

Beurteilung des Einflusses von Agrarumweltmaßnahmen auf Honigbienen basierend auf genetischer Pollenanalyse mit Nanoporesequenzierung

Birgit Pannicke¹, Lisa Prudnikow¹ und Röbbe Wünschiers¹

¹ Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften

Kurzfassung. Intensive Landnutzung einhergehend mit dem Einsatz von Pestiziden und einer Verminderung des Blütenreichtums ist ein wesentlicher Faktor, der zum Verlust von Bestäuberinsekten beiträgt. Diese Arbeit befasst sich mit der Analyse von Pollenproben, die von Honigbienenvölkern an landwirtschaftlich unterschiedlich intensiv genutzten Standorten stammen. Das Ziel ist die Bestimmung der in den Proben enthaltenen Pflanzenarten anhand von DNA-Barcodes und der Nanoporesequenzierung, um so Aussagen über den Einfluss dieser unterschiedlich genutzten Landschaften auf das Sammelverhalten von Honigbienen treffen zu können. Erste Ergebnisse beinhalten die DNA-Extraktion und die Identifikation universeller Primer als Vorbereitung auf die Sequenzierung mit dem *MinION Mk1c* von *Oxford Nanopore Technologies*.

1. Motivation

Die intensive Landnutzung einhergehend mit dem Einsatz von Pestiziden und einer Verminderung des Blütenreichtums ist ein wesentlicher Faktor, der zum Verlust von Bestäuberinsekten beiträgt [1]. Eine ernstzunehmende Entwicklung, bedenkt man, dass über 70% der weltweiten Kulturpflanzen von Bestäubernetzwerken abhängig sind, wobei insbesondere die Honigbiene ökonomisch eine zentrale Rolle einnimmt [2]. Ökologische Landwirtschaft ist eine Möglichkeit, dieser Problematik zu begegnen – dennoch gilt es zu untersuchen, wie konkrete Maßnahmen (z.B. Blühstreifen) tatsächlich zum Erhalt von Bestäuberinsekten beitragen können [3]. Die Analyse von Bienen-Pollenhöschchen ist ein entscheidender Ansatzpunkt für diese Fragestellung, da sie Auskunft über das Sammelverhalten und die Nahrungsvielfalt der Bestäuber geben [4]. DNA-Metabarcoding und die Nanoporesequenzierung stellen dabei wirksame Werkzeuge dar, die im Hochdurchsatz für eine schnelle und akkurate Zuordnung solcher Pollenproben sorgen können [5].

2. Methodik

Diese Studie ist Teil des *ComBee*-Projektes, einer Kollaboration unter der Leitung der Forschungsgruppe für funktionelle Agrobiodiversität der Universität Göttingen. Das Projekt untersucht dabei die Auswirkungen verschiedener Agrarumweltmaßnahmen auf Bestäuberinsekten [6]. Im Zuge dessen befasst sich diese Arbeit mit der Analyse von Pollenproben, die von Honigbienenvölkern an 19 landwirtschaftlich unterschiedlich intensiv genutzten Standorten stammen. Das Ziel ist die Bestimmung der in den Proben enthaltenen Pflanzenarten anhand von DNA-Barcodes, d.h. kurzen Sequenzabschnitten, die aussagekräftig genug sind, um eine speziesspezifische Zuordnung zu ermöglichen [7]. Da Pollenkörner mit einer sehr robusten Zellwand aus Sporopollenin versehen sind [8], erforderte die DNA-Extraktion der Proben zunächst

einen mechanischen Aufschluss der Pollenkörner mithilfe kleiner Keramikkugeln. Des Weiteren stand im Hinblick auf die anschließende Vervielfältigung der Barcode-Regionen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die Identifikation universeller Primer im Vordergrund, um eine Amplifikation der entsprechenden DNA-Abschnitte in einer breiten Masse an Pflanzenspezies zu ermöglichen.

3. Erste Ergebnisse

Der Erfolg der DNA-Extraktion von Pollenproben kann sehr unterschiedlich ausfallen, abhängig von Form, Größe und Zusammensetzung der Pollenzellwand [9]. Aus diesem Grund, wurden zunächst unterschiedliche DNA-Extraktionskits getestet, um bestmögliche Mengen und Reinheitsgrade an DNA für den weiteren Prozess zu erhalten. Zudem wurden unterschiedliche Barcode-Regionen auf ihre Eignung für das Projekt geprüft – insbesondere im Hinblick auf die *long-read* Nanoporesequenzierung fiel die Wahl zum einen auf das Chloroplastengen für die *RuBisCO large subunit (rbcL)* und zum anderen auf den im Zellkern lokalisierten *Internal transcribed spacer (ITS)*. Zusätzlich wurde für die PCR des *rbcL*-Barcodes ein universeller *reverse* Primer konzipiert, welcher im Vergleich zu vorangegangenen Studien [10; 11] nicht nur einen Teil, sondern die vollständige Amplifikation dieses Genabschnitts ermöglichen soll.

4. Ausblick auf den weiteren Verlauf des Projekts

Die folgenden Schritte dieser Studie beinhalten die Amplifikation der Barcode-Regionen und anschließend die Sequenzierung mit dem *MinION Mk1c* von *Oxford Nanopore Technologies*. Ein weiterer Abschnitt ist die Erstellung einer aktuellen Datenbank für den Abgleich der Barcode-Sequenzen. Die Erkenntnis darüber, aus welchen Pflanzenarten die einzelnen Proben zusammengesetzt sind, soll am Ende in den Kontext des Landschaftsmanagements gesetzt werden. Ziel ist es, dadurch einerseits Aussagen über den Einfluss dieser unterschiedlich genutzten Landschaften auf das Sammelverhalten von Honigbienen treffen zu können und andererseits die Nanoporesequenzierung für die Analyse solcher Umweltproben weiter zu etablieren.

Datenverfügbarkeit

Die Verfügbarkeit von Daten ist für diese Art von Einreichung nicht relevant.

Interessenskonflikte

Die Autor*innen erklären, dass sie keine Interessenskonflikte haben.

Literaturverzeichnis

1. Vanbergen, A. J. and The Insect Pollinators Initiative (2013): Threats to an ecosystem service: Pressures on pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment* 11(5): 251–259.
2. Klein, A.-M. et al. (2007): Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B. Biological sciences*, 274: 303–313.
3. Haaland, C.; Naisbit, R. E. and Bersier, L.-F. (2011): Sown wildflower strips for insect conservation: A review. *Insect Conservation and Diversity*, 4: 60–80.
4. Pornon, A. et al. (2016): Using metabarcoding to reveal and quantify plant-pollinator interactions. *Scientific reports*, 6(27282): 1–12.
5. Leidenfrost, R. M. et al. (2020): Analyzing the dietary diary of bumble bee. *Frontiers in plant science*, 11(287): 1–9.

6. Westphal, C.; Hass, A. and Paxton, R. (2021): ComBee: Kombinierte Agrarumweltmaßnahmen, Bienendiversität und Gesundheitszustand von Wild- und Honigbienen. <https://www.uni-goettingen.de/de/646422.html> [05.05.2022].
7. Fišer Pečnikar, Ž. and Buzan, E. V. (2014): 20 years since the introduction of DNA barcoding: From theory to application. *Journal of applied genetics*, 55: 43–52.
8. Li, F.-S. et al. (2019): The molecular structure of plant sporopollenin. *Nature plants*, 5: 41–46.
9. Hawkins, J. et al. (2015): Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: A new tool for investigating honey bee foraging preferences. *PloS one*, 10(8): 1–20.
10. Bell, K. L. et al. (2017): Applying pollen DNA metabarcoding to the study of plant-pollinator interactions. *Applications in plant sciences*, 5(6): 1–10.
11. Richardson, R. T. et al. (2021): Application of plant metabarcoding to identify diverse honeybee pollen forage along an urban-agricultural gradient. *Molecular ecology*, 30: 310–323.