

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre
Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Martin Förster

Untersuchungen zur genetischen Populationsstruktur von *Varroa destructor*



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Verena Schneider
aus Tumlingen

München 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Martin Förster

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Deeg

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Anhangsübersicht.....	V
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Biologie der Varroamilbe.....	2
2.1.1 Taxonomie	2
2.1.2 „Siegeszug“ von <i>Varroa destructor</i>	3
2.1.3 Verbreitung	4
2.1.4 Befallsstärke bei Bienenvölkern	5
2.1.5 Morphologie	6
2.1.6 Entwicklung.....	7
2.1.7 Lebens- und Fortpflanzungszyklus	8
2.1.8 Lebenserwartung der Varroen	15
2.2 Parasit-Wirt-Beziehung	15
2.2.1 Der Wirt: die Biene.....	16
2.2.2 Zusammenleben von Wirt und Parasit	18
2.2.3 Pathogenese und Pathologie	19
2.2.3.1 Schaden der einzelnen Biene.....	20
2.2.3.2 Schaden des Bienenvolks	21
2.3 Markergestützte Ermittlung von DNA-Varianten	22
2.3.1 Mikrosatelliten	23
2.3.1.1 Entstehung und Funktion	23
2.3.1.2 Aufbau	24
2.3.1.3 Darstellung	25
2.3.2 „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs)	25
2.3.2.1 Entstehung	26
2.3.2.2 Darstellung	27
2.4 Populationsgenetik.....	27
3 Material und Methoden.....	29

3.1	Material	29
3.1.1	Probenmaterial.....	29
3.1.2	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	30
3.1.3	Puffer und Lösungen.....	31
3.1.4	Verbrauchsmaterial.....	32
3.1.5	Geräte	32
3.1.6	Software.....	33
3.2	Methoden	34
3.2.1	Probennahme und -aufbewahrung.....	34
3.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	34
3.2.2.1	DNA-Präparation	34
3.2.2.2	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	35
3.2.2.3	Photometrische Bestimmung der DNA-Qualität	36
3.2.2.4	Mikrosatellitenanalyse	36
3.2.2.4.1	Auswahl geeigneter Mikrosatelliten-Marker im Kerngenom ...	36
3.2.2.4.2	Primerdesign.....	38
3.2.2.4.3	Fluoreszenzmarkierung der Primer.....	38
3.2.2.4.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
3.2.2.4.5	Multiplex-PCR	40
3.2.2.4.6	Durchführung der Multiplex-PCR	42
3.2.2.4.7	Gelelektrophoretische Auftrennung.....	43
3.2.2.5	SNP-Analyse im mitochondrialen Genom	45
3.2.3	Statistische Auswertung.....	47
4	Ergebnis	49
5	Diskussion	56
6	Zusammenfassung.....	68
7	Summary.....	69
8	Literaturverzeichnis	70
9	Anhang.....	78

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
ccd	charge coupled device (-Kamera)
COI	Cytochrom C Oxidase I
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dbSNP	SNP-Datenbank
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAM	6-Carboxyfluorescein
HEX	4,7,2,4',5',7'-Hexachloro-6-Carboxyfluorescein
µl	mikroliter
ml	milliliter
mM	millimolar
mt	mitochondrial
NaCl	Natriumchlorid
nm	nanometer
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, polymerase chain reaction
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
rpm	revolutions per minute
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus, single nucleotide polymorphism
STR	short tandem repeat
TAMRA	N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxyrhodamin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TET	4,7,2',7'-Tetrachloro-6-Carboxyfluorescein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
VNTR	variable number of tandem repeats

Abbildungsverzeichnis

- Abb.1 Systematische Einordnung von *Varroa destructor*
- Abb.2 Jahrespopulation von Bienenbrut (kontinuierliche Linie) und Milben (diskontinuierliche Linie), in gemäßigter Zone
- Abb.3 Varroa-Weibchen (Oberseite)
- Abb.4 Vergleich zwischen weiblichem (links) und männlichem Adultus (rechts)
- Abb.5 Stadien der Milbenentwicklung
- Abb.6 Lebenszyklus von *Varroa destructor*
- Abb.7 Entwicklung von Wirt und Parasit (nach Sanford)
- Abb.8 Varroamilbe im Futtersaft in der Wabenzelle
- Abb.9 Wabenzelle mit Varroamilbe, Kotpaket (K) und dem ersten Ei (E)
- Abb.10 Zellinhalt nach Entfernen der Bienenpuppe (an der rechten Zellwand sind zwei adulte Milben zu sehen, in der Mitte am Zellboden drei Nymphenstadien)
- Abb.11 Drohnenmaden (links) und adulte Arbeiterin (rechts) mit multiplem Varroabefall
- Abb.12 Frischgeschlüpfte Biene mit deformierten Flügeln
- Abb.13 Geographische Verteilung der Bienenstandorte
- Abb.14 Mitochondriales Genom (nach Evans und Lopez)
- Abb.15 Darstellung der Allele der Multiplex 1
- Abb.16 Darstellung der Allele der Multiplex 2 (links) und 3 (rechts)
- Abb.17 Sequenz des Fragments des COI-Gens
- Abb.18 Fixierung einer Mutation (nach Cornuet)

Tabellenverzeichnis

Tab.1	Genotypen von <i>Varroa destructor</i>
Tab.2	Die neun Arten der Honigbiene (<i>Apis</i>)
Tab.3	Marker mit Primersequenz, Accession number, Label und Größe, die für die Mikrosatellitenanalyse verwendet wurden
Tab.4	Fluoreszenzmarkierungen der Primer
Tab.5	Multiplex-PCR-Sets
Tab.6	Standard-PCR-Protokoll zur Mikrosatellitenanalyse
Tab.7	Tiere, die für die COI-Gen-Sequenzierung ausgewählt wurden
Tab.8	Standard-PCR-Protokoll mit Temperatur-Programm zur SNP-Analyse
Tab.9	Darstellung der einzelnen Marker mit Allelzahl, Loci und Frequenz
Tab.10	Verteilung der Allelfrequenzen des VD126 in den Subpopulationen

Anhangsübersicht

Anhang 1 Tierliste

Anhang 2 PCR-Protokoll

Anhang 3 Sequenz-Alignment des COI-Gen-Fragments

1 Einleitung

Varroamilben leben schon sehr lange in engem Verhältnis mit ihrem natürlichen Wirt der Asiatischen Honigbiene, *Apis cerana* (Calderón 2009b). Nach Einfuhr der Europäischen Honigbiene, *Apis mellifera*, nach Asien, war es der Milbe *Varroa destructor* möglich auf den neuen Wirt zu wechseln.

Heute ist die Varroamilbe, in ihrer Stellung als Parasit von *Apis mellifera*, von herausragender Bedeutung. Deshalb wird die Varroose, wie die Erkrankung, verursacht durch Varroamilben, genannt wird, von einigen Autoren auch als die schwerwiegendste Bedrohung für die weltweite Bienenwirtschaft erachtet (De Jong und Soares 1997, Oldroyd 1999, Sammataro 2000, Rosenkranz 2009).

Kein anderes Pathogen hatte bisher vergleichbare Auswirkungen auf die Bienenhaltung und -forschung, während der langen Geschichte der Bienenzucht (Rosenkranz 2009). Der wirtschaftliche Schaden übersteigt bei Weitem den aller anderen Bienenkrankheiten zusammen (Berg 2009).

Nicht umsonst kam die dafür verantwortliche Milbe *Varroa destructor* (Anderson und Trueman 2000), *die Zerstörerische*, zu ihrem Namen.

Trotz der Brisanz dieser Problematik in der Bienenwirtschaft ist die heutige Forschung, was die Varroamilbe angeht, noch lange nicht am Ziel. Deshalb ist es das Anliegen dieser Arbeit, das Wissen über die Populationsstruktur von *Varroa destructor* zu erweitern. Die Milbenpopulation in Deutschland soll im Hinblick auf ihre Genetik genauer untersucht werden. Anhand von möglichen Variablen im Genom soll die genetische Varianz zwischen Milben unterschiedlicher, regionaler Standorte ermittelt werden. Dies soll durch die Untersuchung des Kerngenoms, mittels Mikrosatelliten-Markern, beziehungsweise durch die Untersuchung des mitochondrialen Genoms auf Einzelnukleotid-Polymorphismen, erreicht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Biologie der Varroamilbe

2.1.1 Taxonomie

Bisher sind vier Arten von Varroamilben bekannt. Ursprünglich ging man davon aus, dass neben *Varroa rinderi* (De Guzman und Delfinado-Baker 1996) und *Varroa underwoodi* (Delfinado-Baker und Aggarwal 1987) hauptsächlich *Varroa jacobsoni* Oudemans (Oudemans 1904) großen Schaden in der Bienenhaltung anrichtete.

2000 konnten Anderson und Trueman anhand mitochondrialer-DNA-Analysen (mt-DNA-Analysen) nachweisen, dass es sich bei *Varroa jacobsoni* nicht nur um eine Milbenspezies handelt, sondern um einen Komplex von mindestens zwei Spezies. Sie nannten die neu entdeckte Art *Varroa destructor* (Abb. 1).

Abb. 1 Systematische Einordnung von *Varroa destructor*

Stamm:	Arthropoda
Unterstamm:	Chelicerata
Klasse:	Arachnea
Unterklasse:	Acari
Ordnung:	Parasitiformes
Unterordnung:	Mesostigmata
Familie:	Varroidae
Gattung:	Varroa
Art:	<i>Varroa destructor</i>

Weltweit wurden seither acht verschiedene Genotypen (oder auch Haplotypen, da die meisten durch mt-DNA-Analysen als solche erkannt wurden) von *Varroa destructor* entdeckt (Tab. 1).

Die Namensgebung erfolgte nach der Erstentdeckung im jeweiligen Land, wo die Milben auf ihrem natürlichen Wirt der Asiatischen Honigbiene, *Apis cerana*, gefunden wurden.

Tab. 1 Genotypen von *Varroa destructor*

Genotyp	Quelle	Datum
VD China	Anderson und Trueman	2000
VD China2	Zhou et al.	2004
VD Japan	Anderson und Trueman	2000
VD Nepal	Anderson und Trueman	2000
VD Korea	Anderson und Trueman	2000
VD Pakistan	Anderson	unpublished data
VD Sri Lanka	Anderson und Trueman	2000
VD Vietnam	Anderson und Trueman	2000

Allerdings sind nur zwei bestimmte Genotypen, der Korea-Genotyp und der Japan-Genotyp, bekannt dafür, die Europäische Honigbiene, *Apis mellifera*, als alternativen Wirt zu nutzen. Nur diese beiden sind in der Lage sich auf *Apis mellifera* zu reproduzieren (Zhou 2004).

Während der Korea-Genotyp bei *Apis mellifera* fast weltweit verbreitet ist (inklusive größte Teile Asiens), ist der Japan-Genotyp nur in Japan, Thailand und Amerika präsent (Solignac 2005).

In Deutschland, so schätzt man, parasitiert auf unserer heimischen Honigbiene, *Apis mellifera*, nur *Varroa destructor* mit dem Korea-Genotyp (Anderson 2000, Anderson und Trueman 2000, Solignac 2005).

2.1.2 „Siegeszug“ von *Varroa destructor*

Ursprünglich wurde *Varroa jacobsoni* von Jacobson auf Java entdeckt und von Oudemans (1904) beschrieben. Der einzige Wirt war *Apis cerana*, deren Lebensraum sich auf Südostasien beschränkte.

Der heutige Wirt *Apis mellifera* war bis dato nur in Europa, Afrika und im Nahen Osten beheimatet.

Im Zuge des aufstrebenden Handels und Reiseverkehrs (Crane 1988, Sammataro 2000) wurde, mit der Transsibirischen Eisenbahn, der Weg für *Apis mellifera* nach Osten (Oldroyd 1999) geebnet. So ist es wahrscheinlich, dass sich *Apis*

mellifera dort mit ihrer Schwester-Spezies *Apis cerana* vereinen konnte. Dabei war auch erstmals der Kontakt zu *Varroa jacobsoni*, respektive *Varroa destructor*, ermöglicht.

Was folgte war ein Wirtswechsel. Wann genau dieser Wirtswechsel von *Apis cerana* zu *Apis mellifera* stattfand ist umstritten. Während De Guzman und Stelzer (1997) es als unklar befinden, sind andere Autoren der Meinung, dass dieses Ereignis um 1957 in Japan auftrat (Donzé 1996, Oldroyd 1999, Solignac 2005).

Die infestierten *Apis mellifera* wurde dann nach Russland zurück exportiert, von wo aus die Milbe ihren Siegeszug startete (Oldroyd 1999). Die schnelle und massive Verbreitung führte dazu, dass die Varroose heutzutage in fast allen Ländern der Welt (Anderson 2000), mit Ausnahme von Australien (Rosenkranz 2009), vorkommt.

In den 70er Jahren wurde das Vorkommen der Varroamilbe auch in Deutschland festgestellt. Wie genau die Einschleppung der Milbe nach Deutschland möglich gewesen sein könnte, beschreiben zwei Theorien von Ruttner und Ritter (1980) und Ritter (1981).

Bei Ersterer wurden befallene Bienen der Spezies *Apis cerana* aus Pakistan zu Forschungszwecken importiert.

Die zweite Theorie besagt die Exportierung befallener *Apis mellifera*-Königinnen aus der USSR (Ukrainische Sozialistische Sowjetrepublik), die über Rumänien Deutschland erreicht haben.

Forschungsergebnisse von De Guzman und Stelzer (1997) zeigen jedoch, dass die Einschleppung eher über europäische Nachbarländer wie Rumänien und der USSR stattgefunden hat, als wie ursprünglich angenommen von Pakistan.

2.1.3 Verbreitung

Bienenmilben haben ein vermeintlich größeres Verbreitungspotential als andere Spezies der Unterklasse Acari.

Dies liegt zum einen daran, dass es ihnen möglich ist, mit ihrem Wirt weite Strecken zurückzulegen und zum anderen, weil der Mensch aus wirtschaftlichen Gründen seinen Teil dazu beiträgt (Sammataro 2000).

So ist *Varroa destructor* mittlerweile in ganz Deutschland verbreitet, was unter anderem durch die Wandertätigkeit der Imker mit ihren Bienen (De Jong 1982, Sammataro 2000), zur Erhöhung des Trachtertrags, aber auch zur kommerziellen Bestäubung von Pflanzen, begünstigt wird. Dazu kommt ein möglicher Austausch von Milben im Zuge des internationalen Handels mit Königinnen und ganzen Bienenvölkern.

Weitere Gründe für die sehr effiziente Verbreitung der Milbe liegen in der Biologie der Biene. Innerhalb einer Bienenpopulation ist die Verbreitung ein Leichtes, da sich die Biene, als soziales Insekt, die meiste Zeit zu mehreren aufhält und durch ihre Aufgabe als Brutpflegerin, ihren Parasiten relativ schnell im Stock verteilen kann (Solignac 2005).

Auch beim Ausschwärmen eines ganzen Bienenvolks können die Milben durch einen raschen Standortwechsel zur weiteren Ausbreitung gelangen.

Daneben kommt es oft vor, dass bei der sogenannten Räuberei der Bienen, Milben „ausgetauscht“ werden. So schreibt Rosenkranz (2009), dass während Perioden mit geringem Nektarfluss und folglich verstärktem „Räubern“ der Bienen, die Parasitenbürde rasch und signifikant ansteigen kann, weil die räuberischen Bienen Milben von geschwächten, parasitierten Völkern erhalten.

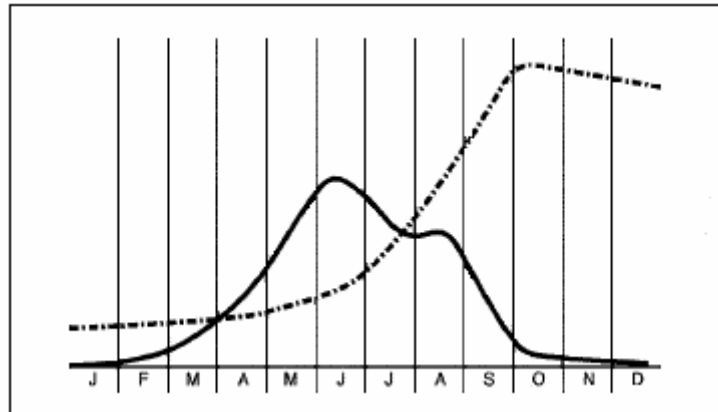
Ebenso können abwandernde Arbeiterinnen und Drohnen Milben von Volk zu Volk tragen (Solignac 2005).

Generell neigt *Varroa destructor* zur raschen Ausbreitung in *Apis mellifera*-Völkern (De Jong 1982). Was neben oben genannten Punkten dadurch begünstigt wird, dass der Wirt seinem „neuerworbenen“ Parasiten scheinbar wenig entgegenzusetzen hat (Oldroyd 1999).

2.1.4 Befallsstärke bei Bienenvölkern

Während des Jahres nimmt die Varroa-Befallsstärke zu und erreicht im Spätsommer ihren Höhepunkt (Abb. 2). Wobei berücksichtigt werden muss, dass die Befallsstärke vom Ausmaß der Brutaufzucht des Bienenvolkes abhängig ist (Boch 2006).

Abb. 2 Jahrespopulation von Bienenbrut (kontinuierliche Linie) und Milben (diskontinuierliche Linie), in gemäßigter Zone



(Quelle: World Organisation for Animal Health, OIE, 2009)

2.1.5 Morphologie

Bei Varroamilben herrscht ein klarer Geschlechtsdimorphismus (Infantidis 1983). Die Form des Milbenweibchens (Abb. 3) ist quer oval, etwa 1,2 mm lang und 1,6 mm breit. Es hat einen nach oben gewölbten Körper, der dunkelbraun gefärbt und mit einer großen Anzahl feiner Borsten und Härchen besetzt ist.

Abb. 3 Varroa-Weibchen (Oberseite)



(Quelle: http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures/misc/bees/varroa_mite.htm, University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences, Department of Entomology and Nematology)

Die Larve (L1) ist mit drei Beinpaaren ausgestattet, alle folgenden Stadien besitzen vier Beinpaare. Jedes dieser Beinpaare ist am Ende mit Haftlappen versehen, was der Milbe ermöglicht sich schnell und fest am Hinterleib der Biene

anzuheften, wobei sie dort bevorzugt versucht sich in die Zwischenringtaschen hineinzuzwängen.

Die vorderen Laufbeine tragen Geruchs- und Tastorgane. Die Mundwerkzeuge (Chelizeren) dienen der Milbe zum Anstechen dünnwandiger Körperteile der adulten Biene und der Bienenmade, um Hämolymphe zu saugen.

Das Milbenmännchen (Abb. 4) dagegen, ist mit 0,85 mm Länge und 0,8 mm Breite, kleiner. Zudem ist die Grundform eher rund. Die Männchen sind in der Wabenzelle durch ihre Färbung von den weiblichen Milben gut zu unterscheiden. Sie sind viel heller und von gelber bis grauer Farbe.

Im Vergleich zu den Weibchen haben sie längere Beine.

Abb. 4 Vergleich zwischen weiblichem (links) und männlichem Adultus (rechts)



(Quelle: Rosenkranz, 2009, Journal of Invertebrates Pathology)

Die Chelizeren der Männchen sind röhrenförmig umgebildet und ihre Funktion besteht darin, Spermien auf das Weibchen zu übertragen. Daraus folgt, dass sie nur in der Lage sind Nahrung aufzunehmen und sich weiterzuentwickeln und zu häuten, wenn die Muttermilbe die Bienenbrut bereits angestochen hat. Erst wenn ein „Futterloch“ besteht, können sie Hämolymphe saugen.

2.1.6 Entwicklung

Die Varroamilbe durchläuft eine für Milben typische Entwicklung (Abb. 5).

Nach der Eiablage reift im Ei die Larve (L1) heran. Diese verbleibt auch im Ei, bis zur Umbildung zur Nymphe. Es folgen zwei Nymphenstadien, zunächst das der Protonymphen, mit mobiler und pharater (immobiler) Phase, dann das der Deutonymphen, ebenfalls mit mobiler und pharater Phase. Schließlich entwickeln sie sich zum Adultus (Infantidis 1983).

Abb. 5 Stadien der Milbenentwicklung (von links nach rechts): frisch geschlüpfte Protonymphe, zwei Deutonymphen-Stadien, adulte Jungmilbe, adulte Milbe



(Quelle: American Bee Journal and Bee Culture Magazine)

Die gesamte Ontogenese, die Zeitspanne der Entwicklung vom Ei bis zum fortpflanzungsfähigen Adultstadium, nimmt bei den Männchen durchschnittlich 6,2 Tage (150 Stunden), bei den Weibchen 5,5 Tage (133 Stunden) in Anspruch (Martin 1995).

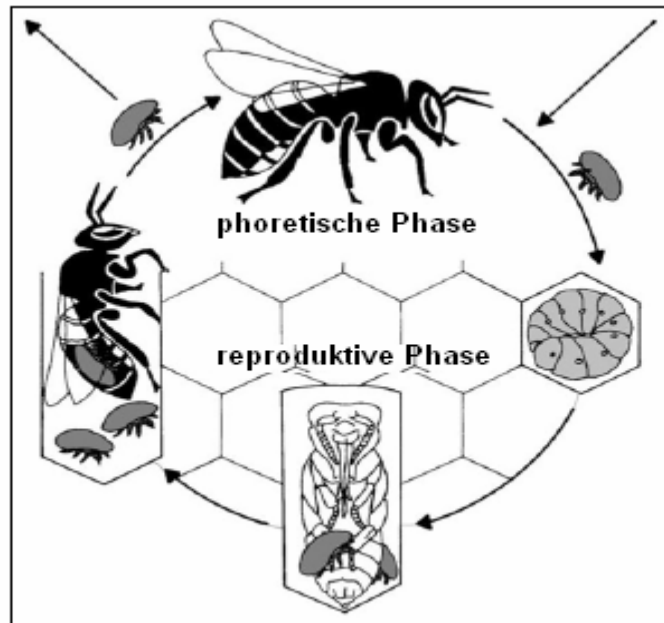
2.1.7 Lebens- und Fortpflanzungszyklus

Die Milben pflanzen sich sexuell fort. Die zuvor in ihrer „Geburtszelle“ befruchtete Milbe erreicht die neue Wabenzelle mit einem Samenpaket in ihrer Samenblase. Die Fortpflanzung läuft bei Varroen pseudoarrhenotokisch ab (Martin 1997, Solignac 2005). Entwicklungsfähiger Nachwuchs kann nur aus befruchteten Eiern entstehen. Dabei erfolgt beim ersten Ei bereits während der Embryogenese die Eliminierung des paternalen Genoms (Sabelis und Nagelkerke 1988, Cruickshank 1999), wodurch ein haploides Männchen entsteht. Alle folgenden werden zu diploiden Weibchen. Durch diesen haplodiploiden Modus ist es möglich, die für die Entwicklung und Fortpflanzung wichtige Geschlechterfestlegung, zu gewährleisten.

Der Lebenszyklus (Abb. 6) der Varroamilbe setzt sich aus einer phoretischen Phase und einer reproduktiven Phase zusammen (Donzé 1998). In der phoretischen Phase wird die Milbe durch adulte Bienen von Wabe zu Wabe getragen. Bis sich die Milbe in eine Wabenzelle niederlässt und diese Phase beendet, können ein bis 20 Tage vergehen (Fuchs 1992).

Im Gegenzug findet die reproduktive Phase ausschließlich in der Wabe statt. Wie lange diese Phase vereinnahmt hängt von der Bienenbrut in der Zelle ab, in der sich die Milbe reproduziert. Während die Verdeckelungszeit bei Drohnenbrut 360 Stunden (15 Tage) in Anspruch nimmt, beträgt sie bei Arbeiterbrut nur 282 Stunden (11,75 Tage) (Martin 1998).

Abb. 6 Lebenszyklus von *Varroa destructor*



(Quelle: Boecking und Genersch, 2008, „Varroosis – the ongoing crisis in bee keeping“, Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit)

Die Muttermilbe legt ihre Eier in der Wabenzelle ab, in der sich diese bis zu adulten Jungmilben entwickeln. Die Befruchtung erfolgt in einer Wabenzelle in der Regel durch Geschwisterpaarung, die sogenannte Adelphogamie (Solignac 2005), bei der das Männchen seine Schwestern befruchtet, sobald die jeweilige Schwester erwachsen ist. Mitunter kann auch eine Paarung zwischen der Muttermilbe und dem Sohn vorkommen. Dies ist allerdings weniger häufig anzutreffen und der Akt wird meist vorzeitig abgebrochen (Donzé 1996).

Insgesamt seltener, jedoch bei steigender Parasitenbürde durchaus regelmäßig zu beobachten, sind Zellen, die mit zwei oder mehr Milbenweibchen infestiert sind. Dabei kann auch eine Befruchtung zwischen den Linien stattfinden (Solignac 2003).

Bei der Auswahl ihres Bienenwirts bevorzugt die Varroamilbe Drohnen gegenüber den Arbeiterinnen. So wurde festgestellt, dass die Präferenz für Drohnenbrut

achtfach über der für Arbeiterbrut liegt (Martin 1995, Oldroyd 1999, Rosenkranz 2009). Dadurch verschaffen sich die Milben einen entwicklungs- und fortpflanzungstechnischen Vorteil: Drohnen brauchen für ihre Entwicklung ungefähr drei Tage länger als Arbeiterbienen, dementsprechend ist die Aufenthaltsdauer der Milbennachkommen in der Zelle länger, es können mehr Milben zu adulten Weibchen heranreifen. Außerdem kann das Männchen seine Schwestern häufiger befruchten. Das ist wichtig, da beachtet werden muss, dass junge Weibchen, die vor dem Schlüpfen der Biene nicht ausreichend begattet worden sind, unfruchtbar bleiben (Donzé 1998b).

Zudem scheint die Drohnenbrut attraktiver für die Milben zu sein, weil sie von den Bienen häufiger angefliegen wird (Martin 1995), was an der höheren Fütterungsfrequenz bei Drohnen (Boecking und Genersch 2008) liegt.

1989 schrieben Le Conte et al. als weiteren Grund für die Bevorzugung von Drohnen von Fettsäureestern, die als Kairomone (Infochemikalien, ähnlich der Pheromone) wirken und von der Drohnenbrut in höherer Konzentration produziert werden. Die Fettsäureester locken gleichzeitig sowohl Milbe (als Kairomon) als auch Biene (als Pheromon) an, wobei bei letzterer der Impuls zum Verdeckeln der Wabenzelle ausgelöst wird (Le Conte 1990).

Frühere Annahmen, dass die Milbe Drohnenbrut daran erkennt, dass sie höhere Konzentrationen an Juvenilhormon produziert (Le Conte 1989, Rosenkranz 2009), welches als Auslöser der Oogenese bei der Milbe gilt (Hänel 1986), wurden von Garrido und Rosenkranz (2003) widerlegt.

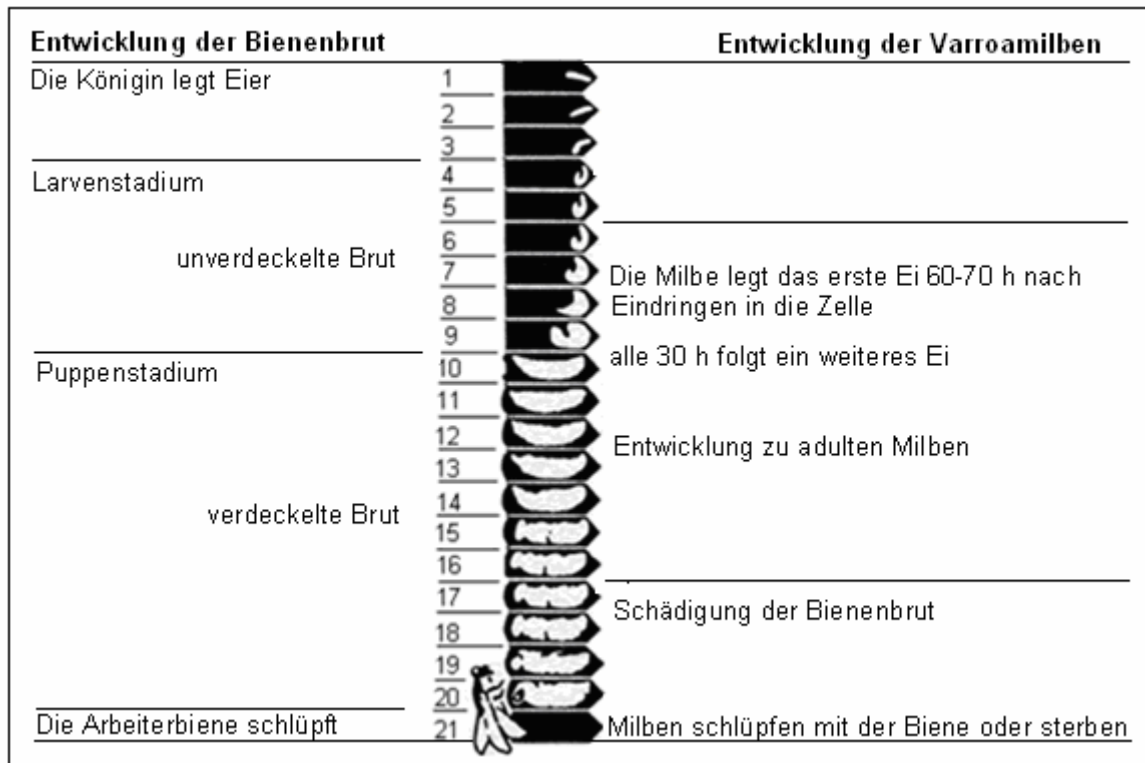
Als weitere mögliche Anreize für die Milbe werden aliphatische Alkohole und Aldehyde des Bienenkokons diskutiert (Rosenkranz 2009).

Der Fortpflanzungszyklus (Abb. 7):

Das adulte Milbenweibchen gelangt, am Hinterleib einer Biene angeheftet, zur Bienenbrut. Kurz bevor diese verdeckelt wird, lässt die Milbe sich von der Biene herab und in einer Wabenzelle "einschließen". Zu diesem Zeitpunkt befindet sich in der Brutzelle eine Bienenlarve, die 5 bis 5,5 Tage alt ist (De Jong 1982).

Ab dem Zeitpunkt der Vedeckelung der Brutzellen bleiben der Milbe für ihre Fortpflanzung nun noch 12 Tage in Arbeiterzellen und 15 Tage in Drohnenzellen (Martin 1998).

Abb. 7 Entwicklung von Wirt und Parasit (nach Sanford)



In der Wabenzelle schiebt sich die Milbe unter die Made und setzt sich in den Futtersaft (Abb. 8). Vermutet wird, dass die Milbe diese Stelle in der Zelle bewusst aussucht, um sich vor den Brutpflegenden Bienen zu schützen (Donzé 1998, Sammataro 2000).

Abb. 8 Varroamilbe im Futtersaft in der Wabenzelle



(Quelle: Donzé, 1998, „Hochorganisiertes Leben auf kleinem Raum: Fortpflanzung der Varroa-Milben“, Schweizerische Bienen-Zeitung)

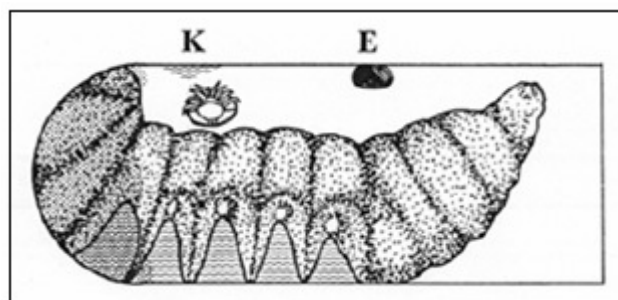
Sobald die Streckmade den Futtersaft verzehrt, befreit sich die Milbe in dem sie sich an der Made festklammert und sich aus dem Futtersaft ziehen lässt (Donzé 1998).

Als nächstes beginnt die Bienenmade sich einzuspinnen. Bei diesem Vorgang schiebt sich die Milbe zwischen Made und Kokon (Sammataro 2000). Anschließend sticht die Milbe die Bienenmade an und nimmt zum ersten Mal in dieser Wabenzelle Nahrung auf.

Als Nahrung dient die Hämolymphe. Durch deren Aufnahme wird die Eierstockstätigkeit der Milbe angeregt. Dieser erste Akt der Nahrungsaufnahme ist von enormer Wichtigkeit, weil dabei die Milbe ihren Fortpflanzungsablauf mit der Entwicklung der Biene synchronisiert (Boecking und Genersch 2008).

Die Milbe legt nun den Kotplatz fest. Sie setzt meist das Kotpaket an der Zelldecke, nahe der analen Zone der Vorpuppe, ab (Abb. 9; Donzé 1998, Calderón 2009). Dies ist ein wichtiger Orientierungspunkt für die Milbennachkommen, da dort die Paarung der jungen Milben stattfinden wird. Diese Festlegung steigert die Fortpflanzungseffizienz, da zum einen sichergestellt wird, dass die Weibchen auch befruchtet werden. Zum anderen können die Jungmilben durch Vermeiden unnötig langer Wege, oder gar Umwege, ihren Energieverbrauch niedriger halten.

Abb. 9 Wabenzelle mit Varroamilbe, Kotpaket (K) und dem ersten Ei (E)



(Quelle: Donzé, 1998, „Hochorganisiertes Leben auf kleinem Raum: Fortpflanzung der Varroa-Milben“, Schweizerische Bienen-Zeitung)

Nach ungefähr 60-70 Stunden (Infantidis 1983) legt die Milbe das erste Ei und klebt es an der Zelldecke fest (Abb. 9; Donzé 1998). Aus diesem Ei entsteht immer ein männlicher Nachkomme.

Das Larvenstadium der Milbe entwickelt sich binnen 24 Stunden, bleibt aber innerhalb des Eies (Akranakul 1976). Etwa 30 Stunden nach der Eiablage schlüpft bereits die Protonympe aus der Eihülle.

Dann bohrt die Muttermilbe ein Saugloch in die Kutikula der Bienenpuppe. Dies ist wichtig für die Protonymphen, da diese Stadien noch nicht in der Lage sind selbst ein Loch zu bohren. Ist die Protonympe hungrig, steigt sie zur Puppe ab und saugt Hämolymphe. Während der Wachstumsphase und auch im Adultstadium geschieht dies mehrmals.

Abb. 10 Zellinhalt nach Entfernen der Bienenpuppe (an der rechten Zellwand sind zwei adulte Milben zu sehen, in der Mitte am Zellboden drei Nymphenstadien)



(Quelle: http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures/misc/bees/varroa_mite.htm, University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences, Department of Entomology and Nematology)

Nach dem ersten Ei legt die Muttermilbe, im Abstand von im Mittel 30 Stunden, weitere Eier, die zu weiblichen Tochtermilben heranreifen (Rehm und Ritter 1989, Martin 1995).

Die Nachkommensfolge von nur einem Männchen und mehreren Weibchen ist sehr effizient, da kein Wettbewerb unter mehreren Männchen besteht. Steigender Wettbewerb kostet die Männchen Energie, was wiederum zu Lasten der Paarungshäufigkeit geht (Fuchs und Langenbach 1989).

Insgesamt legt die Muttermilbe bis zu sechs Eier (Steiner 1994, Martin 1995).

Die Geschlechtsreife tritt nach der letzten Häutung ein (Rosenkranz 2009), wobei das Männchen synchron mit dem ersten Weibchen dieses Stadium erreicht (Oldroyd 1999). Es beginnt unverzüglich das Weibchen zu begatten. Um den

Befruchtungserfolg seiner Schwestern zu erhöhen, erfolgt die Begattung mehrmals.

Erreicht die nächste Tochtermilbe das Adultstadium, wird diese dann mehrmals begattet (Donzé 1998b). Dieses Muster setzt sich fort, bis die Jungbiene schlüpft und die befruchteten Tochtermilben mitnimmt. In dieser Zeitspanne reifen meist nicht alle Tochtermilben bis zum Adultstadium und es werden auch nicht alle befruchtet.

Zum Zeitpunkt, bei dem die Augen der Bienenmade bereits dunkel gefärbt sind, kann man alle Milbenstadien in der Wabenzelle antreffen (Abb. 10; Infantidis 1983).

Bei der Begattung an sich tastet das Männchen die Bauchzone des Weibchens ab. Es richtet seine Chelizeren gegen seine eigene Geschlechtsöffnung und nimmt von dort ein Samenpaket auf, das es dann in die Geschlechtsöffnung des Weibchens einführt. Dabei wird ein Depot in der Samenblase angelegt. Von hier aus erreichen die Samenzellen später, wenn die Tochtermilbe einen neuen Fortpflanzungszyklus beginnt, die zu besamenden Eier (Donzé 1998b).

Die Paarung kann ausschließlich nur in der Zelle stattfinden, da das Männchen außerhalb der Zelle nicht überlebensfähig ist und mit dem Schlupf der Jungbiene stirbt.

Mit der Jungbiene verlassen sowohl Muttermilbe, als auch die Tochtermilben mit ihren Samenvorräten die Wabenzelle und werden zur nächsten Wabenzelle getragen, wo der nächste Zyklus beginnt.

Pro Muttermilbe sind es im Mittel 1-1,5 fortpflanzungsfähige Tochtermilben zum Zeitpunkt des Ausschwärmens der Arbeiterbiene (Donzé 1998). Bei Drohnenzellen gar 2-2,2 fortpflanzungsfähige Tochtermilben (Martin 1995, Oldroyd 1999).

Der Fortpflanzungserfolg der Varroamilbe sinkt in den Wabenzellen (ungeachtet ob Drohnen- oder Arbeiterzellen), bei steigendem Befall. Ist eine Drohnenzelle mit mehr als acht adulten Milben beziehungsweise eine Arbeiterzelle mit mehr als vier adulten Milben infestiert, so wird weniger als ein weiblicher Nachkomme produziert

(Fuchs 1992). Allerdings stellen einzelne Milben ihre Reproduktion nicht komplett ein, viel mehr fallen spätere Nachkommen aus. Dadurch hebt sich der Anteil an männlichen Milben in diesen Zellen deutlich an.

Folglich wird erwartet, dass rasch überfüllte Zellen nicht mehr oder nur unwesentlich zum weiteren Wachstum der Milbenpopulationen beitragen (Fuchs und Langenbach 1989).

2.1.8 Lebenserwartung der Varroen

Die adulten Weibchen leben im Sommer theoretisch ebenso lang wie ihre Bienenwirte, das heißt etwa drei bis acht Wochen. In Feldpopulationen wird das Durchlaufen von zwei bis drei Reproduktionszyklen als wahrscheinlich erachtet (Martin und Kemp 1997, Calderón 2009), danach sterben sie.

Die Milben können ohne ihren Wirt nicht länger als 18 – 70 Stunden (Sammataro 2000) überleben. Die Männchen, sowie weibliche Milben, die das Adultstadium vor dem Schlupf der Biene nicht erreicht haben, sterben in der leeren Wabenzelle. Noch Lebende werden von Arbeiterinnen sofort getötet und der gesamte Inhalt wird ausgeräumt (Calderón 2009).

Pro Jahr bringt eine Varroamilbe (in gemäßigten Zonen) zehn bis 15 Generationen hervor (Solignac 2005).

2.2 Parasit-Wirt-Beziehung

Bereits vor 5000 Jahren begannen die Ägypter mit der Bienenhaltung. Damals wurden sie noch in Tonröhren gehalten. Auch wenn die Biene nie im eigentlichen Sinne gezähmt wurde, markierte das den Zeitraum der „Domestikation“.

Als der Ausbau der Landwirtschaft mehr in den Vordergrund rückte, wurde auch der Bienenwirtschaft mehr Beachtung geschenkt.

Doch noch weiter als das Zusammenleben von Biene und Mensch, reicht ihr Zusammenleben mit Parasiten zurück.

2.2.1 Der Wirt: die Biene

Die Honigbiene gehört zu den sozialen Insekten, die Staaten bilden (Sammataro 2000). Im Gegensatz dazu stehen die Wildbienen, welche meist solitär leben.

Bienen sind taxonomisch in die Ordnung der Hymenoptera einzuordnen und zählen dort zur Familie der Apidae, von der sich die Honigbiene (*Apis*) abspaltet. Die Gattung *Apis* umfasst insgesamt neun bekannte Arten (Tab. 2). Mit Ausnahme von *Apis mellifera*, die früher nur in Europa, Afrika und im Nahen Osten vorkam, im Zuge der Bienenwirtschaft aber inzwischen weltweit verbreitet ist, sind alle Bienen in Asien beheimatet.

Von wirtschaftlicher Bedeutung ist in westlichen Regionen nur *Apis mellifera*.

Tab. 2 Die neun Arten der Honigbiene (*Apis*)

<i>Apis mellifera</i> Linnaeus	Europäische bzw. Westliche Honigbiene
<i>Apis cerana</i> Fabricius	Asiatische bzw. Östliche Honigbiene
<i>Apis dorsata</i>	Riesenhonigbiene
<i>Apis koschevnikovi</i>	Rote Honigbiene
<i>Apis nigrocincta</i>	
<i>Apis nuluensis</i> Tingek	Asiatische Bergbiene
<i>Apis florea</i> Fabricius	Zwerghonigbiene
<i>Apis laboriosa</i>	Kliffhonigbiene
<i>Apis andreisformis</i>	Zwergbuschbiene

Jedes Volk ist aus zwei „weiblichen“ Komponenten, der einzelnen Königin und den 20000 bis 50000 Arbeiterinnen (sterile Weibchen), und aus einem männlichen Anteil, den sogenannten Drohnen (Sammataro 2000), die zahlenmäßig allerdings mit circa 500 bis maximal 2000 Individuen weit hinter den Arbeiterinnen zurückstehen, aufgebaut.

Die gesamte Entwicklung in einer Wabenzelle erfordert bei der Königin rund 16 Tage, bei Arbeiterinnen 21 Tage und bei Drohnen 24 Tage.

Die Königin hat eine durchschnittliche Lebenserwartung von zwei bis drei Jahren. Sie ist das einzige vollentwickelte Weibchen im Bienenvolk (Wenseleers und Ratnieks 2006). Sechs bis zehn Tage, nachdem eine junge Bienenkönigin geschlüpft ist, geht diese, bei guter Witterung, auf den Hochzeitsflug, um sich auf

einem Drohnensammelplatz mit mehreren Drohnen zu paaren (Rosenkranz 2009). Deren Spermien bewahrt sie in ihrer Samenblase auf und „verwendet“ sie bis an ihr Lebensende. Die Paarung findet in der Luft, im Flug, statt. Eine Bienenkönigin kann pro Tag bis zu 1500 Eier legen.

Die Drohnen entstehen durch Parthenogenese. Dabei legt die Königin unbefruchtete Eier in die dafür bestimmten größeren Drohnenzellen.

Befruchtete Eier legt sie in die kleineren Wabenzellen. Daraus bilden sich dann die Arbeiterinnen. Zu gegebener Zeit muss auch eine neue Königin nachgezogen werden, dafür sind die großen, sogenannten Weiselzellen bestimmt. Bedeutsamer für die Entwicklung der Königin als die Zellengröße, ist die Fütterung der Bienenmade. Verliert ein Volk seine Königin, sinkt auch die Konzentration der von ihr gebildeten Königinnensubstanz (*queen mandibular pheromone*, QMP). Das führt zu rapiden Veränderungen im Stock und die Arbeiterinnen beginnen sofort eine neue Königin nachzuziehen, indem sie die Zukünftige während ihrer gesamten Entwicklungszeit mit hochwertiger Nahrung, dem Gelee royal, versorgen. Das Gelee royal ist entscheidend für die Entwicklung der Eierstöcke.

Die Lebenserwartung der Drohnen beträgt fünf Monate. Ihre einzige Aufgabe ist es, die Königin auf ihrem sogenannten Hochzeitsflug zu begatten. Nach dem Akt der Begattung ist ihr Lebenszweck erfüllt.

Diejenigen, die die Möglichkeit hatten die Königin zu begatten, sterben bei der Kopulation. Die restlichen Drohnen werden im Hochsommer in der sogenannten Drohnenschlacht getötet. Da die Nahrung in dieser Zeit knapper wird und Drohnen für das Bienenvolk unnütz geworden sind, werden sie von den Arbeiterinnen ausgehungert, vertrieben oder gar abgestochen. Männliche Tiere besitzen keinen Giftstachel und können sich daher gegen die Angriffe nicht wehren.

Arbeiterinnen leben sechs bis acht Wochen. Ihre Aufgaben sind äußerst vielfältig, aber auch altersabhängig. Junge Arbeiterinnen sind in den ersten Lebenstagen allein dafür zuständig die Königin zu füttern und zu pflegen (Galizia 2007).

Ältere Arbeiterinnen sammeln Pollen, Nektar und Wasser, betreiben Brutpflege, und verteidigen den Stock bei vermeintlicher Gefahr. Sie sorgen darüber hinaus dafür, dass Pollen und Honig immer im Überfluss vorhanden sind. Sollten die

Sammlerinnen witterungsbedingt nicht ausfliegen können, greifen sie auf ihre eingelagerten Vorräte zurück.

Das Klima im Stock wird hauptsächlich von ihnen bestimmt, da sie für eine beinahe konstante Temperatur von 35°C, während der Vegetationszeit, und für konstante Feuchtigkeit sorgen, unabhängig äußerer Wetterbedingungen.

Dafür besitzen sie eine kräftige Flügel- und Thoraxmuskulatur. Durch Flügelbewegungen und Vibration kann so Wärme erzeugt, oder für Ventilation und damit Kühlung gesorgt werden.

Bei Temperaturen unter 10°C erstarren Bienen und sterben. Es gibt aber in der kalten Jahreszeit die sogenannten Winterbienen, die mehrere Monate (sechs bis acht Monate) überleben können, und deren einzige Aufgabe es ist den Stock zu „beheizen“. Während dieser Kälteperioden, schwärmen Arbeiterinnen, um die Königin herum, um die während dieser Zeit gelegten Eier zu inkubieren.

2.2.2 Zusammenleben von Wirt und Parasit

Bienen sind Wirte einer Vielzahl von Milben. Neben etwa 100 meist harmlosen Milbenspezies entwickelten sich wenige davon zu echten Parasiten.

Im Fall der Familie der Varroidae gar zu spezialisierten Brutparasiten (Oldroyd 1999). Dadurch ist die Milbe in ihrer Biologie fest an den Lebenszyklus ihres Wirtes gebunden, was ihr auch einige Vorteile einbringt.

So stellt die Brutzelle eine ideale Umgebung für die Reproduktion dar. Bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit, leicht zugänglicher Nahrungsquelle und Schutz vor Feind- und Konkurrenzspezies, kann sich die Milbe nahezu ungestört vermehren (Donzé und Guerin 1994).

Varroa destructor richtet, dank eines ausgeglichenen Parasit-Wirt-Verhältnisses, bei ihrem ursprünglichen Wirt kaum Schaden an (Martin 1995). Eine mögliche Erklärung hierfür besteht in der co-evolutionären Beziehung zwischen *Varroa destructor* und *Apis cerana*. Die Milbe hat sich mit der Biene mitentwickelt und Letztere hat sich an ihren Parasit angepasst, um ihn unter Kontrolle zu halten

(Oldroyd 1999, Rath 1999). Im Gegensatz dazu kann *Apis mellifera* nicht von einer langen Beziehung zur Milbe profitieren (Delfinado-Baker und Houck 1989).

So haben De Jong und Soares (1997) festgestellt, dass die Problematik der Varroose in Regionen mit gemäßigttem Klima am stärksten ist. Also in den Regionen, in denen *Apis mellifera* beheimatet ist.

Gründe für den unterschiedlichen Verlauf der Varroose liegen im Wesen der verschiedenen Bienenarten.

Apis cerana ist in der Lage befallene Wabenzellen zu erkennen und sofort auszuräumen („hygienic behavior“). Desweiteren haben adulte Bienen gelernt sich aufmerksam gegenseitig von Milben zu säubern („grooming behavior“).

Diese Gegenmaßnahmen fehlen bei *Apis mellifera*, oder werden in weitaus geringerem Maß betrieben.

Ein weiterer wichtiger Faktor besteht darin, dass sich die Varroamilbe bei *Apis cerana* ausschließlich in der Drohnenbrut reproduziert (Delfinado-Baker und Houck 1989). So liegt die mengenmäßig starke Vermehrung bei *Apis mellifera* mitunter daran, dass sich *Varroa destructor* auch erfolgreich in der Arbeiterbrut reproduzieren kann. Dies führt zu einem exponentiellen Anstieg der Milbenpopulation (Oldroyd 1999). Dazu sei bemerkt, dass die Drohnenbrut mit 5-10% nur einen kleinen Anteil eines Bienenvolkes ausmacht. Was der Grund dafür ist, dass die Milbenvermehrung in Drohnenzellen nur wenig Einfluss (mit Ausnahme von der initialen Besiedlung eines Bienenvolkes) auf die Populationsdynamik der Milbe hat (Martin 1995).

Delfinado-Baker und Houck (1989) führen als weitere Eigenschaft, die sich kontrollierend auf die Milbenreproduktion auswirkt, eine kürzere Entwicklungszeit von *Apis cerana* nach der Verdeckelung, an. Das bedeutet für die Varroamilbe, dass weniger fortpflanzungsfähiger Nachwuchs produziert wird.

2.2.3 Pathogenese und Pathologie

Die Milbe (Abb. 11) schädigt sowohl die Brut, als auch die adulten Bienen, direkt durch die Nahrungsaufnahme, oder indirekt durch Übertragen weiterer Pathogene.

Abb. 11 Drohnenmaden (links) und adulte Arbeiterin (rechts) mit multiplem Varroabefall



(Quelle: Universität Hohenheim, Institut für Bienenkunde; Eva Frey)



(Quelle: Dr. Pohl, Varroose erkennen und erfolgreich behandeln; Dr. Pia Aumeier)

2.2.3.1 Schaden der einzelnen Biene

Der Verlust von Hämolymphe, durch den Saugakt, hat für die Biene negative Auswirkungen auf die Organausbildung (Boecking und Genersch 2008). Von einer verkürzten Lebensdauer ist auszugehen. Die Jungbienen schlüpfen mit mehr oder weniger stark verkrüppelten Extremitäten (Abb. 12; Sammataro 2000), vor allem dann wenn die Zellen mit vielen Milben belegt sind. Außerdem kommt es bei den schlüpfenden Bienen zur Gewichtsreduktion (De Jong 1982).

Indirekter Schaden entsteht durch Immunsuppression (Gregory 2005) und zusätzlicher Übertragung viraler Infektionserreger, wie beispielsweise das *kashmir bee virus*, das *sacbrood virus* oder das *deformed wing virus* (Boecking und Genersch 2008).

Varroa destructor beeinflusst auch das Flugverhalten und das Orientierungsvermögen der Trachtbienen (Kralj 2007). Parasitierte Trachtbienen zeigen eine vermehrte Abwesenheit und eine niedrigere Rückkehrate zum Volk. Vermehrtes Verfliegen der Bienen wird also begünstigt. Das kann als Vorteil für die Milbe gewertet werden, da es ihrer weiteren Verbreitung dient, kann aber auch als Vorteil für das Bienenvolk gesehen werden, da sich so befallene Bienen im Stock automatisch reduzieren.

Besonders bemerkt sei, dass die Milbe nie den Kopf oder die Brustsegmente zum Hämolymphe saugen ansticht, sondern meist nur eine Stelle am Hinterleib (Donzé 1998) nutzt. Das verhindert möglicherweise größere Schäden in den Entwicklungsstadien und es bleibt gewährleistet, dass die Biene bei ihrem Schlupf flugfähig ist und die Milbe weitertragen kann. Die Milben haben also nicht das Bestreben ihren Wirt zu töten, da sie auf den Transport durch die Biene zur nächsten Zelle, angewiesen sind. Erst bei starker Parasitenbürde kommt es zum Absterben der immaturen Biene in der Wabenzelle.

Abb. 12 Frischgeschlüpfte Biene mit deformierten Flügeln



(Quelle: Dr. Pohl, Varroose erkennen und erfolgreich behandeln; Dr. Michael J. Traynor)

2.2.3.2 Schaden des Bienenvolks

Bei niedriger Befallsintensität sind die Schäden am Bienenvolk gering und werden oft nicht bemerkt, sofern der Imker nicht gründlich nach toten Milben am Beutenboden, zwischen dem restlichen Debris, sucht.

Bei moderatem Befall reduziert sich zwar das Bienenvolk und auch der Honigertrag sinkt ab, augenscheinliche klinische Symptome sind aber immer noch nicht vorhanden.

Erst bei starkem Befall entstehen schwache Völker mit ungleichmäßiger Brut (Sammataro 2000). Die Verteilung der Milbe auf befallenen Waben ist meist flächenweise gehäuft (Le Conte 1989, Donzé 1996, Maggi 2009), so dass in vielen Zellen keine oder nur wenige Milben sind, es an manchen Stellen der Wabe allerdings auch Zellen mit hoher Parasitenbürde gibt. Diese beherbergen Bienen, die entweder schon abgestorben oder zu schwach zum Schlüpfen sind. Die Wabendeckel bleiben somit geschlossen.

Das Volk wirkt insgesamt unruhig und fliegende Bienen wirken gereizt. Es kommt zu starkem Leistungsabfall und es gibt mehr unfruchtbare Drohnen. Parasitierte Drohnen begatten die Königin in weitaus geringerer Zahl, dadurch sinkt die Rate der Arbeiterinnennachkommen und das Bienenvolk reduziert sich von allein.

Im Endstadium zeigt sich dann der Niederbruch des Volkes mit ausgeprägter Klinik, vor allem durch großflächige Anteile nicht geschlüpfter Brut und geringerer Bienenzahl pro Volk, bis zur totalen Auslöschung. Wobei dieses Stadium nicht durch die Infestation mit der Milbe allein oder selbst entsteht, sondern eher durch sekundäre Viruserkrankungen (Rosenkranz 2009), die erst durch die Immunsuppression des Volkes, aufgrund der Varroose, aufblühen können.

Die Übergänge der Varroose-Bilder sind, abhängig von der Befallsintensität, fließend.

Wie De Jong (1982) feststellte sind normalerweise alle Völker einer Imkerei, allerdings nicht alle gleichstark, betroffen. Schwache oder Königinnen-lose Völker sind weitaus stärker befallen.

2.3 Markergestützte Ermittlung von DNA-Varianten

In der Genetik bezeichnet man das Auftreten einer DNA-Variante in einer Population als Polymorphismus. In Bezug auf einen Locus spricht man bei DNA-Varianten von Allelen.

Durch Genotypisieren (oder auch Haplotypisieren) lassen sich die Polymorphismen von Individuen innerhalb einer Population detektieren.

Polymorphismen kann man der Einfachheit halber in zwei Gruppen unterteilen:

- SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)
- VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats; Mikrosatelliten)

Bei SNPs stellen sich die Varianten immer biallel dar, während bei Mikrosatelliten auch mehr als zwei Allele beobachtet werden (Geldermann 2005).

2.3.1 Mikrosatelliten

Schon in den siebziger Jahren kannte man repetitive Abfolgen kurzer Nukleotidsequenzen. Diese Abschnitte im Genom werden als Satelliten-DNA bezeichnet (Hamada 1982, Tautz und Renz 1984, Tautz 1986). Zu ihrem Namen ist sie gekommen, weil sich diese Abschnitte bei der Dichtegradientenzentrifugation als kleine Satelliten-Banden abtrennen lassen.

Abhängig von ihrer Gesamtgröße werden die Satelliten in Midisatelliten (wenige Hundert Kilobasen), Minisatelliten (wenige Kilobasen bis Hundert Kilobasen) und Mikrosatelliten (ein paar Dutzend Nukleotide) unterteilt (Mariat 1992).

Seither haben sich Mikrosatelliten zu einem der populärsten genetischen Marker entwickelt (Schlötterer 2000)

2.3.1.1 Entstehung und Funktion

Ihre Entstehung ist nicht abschließend geklärt. Verschiedene Autoren vermuten anhand ihrer Untersuchungsergebnisse, dass die Entstehung von Mikrosatelliten auf „DNA-slippage“ und damit verbunden auf „DNA-mispairing“ zurückzuführen ist. Das Prinzip besteht darin, dass, zunächst auf kleine Sequenzeinheiten begrenzt, eine Denaturierung des DNA-Doppelstrangs erfolgt. Durch Verrutschen der Polymerase am repetitiven Strang kommt es zum fehlerhaften Nukleotideinbau. Als Konsequenz dieser Fehlpaarung folgt dann eine Deletion oder Insertion von

einem oder mehreren sich wiederholenden Sequenzmotiven (Tautz 1986, Levinson 1987, Schlötterer und Tautz 1992, Bruvo 2004).

Gordenin et al. (1997) gehen davon aus, dass die Okazaki-Fragmente Haarnadelstrukturen oder gar Sekundärstrukturen ausbilden. Die Bildung von Haarnadelstrukturen hat als Ergebnis eine Deletion der Sequenz. Bei einem neu synthetisierten Strang der nach Dissoziation an anderer Stelle wieder an der selbigen DNA-Matrize bindet und die DNA-Synthese fortgesetzt wird, kommt es zur Expansion.

Außerdem werden ungleiche Aneinanderlagerungen der Chromosomenstränge beim Crossing-over während der Replikation diskutiert (Smith 1976, Tautz und Renz 1984, Tautz 1986, Levinson 1987, Tautz 1989).

Über die biologische Funktion ist nichts bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass die Genexpressionsregulierung (Tautz 1986, Naylor 1990, Kashi 1999) zu den Aufgaben der Mikrosatelliten gehört. Da man allerdings auch weiß, dass man Mikrosatelliten ebenso in Genomregionen findet, die keiner starken Selektion unterworfen sind, schreiben Tautz und Renz (1984), dass man Mikrosatelliten keine generelle Funktion hinsichtlich der Genexpression unterstellen kann.

Laut Pennisi (1998) dienen sie als „hot spots“ für die Rekombination. So wird durch vermehrte und an bestimmten Stellen im Genom häufiger auftretende Mutationen, die Effizienz der Evolution gesteigert.

2.3.1.2 Aufbau

Mikrosatelliten sind DNA-Sequenzen von tandemartig wiederholten Basenmotiven (deshalb werden sie auch „short tandem repeats“, STRs, genannt). Die Motive in einem Mikrosatelliten sind sehr einfach strukturiert und bestehen meist aus ein bis sechs Nukleotiden.

Mikrosatelliten sind gleichmäßig im Genom als zwischengeschobene Wiederholungssequenzen (Tautz 1989) verteilt, zumeist jedoch in nichtkodierenden Regionen angesiedelt.

Durch ihre Tendenz Wiederholungseinheiten zu bilden oder zu entfernen entsteht eine hypervariable Längenverteilung. Dieser ausgeprägte Längenpolymorphismus (VNTR) ist hilfreich bei der Untersuchung von Verwandtschaftsgraden von Individuen innerhalb und zwischen Populationen (Tautz 1989).

Variationen von Größe und Anzahl der Wiederholungseinheiten lassen sich nicht nur im Kerngenom, sondern auch im mitochondrialen Genom feststellen (Navajas 2002).

2.3.1.3 Darstellung

1984 beschrieben Tautz und Renz, dass die Anzahl der Wiederholungseinheiten innerhalb eines Mikrosatellitenlocus von Individuum zu Individuum unterschiedlich sein kann. Das macht Mikrosatelliten als genetische Marker so geeignet (Litt und Luty 1989, Tautz 1989, Schlötterer 2000).

Die methodische Grundlage zur Darstellung von Mikrosatelliten ist die enzymatische Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis 1986). Führt man die PCR mit DNA verschiedener Individuen durch, erhält man verschieden große PCR-Produkte. Diese unterscheiden sich in der Regel um mindestens zwei Basenpaare, was einer Wiederholungseinheit entspricht. Die unterschiedlich großen Fragmente werden auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und, bei Einsatz farbmarkierter Primer, gleichzeitig sichtbar gemacht (Chehab und Kan 1989).

2.3.2 „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs)

Die Variabilität im Genom kann auch von Sequenzabweichungen eines einzelnen Nukleotids an einem bestimmten Locus bestimmt sein, welche als Einzelnukleotid-Polymorphismen, oder auch „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs),

bezeichnet werden (Landegren 1998). Sie stellen die häufigsten DNA-Veränderungen dar.

Eine frühere Definition erklärte erst dann eine Variation zu einem SNP, wenn die Allelfrequenz der häufigeren Variante in einer Population unter 99% liegt (Landegren 1998), also mindestens 1% der Population von der gleichen Abweichung betroffen ist. Sonst spricht man lediglich von einer Mutation.

Diese Definition wird inzwischen nicht mehr so eng gesehen, da in SNP-Datenbanken (wie zum Beispiel dbSNP) diese Voraussetzung nicht immer erfüllt wird und es SNPs mit Allelfrequenzen gibt, die niedriger als 1% sind (Wheeler 2007).

Die meisten SNPs sind in nichtkodierenden Regionen des Genoms lokalisiert und haben keine direkt bekannte Auswirkung auf den Phänotyp eines Individuums (Syvanen 2001). Es gibt aber auch welche, die in kodierenden Regionen (in den Genen) angesiedelt sind und letztlich, durch den Basenaustausch, zur Bildung einer anderen Aminosäure führen können (Landegren 1998), was wiederum die Zellfunktion erheblich beeinflussen kann.

Ihre wissenschaftliche Bedeutung liegt im häufigen Auftreten (Syvanen 1999), der hohen Variabilität und in dem wichtigen Vorteil, dass sie relativ geringe Mutationsraten aufweisen. Die Eigenschaft ihrer langsamen Entstehung macht sie stabiler als Mikrosatelliten (Landegren 1998). Dazu kommt, dass sie technisch einfach nachgewiesen werden können, was sie als genetische Marker, vor allem in der Populationsgenetik und für Evolutionsstudien (Syvanen 1998, 2001), sehr nützlich macht.

2.3.2.1 Entstehung

Eine Mutation ist eine dauerhafte Veränderung des Erbgutes. Bei SNPs handelt es sich um eine Punktmutation, weil jeweils nur eine Base verändert wird. Dabei kann diese Veränderung durch eine Substitution, Insertion oder auch Deletion bedingt sein (Strachnan und Read 2005).

Je nachdem, wo die Mutation ansetzt, können sich unterschiedliche Konsequenzen für das Individuum ergeben. Es kann sich um eine stille Mutation handeln, bei der zwar die Basensequenz verändert wird, sofern diese aber für eine identische Aminosäure kodiert, ergibt sich das gleiche Protein und es entstehen keine Auswirkung auf den Organismus. Es können sich auch negative Folgen ergeben, wie beispielsweise letale Mutationen oder welche, die zu Erbkrankheiten führen. Aber auch positive Folgen, die zur Weiterentwicklung im Sinne der Evolution führen.

2.3.2.2 Darstellung

Der Nachweis von SNPs erfolgt im Allgemeinen durch die DNA-Sequenzierung (Strachnan und Read 2005). Dabei wird die Abfolge der Nukleotide und somit die komplette Sequenz ermittelt. Das hat den Vorteil, dass man nicht nur um das Vorhandensein, der Variante weiß, sondern auch weiß wie die Basenabweichung aussieht.

Weitere Darstellungsmöglichkeiten sind beispielsweise die RFLP-Analyse (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus), wobei die Variante erkannt wird, wenn sie im Bereich der Erkennungssequenz für die Schnittstelle sitzt. Oder eine Allel-spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung wie sie bei einem DNA-Array genutzt wird.

2.4 Populationsgenetik

Die Aufgabe der Populationsgenetik besteht in der Untersuchung der genetischen Struktur einer Population. Dabei befasst sie sich mit der Auswirkung der Mendelschen Gesetze auf die Zusammensetzung einer Population (Tariverdian und Buselmaier 2004) und erfasst die Änderung der Populationsstruktur (Nei 1987).

Diese Änderung steht unter dem Einfluss von vier Evolutionsfaktoren: Selektion, Gendrift, Mutation und Genfluß (Migration).

Ein wichtiges Werkzeug in der Populationsgenetik ist die Bestimmung der Allelfrequenzen (Nei 1987) und Genotypen.

Auch die Erfassung, wie variabel sich die Genetik innerhalb einer Population oder auch einer Subpopulation verhält, spielt eine wichtige Rolle. Ein Maß für die genetische Variabilität ist der Heterozygotiegrad h (Nei 1973), der bei Populationen, die dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht unterliegen, den Anteil heterozygoter Individuen angibt. Bei starker Inzucht weicht eine Population vom Hardy-Weinberg-Gesetz ab, dann wird der Heterozygotiegrad als die Wahrscheinlichkeit, dass zwei zufällig gewählte Gene unterschiedliche Herkunft haben (Nei 1987), bezeichnet.

Mit Hilfe der genetischen Variabilität, können Aussagen über Einflüsse in der Vergangenheit auf die genetische Zusammensetzung einer Population, gemacht werden. Die Genhäufigkeiten und damit die beiden homozygoten Genotypen (AA, aa) und der heterozygote Genotyp (Aa) bleiben, laut Mendelscher Gesetze, innerhalb einer Population konstant, sofern keine Auslese oder Inzucht beteiligt ist. Durch Abweichungen können starke Selektionseinflüsse oder Ereignisse, die Schwankungen in der Populationsgröße oder -zusammensetzung bedingen, wie zum Beispiel der Flaschenhalseffekt oder der Gründereffekt, nachvollzogen werden (Chakraborty und Nei 1977).

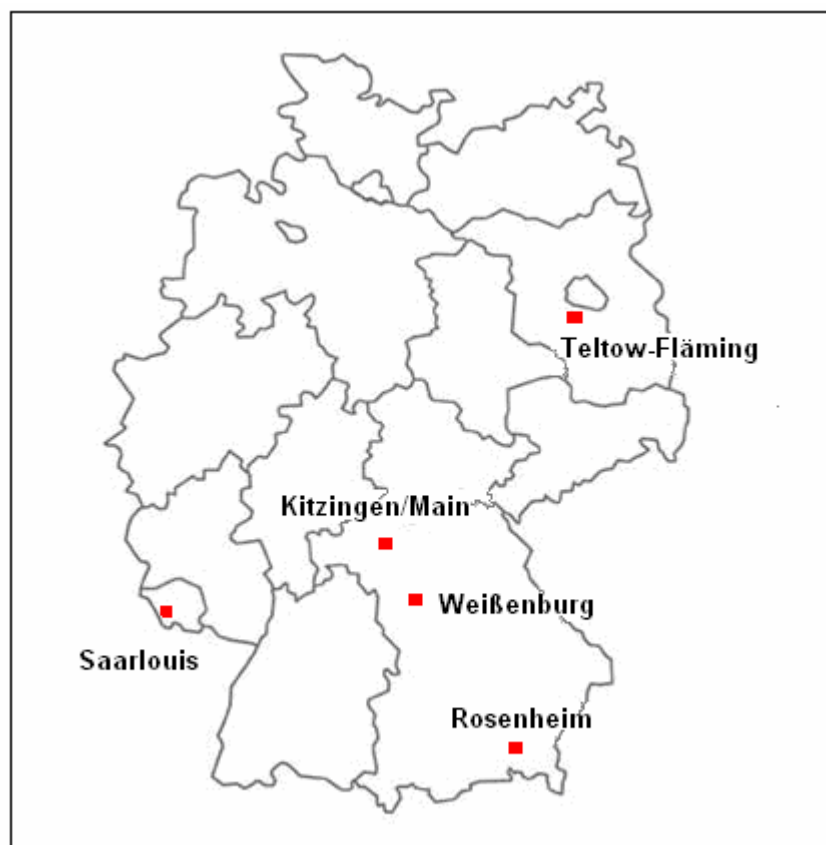
3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

Das Probenmaterial besteht aus insgesamt 872 Milben. Diese wurden von fünf Imkereien aus verschiedenen geographischen Regionen in Deutschland gesammelt (Abb. 13). Pro Imkerei wurden drei bis fünf Waben gezogen, die für jeweils ein Volk und einen anderen Standort stehen. Bei jeder Wabe wurden mindestens 20 mit Varroa befallene Zellen geöffnet und der gesamte Inhalt entnommen.

Abb. 13 Geographische Verteilung der Bienenstandorte



Legende: 1. Landkreis Kitzingen/Main (Regierungsbezirk Unterfranken)
2. Lkr. Rosenheim (Oberbayern)
3. Lkr. Saarlouis (Saarland)
4. Lkr. Teltow-Fläming (Brandenburg)
5. Lkr. Weißenburg (Mittelfranken)

3.1.2 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Alle für die Analysen verwendeten Chemikalien und Reagenzien werden nachfolgend, mit Angabe des Herstellers, aufgeführt.

Agarose (Seakem LE) (Biozym)
Alconox Powdered Orecision Cleaner (Alconox Inc.)
APS (Roth)
Borsäure (pulv.) (Roth)
Chloroform (Roth)
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) (peqLab)
Dextranblau (Sigma)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Roth)
Ethanol (70%ig) (Roth)
Ethanol (100%ig) (Roth)
Formamid (Sigma)
GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega)
Hot FIREPol® DNA Polymerase (Eutectic)
Isoamylalkohol (Roth)
Magnesiumchlorid (Solis BioDyne)
Natriumacetat (Roth)
Natriumchlorid (Roth)
NF Acrylamid (30%) (Roth)
NF Harnstoff (Roth)
Oligonukleotide (MWG Biotech)
Phenol (Roth)
Proteinase K (Roth)
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1) (Roth)
Salzsäure (Roth)
TEMED (Invitrogen)
Tris-hydroxymethyl-methylaminohydrochlorid (Roth)
Triton-X-100 (Roth)
Wasser (double processed tissue culture water) (Sigma)

3.1.3 Puffer und Lösungen

Angabe der verwendeten Puffer und Lösungen und ihrer Zusammensetzung:

ABI Puffer

10 x TBE 140 ml

ad 1400 ml Wasser

Agarosegel-Lösung (2%ig)

Agarose 1 g

TBE-Puffer 50 ml

Formamid-Blaupuffer

Dextranblau 10 mg

Formamid 1 ml

Gel-Lösung zur vertikalen Gelelektrophorese (ABI 377)

Harnstoff 33,6 g

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 10,66 ml

10 x TBE-Puffer 8 ml

ad 80 ml Wasser

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung

Phenol 25 ml

Chloroform 24 ml

Isoamylalkohol 1 ml

TBE-Puffer (für 1 L)

Tris 60,57 g

Borsäure 30,89 g

EDTA 3,72 g

TET-Puffer

Tris-HCl 50 mM

EDTA 25 mM

NaCl 100 mM

TritonX-100 0,4%

3.1.4 Verbrauchsmaterial

Angabe verwendeter Verbrauchsmaterialien:

Kimwipes (Kimberly-Clark)

Klebefolie für 96-well Platten (Adhesive PCR film)(ABgene)

Microcon® Centrifugal Filters (Millipore)

Pipettenspitzen (10, 20, 100, 200, 1000 µl, mit und ohne Aerosolfilter) (Biozym)

Pipettenspitzen mit abgeflachter Spitze (Applied Biosystems)

Reaktionsplatten, Thermo-Fast 96 wells (ABgene)

Tubes (1,6 ml, easy-open und mit Kugelsicherheitsverschluß) (Biozym)

Verdünnungsplatten (Biozym)

3.1.5 Geräte

Auflistung aller benutzter technischer Geräte, mit Angabe des Herstellers:

ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems)

Brutschrank (Mettler)

Electronicrührer Mono (Variomag®)

Flow (Hohenloher)

Kaltlichtlampe KL 200 LED (Schott)

Kaltlichtlupenleuchte LTS-131-CD (McVoice Lichttechnik)

Magnetrührer Yellow line (MSH basic)

NanoDrop®, ND-1000 Spectrophotometer (peqLab, Biotechnologie GmbH)

Pipetten (Rainin, Gilson, Abimed, Eppendorf)

Thermocycler PTC-100™, Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.)

Thermocycler DNA Engine®, Peltier Thermal Cycler (BioRad)

Tischwaage (Sartorius analytic)

Tischzentrifuge (Bachofer)

UV Crosslinker (Hoefer)

Vortexer (Bachofer, peqLab)

Zentrifuge Universal 320R (Hettich)

Wasseraufbereitungsanlage arium® 611VF und arium® 61316 (Sartorius stedim biotech)

3.1.6 Software

Auflistung der verwendeten Software, mit Angabe der Quelle beziehungsweise des Entwicklers:

ABI PRISM GeneScan® (Applied Biosystems)

ABI PRISM GenoTyper® (Applied Biosystems)

Beacon Designer Free Edition (www.premierbiosoft.com/qOligo.jsp) (Premier Biosoft International)

DNA sequence Reverse and Complement

(http://www.cellbiol.com/scripts/complement/reverse_complement_sequence.html)

Input Primer3 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer>) (Whitehead Institute for Biomedical Research)

Nanodrop-Software (peqLab)

Paradox-Datenbank (Borland)

WWW2HUSAR (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/>)

3.2 Methoden

3.2.1 Probennahme und –aufbewahrung

Die Probennahme wurde im Sommer 2009 durchgeführt.

Die gesamte Wabe wurde direkt nach der Entnahme aus der Bienenbeute über Nacht tiefgefroren.

In angetautem Zustand wurde der Deckel der Wabenzelle mit Hilfe eines Skalpells abgenommen und die Biene vorsichtig mit der Pinzette aus der Wabe gezogen. Anhaftende Milben wurden mit der Pinzette abgestreift und die Wabenzelle auf weitere Milben untersucht. Die Milben wurden einzeln in Tubes verbracht und sorgfältig mit dem Standort, der Volk- beziehungsweise Wabennummer und der fortlaufenden Milbennummer beschriftet.

Die Probenaufbewahrung erfolgte bis zur Weiterverarbeitung tiefgefroren bei -20 °C.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 DNA-Präparation

Für die Isolierung der DNA aus einzelnen Milben wurde eine kombinierte Methode gewählt. Zuerst wurde zur Freisetzung der Nukleinsäuren ein Proteinase-K-Verdau durchgeführt, dann mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung die DNA, durch Denaturieren von Proteinen, aufgereinigt. Und zuletzt erfolgte ein weiterer Aufreinigungsschritt durch Ethanol-fällung, wobei die DNA von weiteren Lösungsbestandteilen (Oligonukleotide, Proteine) getrennt wird.

Bei der Durchführung wurden zuerst die einzelnen Milben in je einem Tube zermörsert.

Zu diesem Pulver wurden 400 µl TET-Puffer und anschließend noch 5 µl (20mg/ml) Proteinase-K zugegeben. Das Enzym spaltet die Peptidbindungen in Biomembranen, was zur Freisetzung von Nukleinsäuren führt. Nach sorgfältigem Mischen wurden die Proben zwei Stunden lang bei 50°C im Brutschrank inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben und mit 14000 rpm 20 Minuten lang zentrifugiert. Dadurch stellt sich in dem Tube eine Phasenverteilung ein, bei der sich die Phenolphase unten und die wässrige Phase mit der DNA oben befindet. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein neues Tube überführt.

Im Anschluss erfolgte dann eine Ethanolfällung. Dafür wurden 30 µl 3 M Natriumacetat zugegeben und gründlich mit dem Schüttelmixer gemischt. Zu diesem Gemisch wurde noch 1 ml 100%iges Ethanol hinzupipettiert und 20 Minuten mit 14000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgegossen, in selbiges Tube 1 ml 70%iges Ethanol gegeben und erneut für 10 Minuten zentrifugiert (14000 rpm). Wieder wurde der Überstand abgegossen und das Pellet im Brutschrank bei 65°C ca. 30 Minuten getrocknet.

Zum Schluss wurde die DNA mit 30 µl Wasser resuspendiert.

3.2.2.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Ermittlung des DNA-Gehalts und der Reinheit, durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm, erfolgte mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.

Die gewonnenen DNA-Proben wurden mit Wasser verdünnt und dabei standardmäßig auf eine Konzentration von 15 ng/µl eingestellt.

Die DNA-Stocklösungen wurden bei -20°C und die für die PCR hergestellten Verdünnungslösungen bei +4°C, bis zur weiteren Verwendung, gelagert.

3.2.2.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Qualität

Grundlage hierfür ist die Messung der Optischen Dichte (OD). Aus dem Verhältnis, auch Ratio genannt, der OD_{260nm} und der OD_{280nm} erhält man eine Aussage über die Qualität der DNA-Proben (Mühlhardt 2006).

Wie Marmur et al. (1961) angeben, kann man bei Ratio-Werten zwischen 1,7 und 2,0 eine angemessene Reinheit für die DNA annehmen.

Liegen die Werte über 2,0 sind die Proben in der Regel durch RNA verunreinigt. Bei Werten unter 1,7 besteht eine Verunreinigung durch Proteinreste.

3.2.2.4 Mikrosatellitenanalyse

3.2.2.4.1 Auswahl geeigneter Mikrosatelliten-Marker im Kerngenom

Am Anfang der Mikrosatellitenanalyse stand die Auswahl von geeigneten Markern. Als Grundlage wurden bekannte Mikrosatellitensequenzen hergenommen, die von Solignac et al. (2003) bereits sequenziert und veröffentlicht wurden. Diese Sequenzen sind in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter der in Tab. 3 angegebenen Accession number verfügbar.

Speziell für diese Mikrosatelliten hat oben genannte Arbeitsgruppe ebenfalls Primersequenzen veröffentlicht. 13 von diesen Markern wurden mit ihren zugehörigen Primerpaaren für die vorliegende Arbeit verwendet und zunächst auf ihr Funktionieren getestet. Aus unbekannten Gründen ist die Amplifikation dreier Marker in unserem Labor fehlgeschlagen (VD001, VD152, VD154). Einer von diesen (VD001) konnte mittels eigenem Primerdesign neu erstellt und optimiert werden und fand so in dieser Arbeit noch Anwendung, woraus sich eine Gesamtzahl von eingesetzten 14 Markern ergibt.

Tab. 3 Marker mit Primersequenz, Accession number, Label und Größe, die für die Mikrosatellitenanalyse verwendet wurden

MarkerID	PrimerID	Sequenz	Mikrosatelliten Accession no.	Label	bp
VD001	VD001_2F	CCCGCGAACGAAATAAATAG	AJ558164	Fam	151
	VD001_1	CCTACGGTGCTCGTATCCTC			
VD015	VD015F_H	GCGCAAACCTTAACGCTCG	AJ558165	Hex	144
	VD015R	TCAAGCCAGAGTGCTGCAG			
VD016	VD016F_H	TCATGCACTACGACGAAGGC	AJ558166	Hex	268
	VD016R	ACGTTTATGCATGCACAAATACG			
VD109	VD109F_F	ACGAAAATGTAGCAGACATACACAC	AJ558167	Fam	134
	VD109R	CCGAAACTTTGCGTTCTGAAC			
VD112	VD112F_T	TAACATATGGCCTAGCGACGG	AJ558168	Tet	142
	VD112R	CGTCGCTCATTATGGAACG			
VD114	VD114F_F	GCAGATTAGGAAGAATAAGCCG	AJ558169	Fam	218
	VD114R	CTCATACGACACTTGCCATAGG			
VD115	VD115F_H	GGCGAAGTTAGTGCACCG	AJ558170	Hex	116
	VD115R	AGCTGTTATAAGCAGTTCTTCGG			
VD119	VD119F_F	CACTGTTACGTTACAATTAAGCACG	AJ558171	Fam	117
	VD119R	TCTTGATCCCAAATGTAATTAGAGG			
VD121	VD121F_T	TCACCTTCACCAGGATTAGGC	AJ558172	Tet	193
	VD121R	TCATTACCAATATCCCTGGCG			
VD126	VD126F_F	ACCGGAAGCCGCTAATC	AJ558173	Fam	115-117
	VD126R	TTTATGACTATCTAAACGTGTATTTGGG			
VD134	VD134F_T	CAGGGCGATTACGTAAACG	AJ558174	Tet	119
	VD134R	CCATATACAACCATTTACAATGAATTG			
VD146	VD146F_F	TGGCTCATGCATTATCGTTG	AJ558176	Fam	172
	VD146R	AGCGTTTGGAGAGTGAGAAATAC			
VD151	VD151F_H	CGTTCAAGTATGCATACACACAC	AJ558177	Hex	116
	VD151R	CTAGGCATATTGGGCACG			
VD163	VD163F_H	CAAGAGTCGGATTTGGCGC	AJ558179	Hex	113
	VD163R	ATAGTATGCTTCTATATATCTCTGAGTTTTTAT			

3.2.2.4.2 Primerdesign

Zum Erstellen zweier neuer Primersequenzen, die den Marker flankieren sollen, wurde die Mikrosatellitensequenz des VD001 (Accession no. AJ558164) in das Computerprogramm *Primer3 Input 0.4.0* (vom Whitehead Institute for Biomedical Research) eingefügt. Vom Programm wurden Vorschläge zu möglichen Primern gegeben, welche im Programm *Beacon Designer Free Edition* (von Premier Biosoft International) auf Fehlpaarungsverhalten, wie beispielweise die Ausbildung von crosspins oder hairpins, geprüft wurden.

3.2.2.4.3 Fluoreszenzmarkierung der Primer

Der limitierende Faktor in der Besetzung einer Multiplex-PCR sind DNA-Fragmente, die annähernd die gleiche Länge besitzen, da diese elektrophoretisch nicht einwandfrei aufgetrennt werden können. Das bedeutet, dass in einem Multiplex-Set, mit einfachen Primerpaaren, nur sechs Positionen besetzt werden können, wenn man davon ausgeht, dass Fragmente in der Länge zwischen 50 und 350 bp detektiert werden können.

Durch die Kombination von Multiplex-PCR und fluoreszenzbasierender Darstellungsweise (Tab. 4) entsteht eine schnelle und effiziente Technik für eine individuelle Identifikation (Kimpton 1993).

Tab. 4 Fluoreszenzmarkierungen der Primer

Label	Bezeichnung	Farbe
TAMRA	N,N,N',N' -Tetramethyl-6-carboxyrhodamin	rot
FAM	6-Carboxyfluorescein	blau
TET	4,7,2',7'-Tetrachloro-6-Carboxyfluorescein	grün
HEX	4,7,2,4',5',7'-Hexachloro-6-Carboxyfluorescein	gelb

Um dies zu ermöglichen und mehrere gleich lange DNA-Fragmente aus einem Multiplex-PCR-Set analysieren zu können, wurden die Primer mit

Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Für die Markierung standen drei Farben zur Verfügung, die da blau (FAM), grün (TET) und gelb (HEX) sind. Pro Primerpaar wird immer nur ein Primer farbmarkiert.

Die Farbmarkierung bietet den Vorteil, dass pro Set theoretisch bis zu sechs Mikrosatellitensequenzen einer Farbe, bei drei Farben daher bis zu 18 Sequenzen gleichzeitig amplifiziert werden können.

Mit der roten Farbe (TAMRA) ist der Größenstandard markiert, der immer parallel zu den Proben mitläuft.

3.2.2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist aufgrund unterschiedlichster Anwendbarkeit und automatischer Analysemethoden, die eine schnelle und sensitive DNA-Analyse ermöglicht, eine gebräuchliche Technik.

Das Prinzip der PCR besteht in der exponentiellen Vermehrung eines zu amplifizierenden DNA-Fragments. Das heißt, dass theoretisch nur winzigste Spuren an DNA nötig sind und dank der PCR-Methode trotzdem weitere Untersuchungsverfahren durchgeführt werden können, bei denen größere Mengen an DNA eingesetzt werden müssen.

Die Methodik der PCR wurde 1986 von Mullis et al. beschrieben. Es handelt sich um eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten. Hier werden die *in vivo* ablaufenden Prinzipien der enzymatischen DNA-Replikation künstlich imitiert.

Der Amplifikationsvorgang setzt sich aus drei Reaktionsschritten zusammen, die sich zyklisch wiederholen. Den ersten Schritt stellt die Denaturierung dar. Dabei wird die doppelsträngige DNA meist bei etwa 95°C aufgetrennt, so dass man zwei Einzelstränge erhält. Dann folgt der zweite Schritt, die Hybridisierung (*Annealing*), bei der zwei einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) mit der Einzelstrangsequenz der DNA hybridisieren. Hierbei wird eine deutlich niedrigere Temperatur gewählt, die meist zwischen 50 und 60°C liegt.

Der letzte Schritt ist die Elongation. Das vorherige *Annealing* erlaubt einer thermostabilen Polymerase (z.B. *Taq*-Polymerase, ein Enzym isoliert aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) das Ansetzen am zu vervollständigenden Einzelstrang. Mit Zugabe von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) erfolgt dann die spezifische Synthese eines neuen Doppelstrangs. Dies geschieht bei einer Temperatur, die nach dem Optimum der Polymerase gewählt wird (meist 72°C).

Das entstehende PCR-Produkt dient dann ebenfalls als Matrize für weitere Amplifikationszyklen.

Durch die Temperaturstabilität der Polymerase ist eine 25 bis 40malige zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte möglich, ohne nach jedem beendeten Zyklus erneut das Enzym zugeben zu müssen.

Die Durchführung erfolgt heutzutage automatisch in einem Thermocycler.

3.2.2.4.5 Multiplex-PCR

In vorliegender Arbeit wurde die oben beschriebene einfache PCR zu einer Multiplex-PCR erweitert. Die Multiplex-PCR hat den Vorteil, dass mehrere Primerpaare gleichzeitig eingesetzt werden und folglich in einem Untersuchungsschritt mehrere unterschiedliche DNA-Fragmente amplifiziert werden können. Dies ist eine enorme Effizienzsteigerung, da im Gegensatz zur Uniplex-PCR eine deutlich geringere Vorarbeitungs- und Reaktionszeit, sowie ein geringerer Materialaufwand, anfallen (Edwards und Gibbs 1994).

Für die PCR ist ein Primerpaar, bestehend aus zwei Primern, die zum Anfang und zum Ende des spezifischen DNA-Abschnitts antiparallel komplementär sind, erforderlich. Die Primer sollten eine Länge zwischen 18 und 25 bp besitzen.

Was die Multiplex-PCR erschwert ist der Wettbewerb um Ressourcen, wodurch das Ergebnis „verfälscht“ werden kann. So tun sich Primer, die ein langes Fragmentstück einrahmen, schwerer als Primer kürzerer Fragmente.

Dem kann man entgegensteuern, indem man der PCR mehr von den Primern, die größere PCR-Produkte herstellen, zuführt (Edwards und Gibbs 1994).

Weitere Nachteile der Multiplex-PCR können auch lange Extensions- und *Annealing*-Zeiten darstellen. Denn dabei können unerwünschterweise nichtspezifische Amplifikationen entstehen (Chamberlain 1991).

Zusammenstellung der Multiplex-PCR-Sets:

Entscheidend für die Zusammenstellung der Multiplex-PCR-Sets (Tab. 5) ist eine wohl überlegte Auswahl der Primer. Dabei ist wichtig auf Folgendes zu achten:

Man wählt sich die Primer so, dass die entstehenden PCR-Produkte von ihrer Länge her im Grenzbereich zwischen 60 und 350 bp liegen. Man sollte keine Primer in einem Set einsetzen, die homologe Sequenzen amplifizieren, da sich sonst Fehlannealing häuft.

Außerdem achtet man darauf, dass sich die Fragmentlängen verschiedener PCR-Produkte durch mindestens 25 bp unterscheiden, damit sich bei der elektrophoretischen Auftrennung und Analyse keine Überlagerung ergibt.

Tab. 5 Multiplex-PCR-Sets

Set1	Set2	Set3
VD015	VD001	VD126
VD016	VD119	VD134
VD109	VD163	VD151
VD112		
VD114		
VD115		
VD121		
VD146		

Vor dem Einsatz der Primerpaare ist es hilfreich diese auf Primerdimerisation oder Haarnadelstruktur-Bildung zu überprüfen (vgl. 3.2.2.4.2 Primerdesign), damit die Beeinträchtigung der PCR durch diese Mechanismen auf ein Minimum reduziert wird (Edwards und Gibbs 1994).

Desweiteren sollten die Primer annähernd eine gleiche *Annealing*-Temperatur aufweisen.

Da die für diese Arbeit ausgewählten zu amplifizierenden Sequenzstücke oft die gleiche Länge haben, mussten die Marker auf insgesamt drei Sets (Tab. 5) verteilt werden.

3.2.2.4.6 Durchführung der Multiplex-PCR

Alle Multiplex-PCRs wurden anhand von Probeläufen mit Test-DNA optimiert. Jeder Marker wurde zunächst einzeln in einer PCR getestet. Zum einen, um zu überprüfen, ob das Primerpaar zufriedenstellend funktioniert, und zum anderen, um die ungefähre Größe der PCR-Produkte, die durch die Erstveröffentlichung (Solignac 2003) bekannt war, zu überprüfen.

Die PCR (Tab. 6) wurde mit einem Reaktionsansatzvolumen von 15 µl durchgeführt.

Tab. 6 Standard-PCR-Protokoll zur Mikrosatellitenanalyse

	Konzentration	Endvolumen in µl
H ₂ O bidest		ad 15 µl
Puffer	10x	1,5
dNTP	2 mM	1,5
MgCl	25 mM	0,9
Forward primer	10 µM	
Reverse primer	10 µM	
Estland- <i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µl	0,2
DNA	15 ng	2

Die Primermenge variiert von Set zu Set und kann daher an dieser Stelle nicht endgültig angegeben werden. Ein Beispiel für jedes Set ist dem Anhang 2 zu entnehmen.

Das Temperaturprogramm des Thermocyclers (GeneAmp®, Applied Biosystems) wurde standardmäßig wie folgt eingestellt:

Die Initialisierung erfolgte bei 95°C für 15 Minuten. In 35 Zyklen betrugen die Temperaturen für 30 Sekunden 94°C (Denaturierung), 30 Sekunden 55°C (Primer-Hybridisierung, *Annealing*) und weitere 30 Sekunden 72°C (Elongation), sowie abschließend für 20 Minuten 72°C.

3.2.2.4.7 Gelelektrophoretische Auftrennung

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit einem denaturierenden Polyacrylamidgel, das sich durch ein gutes Auflösungsvermögen auszeichnet, was es ermöglicht PCR-Produkte aufgrund nur eines Basenpaares unterscheiden zu können und so präzise die Allellängen feststellen zu können.

Das Prinzip dieser Nachweismethode basiert auf der negativ geladenen Phosphatgruppe der DNA, die eine Wanderung der Fragmente zum Pluspol ermöglicht. Die Beweglichkeit der Fragmente und damit die elektrophoretische Auftrennung hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie beispielsweise der Gesamtnettoladung, Größe und Gestalt der Moleküle, Porengröße des Trägermaterials, pH, Temperatur, Ionenstärke des Puffers und der elektrischen Feldstärke .

Für diese Arbeit wurde der ABI Prism™ 377 DNA Sequencer von Applied Biosystems verwendet. Die Elektrophorese erfolgte durch ein 4 %iges Polyacrylamidgel zwischen zwei Glasplatten. Am unteren Ende der Gelplatte befindet sich ein Laser der kontinuierlich einen bestimmten Bereich abscannt. Dabei regt der Laser die Fluoreszenzmarkierungen der DNA-Fragmente an, woraufhin für jede Farbe Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert wird. Linsen bündeln das emittierte Licht auf einen Spektrographen. Von diesem wird das Licht, abhängig von der Wellenlänge, über eine CCD-Kamera aufgetrennt. Somit können gleichzeitig vier Farben, das bedeutet mehrere PCR-Produkte, die sich in ihrer Größe überschneiden, ausgewertet werden. Die Länge der Fragmente

wird über einen internen, Tamra-markierten Standard mit definierten Fragmentlängen bestimmt.

Durchführung:

Die Gellösung wurde nach bereits angeführter Zusammensetzung (siehe 3.2.2 Puffer und Lösungen) hergestellt.

Die Lösung wurde ungefähr ein Stunde mit dem Magnetrührer gerührt und dabei kontinuierlich entgast. Danach wurde die Gellösung lichtgeschützt aufbewahrt.

Zum Gießen des Gels wurden zuerst 20 ml der Gellösung, 16 ml TEMED und 64 µl APS gemischt. Dies wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch seitliche Platzhalter voneinander getrennt sind. Dadurch entsteht eine Geldicke von 0,2 mm. Dann wurde ein Kamm eingelegt, der am oberen Rand im Gel Taschen bildet, in die später die Proben geladen werden können.

Das Gel polymerisierte zunächst 20 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend nochmals 20 Minuten im Brutschrank bei 64°C. Danach wurde das Gel bis zur Verwendung feucht bei +4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die Gelplatten wurden in das Gerät eingebaut und die Kammern des ABI 377 wurden ausreichend mit ABI Puffer gefüllt.

Zur Vorbereitung der Proben wurden die PCR-Produkte zunächst, je nach Set unterschiedlich, mit Wasser verdünnt (Anhang 2). Aus dieser Verdünnungslösung wurde 1 µl entnommen und mit 2 µl Formamid-Blaupuffer-Standard-Mix versetzt. Anschließend wurden diese Proben zwei Minuten bei 95°C in dem Thermocycler denaturiert und dann sofort auf Eis gekühlt.

Nach einer Vorlaufzeit des Gerätes von 20 Minuten, wurden ca. 1,5 µl je Probe mit Hilfe einer Pipette mit abgeflachter Pipettenspitze geladen.

Insgesamt konnten so 50 Proben in zwei Schritten geladen werden. Zuerst wurden 24 Proben der ungeraden Reihe aufgebracht und nach einer Laufzeit von 3 Minuten 24 Proben der geraden Reihe. Die restlichen zwei Plätze wurden nochmals mit den jeweils ersten Proben beladen. Dies hatte den

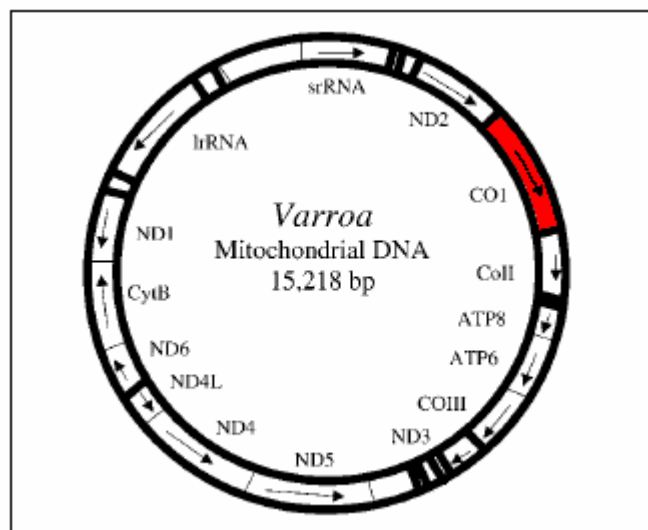
arbeitstechnischen Vorteil, dass immer genau die Hälfte einer 96-well PCR-Platte pro Gel hergenommen werden konnte.

In Abhängigkeit der PCR-Sets und der Größe der darin enthaltenen PCR-Produkte, dauerte die automatische Auftrennung zwischen 1,5 und 2 Stunden.

3.2.2.5 SNP-Analyse im mitochondrialen Genom

Zur weiteren Abklärung von möglichen Varianten wurde das mitochondriale Genom mit der Methode der Sequenzierung untersucht. Das gesamte mt-Genom (Abb. 14) von *Varroa destructor* wurde bereits von zwei Arbeitsgruppen (Evans 2002, Navajas 2002) vollständig sequenziert und für die vorliegende Arbeit als Basis weiterer Untersuchungen genutzt.

Abb. 14 Mitochondriales Genom (nach Evans und Lopez, 2002)



Bereits erfolgreich zur Haplotypisierung eingesetzt wurde das Cytochrom C Oxidase I (COI) -Gen (Zhou 2004, Solignac 2005). Am Vielversprechendsten davon war ein 376 bp langes Fragmentstück, das auch schon von Solignac et al. (2005) (Accession no. AF106899) zur Sequenzierung verwendet wurde. Dabei wurde das flankierende Primerpaar von dieser Arbeitsgruppe übernommen. Und zwar die Primer mtCO1_F (mit der Sequenz: TACAAAGAGGGAAGAAGCAGCC) und mtCO1_R (mit der Sequenz: GCCCCTATTCTTAATACATAGTGAAAATG).

Für die Sequenzierung wurden elf Tiere aus dem Probenbestand ausgewählt. Dabei wurde versucht eine repräsentative Probenauswahl von den Standorten und innerhalb dieser Standorte zu nehmen, die sich nach der Mikrosatelliten-Analyse als vermeintlich verschieden erwiesen.

Die Tierproben sind in der Tab. 7 zu ersehen.

Tab. 7 Tiere, die für die COI-Gen-Sequenzierung ausgewählt wurden

TierID	Herkunft
BRA005007	Teltow-Fläming, Brandenburg
BRA050054	Teltow-Fläming, Brandenburg
ROS063082	Rosenheim, Oberbayern
ROS115193	Rosenheim, Oberbayern
SAA138268	Saarlouis, Saarland
SAA138251	Saarlouis, Saarland
SAA221399	Saarlouis, Saarland
WEI266533	Weißenburg, Mittelfranken
WEI317630	Weißenburg, Mittelfranken
WIB365751	Kitzingen/Main, Unterfranken
WIB396841	Kitzingen/Main, Unterfranken

Die Isolation der DNA wurde nach gleichen Maßstäben wie schon zuvor bei der Mikrosatellitenanalyse (siehe 3.3.2.1 DNA-Präparation) durchgeführt.

Zunächst wurde nach folgendem Protokoll eine PCR (Tab. 8) durchgeführt. Dafür wurde ein Reaktionsansatzvolumen von 25 µl gewählt.

Tab. 8 Standard-PCR-Protokoll mit Temperatur-Programm

	Konzentration	Volumen in µl	Temperatur-Programm
H ₂ O bidest		ad 25 µl	1. 95°C für 2 min.
Puffer	5x	5	2. 95°C für 45 sec.
dNTP	2 mM	2,5	3. 57°C für 30 sec.
MgCl	25 mM	2,5	4. 72°C für 1 min.
Forward primer	10 µM	0,4	x 35 Zyklen
Reverse primer	10 µM	0,4	5. 72°C für 7 min.
Promega- <i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µl	0,2	6. 4°C ∞
DNA	15 ng	2	

Im Anschluß wurden die PCR-Produkte an Filtersäulchen aufgereinigt. Dafür wurde das PCR-Produkt mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt und dieser PCR-Mix nochmals mit 400 µl Wasser versetzt und auf Filtersäulchen pipettiert, die in Tubes stecken. Die Tubes mit den Filtersäulchen wurden 15 Minuten lang mit 3080 rpm zentrifugiert.

Bei diesem Vorgang wird der PCR-Mix durch die Filtersäulchen gedrängt, wobei das „Waschwasser“ in die Tubes abfließt und das eigentliche, zu gewinnende PCR-Produkt im Filter verbleibt. Dieser muss dann noch ausgewaschen werden, wofür 20 µl Wasser auf den Filtereinsatz gegeben und das Ganze zwei Minuten stehengelassen wurde. Danach wurde der Filtereinsatz umgekehrt auf ein neues Tube gesteckt und nochmals mit 3080 rpm zwei Minuten zentrifugiert.

Zum Schluß befindet sich das PCR-Produkt, in Wasser resuspendiert, im Tube.

Danach wurde getestet, ob in den Proben ausreichend PCR-Produkt enthalten ist. Dafür wurde die Konzentration des PCR-Produkts mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer gemessen.

Um die Größe des DNA-Fragments zu bestimmen wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Ein 2%iges Agarosegel wurde in die dafür vorgesehene Form gegossen und das Probenmaterial (6 µl PCR-Produkt und 2 µl Blaupuffer) in die ausgesparten Taschen pipettiert. In eine Extratasche wurden 3 µl des 1kb-Leiters aufgetragen. Nach etwa 1 Stunde wurde das Ergebnis kontrolliert.

Die Proben wurden dann zur Sequenzierung der DNA an ein Fremdlabor (Sequeserve GmbH, Vaterstetten) geschickt.

3.2.3 Statistische Auswertung

Die bei der Elektrophorese im ABI Prism™ 377 erstellten Rohdaten der Mikrosatellitenanalyse wurden mit der Software ABI PRISM GeneScan® Version 3.7 gespeichert und aufgearbeitet. Mit diesem Programm wurden die Werte für

den internen Standard definiert. Dabei ist es möglich den Standard für jede Probe einzeln zu definieren.

Anschließend wurden die Daten mit der Software ABI PRISM GenoTyper® Version 3.7 weiterbearbeitet. Was zuvor im Gelbild noch als Farbpunkt sichtbar war, erscheint nun als Peakbande. Durch Definieren des Längenstandards, können die einzelnen Peaks der Proben einer Fragmentgröße zugeordnet werden und stellen die Allelgrößen dar.

Mit Hilfe der Allelgröße aus der erstellten „category list“ wurden dann die Genotypen festgelegt.

Alle Genotypen wurden in einer formatierten Tabelle in die Paradox-Datenbank eingelesen und dort zur weiteren Auswertung verwaltet.

Die Anzahl der Allele, sowie die jeweilige Allelfrequenz wurden für jeden Locus durch direktes Auszählen bestimmt.

Die Sequenzierung der mitochondrialen DNA wurde einem Fremdlabor überlassen, welches die Daten in Form kompletter Fragmentsequenzen und als Alignment übermittelt hat.

4 Ergebnis

Zur Untersuchung der Populationsstruktur von *Varroa destructor* in Deutschland wurden 872 Milben, aus fünf verschiedenen Regionen, die in insgesamt 22 Subpopulationen (entspricht den beprobten Bienenvölkern) unterteilt wurden, anhand zweier unterschiedlicher Methoden analysiert.

Zunächst wurde das Kerngenom mittels Mikrosatelliten-Markern analysiert. Dabei wurde das Milbengenom an 14 Loci typisiert und anschließend aus den 12208 Genotypen (872 Milben x 14 Loci) eine Datenbank erstellt. Da nicht jeder Genotyp eines Tieres an jedem Marker bestimmt werden konnte, umfasst die Datenbank reell nur 10967 Genotypen.

Als zusätzliche Analyse wurde bei elf besonders ausgewählten Tieren ein 376 bp langes Fragment des mitochondrialen Genoms sequenziert und im Anschluß der jeweilige Haplotyp bestimmt.

An dieser Stelle werden die Ergebnisse, der Mikrosatelliten-Analyse mittels Darstellung der einzelnen Marker mit ihren Allelen, Loci, Allelfrequenzen und Heterozygotiegrad aufgezeigt.

Anschließend werden die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung in Form der Gensequenz und des Alignments (Anhang 3) präsentiert.

Die Proben, die durch den automatischen Sequenzierer ABI Prism™ 377 darstellbar gemacht wurden, konnten nach Bearbeitung mit dem Programm GenoTyper ausgewertet werden.

Die im GenoTyper detektierten Peakbanden (wie in Abb. 15 und Abb. 16 gezeigt) stellen die Allele dar. Für jede Multiplex können bei jedem Tier die Allele eingesehen werden. Durch Zuordnung des Größenstandards werden die Allelgrößen bestimmt. Ob an einem bestimmten Locus ein Längenpolymorphismus vorhanden ist, kann festgestellt werden, wenn die Allelgrößen in der Population variieren.

Abb. 15 Darstellung der Allele der Multiplex 1

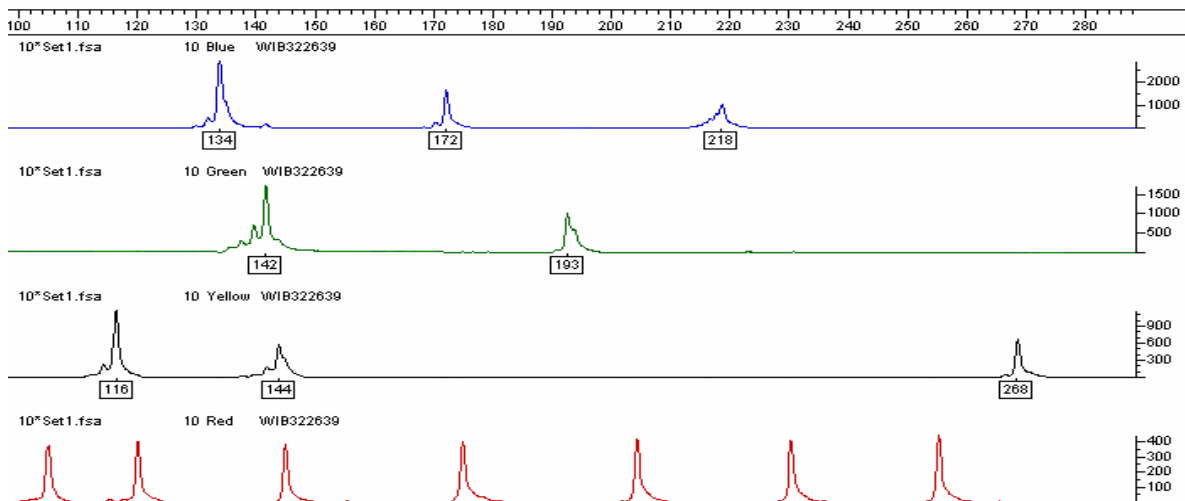
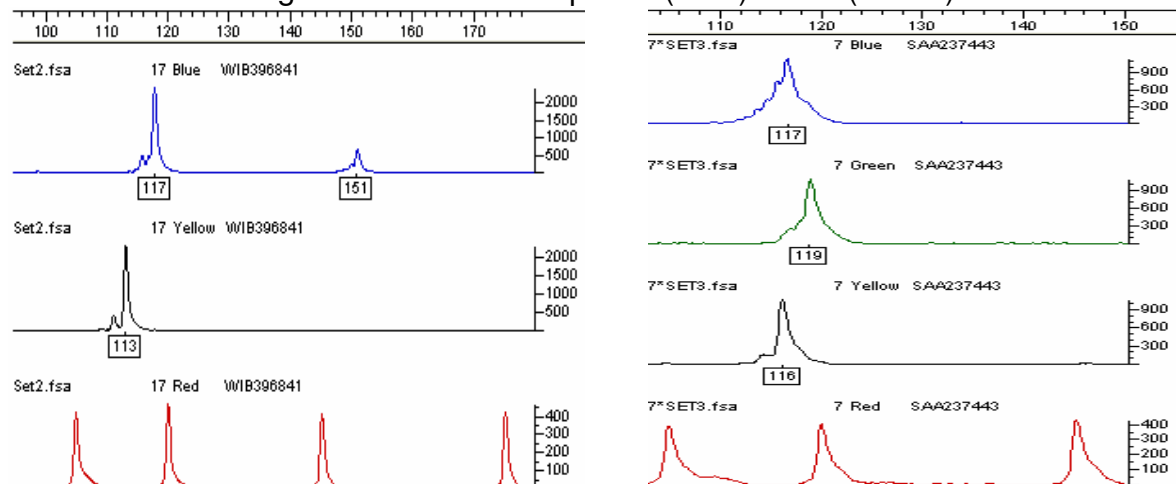


Abb. 16 Darstellung der Allele der Multiplex 2 (links) und 3 (rechts)



Zudem kann aus dieser Darstellung abgelesen werden, ob ein Tier sich am jeweiligen Locus homozygot (einfacher Peak) oder heterozygot (Doppelpeak) zeigt.

Für jeden Locus wurden die Allele einzeln ausgezählt. Es handelt sich bei jedem Marker meist nur um ein Allel (Tab. 9). Von 14 Loci zeigten sich alle untersuchten Tiere an 13 Loci homozygot. Die Ausnahme ist der Marker VD126, der sich entweder mit dem Allel 117 homozygot, oder mit den Allelen 115 und 117 heterozygot, darstellt.

Aufgrund der durchschnittlichen Allelzahl von nur einem Allel und somit dem relativ monomorphen Verhalten der Loci innerhalb der untersuchten Stichprobe, wurden die Ergebnisse dieser 13 Marker nur eingeschränkt für weitere Berechnungen verwendet.

Tab. 9 Darstellung der einzelnen Marker mit Allelzahl, Loci und Frequenz

Marker	Allelzahl	Locus	Frequenz
VD001	1	151	1.0000
VD126	2	115 117	0.0558 0.9442
VD134	1	119	1.0000
VD146	1	172	1.0000
VD151	1	116	1.0000
VD163	1	113	1.0000
VD015	1	144	1.0000
VD016	1	268	1.0000
VD109	1	134	1.0000
VD112	1	142	1.0000
VD114	1	218	1.0000
VD115	1	116	1.0000
VD119	1	117	1.0000
VD121	1	193	1.0000

Die Allelfrequenzen werden durch einfaches Auszählen der Allele für jeden Locus ermittelt (Tab. 9). Durch die Uniformität der Ergebnisse liegt sie fast ausschließlich bei 1.000, da nur ein Hauptallel gefunden wurde und dieses an den jeweiligen Loci zu 100% in der untersuchten Stichprobe bestimmend ist.

Die einzige, von oben aufgezeigtem Muster abweichende, Allelfrequenzverteilung ist am Locus VD126 zu sehen. Aus diesem Grund wird der Marker in Tab. 10 gesondert aufgeführt.

Dieser Marker beweist, dass das Allel 117 mit hoher Frequenz auftritt, da der überwiegende Anteil, sprich 692 Tiere, bei diesem Allel homozygot sind. Nur 87 Tiere zeigen sich heterozygot mit den Allelen 115 und 117.

Dabei konnten vermehrt heterozygote Individuen in den Subpopulationen RO1, SA1, WE1 und WE2 beobachtet werden. Wobei in WE2 mit 23 Heterozygoten von 34 Tieren (entspricht 67,65%) die größte Häufung besteht. Gefolgt von RO1 mit 15 von 37 Individuen (40,54%), SA1 mit 19 von 51 (37,25%) und WE1 mit 12 von 57 (21,05%).

In den Subpopulationen BR1, RO3, RO4, RO5, SA2, SA5, WI2, WI4 und WI5 wurden hingegen keine heterozygoten Individuen gefunden.

Tab. 10 Verteilung der Allelfrequenzen des VD126 in den Subpopulationen

Subpopulation	Tierzahl	Allelzahl	Allele: 115	117
Frequenzen				
BR1	7	1	0.000	1.000
BR2	47	2	0.035	0.965
RO1	37	2	0.278	0.722
RO2	23	2	0.014	0.986
RO3	26	1	0.000	1.000
RO4	5	1	0.000	1.000
RO5	35	1	0.000	1.000
SA1	49	2	0.232	0.768
SA2	41	1	0.000	1.000
SA3	31	2	0.024	0.976
SA4	4	2	0.062	0.938
SA5	38	1	0.000	1.000
SA6	32	2	0.030	0.970
WE1	32	2	0.149	0.806
WE2	18	2	0.359	0.641
WE3	21	2	0.023	0.977
WE4	4	2	0.100	0.900
WI1	62	2	0.042	0.958
WI2	30	1	0.000	1.000
WI3	66	2	0.008	0.992
WI4	43	1	0.000	1.000
WI5	25	1	0.000	1.000

Da Allelfrequenzen die relative Häufigkeit der Kopie eines Allels in einer Population beschreiben, lässt sich beispielhaft sagen, dass in der Subpopulation WE2 das Allel 115 mit einer Häufigkeit von 0.359 vorkommt und das Allel 117 mit einer Häufigkeit von 0.641 (vergleiche Tab. 10).

Trotz der Tatsache, dass beim VD126 eine geringe Variabilität erkennbar ist, ist das Allel 117 in der Gesamtpopulation mit einer hohen Frequenz (0.9442) vorhanden und liegt auch in jeder Subpopulation (mit Ausnahme von WE2) bei einem Wert von größer als 0.72. Es liegt daher nahe, dass auch dieses Allel einen Trend zur Fixierung hat, da laut Roßnagel (1999) Allelfrequenzen von über 0.70

zur Fixierung neigen. In der Subpopulation WE2 ist das Allel 117 mit dem Wert 0.641 zwar von hoher Frequenz, zeigt aber keine Tendenz zur Fixierung.

Schätzung der Variabilität des Markers VD126 innerhalb der Population:

Ein erster Anhaltspunkt für die Variabilität innerhalb einer Population ist die durchschnittliche Anzahl an Allelen pro Locus. Mit Ausnahme des VD126, gibt es immer nur ein Allel pro Locus. Beim VD126 sind es zwei Allele. Daher soll für diesen Marker der Heterozygotiegrad h (siehe nachfolgende Formel) als Maß für die genetische Variabilität nach Nei (1978) geschätzt werden.

$$h = \frac{2n(1 - \sum x_i^2)}{(2n - 1)}$$

Legende: h = Heterozygotiegrad

n = Anzahl der Individuen in der Stichprobe

x_i = Frequenz des Allels i in der Stichprobe

Der Heterozygotiegrad, nach Nei (1973) auch als genetische Diversität bezeichnet, wird auf der Basis der Allelfrequenzen geschätzt. Ist der Wert für $h = 1$, so ist die genetische Variabilität am größten. Im Gegenzug dazu ist bei $h = 0$ keine Variabilität vorhanden, was bedeutet, dass alle Tiere bei diesem Locus genetisch identisch sind.

Der Heterozygotiegrad wurde beim VD126 mit $h = 0,1054$ ermittelt.

Bei allen übrigen Markern lässt sich das Ergebnis auch ohne Berechnung ansehen und liegt bei $h = 0$.

Generell jedoch wird bei der Variabilität, aufgrund der sehr raren Heterozygotie bei *Varroa destructor*, eher die Anzahl der Allele angeführt, als der Heterozygotiegrad selbst (Solignac 2003).

Zur Analyse des mitochondrialen Genoms wurde ein Fragmentstück von 376 bp Länge des COI-Gens ausgesucht (Abb. 17).

Zur Untersuchung auf und Darstellung von möglichen Variablen wurde die Methode der Sequenzierung gewählt. Dafür wurden elf Tiere nach Kriterien ausgesucht, die bestimmen, dass Tiere dieser Stichprobe gleichmäßig über die Probenstandorte verteilt sind und die zu erwartende Diversität am größten ist.

Die DNA-Proben wurden in einem Fremdlabor sequenziert.

Für das Ergebnis wurden die Sequenzen aller Tiere durch ein direktes Alignment (siehe Anhang 3) auf einzelne variable Basen (SNPs) überprüft. Und zusätzlich, zur Bestimmung der Haplotypen, mit den bekannten Sequenzen aus Literatur und Datenbanken verglichen.

Abb. 17 Sequenz des Fragments des COI-Gens

```
TACAAAGAGG GAAGAAGCAG CCTTTTGGAA ATTTAGGGAT AATTTACGCT ATAATAACTA
TCGGTATTTT AGGTTTTTATT GTATGGGCTC ATCATATATT TACAGTAGGA ATAGATATTG
ATACTCGAGC ATATTTTACT GCAGCTACAA TAATTATTGC GGTTCCTACT GGTATTAAAA
TTTTTCTTG ATTAGCAACA ATTCATGGTT CTATAGTTAA ATTAGATGTC CCGATAATTT
GATCTTTAGG TTTTATTTTT TTATTTACTT TAGGGGGTAT TACTGGTGTA ATTTTAGCTA
ATTCTTCTAT TGATATTGTT TTACATGATA CTTATTATGT AGTAGCACAT TTTCATATG
TATTAAGAAT AGGGGC
```

Beim direkten Abgleich der Sequenzen konnte erneut nur ein uniformes Ergebnis ermittelt werden. Alle Tiere zeigten eine komplett identische Nukleotidabfolge, ohne jegliche Variabilität.

Dieses Ergebnis ergänzt und bestätigt voll und ganz die vorangegangene Mikrosatellitenanalyse.

Durch den Mangel an Variabilität in der Sequenz, ist die mt-DNA-Analyse nicht informativ genug, um für weitere populationsgenetische Analysen verwendet zu werden

Der Abgleich der elf untersuchten Tiere mit den von Anderson und Trueman (2000; in Datenbank unter Accession no. AF106899 einzusehen), von Navajas (2002; Accession no. AJ493124) und von Evans (2002; Accession no.

AY163547) bereits sequenzierten Tieren, hat ebenfalls keinerlei Variabilität gezeigt.

Das führt zu dem Schluß, dass es bei der Population von *Varroa destructor* in Deutschland, von den beiden *Apis mellifera* parasitierenden Haplotypen (Korea- und Japan-Haplotyp), nur einen Haplotypen gibt. Und anhand des direkten Vergleichs der Milben-DNA-Sequenz, konnte dieser als der Korea-Haplotyp identifiziert werden.

Zusammenfassend lässt sich über die Ergebnisse sagen, dass die Individuen der untersuchten Population allesamt vom Korea-Biotyp sind, und dass innerhalb dieses Biotyps in der Population keinerlei Variabilität vorliegt, sie quasi „Klone“ (Solignac 2005) darstellen.

In folgender Diskussion werden die Geno- und Haplotypen von *Varroa destructor* der Einfachheit halber als Biotypen bezeichnet, da sie durch unterschiedliche analytische Ansatzpunkte – sowohl durch Genotypisierung, als auch durch Haplotypisierung – bestimmt wurden.

5 Diskussion

Seit geraumer Zeit ist die Milbenspezies *Varroa destructor* eine ernstzunehmende Bedrohung für die Europäische Honigbiene, *Apis mellifera*. Bisher sind nur zwei Biotypen bekannt, denen es möglich ist auf *Apis mellifera* zu parasitieren, der Korea-Biotyp und der Japan-Biotyp. Daher galt es aufzulösen, welcher Biotyp von *Varroa destructor* in Deutschland vorkommt, welcher davon vorherrschend ist und ob gegebenenfalls auch andere Varroen bei *Apis mellifera* zu finden sind.

Die Frage nach den Biotypen und nach der gesamten Populationsstruktur der Varroamilben wurde anhand von Genomanalysen geklärt. Die Analysen wurden mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern und der direkten Sequenzierung eines Genstückes durchgeführt.

In der repräsentativen Stichprobe von 872 Varroamilben aus verschiedenen deutschen Regionen war ein sehr uniformes Ergebnis feststellbar, das heißt als Parasit von *Apis mellifera* konnte *Varroa destructor* mit nur einem Milbenbiotyp ermittelt werden – dem Korea-Biotyp. Es wurde unter den gesammelten Proben weder der Japan-Biotyp, noch eine andere Milbe der Gattung *Varroa* gefunden.

Dieses Ergebnis entspricht den Untersuchungen von Anderson und Trueman (2000), die bereits in anderen europäischen Ländern Analysen mit ähnlichen Untersuchungsansätzen (vgl. auch Anderson, 2000) durchgeführt haben.

Anhand der Ergebnisse aus bekannter Literatur (Anderson 2000, Anderson und Trueman 2000, Solignac 2005), lag nahe, dass es in Europa nur einen Biotyp gibt, und dass dieser der Korea-Biotyp ist.

Im Fall der Mikrosatellitenanalyse wurden für die vorliegende Arbeit Mikrosatelliten-Marker von Solignac et al. (2003) verwendet, weil diese Arbeitsgruppe bei den Markern von einer guten interspezifischen Variabilität bei Varroamilben ausging und diese auch bestätigt hat. Allerdings führen sie, übereinstimmend mit weiteren Arbeitsgruppen (Anderson und Trueman 2000, Evans 2000, Cornuet 2006) an, dass nur eine vernachlässigbare intraspezifische Variabilität bei Varroen allgemein zugegen ist und daher auch mit diesen Markern kein wünschenswertes, variables Ergebnis erzielt werden kann.

Normalerweise ist es am Günstigsten Marker zu wählen, bei denen bekannt ist, dass sie eine starke Heterozygotie in der zu untersuchenden Population zeigen. Bei Varroen wird dieser Punkt dadurch limitiert, dass das Kerngenom zur Zeit nicht vollständig sequenziert vorliegt. Das bedeutet, es sind nur wenige Mikrosatelliten in ihrer Sequenz überhaupt bekannt, was die Auswahl der Marker an sich einschränkt.

Nimmt man die in dieser Arbeit verwendeten Marker als Ausgangspunkt und betrachtet dabei eine Population ausschließlich vom Korea-Genotyp, so berichten Solignac et al. (2003) über das Vorkommen von zwei Allelen bei den Markern VD001 und VD146, bei allen restlichen von nur einem Allel. 2005 berichtete selbige Arbeitsgruppe nur noch am Locus VD146 von intratypischer Variabilität.

In vorliegender Arbeit hat sich dies nicht bestätigt. Beide als polymorph genannten Marker haben in der untersuchten Stichprobe nur ein Allel gezeigt. Hingegen hat sich, anders als bei dieser Arbeitsgruppe, der Marker VD126 mit zwei Allelen variabel dargestellt, wobei der Marker entweder mit dem Allel 117 homozygot oder mit den Allelen 115 und 117 heterozygot, vorkam.

Im Zusammenhang mit der weitgehend abwesenden Variabilität sprechen Solignac et al. (2005) gar von einem klonalen Ursprung der zwei Biotypen, da abgesehen von wenigen, niedrigfrequenten Allelen, durchgehend nur eine homozygote Variante vorherrscht. Insgesamt konnten nur 87 Heterozygote unter den 10967 Genotypen ermittelt werden. Das entspricht einem Anteil von 0,8%, was wiederum als ein verschwindend geringer Prozentsatz zu sehen ist.

Neben der durchschlagenden Homozygotie zeigt sich am Locus VD126 mit den Allelen 115 und 117 eine geringe Variabilität. Der Mikrosatellit stellt einen 2 bp-Repeat dar. In diesem Fall handelt es sich folglich um eine Deletion von nur einer Wiederholungseinheit. Solignac et al. (2005) weisen zudem noch daraufhin, dass die niedrige Frequenz aller Allelvarianten auf eine Mutation schließen lässt, die im Anschluss an die Bildung des neuen „Klons“ aufgetreten ist. Was bedeutet, dass die geringe Variabilität an diesem einen Marker entstanden ist, nachdem die „Trennung“ der Genotypen stattgefunden hat.

Die Deletion innerhalb des Korea-Genotyps, ist eine schrittweise Mutation. Aber wie ist sie entstanden? Heterozygote entstehen entweder durch Einkreuzen intra- oder intertypischer Varianten oder durch Bildung von Neo-Mutationen. Aufgrund des strikten Fortpflanzungssystems, der Adelphogamie innerhalb geschlossener Wabenzellen, ist die Einkreuzung intertypischen Genmaterials unwahrscheinlich, da es durch die Isolierung des Fortpflanzungsortes gar nicht erst zu einer Mischung der Milbenpopulation kommt. Auch bei intratypischer Einkreuzung wird der Genpool nicht wirklich erweitert, da die Milben eines Biotyps eine zu monomorphe genetische Struktur aufweisen. Wahrscheinlicher ist die zufällige Neuentstehung einer Mutation. Dabei begünstigt das Fortpflanzungssystem der Milben, dass eine Neo-Mutation entweder schnell fixiert oder eliminiert wird.

Dies lässt die Vermutung zu, dass bei allen anderen Markern, die nur ein Allel besitzen, dieses Allel längst schon fixiert wurde und etwaige andere Allele, noch in der Ahnenpopulation eliminiert wurden. Aufgrund der Allelfrequenz vom Allel 117, die mit 0.9442 weit über 0.70 (Roßnagel 1999) liegt, könnte es möglich werden, dass sich auch dieses Allel vollends fixiert und das Allel 115 (Allelfrequenz von 0.0558) verlorenght.

Berichten anderer Arbeitsgruppen kann man entnehmen, dass bisher in der Varroa-Forschung auch noch mit anderen Markern gearbeitet wurde. Evans et al. (2000) haben neun weitere Marker entdeckt und für diese Primer entwickelt, welche ursprünglich für das Genom von *Varroa jacobsoni* konzipiert wurden, aber auch bei *Varroa destructor* Anwendung fanden. In der Testphase zur vorliegenden Arbeit wurden diese an DNA von *Varroa destructor* getestet, leider ohne Erfolg.

Evans et al. berichten bei ihren Analyseergebnissen ebenfalls von einem Mangel an Heterozygotie an den meisten Loci. Auch hier wurde wiederum festgestellt, dass sich die Mikrosatelliten-Marker bei intratypischen Analysen durch die klonale Struktur von *Varroa destructor* als monomorph erweisen.

Andererseits ist davon auszugehen, dass sich *Varroa destructor* auf ihrem natürlichen Wirt *Apis cerana* stärker polymorph darstellt. So sind durch Anderson und Trueman (2000) und Zhou et al. (2004) weltweit noch weitere Biotypen, in erster Linie Haplotypen, entdeckt worden, die sich mit großer Varianz unterscheiden.

Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass im Unterschied zum Anliegen vorliegender Arbeit, andere Forschungsgruppen vordergründig zumeist Milben vom Korea- und Japan-Biotyp verglichen haben. Und nur am Rande Ergebnisse zur intraspezifische Variabilität haben einfließen lassen. So auch Solignac et al. (2003), die unter den Markern, bei Vergleichen mit beiden Genotypen, acht als interspezifisch polymorph (VD001, VD016, VD112, VD114, VD119, VD126 und VD163) ermittelt haben.

Der Korea- und der Japan-Biotyp unterscheiden sich in ihrer genetischen Struktur deutlich voneinander. Vergleiche zwischen diesen beiden Typen stellen sich immer polymorph dar, jedoch tritt sowohl bei dem einen, als auch beim anderen keine intraspezifische Varianz auf. Aus dieser Tatsache leitet man ab, dass beim Übertritt der Milbe auf *Apis mellifera* zwei verschiedene Klonstrukturen entstanden sind und sich deshalb alle folgenden Generationen diesen beiden Typen zuordnen lassen (Solignac 2005).

Neben der Mikrosatelliten-Analyse wurde weiter die Untersuchung des mitochondrialen Genoms, auf mögliche genetische Variabilität, durchgeführt. Sie wurde zur vollständigen Abklärung genutzt, um Aussagen darüber treffen zu können, ob die Mikrosatellitenanalyse nicht geeignet oder nicht ausreichend für die Detektion genetischer Varianten ist.

Das mitochondriale Genom liegt komplett sequenziert vor (Evans 2002, Navajas 2002) und wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich zur Haplotypenanalyse eingesetzt. Um phylogenetische Beziehungen zu schätzen, werden verschiedene Gene des mitochondrialen Genoms verstärkt genutzt (Navajas 2000). Bei Varroamilben wurde bisher die Haplotypenanalyse hauptsächlich am mitochondrialen Cytochrom C Oxidase I -Gen (COI-Gen) erhoben. Aus diesem Grund wurde auch für diese Arbeit ein Fragment des COI-Gens zur Sequenzierung ausgewählt.

Erstmals wurden von Anderson und Trueman (2000) nach Variablen in der COI-Sequenz gesucht und anhand dessen 15 verschiedene Haplotypen von *Varroa destructor* und *Varroa jacobsoni* entdeckt. Auch Evans et al. (2000) haben

vermeintlich variable Regionen des mitochondrialen Genoms, unter anderem im COI-Gen, von Varroamilben sequenziert.

Solignac et al. (2005) haben Primer zur Sequenz von Navajas (2000) entwickelt, welche auch in vorliegender Arbeit verwendet wurden, und konnten damit eine Stichprobe von *Varroa destructor* in den Korea- und Japan-Haplotyp unterteilen.

Wie Solignac et al. (2005) berichteten, ist innerhalb eines Haplotyps kein Polymorphismus erkennbar. Demzufolge hat auch jeder Haplotyp eine gewissermaßen klonierte Struktur, ist also jedes Tier eines Haplotyps ein genetisch identisches Individuum.

Das gleiche Ergebnis wurde im Rahmen dieser Arbeit gefunden. Elf mitochondriale Sequenzen von jeweils 376 bp Länge ergaben keinerlei Variabilität. Daher stellt sich die Frage, ob das Sequenzieren weiterer und größerer Genomstücke sinnvoll wäre und bessere Erkenntnisse zur Variabilität der mitochondrialen DNA bringen könnte. Immerhin bleibt beim gewählten 376 bp – Fragment nach Abzug der konstanten Primer (Primer 1: 22 bp und Primer 2: 29 bp) nur mehr ein variables Fragment von 325 bp.

Laut Literatur ist dennoch keine vermehrte intraspezifische Variabilität zu erwarten. So beschreiben Solignac et al. (2005), die mehrere Genfragmente in einer Gesamtlänge von etwa 4500 bp sequenziert haben, die Ergebnisse innerhalb eines Haplotyps als nicht sehr variabel. Und auch Evans (2000) attestiert, dass die derzeit verfügbaren Marker der mitochondrialen DNA nicht ausreichend polymorph sind, um Untersuchungen zum Genfluß der Milben, innerhalb und zwischen Populationen, darzustellen.

Da das Sequenzierungsergebnis komplett identisch ausgefallen ist, kann nicht ausgesagt werden, dass es unterschiedliche Migrationswege der Milbe nach Deutschland gab. Vielmehr wird die Meinung erhärtet, dass aufgrund der homogenen, genetisch identischen Gruppe die Milbenpopulation in Deutschland einen gemeinsamen Ursprung hat. Andererseits kann damit belegt werden, dass der Wirtswechsel eindeutig vor der Besiedelung Deutschlands stattgefunden hat, was auch der Literatur entnehmbar ist (De Jong 1982, Donzé 1996, Oldroyd 1999).

Trotz Uniformität der Populationsstruktur von *Varroa destructor* in Deutschland, ist das Ergebnis nicht unbefriedigend. Mit diesen Untersuchungen konnte dargestellt werden, dass es bei unserer heimischen Honigbiene, *Apis mellifera*, ausschließlich den Korea-Biotyp von *Varroa destructor* gibt und der Japan-Biotyp in unseren Regionen nicht vorkommt.

Insgesamt stellt sich dennoch die Frage, ob es nicht besser geeignete Analysemethoden zur Feststellung von Variablen gibt, die gleichzeitig auch praktikabel in der Durchführung sind. Kraus und Hunt (1995) haben es mit RAPD- (randomly amplified polymorphic DNA-) Markern versucht, konnten mit dieser Technik aber ebenfalls nur eine sehr geringe genetische Variabilität aufzeigen.

Da es scheint, dass ganz gleich welches Verfahren angewandt wird, die detektierte Variabilität immer auf kleinem Niveau bleibt, lässt sich sagen, dass *Varroa destructor* insgesamt als genetisch sehr uniform zu sehen ist.

Aus diesem Grund kann man Mikrosatelliten sehr wohl als geeignete Marker bezeichnen, wenngleich sie keine Polymorphismen aufdecken konnten. Die Variabilität der Milben-Genetik an sich ist so gering, dass das Ergebnis bei anderen Markern ähnlich einzuschätzen ist, was anhand der Sequenzierungsanalyse gezeigt werden konnte.

Wie kommt nun die Uniformität in der *Varroa*-Population zustande? Man geht davon aus, dass die scheinbar identischen Individuen beziehungsweise die mangelnde Variabilität aus der „Klon-Entstehung“ vor etwa 60 Jahren resultieren (Solignac 2005), was dem vermuteten Zeitraum des Wirtswechsels entspricht.

Bekanntermaßen vollzog *Varroa destructor* einen Wirtswechsel von *Apis cerana* auf *Apis mellifera*. Wann dieser genau stattfand, ist bisher nicht abschließend geklärt. Nach der Einschleppung der Milbe 1877 nach Japan, wurde erstmals 1957 von *Varroa destructor* als Parasit von *Apis mellifera* und erst 1975 als Erstentdeckung in der Ukraine, berichtet (Solignac 2005, Cornuet 2006).

Zudem gehen die Autoren Solignac (2005) und Cornuet (2006) davon aus, dass aufgrund der deutlich unterscheidbaren Genotypen, ein Wirtswechsel bei wenigstens zwei Gelegenheiten stattgefunden haben muss.

Der Wirtswechsel von *Varroa destructor* markierte einen wichtigen Punkt in der Historie dieses Parasiten: in diesem Zeitraum durchlief laut Solignac (2005) diese Spezies einen Flaschenhals („*bottleneck*“).

Der Flaschenhalseffekt wird üblicherweise durch ein Umweltereignis bedingt. Im Fall von *Varroa destructor* stellt dieses Phänomen der Wirtswechsel dar. Bei einem Flaschenhals kommt es zur starken Reduzierung der Populationsgröße mit gleichzeitiger Verringerung der genetischen Variabilität, wodurch sie genetisch nicht mehr repräsentativ für die Ursprungspopulation ist. In diesen kleinen Populationen verstärken sich die Auswirkungen der Gendrift. Die Gendrift, die durch die zufällige Auswahl von Allelen, bei der Rekombination der Zygotenbildung, entsteht (Slatkin 1987), führt schneller zu einem Verlust oder einer Fixierung bestimmter Allele (Kräußlich und Brem 1997). Dabei geht man immer von der Verpaarung zweier zufälliger Individuen aus. Jedoch wird der Begriff „zufällig“ durch den Flaschenhals zwangsläufig eingegrenzt, weil die Population durch ihn schon stark minimiert wird und noch das besondere Fortpflanzungsverhalten der Milbe hinzukommt. Populationsgenetisch können solche Populationen durch ihren hohen Grad an Homozygotie erkannt werden.

Navajas et al. (2009) bestätigen, dass die komplette Abwesenheit jeglicher Polymorphismen, innerhalb des Korea- und Japan-Biotyps außerhalb Asiens, durch den genetischen Flaschenhals begründbar ist, welcher in Asien, vor und nachdem *Varroa destructor* ihren Wirtswechsel vollzogen hat, stattgefunden haben muss. Auch Solignac et al. (2005) führen die äußerst geringe Variabilität innerhalb eines Biotyps auf den Flaschenhalseffekt zum Zeitpunkt des Wirtswechsels zurück.

Zudem ist die Arbeitsgruppe davon überzeugt, dass dieses Ereignis bei beiden Typen aufgetreten ist. Die Abspaltung hat wahrscheinlich unabhängig voneinander stattgefunden, zu unterschiedlicher Zeit und von unterschiedlichen Populationen ausgehend, wenngleich beide Populationen denselben ursprünglichen Wirt *Apis cerana* hatten.

Ereignisse die zu einer Besiedelung neuer Lebensräume führen, wobei ein Wirtswechsel, wie in diesem Fall, ein Extrem darstellt, haben durch die radikale Populationsreduktion eine rasche Veränderung im Genpool und einen Verlust an genetischer Variabilität zur Folge (Nei 1975, Templeton 1979, Merilä 1996). Wenn

eine Population in ihrer Größe plötzlich stark reduziert wird, ist zu erwarten, dass die durchschnittliche Heterozygotie an jedem Locus sinkt. Die Sinkrate ist dabei abhängig von der effektiven Populationsgröße. So weist eine größere, sich abspaltende Gruppe auch eine stärkere Heterozygotie auf, als eine kleinere Gruppe (Nei 1975). Der Verlust der genetischen Variabilität wird daher entscheidend von der effektiven Populationsgröße und der Zeitspanne, in der die Population nach dem Flaschenhals klein bleibt, bestimmt. Das bedeutet je kleiner die Population und je länger dieser Zustand so bleibt, desto größer der Verlust von genetischer Variabilität. Auf der anderen Seite bedeutet eine rasche Populationsvergrößerung, die starken Inzuchteffekten unterworfen ist, dass die genetische Drift geschmälert wird, wodurch sich wiederum Verluste an Allelen manifestieren können, was ihrerseits zur Minimierung der Heterozygotie führt (Nei 1975). Dabei unterliegen besonders häufig invasive Spezies, zu denen *Varroa destructor* zweifelsfrei gehört, einem Flaschenhals während dem sie das meiste ihrer, wenn nicht sogar ihre gesamte, genetische Variabilität aufgeben (Merilä 1996).

Im Fall von *Varroa destructor* ist wohl davon auszugehen, dass es sich um nur wenige Individuen handelte, die den Wirtswechsel vollzogen haben und somit der Flaschenhals sehr eng war. Der Theorie nach reicht in Extremfällen auch ein befruchtetes Weibchen einer großen Population aus, um eine neue Kolonie zu gründen (Nei 1975). Diese neue Kolonie besitzt, im Vergleich, einen äußerst kleinen Anteil der Variabilitätsvielfalt der Ursprungspopulation und bringt daher auch nur wenig Variabilität in die neue Population ein.

Dieser Umstand erklärt, warum *Varroa destructor* bei *Apis cerana* eine erstaunliche Vielgestaltigkeit zeigt, bei *Apis mellifera* jedoch nicht.

Wie bereits erwähnt, fand der Flaschenhals nach Schätzung verschiedener Autoren (Donzé 1996, Oldroyd 1999, Solignac 2005) vor rund 60 Jahren statt. Das bedeutet bei durchschnittlich angenommenen zehn Generationen pro Jahr (Solignac 2005, Cornuet 2006), dass seither 600 Generationen entstanden sind und trotzdem in dieser Zeit kaum eine Veränderung des Erbgutes stattgefunden hat. Im Normalfall ist der Flaschenhalseffekt davon geprägt, dass die durchschnittliche Heterozygotie einer Population zuerst in frühen Generationen

absinkt und nach Erreichen eines Minimums, bei rasch wachsender Population wieder größer wird (Nei 1975). Bei *Varroa* nimmt trotz mehrerer Generationen pro Jahr die Varianz nicht zu. Wie ist das zu erklären? Die Lösung liegt im Fortpflanzungssystem der Milbe (Solignac 2005). Durch die starke Inzucht, zwischen meist homozygoten Geschwisterindividuen, kann die Heterozygotie kaum bis gar nicht ansteigen. Das bedeutet je mehr Inzuchtgenerationen, desto niedriger bleibt der Heterozygotiegrad. Dieses Prinzip erklärt wie es kommt, dass auch recht große Populationen sehr uniform sein können (Mayr 1942, Provine 2004).

Im Vordergrund der Fortpflanzung der Varroamilbe steht die Adelphogamie (Solignac 2005). Wenn das Milbenweibchen ihre Eier in der vor kurzem erreichten Zelle ablegt, ist sie zuvor meist schon von ihrem Bruder befruchtet worden. Dieses Muster setzt sich immer weiter fort, was zu weiteren Geschwisterpaarungen führt. Da die Fortpflanzung der Milben ausschließlich in der geschlossenen Wabenzelle stattfindet, ist das sich fortplanzende Individuum in der „zufälligen“ Wahl des Partners stark eingeschränkt. Sofern diese Wabenzelle nicht mit mehreren fortpflanzungsfähigen Weibchen besiedelt wurde, erfolgt die weitere Reproduktion ausschließlich zwischen Verwandten.

Obwohl eine multiple Zellinfestation, und zudem noch eine Verpaarung zwischen den Linien, weniger häufig vorkommt, könnte dieser Vorgang theoretisch zu einer genetischen Mischung führen (Solignac 2005). Praktisch muss man aber damit rechnen, sollte es in einer Zelle zur Verpaarung von Nachkommen kommen, die nicht Vollgeschwister sind, sich der Genpool von *Varroa destructor* trotzdem nur unmerklich ändert. Dies liegt daran, dass man in Deutschland von einem gemeinsamen Ursprung der Population ausgeht und es sich folglich immer noch um eine Verpaarung von Individuen handelt, die herkunftsgleiche Allelkopien besitzen. Dabei sind zwei Allele herkunftsgleich, wenn sie durch Duplikation aus demselben Allel eines Vorfahren hervorgegangen sind (Kräußlich und Brem 1997).

Dieser Umstand wird durch die Autozygotie beschrieben, die bei der Varroamilbe aus einer seit je her immer wiederkehrenden Verwandtschafts-/Geschwisterpaarung entsteht (Solignac 2005). Dabei ist die Autozygotie eine

besondere Form der Homozygotie, bei der zwei Allele identische Kopien des Vorfahren-Gens darstellen. Daraus folgt, dass die Nachkommenschaft homozygot wird, da beide Elternteile identisch homozygot sind.

Die Autozygotie führt dazu, sofern man andere Parameter wie beispielsweise die Mutation nicht berücksichtigt, dass in einer Population der immer selbige Genpool bestehen bleibt.

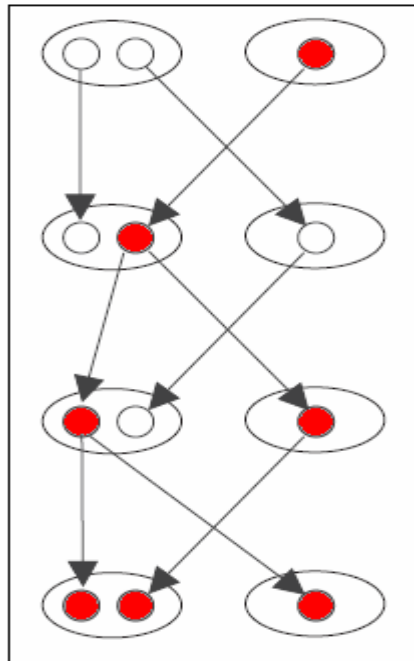
Doch Heterozygotie entsteht auch durch Mutation, die sich bereits bei mindestens einem Vorfahren ereignet hat. Durch anschließende Verpaarung der zwei Varianten, ist es möglich heterozygote Nachkommen zu bekommen. Aufgrund des Fortpflanzungssystems ist die Heterozygotie trotzdem rar, denn *Varroa* milben besitzen einen haplodiploiden Chromosomensatz.

Haplodiploidie ist ein weitverbreitetes Phänomen, bei welchem die Männchen einen haploiden und die Weibchen einen diploiden Chromosomensatz haben. Dies kann von unterschiedlichen genetischen Systemen herrühren. Im Fall von *Varroa destructor* ist dieses System die Pseudoarrhenotokie (De Jong 1981, Martin 1997, Cruickshank 1999).

Dabei entstehen die Männchen, wie auch die Weibchen, aus befruchteten Eiern, eliminieren allerdings in der Embryogenese das paternale Genom (Sabelis und Nagelkerke 1986). Das hat zur Folge, dass das paternale Genom nicht an die männlichen Nachkommen weitergegeben und nur der maternale Teil vererbt wird (Cruickshank 1999, Perrot-Minnot 2000).

Es entstehen daher immer nur homozygote Männchen (Martin 1997). Normalerweise erfolgt bei zufälliger Verpaarung von diploiden Individuen die Mutationsfixierung durch die genetische Drift. Diese scheint durch die Biologie der Milbe geschmälert. Demzufolge ist bei der Haplodiploidie und der Verpaarung des haploiden Bruders mit den diploiden Schwestern, die Fixierungsrate der Mutation sehr hoch (Abb. 18).

Abb. 18 Fixierung einer Mutation ● (nach Cornuet, 2006)



Legende: Von der Mutation zur Fixation in haplodiploiden Individuen, die sich adelphogam fortpflanzen

Genetisch gesehen sind Genotypen das Ergebnis von Mutationen, die bei den Vorfahren irgendwann einmal fixiert worden sind. Daher folgt, dass man wegen der enorm schnellen Fixierung der Mutation (laut Cornuet (2006) innerhalb 6,67 bis 7,67 Generationen), zumeist nur Homozygote antreffen kann. Nur wenn die Mutation erst vor kurzem aufgetreten ist, kann Heterozygotie beobachtet werden.

In der für diese Arbeit untersuchten Population gibt es keine Tiere, die nicht miteinander „verwandt“ sind, was bedeutet, dass das Auftreten von Erbgut, das von Vater und Mutter vererbt wird, die zufällig gleiche Vorfahren haben, sehr stark verbreitet ist.

Aufgrund des Fortpflanzungsmodus mit der ausschließlichen Paarung unter Verwandten und der Tatsache, dass ein enger Flaschenhals vor dem Einzug der Milbe nach Deutschland stattgefunden haben muss, und somit für alle hiesigen Milben ein gemeinsamer Ursprung gilt, gibt es in der Populationsstruktur von *Varroa destructor* nur ein äußerst geringes Maß an Variabilität zu entdecken.

Da die Varroose als bedeutendste Krankheit in der Bienenwirtschaft gilt, scheint deren Konzept (trotz geringer genetischer Variabilität und starker Inzucht, was bei

anderen Lebewesen eher ein negativer Faktor darstellt, betrachtet man Erbkrankheiten oder dergleichen) aufzugehen.

Obwohl der Verlust genetischer Variabilität und eine durchweg homozygote Population eigentlich als Nachteil erscheinen sollte, beweist das Beispiel von *Varroa destructor*, dass ein genetischer Flaschenhals durchaus zu einem breiten, ökologischen Erfolg führen kann (Tsutsui 2000).

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es die parasitische Bienenmilbe *Varroa destructor* genetisch zu untersuchen und anhand der Untersuchungsergebnisse deren Populationsstruktur in Deutschland darzustellen.

Die vorliegenden Analysen basieren auf Untersuchungen des Kerngenoms mittels Mikrosatelliten-Markern und der DNA-Sequenzierung eines Fragments des mitochondrialen Cytochrom C Oxidase I -Gens zur Detektion von Variablen. Anhand der Ergebnisse der Genotypisierung und Haplotypisierung und der anschließenden statistischen Auswertung konnte die Existenz von nur einem Biotyp von *Varroa destructor* ermittelt werden. Dieser wurde als der Korea-Biotyp verifiziert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Milbenpopulation in Deutschland eine äußerst geringe Variabilität vorhanden ist. Bei der Mikrosatellitenanalyse konnten in über 99% der Fälle Genotypen ermittelt werden, die am jeweiligen Locus nur ein Allel besitzen. Folglich sind die meisten typisierten Individuen an den meisten Loci homozygot. Zudem war bei der mitochondrialen Gen-Sequenzierung die Basenabfolge vollkommen identisch. Es konnten keine SNPs gefunden werden.

Die beobachtete Uniformität hängt mit verschiedenen Faktoren in der Geschichte und Biologie der Milbe zusammen. Als Grund für den nahezu vollständig abwesenden genetischen Polymorphismus, wird der enge Flaschenhals, zur Zeit des Wirtswechsels, erachtet, bei dem *Varroa destructor* mit einigen wenigen Individuen von *Apis cerana* auf *Apis mellifera* übergegangen ist. Auch die anschließende rasche Vermehrung konnte den Verlust an Variabilität nicht ausgleichen, was durch das Fortpflanzungsverhalten der Milben begünstigt wird. Die vorherrschende Adelphogamie ist mitverantwortlich für die geringe Heterozygotie und sorgt dafür, dass der bestehende Genpool nicht durch andere Varianten ergänzt wird. Hinzukommt, dass starke Inzucht und die pseudoarrhenotokische Fortpflanzung, zu einer sehr schnellen Fixierung oder Eliminierung von neuen Mutationen führen, was die intratypische Uniformität ermöglicht. Letztlich lässt sich die, seit Generationen kaum veränderte Populationsstruktur, dadurch beschreiben, dass die Varroen einen gemeinsamen Ursprung haben und seither in ihrer Genetik sehr konstant geblieben sind.

7 Summary

A study of the genetic population structure of *Varroa destructor*

The aim of this study was to gain insight into the genetic population structure of the parasitic honeybee mite *Varroa destructor* within the German population.

The accomplished analyses are based on investigations of the nuclear genome by microsatellite markers and sequencing a part of the mitochondrial cytochrome C oxidative I (COI-) gene to search for variables. The results of genotyping and haplotyping and the subsequent statistical evaluation demonstrated the existence of only one biotype of *Varroa destructor* and verified it as the Korean biotype.

Furthermore it displayed generally a very low variability within the population of mites in Germany. The microsatellite analysis showed that more than 99% of the genotypes have only one allele per locus, therefore most of the typed individuals are homozygous at most loci. In addition the mitochondrial gene sequencing showed a totally identical nucleotide sequence. Thus no SNPs could be detected.

The population structure of *Varroa* mites is basically determined by uniformity. This observation may be related to different factors in history and biology of the mite. It is considered that the genetic polymorphism within each type is virtually absent, because of a severe bottleneck at the time of host change, where *Varroa destructor* switched with only a few individuals from *Apis cerana* to *Apis mellifera*. The following rapid expansion wasn't able to compensate the lack of variability, that has been favored by the reproductive behavior of the mite. The almost complete adelphogamy is jointly responsible for the low level of heterozygotes and doesn't change the mites gene pool because there are no variants that could be added to. High inbreeding and the pseudoarrhenotoky reproduction of the mite largely favors the fixation or elimination of new mutations, which facilitates the intratype uniformity.

The results suggest that the reason for the hardly differing population structure is rooted in the same origin of the mites of the species *Varroa destructor* in Germany. And the reproduction system contributes to this uniformity. That's why the whole population is genetically very constant since generations.

8 Literaturverzeichnis

Akratanakul, P. (1976) "Biology and systematics of bee mites of the family Varroidae (Acari: Mesostigmata)", for the degree Master of Science

Anderson, D. (2000) "Variation in the parasitic bee mite *Varroa jacobsoni* Oud.", *Apidologie* 31 (2): 281-292

Anderson, D. and Trueman, J. (2000) "*Varroa jacobsoni* (Acari:Varroidae) is more than one species", *Experimental and Applied Acarology* 24: 165-189

Berg, S. (2009) "Varroa – Gefahr für unsere Honigbienen", *Neue Arten. LWF aktuell* 73/2009: 26-27

Boch, J., Supperer, R. (2006) „Veterinärmedizinische Parasitologie“, Herausgeber: Schnieder, T., 6. Auflage, S. 703-706, Parey Verlag

Boecking, O. and Genersch, E. (2008) „Varroosis – the ongoing crisis in bee keeping“, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 3(2): 221-228

Bruvo, M., D’Souza, Schulenburg (2004) „A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level“, *Molecular Ecology* 13: 2101-2106

Calderón, R.A., Fallas, N., Zamora, L., van Veen, M.J., Sánchez, L. (2009) "Behavior of varroa mites in worker brood cells of Africanized honey bees", *Experimental and Applied Acarology* 49(4): 329-338

Calderón, R.A., van Veen, J.W., Sommeijer, M.J., Sánchez, L.A. (2009b) "Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*)", *Experimental and Applied Acarology* 50(4): 281-297

Chakraborty, R. and Nei, M. (1977) "Bottleneck effects on average heterozygosity and genetic distance with the Stepwise Mutation Model", *Evolution* 31(2): 347-356

Chamberlain, G., Ranier, Caskey (1991) "Detection of gene deletions using multiplex polymerase chain reactions", *Methods in Molecular Biology*, 9 (Protocols in Human Molecular Genetics)

Chehab, F. and Kan, Y. (1989) "Detection of specific DNA sequences by fluorescence amplification: a colour complementation assay", *Proc Natl Acad Sci USA* 86(23): 9178-9182

Cornuet, J.M., Beaumont, M.A., Estoup, A., Solignac, M. (2006) "Inference on microsatellite mutation processes in the invasive mite, *Varroa destructor*, using reversible jump Markov chain Monte Carlo", *Theoretical Population Biology* 69(2): 129-144

Crane, E. (1988) "Africanized bee, and mites parasitic on bees, in relation to world beekeeping", *Annual Review of Entomology*: 1-9

- Cruickshank, R., Thomas, R. (1999)** "Evolution of haplodiploidy in Dermanyssine mites (Acari: Mesostigmata)" *Evolution* 53(6): 1796-1803
- De Guzman, L. and Delfinado-Baker, M. (1996)** "A new species of Varroa (Acari: Varroidae) associated with Apis koschevnikovi (Apidae: Hymenoptera) in Borneo", *Int.J.Acarol.* 22(1): 23-27
- De Guzman, R., Stelzer (1997)** "DNA Evidence of the Origin of Varroa jacobsoni Oudemans in the Americas", *Biochemical Genetics* 35(9): 327-335.
- De Jong, D., Concalves, L.S. (1981)** "The Varroa problem in Brazil", *Am Bee J* 121: 186-189
- De Jong, D., Eickwort (1982)** "Mite pests of honey bees" *Annual Review of Entomology* 27: 229-252
- De Jong, D. and Soares, A.E.E (1997)** "An isolated population of Italian bees that survived Varroa jacobsoni infestation without treatment for over 12 years", *Am. Bee J.* 137: 742-745
- Delfinado-Baker, M. and Aggarwal, K. (1987)** "A new Varroa (Acari: Varroidae) from the nest of Apis cerana (Apidae)", *Int. J. Acarol.* 13(4): 233-237
- Delfinado-Baker, M. and Houck, M.A. (1989)** "Geographic variation in Varroa jacobsoni (Acari: Varroidae): application of multivariate morphometric techniques", *Apidologie* 20(4): 345-358
- Donzé, G. and Guerin, P. (1994)** „Behavioral attributes and parental care of Varroa mites parasitizing honeybee brood“, *Behavioral Ecology and Sociobiology* 34(5): 305-319
- Donzé, G., Herrmann, M., Bachofen, B., Guerin, P. (1996)** „Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite Varroa jacobsoni“, *Ecological Entomology* 21: 17-26
- Donzé, G., Fluri, P., Imdorf, A. (1998)** „Hochorganisiertes Leben auf kleinem Raum: Die Fortpflanzung der Varroa-Milben in den verdeckelten Brutzellen der Bienenvölker“, *Schweizerische Bienen-Zeitung* 121(1): 26-33
- Donzé, G., Fluri, P., Imdorf, A. (1998b)** „Wie viele Begattungen sind bei Varroamilben nötig?“ *Schweizerische Bienenzeitung* 121 (2): 90-94
- Edwards, M.C. and Gibbs, R.A (1994)** "Multiplex PCR: advantages, development and applications", *Genome Research* 3(4): 65-75
- Evans, J.D. (2000)** "Microsatellite loci in the honey bee parasitic mite Varroa jacobsoni" *Mol Ecol* 9(9): 1426-1438
- Evans, J.D. and Lopez, D.L. (2002)** "Complete mitochondrial DNA sequence of the important honey bee pest, Varroa destructor (Acari: Varroidae)", *Exp Appl Acarol* 27(1-2): 69-78

Fuchs, S. and Langenbach, K. (1989) "Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood cells and reproduction in *Varroa jacobsoni* Oud.", *Apidologie* 20(3): 257-266

Fuchs, S. (1992) "Choice in *Varroa jacobsoni* Oud. between honey bee drone or worker brood cells for reproduction", *Behavioral Ecology and Sociobiology* 31(6): 429-435

Galizia, C.G. (2007) "Neuroscience: Brainwashing, honeybee style", *Science* 317(5836): 326-327

Garrido, C. and Rosenkranz, P. (2003) "The reproductive program of female *Varroa destructor* mites is triggered by its host, *Apis mellifera*", *Experimental and Applied Acarology* 31: 269-273

Geldermann, H. (2005) "Tierbiotechnologie", S. 198-228, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart

Gordenin, K., Resnick (1997) "Repeat expansion - all in a flap?", *Nat Genet* 16(2): 116-118

Gregory, P., Evans, J.D., Rinderer, T., De Guzman, L.I. (2005) "Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites", *Journal of Insect Science* 5(7): 5

Hamada, P., Kakunaga (1982) "A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes", *Proc Natl Acad Sci USA* 79(21): 6465-6469

Hänel, H. (1986) "Effect of juvenile hormone (III) from the host *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera) on the neurosection of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* (Acari: Mesostigmata)", *Experimental and Applied Acarology* 2(3): 257-271

Infantidis, M.D. (1983) "Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone brood cells", *J. Apicult. Res.* 22: 200-206

Kashi, Y.S. (1999) "Functional roles of microsatellites and minisatellites" in: Goldstein, D.B. and Schlötterer, C. (eds.). *Microsatellites Evolution and Applications* Oxford University Press, New York, USA, 424-429

Kimpton, C.P., Gill, P., Walton, A., Urquhart, A., Millican, E.S., Adams, M. (1993) "Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci", *Genome Research* 3(1): 13-22

Kralj, B., Fuchs, S., Tautz, J. (2007) „The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L.", *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology* 193(3): 363-370

Kräußlich, H. and Brem, G. (1997) "Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre für Tiermediziner", S. 77-108, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart

Kraus, B. and Hunt, G. (1995) "Differentiation of *Varroa jacobsoni* Oud populations by random amplification of polymorphic DNA (RAPD)", *Apidologie* 26: 283-290.

Landegren, U., Nilsson, Mats, Kwok, Pui-Yan (1998) „Reading bits of genetic information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis“, *Genome Research* 8(8): 769-776

Le Conte, Y., Arnold, G., Trouiller, J., Masson, C., Chappe, B., Ourisson, G. (1989) "Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honeybees by simple aliphatic esters", *Science* 245(4918): 638-639

Le Conte, Y., Arnold, G., Trouiller, J., Masson, C., Chappe, B. (1990) "Identification of a brood pheromone in honeybees", *Naturwissenschaften* 77(7): 334-336

Levinson, G. (1987) "Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution", *Mol Biol Evol* 4(3): 203-221

Litt, M. and Luty, J. (1989) "A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene" *American Society of Human Genetics*

Maggi, M., Damiani, N., Ruffinengo, S., De Jong, D., Principal, J., Eguaras, M. (2009) "Brood cell size of *Apis mellifera* modifies the productive behaviour of *Varroa destructor*", *Exp and Appl Acarol*

Mariat, D., Vergnaud, Gilles (1992) "Detection of polymorphic loci in complex genomes with synthetic tandem repeats" *Genomics* 12(3): 454-458

Marmur, J., Anderson, W.F., Mathews, L., Berns, K., Gajewska, E., Lane, D., Doty, P. (1961) "The effects of ultraviolet light on the biological and physical chemical properties of desoxyribonucleic acids", *J. Cell. Comp. Physiol.* 58 (3): 33-55

Martin, S. (1995) "Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in drone brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions", *Exp and Appl Acarol* 19(4): 199-210

Martin, S., Holland, K., Murray, M. (1997) "Non-reproduction in the honeybee mite *Varroa jacobsoni*", *Exp and Appl Acarol* 21(8): 539-549

Martin, S. and Kemp, D. (1997) "Average number of reproductive cycles performed by *Varroa jacobsoni* in honeybees (*Apis mellifera*) colonies", *J Apic Res* 36: 113-123

Martin, S. (1998) "A population model for the ectoparasite mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies", *Ecological Modelling* 109(3): 267-281

Mayr, E. (1942) "Systematics and the origin of species", Columbia University Press, New York

- Merilä, J., Bjorklund, Mats, Baker, Allan (1996)** "The successful founder: genetics of introduced *Carduelis chloris* (greenfinch) populations in New Zealand", *Hereditary* 77(4): 410-422
- Mülhardt (2006)** "Der Experimentator, Molekularbiologie/ Genomics", Spektrum Akademischer Verlag
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986)** „Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction“, *Methods of Enzymology* 155: 335-350
- Navajas, C., Solignac, Cros-Arteil, Cornuet (2002)** "The complete sequence of the mitochondrial genome of the honeybee ectoparasite mite *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata)" *Mol Biol Evol* 19(12): 2313-2317
- Navajas, M., Anderson, D.L., De Guzman, L., Huang, Z.Y., Clement, J., Zhou, T. and Le Conte, Y. (2009)** "New Asian types of *Varroa destructor*: a potential new threat for world apiculture", *Apidologie*, Preprint.
- Naylor, C. (1990)** "d(TG)_n – d(CA)_n sequences upstream of the rat prolactin gene Z-DNA and inhibit gene transcription", *Nucl. Acids Res.* 18(6): 1595-1601
- Nei, M. (1973)** "Analysis of gene diversity in subdivided populations", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(12): 3321-3323
- Nei, M., Maruyama, Takeo, Chakraborty, Ranajit (1975)** "The bottleneck effect and genetic variability in populations", *Evolution* 29(1): 1-10
- Nei, M. (1978)** "Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals", *Genetics* 89(3): 583-590.
- Nei, M. (1987)** "Molecular evolutionary genetics", Columbia University Press, New York
- Oldroyd, B.P. (1999)** "Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees", *Trends in Ecology and Evolution* 14(8): 312-315
- Oudemans, A.C. (1904)** "On an new genus and species of parasitic Acari", *Notes Leyden Mus.* 24: 216-222
- Pennisi, E. (1998)** "Molecular Evolution: How the genome readies itself for Evolution", *Science* 281(5380): 1131-1134.
- Perrot-Minnot, M.J., Lagnel, J., Migeon, A., Navajas, M. (2000)** "Tracking paternal genes with DALP markers in a pseudoarrhenotokous reproductive system: biparental transmission but haplodiploid-like inheritance in the mite *Neoseiulus californicus*", *Heredity* 84(6): 702-709
- Pohl, F. (2008)** "Varroose erkennen und erfolgreich bekämpfen", Kosmos-Verlag

Provine, W.B. (2004) "Ernst Mayr: Genetics and Specification", *Genetics* 167(3): 1041-1046

Rath, W. (1999) "Defensive adaptations of *A. cerana* against *Varroa jacobsoni* and bearing for *A. mellifera*", *Proc. XIII Int. Congr. IUSSI, Adelaide*: 386

Rehm, S.M. and Ritter, W. (1989) "Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for the calculation of the developmental period", *Apidologie* 20(4): 339-343

Ritter, W. (1981) "Varroa disease of the honeybee *Apis mellifera*", *Bee World* 62: 141-153

Rosenkranz, P., Rachinsky, A., Strambi, A., Strambi, C., Röpstorff, P. (1990) „Juvenile hormone titer in capped worker brood of *Apis mellifera* and reproduction in the bee mite *Varroa Jacobsoni*“, *General and Comparative Endocrinology* 78(2): 189-193

Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. (2009) "Biology and control of *Varroa destructor*", *Journal of Invertebrate Pathology*; In Press, Corrected Proof

Roßnagel, I. (1999) "Untersuchungen zur Biodiversität verschiedener Kaltblut- und Primitivpferderassen", Dissertation, am Lehrstuhl für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Ruttner, F. and Ritter, W. (1980) "Das Eindringen von *Varroa jacobsoni* nach Europa im Rückblick", *Adiz* 5(130)

Sabelis, M.W. and Nagelkerke, C.J. (1986) "Sex allocation strategies of pseudo-arrhenotokous phytoseiid mites", *Netherlands Journal of Zoology* 37: 117-136

Sabelis, M.W. and Nagelkerke, C.J. (1988) "Evolution of pseudo-arrhenotoky", *Exp and Appl Acarol* 4(3): 301-318

Sammataro, D., Gerson, U., Needham, G. (2000) „Parasitic mites of honey bees: life history, implications and impact“, *Annual Review of Entomology* 45(1): 519-548

Schlötterer, C. and Tautz, D. (1992) „Slippage synthesis of simple sequence DNA“, *Nucl. Acids. Res.* 20(2): 211-215

Schlötterer, C. (2000) "Evolutionary dynamics of microsatellite DNA", *Chromosoma* 109(6): 365-371

Slatkin, M. (1987) "Gene flow and the geographic structure of natural populations", *Science* 236(4803): 787-792

Smith (1976) "Evolution of Repeated DNA Sequences by Unequal Crossover", *Science* 191: 528-535

Solignac, M., Vautrin, D., Pizzo, A., Navajas, M., le Contes, Y., Cornuet, J.M. (2003) "Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives", Blackwell Publishing Ltd, Molecular Ecology Notes 3: 556-559

Solignac, C., Vautrin, Le Conte, Anderson, Evans, Cros-Arteil, Navajas (2005) "The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones", Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 272(1561): 411-419

Steiner, D., Rosenkranz, Engels (1994) "The first gonocycle of the parasitic mite (*Varroa jacobsoni*) in relation to preimaginal development of its host, the honey bee (*Apis mellifera carnica*)", Inv. Reprod. Dev. 25: 175-183

Strachan, T. and Read, A.P. (2005) „Molekulare Humangenetik, 3. Auflage, 215, Spektrum Akademischer Verlag

Syvanen, A.C., Landegren, U., Isaksson, A., Gyllensten, U. and Brookes, A. (1999) "Enthusiasm mixed with scepticism about single-nucleotide polymorphism markers for dissecting complex disorders", European Journal of Human Genetics 7: 98-101

Syvanen, A.C. (2001) "Assessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms", Nat Rev Genet 2(12): 930-942

Tariverdian, G. and Buselmaier, W. (2004) „Humangenetik“, 3. Auflage, S. 385-391, Springer Verlag

Tautz, D. and Renz, M. (1984) "Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes", Nucl. Acids Res. 12(10): 4127-4138

Tautz, T., Dover (1986) "Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation", Nature 322(6080):652-6

Tautz, D. (1989) "Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers", Nucl. Acids Res. 17(16): 6463-6471

Templeton, A.R. (1979) "The unit of selection in *Drosophila mercatorum*. II. Genetic revolution and the origin of coadapted genomes in parthenogenetic strains", Genetics 92(4): 1265-1282

Tsutsui, N.D., Suarez, A.V., Holway, D.A., Case, T.J. (2000) "Reduced genetic variation and the success of an invasive species", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 5948-5953

Wenseleers, T. and Ratnieks F.L.W. (2006) "Enforced altruism in insect societies", Nature 444(7115): 50

Wheeler, D., Barret T., Benson, A., Bryant, S.H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D.M., DiCuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Geer, L.Y., Kapustin, Y., Khovayko, O., Landsman, D., Lipman, D.J., Madden, T.L., Maglott, D.R., Ostell, J., Miller, V., Pruitt, K.D., Schuler, G.D., Sequeira, E., Sherry, S.T., Sirotkin, K., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusov, R.L., Tatusova, T.A., Wagner, L. and Yaschenko E. (2007) "Database resources of the National Center for Biotechnology Information", *Nucleic Acids Res.* 35(Database issue): D5-D12

Zhou , T., Anderson, D., Huang, Z., Huang, S., Yao, J., Ken, T., Zhang, Q. (2004) "Identification of Varroa mites (Acari: Varroidae) infesting *Apis cerana* and *Apis mellifera* in China", *Apidologie* 35: 645-654

9 Anhang

Anhang 1 Tierliste

MilbenID	Milben- stadium	Bienenstandort (Landkreis, Regierungsbezirk)	Waben- nummer	Zellen- nummer	Probennahme
BRA001001	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	Fr42	1	28.07.2009
BRA002002	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	Fr42	2	28.07.2009
BRA003003	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	Fr42	3	28.07.2009
BRA003004	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	Fr42	3	28.07.2009
BRA003005	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	Fr42	3	28.07.2009
BRA004006	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	Fr42	4	28.07.2009
BRA005007	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	Fr42	5	28.07.2009
BRA006008	Nymphe	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	6	28.07.2009
BRA007009	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	7	28.07.2009
BRA009010	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	9	28.07.2009
BRA010011	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	10	28.07.2009
BRA011012	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	11	28.07.2009
BRA012013	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	12	28.07.2009
BRA015014	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	15	28.07.2009
BRA016015	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	16	28.07.2009
BRA017016	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	17	28.07.2009
BRA018017	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	18	28.07.2009
BRA019018	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	19	28.07.2009
BRA020019	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	20	28.07.2009
BRA021020	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	21	28.07.2009
BRA022021	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	22	28.07.2009
BRA023022	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	23	28.07.2009
BRA025023	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	25	28.07.2009
BRA026024	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	26	28.07.2009
BRA027025	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	27	28.07.2009
BRA028026	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	28	28.07.2009
BRA028027	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	28	28.07.2009
BRA028028	Nymphe	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	28	28.07.2009
BRA029029	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	29	28.07.2009
BRA030030	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	30	28.07.2009
BRA031031	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	31	28.07.2009
BRA032032	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	32	28.07.2009
BRA032033	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	32	28.07.2009
BRA032034	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	32	28.07.2009
BRA033035	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H41	33	28.07.2009
BRA034036	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	34	28.07.2009
BRA035037	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	35	28.07.2009
BRA036038	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	36	28.07.2009
BRA038039	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	38	28.07.2009
BRA039040	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	39	28.07.2009
BRA040041	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	40	28.07.2009
BRA041042	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	41	28.07.2009
BRA042043	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	42	28.07.2009
BRA042044	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	42	28.07.2009
BRA042045	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	42	28.07.2009
BRA043046	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	43	28.07.2009

BRA043047	Nymphe	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	43	28.07.2009
BRA045048	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	45	28.07.2009
BRA046049	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	46	28.07.2009
BRA048050	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	48	28.07.2009
BRA048051	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	48	28.07.2009
BRA049052	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	49	28.07.2009
BRA049053	Nymphe	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	49	28.07.2009
BRA050054	Adult	Teltow-Fläming, Brandenburg	H1	50	28.07.2009
ROS051055	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	51	04.08.2009
ROS052056	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	52	04.08.2009
ROS052057	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	52	04.08.2009
ROS053058	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	53	04.08.2009
ROS053059	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	53	04.08.2009
ROS054060	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	54	04.08.2009
ROS054061	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	54	04.08.2009
ROS054062	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	54	04.08.2009
ROS054063	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	54	04.08.2009
ROS054064	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	152	54	04.08.2009
ROS055065	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	55	04.08.2009
ROS055066	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	55	04.08.2009
ROS055067	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	55	04.08.2009
ROS056068	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	56	04.08.2009
ROS056070	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	152	56	04.08.2009
ROS057071	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	57	04.08.2009
ROS057072	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	57	04.08.2009
ROS057073	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	57	04.08.2009
ROS058074	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	58	04.08.2009
ROS059075	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	59	04.08.2009
ROS060076	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	60	04.08.2009
ROS060077	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	152	60	04.08.2009
ROS061078	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	61	04.08.2009
ROS061079	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	152	61	04.08.2009
ROS062080	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	62	04.08.2009
ROS063081	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	63	04.08.2009
ROS063082	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	63	04.08.2009
ROS063083	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	63	04.08.2009
ROS063084	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	152	63	04.08.2009
ROS064085	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	64	04.08.2009
ROS065086	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	65	04.08.2009
ROS066087	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	66	04.08.2009
ROS067088	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	67	04.08.2009
ROS068089	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	68	04.08.2009
ROS068090	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	152	68	04.08.2009
ROS069091	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	69	04.08.2009
ROS070092	Adult	Rosenheim, Oberbayern	152	70	04.08.2009
ROS071093	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	71	01.08.2009
ROS072094	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	72	01.08.2009
ROS072095	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	24	72	01.08.2009
ROS073096	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	73	01.08.2009
ROS074097	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	74	01.08.2009
ROS075098	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	75	01.08.2009
ROS075099	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	24	75	01.08.2009
ROS075100	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	24	75	01.08.2009
ROS076101	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	76	01.08.2009
ROS077102	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	77	01.08.2009
ROS077103	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	24	77	01.08.2009

ROS078104	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	78	01.08.2009
ROS079105	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	79	01.08.2009
ROS080106	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	80	01.08.2009
ROS080107	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	24	80	01.08.2009
ROS081108	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	81	01.08.2009
ROS081109	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	24	81	01.08.2009
ROS082110	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	82	01.08.2009
ROS082111	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	24	82	01.08.2009
ROS083112	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	83	01.08.2009
ROS084113	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	84	01.08.2009
ROS084114	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	84	01.08.2009
ROS085115	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	85	01.08.2009
ROS085116	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	24	85	01.08.2009
ROS085117	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	85	01.08.2009
ROS086118	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	86	01.08.2009
ROS087119	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	87	01.08.2009
ROS087120	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	87	01.08.2009
ROS088121	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	88	01.08.2009
ROS089122	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	89	01.08.2009
ROS089123	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	89	01.08.2009
ROS089124	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	24	89	01.08.2009
ROS090125	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	90	01.08.2009
ROS090126	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	90	01.08.2009
ROS090127	Adult	Rosenheim, Oberbayern	24	90	01.08.2009
ROS091128	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	91	01.08.2009
ROS091129	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	91	01.08.2009
ROS091130	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	91	01.08.2009
ROS091131	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	91	01.08.2009
ROS091132	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	91	01.08.2009
ROS091133	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	91	01.08.2009
ROS091134	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	91	01.08.2009
ROS092135	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	92	01.08.2009
ROS092136	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	92	01.08.2009
ROS092137	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	92	01.08.2009
ROS092138	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	92	01.08.2009
ROS093139	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	93	01.08.2009
ROS093140	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	93	01.08.2009
ROS093141	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	93	01.08.2009
ROS093142	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	93	01.08.2009
ROS094143	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	94	01.08.2009
ROS094144	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	94	01.08.2009
ROS095145	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	95	01.08.2009
ROS095146	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	95	01.08.2009
ROS095147	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	95	01.08.2009
ROS096148	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	96	01.08.2009
ROS096149	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	96	01.08.2009
ROS096150	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	96	01.08.2009
ROS097151	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	97	01.08.2009
ROS098152	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	98	01.08.2009
ROS098153	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	98	01.08.2009
ROS099154	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	99	01.08.2009
ROS099155	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	99	01.08.2009
ROS100156	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	100	01.08.2009
ROS101157	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	101	01.08.2009
ROS101158	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	21	101	01.08.2009
ROS101160	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	21	101	01.08.2009

ROS102161	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	102	01.08.2009
ROS102162	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	21	102	01.08.2009
ROS102163	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	21	102	01.08.2009
ROS103164	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	103	01.08.2009
ROS103165	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	103	01.08.2009
ROS104166	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	104	01.08.2009
ROS104167	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	104	01.08.2009
ROS105168	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	105	01.08.2009
ROS106169	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	106	01.08.2009
ROS106170	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	106	01.08.2009
ROS107171	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	107	01.08.2009
ROS107172	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	107	01.08.2009
ROS107173	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	21	107	01.08.2009
ROS108174	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	108	01.08.2009
ROS108175	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	108	01.08.2009
ROS108176	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	108	01.08.2009
ROS108177	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	108	01.08.2009
ROS108178	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	108	01.08.2009
ROS108179	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	108	01.08.2009
ROS108180	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	108	01.08.2009
ROS109181	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	109	01.08.2009
ROS109182	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	109	01.08.2009
ROS109183	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	109	01.08.2009
ROS110184	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	110	01.08.2009
ROS110185	Adult	Rosenheim, Oberbayern	21	110	01.08.2009
ROS111186	Adult	Rosenheim, Oberbayern	84	111	01.08.2009
ROS112187	Adult	Rosenheim, Oberbayern	84	112	01.08.2009
ROS113188	Adult	Rosenheim, Oberbayern	84	113	01.08.2009
ROS113189	Adult	Rosenheim, Oberbayern	84	113	01.08.2009
ROS113190	Adult	Rosenheim, Oberbayern	84	113	01.08.2009
ROS113191	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	84	113	01.08.2009
ROS114192	Adult	Rosenheim, Oberbayern	84	114	01.08.2009
ROS115193	Adult	Rosenheim, Oberbayern	84	115	01.08.2009
ROS115194	Adult	Rosenheim, Oberbayern	84	115	01.08.2009
ROS116195	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	116	01.08.2009
ROS116196	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	116	01.08.2009
ROS116197	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	116	01.08.2009
ROS116198	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	116	01.08.2009
ROS117199	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	117	01.08.2009
ROS117200	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	117	01.08.2009
ROS117201	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	117	01.08.2009
ROS118202	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	118	01.08.2009
ROS119203	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	119	01.08.2009
ROS119204	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	119	01.08.2009
ROS119205	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	119	01.08.2009
ROS119206	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	119	01.08.2009
ROS120207	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	120	01.08.2009
ROS120208	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	120	01.08.2009
ROS121209	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	121	01.08.2009
ROS121210	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	121	01.08.2009
ROS121211	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	121	01.08.2009
ROS122212	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	122	01.08.2009
ROS122213	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	122	01.08.2009
ROS122214	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	122	01.08.2009
ROS123215	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	123	01.08.2009
ROS123216	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	123	01.08.2009

ROS123217	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	123	01.08.2009
ROS123218	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	123	01.08.2009
ROS124219	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	124	01.08.2009
ROS125220	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	125	01.08.2009
ROS125221	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	125	01.08.2009
ROS126222	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	126	01.08.2009
ROS127223	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	127	01.08.2009
ROS128224	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	128	01.08.2009
ROS128225	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	128	01.08.2009
ROS128226	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	128	01.08.2009
ROS128227	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	128	01.08.2009
ROS128228	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	128	01.08.2009
ROS128229	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	128	01.08.2009
ROS128230	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	128	01.08.2009
ROS129231	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	129	01.08.2009
ROS129232	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	129	01.08.2009
ROS130233	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	130	01.08.2009
ROS131234	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	131	01.08.2009
ROS131235	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	131	01.08.2009
ROS132236	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	132	01.08.2009
ROS133237	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	133	01.08.2009
ROS134238	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	134	01.08.2009
ROS134239	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	134	01.08.2009
ROS134240	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	134	01.08.2009
ROS135241	Adult	Rosenheim, Oberbayern	51	135	01.08.2009
ROS135242	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	135	01.08.2009
ROS135243	Nymphe	Rosenheim, Oberbayern	51	135	01.08.2009
SAA136244	Adult	Saarlouis, Saarland	105	136	12.08.2009
SAA136245	Adult	Saarlouis, Saarland	105	136	12.08.2009
SAA136246	Adult	Saarlouis, Saarland	105	136	12.08.2009
SAA136247	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	136	12.08.2009
SAA137248	Adult	Saarlouis, Saarland	105	137	12.08.2009
SAA137249	Adult	Saarlouis, Saarland	105	137	12.08.2009
SAA138250	Adult	Saarlouis, Saarland	105	138	12.08.2009
SAA138251	Adult	Saarlouis, Saarland	105	138	12.08.2009
SAA138252	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	138	12.08.2009
SAA139253	Adult	Saarlouis, Saarland	105	139	12.08.2009
SAA139254	Adult	Saarlouis, Saarland	105	139	12.08.2009
SAA139255	Adult	Saarlouis, Saarland	105	139	12.08.2009
SAA140256	Adult	Saarlouis, Saarland	105	140	12.08.2009
SAA140257	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	140	12.08.2009
SAA141258	Adult	Saarlouis, Saarland	105	141	12.08.2009
SAA141259	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	141	12.08.2009
SAA142260	Adult	Saarlouis, Saarland	105	142	12.08.2009
SAA142261	Adult	Saarlouis, Saarland	105	142	12.08.2009
SAA142262	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	142	12.08.2009
SAA143263	Adult	Saarlouis, Saarland	105	143	12.08.2009
SAA144264	Adult	Saarlouis, Saarland	105	144	12.08.2009
SAA144265	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	144	12.08.2009
SAA144266	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	144	12.08.2009
SAA144267	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	144	12.08.2009
SAA145268	Adult	Saarlouis, Saarland	105	145	12.08.2009
SAA146269	Adult	Saarlouis, Saarland	105	146	12.08.2009
SAA146270	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	146	12.08.2009
SAA146271	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	146	12.08.2009
SAA147272	Adult	Saarlouis, Saarland	105	147	12.08.2009

SAA147273	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	147	12.08.2009
SAA148274	Adult	Saarlouis, Saarland	105	148	12.08.2009
SAA148275	Adult	Saarlouis, Saarland	105	148	12.08.2009
SAA148276	Adult	Saarlouis, Saarland	105	148	12.08.2009
SAA149277	Adult	Saarlouis, Saarland	105	149	12.08.2009
SAA149278	Adult	Saarlouis, Saarland	105	149	12.08.2009
SAA150279	Adult	Saarlouis, Saarland	105	150	12.08.2009
SAA150280	Adult	Saarlouis, Saarland	105	150	12.08.2009
SAA150281	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	150	12.08.2009
SAA150282	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	150	12.08.2009
SAA151283	Adult	Saarlouis, Saarland	105	151	12.08.2009
SAA151284	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	151	12.08.2009
SAA152285	Adult	Saarlouis, Saarland	105	152	12.08.2009
SAA152286	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	152	12.08.2009
SAA153287	Adult	Saarlouis, Saarland	105	153	12.08.2009
SAA154288	Adult	Saarlouis, Saarland	105	154	12.08.2009
SAA154289	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	154	12.08.2009
SAA154290	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	154	12.08.2009
SAA154291	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	154	12.08.2009
SAA155292	Adult	Saarlouis, Saarland	105	155	12.08.2009
SAA155293	Adult	Saarlouis, Saarland	105	155	12.08.2009
SAA155294	Nymphe	Saarlouis, Saarland	105	155	12.08.2009
SAA156295	Adult	Saarlouis, Saarland	414	156	12.08.2009
SAA157296	Adult	Saarlouis, Saarland	414	157	12.08.2009
SAA157297	Adult	Saarlouis, Saarland	414	157	12.08.2009
SAA157298	Nymphe	Saarlouis, Saarland	414	157	12.08.2009
SAA158299	Adult	Saarlouis, Saarland	414	158	12.08.2009
SAA158300	Adult	Saarlouis, Saarland	414	158	12.08.2009
SAA158301	Nymphe	Saarlouis, Saarland	414	158	12.08.2009
SAA158302	Nymphe	Saarlouis, Saarland	414	158	12.08.2009
SAA159303	Adult	Saarlouis, Saarland	414	159	12.08.2009
SAA160304	Adult	Saarlouis, Saarland	414	160	12.08.2009
SAA161305	Adult	Saarlouis, Saarland	414	161	12.08.2009
SAA162306	Adult	Saarlouis, Saarland	414	162	12.08.2009
SAA163307	Adult	Saarlouis, Saarland	414	163	12.08.2009
SAA163308	Nymphe	Saarlouis, Saarland	414	163	12.08.2009
SAA164309	Adult	Saarlouis, Saarland	414	164	12.08.2009
SAA165310	Adult	Saarlouis, Saarland	414	165	12.08.2009
SAA165311	Adult	Saarlouis, Saarland	414	165	12.08.2009
SAA165312	Nymphe	Saarlouis, Saarland	414	165	12.08.2009
SAA165313	Nymphe	Saarlouis, Saarland	414	165	12.08.2009
SAA166314	Adult	Saarlouis, Saarland	414	166	12.08.2009
SAA166315	Adult	Saarlouis, Saarland	414	166	12.08.2009
SAA166316	Nymphe	Saarlouis, Saarland	414	166	12.08.2009
SAA167317	Adult	Saarlouis, Saarland	414	167	12.08.2009
SAA167318	Nymphe	Saarlouis, Saarland	414	167	12.08.2009
SAA168319	Adult	Saarlouis, Saarland	414	168	12.08.2009
SAA168320	Nymphe	Saarlouis, Saarland	414	168	12.08.2009
SAA169321	Adult	Saarlouis, Saarland	414	169	12.08.2009
SAA169322	Adult	Saarlouis, Saarland	414	169	12.08.2009
SAA170323	Adult	Saarlouis, Saarland	414	170	12.08.2009
SAA170324	Adult	Saarlouis, Saarland	414	170	12.08.2009
SAA170325	Nymphe	Saarlouis, Saarland	414	170	12.08.2009
SAA171326	Adult	Saarlouis, Saarland	414	171	12.08.2009
SAA172327	Adult	Saarlouis, Saarland	414	172	12.08.2009
SAA172328	Nymphe	Saarlouis, Saarland	414	172	12.08.2009

SAA173329	Adult	Saarlouis, Saarland	414	173	12.08.2009
SAA173330	Adult	Saarlouis, Saarland	414	173	12.08.2009
SAA173331	Adult	Saarlouis, Saarland	414	173	12.08.2009
SAA173332	Adult	Saarlouis, Saarland	414	173	12.08.2009
SAA173333	Adult	Saarlouis, Saarland	414	173	12.08.2009
SAA173334	Adult	Saarlouis, Saarland	414	173	12.08.2009
SAA173335	Nymphe	Saarlouis, Saarland	414	173	12.08.2009
SAA174336	Adult	Saarlouis, Saarland	414	174	12.08.2009
SAA174337	Nymphe	Saarlouis, Saarland	414	174	12.08.2009
SAA175338	Adult	Saarlouis, Saarland	414	175	12.08.2009
SAA175339	Adult	Saarlouis, Saarland	414	175	12.08.2009
SAA175340	Adult	Saarlouis, Saarland	414	175	12.08.2009
SAA175341	Nymphe	Saarlouis, Saarland	414	175	12.08.2009
SAA176342	Adult	Saarlouis, Saarland	120	176	12.08.2009
SAA176343	Nymphe	Saarlouis, Saarland	120	176	12.08.2009
SAA177344	Adult	Saarlouis, Saarland	120	177	12.08.2009
SAA177345	Nymphe	Saarlouis, Saarland	120	177	12.08.2009
SAA177346	Nymphe	Saarlouis, Saarland	120	177	12.08.2009
SAA178347	Adult	Saarlouis, Saarland	120	178	12.08.2009
SAA179348	Adult	Saarlouis, Saarland	120	179	12.08.2009
SAA179349	Nymphe	Saarlouis, Saarland	120	179	12.08.2009
SAA180350	Adult	Saarlouis, Saarland	120	180	12.08.2009
SAA181351	Adult	Saarlouis, Saarland	120	181	12.08.2009
SAA181352	Nymphe	Saarlouis, Saarland	120	181	12.08.2009
SAA181353	Nymphe	Saarlouis, Saarland	120	181	12.08.2009
SAA182354	Adult	Saarlouis, Saarland	120	182	12.08.2009
SAA182355	Adult	Saarlouis, Saarland	120	182	12.08.2009
SAA182356	Adult	Saarlouis, Saarland	120	182	12.08.2009
SAA183357	Adult	Saarlouis, Saarland	120	183	12.08.2009
SAA184358	Adult	Saarlouis, Saarland	120	184	12.08.2009
SAA185359	Adult	Saarlouis, Saarland	120	185	12.08.2009
SAA186360	Adult	Saarlouis, Saarland	120	186	12.08.2009
SAA186361	Adult	Saarlouis, Saarland	120	186	12.08.2009
SAA186362	Adult	Saarlouis, Saarland	120	186	12.08.2009
SAA186363	Adult	Saarlouis, Saarland	120	186	12.08.2009
SAA187364	Adult	Saarlouis, Saarland	120	187	12.08.2009
SAA187365	Adult	Saarlouis, Saarland	120	187	12.08.2009
SAA187366	Adult	Saarlouis, Saarland	120	187	12.08.2009
SAA188367	Adult	Saarlouis, Saarland	120	188	12.08.2009
SAA188368	Adult	Saarlouis, Saarland	120	188	12.08.2009
SAA188369	Adult	Saarlouis, Saarland	120	188	12.08.2009
SAA188370	Adult	Saarlouis, Saarland	120	188	12.08.2009
SAA189371	Adult	Saarlouis, Saarland	120	189	12.08.2009
SAA190372	Adult	Saarlouis, Saarland	120	190	12.08.2009
SAA191373	Adult	Saarlouis, Saarland	120	191	12.08.2009
SAA192374	Adult	Saarlouis, Saarland	120	192	12.08.2009
SAA192375	Adult	Saarlouis, Saarland	120	192	12.08.2009
SAA192376	Adult	Saarlouis, Saarland	120	192	12.08.2009
SAA192377	Adult	Saarlouis, Saarland	120	192	12.08.2009
SAA193378	Adult	Saarlouis, Saarland	120	193	12.08.2009
SAA194379	Adult	Saarlouis, Saarland	120	194	12.08.2009
SAA195380	Adult	Saarlouis, Saarland	120	195	12.08.2009
SAA195381	Adult	Saarlouis, Saarland	120	195	12.08.2009
SAA195382	Adult	Saarlouis, Saarland	120	195	12.08.2009
SAA196383	Adult	Saarlouis, Saarland	52	196	12.08.2009
SAA196384	Nymphe	Saarlouis, Saarland	52	196	12.08.2009

SAA197385	Adult	Saarlouis, Saarland	52	197	12.08.2009
SAA197386	Nymphe	Saarlouis, Saarland	52	197	12.08.2009
SAA198387	Adult	Saarlouis, Saarland	52	198	12.08.2009
SAA199388	Adult	Saarlouis, Saarland	52	199	12.08.2009
SAA199389	Adult	Saarlouis, Saarland	52	199	12.08.2009
SAA199390	Nymphe	Saarlouis, Saarland	52	199	12.08.2009
SAA216391	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	216	12.08.2009
SAA216392	Nymphe	Saarlouis, Saarland	109 HG	216	12.08.2009
SAA217393	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	217	12.08.2009
SAA218394	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	218	12.08.2009
SAA219395	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	219	12.08.2009
SAA219396	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	219	12.08.2009
SAA220397	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	220	12.08.2009
SAA221398	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	221	12.08.2009
SAA221399	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	221	12.08.2009
SAA221400	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	221	12.08.2009
SAA221401	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	221	12.08.2009
SAA222402	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	222	12.08.2009
SAA223403	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	223	12.08.2009
SAA224404	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	224	12.08.2009
SAA224405	Nymphe	Saarlouis, Saarland	109 HG	224	12.08.2009
SAA225406	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	225	12.08.2009
SAA225407	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	225	12.08.2009
SAA225408	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	225	12.08.2009
SAA225409	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	225	12.08.2009
SAA225410	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	225	12.08.2009
SAA225411	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	225	12.08.2009
SAA225412	Nymphe	Saarlouis, Saarland	109 HG	225	12.08.2009
SAA225413	Nymphe	Saarlouis, Saarland	109 HG	225	12.08.2009
SAA226414	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	226	12.08.2009
SAA226415	Nymphe	Saarlouis, Saarland	109 HG	226	12.08.2009
SAA227416	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	227	12.08.2009
SAA227417	Nymphe	Saarlouis, Saarland	109 HG	227	12.08.2009
SAA228418	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	228	12.08.2009
SAA229419	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	229	12.08.2009
SAA229420	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	229	12.08.2009
SAA229421	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	229	12.08.2009
SAA229422	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	229	12.08.2009
SAA230423	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	230	12.08.2009
SAA230424	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	230	12.08.2009
SAA230425	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	230	12.08.2009
SAA230426	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	230	12.08.2009
SAA230427	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	230	12.08.2009
SAA230428	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	230	12.08.2009
SAA231429	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	231	12.08.2009
SAA231430	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	231	12.08.2009
SAA231431	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	231	12.08.2009
SAA232432	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	232	12.08.2009
SAA233433	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	233	12.08.2009
SAA233434	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	233	12.08.2009
SAA233435	Nymphe	Saarlouis, Saarland	109 HG	233	12.08.2009
SAA233436	Nymphe	Saarlouis, Saarland	109 HG	233	12.08.2009
SAA234437	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	234	12.08.2009
SAA234438	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	234	12.08.2009
SAA234439	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	234	12.08.2009
SAA235440	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	235	12.08.2009

SAA236441	Adult	Saarlouis, Saarland	109 HG	236	12.08.2009
SAA236442	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	236	12.08.2009
SAA237443	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	237	12.08.2009
SAA237444	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	237	12.08.2009
SAA237445	Nymphe	Saarlouis, Saarland	56 HG	237	12.08.2009
SAA237446	Nymphe	Saarlouis, Saarland	56 HG	237	12.08.2009
SAA238447	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	238	12.08.2009
SAA238448	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	238	12.08.2009
SAA239449	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	239	12.08.2009
SAA239450	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	239	12.08.2009
SAA239451	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	239	12.08.2009
SAA240452	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	240	12.08.2009
SAA240453	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	240	12.08.2009
SAA240454	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	240	12.08.2009
SAA240455	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	240	12.08.2009
SAA240456	Nymphe	Saarlouis, Saarland	56 HG	240	12.08.2009
SAA241457	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	241	12.08.2009
SAA241458	Nymphe	Saarlouis, Saarland	56 HG	241	12.08.2009
SAA241459	Nymphe	Saarlouis, Saarland	56 HG	241	12.08.2009
SAA242460	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	242	12.08.2009
SAA242461	Nymphe	Saarlouis, Saarland	56 HG	242	12.08.2009
SAA242462	Nymphe	Saarlouis, Saarland	56 HG	242	12.08.2009
SAA243463	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	243	12.08.2009
SAA243464	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	243	12.08.2009
SAA243465	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	243	12.08.2009
SAA243466	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	243	12.08.2009
SAA243467	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	243	12.08.2009
SAA244468	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	244	12.08.2009
SAA245469	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	245	12.08.2009
SAA245470	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	245	12.08.2009
SAA246471	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	246	12.08.2009
SAA246472	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	246	12.08.2009
SAA246473	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	246	12.08.2009
SAA246474	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	246	12.08.2009
SAA246475	Nymphe	Saarlouis, Saarland	56 HG	246	12.08.2009
SAA247476	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	247	12.08.2009
SAA247477	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	247	12.08.2009
SAA247478	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	247	12.08.2009
SAA247479	Nymphe	Saarlouis, Saarland	56 HG	247	12.08.2009
SAA248480	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	248	12.08.2009
SAA248481	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	248	12.08.2009
SAA248482	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	248	12.08.2009
SAA248483	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	248	12.08.2009
SAA249484	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	249	12.08.2009
SAA249485	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	249	12.08.2009
SAA249486	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	249	12.08.2009
SAA250487	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	250	12.08.2009
SAA250488	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	250	12.08.2009
SAA250489	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	250	12.08.2009
SAA250490	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	250	12.08.2009
SAA251491	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	251	12.08.2009
SAA251492	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	251	12.08.2009
SAA251493	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	251	12.08.2009
SAA252494	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	252	12.08.2009
SAA253495	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	253	12.08.2009
SAA253496	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	253	12.08.2009

SAA254497	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	254	12.08.2009
SAA254498	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	254	12.08.2009
SAA254499	Nymphe	Saarlouis, Saarland	56 HG	254	12.08.2009
SAA255500	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	255	12.08.2009
SAA255501	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	255	12.08.2009
SAA255502	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	255	12.08.2009
SAA255503	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	255	12.08.2009
SAA255504	Adult	Saarlouis, Saarland	56 HG	255	12.08.2009
SAA255505	Nymphe	Saarlouis, Saarland	56 HG	255	12.08.2009
WEI256506	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	256	01.08.2009
WEI256507	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	256	01.08.2009
WEI257508	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	257	01.08.2009
WEI257509	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	257	01.08.2009
WEI257510	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	257	01.08.2009
WEI258511	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	258	01.08.2009
WEI258512	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	258	01.08.2009
WEI259513	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	259	01.08.2009
WEI259514	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	259	01.08.2009
WEI259515	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	259	01.08.2009
WEI260516	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	260	01.08.2009
WEI260517	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	260	01.08.2009
WEI260518	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	260	01.08.2009
WEI261519	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	261	01.08.2009
WEI261520	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	261	01.08.2009
WEI261521	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	261	01.08.2009
WEI261522	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	261	01.08.2009
WEI261523	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	261	01.08.2009
WEI261524	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	261	01.08.2009
WEI261525	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	261	01.08.2009
WEI262526	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	262	01.08.2009
WEI262527	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	262	01.08.2009
WEI263528	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	263	01.08.2009
WEI264529	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	264	01.08.2009
WEI265530	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	265	01.08.2009
WEI265531	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	265	01.08.2009
WEI266532	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	266	01.08.2009
WEI266533	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	266	01.08.2009
WEI267534	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	267	01.08.2009
WEI267535	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	267	01.08.2009
WEI267536	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	267	01.08.2009
WEI268537	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	268	01.08.2009
WEI268538	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	268	01.08.2009
WEI268539	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	268	01.08.2009
WEI268540	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	268	01.08.2009
WEI268541	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	268	01.08.2009
WEI268542	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	268	01.08.2009
WEI268543	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	268	01.08.2009
WEI269544	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	269	01.08.2009
WEI270546	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	270	01.08.2009
WEI270547	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	270	01.08.2009
WEI271548	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	271	01.08.2009
WEI271549	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	271	01.08.2009
WEI271550	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	271	01.08.2009
WEI271551	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	271	01.08.2009
WEI271552	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	271	01.08.2009
WEI272553	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	272	01.08.2009

WEI272554	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	272	01.08.2009
WEI272555	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	272	01.08.2009
WEI272556	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	272	01.08.2009
WEI273557	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	273	01.08.2009
WEI273558	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	273	01.08.2009
WEI274559	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	274	01.08.2009
WEI275560	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	275	01.08.2009
WEI275561	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	151	275	01.08.2009
WEI275562	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	275	01.08.2009
WEI275563	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	151	275	01.08.2009
WEI276564	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	276	01.08.2009
WEI277565	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	277	01.08.2009
WEI278566	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	278	01.08.2009
WEI278567	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	278	01.08.2009
WEI278568	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	292	278	01.08.2009
WEI279569	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	279	01.08.2009
WEI279570	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	279	01.08.2009
WEI279571	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	292	279	01.08.2009
WEI280572	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	280	01.08.2009
WEI280573	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	292	280	01.08.2009
WEI281574	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	281	01.08.2009
WEI282575	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	282	01.08.2009
WEI283576	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	283	01.08.2009
WEI284577	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	284	01.08.2009
WEI285578	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	292	285	01.08.2009
WEI286579	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	286	01.08.2009
WEI286580	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	286	01.08.2009
WEI286581	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	286	01.08.2009
WEI287582	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	292	287	01.08.2009
WEI287583	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	292	287	01.08.2009
WEI288584	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	288	01.08.2009
WEI288585	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	292	288	01.08.2009
WEI289586	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	289	01.08.2009
WEI290587	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	290	01.08.2009
WEI290588	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	292	290	01.08.2009
WEI291589	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	291	01.08.2009
WEI291590	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	291	01.08.2009
WEI291591	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	292	291	01.08.2009
WEI291592	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	292	291	01.08.2009
WEI291593	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	292	291	01.08.2009
WEI292594	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	292	01.08.2009
WEI293595	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	293	01.08.2009
WEI293596	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	292	293	01.08.2009
WEI294597	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	294	01.08.2009
WEI295598	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	292	295	01.08.2009
WEI296599	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	296	01.08.2009
WEI297600	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	297	01.08.2009
WEI298601	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	298	01.08.2009
WEI299602	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	299	01.08.2009
WEI300603	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	300	01.08.2009
WEI301604	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	301	01.08.2009
WEI302605	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	302	01.08.2009
WEI303606	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	303	01.08.2009
WEI304607	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	304	01.08.2009
WEI304608	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	507	304	01.08.2009
WEI305609	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	507	305	01.08.2009

WEI306610	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	306	01.08.2009
WEI307611	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	307	01.08.2009
WEI307612	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	507	307	01.08.2009
WEI308613	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	308	01.08.2009
WEI308614	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	308	01.08.2009
WEI309615	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	309	01.08.2009
WEI309616	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	507	309	01.08.2009
WEI310617	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	310	01.08.2009
WEI311618	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	507	311	01.08.2009
WEI311619	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	507	311	01.08.2009
WEI312620	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	312	01.08.2009
WEI312621	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	507	312	01.08.2009
WEI313622	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	313	01.08.2009
WEI314623	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	314	01.08.2009
WEI315624	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	507	315	01.08.2009
WEI316625	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	B26	316	01.08.2009
WEI316626	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	B26	316	01.08.2009
WEI316627	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	B26	316	01.08.2009
WEI317628	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	B26	317	01.08.2009
WEI317629	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	B26	317	01.08.2009
WEI317630	Nymphe	Weißenburg, Mittelfranken	B26	317	01.08.2009
WEI318631	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	B26	318	01.08.2009
WEI319632	Adult	Weißenburg, Mittelfranken	B26	319	01.08.2009
WIB320633	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	320	03.08.2009
WIB320634	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	320	03.08.2009
WIB321635	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	321	03.08.2009
WIB321636	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	321	03.08.2009
WIB321637	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	321	03.08.2009
WIB321638	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	321	03.08.2009
WIB322639	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	322	03.08.2009
WIB322640	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	322	03.08.2009
WIB323641	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	323	03.08.2009
WIB323642	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	323	03.08.2009
WIB323643	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	323	03.08.2009
WIB323644	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	323	03.08.2009
WIB324645	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	324	03.08.2009
WIB324646	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	324	03.08.2009
WIB324647	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	324	03.08.2009
WIB325648	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	325	03.08.2009
WIB325649	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	325	03.08.2009
WIB325650	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	325	03.08.2009
WIB325651	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	325	03.08.2009
WIB325652	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	325	03.08.2009
WIB325653	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	325	03.08.2009
WIB325654	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	325	03.08.2009
WIB326655	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	326	03.08.2009
WIB327656	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	327	03.08.2009
WIB327657	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	327	03.08.2009
WIB327658	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	327	03.08.2009
WIB327659	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	327	03.08.2009
WIB328660	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	328	03.08.2009
WIB328661	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	328	03.08.2009
WIB329662	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	329	03.08.2009
WIB329663	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	329	03.08.2009
WIB330664	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	330	03.08.2009
WIB330665	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	330	03.08.2009

WIB330666	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	330	03.08.2009
WIB330667	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	330	03.08.2009
WIB331668	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	331	03.08.2009
WIB331669	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	331	03.08.2009
WIB331670	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	331	03.08.2009
WIB331671	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	331	03.08.2009
WIB332672	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	332	03.08.2009
WIB332673	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	332	03.08.2009
WIB332674	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	332	03.08.2009
WIB333675	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	333	03.08.2009
WIB333676	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	333	03.08.2009
WIB333677	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	333	03.08.2009
WIB334678	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	334	03.08.2009
WIB334679	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	334	03.08.2009
WIB335680	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	335	03.08.2009
WIB335681	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	335	03.08.2009
WIB335682	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	335	03.08.2009
WIB335683	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	335	03.08.2009
WIB335684	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	335	03.08.2009
WIB336685	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	336	03.08.2009
WIB336686	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	336	03.08.2009
WIB336687	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	336	03.08.2009
WIB337688	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	337	03.08.2009
WIB337689	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	337	03.08.2009
WIB337690	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	337	03.08.2009
WIB338691	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	338	03.08.2009
WIB338692	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	338	03.08.2009
WIB338693	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	338	03.08.2009
WIB338694	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	338	03.08.2009
WIB338695	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	338	03.08.2009
WIB339696	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 523	339	03.08.2009
WIB340697	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	340	04.08.2009
WIB340698	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	340	04.08.2009
WIB340699	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	340	04.08.2009
WIB341700	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	341	04.08.2009
WIB341701	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	341	04.08.2009
WIB342702	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	342	04.08.2009
WIB342703	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	342	04.08.2009
WIB343704	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	343	04.08.2009
WIB343705	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	343	04.08.2009
WIB344706	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	344	04.08.2009
WIB345707	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	345	04.08.2009
WIB346708	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	346	04.08.2009
WIB346709	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	346	04.08.2009
WIB347710	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	347	04.08.2009
WIB347711	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	347	04.08.2009
WIB348712	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	348	04.08.2009
WIB348713	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	348	04.08.2009
WIB348714	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	348	04.08.2009
WIB349715	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	349	04.08.2009
WIB350716	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	350	04.08.2009
WIB350717	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	350	04.08.2009
WIB351718	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	351	04.08.2009
WIB352719	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	352	04.08.2009
WIB353720	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	353	04.08.2009
WIB353721	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 508	353	04.08.2009

[illegible]

[illegible]

WIB393834	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 511	393	03.08.2009
WIB393835	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 511	393	03.08.2009
WIB393836	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 511	393	03.08.2009
WIB394837	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 511	394	03.08.2009
WIB394838	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 511	394	03.08.2009
WIB394839	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 511	394	03.08.2009
WIB395840	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 511	395	03.08.2009
WIB396841	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 511	396	03.08.2009
WIB396842	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 511	396	03.08.2009
WIB397843	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 511	397	03.08.2009
WIB398844	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 511	398	03.08.2009
WIB399845	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 511	399	03.08.2009
WIB400846	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	400	03.08.2009
WIB400847	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	400	03.08.2009
WIB400848	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	400	03.08.2009
WIB401849	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	401	03.08.2009
WIB401850	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	401	03.08.2009
WIB401851	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	401	03.08.2009
WIB402852	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	402	03.08.2009
WIB402853	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	402	03.08.2009
WIB403854	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	403	03.08.2009
WIB403855	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	403	03.08.2009
WIB404856	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	404	03.08.2009
WIB404857	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	404	03.08.2009
WIB405858	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	405	03.08.2009
WIB405859	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	405	03.08.2009
WIB406860	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	406	03.08.2009
WIB407861	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	407	03.08.2009
WIB407862	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	407	03.08.2009
WIB407863	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	407	03.08.2009
WIB407864	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	407	03.08.2009
WIB408865	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	408	03.08.2009
WIB408866	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	408	03.08.2009
WIB409867	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	409	03.08.2009
WIB410868	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	410	03.08.2009
WIB411869	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	411	03.08.2009
WIB411870	Nymphe	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	411	03.08.2009
WIB412871	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	412	03.08.2009
WIB413872	Adult	Kitzingen/Main, Unterfranken	EL 532	413	03.08.2009

Anhang 2 PCR-Protokoll

Anzahl Tiere: 96		mil01a	55°	mil01b	55°	mil02	55°	mil03	55°
1	VD109F_F	137	0,07	7,7					
	VD109R								
2	VD146F_F	174		0,07	7,7				
	VD146R								
3	VD114F_F	217		0,11	12,1				
	VD114R								
4	VD119F_F	116				0,10	11,0		
	VD119R								
5	VD001_2F	150				0,10	11,0		
	VD001_1								
6	VD126F_F	117						0,07	7,7
	VD126R								
1	VD112F_T	142	0,07	7,7					
	VD112R								
2	VD121F_T	195		0,06	6,6				
	VD121R								
3	VD134F_T	122						0,12	13,2
	VD134R								
4									
1	VD115F_H	117	0,10	11,0					
	VD115R								
2	VD015F_H	143	0,11	12,1					
	VD015R								
3	VD016F_H	268		0,12	13,2				
	VD016R								
4	VD163F_H	114				0,08	8,8		
	VD163R								
5	VD151F_H	116						0,07	7,7
	VD151R								

Estland-Taq
1µl DNA

Verdünnung:
mil01a 1µl + mil01b 1µl + H2O 2µl
mil02 1µl + H2O 5µl
mil03 1µl + H2O 6µl

programm	VA2
1 95°	20min
2 94°	30sec
3 55°	30sec
4 72°	30sec
5 goto	35x
6 72°	10min
7 4°	16h

Anzahl	PCR	288,0
Taq	0,2	67,4
Buffer	1,5	505,4
dNTP	1,5	505,4
MgCl2	0,9	303,3
Wasser	0,9	303,3

Anhang 3 Sequenz-Alignment des COI-Gens

	10	20	30	40	50	60	70	80
BRA003003	TACAAAGAGG	GAAGAAGCAG	CCTTTTGGAA	ATTTAGGGAT	AATTTACGCT	ATAATAACTA	TCGGTATTTT	AGGTTTTTATT
BRA050054	TACAAAGAGG	GAAGAAGCAG	CCTTTTGGAA	ATTTAGGGAT	AATTTACGCT	ATAATAACTA	TCGGTATTTT	AGGTTTTTATT
ROS063082	TACAAAGAGG	GAAGAAGCAG	CCTTTTGGAA	ATTTAGGGAT	AATTTACGCT	ATAATAACTA	TCGGTATTTT	AGGTTTTTATT
ROS115193	TACAAAGAGG	GAAGAAGCAG	CCTTTTGGAA	ATTTAGGGAT	AATTTACGCT	ATAATAACTA	TCGGTATTTT	AGGTTTTTATT
SAA138268	TACAAAGAGG	GAAGAAGCAG	CCTTTTGGAA	ATTTAGGGAT	AATTTACGCT	ATAATAACTA	TCGGTATTTT	AGGTTTTTATT
SAA138251	TACAAAGAGG	GAAGAAGCAG	CCTTTTGGAA	ATTTAGGGAT	AATTTACGCT	ATAATAACTA	TCGGTATTTT	AGGTTTTTATT
SAA221399	TACAAAGAGG	GAAGAAGCAG	CCTTTTGGAA	ATTTAGGGAT	AATTTACGCT	ATAATAACTA	TCGGTATTTT	AGGTTTTTATT
WEI266533	TACAAAGAGG	GAAGAAGCAG	CCTTTTGGAA	ATTTAGGGAT	AATTTACGCT	ATAATAACTA	TCGGTATTTT	AGGTTTTTATT
WEI317630	TACAAAGAGG	GAAGAAGCAG	CCTTTTGGAA	ATTTAGGGAT	AATTTACGCT	ATAATAACTA	TCGGTATTTT	AGGTTTTTATT
WIB365751	TACAAAGAGG	GAAGAAGCAG	CCTTTTGGAA	ATTTAGGGAT	AATTTACGCT	ATAATAACTA	TCGGTATTTT	AGGTTTTTATT
WIB396841	TACAAAGAGG	GAAGAAGCAG	CCTTTTGGAA	ATTTAGGGAT	AATTTACGCT	ATAATAACTA	TCGGTATTTT	AGGTTTTTATT
Navajas	TACAAAGAGG	GAAGAAGCAG	CCTTTTGGAA	ATTTAGGGAT	AATTTACGCT	ATAATAACTA	TCGGTATTTT	AGGTTTTTATT
	90	100	110	120	130	140	150	160
BRA003003	GTATGGGCTC	ATCATATATT	TACAGTAGGA	ATAGATATTG	ATACTCGAGC	ATATTTTACT	GCAGCTACAA	TAATTATTGC
BRA050054	GTATGGGCTC	ATCATATATT	TACAGTAGGA	ATAGATATTG	ATACTCGAGC	ATATTTTACT	GCAGCTACAA	TAATTATTGC
ROS063082	GTATGGGCTC	ATCATATATT	TACAGTAGGA	ATAGATATTG	ATACTCGAGC	ATATTTTACT	GCAGCTACAA	TAATTATTGC
ROS115193	GTATGGGCTC	ATCATATATT	TACAGTAGGA	ATAGATATTG	ATACTCGAGC	ATATTTTACT	GCAGCTACAA	TAATTATTGC
SAA138268	GTATGGGCTC	ATCATATATT	TACAGTAGGA	ATAGATATTG	ATACTCGAGC	ATATTTTACT	GCAGCTACAA	TAATTATTGC
SAA138251	GTATGGGCTC	ATCATATATT	TACAGTAGGA	ATAGATATTG	ATACTCGAGC	ATATTTTACT	GCAGCTACAA	TAATTATTGC
SAA221399	GTATGGGCTC	ATCATATATT	TACAGTAGGA	ATAGATATTG	ATACTCGAGC	ATATTTTACT	GCAGCTACAA	TAATTATTGC
WEI266533	GTATGGGCTC	ATCATATATT	TACAGTAGGA	ATAGATATTG	ATACTCGAGC	ATATTTTACT	GCAGCTACAA	TAATTATTGC
WEI317630	GTATGGGCTC	ATCATATATT	TACAGTAGGA	ATAGATATTG	ATACTCGAGC	ATATTTTACT	GCAGCTACAA	TAATTATTGC
WIB365751	GTATGGGCTC	ATCATATATT	TACAGTAGGA	ATAGATATTG	ATACTCGAGC	ATATTTTACT	GCAGCTACAA	TAATTATTGC
WIB396841	GTATGGGCTC	ATCATATATT	TACAGTAGGA	ATAGATATTG	ATACTCGAGC	ATATTTTACT	GCAGCTACAA	TAATTATTGC
Navajas	GTATGGGCTC	ATCATATATT	TACAGTAGGA	ATAGATATTG	ATACTCGAGC	ATATTTTACT	GCAGCTACAA	TAATTATTGC
	170	180	190	200	210	220	230	240
BRA003003	GGTTCCTACT	GGTATTAAAA	TTTTTCTTG	ATTAGCAACA	ATTCATGGTT	CTATAGTTAA	ATTAGATGTC	CCGATAATTT
BRA050054	GGTTCCTACT	GGTATTAAAA	TTTTTCTTG	ATTAGCAACA	ATTCATGGTT	CTATAGTTAA	ATTAGATGTC	CCGATAATTT
ROS063082	GGTTCCTACT	GGTATTAAAA	TTTTTCTTG	ATTAGCAACA	ATTCATGGTT	CTATAGTTAA	ATTAGATGTC	CCGATAATTT
ROS115193	GGTTCCTACT	GGTATTAAAA	TTTTTCTTG	ATTAGCAACA	ATTCATGGTT	CTATAGTTAA	ATTAGATGTC	CCGATAATTT
SAA138268	GGTTCCTACT	GGTATTAAAA	TTTTTCTTG	ATTAGCAACA	ATTCATGGTT	CTATAGTTAA	ATTAGATGTC	CCGATAATTT
SAA138251	GGTTCCTACT	GGTATTAAAA	TTTTTCTTG	ATTAGCAACA	ATTCATGGTT	CTATAGTTAA	ATTAGATGTC	CCGATAATTT

SAA221399	GGTTCCTACT	GGTATTAAAA	TTTTTCTTG	ATTAGCAACA	ATTCATGGTT	CTATAGTTAA	ATTAGATGTC	CCGATAATTT
WEI266533	GGTTCCTACT	GGTATTAAAA	TTTTTCTTG	ATTAGCAACA	ATTCATGGTT	CTATAGTTAA	ATTAGATGTC	CCGATAATTT
WEI317630	GGTTCCTACT	GGTATTAAAA	TTTTTCTTG	ATTAGCAACA	ATTCATGGTT	CTATAGTTAA	ATTAGATGTC	CCGATAATTT
WIB365751	GGTTCCTACT	GGTATTAAAA	TTTTTCTTG	ATTAGCAACA	ATTCATGGTT	CTATAGTTAA	ATTAGATGTC	CCGATAATTT
WIB396841	GGTTCCTACT	GGTATTAAAA	TTTTTCTTG	ATTAGCAACA	ATTCATGGTT	CTATAGTTAA	ATTAGATGTC	CCGATAATTT
Nava jas	GGTTCCTACT	GGTATTAAAA	TTTTTCTTG	ATTAGCAACA	ATTCATGGTT	CTATAGTTAA	ATTAGATGTC	CCGATAATTT
	250	260	270	280	290	300	310	320
BRA003003	GATCTTTAGG	TTTTATTTTT	TTATTTACTT	TAGGGGGTAT	TACTGGTGTA	ATTTTAGCTA	ATTCTTCTAT	TGATATTGTT
BRA050054	GATCTTTAGG	TTTTATTTTT	TTATTTACTT	TAGGGGGTAT	TACTGGTGTA	ATTTTAGCTA	ATTCTTCTAT	TGATATTGTT
ROS063082	GATCTTTAGG	TTTTATTTTT	TTATTTACTT	TAGGGGGTAT	TACTGGTGTA	ATTTTAGCTA	ATTCTTCTAT	TGATATTGTT
ROS115193	GATCTTTAGG	TTTTATTTTT	TTATTTACTT	TAGGGGGTAT	TACTGGTGTA	ATTTTAGCTA	ATTCTTCTAT	TGATATTGTT
SAA138268	GATCTTTAGG	TTTTATTTTT	TTATTTACTT	TAGGGGGTAT	TACTGGTGTA	ATTTTAGCTA	ATTCTTCTAT	TGATATTGTT
SAA138251	GATCTTTAGG	TTTTATTTTT	TTATTTACTT	TAGGGGGTAT	TACTGGTGTA	ATTTTAGCTA	ATTCTTCTAT	TGATATTGTT
SAA221399	GATCTTTAGG	TTTTATTTTT	TTATTTACTT	TAGGGGGTAT	TACTGGTGTA	ATTTTAGCTA	ATTCTTCTAT	TGATATTGTT
WEI266533	GATCTTTAGG	TTTTATTTTT	TTATTTACTT	TAGGGGGTAT	TACTGGTGTA	ATTTTAGCTA	ATTCTTCTAT	TGATATTGTT
WEI317630	GATCTTTAGG	TTTTATTTTT	TTATTTACTT	TAGGGGGTAT	TACTGGTGTA	ATTTTAGCTA	ATTCTTCTAT	TGATATTGTT
WIB365751	GATCTTTAGG	TTTTATTTTT	TTATTTACTT	TAGGGGGTAT	TACTGGTGTA	ATTTTAGCTA	ATTCTTCTAT	TGATATTGTT
WIB396841	GATCTTTAGG	TTTTATTTTT	TTATTTACTT	TAGGGGGTAT	TACTGGTGTA	ATTTTAGCTA	ATTCTTCTAT	TGATATTGTT
Nava jas	GATCTTTAGG	TTTTATTTTT	TTATTTACTT	TAGGGGGTAT	TACTGGTGTA	ATTTTAGCTA	ATTCTTCTAT	TGATATTGTT
	330	340	350	360	370	376		
BRA003003	TTACATGATA	CTTATTATGT	AGTAGCACAT	TTTCACTATG	TATTAAGAAT	AGGGGC		
BRA050054	TTACATGATA	CTTATTATGT	AGTAGCACAT	TTTCACTATG	TATTAAGAAT	AGGGGC		
ROS063082	TTACATGATA	CTTATTATGT	AGTAGCACAT	TTTCACTATG	TATTAAGAAT	AGGGGC		
ROS115193	TTACATGATA	CTTATTATGT	AGTAGCACAT	TTTCACTATG	TATTAAGAAT	AGGGGC		
SAA138268	TTACATGATA	CTTATTATGT	AGTAGCACAT	TTTCACTATG	TATTAAGAAT	AGGGGC		
SAA138251	TTACATGATA	CTTATTATGT	AGTAGCACAT	TTTCACTATG	TATTAAGAAT	AGGGGC		
SAA221399	TTACATGATA	CTTATTATGT	AGTAGCACAT	TTTCACTATG	TATTAAGAAT	AGGGGC		
WEI266533	TTACATGATA	CTTATTATGT	AGTAGCACAT	TTTCACTATG	TATTAAGAAT	AGGGGC		
WEI317630	TTACATGATA	CTTATTATGT	AGTAGCACAT	TTTCACTATG	TATTAAGAAT	AGGGGC		
WIB365751	TTACATGATA	CTTATTATGT	AGTAGCACAT	TTTCACTATG	TATTAAGAAT	AGGGGC		
WIB396841	TTACATGATA	CTTATTATGT	AGTAGCACAT	TTTCACTATG	TATTAAGAAT	AGGGGC		
Nava jas	TTACATGATA	CTTATTATGT	AGTAGCACAT	TTTCACTATG	TATTAAGAAT	AGGGGC		

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Martin Förster danke ich herzlichst für die Überlassung des interessanten Themas, für die Bemühungen bei der Beschaffung des Probenmaterials und die freundlich gewährte Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Bei meinen Mitdoktoranden aus dem Mädelszimmer, allen voran Sophie Rothammer, bedanke ich mich für den seelischen Beistand und die grenzenlose Geduld. *Sophie, Du hast wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und warst bei meinen diversen Problemen der Textverarbeitung und Formatierung für mich unersetzbar!*

Herrn Dr. Ivica Medjugorac danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Tatiana Schröter, Uschi Werner, Gisela Andorfer, Renate Damian, Heike Zierahn und Martin Dinkel möchte ich für die fachliche Unterstützung und freundliche Hilfestellung bei der Durchführung der Laboruntersuchungen danken.

Meiner Familie möchte ich von ganzem Herzen für alles danken! Vor allem meinen Eltern, ohne deren Motivation, das in mich gesetzte Vertrauen, den Zuspruch und nicht zuletzt die finanzielle Unterstützung, mein Tiermedizinstudium und die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Dankeschön!