

# Entwicklung einer neuen Methode für die Hybridanalyse bei Honigbienen

In einer kürzlich veröffentlichten Studie<sup>1</sup>, bei welcher das Zentrum für Bienenforschung, Agroscope, mitwirkte, wurde ein neuartiger Hybridtest für Honigbienen entwickelt. Dieser Test basiert auf neusten genetischen Markern, welche maximale Unterschiede zwischen der M- und C-Gruppe aufweisen. Dies ermöglicht es, die Hybridisierung zwischen der *Mellifera* und *Carnica* sehr genau zu bestimmen. Der entwickelte Hybridtest wurde in der wissenschaftlichen Studie anhand von 573 Proben aus ganz Europa, inklusive 87 Proben aus der Schweiz, validiert.

MELANIE PAREJO, ZENTRUM FÜR BIENENFORSCHUNG (ZBF), AGROSCOPE, 3003 BERN

Das komplexe Paarungssystem der Honigbiene, bei der sich die Jungfernköniginnen teils weit abseits vom Bienenstock an sogenannten Drohnensammelplätzen mit mehreren Drohnen paaren, erschwert die Erhaltung reiner Honigbienenrassen und die gerichtete Zucht. Werden unterschiedliche Bienenunterarten in der gleichen Gegend gehalten, ist der Hybridisierung kaum entgegenzuwirken. Deshalb ist die stetige Kontrolle der Abstammung der Bienen in einem Zuchtprogramm oder einem Schutzgebiet unumgänglich.

Klassischerweise werden Hybride mittels morphologischer Merkmale identifiziert. Am häufigsten werden dabei die rassetypischen Flügeläderungen gemessen, welche sehr erbtreu sind. Mittlerweile werden auch DNA-Analysen basierend auf Mikrosatelliten durchgeführt. Mikrosatelliten sind kurze DNA-Sequenzen, die im Genom eines Organismus oft wiederholt und traditionell in der Populationsgenetik angewendet werden. Durch die kontinuierlichen Fortschritte in der Sequenzierungs- und Genotypisierungstechnologie werden neuerdings auch DNA-Tests basierend auf SNPs entwickelt. SNPs (englisch für «single nucleotide polymorphisms») kennzeichnen punktuelle Variationen im genetischen Code der Lebewesen. SNPs als genetische Marker zu benutzen, hat zahlreiche Vorteile. Einerseits sind SNPs im Genom weit verbreitet und häufig aufzufinden und weisen einen niedrigen Genotypisierungsfehler auf. Andererseits können die

qualitativ hochwertigen SNP-Daten einfach zwischen Labors transferiert werden. Bei anderen Nutztierarten sind SNP-Genotypisierungen mittels sogenannten SNP-Chips bereits erfolgreich im Zuchtprogramm implementiert.

## Entwicklung des SNP-Tests

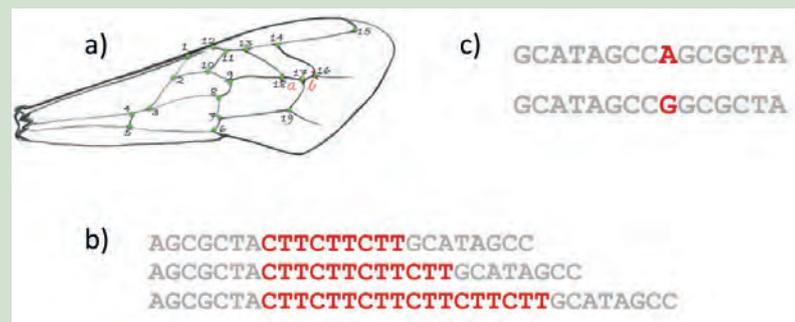
Ein SNP-Test zur genauen Unterscheidung der M- und C-Gruppe wurde kürzlich von der Forschungsgruppe

um Prof. A. Pinto in Portugal entwickelt und validiert.<sup>1,2</sup> Für diese Studie hat das Zentrum für Bienenforschung 87 Proben zur Verfügung gestellt und zur Auswertung der Daten beigetragen. Gestartet wurde mit einem Datensatz von 1536 SNPs und 113 Bienen (*Carnica*, *Ligustica*, *Mellifera*), welche zuvor mittels Morphometrie oder Mikrosatellitenanalyse klassifiziert wurden. Die SNPs wurden anhand verschiedener Teststatistiken

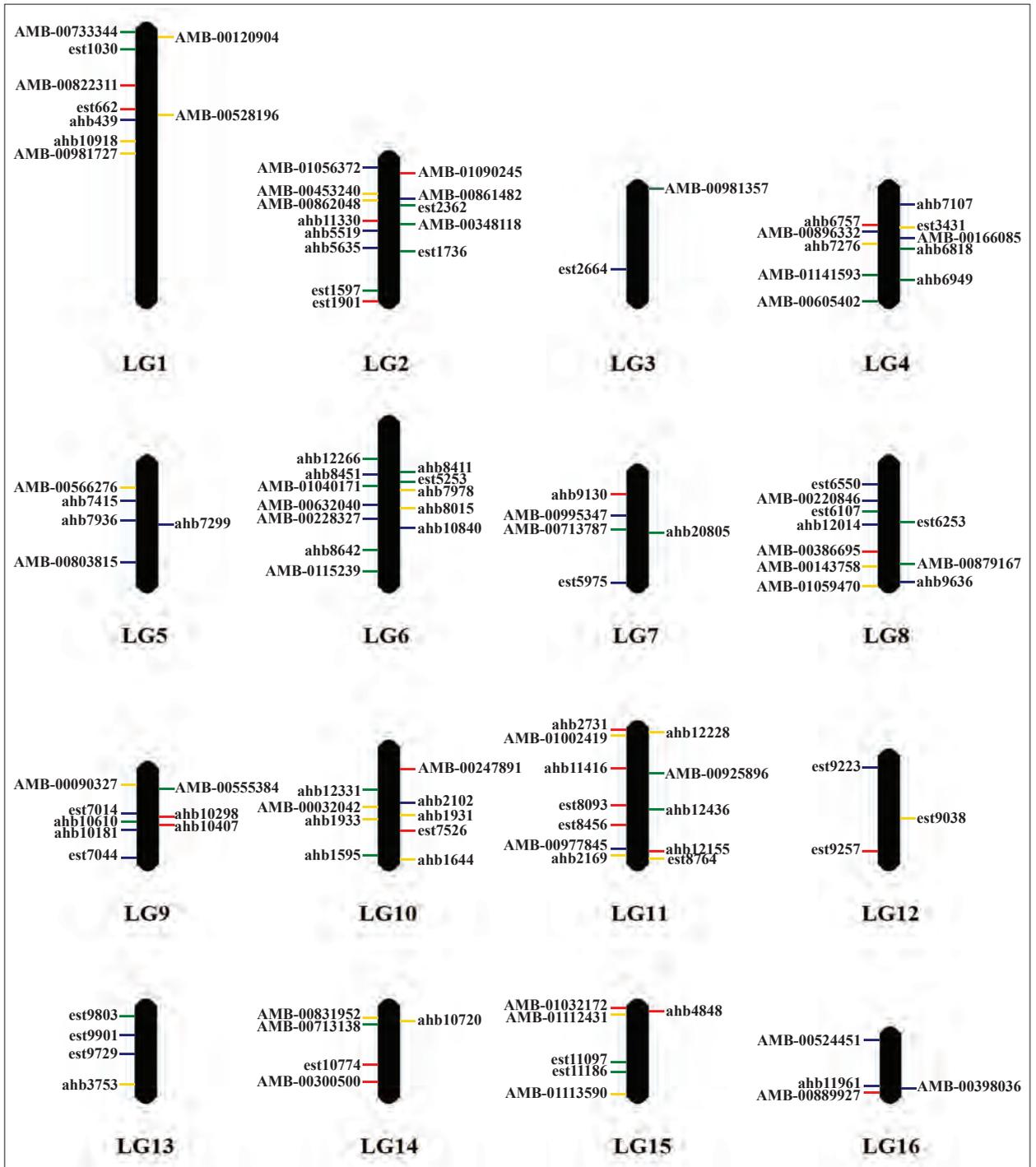
## Unterschiedliche Ansätze zur Rassenbestimmung

Die erste systematische Klassifizierung der Honigbienenunterarten geht auf die Beschreibung und Messung morphologischer Merkmale zurück, welche die sichtbaren Unterschiede aufzeigt. Insbesondere die erbtreuen Merkmale der Flügeläderung wurden verwendet. Jedoch geht aus den Daten über afrikanisierte Honigbienen<sup>3</sup> hervor, dass die Flügelmorphometrie nur begrenzt in der Lage ist, niedrige Hybridisierungsgrade nachzuweisen. Diese Beschränkung wird durch genetische Marker wie die Mikrosatelliten überwunden. Tatsächlich trugen die Mikrosatelliten einen wichtigen Schritt zur Analyse der Populationsgenetik der Honigbienen bei. Später stellte deren Einführung im Zuchtmanagement einen weiteren Fortschritt dar. Mittlerweile wurden neue genetische Tests basierend auf SNPs entwickelt und es konnte gezeigt werden, dass eine kleine Anzahl höchst informativer SNPs die Mikrosatelliten bei der Genauigkeit der Hybridisierungsschätzung übertrifft.<sup>4</sup>

Für alle Methoden gibt es Vor- und Nachteile. Neben Berücksichtigung der Kosten und des Aufwandes hängt die Wahl eines geeigneten genetischen Tests vor allem von der Anwendung und Fragestellung ab. Ausserdem lassen sich morphologische Messungen bestens mit den Analysen genetischer Marker ergänzen.



Flügelmorphologie (a) sowie Mikrosatelliten (b) und SNPs (c) können für die Rassenbestimmung verwendet werden.



Die Positionen der 117 SNPs des neuen Hybridtests auf den 16 Chromosomen der Honigbiene.

GRAFIKEN: HENRIQUES ET AL. 2018

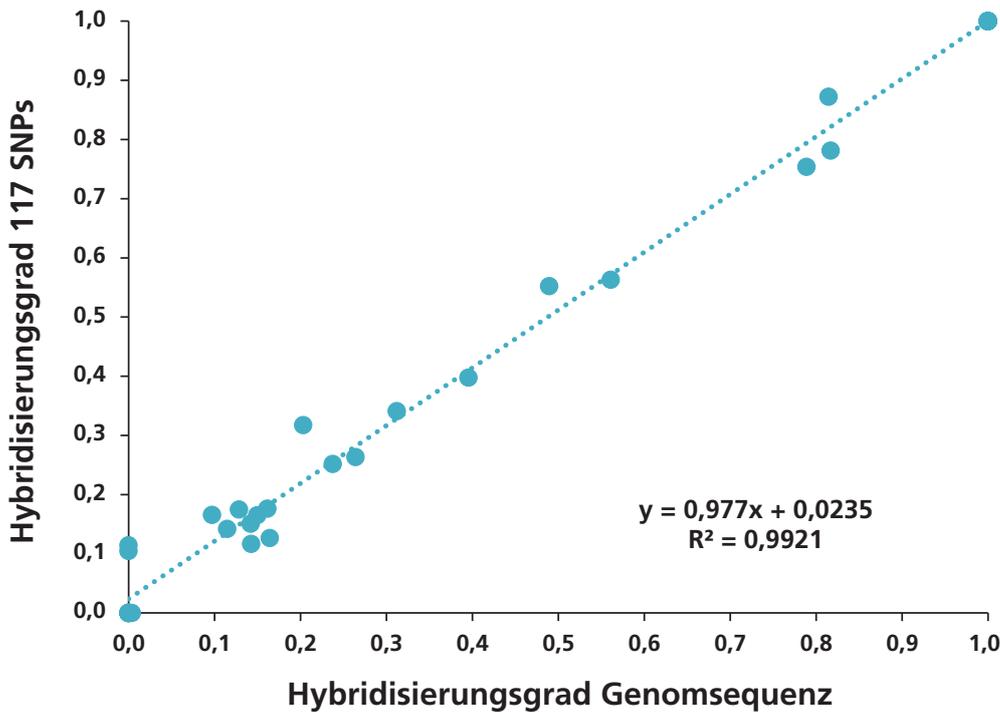
(Weir & Cockerham's  $F_{ST}$ ,  $F_{ST}$ -outlier test, Delta, informativeness [In], PCA) nach ihrem Informationsgehalt für die Unterscheidung zwischen der M- und C-Gruppe rangiert. Anschließend wurden die 144 informativsten SNPs ausgewählt, welche ermöglichen, M- und C-Bienen am besten zu unterscheiden. Die flankierenden Genomregionen dieser 144 SNPs wurden dann verwendet, um Testsonden zu entwerfen und die SNPs auf der MassARRAY® MALDI-TOF-Plattform von Agena Biosciences zu

genotypisieren. Von den ursprünglich 144 informativen SNPs konnten Testsonden bei 127 SNPs erfolgreich entworfen werden. Weitere 10 SNPs fielen durch die Qualitätskontrolle, da sie inkonsistente Basen oder eine schlechte Genotypisierungsrate zeigten. Schliesslich blieben 117 qualitätsgeprüfte und höchst informative genetische Marker. Die SNPs sind gleichmässig auf allen Chromosomen der Honigbiene lokalisiert (Abbildung oben) und decken somit das ganze Genom ab.

### Validierung des SNP-Tests

Um den entworfenen SNP-Hybridtest zu validieren, wurden 573 Proben aus ganz Europa genotypisiert und getestet. Der verwendete Datensatz für diese Berechnungen bestand aus Drohnen, Arbeiterinnen und Drohnenmischproben mit unterschiedlichen Abstammungen (Mellifera, Carnica, Ligustica, Buckfast sowie deren Hybride).

In einer ersten Analyse wurden die Resultate des neuen Tests bestehend aus 117 SNPs mit den Ergebnissen



Honigbienenrassen auf kleinstem Raum koexistieren und Königinnen und Drohnen für den Begattungsflug teils lange Strecken auf sich nehmen, sogar über Pässe.

### Literatur

- Henriques, D.; Browne, K.; Kryger, P.; Muñoz, I.; Parejo, M.; Barnett, M.; McCormack, G.; Garnery, L.; Pinto, M. A. (2018) High sample throughput genotyping for estimating C-lineage introgression in the dark honeybee: an accurate and cost-effective SNP-based tool. *Scientific Reports* 8: 8552.
- Muñoz, I.; Henriques, D.; Johnston, J. S.; Chávez-Galarza, J.; Kryger, P.; Pinto, M. A. (2015) Reduced SNP panels for genetic identification and introgression analysis in the dark honey bee (*Apis mellifera mellifera*). *PLoS ONE* (doi.org/10.1371/journal.pone.0124365).
- Guzmán-Novoa, E.; Page, R. E.; Fondrk, M. K. (1994) Morphometric techniques do not detect intermediate and low levels of Africanization in honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) colonies. *Annals of the Entomological Society of America* 87(5): 507–515 (doi.org/10.1093/aesa/87.5.507).
- Muñoz, I.; Henriques, D.; Jara, L.; Johnston, J. S.; Chávez-Galarza, J.; De La Rúa, P.; Pinto, M. A. (2016) SNPs selected by information content outperform randomly selected microsatellite loci for delineating genetic identification and introgression in the endangered dark European honeybee (*Apis mellifera mellifera*). *Molecular Ecology Resources* (doi.org/10.1111/1755-0998.12637).

aus der Vollsequenzierung (2,399 Millionen SNPs) verglichen. Wie in der Abbildung oben ersichtlich, ist die Information der 117 SNPs sehr stark mit dem ganzen Genom korreliert, welches die genaueste Information zur Abstammung liefert. Zudem ist die durchschnittliche Abweichung zum Hybridisierungsgrad, welcher anhand des ganzen Genoms berechnet wurde, mit 2% sehr klein. Die berechnete Hybridisierung mit 117 SNPs liegt somit sehr nahe an der tatsächlichen Hybridisierung. Allerdings war die maximale Abweichung mit 11,4% relativ hoch.

In einer zweiten Analyse wurden 16 *Mellifera*-Königinnen mit *Carnica*-Drohnen gekreuzt und anschließend deren Nachkommen mit den 117 SNPs getestet. Der erwartete Hybridisierungsgrad bei einer Kreuzung mit reinen Eltern liegt bei ~0,5. In der Tat bewegte sich der Hybridisierungsgrad der 16 getesteten Arbeiterinnen sehr nahe an diesem Wert ( $0,56 \pm 0,03$ ).

Des Weiteren wurde die Sensitivität untersucht, um auch geringere Hybridisierungsgrade zu erkennen. Für diese Analyse wurden DNA-Proben zweier haploider Drohnen (eine *Ligustica* und eine *Mellifera*) mit unterschiedlichen Verhältnissen vermischt: 10:20, 5:20, 2:20, 1:20 und 0,5:20. Bis zum Verhältnis 2:20

konnten die *Ligustica*-Allele sicher in allen Wiederholungen erkannt werden. Bei den noch kleineren Verdünnungen konnten immer noch 29 der 177 SNPs beide Allele nachweisen, jedoch wird die Bestimmung des Hybridisierungsgrads immer ungenauer.

### Schlussfolgerungen

In der modernen Bienenzucht ist es heutzutage notwendig, sich auf molekulare Werkzeuge zu verlassen, welche in der Lage sind, unterschiedliche Hybridisierungsgrade genau und kosteneffektiv zu ermitteln. Insgesamt schneidet der neue SNP-Test in allen Untersuchungen sehr gut ab. Jedoch sind Abweichungen im Einzelfall trotz neuester Technologien und Auswertungsmethoden möglich. Da die natürliche Variation sehr gross ist, kann es vorkommen, dass nicht alle Varianten berücksichtigt wurden. Es ist deshalb wichtig, bei der Interpretation der Resultate im Grenzfall auch andere Eigenschaften des Volkes zu überprüfen. Zudem wäre es schade, fälschlicherweise reinrassige, aber diverse Bienen zu ersetzen, da Bienen für eine hohe Fitness genügend genetische Diversität benötigen.

Die Anwendung eines genauen Hybridisierungstests ist gerade in der kleinen Schweiz wichtig für die Rassenzucht, da unterschiedliche

Die Hybridisierungswerte, berechnet anhand des neuen SNP-Tests, korrelieren sehr stark mit den Werten, welche durch die ganze Genomsequenz ermittelt wurden.

### SNP-Hybridtest in der Schweiz

Der neue SNP-Hybridtest ist demnächst auch in der Schweiz erhältlich.

Weitere Infos unter: [www.mp-genetics.com](http://www.mp-genetics.com)

Kontakt: Dr. Melanie Parejo

E-Mail: [info@mp-genetics.com](mailto:info@mp-genetics.com)

Tel.: +41 33 533 33 53

