

DUURZAME BESTRIJDING VAN DE VARROA MIJT IN DE NEDERLANDSE BIJENHOUDERIJ



LIZA KLUSS



MISSIE INHOLLAND

Hogeschool Inholland richt zich op het opleiden van zelfstandig denkende professionals. door praktijkgerichte kennis te ontwikkelen. Inholland verwerft onderwijs met onderzoek om elkaar te versterken in de bijdrage aan een duurzame leefomgeving en een veerkrachtige samenleving.

MISSIE BEJO ZADEN

Naast het veredelen van groentezaden, richt Bejo zich op het delen van kennis en het verkennen van innovatieve technologieën. Bejo Zaden investeert in het onderzoek en de ontwikkeling van moderne technieken voor duurzame teelt.

VARROA DESTRUCTOR VS APIS MELLIFERA

Het in stand houden van gezonde honingbij kolonies gaat moeizaam bij de Nederlandse imkers, voornamelijk vanwege de virussen die worden overgedragen door de ectoparasitaire mijt *Varroa destructor*. Het gebruik van miticiden is ineffectief gebleken en levert negatieve effecten op het milieu en op de bijen zelf. Sommige *Apis mellifera* lijnen bezitten een eigenschap die de Varroa-infectie uit een bijenvolk elimineert: *Varroa Sensitive Hygiene* (VSH). Pogingen om kweeklijnen te creëren worden gehinderd door de grote hoeveelheid werk die nodig is om het VSH-niveau van verschillende kolonies te kwantificeren. Door de genen te vinden die geassocieerd zijn met VSH, kan er met de eigenschap-bepalende loci een marker assisted breeding techniek ontworpen worden door middel van KASP om VSH aan te tonen.

METHODE

Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) wordt gebruikt om de associatie tussen een SNP en een genetische eigenschap te achterhalen. Omdat er 2 'traits' zijn: VSH en non-VSH, zijn er 2 allel specifieke forward primers ontwikkeld met 1 common reverse primer. De resultaten worden worden afgelezen in fluorescent signaal: de ene forward primer bezin de sequentie behorend bij FAM dye en de andere HEX dye.

D.m.v. statistische tools, zijn er regio's van interesse (ROIs) gevonden uit *Apis mellifera* Buckfast sequencing data. Uit deze ROIs zijn vervolgens 34 SNPs gefilterd die geschikt waren voor KASP probes.

Single-drone geïnsemineerde (SDI) Buckfast bijen DNA is geïsoleerd door de thorax van de bijen te snijden en in 96-wells platen te plaatsen (figuur 3). Eerst is er getest of een planten isolatie kit voldoende was voor bijen DNA isolatie, of dat er een dieren kit gebruikt moest worden. Met de meest geschikte isolatie kit, zijn de overgebleven 96-wells platen met bijen thoraxen met een DNA isolatie robot geïsoleerd. De samples zijn verdund op 384-wells platen en overgebracht naar 1536-wells. De 34 ontworpen SNP probes zijn vervolgens gepipeteerd in de juiste wells met de Meridian2 (figuur 4).

De platen zijn in een hydrocycler geplaatst en geanalyseerd met de Pherastar. Er is een test-run uit gevoerd om de juiste verdunning te achterhalen. Met de fluorescentie data zijn er meerdere analyses uitgevoerd om de SNPs te scoren op basis van:

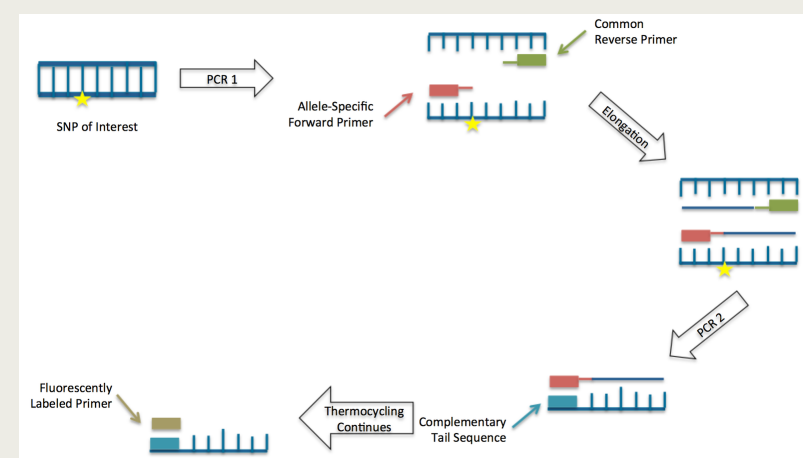
1. Consistent voorspellend vermogen: in hoeverre kunnen de SNP probes non-VSH en VSH bijen uit elkaar halen (binden de primers aan de juiste sequentie)?
2. Juiste genotypering: classificeren de SNP probes de samples met het juiste genotype (genotype passend bij single drone inseminatie bijen)?
3. Betrouwbaarheid: binden de primers niet wanneer de juiste sequentie niet aanwezig is en ontstaat er geen fluorescent signaal wanneer het niet hoort (achtergrond signaal, primer dimers, contaminatie negatieve controle)?

HET DOEL

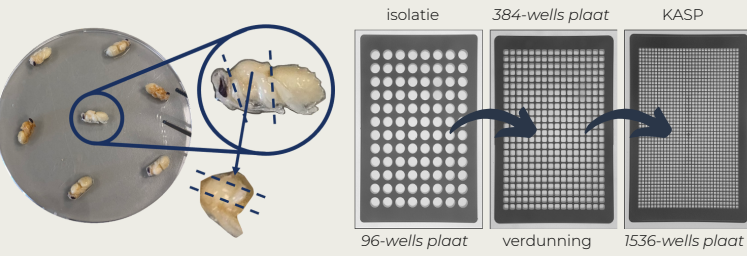
Het ontwikkelen van een VSH-detectieprotocol voor *Apis mellifera* Buckfast op basis van Single Nucleotide Polymorphisms (SNP's), gevonden in bioinformatica analyse van gepoolde sequencing data, door probes te designer van de gevonden SNPs en deze te testen d.m.v. Kompetitive Allele Specific PCR (KASP).



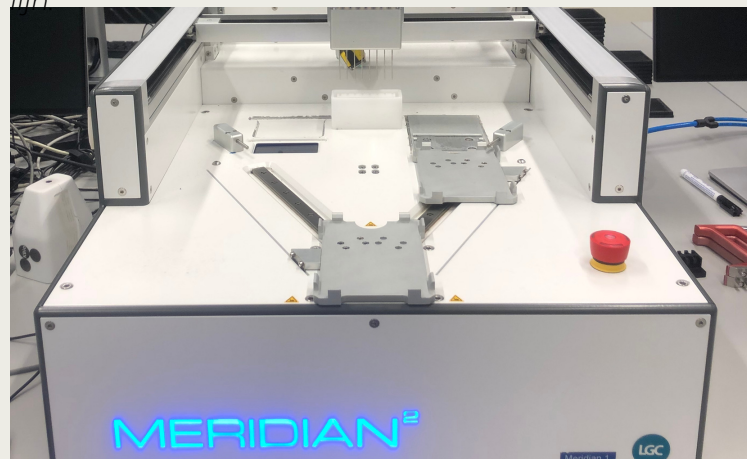
Figuur 1: *Apis mellifera* met *Varroa* mijt op de rug. De *Varroa* mijt is de grootste parasitaire mijt in verhouding met zijn host met een afmeting van 1.5 bij 1.1 mm.



Figuur 2: Kompetitive Allele Specific PCR (KASP). Voor KASP wordt er gebruik gemaakt van 2 allel-specifieke forward primers, 1 common reverse primer en een mastermix met fluorescente dye en een quencher. In de eerste PCR ronde bind de forward primer aan de sequentie met de corresponderende SNP en de common reverse primer amplificeert de target region. In de tweede PCR ronde wordt de allel-specifieke tail sequence gekopieerd om het complement te vormen. In de derde ronde wordt de hoeveelheid allel-specifieke tail sequences verhoogd waardoor er meer PCR product gevormd wordt. De tail sequence is complementair aan de fluorescente label waardoor de quencher loslaat en fluorescent signaal wordt gegenereerd.



Figuur 3: Methode bijen snijden en overplaatsen van samples. 1/3 thorax per 96-wells plaat well is gebruikt per individu. 15 individuen en 1 gepooled sample per lijn.



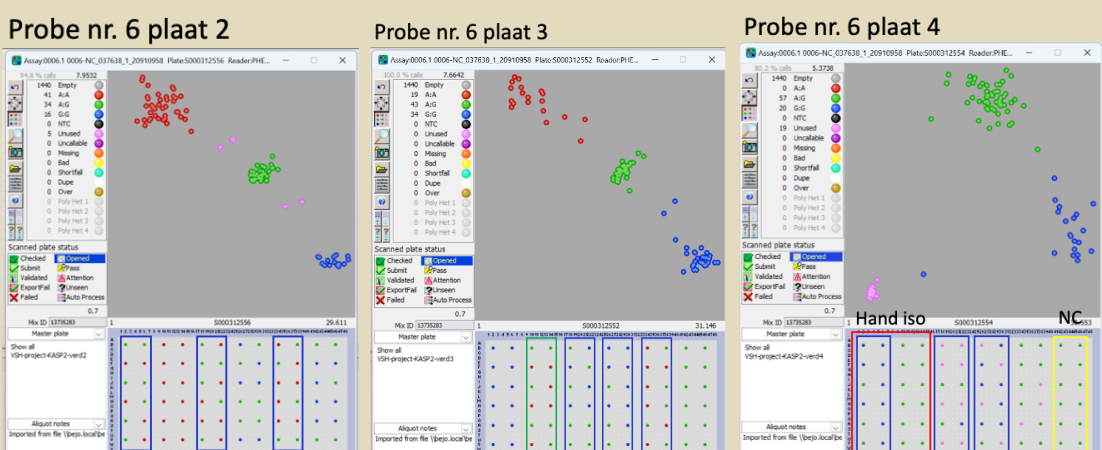
Figuur 4: 'Meridian 2' voor KASP probe pipetteren. 16 probes passen op een 1536-wells plaat. Er is een test run uitgevoerd met 2 lijnen en een main run met 15 lijnen. Voor de 'main essay' zijn er 32 probes gebruikt (2 probes zijn uit de selectie gehaald na de test-run).

RESULTATEN

De animal- en plant DNA isolatie kits werden met de hand getest en toonde geen groot verschil in DNA concentratie. Voor de robot isolatie is de plant kit gebruikt.

Elke verdunning van de test-run toonde de zelfde resultaten: kleine volumes en lage concentraties bijen DNA kan gebruikt worden voor KASP. Er zijn 2 probes uitgekozen die niet meegenomen zouden worden voor me 'main KASP essay' omdat er 2x16 probes op 1 plaat passen.

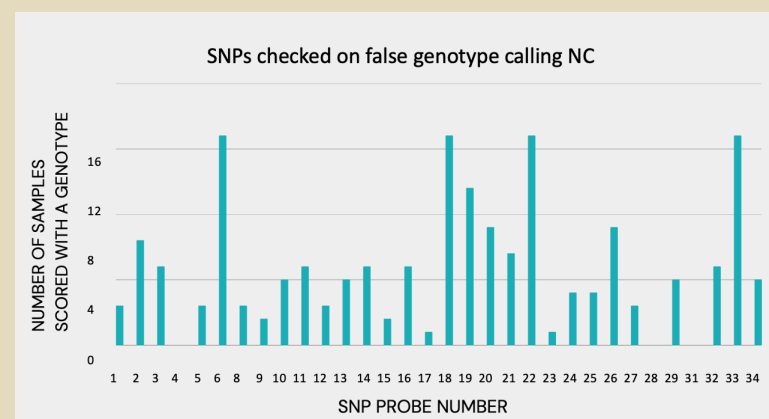
In figuur 5 zijn 3 allelic discrimination plots te zien welke resulteerde uit de KASP. SNP probe 6 is hier als voorbeeld genomen. Elke kleur in de plot geeft aan welk soort fluorescent signaal is afgegeven (HEX of FAM) en correspondeert met het genotype/SNP die gebonden is aan de primer. Er is zijn scheidingen te zien tussen de 2 eigenschappen: VSH, non-VSH en heterozygote individuen. SNP probes 3, 6, 13, 14, 16, 21, 25 en 26 lieten consistent zien dat ze van de meeste samples het genotype van VSH en van non-VSH bijen uit elkaar konden halen.



Figuur 5: Allelic discrimination plots KASP resultaten probe 6. Onderin staat de layout van de samples waarvan de VSH bijen zijn aangegeven met een blauwe box, non-VSH zonder en de groene box op plaat 3 was gelabeld als 25% VSH. Op plaat 4 is de rode box met de hand geïsoleerd en de gele box is de negatieve controle.

In figuur 7 is de scoring te zien van de SNP probes waaruit probes 3, 6, 13, 14, 16, 21, 25 en 26 waren uitgekozen als kandidaat SNPs gebaseerd op de scores per criterium.

De negatieve controle met MilliQ toonde genotypes, oftewel, binding met sommige primers. Dit kan komen door contaminatie van de NC wells of doordat de primers aan zichzelf konden binden (figuur 6).



Figuur 6: Hoeveelheid NC wells gelabeld met een genotype per SNP probe. Probes 4, 17, 23, 28 en 31 waren de enige die niet bonden aan NC samples. Dit betekent dat deze probes niet aan zichzelf kunnen binden, of dat deze wells niet waren gecontamineerd.

SNP probe number	Predictive value for VSH: test-run hives (scoring 0-10, 10 being: clear division 0 - 100%)	Predictive value for VSH: final assay (scoring 0-10, 10 being: clear division 0 - 100%)	Reliability: false positives NC (% of NC wells scored with genotype, high = bad)	Chance of failure (% of individuals scored with no genotype, high = bad)	Correctness: incompatible genotypes (1 = incompatible genotype was found)
1	2	2	19%	13%	
2	8	5	50%	15%	
3	8	5	38%	13%	1
4	0	1	0%	23%	
5	4	0	19%	17%	
6	8	6	100%	10%	
7	10	-	-	-	-
8	0	0	19%	8%	
9	8	2	13%	10%	1
10	0	0	31%	28%	
11	0	0	38%	15%	
12	4	3	19%	19%	
13	6	5	31%	15%	1
14	4	7	38%	13%	1
15	0	6	13%	17%	1
16	10	5	38%	9%	
17	0	0	6%	15%	
18	6	2	100%	19%	1
19	6	1	75%	13%	1
20	8	2	56%	11%	1
21	10	4	44%	13%	1
22	0	1	100%	21%	1
23	1	0	6%	18%	1
24	10	3	25%	10%	1
25	10	7	25%	12%	1
26	10	4	56%	12%	1
27	8	1	19%	12%	
28	0	0	0%	100%	
29	0	3	31%	11%	
30	0	-	-	-	-
31	0	0	0%	100%	
32	0	6	38%	21%	1
33	10	0	100%	0%	
34	-	1	31%	11%	

Figuur 7: SNP probe scoring. Er is een script geschreven in R studio (Peter Hoitinga) om samples en SNPs te vinden die incompatibele genotypes gaven: SDI bijen lijnen kunnen enkel 3 genotypes hebben (A:A, G:G of G:A). Dit leverde de correctness score. Uit deze analyse is gebleken dat deze genotypes door 14 van de 32 SNP probes werden gegeven en dat 7 van de 15 lijnen deze genotypes hebben ontvangen. Bij 1 geteste lijn kwam er 12 keer een incompatibel genotype voor waardoor er geconcludeerd kan worden dat dit probleem voornamelijk sample gerelateerd is. De predictive value voor VSH is visueel beoordeeld. De reliability score is gebaseerd op de NC resultaten en de chance of failure is beoordeeld door te kijken hoeveel primers bij hoeveel samples niet konden binden en geen genotype was gecalled.

CONCLUSIE

Bijen DNA geïsoleerd met een isolatierobot met behulp van een isolatiekit bedoeld voor plantaardig materiaal, is succesvol gebleken voor KASP. De gebruikte DNA-verdunningen (1x, 2x, 4x, 8x) bleken allemaal geschikt te zijn. 8 SNP-probes werden gelabeld als kandidaat-SNP's voor de detectie van VSH in *Apis mellifera*: probes 3, 6, 13, 14, 16, 21, 25 en 26 op basis van de criteria genoemd in 'methode'.

Een suggestie voor verder onderzoek is om het genotype van de geteste bijen terug te zoeken in de sequencing data, om PCR te optimaliseren en om meer controles te gebruiken. Ook moet er een beter SNP scoring pipeline ontwikkeld worden om de betrouwbaarheid van de probe validatie te verhogen. Hiernaast kunnen er meer SNPs gezocht worden d.m.v. bioinformatica analyse (chrom 10-16) op een grotere data set (meer sequencen) en meer bijen te testen (van zelfde sister queen, niet SDI),

LITERATUUR

Tsuruda JM, Harris JW, Bourgeois L, Danka RG, Hunt GJ (2012) High-Resolution Linkage Analyses to Identify Genes That Influence Varroa Sensitive Hygiene Behavior in Honey Bees. *PLoS ONE* 7 (11): e48276.

Spötter A, Gupta P, Mayer M, Reinsch N, Blenfield K (2012) Genome-wide association study of a Varroa-specific defense behavior in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Heredity*, 107 (3): 220-227.

Oxley PR, Spivak M, Oldroyd BP. Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). *Mol. Ecol.* 2010; Apr;19(7):1452-61.

Han B, Lee, Tanya L, Schwab, Alaa Koleilat, Hirotsuka Ata, Camden L, Daby, Roberto Lopez-Cervera, Melissa S, McNulty, Hannah S, Bostwick, and Karl J, Clark. Allele-Specific Quantitative PCR for Accurate, Rapid, and Cost-Effective Genotyping. *Human Gene Therapy Jun 2016;425-435.*

OOK GEÏNTERESSEERD IN DEZE STAGE PLEK?
MAIL DAN NAAR FRENS.PRIES@INHOLLAND.NL