

IRSTI: 34.35.17

S.T. DAUGALIYEVA^{1*}, A.T. DAUGALIYEVA², S. PELETTO³, A.E. YELUBAYEVA¹,
K.T. AMIROVA¹, A. KAPAR¹, A.I. ABITI¹

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Kazakh Research Institute for livestock and Fodder Production, Almaty, Kazakhstan

³Experimental Institute for Animal Prevention of Piedmont, Liguria and Valle d'Aosta, via
Bologna, Turin, Italy

*e-mail: saule.daugalieva@mail.ru

DETERMINATION OF THE FLORAL COMPOSITION OF HONEY BY METHODS OF PALYNOLOGICAL ANALYSIS AND METABARCODING OF ECOLOGICAL DNA

doi:10.53729/MV-AS.2024.01.08

Abstract

Global climate change on Earth has a significant impact on various populations of living organisms. In recent years, bee populations have been declining in all countries of the world. The main reasons for this phenomenon: the use of chemicals in crop production, urbanization and sowing of vast territories with monocultures, the widespread use of GMO plants, climate change, pathogens and bee diseases.

Determining the botanical composition of honey is an urgent task in the study of bee ecology. Data in the form of taxonomic characteristics of the floral composition of honey can be used to develop measures to protect bee populations, determine the medicinal value, improve the quality and production of honey. The traditional approach to studying the plant composition of honey is palynological analysis of pollen based on microscopic examination, which is labor-intensive, time-consuming and requires special palynological knowledge. The development of next-generation sequencing methods has made it possible to use the amplicon metabarcoding method to determine the floral composition of honey at the gene level. The article describes methods for determining the botanical composition of honey using the classical palynological method and using metabarcoding of environmental DNA of honey, and describes their advantages and disadvantages.

Keywords: honey, bees, metabarcoding, palynological analysis.

The rapid decline of bee populations and the associated impacts on plant biodiversity is a global problem. According to the World Bee Fund, in the United States over the past decades the number of bee colonies has decreased from 6 to 4.5 million (30-35% of bee colonies die out every year), in Russia - from 4.3 to 3.09 million [1]. In Europe, 20% of bee families are lost every year; the situation is similar in Latin America and China [2]. The number of honey bees is also declining in Kazakhstan. According to statistics, one Kazakhstani eats only 10 grams of honey per month. This is 20 times less than what residents of the European Union consume [3].

According to the UN, bees are disappearing 8 times faster than other animals, and if this trend continues, then by 2035 there will be no bees left on the planet. The death of bees could lead to the extinction of thousands of plant species, which could lead to starvation of people. The range of plant products for people and livestock will decrease. The food will become monotonous.

Beekeeping, being a branch of agriculture, provides humanity with one third of the food consumed. The problem of the disappearance of bees is of great social importance, since the decline in the bee population poses a threat to the food security of mankind. According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations, production of pollination-dependent crops has increased by 300% over the past 50 years. About 85% of plants grown by humans and 90% of wild ones need pollination. Lack of pollination can lead to a decrease in plant diversity. Maintaining bee populations is necessary to preserve plant biodiversity and feed for people and

animals. In addition to honey, bees produce products used in various industries. Preservation of bees is necessary for healthcare, cosmetics industry, food production, etc. Beekeeping is a source of income for many people, especially in rural areas. Understanding which plants pollinators use is important for planning conservation efforts by providing appropriate floral resources to prevent bee loss.

The reasons for the decline in the bee population are: pesticides, climate change, landscape of crops (seeding areas under monoculture, ornamental and GMO plants), pathogens and parasites of bees [4]. Since 2000, the phenomenon of “bee colony destruction syndrome” has been observed, when bees leave the hives en masse and do not return, that is, worker honeybees leave the hives forever, leaving behind queens, food supplies and nurse bees [5]. The reasons for this phenomenon have not yet been clarified still.

One of the factors in the decline in the number of wild and cultivated bees is the lack of floral resources and poor nutrition. Sowing monocultures makes the diet of bees poorer and more monotonous [6]. The landscape of arable crops that we need for food production causes restrictions on the nutrition of bees [7]. Urbanization and development of suburban areas are robbing bees of their foraging areas. The main part of ornamental plants in urban and suburban areas cannot serve as a food source for bees [8].

Honeybees and bee products are bioindicators of pollutants, such as heavy metals and pesticides, and allow us to track changes in agricultural intensification, productivity, and ecology [9]. Quantitative and qualitative assessment of plant species that are eaten by bees gives an idea of the state of their nutrition and patterns of use of the surrounding landscape to preserve their population [10].

A generally accepted method for determining the plant composition of honey is microscopic analysis of pollen or palynological analysis. Palynological analysis is a research method that allows to determine the taxonomic affiliation of plants based on the morphological characteristics of pollen grains. Melisopalynological analysis studies the composition of pollen in honey and allows to reliably diagnose the botanical and geographical origin of honey and other bee products [11-14]. The effectiveness of palynological analysis is due to the large number of pollen grains with characteristic features in honey samples, which makes it possible to determine the taxonomic affiliation of the plants from which the honey was obtained. The undoubted advantage of the method is its low cost and the use of a minimum amount of equipment (centrifuge, microscope). The disadvantage of the method is that some plant species have similar pollen grain morphology, which makes accurate botanical identification difficult. In addition, traditional approaches based on microscopic observation of pollen are labor-intensive, time-consuming, and lack practitioners with specialized knowledge in palynology [15,16].

One of the alternative solutions to this issue is the use of DNA metabarcoding method. The DNA used to study the floral composition of honey is classified as environmental DNA. eDNA is genetic material isolated from environmental samples [17]. The use of eDNA to study the genetic structure of populations allows one to reconstruct their history, assess their current state, and predict future prospects, which is necessary for planning environmental measures [18]. Environmental DNA of honey contains traces of DNA from food plants, bee bacteria and hive pathogens. Analysis of eDNA of honey makes it possible to determine the plant biodiversity of honey and the influence of ecosystems on its composition [19 - 23].

The proliferation of NGS (next generation sequencing) has facilitated the use of metabarcoding to study the taxonomic composition of samples based on unique DNA sequences [15]. For example, to determine the taxonomic composition of the bacterial community, the 16S ribosomal gene is used as a genetic marker [24]. To assess plant diversity, the plastid genes ribulose biphosphate carboxylase (rbcL) and maturase K (matK), the chloroplast marker trnL and ITS are used. The universality of rbcL primers is 100%, and matK – 35% [25]. The rbcL barcode is effective in identifying the botanical origin of honey with a probability of 99 to 100% [26]. The use of a combination of ITS2 and rbcL markers provides a reliable determination of the geographical origin of honey [27].

Identification of nectar-bearing plants also can be used to determine species falsification of honey, which is difficult to detect. By the plant composition of honey, can determine the type, authenticity, quality and origin of honey. An experimental study of 85 monofloral honey samples showed that 72 were consistent with the label claims and 13 were not [28]. Tomonori Matsuzawa et al., in an eDNA analysis of 14 types of honey sold in supermarkets, found discrepancies between the plants listed on the labels and the species whose DNA was most prominent in the sample [29]. When comparing 75 samples of honey from apiaries and store-bought honey using bacterial 16S gene metabarcoding, differences in alpha and beta diversity of microbial communities were found. In particular, contaminant bacteria dominated the microbiota of store-bought honey samples, while lactic acid bacteria predominated in samples from apiaries [29].

The advantage of the metabarcoding method is the larger sample size and the detection of pollen present in low quantities. Metabarcoding allows for more and more reliable identification of plant taxa [20,30,31]. Thanks to metabarcoding, it is possible to find out the geographical origin and bacterial composition of honey, and to conduct a comparative analysis of the food supply of bees of different populations [26,32,33]. The disadvantage of this method is the high cost, labor-intensive sample preparation, and the need for data processing using special programs.

Thus, we can conclude that both palynological and molecular genetic methods make it possible to determine the floral composition of honey, but metabarcoding of individual genes provides more accurate and reliable information.

Conclusion

Studying the decline in bee populations in nature is a pressing environmental problem. One of the methods for solving this issue is to determine the botanical composition of honey. It is necessary for assessing the food preferences of bees, the efficiency of plant pollination, and monitoring climate change. Thanks to knowledge of the foraging preferences of bees and analysis of their decline, recommendations can be made for crop rotation in bee habitats.

The main methods for determining the biodiversity of honey are classical palynological analysis, and well as more modern DNA metabarcoding analysis, based on the determination of molecular genetic markers of the present plants in honey. Multilocus metabarcoding using a combination of ITS2 and rbcL is a reliable method for determining the floral composition and geographic origin of honey, as it can detect DNA from rare pollen grains and identify plants down to the species level.

Funding

The work was carried out with financial support from the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (grant No. AP19676294).

References:

- 1 V mire vymirajut pchjoly. Kak jeto povlijaet na chelovechestvo i chto mozžno sdelat'? (<https://sberegipianetu.ru/publications/v-mire-vymiraiut-pchely-kak-eto-povliiaet-nachelo-vechestvo-i-cto-mozhno-sdelat>)
- 2 Pchelinyj kollaps. (<http://www.futurible.space/ru/winners/96/>)
- 3 Chislennost' medonosnyh pchjol sokrashhaetsja v Kazahstane. (<https://24.kz/ru/tv-projects/agrolife/item/566646-chislennost-medonosnykh-pchjol-krash-chaetsya-v-kazahstane-agrolife>)
- 4 Subotic S., Boddicker A.M., Nguyen V.M., Rivers J., Briles C.E., Mosier A.C. Honey bee microbiome associated with different hive and sample types over a honey production season. *PLOS ONE*, 2019, 8 (doi.org/10.1371/journal.pone.0223834)
- 5 Kimberly A. Colony Collapse Disorder and Its Impact on the Economy. March 4, 2021. (<https://www.thebalancemoney.com/bee-colony-collapse-disorder-facts-and-economic-impact-3305815>)
- 6 Clair A., Zhang G., Dolezal A.G., O'Neal M.E., and Toth A.L. Diversified Farming in a Monoculture Landscape: Effects on Honey Bee Health and Wild Bee Communities. *Environmental*

Entomology, 2020, 49(3): 753–764 (doi:10.1093/ee/nvaa031)

7 Silliman M.R., Schürch R., Malone S., Taylor S.V., Couvillon M.J. Row crop fields provide mid-summer forage for honey bees. *Ecology and Evolution*, 2022, 12:8979 (doi.org/10.1002/ece3.8979)

8 Sponsler D.B., Grozinger C.M., Richardson R.T., Nurse A., Brough D., Patch H.M., Stoner K.A. A screening-level assessment of the pollinator-attractiveness of ornamental nursery stock using a honey bee foraging assay. *Scientific Reports*, 2020,10:831 (doi.org/10.1038/s41598-020-57858-2)

9 Papa G., Maier R., Durazzo A., Lucarini M., Karabagias I.K., Plutino M., Bianchetto E., Aromolo R., Pignatti G., Ambrogio A., Pellecchia M. and Negri I. The Honey Bee *Apis mellifera*: An Insect at the Interface between Human and Ecosystem Health. *Biology*, 2022, 11:233 (doi.org/10.3390/biology11020233)

10 Oliver A.E., Newbold L.K., Gweon H.S., Read D.S., Woodcock B.A., Pywell R.F. Integration of DNA extraction, metabarcoding and an informatics pipeline to underpin a national citizen science honey monitoring scheme. *MethodsX*, 2021, 8:101303. (doi.org/10.1016/j.mex.2021.101303)

11 Jamwal R. and Mattu V.K. Melissopalynological Determination of Pollen Density and Botanical Origin of Autumn Honeys of Kullu Hills, Himachal Pradesh, India. *Indian Journal of Agricultural Research*, 2022, 56(4):381-388. (doi: 10.18805/IJARE.A-5605)

12 Shakoori Z., Mehrabian A., Minai D., Salmanpour F., Khajoei N.F. Assessing the quality of bee honey on the basis of melissopalynology as well as chemical analysis. *PLoS ONE*, 2023,18(8):289702 (doi.org/ 10.1371/journal.pone.0289702)

13 Pospiech M., Javurková Z., Hrabec P., Cížková H., Titera D., Štarha P., Ljasovská S., Kružík V., Podskalská T., Bednár J. et al. Physico-Chemical and Melissopalynological Characterization of Czech Honey. *Appl. Sci.* 2021, 11:4989 (doi.org/10.3390/app11114989)

14 Tulu D., Aleme M., Mengistu G., Bogale A., Bezabeh A., Mendesil E. Melissopalynological analysis and floral spectra of *Apis mellifera scutellata* Lepeletier bees in different agroecologies of southwest Ethiopia. *Heliyon*, 2023, 9:16047 (doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16047)

15 Laha R.C., De Mandal S., Ralte L., Ralte L., Kumar N.S., Gurusubramanian G., Satishkumar R., Mugasimangalam R. and Laha N. *AMB Express*, 2017, 7:132. (doi 10.1186/s13568-017-0429-7)

16 Bell K.L., de Vere N., Keller A., Richardson R.T., Gous A., Burgess K.S., and Brosi B.J. Pollen DNA barcoding: current applications and future Prospects. *Genome*, 2016, 59: 629–640 (doi.org/10.1139/gen-2015-0200)

17 Thomsen P.F., Willerslev E. Environmental DNA – an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 2015, 183:4-18 (doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019)

18 Pinahina D.V., Chekunova E.M. DNK okruzhajushhej sredy: istorija izuchenija, sovremennye i perspektivnye napravlenija v fundamental'nyh i prikladnyh issledovanijah. *Ecological genetics*, 2020, 18(4) (doi.org/10.17816/ecogen25900)

19 Matsuzawa T., Kohsaka R. and Uchiyama Y. Application of Environmental DNA: Honey Bee behavior and Ecosystems for Sustainable Beekeeping. *IntechOpen*, 2020, 5 (doi: 10.5772/intechopen.92717 www.intechopen.com/chapters/72529)

20 Milla L., Sniderman K., Lines R., Mousavi-Derazmahalleh M., Encinas-Viso F. Pollen DNA metabarcoding identifies regional provenance and high plant diversity in Australian honey. *Ecology and Evolution*, 2021, 11: 8683 – 8698 (doi: 10.1002/ece3.7679)

21 Dolezal A.G., St. Clair A.L., Ge Zhang, Toth A.L. and O'Neal M.E. Native habitat mitigates feast–famine conditions faced by honey bees in an agricultural landscape. *PNAS*, 2019, December 10, vol. 116, 50:25147–25155 (doi/10.1073/pnas.1912801116)

22 Richardson R.T., Lin C.H., Sponsler D.B., Quijia J.O., Goodell K., and Johnson R.M. Application of ITS2 Metabarcoding to Determine the Provenance of Pollen Collected by Honey Bees in an Agroecosystem. *Application in Plant Biocseienec*, 2015, January (doi.org/10.3732/apps.1400066)

23 Potter C., de Vere N., Jones L.E., Ford C.R., Hegarty M.J., Hodder K.H., Diaz A., Franklin E. Pollen metabarcoding reveals broad and species-specific resource use by urban bees. *PeerJ*, 2019.7:5999 (doi 10.7717/peerj.5999)

24 Daugalieva S.T., Daugalieva A.T., Ashanin A.I., Errali B.B. Vlijanie raciona na produktivnost' bychkov kazahskoj belogolovoj porody i koncentraciju arhej v mikrobiome zheludochno-kishechnogo trakta. *Mikrobiologija zhəne virusologija*, 2023, №1 (40) (doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.15)

25 Maloukh L., Kumarappan A., Jarrar M., Salehi J., El-wakil H., Rajya L.T. Discriminatory power of rbcL barcode locus for authentication of some of United Arab Emirates (UAE) native plants. *Biotech*,

2017, 7:144 (doi 10.1007/s13205-017-07-461)

26 Murthy M.K., Khandayataray P., Ralte L., Laha R. and Samal D. Identification of plant species in multi flower honey by using Ribulose-Bisphosphate carboxylase gene (RBC L) coding region as barcode marker, Mizoram, Northeast India: An Indo-Burma hotspot region. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2019, 7(3): 1475-1483. P-ISSN: 2349-6800. <https://www.entomoljournal.com/archives/2019/vol7issue3/PartY/7-3-264-389.pdf>

27 Khansaritoreh E., Salmaki Y., Ramezani E., Azirani T.A., Keller A., Neumann K., Alizadeh K., Zarre S., Beckh G., Behling H. Employing DNA metabarcoding to determine the geographical origin of honey. *Heliyon*, 2020, 6 (doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05596)

28 Beltramo C., Cerutti F., Brusa F., Mogliotti P., Garrone A., Squadrone S., Acutis P.L., Peletto S. Exploring the botanical composition of polyfloral and monofloral honeys through DNA metabarcoding. *Food Control*, 2021, 128:108175 (doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108175)

29 Balzana S., Carraro L., Merlantia R., Lucatello L., Capolongo F., Fontana F., Novellia E., Larini I., Vitulo N., Cardazzo B. Microbial metabarcoding highlights different bacterial and fungal populations in honey samples from local beekeepers and market in northeastern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 334:108806 (doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108806)

30 Hawkins J., de Vere N., Griffith A., Ford C.R., Allainguillaume J., Hegarty M.J., Baillie L., Adams-Groom B. Using DNA Metabarcoding to Identify the Floral Composition of Honey: A New Tool for Investigating Honey Bee Foraging Preferences. *PLOS ONE*, 2015, August 26 (doi:10.1371/journal.pone.0134735)

31 Milla L., Schmidt-Lebuhn A., Bovill J., Encinas-Viso F. Monitoring of honey bee floral resources with pollen DNA metabarcoding as a complementary tool to vegetation surveys. *Ecological Solutions and Evidence*, 2022, 3:12120 (doi.org/10.1002/2688-8319.12120)

32 Wirta H., Abrego N., Miller K., Roslin T. and Vesterinen E. DNA traces the origin of honey by identifying plants, bacteria and fungi. *Scientific Reports*, 2021, 11:4798 (doi.org/10.1038/s41598-021-84174-0)

33 Namin S.M., Kim M.J., Son M. & Jung C. Honey DNA metabarcoding revealed foraging resource partitioning between Korean native and introduced honey bees (Hymenoptera Apidae). *Scientific Reports*, 2022, 12:14394 (doi.org/10.1038/s41598-022-18465-5)

С.Т. ДӘУҒАЛИЕВА^{1*}, А.Т. ДӘУҒАЛИЕВА², С. ПЕЛЕТТО³, А.Е. ЕЛУБАЕВА¹,
Қ.Т. ӘМІРОВА¹, А. ҚАПАР¹, А.И. ӘБІТІ¹

¹Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²Қазақ мал шаруашылығы және жемшөп өндірісі ғылыми-зерттеу институты, Алматы, Қазақстан

³Пьемонт, Лигурия және Валле-д'Аоста жануарларының алдын алу эксперименттік институты, Болонья, Турин, Италия

*e-mail: saule.daugalieva@mail.ru

ЭКОЛОГИЯЛЫҚ ДНҚ-НЫ ПАЛИНОЛОГИЯЛЫҚ ТАЛДАУ ЖӘНЕ МЕТАБАРКОДТАУ АРҚЫЛЫ БАЛДЫҢ ФЛОРАЛЫҚ ҚҰРАМЫН АНЫҚТАУ

Түйін

Жер бетіндегі жаһандық климаттың өзгеруі тірі организмдердің әртүрлі популяцияларына айтарлықтай әсер етеді. Соңғы жылдары әлемнің барлық елдерінде ара популяциясы азайып келеді. Бұл құбылыстың негізгі себептері: өсімдік шаруашылығында химиялық заттарды қолдану, мономәдениеттері бар кең-байтақ аумақтарды урбанизациялау және егу, гендік модификацияланған ағза (ГМА) өсімдіктерін кеңінен пайдалану, климаттың өзгеруі, ауру қоздырғыштары мен ара аурулары. Балдың ботаникалық құрамын анықтау ара экологиясын зерттеудің өзекті мәселесі болып табылады. Балдың флоралық құрамының таксономиялық сипаттамасы түріндегі мәліметтерді ара популяциясын қорғау, емдік құндылығын анықтау, балдың сапасы мен өнімін жақсарту шараларын әзірлеу үшін пайдалануға болады. Балдың өсімдік құрамын зерттеудің дәстүрлі тәсілі - микроскопиялық зерттеуге негізделген тозаңды палинологиялық талдау, ол көп еңбекті, көп уақытты қажет етеді және арнайы палинологиялық

білімді қажет етеді. Келесі ұрпақты секвенирлеу әдістерінің дамуы гендік деңгейде балдың флоралық құрамын анықтау үшін ампликондық метабаркодтау әдісін қолдануға мүмкіндік берді. Мақалада балдың ботаникалық құрамын классикалық палинологиялық әдіспен және балдың экологиялық ДНҚ метабаркодтауымен анықтау әдістері сипатталып, олардың артықшылықтары мен кемшіліктері сипатталған.

Кілтті сөздер: бал, аралар, метабаркодтау, палинологиялық талдау.

МРНТИ: 34.35.17

С.Т. ДАУГАЛИЕВА^{1*}, А.Т. ДАУГАЛИЕВА², S. PELETTO³, А.Е. ЕЛУБАЕВА¹,
Қ.Т. ӘМІРОВА¹, А. КАПАР¹, А.И. ӘБІТІ¹

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Казахский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства,
Алматы, Казахстан

³Экспериментальный зоопрофилактический институт Пьемонта, Лигурии и Валле д'Аоста,
и Болоньи, Турин, Италия

*e-mail: saule.daugalieva@mail.ru

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛОРАЛЬНОГО СОСТАВА МЕДА МЕТОДАМИ ПАЛИНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И МЕТАБАРКОДИРОВАНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ДНК

doi:10.53729/MV-AS.2024.01.08

Аннотация

Глобальное изменение климата на Земле оказывает существенное влияние на различные популяции живых организмов. В последние годы во всех странах мира наблюдается уменьшение популяции пчел. Основные причины этого явления: использование химических веществ в растениеводстве, урбанизация и засев монокультурами огромных территорий, широкое распространение ГМО растений, изменение климата, патогены и болезни пчел.

Определение ботанического состава меда является актуальной задачей в изучении экологии пчел. Данные, в виде таксономической характеристики флорального состава меда, могут быть использованы для разработки мероприятий по охране популяций пчел, определения лечебной ценности, повышения качества и производства меда. Традиционным подходом изучения растительного состава меда является палинологический анализ пыльцы на основе микроскопического исследования, который является трудоемким, требует много времени и специальных палинологических знаний. Развитие методов секвенирования нового поколения позволило использовать метод метабаркодирования ампликонов для определения флорального состава меда на генном уровне. В статье приводится описание методов определения ботанического состава меда классическим палинологическим методом и с помощью метабаркодирования экологической ДНК меда, описаны их преимущества и недостатки.

Ключевые слова: мед, пчелы, метабаркодирование, палинологический анализ.

Стремительное сокращение популяций пчел и связанное с этим воздействие на биоразнообразие растений является глобальной проблемой. Согласно данным Всемирного фонда защиты пчел в США за последние десятилетия количество пчелиных семей уменьшилось с 6 до 4,5 млн (каждый год вымирает 30-35% пчелиных колоний), в России — с 4,3 до 3,09 млн [1]. В Европе каждый год теряют 20% пчелиных семейств, аналогичная ситуация в Латинской Америке, Китае [2]. Численность медоносных пчел сокращается и в Казахстане. По статистике один казахстанец съедает всего 10 граммов меда в месяц. Это в 20 раз меньше, чем потребляют жители Евросоюза [3].

По данным ООН, пчелы исчезают в 8 раз быстрее, чем остальные животные, и если эта тенденция сохранится, то к 2035 году их на планете не останется. Гибель пчел может

привести к исчезновению тысячи видов растений, что может привести к нехватке продовольствия. Уменьшится ассортимент растительных продуктов для людей и скота. Пища станет однообразной.

Пчеловодство, являясь отраслью сельского хозяйства, обеспечивает человечество одной третью потребляемой пищи. Проблема исчезновения пчел имеет огромное социальное значение, так как сокращение популяции пчел представляет собой угрозу продовольственной безопасности человечества. Согласно данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН, за последние 50 лет объём производства сельскохозяйственных культур, зависящих от опыления, увеличился на 300%. В опылении нуждаются около 85% растений, выращиваемых человеком, и 90% диких. Недостаток опыления может привести к снижению ассортимента растений. Поддержание популяций пчел необходимо для сохранения биоразнообразия растений, питания людей и животных. Помимо меда, пчелы производят продукты, используемые в различных отраслях. Сохранение пчел необходимо для здравоохранения, косметической промышленности, пищевых производств и др. Пчеловодство является источником дохода многих людей, особенно в сельской местности. Понимание того, какие растения используют опылители, важно для планирования природоохранных мероприятий путем предоставления соответствующих цветочных ресурсов для предотвращения потери пчел.

Причинами снижения популяции пчел являются: пестициды, изменение климата, ландшафта посевных культур (засев площадей под монокультурные, декоративные и ГМО растения), патогены и паразиты пчел [4]. С 2000 года отмечается феномен «синдрома разрушения пчелиных семей», когда пчелы массово покидают ульи и не возвращаются, то есть рабочие особи медоносных пчёл навсегда покидают ульи, оставляя там маток, запасы еды и пчёл-кормилиц [5]. Причины этого явления не выяснены до сих пор.

Одним из факторов снижения численности диких и культурных пчел является нехватка цветочных ресурсов и неполноценное питание. Посев монокультур делает рацион пчел беднее, однообразнее [6]. Ландшафт пахотных культур, необходимый нам для производства продуктов питания, вызывает ограничения в питании пчел [7]. Урбанизация и застройка пригородных зон отнимает у пчел территории для добычи кормов. Основная часть декоративных растений в городской и пригородных зонах не может служить кормовой базой для пчел [8].

Медоносные пчелы и продукты пчеловодства являются биоиндикаторами загрязняющих веществ, таких как тяжелые металлы и пестициды, позволяют отследить, как меняется интенсификация земледелия, урожайность, экология [9]. Количественная и качественная оценка видов растений, которые поедаются пчелами, дает представление о состоянии их питания, моделях использования окружающего ландшафта для сохранения их популяции [10].

Общепринятой методикой определения растительного состава меда является микроскопический анализ пыльцы или палинологический анализ. Палинологический анализ – метод исследования, который позволяет определить таксономическую принадлежность растений по характерным морфологическим признакам пыльцевых зерен. Мелисопалинологический анализ изучает состав пыльцы в меде и позволяет достоверно диагностировать ботаническое и географическое происхождение мёда и других продуктов пчеловодства [11-14]. Эффективность палинологического анализа обусловлена большим количеством пыльцевых зерен с характерными особенностями в образцах меда, что позволяет определить таксономическую принадлежность растений, из которых был получен мед. Несомненным достоинством метода является низкая стоимость и использование минимального количества оборудования (центрифуга, микроскоп). Недостатком метода является то, что некоторые виды растений имеют сходную морфологию пыльцевых зёрен, что затрудняет точную ботаническую идентификацию. Кроме того, традиционные подходы, основанные на микроскопическом наблюдении пыльцы, являются трудоемкими, занимают много времени, а также наблюдается дефицит

специалистов-практиков со специальными знаниями в области палинологии [15,16].

Одним из альтернативных решений этого вопроса является применение метода ДНК метабаркодирования. ДНК, используемая для изучения флорального состава меда относится к экологической ДНК или environmental DNA. eDNA — генетический материал, выделяемый из проб внешней среды [17]. Использование eDNA для изучения генетической структуры популяций позволяет реконструировать их историю, оценить текущее состояние, прогнозировать будущие перспективы, что необходимо для планирования природоохранных мероприятий [18]. Экологическая ДНК меда содержит следы ДНК кормовых растений, бактерий пчел и патогенов ульев. Анализ эДНК меда позволяет определить растительное биоразнообразие меда и влияние экосистем на его состав [19 - 23].

Распространение NGS (секвенирования нового поколения) способствовало использованию метабаркодирования для изучения таксономического состава образцов по уникальным последовательностям ДНК [15]. Так, например для определения таксономического состава бактериального сообщества в качестве генетического маркера используется 16S рибосомальный ген [24]. Для оценки разнообразия растений используют пластидные гены рибулозобисфосфаткарбоксилазы (rbcL) и матуразы K (matK), хлоропластный маркер trnL и ITS. Универсальность праймеров rbcL составляет 100%, а matK – 35% [25]. Штрих-код rbcL эффективен для идентификации ботанического происхождения меда с вероятностью от 99 до 100% [26]. Использование комбинации ITS2 и rbcL маркеров обеспечивает надежное определение географического происхождения меда [27].

Идентификация нектароносных растений может быть использована и для определения видовой фальсификации меда, которую трудно обнаружить. По растительному составу меда можно определить вид, подлинность, качество и происхождение меда. Экспериментальное исследование 85 монофлорных образцов меда, показало, что 72 соответствовали заявлению на этикетке, а 13 - нет [28]. Tomonogi Matsuzawa и др. при проведении анализа эДНК 14 видов меда, продаваемого в супермаркетах, установили случаи несоответствия между растениями, указанными на этикетках, и видами, чья ДНК была наиболее заметной в образце [29]. При сравнении 75 образцов меда из пасек и магазинного образца методом метабаркодирования 16S гена бактерий были обнаружены различия в альфа- и бета-разнообразии микробных сообществ. В частности, контаминантные бактерии доминировали в микробиоте образцов магазинного меда, в то время как в образцах из пасек преобладали молочнокислые бактерии [29].

Преимуществом метода метабаркодирования является больший размер выборки и обнаружение пыльцы, присутствующей в малых количествах. Метабаркодирование позволяет больше и достовернее идентифицировать растительные таксоны [20,30,31]. Благодаря метабаркодированию можно узнать географическое происхождение и бактериальный состав меда, провести сравнительный анализ кормовой базы пчел разных популяций [26,32,33]. Недостатком данного метода остается дороговизна, трудоемкость пробоподготовки, необходимость обработки данных с помощью специальных программ.

Таким образом, можно заключить, что оба метода: и палинологический и молекулярно-генетический позволяют определить флоральный состав меда, но метабаркодирование отдельных генов дает более точную и достоверную информацию.

Заключение

Изучение сокращения популяции пчел в природе является актуальной экологической проблемой. Одним из методов решения этого вопроса является определение ботанического состава меда. Оно необходимо для оценки кормовых предпочтений пчел, эффективности опыления растений, мониторинга изменения климата. Благодаря знаниям о кормовых предпочтениях пчел и анализа сокращения их численности, можно дать

рекомендации по севообороту растений в местах обитания пчел.

Основными методами определения биоразнообразия меда являются классический палинологический анализ, а также более современный анализ метабаркодирования ДНК, основанный на определении молекулярно-генетических маркеров присутствующих растений. Мультилокусное метабаркодирование с использованием комбинации ITS2 и rbcL является надежным методом определения флорального состава и географического происхождения меда, поскольку он может обнаруживать ДНК из редких пыльцевых зерен и идентифицировать растения вплоть до уровня вида.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант №AP19676294).

Литература:

- 1 В мире вымирают пчёлы. Как это повлияет на человечество и что можно сделать? (<https://sberegipianetu.ru/publications/v-mire-vymiraiut-pchely-kak-eto-povliiaet-nachelo-vechestvo-i-chto-mozhno-sdelat>)
- 2 Пчелиный коллапс. (<http://www.futurible.space/ru/winners/96/>)
- 3 Численность медоносных пчёл сокращается в Казахстане. (<https://24.kz/ru/tv-projects/agrolife/item/566646-chislennost-medonosnykh-pchjol-krashchaetsya-v-kazakhstane-agrolife>)
- 4 Subotic S., Boddicker A.M., Nguyen V.M., Rivers J., Briles C.E., Mosier A.C. Honey bee microbiome associated with different hive and sample types over a honey production season. *PLOS ONE*, 2019, 8 (doi.org/10.1371/journal.pone.0223834)
- 7 Kimberly A. Colony Collapse Disorder and Its Impact on the Economy. March 4, 2021. (<https://www.thebalancemoney.com/bee-colony-collapse-disorder-facts-and-economic-impact-3305815>)
- 8 Clair A., Zhang G., Dolezal A.G., O'Neal M.E., and Toth A.L. Diversified Farming in a Monoculture Landscape: Effects on Honey Bee Health and Wild Bee Communities. *Environmental Entomology*, 2020, 49(3): 753–764 (doi:10.1093/ee/nvaa031)
- 7 Silliman M.R., Schürch R., Malone S., Taylor S.V., Couvillon M.J. Row crop fields provide mid-summer forage for honey bees. *Ecology and Evolution*, 2022, 12:8979 (doi.org/10.1002/ece3.8979)
- 8 Sponsler D.B., Grozinger C.M., Richardson R.T., Nurse A., Brough D., Patch H.M., Stoner K.A. A screening-level assessment of the pollinator-attractiveness of ornamental nursery stock using a honey bee foraging assay. *Scientific Reports*, 2020, 10:831 (doi.org/10.1038/s41598-020-57858-2)
- 9 Papa G., Maier R., Durazzo A., Lucarini M., Karabagias I.K., Plutino M., Bianchetto E., Aromolo R., Pignatti G., Ambrogio A., Pellicchia M. and Negri I. The Honey Bee *Apis mellifera*: An Insect at the Interface between Human and Ecosystem Health. *Biology*, 2022, 11:233 (doi.org/10.3390/biology11020233)
- 10 Oliver A.E., Newbold L.K., Gweon H.S., Read D.S., Woodcock B.A., Pywell R.F. Integration of DNA extraction, metabarcoding and an informatics pipeline to underpin a national citizen science honey monitoring scheme. *MethodsX*, 2021, 8:101303. (doi.org/10.1016/j.mex.2021.101303)
- 11 Jamwal R. and Mattu V.K. Melissopalynological Determination of Pollen Density and Botanical Origin of Autumn Honeys of Kullu Hills, Himachal Pradesh, India. *Indian Journal of Agricultural Research*, 2022, 56(4):381-388. (doi: 10.18805/IJAR.A-5605)
- 12 Shakoori Z., Mehrabian A., Minai D., Salmanpour F., Khajoei N.F. Assessing the quality of bee honey on the basis of melissopalynology as well as chemical analysis. *PLoS ONE*, 2023, 18(8):289702 (doi.org/10.1371/journal.pone.0289702)
- 13 Pospiech M., Javurková Z., Hrabec P., Cížková H., Titera D., Štarha P., Ljasovská S., Kružík V., Podskalská T., Bednár J. et al. Physico-Chemical and Melissopalynological Characterization of Czech Honey. *Appl. Sci.* 2021, 11:4989 (doi.org/10.3390/app11114989)
- 14 Tulu D., Aleme M., Mengistu G., Bogale A., Bezabeh A., Mendesil E. Melissopalynological analysis and floral spectra of *Apis mellifera scutellata* Lepeletier bees in different agroecologies of southwest Ethiopia. *Heliyon*, 2023, 9:16047 (doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16047)
- 15 Laha R.C., De Mandal S., Ralte L., Ralte L., Kumar N.S., Gurusubramanian G., Satishkumar R., Mugasimangalam R. and Laha N. *AMB Express*, 2017, 7:132. (doi 10.1186/s13568-017-0429-7)
- 16 Bell K.L., de Vere N., Keller A., Richardson R.T., Gous A., Burgess K.S., and Brosi B.J. Pollen DNA barcoding: current applications and future Prospects. *Genome*, 2016, 59: 629–640 (doi.org/10.1139/gen-2015-0200)

- 17 Thomsen P.F., Willerslev E. Environmental DNA – an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 2015, 183:4-18 (doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019)
- 18 Пинахина Д.В., Чекунова Е.М. ДНК окружающей среды: история изучения, современные и перспективные направления в фундаментальных и прикладных исследованиях. *Ecological genetics*, 2020, 18(4) (doi: <https://doi.org/10.17816/ecogen25900>)
- 19 Matsuzawa T., Kohsaka R. and Uchiyama Y. Application of Environmental DNA: Honey Bee behavior and Ecosystems for Sustainable Beekeeping. *IntechOpen*, 2020, 5 (doi: 10.5772/intechopen.92717 www.intechopen.com/chapters/72529)
- 20 Milla L., Sniderman K., Lines R., Mousavi-Derazmahalleh M., Encinas-Viso F. Pollen DNA metabarcoding identifies regional provenance and high plant diversity in Australian honey. *Ecology and Evolution*, 2021, 11: 8683 – 8698 (doi: 10.1002/ece3.7679)
- 21 Dolezal A.G., St. Clair A.L., Ge Zhang, Toth A.L. and O’Neal M.E. Native habitat mitigates feast–famine conditions faced by honey bees in an agricultural landscape. *PNAS*, 2019, December 10, vol. 116, 50:25147–25155 (doi/10.1073/pnas.1912801116)
- 22 Richardson R.T., Lin C.H., Sponsler D.B., Quijia J.O., Goodell K., and Johnson R.M. Application of ITS2 Metabarcoding to Determine the Provenance of Pollen Collected by Honey Bees in an Agroecosystem. *Application in Plant Biocseienec*, 2015, January (doi.org/10.3732/apps.1400066)
- 23 Potter C., de Vere N., Jones L.E., Ford C.R., Hegarty M.J., Hodder K.H., Diaz A., Franklin E. Pollen metabarcoding reveals broad and species-specific resource use by urban bees. *PeerJ*, 2019.7:5999 (doi 10.7717/peerj.5999)
- 24 Даугалиева С.Т., Даугалиева А.Т., Ашанин А.И., Ерғали Б.Б. Влияние рациона на продуктивность бычков казахской белоголовой породы и концентрацию архей в микробиоме желудочно-кишечного тракта. *Микробиология және вирусология*, 2023, №1 (40) (doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.15)
- 25 Maloukh L., Kumarappan A., Jarrar M., Salehi J., El-wakil H., Rajya L.T. Discriminatory power of rbcL barcode locus for authentication of some of United Arab Emirates (UAE) native plants. *Biotech*, 2017, 7:144 (doi 10.1007/s13205-017-07-461)
- 26 Murthy M.K., Khandayataray P., Ralte L., Laha R. and Samal D. Identification of plant species in multi flower honey by using Ribulose-Bisphosphate carboxylase gene (RBC L) coding region as barcode marker, Mizoram, Northeast India: An Indo: Burma hotspot region. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2019, 7(3): 1475-1483. P-ISSN: 2349-6800. <https://www.entomoljournal.com/archives/2019/vol7issue3/PartY/7-3-264-389.pdf>
- 27 Khansaritoreh E., Salmaki Y., Ramezani E., Azirani T.A., Keller A., Neumann K., Alizadeh K., Zarre S., Beckh G., Behling H. Employing DNA metabarcoding to determine the geographical origin of honey. *Heliyon*, 2020, 6 (doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05596)
- 28 Beltramo C., Cerutti F., Brusa F., Mogliotti P., Garrone A., Squadrone S., Acutis P.L., Peletto S. Exploring the botanical composition of polyfloral and monofloral honeys through DNA metabarcoding. *Food Control*, 2021, 128:108175 (doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108175)
- 29 Balzana S., Carraroa L., Merlantia R., Lucatelloa L., Capolongoa F., Fontanaa F., Novellia E., Larini I., Vitulo N., Cardazzo B. Microbial metabarcoding highlights different bacterial and fungal populations in honey samples from local beekeepers and market in northeastern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 334:108806 (doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108806)
- 30 Hawkins J., de Vere N., Griffith A., Ford C.R., Allainguillaume J., Hegarty M.J., Baillie L., Adams-Groom B. Using DNA Metabarcoding to Identify the Floral Composition of Honey: A New Tool for Investigating Honey Bee Foraging Preferences. *PLOS ONE*, 2015, August 26 (doi:10.1371/journal.pone.0134735)
- 31 Milla L., Schmidt-Lebuhn A., Bovill J., Encinas-Viso F. Monitoring of honey bee floral resources with pollen DNA metabarcoding as a complementary tool to vegetation surveys. *Ecological Solutions and Evidence*, 2022, 3:12120 (doi.org/10.1002/2688-8319.12120)
- 32 Wirta H., Abrego N., Miller K., Roslin T. and Vesterinen E. DNA traces the origin of honey by identifying plants, bacteria and fungi. *Scientific Reports*, 2021, 11:4798 (doi.org/10.1038/s41598-021-84174-0)
- 33 Namin S.M., Kim M.J., Son M. & Jung C. Honey DNA metabarcoding revealed foraging resource partitioning between Korean native and introduced honey bees (Hymenoptera Apidae). *Scientific Reports*, 2022, 12:14394 (doi.org/10.1038/s41598-022-18465-5)