



Abbildung 1: Abschlusstreffen der Beteiligten von Projekt SETBie in Baden-Württemberg im Frühjahr 2023 an der Landesanstalt für Bienenkunde (Universität Hohenheim). (Foto: Martin Hasselmann)

Birgit Gessler

SETBie in Baden-Württemberg: Interessante Ergebnisse bei Projektende



Das Projekt Selektion und Etablierung Varroa toleranter Bienenvölker (SETBie) in Baden-Württemberg ist nach vier Projektjahren (Januar 2019 bis Dezember 2022) mit Förderung durch die Europäische Union und dem Land Baden-Württemberg ausgelaufen. Vier Jahre geprägt von spannender Arbeit mit den Bienen liegen hinter den 23 züchterisch aktiven Imkern aus ganz Baden-Württemberg und den verschiedenen beteiligten Institutionen (Abb.1). Zu Letzterem zählten die Imkerverbände Buckfast Süd, Württemberg und Baden sowie die Universität Hohenheim mit dem Fachgebiet Populationsgenomik bei Nutztieren am Institut für Nutztierwissenschaften sowie der Landesanstalt für Bienenkunde, der Universität Tübingen mit dem Zentrum für Quantitative Biologie (QBIC) und der Arista-Stiftung aus Wageningen (Niederlande).

Gemeinsam haben sich die Beteiligten 2019 auf den Weg gemacht, Bienenvölker zu identifizieren, die Merkmale zeigen, um mit dem Parasit der Varroamilbe (*Varro destructor*) besser umzugehen. Die Milbe vermehrt sich in der Brut in einem Bienenvolk

und kann Krankheiten durch die Verbreitung von Viren übertragen. Eine sehr hohe Anzahl an Milben in einem Bienenvolk verursacht enorme Schäden und periodisch auftretende hohe Völkerverluste. Der Imker versucht die Anzahl an Milben durch regelmäßige chemische Bekämpfungen oder aufwendige biotechnische Verfahren zu reduzieren. Um diesen wiederkehrenden Kreislauf nachhaltig zu durchbrechen, sollte eine züchterische Lösung durch die Selektion von Bienenvölkern in dem SETBie Projekt etabliert werden, die durch eigene Mechanismen den Vermehrungserfolg der Milbe unterhalb der Schadensschwelle halten. Von den angewandten Methoden und Ergebnissen in diesem Projekt befasst sich der vorliegende Bericht.

Unter dem Oberbegriff „Unterdrückung der Milbenreproduktion“ (auf Englisch Suppressed mite reproduction = SMR) gehören Merkmale, die durch die Bienenbrut hervorgerufen werden und eine erfolgreiche Milbenvermehrung unterbinden. Bei den Bienenvölkern sind bei Vorliegen von SMR in Milben infizierten Brutzellen keine oder zu junge Nachkommen der Milben zu fin-

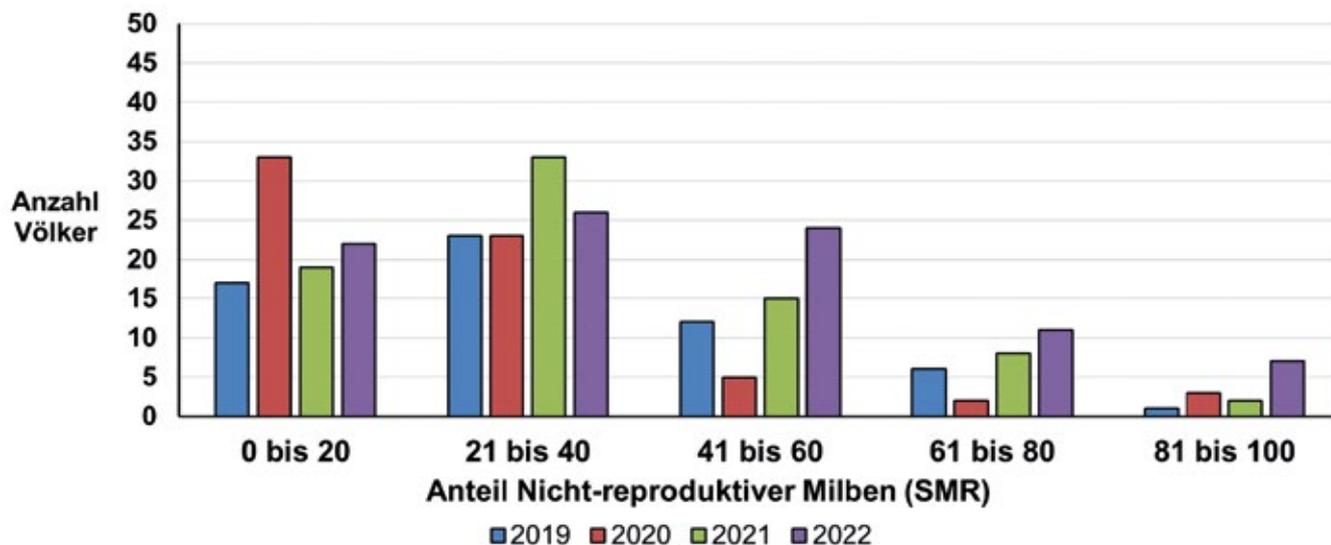


Abbildung 2: SMR-Werte für die ausgewerteten SETBie Völker zwischen 2019 bis 2022 mittels der RNSBB Methode. (Methode: Büchler et al. 2017; <https://www.beebreeding.net/index.php/2017/09/01/new-smr-protocol/>)

den. Diese sehr jungen Milben sind dann bei Schlupf der Bienen nicht in der Lage, in eine andere Brutzelle zu wandern und sich dort zu vermehren. Ein zweiter Begriff ist die Varroa Sensitive Hygiene (VSH). Bei Vorliegen von VSH im Bienenvolk räumen die Arbeiterinnen die Milben infizierten Brutzellen gezielt aus, indem sie die Puppen entfernen. Die Voraussetzung für dieses Merkmal ist das „Erkennen“ der Milbe in der Brut. Bei einer konsequenten Ausräumung der Varroa befallenen Brut wird die exponentielle Vermehrung im Bienenvolk gebremst. Das Merkmal VSH führt ebenfalls zu einer (natürlichen) Reduzierung der Anzahl an Milben im Bienenvolk.

Künstliche Besamung und Milbeninfektion

Um die Merkmale SMR und VSH untersuchen zu können wurden von den teilnehmenden Imkern aus Baden-Württemberg eigene Bienenvölker untersucht. Im Frühjahr jeden Jahres erfolgte eine Königinnenzucht von den Völkern der Projektteilnehmer sowie die Nachzucht von Drohnen guter Herkünfte, um diese für die anschließende künstliche Besamung der Königinnen zu verwenden. 1411 Königinnen wurden in der gesamten Projektlaufzeit (2019-2022) künstlich besamt.

Eine Königin gibt durch die Brut das eigene genetische Material sowie die des Drohns an die Nachkommen weiter. Um die Eigenschaften untersuchen zu können, wurde der Schlupf der neuen Arbeiterinnen abgewartet, so dass zwei Monate nach der künstlichen Besamung die Untersuchung des Bienenvolks in den kleinen Mini-Plus Beuten auf das Merkmal SMR erfolgen konnte. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die bewusste Milbeninfektion mit 180 Milben je Volk. Ziel war es herauszufinden, ob die Milben sich in dem Volk vermehren konnten oder nicht. Etwa 9 Tage später, wenn die Milben in die Brutzellen eingewandert waren und die Möglichkeit hatten sich zu vermehren, wurden die Brutzellen geöffnet. Die Dokumentation erfolgte nach der Fragestellung, ob eine Milbe in die Brutzelle eingewandert war und wenn ja, ob sie Nachkommen hatte und welche Entwicklungsstadien die Nachkommen hatten. Mit dieser Methode wird der SMR-Wert für das

Volk analysiert. Da pro Volk bis zu 450 Zellen ausgewertet oder bis zu 30 einfach infizierte Zellen notiert wurden, bekamen die SETBie Imker bei der dreitägigen Auswertung auf dem Hofgut Tachenhausen in Oberboihingen Ende Juli jeden Jahres tatkräftige Unterstützung von interessierten Imkern sowie von zahlreichen Mitarbeitern und Studenten, die an den beteiligten Instituten der Universität Hohenheim arbeiteten. Weiterhin gab es Unterstützung von der Arista Stiftung durch Guillaume Misslin, der sich ebenfalls um das technische Equipment kümmerte und Interessierte in die Arbeitsweise einwies. Diese arbeitsintensiven Tage wurden mit viel guter Laune und gemeinsamen Grillen bestritten und so insgesamt 798 Völker in den vier Jahren für den Parameter SMR ausgewertet.

SMR Ergebnisse

Bei der Auswertung des SMR-Wertes wird das Verhältnis der reproduktiven Milben (Milben mit Nachkommen) zu den nicht-reproduktiven Milben (Milben ohne Nachkommen) berechnet. Bei der SMR Auswertung ist zu beachten, dass erst eine Anzahl von 10 gefundenen Milben eine statistisch aussagekräftige Bewertung zulässt, deshalb konnten nur in 299 Völkern ein klarer SMR-Wert bestimmt werden, die verbliebenen 499 Völker zeigten nur Tendenzen bezüglich des SMR-Wertes auf (Daten sind hier nicht gezeigt). Das bedeutet jedoch nicht, dass diese Völker nicht gut in ihrem VSH-Verhalten bewertet werden können, da es sich bei SMR und VSH um zwei unterschiedliche Mechanismen handelt. Von den 299 Völkern konnten 115 Völker identifiziert werden die einen höheren SMR-Wert als 40% zeigten (Abb. 2). Ein höherer SMR-Wert bedeutet, dass bei diesen mit Milben befallenen Zellen, mehr Zellen mit nicht reproduktiven Milben gefunden wurden. 40% SMR wurde auch in natürlich überlebenden Völkern gemessen (Locke et al. 2012) und kann somit als Referenz bzw. Schwellenwert angenommen werden.

Direktinfektion der Brutzellen zum Nachweis von VSH

In einem weiteren Schritt wurden von den 798 ausgewerteten Völkern auf SMR jedes Jahr 37 bis 47 Völker ausgewählt (ins-

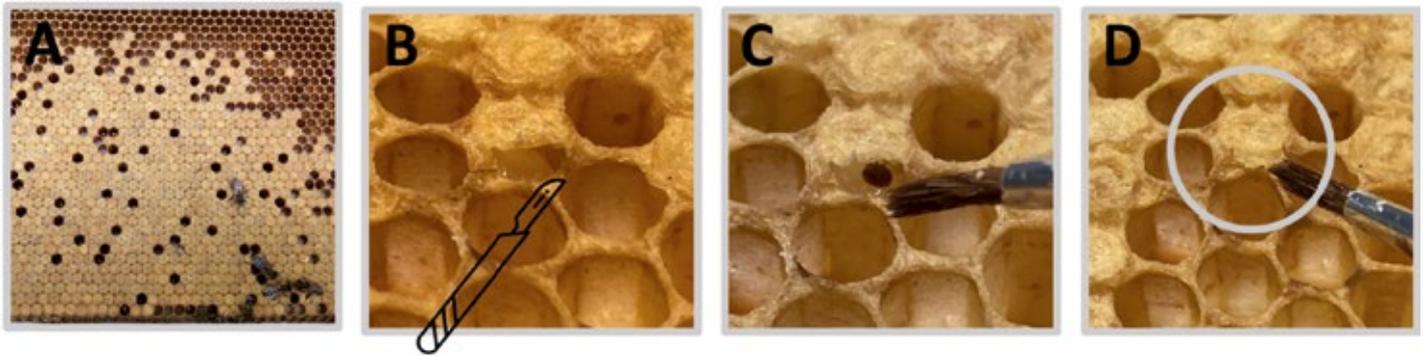


Abbildung 3: Die Methode der Milben-Direktinfektion in Bildern. A: Wabe mit verdeckelten Brutzellen; B: Eine frisch verdeckelte Brutzelle wird mit dem Skalpell an einer Seite geöffnet; C: Eine Varroamilbe wird gezielt in die Zelle geführt; D: die Zelle wird wieder geschlossen. (Bilder: Lina Sprau)

gesamt 124 Völker), die per Direktinfektion an der Universität Hohenheim auf ihre VSH-Ausprägung geprüft wurden. Zum Nachweis von VSH dient die Methode der Direktinfektion bei der in 30 frisch verdeckelte Zellen eine Varroamilbe gezielt eingesetzt wird (Abb. 3). 30 Kontrollzellen wurden ebenfalls geöffnet und geschlossen, ohne in diese Zelle eine Milbe einzusetzen. Acht Tage nach der Direktinfektion wurden die markierten Zellen überprüft, ob sich die Bienenpuppe noch in der Zelle befindet und wenn ja, ob sich die Varroamilbe vermehrt hat. Hat ein Volk ein ausgeprägtes VSH-Verhalten wird in diesem Volk die Bienenpuppe, die mit einer Milbe infiziert wurde, ausgeräumt. Da in den Kontrollzellen keine Milben sind, sollten diese Zellen vom Bienenvolk unberührt bleiben.

VSH Ergebnisse

Von den 124 untersuchten Bienenvölkern für VSH konnten zwischen den Jahren 2020 und 2022 71 Völker mit einem guten VSH-Wert von über 50% identifiziert werden (vgl. Abb. 4). Bei diesen Völkern wurden über 50% der Bienenpuppen aus den infizierten Brutzellen entfernt. Hingegen räumen Völker in der Kategorie 0-25% nur wenige mit Milben infizierte Zellen aus. Diese Völker wurden als Kontrollvölker bewusst geprüft, da sie im Vergleich für die weiterführenden genetischen Analysen sehr wichtig sind, um eine Aussage über das Merkmal VSH machen zu können.

Hingegen sollte die Auswertung der mitgeführten Kontrollzellen bei der Direktinfektion zum Nachweis von VSH nach Möglichkeit in die geringste Kategorie (0-25%) fallen. In diesem Fall ist die Brut aus den manipulierten Zellen nicht entfernt worden, da sich in diesen Brutzellen keine Milbe befand. Es hat sich über die Jahre ein stetiger Abstieg der Völker mit einer Ausräumrate von Kontrollzellen über 50% gezeigt, welcher sehr positiv zu werten ist (Abb. 5). Völker, die viele manipulierte Zellen ausräumen, in denen keine Milbe war, sind sehr sensibel für Störungen. In diesem Fall reagiert das Volk auf die Manipulation der Zelle und nicht darauf, dass eine Milbe in der Zelle ist. Von der Weiterzucht solcher Völker wird abgeraten. Gleichzeitig wird bei der Durch-

führung der Direktinfektion zum Nachweis von VSH die Wichtigkeit des Mitführens von Kontrollzellen hervorgehoben.

In einer weiteren Untersuchung wurden mehrere Nachkommen von der gleichen Anpaarung mittels der Direktinfektion für VSH untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei stellte sich heraus, dass bei den Nachzuchten der VSH-Wert zwischen den Völkern stark schwankte und die Bandbreite von einem gut ausgeprägtem VSH-Merkmal bis zu einem sehr geringen VSH-Merkmal reichte. Züchterisch ist es deswegen wichtig auf die kontinuierliche Überprüfung der Völker zu achten, um gute Völker zu identifizieren. Nur durch die Überprüfung der Völker mittels der Direktinfektion kann VSH nachgewiesen werden. Ein wesentlicher Grund für die starke Schwankung der VSH-Werte in den Nachzuchten ist die sehr hohe Rekombinationsrate der Honigbiene. Dieser biologische Begriff bedeutet, dass das genetische Material (die DNA) in jeder Generation immer wieder neu durchmischt wird. Die dadurch entstehende, neue genetische Variabilität ist durchaus vorteilhaft für die Honigbienen, jedoch erschwert sie auch die Etablierung einer stabilen Zuchtgenetik auf selektierte Merkmale.

Umfangreiche genetische Analysen

Innovativ in diesem Projekt war die Durchführung von genetischen Analysen, um Marker zu identifizieren, die mit VSH assoziiert sind sowie die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen im Zusammenhang mit VSH besser zu verstehen. Dazu wurden Bienenproben (Arbeiterinnen) aus Völkern mit einem stark ausgeprägtem VSH-Merkmal mit den Proben aus Völkern verglichen, welches dieses Merkmal nicht zeigten (Unterscheidung von VSH-hoch versus VSH-niedrig). Die Analyse jeder Probe erfolgte mittels drei unterschiedlicher Sequenzierungen: der genomischen DNA, um Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) zu detektieren, der gesamten mRNA, um die Genexpression zu messen sowie mittels der Bisulfit Sequenzierung, um mögliche Methylierungen der DNA zu detektieren. Weiterhin wurden die Analysen für die verschiedenen Unterarten

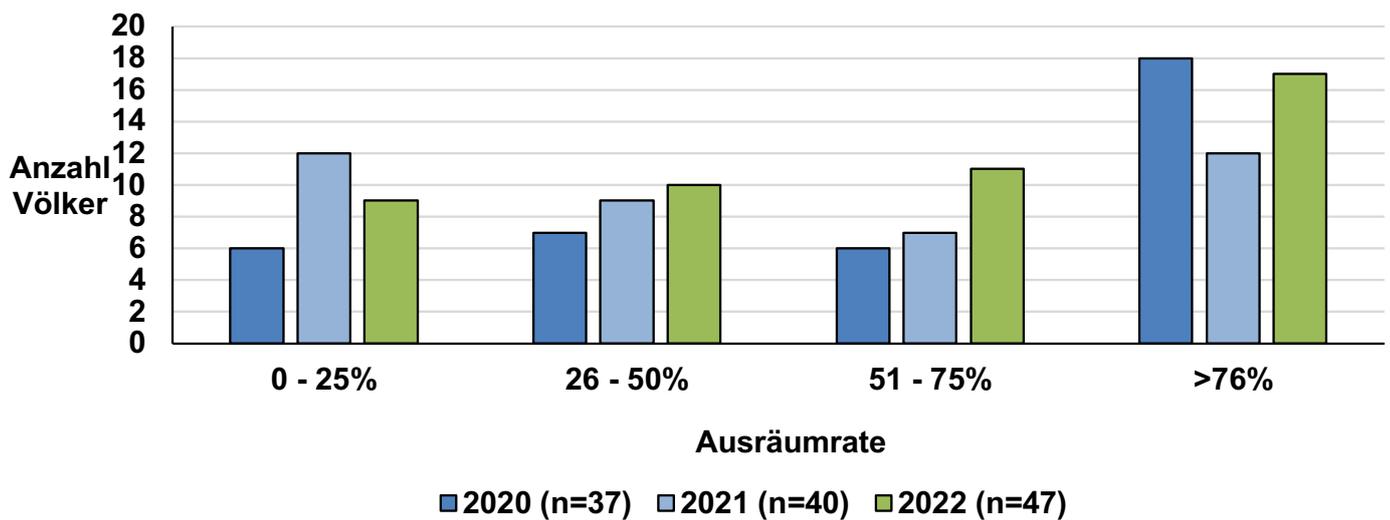


Abbildung 4: Darstellung der Ausräumraten der per Direktinfektion mit Milben infizierten Zellen der Völker aufgetrennt pro Jahr (VSH-Auswertung).

Apis mellifera (A.m.) carnica, *A.m. mellifera* und Buckfast durchgeführt. Die umfangreiche Datenanalyse zeigte bei der Qualitätskontrolle sehr gute Ergebnisse.

Bei der Auswertung der Ergebnisse von der genomischen DNA wurde eine große Varianz an Genen bei den verschiedenen Unterarten gefunden. Diese Varianz mag Indikator für einen gemeinsamen Phänotyp (dem Merkmal VSH), aber unterschiedlich entwickelten Genotypen sein. Das bedeutet, dass sich die Merkmalsausprägung bei den Unterarten genetisch unterscheidet. Nach dieser Analyse mag das Merkmal VSH sich genetisch nicht nur durch die Gene beschreiben lassen, die zwischen den Unterarten übereinstimmen. Vielmehr mögen komplexe Zusammenhänge hier die Grundlage für das komplexe Merkmal sein.

Die Analyse der Genexpressionsstudie ergab dagegen kaum signifikante Unterschiede zwischen der Kategorie VSH hoch und niedrig sowie den verschiedenen Unterarten. Zusammen mit den Ergebnissen der Bisulfit Sequenzierung (lagen beim Verfassen des Berichts noch nicht vor) wird weiter nach den genetischen Grundlagen für das Merkmal VSH geforscht.

Prüfung in der Praxis

Die Überprüfung der Bienenvölker für das Merkmal für SMR und VSH führte zu einer erfolgreichen Identifikation von Bienenvölkern, die diese Merkmale zeigen. Um die Bienenvölker auf ihre Praxis Tauglichkeit zu testen, wurden nachgezogene Königinnen von vielversprechenden Völkern (2020/21 und 2022/23) in Wirtschaftsvölker eingeweiselt. Ziel war es die Königinnen und das Bienenvolk für weitere züchterische Ziele wie z.B. Sanftmut, Honigertrag oder Milbenbefall unter praktischen Bedingungen beurteilen zu können. Aufgrund der Wetterlage konnte über den Honigertrag sowohl bei den Prüfvölkern als auch bei den Kontrollen 2021 keine Aussage gemacht werden (es gab keinen Honig). Insgesamt war die Beurteilung im ersten Versuchsdurchlauf vergleichbar zu den Kontrollvölkern. Bei dem zweiten

Versuchszeitraum 2022/23 waren die Bienenvölker ebenfalls vergleichbar zu den mitgeführten Kontrollvölkern. Es gab auch hier Schwankungen innerhalb einer Geschwistergruppe, die auch bei den Ergebnissen der SMR und VSH Auswertungen zu erkennen waren.

Zusammenfassung der Ergebnisse

In dem Projekt SETBie in Baden-Württemberg konnten Bienenvölker, die das Merkmal VSH zeigen, identifiziert werden, darunter besonders einige Buckfast-Linien, die als erfolgreich klassifiziert wurden. Bei den Unterarten der westlichen Honigbiene *Apis mellifera mellifera* und *Apis mellifera carnica* konnte teilweise eine Verbesserung einzelner Zuchtlinien hinsichtlich der Parameter SMR und VSH erreicht werden. Durch die Etablierung verschiedener Völker wurde das Ziel, eine genetische Breite in der Zucht zu erhalten, bestmöglich erreicht. Für eine präzise Überprüfung dieser Genetik waren jedoch am Projektende keine weiteren Mittel mehr verfügbar.

Weiterhin wurde Neueinsteigern in diesem Projekt die Methodik der Selektion bei Bienenvölkern vermittelt. Dazu gehören die termingerechte Zucht von Königinnen und der Ablauf bei einer Besamung, die Völkerführung in Mini-Plus Beuten sowie die gezielte Infektion der Bienenvölker mit Varroamilben zur Analyse von SMR und VSH. Die Durchführung, Auswertung und Beurteilung der Völker für SMR und VSH wurden durch Anleitungen, Schulungen und Vorträgen Imkern und Interessierten vermittelt. Die genetischen Analysen konnten zum Teil während der Projektlaufzeit abgeschlossen werden. Auch wenn die echten, robusten genetischen Marker, die mit VSH assoziiert sind, nicht eindeutig verifiziert werden konnten, wurden in diesem Projekt die Grundlagen dazu gelegt.

Ein Fazit

Vier Jahre mit sehr aufwendigen, praktischen und analytischen Arbeiten liegen hinter den Projektbeteiligten. Der Erfolg von guten Zuchtlinien wurde unter anderem von der langjährigen

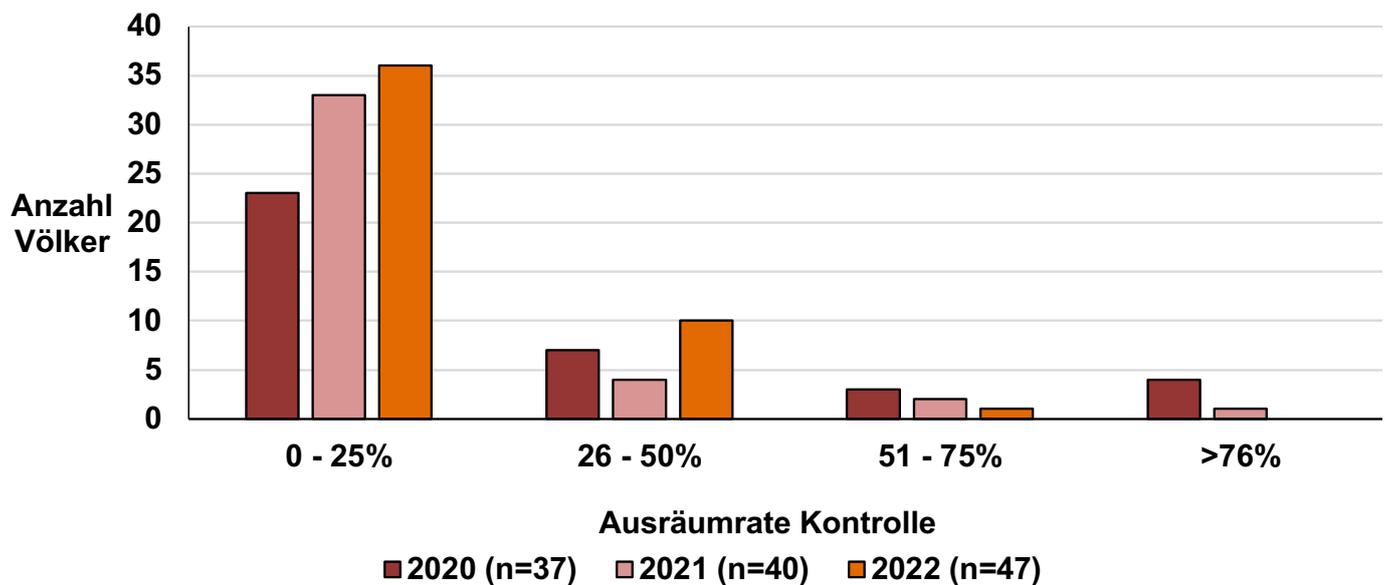


Abbildung 5: Darstellung der Ausräumraten der per Direktinfektion erstellten Kontrollzellen der Völker aufgetrennt pro Jahr (VSH-Auswertung).

Zuchtarbeit einzelner Imker und geprüften Zuchtlinien positiv beeinflusst. Dadurch zeigt sich, dass eine ausdauernde Zucht zur Selektion von geeigneten Bienenvölkern wichtig ist. Es gilt jedoch zu beachten, dass umfassende Praxistests das entscheidende Kriterium sind, um den Selektionserfolg zu messen. Dabei ist auch zu berücksichtigen, dass die künstliche Besamung mit Einzeldrohnen schrittweise zu einer genetischen Verarmung führt bzw. führen kann, deren Konsequenzen in der Praxis aktuell nicht konkret abzuschätzen sind. Die hohe Varianz der Merkmale bei den Nachzuchten zeigt die zugrundeliegende Komplexität, die durch die genetischen Grundlagen (Stichworte Rekombinationsrate und Paarungsbiologie) der Honigbiene gegeben sind. Mögliche Unterschiede in Bezug auf Umweltparameter (Verteilung von Pathogenlast, Nahrungsangebot) in Kombination mit Unterart-spezifischen Eigenheiten können zusätzlich eine Rolle spielen, die wir in Zukunft angehen müssen.

Obwohl wir in jeder Generation Völker mit hohen VSH- und SMR-Werten finden konnten, schienen diese Merkmale eine geringe Erbllichkeit aufzuweisen, da die Varianz zwischen den nachgezüchteten Töchtern extrem hoch war. Die erfolgreiche Selektion der o.a. Bienenvölker erforderte einen enormen methodischen Aufwand und war nur durch das außergewöhnliche Engagement aller Projektbeteiligten sowie der guten imkerlichen Expertise der beteiligten Züchter möglich. Dies ist im Rahmen der "normalen" Zuchtarbeit in der Fläche so nicht umzusetzen. Daher bedarf es dringend (1) methodischer Vereinfachungen des Selektionsprozesses, die den Arbeitsaufwand verringern und (2) noch intensivere Anstrengungen zur Identifizierung genetischer Marker für ein gezieltes Screening von nachzuchtwürdigen Völkern.

Es haben sich mehrere Institutionen in Deutschland zusammengeschlossen, um gemeinsam ein Projekt zur Etablierung von Varroaresistenten Bienen durchzuführen. Interessierte dürfen sich sehr gerne an den Projektkoordinator Gerhard Kottek wenden.

Kontakte:

Birgit Gessler

Birgit.Gessler@uni-hohenheim.de

Projektkoordination:

Gerhard Kottek (g.kottek@gdeb.eu)

Homepage des Projekts:

<https://setbie.uni-hohenheim.de/>

Erläuterungen

Rekombinationsrate: Die Rekombinationsrate bei der Honigbiene ist sehr hoch verglichen zu anderen Tieren bzw. dem Menschen. Biologisch gesprochen versteht man unter der Rekombination eine Neuordnung des genetischen Materials in den frühen Zellen der Entwicklung. Dadurch gibt es immer wieder neue Kombinationen der Merkmale und Gene, welches zu einer großen genetischen Varianz bei den Nachkommen bzw. in einer Population führt. Diese Anpassungsfähigkeit hat Vorteile bei wechselnden Umweltbedingungen. Sie erschwert aber bei der Honigbiene die gezielte Züchtung, da jede Generation wieder aufs Neue auf die gewünschten Eigenschaften geprüft werden muss.

Paarungsbiologie: Die jungfräuliche Königin wird auf dem Hochzeitsflug von einer Anzahl an verschiedenen Drohnen begattet. Das heißt bei ihren Nachkommen gibt die Königin immer die Hälfte ihres genetischen Materials weiter und die andere Hälfte stammt von einem der verschiedenen Drohnen. In dem SET-Bie Projekt wurde durch die bewusste künstliche Besamung mit dem Samen von Drohnen aus einem Drohnenvolk, bzw. mit dem Samen nur eines Drohns die genetische Vielfalt in der nächsten Generation reduziert, um eine bessere Aussage über die Merkmale von Interesse machen zu können.