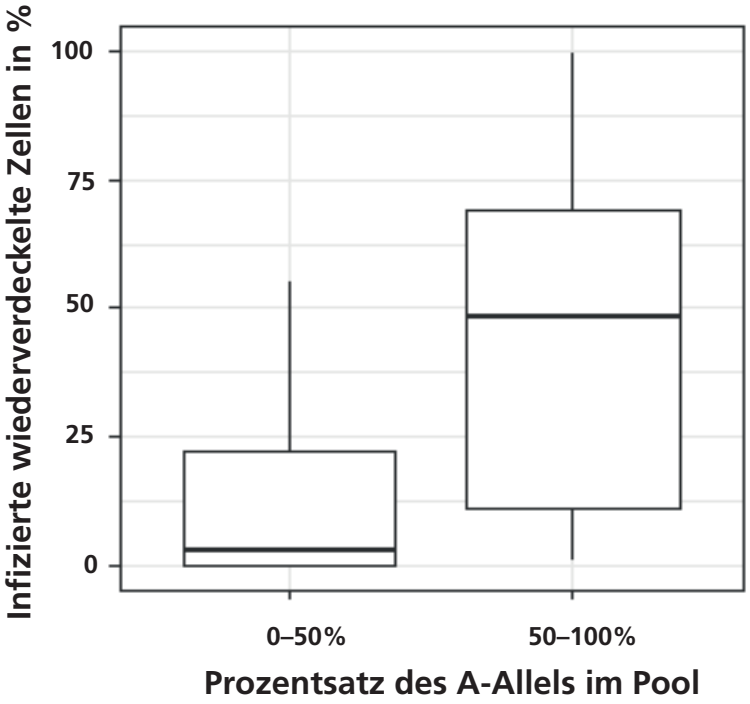

Abbildung 3: Darstellung der Allelfrequenz des am besten assoziierten QTL und des Wiederverdeckelns der befallenen Brut. Die Boxplots präsentieren die Verteilung der Völker für das Wiederverdeckeln der befallenen Brut: dunkle Linie = Mittelwert; untere und obere Enden des Rechtecks: 1. und 3. Quartil; Whisker = Minimum und Maximum, wobei die Werte, die über dem 1,5-Fachen des Interquartilsabstands liegen, ausgeschlossen werden. Der Unterschied in der Verteilung zwischen den beiden Gruppen ist signifikant.

anhand der identifizierten QTLs ermöglichen. In den letzten Jahren wurden auch Methoden entwickelt, mit denen das Genom der Königin, beispielsweise aus dem von ihrem Kokon entnommenen genetischen Material, erfasst werden kann.[5] Diese Methode ermöglicht die Selektion der Königin für ein bestimmtes Merkmal noch vor der phänotypischen Bewertung. Es ist jedoch trotzdem notwendig, zumindest einen Teil der Königinnen zu testen, um die Zuverlässigkeit der untersuchten QTLs zu bestätigen und zu verfeinern.

Die genomische Selektion hat in einigen Nutztierrassen zu einem Verlust der genetischen Vielfalt geführt, da die Steigerung von wirtschaftlich wichtigen Merkmalen (z. B. der Milchmenge) auf Kosten anderer Merkmale (Krankheitsresistenz, Morphologie) erfolgte. Aus diesem Grund scheint es wünschenswert, dass die Einführung der genomischen Selektion bei Honigbienen mit einer Überwachung (Monitoring) der genetischen Diversität einhergeht. Ausserdem sollten Merkmale bevorzugt werden, bei denen die Erfassung des Phänotyps besonders kostenintensiv ist (z. B. Varroa-Resistenz). Um unerwünschte Nebeneffekte der Selektion zu vermeiden, sollten die Auswirkungen der Selektion auf andere Merkmale mittels genetischer Korrelationen überprüft werden. Vorgängig müssen jedoch zuverlässige SNPs identifiziert werden und eine Infrastruktur für das Speichern und die Auswertung der Daten (Genomdaten, Phänotypen) geschaffen werden, was die Zustimmung der Imkerinnen und Imker zu einem solchen Vorgehen voraussetzt.

Schlussfolgerung

Die Genomanalyse von Honigbienenvölkern hat gezeigt, dass Genorte (QTLs), welche ein Zuchtmerkmal signifikant beeinflussen, erfolgreich identifiziert werden können. Anhand dieser Information (markergestützte Selektion) wäre es bereits jetzt möglich, bestimmte Merkmale (z. B. Recapping) zielgerichtet und frühzeitig zu verbessern. Die Einführung der genomischen Selektion erfordert noch weitere Genomanalysen einer Vielzahl von Völkern (Hunderte bis Tausende) und ist zusätzlich abhängig von wissenschaftlichen Fortschritten, wirtschaftlichen Entscheidungen und der Zustimmung der beteiligten Imkerinnen und Imker. Aus diesen Gründen denken wir, dass die Umsetzung eher mittel- bis langfristig erfolgen wird. ⬡

Literatur

1. Wallberg, A.; Han, F.; Wellhagen, G. et al. (2014) A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics* 46: 1081–1088.
2. Parejo, M.; Charrière, J.-D.; Estonba, A. (2021) Genetisches Unterart-Identifizierungs-Tool für europäische Honigbienen. *Schweizerische Bienen-Zeitung* 10: 23–25.
3. Guichard, M.; Dainat, B.; Eynard, S.; Vignal, A.; Servin, B. The Beestrong Consortium; Neuditschko, M. (2021) Identification of quantitative trait loci associated with calmness and gentleness in honey bees using whole-genome sequences. *Animal Genetics* 52: 472– 481 (*https://doi.org/10.1111/age.13070*).
4. Guichard, M.; Dainat, B.; Eynard, S.; Vignal, A.; Servin, B. The Beestrong Consortium; Neuditschko, M. (2022) Two quantitative trait loci are associated with recapping of *Varroa destructor*-infested brood cells in *Apis mellifera mellifera*. *Animal Genetics* 53: 156–160 (*https://doi.org/10.1111/age.13150*).
5. Bubnic, J.; Mole, K.; Prešern, J.; Moškric, A. (2020) Non-Destructive Genotyping of Honeybee Queens to Support Selection and Breeding. *Insects* 11: 896.