



OUVRIR

Les choix de recherche de nourriture des abeilles pour le nectar et le pollen révélés par le métabarcodage de l'ADN

Matti Leponiemi¹, Dalial Freitak¹, Miguel Moreno Torres², Eva Maria Pferschy Wenzig³, Antoine Becker Scarpitta⁴, Mikko Tiusanen^{5,7}, Eero J. Vesterinen⁶ & Helena Wirta^{7*}

Les abeilles domestiques sont les pollinisateurs gérés les plus répandus de nos cultures vivrières, et une alimentation adaptée est un élément crucial de leur bien-être. Pourtant, nous ne savons pas comment ils choisissent les fleurs pour récolter le nectar ou le pollen. Ici, nous avons étudié quarante-trois colonies d'abeilles domestiques dans six ruchers au cours d'un été, identifiant les origines forales du miel et des échantillons de pollen stockés dans la ruche par métabarcodage ADN. Nous avons enregistré les plantes à fleurs disponibles et analysé les métabolites spécialisés présents dans le miel. Dans l'ensemble, nous constatons que les abeilles utilisent principalement les mêmes plantes pour le nectar et le pollen, mais que par colonie, moins de la moitié des genres végétaux sont utilisés à la fois pour le nectar et le pollen. Parmi les échantillons, en moyenne, moins de genres de plantes ont été utilisés pour le pollen, mais la composition était plus variable selon les échantillons, ce qui suggère une sélectivité plus élevée pour les sources de pollen. Parmi les plantes à fleurs disponibles, les abeilles n'en utilisaient qu'une fraction pour la recherche de nectar ou de pollen. La période de l'été a le plus guidé le choix des plantes, et l'emplacement a eu un impact à la fois sur les plantes sélectionnées et sur la composition des métabolites spécialisés du miel.

Ainsi, les abeilles sont sélectives à la fois pour le nectar et le pollen, ce qui implique la nécessité de disposer d'une grande variété de ressources forales parmi lesquelles choisir un régime alimentaire optimal.

La plupart des espèces de plantes à fleurs sauvages et cultivées dépendent des pollinisateurs animaux^{1, 2}. Les abeilles domestiques sont les pollinisateurs les plus abondants au monde² et sont élevées par les humains pour leur production de miel ainsi que pour la pollinisation qu'elles assurent. En raison de leur grande abondance dans divers environnements, les abeilles domestiques sont d'importants pollinisateurs pour les plantes cultivées³. Dans le même temps, la disponibilité d'une alimentation adéquate contribue à la santé des abeilles. Une variété de sources alimentaires est bénéfique pour la santé des abeilles⁴, cependant, dans les environnements agricoles modernes, les monocultures sont courantes, ce qui pourrait compromettre la bonne nutrition des abeilles⁵. Par ailleurs, il a été démontré que les abeilles stressées par les pesticides préfèrent une alimentation plus variable⁶, ce qui suggère qu'une alimentation diversifiée est non seulement importante pour un fonctionnement normal, mais pourrait également favoriser la santé des abeilles en période de stress.

Les abeilles domestiques récoltent du nectar et du pollen pour répondre à différents besoins nutritionnels, ceux en glucides et ceux en protéines et lipides. Le nectar est principalement constitué de sucres monosaccharides, à savoir le glucose et le fructose. Le nectar est utilisé pour soutenir les besoins énergétiques de la colonie, comme le coûteux combat des butineuses et la thermorégulation de la ruche⁷.

Les abeilles sélectionnent généralement les plantes pour butiner le nectar en fonction de la concentration en sucre du nectar⁸, et la teneur totale en sucre au sein et entre les espèces végétales peut varier considérablement, de 6,3 à 85 %⁹. La quantité de protéines et de lipides ainsi que la composition des différents acides aminés et gras varient également considérablement selon le pollen de différentes espèces végétales. La teneur en protéines du pollen d'abeille collecté varie de 1,5 à 48,4 % et la teneur en lipides de 1,2 à 24,6 %¹⁰. Les préférences polliniques des butineuses sont déterminées par les besoins de la colonie ; les sources de pollen préférées sont davantage influencées par la composition en acides gras et en acides aminés du pollen que par la teneur totale en protéines¹¹⁻¹³. Comme le nectar, le pollen récolté est stocké dans la ruche, mais il est principalement utilisé pour nourrir le couvain en développement, tandis que les adultes peuvent survivre plus longtemps sans pollen⁷.

Non seulement le nectar et le pollen sont utilisés à des fins différentes, mais leur recherche de nourriture est également effectuée par différents groupes d'individus, car les abeilles butineuses individuelles ne butinent généralement que du nectar ou du pollen^{14, 15}. La recherche de nectar et de pollen sont donc des processus distincts, également du point de vue de la recherche de plantes qui les produisent. Comme le nectar et le pollen diffèrent en termes de nutriments qu'ils contiennent, les plantes récompensées par le nectar et le pollen peuvent être très différentes.

¹Institut de biologie, Université Karl-Franzen de Graz, Universitätsplatz 2, 8010 Graz, Autriche. ²Institut de 3 Science des systèmes environnementaux, Karl-Franzens-Universität Graz, Merangasse 18/I, 8010 Graz, Institut Autriche. des sciences pharmaceutiques, pharmacognosie, Université de Graz, Beethovenstraße 8, Graz, Autriche. ³IRAD, UMR PVBMT, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France. ⁵Département de biologie évolutive et d'études environnementales, Université de Zurich, Zurich, Suisse. ⁶Département de biologie, Université de Turku, Vesilinnantie 5, Turku, Finlande. ⁷Département des sciences agricoles, Université d'Helsinki, Latokartanonkaari 5, PO Box 27, 00014 Helsinki, Finlande. *email : helena.wirta@helsinki.fi

à travers les espèces. Certaines plantes, comme les espèces pollinisées par le vent, ne produisent pas du tout de nectar, mais peuvent néanmoins servir de source de pollen¹⁶. Les sources végétales peuvent alors différer en quantité et en qualité entre la récompense offerte en nectar et en pollen. Si l'on considère également le fait que ces deux ressources sont utilisées à des fins différentes et sont récoltées par des individus différents, on pourrait s'attendre à ce que différentes plantes soient utilisées pour la recherche de nectar et de pollen. Pourtant, la plupart des recherches examinent la sélection d'un type de ressource à la fois (par exemple, le pollen¹⁷ ou le nectar¹⁸). Cependant, certaines études ont examiné la façon dont les abeilles sélectionnent les plantes pour leur nectar et leur pollen, mais avec un nombre très restreint de colonies¹⁹ ou à un moment donné, au printemps^{19, 20}. À mesure que la disponibilité des plantes change au cours de l'été en raison des différentes périodes de floraison, des changements dans l'alimentation sont également susceptibles de se produire tout au long de la saison¹⁹. Ainsi, il y a un manque de compréhension approfondie quant à savoir si les abeilles choisissent des plantes différentes pour les deux types de ressources, et dans quelle mesure elles sont sélectives pour chaque type de ressource parmi les fleurs disponibles, car on sait que les abeilles n'utilisent qu'une partie des ressources disponibles²¹.

Des études antérieures sur les choix alimentaires des abeilles domestiques étaient basées sur l'identification morphologique des grains de pollen présents dans le miel (méliissopalynologie)²². Le pollen de la plante source de nectar peut s'attacher à l'abeille butineuse et se retrouver plus tard dans le nid d'abeilles. Aujourd'hui, les méthodes basées sur l'ADN permettent une extraction et une identification taxonomique plus précise de l'origine végétale du miel, non seulement à partir du pollen mais de n'importe quel tissu végétal¹⁷. L'ADN peut également être facilement extrait du pollen stocké dans la ruche, le pain d'abeille²³. Les abeilles préparent du pain d'abeille à partir du pollen en le mélangeant avec des sécrétions glandulaires et de petites quantités de nectar. Bien qu'une certaine contamination croisée naturelle de ces ressources soit inévitable, nous pouvons utiliser l'ADN du miel pour déduire les plantes sources du nectar, tandis que l'ADN du pain d'abeille peut être utilisé pour déduire les plantes sources du pollen^{17, 22-25}.

En plus des nutriments contenus dans le nectar et le pollen, les plantes produisent une grande variété de métabolites spécialisés qui se retrouvent également dans les ressources fournies par les plantes, comme le nectar. Certains métabolites spécialisés peuvent affecter le comportement des pollinisateurs et améliorer le succès de la pollinisation des espèces en fleurs²⁶, mais certains d'entre eux agissent également comme un moyen de dissuasion pour les pollinisateurs, créant une situation paradoxale, car les plantes doivent également attirer les pollinisateurs²⁷. On ne sait pas encore clairement pourquoi les composés dissuasifs se retrouvent dans le nectar, même s'ils pourraient potentiellement protéger le nectar des visiteurs indésirables ou contrôler l'activité microbienne²⁸. Dans l'ensemble, le rôle des métabolites spécialisés dans les plantes dans les choix alimentaires des abeilles et leurs effets sur les colonies d'abeilles n'est pas résolu²⁹.

Ici, nous utilisons le métabarcoding ADN pour identifier l'origine végétale du miel et du pain d'abeilles des colonies d'abeilles domestiques afin d'examiner les choix d'alimentation pour ces deux ressources simultanément, à différentes périodes de l'été et dans différents endroits. En comparant les plantes utilisées à la disponibilité de fleurs environnantes, nous déterminons à quel point les abeilles sont sélectives lorsqu'elles recherchent du nectar et du pollen. Nous examinons également quels types de métabolites spécialisés se trouvent dans les échantillons de miel à l'aide d'une spectrométrie de masse par chromatographie liquide ultra-haute performance (UHPLC-HRMS). De plus, nous examinons comment les choix de recherche de nourriture changent au cours de la saison de floraison, à la fois pour le nectar et le pollen, et évaluons comment le moment et le lieu affectent les choix de recherche de nourriture ainsi que la composition des métabolites spécialisés dans le miel.

Résultats

Résumé des méthodes. Nous avons collecté des échantillons de miel et de pain d'abeille dans 43 ruches, situées dans six ruchers répartis dans trois zones début juin, juillet et août 2021. Entre le moment de la recherche de nourriture et notre échantillonnage, nous supposons une durée similaire pour les deux types d'échantillons, car le taux de renouvellement du pain d'abeille est d'environ 2 semaines pendant les mois d'été³⁰, et il faut 3 à 10 jours aux abeilles pour transformer le nectar en miel³¹. Les trois zones étaient situées dans le sud-ouest de la Finlande, à environ dix kilomètres les unes des autres, donc plus éloignées que les abeilles ne se déplacent généralement pour se nourrir. Pour identifier les taxons végétaux dans les échantillons, nous avons utilisé le métabarcoding de l'ADN basé sur l'espaceur transcrit interne 2 du gène (ITS2). Nous avons également cartographié les plantes à fleurs naturelles autour des trois zones de ruchers aux mêmes moments que l'échantillonnage, afin de comparer les plantes disponibles à celles détectées dans les échantillons. Nous avons collecté des échantillons de miel supplémentaires en août pour examiner les métabolites spécialisés présents dans le miel par UHPLC-HRMS, en utilisant deux méthodes de purification pour obtenir une large couverture des composés.

Les analyses ont été effectuées au niveau taxonomique du genre en utilisant les abondances relatives lues des genres³² et les données de présence-absence pour garantir la robustesse des résultats et de l'interprétation, car la méthode de métabarcodage ADN peut générer certains biais dans les abondances relatives lues parmi les taxons³³. Les données de composition du pain d'abeille et du miel ont été comparées graphiquement à l'aide d'une échelle multidimensionnelle non métrique (NMDS), et l'homogénéité multivariée des dispersions de groupe a été testée à l'aide de la procédure PERMDISP. Dixièmement, nous avons testé le changement de composition végétale entre les types d'échantillons en utilisant une analyse de variance permutative (PERMANOVA) avec des distances de Hellinger. En tant qu'analyse complémentaire de la composition du miel et du pain d'abeille, nous avons identifié des espèces indicatrices qui caractérisaient chaque type d'échantillon à l'aide de la procédure IndVal. La richesse des genres au sein d'une ruche dans les deux types d'échantillons a été comparée avec des modèles mixtes linéaires et le nombre de genres partagés avec un modèle mixte linéaire généralisé binomial. Pour évaluer la proportion de plantes à fleurs disponibles utilisées pour la recherche de nectar et de pollen, nous avons comparé les plantes à fleurs cartographiées dans les environs à celles détectées dans les échantillons à l'aide de diagrammes d'Euler. Pour trouver les facteurs affectant les choix d'alimentation, nous avons à nouveau appliqué les NMDS et utilisé l'analyse de redondance (RDA) pour évaluer les variables influentes, avec des valeurs transformées par Hellinger. Pour déterminer si la superficie du rucher a également un effet sur la composition des métabolites spécialisés dans le miel, nous avons utilisé une analyse de données multivariées.

Les métabolites spécialisés les plus abondants discriminant les trois zones de rucher ainsi que les plus abondants couramment présents dans les trois zones de rucher ont été annotés en comparant leurs données de spectrométrie de masse (MS) avec la littérature et les bases de données.

Taxons détectés dans le miel et le pain d'abeille. Après filtrage bioinformatique, il y a eu 2 592 723 lectures de séquençage à partir des échantillons de miel et 1 724 302 à partir des échantillons de pain d'abeille. Après avoir filtré les échantillons comportant moins de 5 000 lectures ($n = 5$), nous avons 97 échantillons de miel à analyser, avec en moyenne 26 656 ($SD \pm 10\,877$) lectures par échantillon. Parmi eux, 39 ont été collectés en juin, 30 en juillet et 28 en août. Pour le pain d'abeille, nous avons eu 87 échantillons après le

filtrage avec en moyenne 19 769 (SD \pm 7 249) lectures par échantillon. 36, 28 et 23 d'entre eux ont été collectés respectivement en juin, juillet et août. 95,1 % des lectures de miel et 91,1 % des lectures de pain d'abeille ont été attribuées à un genre. Les proportions attribuées aux espèces étant bien inférieures (14,9 % pour le miel et 21,8 % pour le pain d'abeille), afin d'utiliser la plupart des données disponibles, nous utilisons les affectations au niveau du genre pour toutes les analyses.

Le nombre total de genres différents détectés dans le miel ou le pain d'abeille était de 67 (57 dans le miel, 61 dans le pain d'abeille). Dans les échantillons de miel, nous avons trouvé 33, 33 et 42 genres, tandis que dans les échantillons de pain d'abeille, nous avons trouvé 39, 20 et 29 genres en juin, juillet et août, respectivement (tableau supplémentaire S1). Sur l'ensemble de la saison, près de la moitié des lectures de séquençage dans le miel provenaient de deux genres, 32,8 % provenant de *Brassica* et 17,4 % de *Rubus*. Chez Beebread, la plupart des lectures provenaient également de deux genres, 27,1 % de *Brassica* et 22,1 % de *Sorbus*. Les abondances relatives des genres dans les échantillons à chaque instant peuvent être trouvées dans le tableau supplémentaire S1. En termes de diversité végétale spécifique aux zones ruchers, le nombre de genres trouvés dans le miel était de 17, 25 et 29 dans la zone rucher AB en juin, juillet et août respectivement. Pour la zone rucher C–D, il y avait 23, 15 et 20 genres, et pour E–F, 26, 23 et 29 genres, en juin, juillet et août. Quant au pain d'abeille, le nombre de genres dans la zone A–B était de 24, 15 et 21, pour la zone C–D 28, 10 et 15, et pour la zone E–F 28, 10 et 20 genres, en juin, Juillet et août respectivement.

Genres végétaux partagés et distincts trouvés dans le miel et le pain d'abeille. Sur les 67 genres au total, 51 ont été détectés à la fois dans le miel et le pain d'abeille (tableau supplémentaire S1). Six genres ont été trouvés uniquement dans le miel et dix uniquement dans le pain d'abeille. Indépendamment du chevauchement partiel dans la composition des genres végétaux pour le miel et le pain d'abeille, comme le montre l'ordination (Fig. 1), les communautés végétales des échantillons de miel et de pain d'abeille diffèrent considérablement dans leur dispersion (PERMDISP, $F = 12, 575, p < 0, 001$, miel=0,726, pain d'abeille=0,811). Nous avons trouvé une différence significative dans la composition des genres végétaux entre le miel et le pain d'abeille (PERMANOVA, $F = 24,961, p = 0,001, R^2 = 0,070$), bien que ce résultat soit au moins en partie dû à la différence dans les dispersions de groupe montrée par l'homogénéité multivariée des groupes. analyse de dispersion (Fig. S1 supplémentaire).

Pour évaluer l'évolution des choix de plantes au fil du temps dans les colonies, nous avons analysé le nombre de genres dans des échantillons de miel et de pain d'abeille provenant de ruches individuelles. Les échantillons de miel contenaient un plus grand nombre de genres en août qu'aux moments précédents (Fig. 2A, Tableau supplémentaire S2), tandis que les échantillons de pain d'abeille avaient le plus petit nombre de genres en juillet par rapport aux autres moments (Fig. 2B, Tableau supplémentaire S3). Dans l'ensemble, le nombre de genres était significativement plus élevé dans les échantillons de miel (moyenne 10, 16) que dans les échantillons de pain d'abeille (moyenne 7, 87) (tableau supplémentaire S4). Pour évaluer la proportion de genres végétaux partagés entre les communautés de miel et de pain d'abeille dans chaque ruche, nous avons analysé des échantillons appariés de miel et de pain d'abeille, collectés simultanément dans des ruches individuelles

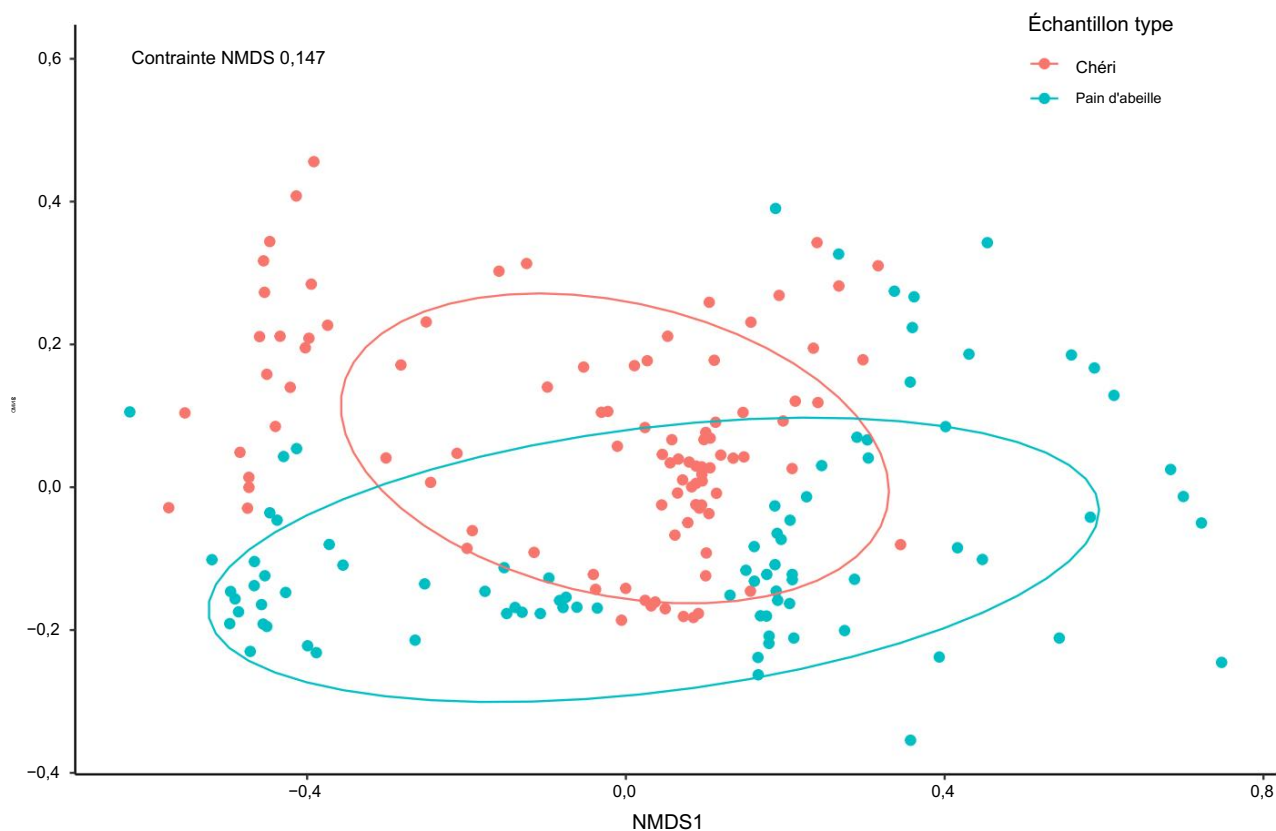


Figure 1. Composition en genres végétaux d'échantillons de miel (rouge, $n = 97$) et de pain d'abeille (bleu, $n = 87$) collectés dans 43 ruches dans 6 ruchers en Finlande en 2021. Figure montrant une échelle multidimensionnelle non métrique (NMDS) basée sur Hellinger indice de dissimilarité. Les ellipses indiquent des limites de confiance de 75 % pour chaque type d'échantillon.

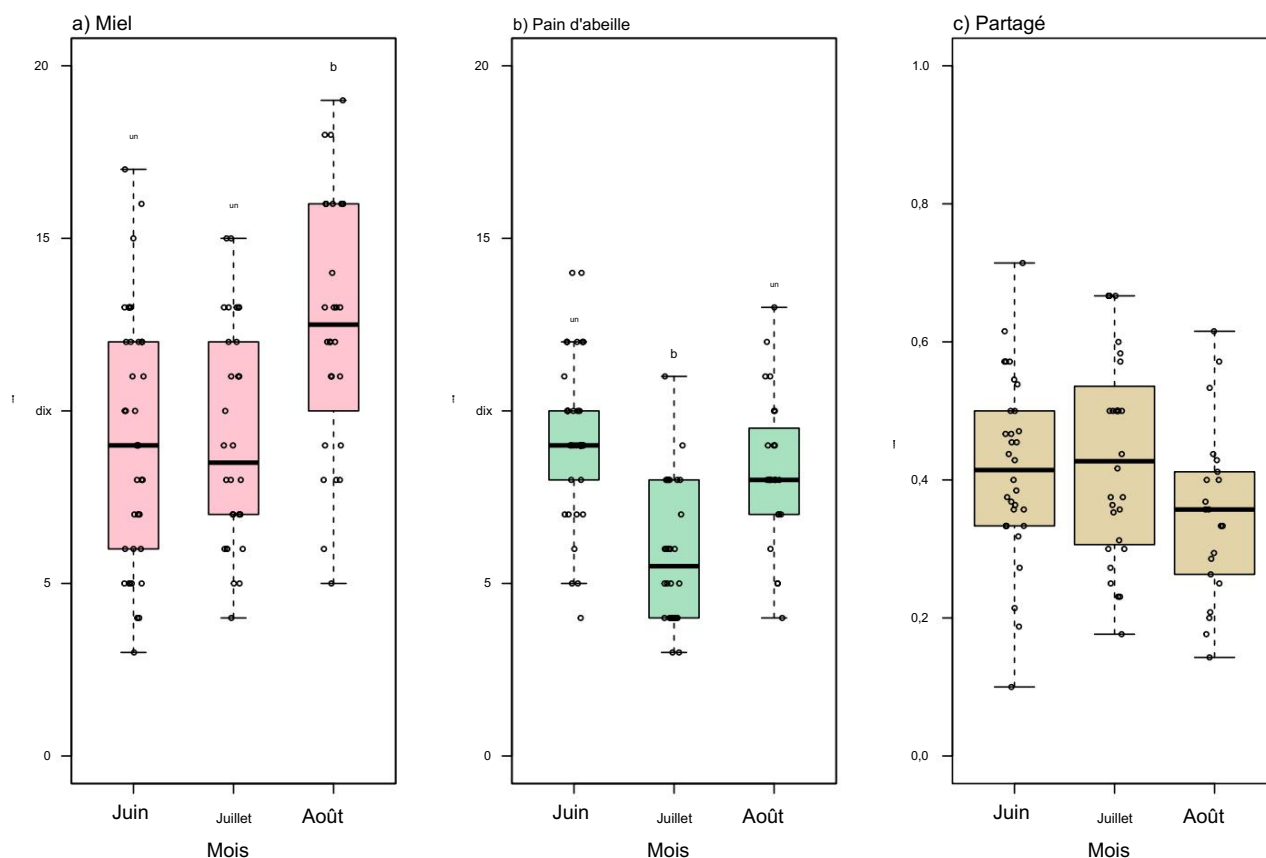


Figure 2. Nombre de genres dans les échantillons collectés dans les ruches en Finlande en 2021 à chaque instant dans 6 ruches, montrant les genres dans le miel (a, n = 39 juin, n = 30 juillet, n = 28 août) et le pain d'abeille (b, juin n = 36, juillet n = 28, août n = 23), et la proportion de genres partagés pour des échantillons appariés de miel et de pain d'abeille provenant de ruches individuelles (c, juin n = 32, juillet n = 28, août n = 21). Les groupes significativement différents dans les comparaisons par paires dans (a) et (b) sont désignés par des lettres.

n=32, juillet n=28, août n=21). La proportion dans les ruches variait de 0,10 à 0,71 mais était en moyenne similaire tout au long de l'été, allant de 0,35 à 0,43 entre les moments (Fig. 2C). Il n'y avait aucune différence significative dans la proportion de genres partagés entre les moments (GLMM, $p = 0,12$, tableau supplémentaire S5).

Sur la base des analyses d'espèces indicatives, pour identifier les genres de plantes qui sont principalement sélectionnés pour la recherche de nectar ou de pollen, douze genres sont associés de manière significative aux échantillons de miel, contre huit genres pour le pain d'abeille (Tableau 1, pour les résultats basés sur les données de présence-absence, voir Tableau supplémentaire S6). Les genres les plus fortement associés au miel étaient *Rubus* et *Myosotis*, tandis que pour le pain d'abeille, ils étaient *X-Amelanosorbus* (un genre hybride) et *Pisum*.

Sélectivité des choix floraux parmi les fleurs disponibles. Au cours des relevés des plantes à fleurs dans les 28 parcelles présentant les six différents types d'habitats entourant les zones ruchers, nous avons trouvé 99 espèces, représentant 73 genres et 27 familles (tableau supplémentaire S7). 39 genres étaient en fleurs en juin, 43 en juillet et 50 en août. Les champs agricoles trouvés en fleurs à proximité des ruches étaient *Linum usitatissimum*, *Brassica* sp. et *Solanum tuberosum*, le tout en juillet. Sur les 73 genres trouvés, moins de la moitié ont été trouvés dans les échantillons de miel (32) ou de pain d'abeille (30). Les proportions de genres de plantes à fleurs également trouvées dans le miel étaient de 40,0 %, 32,6 % et 38,0 % en juin, juillet et août (Fig. 3). Chez le pain d'abeilles, la proportion de plantes fleuries était de 40,0%, 23,3% et 32,0% en juin, juillet et août. Parmi les genres trouvés dans le miel et le pain d'abeille, 33 genres n'ont pas été trouvés lors de l'enquête sur les plantes à fleurs. La proportion de genres non trouvés en floraison dans les types d'habitats naturels mais trouvés dans les échantillons de miel en juin, juillet et août était de 51,5 %, 57,6 % et 54,8 % et dans les échantillons de pain d'abeille de 59 %, 50 % et 44,8 %. D'autre part, la plupart des plantes en fleurs dans les habitats naturels n'étaient trouvées ni dans le miel ni dans le pain d'abeille, soit respectivement 52,5%, 62,8% et 60,0% en juin, juillet et août (Fig. 3).

Impact du moment de la saison et du lieu sur les choix floraux. La sélection des fleurs par les abeilles varie fortement selon le type d'échantillon et l'évolution dans le temps (Tableau 2). Dans la répartition des variations, le type d'échantillon et le temps expliquaient 30,7 % de la variation totale, tandis que les variables associées au plan expérimental et aux effets spatiaux (c'est-à-dire le site, le rucher et la ruche) représentaient 1,2 % de la variation totale, et 62,5 % sont non expliqués par le modèle (modèle RDA $F = 25,31$, $df = 5$, valeur $p < 0,001$, $adj R^2 = 45,7$, tableau 2, figure 4).

Chéri	A (spécificité)	B (fidélité)	statistique	valeur p
Rubus	0,936	0,845	0,889	0,001
Myosotis	0,971	0,474	0,678	0,001
Salix	0,647	0,505	0,572	0,016
Vicia	0,628	0,485	0,551	0,004
Taraxacum	0,888	0,268	0,488	0,001
Prunus	0,754	0,309	0,483	0,002
Malus	0,654	0,289	0,434	0,031
Chamaenerion	0,796	0,165	0,362	0,014
Rose	1,000	0,124	0,352	0,001
Médicago	0,925	0,082	0,276	0,016
Population	1,000	0,062	0,249	0,028
Comarum	1,000	0,062	0,249	0,031
Pain d'abeille	A (spécificité)	B (fidélité)	statistique	valeur p
x-Amelasorbus	0,757	0,379	0,536	0,001
Pisum	0,724	0,391	0,532	0,026
Callune	0,856	0,322	0,525	0,001
Rhododendrons 0,690		0,253	0,418	0,024
Seringue	0,808	0,161	0,361	0,009
Cirsium	0,771	0,161	0,352	0,035
Crataegus	1,000	0,092	0,303	0,002
Aronia	1,000	0,069	0,263	0,010

Tableau 1. Genres de plantes indicatifs statistiquement étayés associés à des échantillons de miel (n = 97) et de pain d'abeille (n = 87) qui ont été collectés dans 43 ruches dans 6 ruchers en Finlande en 2021, sur la base des abondances relatives lues, avec les valeurs des composants.

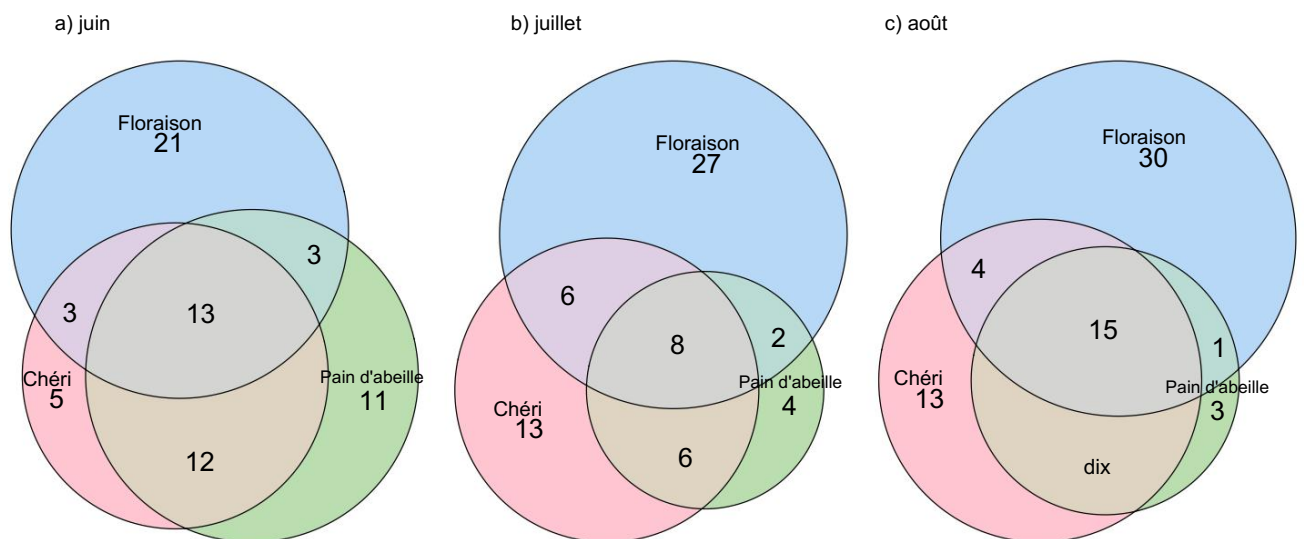


Figure 3. Nombre de genres végétaux partagés et uniques trouvés dans des échantillons de miel (n = 39 juin, n = 30 juillet, n = 28 août) et de pain d'abeille (n = 36 juin, n = 28 juillet, n = 23 août), collectées dans 43 ruches réparties dans six ruchers en Finlande en 2021, ainsi que le nombre de plantes fleuries entourant les ruches. Le miel est représenté en rose, le pain d'abeille en vert et les plantes fleuries en bleu à différents moments ; (a) juin, (b) juillet et (c) août.

Composition des métabolites spécialisés du miel. Les métabolites spécialisés les plus abondants présents dans toutes les zones de ruchers dans les échantillons de miel collectés en août ont été annotés sur la base des données MS (texte supplémentaire S1, tableau S10). Plusieurs glycosides monoterpéniques isomères et tricoumaroyl spermidines, acides carboxyliques et dicarboxyliques, l'hormone végétale acide abscissique et la vitamine acide pantothenique figuraient parmi les principaux métabolites trouvés dans les trois zones ruchers (Tableau supplémentaire S9, figures S6 et S7).

L'impact de la zone du rucher sur la composition des métabolites spécialisés dans le miel a été évalué par une analyse de données multivariée (texte supplémentaire S1, figures S4, S5, S8 et S9), montrant non seulement la présence mais également l'abondance de métabolites spécifiques à différents moments selon les zones du rucher. Les métabolites discriminants les plus abondants

Variables	Df	Écart F	valeur p
échantillon type	1	0,043	25,535 0,001
temps	2	0,145	42,636 0,001
type_échantillon : heure	2	0,052	15,204 0,001
Résiduel	135	0,229	
Fractions	Df Adj.	R2	
X1=Type_échantillon et heure 3		0,307	
X2=Zone, rucher et ruche	42	0,012	
X1+X2	45	0,375	
Résidus		0,625	

Tableau 2. Résultats du modèle canonique partiel incluant des variables spatiales pour contrôler la pseudo-réplication liée au plan expérimental (voir méthodes statistiques). Le partitionnement des variations quantifie la proportion de variation expliquée par le type d'échantillon, la période d'échantillonnage et les variables (site, abri, ruche) sur les genres végétaux trouvés dans les échantillons de miel (n = 97) et de pain d'abeille (n = 87), collectés dans 43 ruches de 6 ruchers en Finlande en 2021. Les valeurs de signification sont [gras].

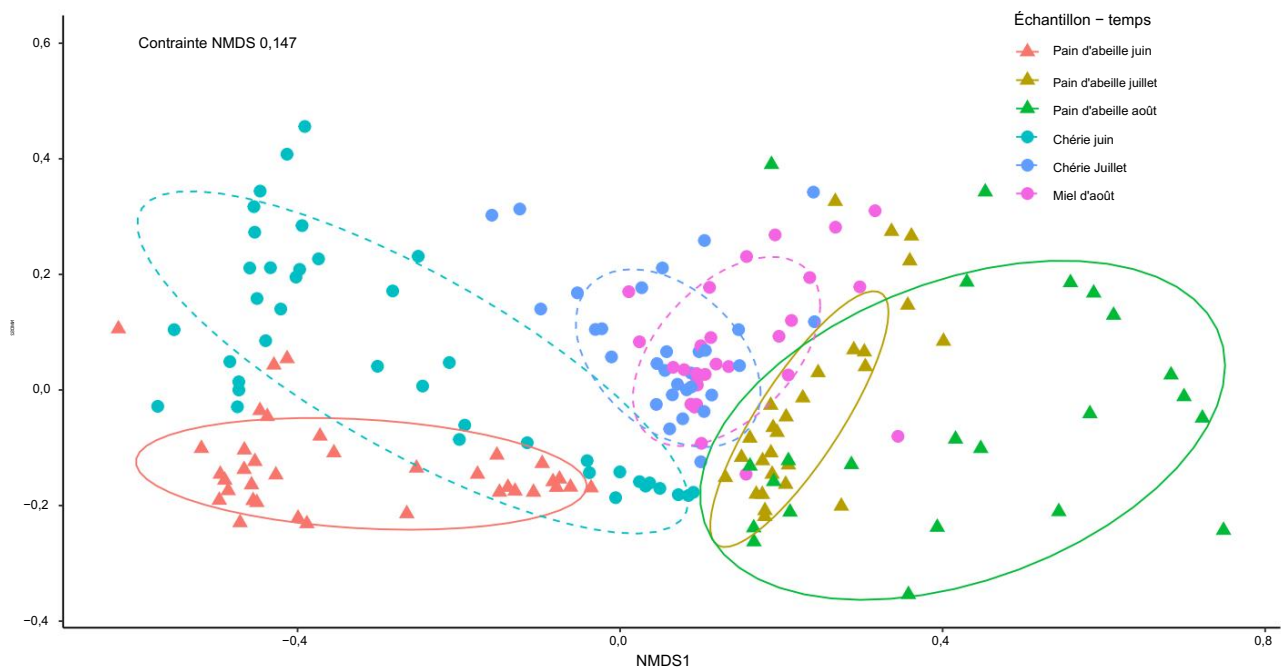


Figure 4. Composition des genres végétaux de pain d'abeille (triangles, ellipses en pointillés, juin n = 36, juillet n = 28, août n = 23) et de miel (cercles, ellipses pleines, juin n = 39, juillet n = 30, août n = 28) à différents moments dans des échantillons collectés dans 43 ruches dans 6 ruchers en Finlande en 2021. Figure montrant une mise à l'échelle multidimensionnelle non métrique (NMDS) basée sur l'indice de dissimilarité de Hellinger, des ellipses montrant des limites de confiance de 75 %.

ont été déduits des modèles OPLS-DA utilisant les zones ruchers comme classificateurs et annotés (Tableaux S11, S12). Leur répartition entre les trois zones de ruchers variait fortement (Figures supplémentaires S8 et S9). En utilisant NMDS, les métabolites spécialisés des deux ensembles de données semblent se regrouper de la même manière, tandis que les genres de plantes présents dans les échantillons de miel provenant des mêmes moments se chevauchent davantage dans les sites ruchers CD et EF (Fig. 5).

Discussion

Le nectar et le pollen constituent l'ensemble du régime alimentaire des abeilles, mais le contenu nutritionnel ainsi que les quantités de nectar et de pollen diffèrent considérablement selon les espèces végétales. Ainsi, les choix que font les abeilles lorsqu'elles sélectionnent les fleurs sur lesquelles récolter le nectar ou le pollen sont très importants pour leur alimentation. Ici, nous avons constaté que les abeilles choisissent en grande partie les mêmes plantes pour le nectar et le pollen, en considérant toutes les ruches tout au long de l'été. Pourtant, en se concentrant sur des colonies individuelles à un moment donné, les plantes choisies pour le nectar ou le pollen diffèrent considérablement. Nous montrons également que les abeilles n'utilisent qu'une fraction des fleurs disponibles dans les habitats naturels environnants, soit pour la recherche de nectar ou de pollen. Dans notre étude, la période de l'été était le facteur le plus déterminant quant aux plantes sur lesquelles elles se nourrissaient, mais le type de ressource fourragère et l'emplacement jouaient également un rôle important. Une grande variété de produits spécialisés

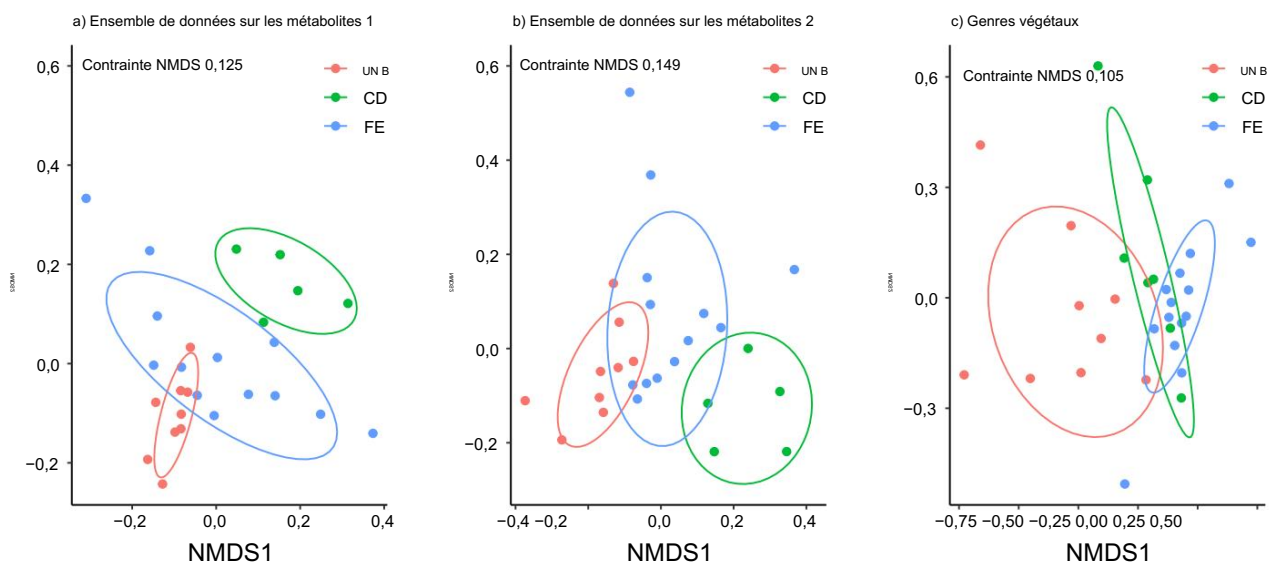


Figure 5. Graphiques d'échelle multidimensionnelle non métrique (NMDS) pour les métabolites spécialisés dans le miel avec deux techniques de séparation produisant l'ensemble de données 1 (a, $n = 27$), l'ensemble de données 2 (b, $n = 27$) et la composition des genres végétaux dans les échantillons de miel à la même point temporel (c, $n = 30$), regroupés par sites de ruchers. Les ellipses indiquent des limites de confiance de 75 % pour chaque site.

des métabolites ont été trouvés dans les échantillons de miel, montrant des différences entre les zones de ruchers. Ci-dessous, nous discutons tour à tour de toutes ces découvertes.

Les abeilles sont plus sélectives pour le pollen. Nous avons constaté que les colonies d'abeilles utilisent différentes plantes pour le nectar et pour le pollen, car en moyenne moins de la moitié des genres végétaux trouvés dans une ruche à la fois ont été trouvés dans des échantillons de miel et de pain d'abeille. Ces différences ne sont pas surprenantes, car le nectar et le pollen sont collectés pour des besoins différents, par différents butineurs spécialisés, et les qualités nutritionnelles ainsi que les quantités du nectar et du pollen varient considérablement selon les plantes³⁴. Le nombre moyen de genres dans les échantillons de miel des colonies était plus élevé que dans le pain d'abeille. Cependant, la composition des genres dans les échantillons de pain d'abeille variait beaucoup plus. Par conséquent, même si moins de genres étaient utilisés pour la recherche de pollen, les genres variaient davantage entre les ruches et les moments, ce qui rendait le nombre total de genres de plantes utilisés pour le pollen plus élevé. Ce résultat correspond à des études antérieures révélant que les abeilles mellifères se nourrissent de moins d'espèces pour le nectar que pour le pollen^{19, 20, 35}. Ce résultat, combiné à nos résultats, suggère que les mêmes plantes sont plus systématiquement utilisées pour le nectar, tandis que les choix de recherche de pollen changent plus fréquemment. Cela pourrait signifier que les sources de pollen sont plus variables pour maintenir le flux de nutriments importants requis par la colonie, car les colonies d'abeilles peuvent remédier aux carences en acides gras essentiels et en acides aminés en préférant le pollen qui complète les carences^{11, 12}. Nous avons en outre détecté un certain nombre de genres sont fortement associés à un type de ressource, ce qui suggère que les propriétés du nectar ou du pollen de ces plantes sont favorables^{19, 20}.

Bien qu'environ la moitié des genres détectés dans les colonies à la fois étaient différents en ce qui concerne le nectar et le pollen, nous avons constaté que dans l'ensemble, les mêmes genres de plantes étaient utilisés à la fois pour la recherche de nectar et de pollen. Tis36 indique que de nombreux genres de plantes conviennent à la fois à la recherche de pollen et de nectar, mais la ressource elle-même est importante, car nous constatons de nettes différences dans les choix pour les deux types de ressources.

Utilisation limitée des ressources florales disponibles. Tout au long de l'été, moins de la moitié des plantes naturelles à fleurs disponibles avaient été récoltées pour le nectar ou le pollen. Auparavant, des comparaisons basées sur l'ADN de ce que les abeilles recherchent dans les ressources forestières environnantes ont également révélé que seule une fraction des fleurs disponibles est utilisée par les abeilles^{21, 37}. Par exemple, une étude menée dans un jardin botanique au Pays de Galles a révélé que les abeilles n'utilisaient que 11 fleurs. % des taxons en fleurs disponibles, préférant les plantes indigènes ou quasi indigènes²¹. Dans notre étude, nous avons également constaté que les plantes horticoles n'étaient pas principalement utilisées par les abeilles. Seuls deux genres avaient une abondance relative supérieure à 1 % à tout moment dans le miel ou le pain d'abeille, l'Hydrangea (2,2 %) et la Phacelia (2,3 %), qui est parfois plantée comme ressource pour les abeilles.

D'un autre côté, nous avons constaté que les abeilles avaient utilisé de nombreux genres que nous n'avons pas détectés lors de nos enquêtes sur les plantes à fleurs dans les habitats naturels. Huit de ces genres étaient des plantes ornementales ou d'autres plantes de jardin, comme Rosa et Paeonia, et six étaient des plantes cultivées, comme Coriandrum (coriandre) et Raphanus (radis), montrant que les abeilles se nourrissent également dans les jardins et sur les champs de notre étude. zone. C'est ce qui est attendu, comme dans des études antérieures au Royaume-Uni, il a été démontré que les abeilles domestiques utilisent largement les plantes de jardin^{38, 39}. Dix genres trouvés dans des échantillons de miel et de pain d'abeille, mais non enregistrés lors de notre enquête sur les plantes du sous-bois en fleurs, étaient des arbres finlandais typiques. Pourtant, quelques genres fleuris finlandais indigènes ont été trouvés couramment dans les échantillons de miel, comme Persicaria (renouée), Fallopia (ex. : liseron noir) et Convallaria (muguet), bien que nous ne les ayons pas répertoriés lors de l'enquête. Cela signifie que nos enquêtes sur les plantes en fleurs n'étaient pas suffisamment approfondies pour donner une image complète de

les ressources florales disponibles, même si nous avons évalué tous les types d'habitats de la zone. Pourtant, les abeilles n'ont utilisé qu'une fraction des fleurs que nous avons trouvées en train de fleurir, ce qui indique qu'elles sont sélectives dans le choix des plantes sur lesquelles elles se nourrissent, ce qui conforte d'autres études montrant qu'elles sont sélectives^{21, 37}.

Le choix de nectar et de pollen change différemment selon la période de l'été. La période de l'été était le facteur déterminant le plus important pour les genres de plantes trouvés dans les échantillons de miel et de pain d'abeille. Il s'agit d'un résultat attendu compte tenu des différentes périodes de floraison des plantes, de la modification de la disponibilité au cours de l'année, et conformément aux recherches antérieures concluant que l'utilisation de la fleur par les abeilles suit clairement les phénologies des plantes^{38, 40}. La localisation a également joué un rôle dans l'utilisation de la fleur. Les plantes, car les effets spatiaux représentaient près d'un quart de la variation. Cela était prévu puisque le bassin de plantes fleuries à portée d'une colonie serait défini par le site.

La diversité des plantes utilisées pour la recherche de nectar et de pollen, détectée dans les échantillons de miel et de pain d'abeille, a eu une dynamique différente tout au long de l'été. Le nombre de genres dans le miel était le plus élevé en août, période qui correspond également à la détection de la plupart des plantes à fleurs dans l'environnement, mais après la principale production de nectar en Finlande⁴¹. Cependant, dans les échantillons de pain d'abeille, nous avons trouvé moins de genres en juillet, lorsque le colza (*Brassica*) fleurit. Un effet similaire dans la réduction de la richesse en pollen coïncidant avec la floraison massive du colza a également été observé dans d'autres études⁴². Cela a été expliqué par la théorie de la recherche alimentaire optimale, qui prédit que lorsqu'une source de nourriture préférée est disponible en abondance, les butineurs devraient l'utiliser, et que lorsque la ressource préférée devient limitée, le nombre d'espèces utilisées augmenterait⁴⁰. Ceci est corroboré par nos observations, car en juillet, le colza dominait également l'abondance lue dans le pain d'abeille, et la diversité des genres dans le pain d'abeille était à son plus bas. Comme le colza semble être une bonne source de nutrition pour les abeilles⁴³, on pourrait s'attendre à une préférence, mais cette préférence n'a souvent pas été démontrée^{18, 35}. Il est intéressant de noter que dans les échantillons de miel, le nombre total de genres n'a pas diminué en juillet. Il était légèrement inférieur dans la zone rucherière E – F et nettement inférieur dans la zone CD, qui est entourée de la plus faible superficie de paysage agricole. Ces différences pourraient résulter du fait que le paysage différent impose une disponibilité différente des ressources entre les zones, façonnant l'étendue des plantes fourragères⁴⁰. Néanmoins, le résultat montre que la disponibilité d'une source abondante affecte différemment les choix des butineuses de pollen et des butineuses de nectar.

Le nombre inférieur de genres présents dans le pain d'abeille en juillet peut paraître alarmant, car la diversité du régime pollinique a été liée à la santé des abeilles domestiques⁴⁴. Cependant, une plus faible diversité de pollen ne pose pas toujours de problèmes, car la qualité nutritionnelle du pollen est plus importante⁴. Par exemple, la floraison massive de maïs est préjudiciable à la santé des abeilles, car le pollen de maïs est de mauvaise qualité⁴, mais un régime pollinique d'une faible diversité similaire n'entraîne pas d'effets néfastes sur la santé lorsqu'il est composé de sources de meilleure qualité⁴. Diverses sources de pollen lors de la floraison massive sont donc particulièrement importantes dans les zones où les ruches sont proches de cultures produisant du pollen à faible contenu nutritionnel, et en période de ressources limitées⁴⁰.

Contaminations naturelles d'ADN entre le miel et le pain d'abeille dans la ruche. Lorsque les abeilles se nourrissent, le pollen de la fleur s'y attache et une partie peut également pénétrer dans les rayons lorsque les abeilles transforment le nectar en miel. De plus, les abeilles ajoutent de petites quantités de nectar et de sécrétions glandulaires au pollen lorsqu'elles le préparent sous forme de pain d'abeille⁷. Ainsi, les échantillons de pain d'abeille pourraient contenir des traces d'ADN provenant des plantes utilisées comme sources de nectar et vice versa. De telles contaminations naturelles possibles rendront la composition végétale des deux types d'échantillons plus similaire, rendant les différences détectées plus conservatrices. Nous trouvons néanmoins des différences dans les genres de plantes dans les échantillons de miel et de pain d'abeille, tous deux basés sur les abondances et les occurrences relatives des lectures, et soupçonnons qu'en raison des biais mentionnés, les différences réelles dans les choix d'alimentation sont plus fortes.

La composition des métabolites spécialisés dans le miel est influencée par l'emplacement du rucher. Tout comme la composition des genres végétaux, les profils de métabolites spécialisés des échantillons de miel ont été influencés par l'emplacement, ce qui suggère que la disponibilité des différents taxons végétaux dans chaque zone de rucher a contribué aux différences observées. Cela correspondait à la similitude perçue du paysage environnant, les zones A à B et E à F ayant une composition d'utilisation des terres similaire. Il est intéressant de noter que les métabolites spécialisés semblent se regrouper plus distinctement par rapport à la composition des genres végétaux, bien que cela puisse s'expliquer par les méthodes d'échantillonnage légèrement différentes. De nombreux composés annotés ont déjà été détectés dans des échantillons de miel. Par exemple, de nombreuses hydroxycinnamoylamine, constituants connus du pollen avec des niveaux et des modèles de substitution variables entre les espèces végétales^{45–47}, ont été annotées. Certains des isomères détectés ayant des origines florales évidentes se trouvaient systématiquement dans des échantillons provenant des trois régions (par exemple, les isomères de la tricumaroylspermidine sont connus pour être présents dans le pain d'abeille au colza⁴⁸), tandis que d'autres étaient évidemment dérivés de taxons végétaux plus spécifiques. L'acide pantothénique, une vitamine, et l'acide abscessique, une hormone végétale possédant des rôles régulateurs divers et importants dans les plantes, étaient également courants. Il est intéressant de noter que l'acide abscessique semble avoir un impact bénéfique sur la santé des abeilles. Il a été démontré que la supplémentation en acide abscessique améliore la réponse immunitaire chez les abeilles domestiques et contribue à la santé des colonies⁴⁹, et elle a pu améliorer la tolérance au stress dû au froid chez les larves d'abeilles domestiques élevées *in vitro*⁵⁰, elle aurait donc pu guider les choix floraux.

Deux acides carboxyliques couramment présents dans les zones ruchers remontent à la gelée royale, l'aliment des larves de l'abeille, qui est connue pour contenir des acides décène et décanedioïque identifiés ici^{51, 52}. Ces composés ont déjà été détectés dans diverses accessions de miel, et leurs leur présence dans la gelée royale suggère qu'ils proviennent de l'abeille elle-même et ne jouent aucun rôle dans les choix de recherche de nourriture.

Parmi les métabolites discriminants entre les zones, les favonoïdes chryisine, tectochryisine et pin-obanksine ont fréquemment été détectés dans le miel^{53, 54}. Puisqu'ils sont connus comme des constituants typiques de la propolis, leur abondance dans le miel peut plutôt dépendre de sa teneur en propolis que de sa teneur en propolis. L'origine florale⁵⁵. Le vomifolol a déjà été détecté comme constituant majeur du miel produit à partir du nectar de *Salix*⁵⁶ et comme constituant mineur du miel de *Trifolium pratense*⁵⁷. En ligne, *Salix* et *Trifolium* figuraient parmi les genres relativement les plus abondants.

dans l'ADN de ces échantillons de miel. La salicine n'a été détectée qu'occasionnellement dans le miel, mais elle est également connue comme constituant de l'espèce *Salix*58.

Conclusions

Nous avons constaté que les abeilles mellifères sont clairement sélectives pour les fleurs dans leur ensemble, n'utilisant qu'une fraction des plantes disponibles. La floraison massive du colza semble altérer davantage la recherche de pollen que de nectar. La période de l'été et l'environnement des ruches déterminent la disponibilité des fleurs, et bien que de nombreuses espèces végétales puissent fournir à la fois du nectar et du pollen appropriés, nous avons constaté que chaque colonie sélectionnait des plantes largement différentes pour le nectar et le pollen.

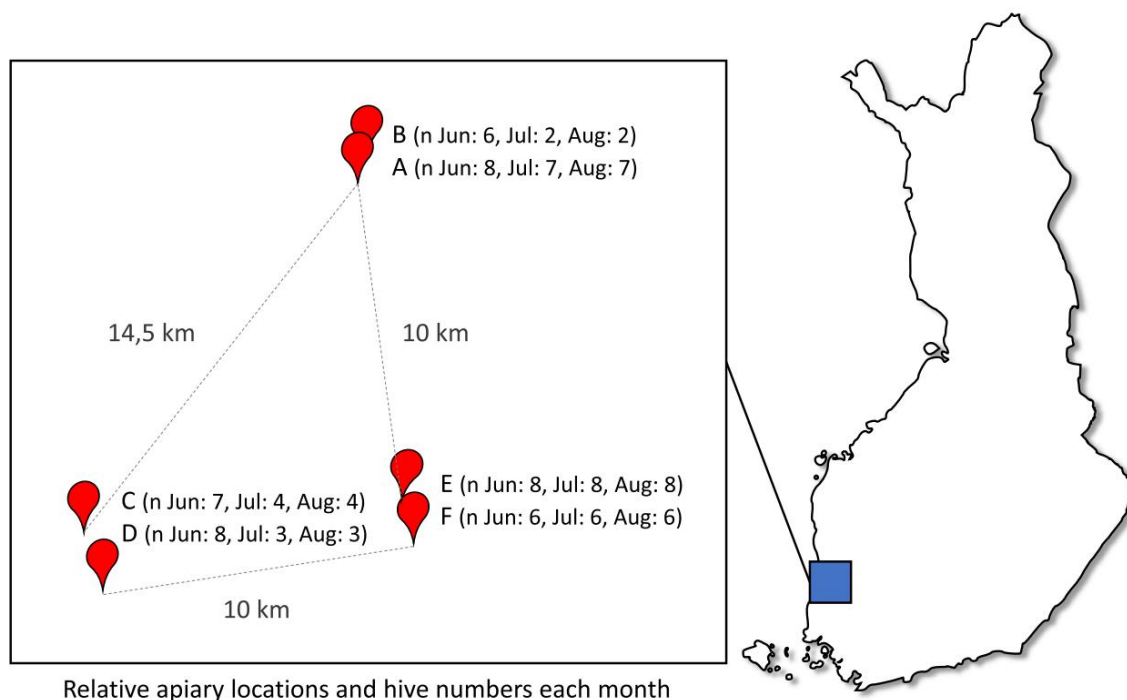
Ensemble, ils racontent que les abeilles fondent leurs choix de recherche de nourriture sur plusieurs facteurs et qu'elles choisissent activement les plantes sur lesquelles elles se nourrissent. Des recherches plus approfondies sur les besoins en nectar et en pollen des abeilles et sur les choix de recherche de nourriture pourraient simultanément contribuer aux efforts de conservation des abeilles. Comme nous savons qu'une diversité de plantes est importante pour répondre aux besoins nutritionnels des abeilles, nous devons garantir qu'une grande variété de plantes soit disponible pour elles tout au long de l'été, afin qu'elles puissent sélectionner les bonnes plantes pour répondre à leurs besoins en ressources.

Matériels et méthodes

Description de l'habitat et échantillonnage. Pour étudier les choix de recherche de nourriture des abeilles pour le nectar et le pollen, nous avons étudié 43 colonies d'abeilles et les plantes fleuries environnantes dans le sud de la Finlande en 2021. Les ruches ont été créées en 2020 et entretenues par deux apiculteurs expérimentés utilisant des pratiques apicoles finlandaises conventionnelles41. Les ruches étaient réparties dans six ruchers, avec deux ruchers distants de moins de 2 km et 10 à 15 km entre chaque paire de ruchers (Fig. 6). Dans chaque rucher, il y avait de deux à huit ruches. Les ruches ont également été utilisées dans une expérience sur l'amorçage immunitaire transgénérationnel59. Le traitement d'amorçage n'a eu aucun effet sur le comportement de recherche de nourriture (Fig. S2 supplémentaire) et n'est donc pas pris en compte davantage dans cette étude.

Comme les abeilles butinent principalement à quelques kilomètres de leur ruche60 et dépassent rarement dix kilomètres61, nous considérons que chaque paire de ruchers partage en partie les ressources florales, alors qu'entre les paires de ruchers les abeilles étudiées seraient pour la plupart trop éloignées les unes des autres pour les utiliser. Les mêmes ressources en fleurs. La zone du rucher est constituée d'une mosaïque de champs cultivés et de forêts gérées, avec des différences dans les ratios entre ceux-ci entre le voisinage de chaque rucher, telles que déterminées par la base de données Corine sur la couverture terrestre (version 20b2, 2018, base de données raster européenne de 100 m62 ; Fig. S3).

Nous avons cartographié les plantes à fleurs et, dans les ruches, nous avons collecté des échantillons de pain d'abeille et de miel à trois moments au cours de l'été 2021. Le premier échantillonnage des ruches et le décompte des fleurs ont été effectués en juin (du 8 au 13 juin), le deuxième en juillet (9.–14.7.), et troisième en août (10.–13.8.2021). Pour l'échantillonnage, qui concernait uniquement les ruches, nous avons l'autorisation des propriétaires des ruches et était donc conforme à toutes les règles et législations nationales en Finlande, car aucun autre permis n'est requis. Les plantes à fleurs ont été évaluées dans un rayon de 3 km des ruches, dans des sites sélectionnés par échantillonnage stratifié (aléatoire) avec allocation arbitraire, dans différents types d'habitats indiqués par la base de données Corine sur la couverture terrestre. Les types d'habitats sélectionnés à cartographier étaient les forêts mixtes, les forêts de conifères et les forêts de feuillus, les bords de routes, de rivières et les pâturages naturels. Cinq des types d'habitats ont été trouvés à proximité de chaque paire de ruchers, tandis que la forêt de feuillus n'en était proche que de deux (ruchers AB et CD) et dans la troisième zone.



Relative apiary locations and hive numbers each month

Figure 6. Localisation de la zone d'étude en Finlande (rectangle sur la carte non à l'échelle) avec emplacements relatifs des ruchers et numéros de ruches chaque mois (juin, juillet et août 2021).

(ruchers E–F), la seule végétation riveraine était présente. Au total, les fleurs ont été identifiées et comptées dans 24 sites, soit six types de végétation à proximité de chaque paire de ruchers puis un site à côté de chaque rucher. Dans chaque site, une superficie de 200 m² a été aménagée (14,5 m × 14,5 m ou 100 m × 2 m). De plus, nous avons évalué les plantes fleuries à proximité de chaque rucher, en bordure d'un champ si le rucher était placé à côté d'un champ, ou le long d'une route si le rucher était situé en forêt. Pour ceux-ci, nous avons établi des superficies de 100 m × 2 m (200 m²). Toutes les plantes à fleurs de la zone ont été identifiées sur la base de la littérature disponible sur place⁶³.

Pour évaluer les plantes utilisées pour la recherche de nectar, nous avons collecté une cuillerée (environ 15 g) de miel nouvellement recouvert sur trois cadres de chaque ruche, afin de couvrir la diversité du miel à la fois. Le miel a été collecté à l'aide d'une cuillère propre à l'ADN dans un tube de 50 ml sans ADN (Sarstedt AG & Co. KG, Allemagne), regroupant l'échantillon des trois cadres. Des cuillères sans ADN ont été préparées par lavage avec un détergent et incubation pendant 5 h à + 200 °C.

Lors de l'échantillonnage en août, un autre échantillon de miel a été collecté pour évaluer les métabolites végétaux présents dans le miel. Pour cela, l'échantillon regroupé a été collecté de la même manière, sauf en échantillonnant la cuillerée d'un cadre de miel nouvellement recouvert et de deux cadres contenant du miel plus ancien, afin d'obtenir un échantillon représentant la dernière partie de la saison de manière plus complète. Pour identifier les espèces en fleurs dont les abeilles collectent le pollen, par rapport au nectar, nous avons collecté un échantillon de pain d'abeille dans chaque ruche aux mêmes moments. Vingt cellules de pain d'abeille ont été échantillonnées à partir de trois cadres, ce qui a donné un échantillon regroupé de soixante cellules de pain d'abeille, pour couvrir la diversité du pollen stocké dans une ruche à la fois. Le pain d'abeille d'une cellule a été échantillonné en poussant une paille en plastique jusqu'au fond d'une cellule et en la tordant, incluant ainsi la totalité ou la majeure partie du pain d'abeille dans une cellule. Les échantillons ont été immédiatement congelés sur de la neige carbonique dans le champ. Tous les échantillons ont été conservés congelés à -20 °C avant un traitement ultérieur.

Exemples de numéros. Au début de l'échantillonnage, nous avons échantillonné 43 ruches, mais malheureusement près d'un tiers des colonies se sont retrouvées sans reine (la reine était morte ou avait essaimé) avant le deuxième échantillonnage, donc il restait 30 ruches en juillet et 29 en août. Au total, nous avons collecté 99 échantillons de miel et 90 échantillons de pain d'abeille, car nous n'avons pas pu obtenir un échantillon approprié. Lors du premier échantillonnage en juin, onze des ruches n'avaient pas encore de miel couvert. Nous avons donc échantillonné du nectar partiellement transformé comme échantillon de miel.

Prétraitement des échantillons pour l'extraction de l'ADN. Avant d'extraire l'ADN, les échantillons ont été prétraités. Pour le miel, l'échantillon collecté sur trois cadres a été mélangé et 10 g de miel ont été dilués dans 30 ml d'eau propre à ADN dans un tube de 50 ml. Le miel a été laissé se dissoudre dans l'eau pendant 30 minutes à 60°. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 8 000 G pendant 60 minutes, après quoi la majeure partie du surnageant a été éliminée et le culot a été transféré dans un tube de 2 ml. Le tube de 2 ml a ensuite été centrifugé à 11 000 G pendant 5 min et le surnageant restant a été éliminé.

Pour le pain d'abeille, le pain d'abeille était d'abord extrait de la paille et pesé avec une balance de précision. L'échantillon a ensuite été dilué dans de l'eau bidistillée avec un rapport pondéral eau-pain d'abeille de 2: 1 et mélangé avec un agitateur magnétique pendant 10 min pour produire une suspension homogénéisée. 100 µl de suspension de pain d'abeille par échantillon ont été collectés dans un tube de microcentrifugation de 2 ml. Le tube de 2 ml a été centrifugé à 16 873 G pendant 3 min et le surnageant a été éliminé.

Tous les échantillons prétraités ont été conservés au congélateur jusqu'à l'extraction de l'ADN.

Extraction, amplifications et séquençage d'ADN. Le mini kit QIAamp DNeasy plant (Qiagen, Pays-Bas) a été utilisé pour extraire l'ADN avec les protocoles adaptés du fabricant. Pour les échantillons de miel, le culot a été remis en suspension dans 400 µl de tampon AP1, puis 4 µl de RNase, 4 µl de protéinase K (20 mg/ml) et une bille de carbure de tungstène de 3 mm ont été ajoutés à chaque tube d'échantillon. L'échantillon a été perturbé 2 x 2 min à 30 Hz (Mixer Mill MM 400, Retsch, Allemagne). L'extraction de l'ADN a ensuite suivi le protocole, à l'exception de l'omission de l'étape de la colonne QIAshredder et, enfin, l'ADN a été élué dans 50 µl de tampon d'éluion.

Pour les échantillons de pain d'abeille, le culot a été remis en suspension dans 400 µl de tampon AP1 avec deux billes métalliques de 5 mm et rompu 2 x 2 min à 30 Hz (TissueLysér II, Qiagen, Pays-Bas). L'incubation avec le tampon AP1 et 4 µl de RNase A a été réalisée à 65 °C pendant 30 min, en inversant les tubes deux fois pendant l'incubation. Le protocole du fabricant a ensuite été suivi, sauf qu'un volume d'éluion final de 100 µl a été utilisé avec une seule étape de centrifugation. Avec l'extraction de chaque type d'échantillon, 2 à 3 contrôles d'extrait d'ADN ont été inclus. Nous avons utilisé uniquement des tubes, des pointes de pipettes et des plaques PCR sans ADN ainsi que de l'eau sans ADN.

Les amplifications initiales ont été réalisées avec un volume total de 10 µl, contenant chacune 5 µl de MyTaq Red Mix (Bio-ligne, Londres, Royaume-Uni), 1,3 µl d'eau sans ADN, 0,3 µM de chaque amorce et 3 µl d'extrait d'ADN. Pour amplifier une région ITS2 partielle à partir d'échantillons de miel et de pain d'abeille, nous avons utilisé les amorces ciblées sur les plantes avec une étiquette pour attacher l'index dans la deuxième PCR, tagF ITS2-F et tagR ITS2-R (tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagATGCGATACCTTG GTGTGAAT et gtctcgtggcgtcggagatgtgtataagagacagTCCTCCGCTTATTGATATGC, respectivement, étiquette affichée en minuscules et amorce de recuit en majuscules^{64, 65}). Les conditions du cycle PCR étaient les suivantes. La dénaturation initiale a duré 3 min à 95 °C, suivie de 28 cycles de 30 s à 95 °C (dénaturation), 30 s à 55 °C (recuit), 30 s à 72 °C (extension) et se terminant par le dernier prolongation pendant 7 min à 72 °C. Pour minimiser le biais initial d'amplification, chaque réaction a été réalisée en deux répétitions. Tous les amplicons ont été vérifiés sur gel d'agarose et imagés pour vérifier que la réaction avait fonctionné et que les contrôles ADN et PCR étaient propres. Les réplicats de PCR ont été combinés avant la PCR en bibliothèque sous forme de 1, 3 µl de chaque réplicat de produit de PCR. Des adaptateurs spécifiques à Illumina et des combinaisons uniques à double index pour chaque échantillon ont été utilisés ⁶⁶. La PCR de la bibliothèque avait un volume total de 10 µl, chacune contenant 5 µl de MyTaq Red Mix (BioLine, Londres, Royaume-Uni), 0,3 µM d'amorce inverse, 0,3 µM d'amorce directe et 2,6 µl du 1er produit PCR combiné spécifique au locus. Les conditions de cycle de PCR étaient les suivantes, les mêmes pour toutes les régions génétiques de la bibliothèque PCR. Commencant par 4 min à 95 °C pour dénaturer, suivi de 15 cycles de 20 s à 98 °C, 15 s à 60 °C et 30 s à 72 °C, et se terminant par 3 min à 72 °C. Les bibliothèques d'ADN ont été regroupées par région génique et pour 96 échantillons, et concentrées à l'aide d'un protocole de billes SPRI. L'échantillon groupé concentré a été chargé sur un gel d'agarose à 1 % (comprimés d'agarose + TAE) et analysé avec 90 V pendant 120 min. Les bandes cibles ont été coupées à la lumière UV et l'échantillon regroupé

a été nettoyé du gel avec le kit PCR et Gel CleanUp (Macherey – Nagel), dilué dans $2 \times 20 \mu\text{l}$ du tampon d'éluion fourni dans le kit. La concentration d'ADN des piscines nettoyées a été mesurée avec Qubit 2.0 (dsHS DNA Kit, TermoFisher Scientific).

Les pools de 96 échantillons ont été combinés dans des rapports équimolaires et séquencés en deux cycles de séquençage MiSeq. (y compris d'autres bibliothèques également) avec une chimie v3 avec 600 cycles et une longueur de lecture à extrémités appariées de $2 \times 300 \text{ pb}$.

Bioinformatique. Le traitement bioinformatique (suivant^{67, 68}) impliquait d'abord de tronquer les lectures à 240 pb. Cela a été fait pour couper les extrémités de qualité inférieure avant de fusionner les extrémités appariées pour chaque région génétique à l'aide de VSEARCH69 avec un maximum de 80 différences autorisées pour le chevauchement et une longueur d'assemblage minimale de 150 pb.

La qualité des lectures fusionnées a été contrôlée par fastq_maxee, avec maxee=3. Les amorces ont été supprimées à l'aide de cutadapt avec un taux d'erreur maximum de 0,2 pour les amorces, et les lectures ont été conservées avec une longueur minimale de 100 pb après la suppression de l'amorce. Les lectures fusionnées et dont la qualité a été contrôlée n'étaient conservées que si elles contenaient les amorces attendues à chaque extrémité. Les lectures ont ensuite été dérépliquées en uniques et les singletons ont été supprimés. Les lectures ont été débruitées en unités taxonomiques opérationnelles à rayon zéro (ZOTU) en utilisant unioise3 avec USEARCH70. Une table ZOTU a été construite et l'attribution taxonomique des ZOTU a été effectuée par comparaison avec une base de données de référence ITS2 de PLANTITS71, consultée le 21.3.2022 avec VSEARCH. Nous considérons ici les attributions taxonomiques telles qu'elles résultent des analyses sans correction basée sur la distribution des espèces, bien que certaines attributions de genre puissent ne pas être correctes, par exemple, x-Amelasorbus est un genre hybride, et très probablement les séquences qui lui sont attribuées proviendraient de Sorbus en Finlande.

Pour supprimer d'éventuelles lectures mal attribuées et faux positifs, dus à une contamination, nous avons filtré davantage les lectures dans les ZOTU (en suivant par exemple 72, 73). Comme un petit nombre de lectures a été trouvé dans tous les contrôles, les lectures ont été supprimées pour chaque ZOTU, de chaque échantillon si elles étaient inférieures aux lectures dans l'échantillon que le nombre maximum de lectures provenant de l'extraction d'ADN ou des contrôles négatifs PCR pour le ZOTU. Après l'attribution taxonomique, les taxons contenant moins de 0,05 % du nombre total de lectures de cet échantillon ont été supprimés, ainsi que les taxons comportant moins de 10 lectures. Les échantillons comportant moins de 5 000 lectures ont été supprimés pour exclure les échantillons présentant un séquençage superficiel.

Méthodes statistiques. Nous avons calculé les abondances relatives lues (RRA) de chaque genre végétal par échantillon³², et les données RRA ont été utilisées pour les analyses. Nous avons également effectué les analyses en utilisant des données de présence-absence (PA). Les résultats des analyses PA sont généralement en accord avec les résultats RRA et sont disponibles dans les informations supplémentaires.

Des méthodes statistiques ont été mises en œuvre et des chiffres générés dans la version R 4.2.2⁷⁴, à l'exception des analyses spécialisées des métabolites (voir ci-dessous). Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Pour identifier la différence dans la sélection des ressources forales par les abeilles pour produire du miel ou du pain d'abeille, nous avons d'abord testé l'homogénéité multivariée de la dispersion des groupes entre miel et pain d'abeille (PERMDISP, fonction R « betadisper » du package vegan75, en utilisant la méthode Hellinger- données transformées au niveau du genre). Deuxièmement, nous quantifions la différence de composition en genres végétaux entre le pain d'abeille et le miel à l'aide d'une analyse de variance permutatoire (PERMANOVA, avec la fonction « adonis2 » du package végétalien75). Comme adonis2 n'autorise pas les effets aléatoires, les termes site, rucher et ruche ont été inclus dans la formule du modèle en tant qu'effets fixes pour tenir compte de la pseudo-réplication suivant la structure :

adonis (Hellinger_abundance site/rucher/ruche + sample_type).

Pour décrire comment les échantillons de miel et de pain d'abeille diffèrent et se regroupent en groupes distincts en fonction de leur composition en genres végétaux, nous avons appliqué une mise à l'échelle multidimensionnelle non métrique (NMDS, avec la fonction « métaMDS » du package vegan75). Le NMDS a en outre été utilisé pour illustrer les effets temporels sur les échantillons ainsi que pour la comparaison avec des ensembles de données sur les métabolites, pour lesquels des données d'échantillons de miel regroupés de juillet et août ont été utilisées. Les analyses NMDS ont été effectuées avec des données transformées de Hellinger.

Nous avons analysé le nombre de genres dans chaque type d'échantillon (miel ou pain d'abeille) avec des modèles linéaires, en utilisant le point temporel comme variable explicative et la ruche comme variable aléatoire, avec la fonction « lmer » du package lme476. Des comparaisons par paires pour les points temporels ont été effectuées à l'aide d'emmeans-package77 avec un ajustement de la valeur p de Tukey. Pour analyser la proportion de genres partagés et non partagés dans les comparaisons appariées miel-pain d'abeille, un modèle linéaire généralisé binomial avec fonction logit-link a été utilisé (en utilisant la fonction « glmer » du package lme476), en utilisant à nouveau le point temporel comme variable explicative et la ruche comme variable aléatoire. Les hypothèses du modèle ont été vérifiées visuellement et avec le package R DHARMA78. Pour identifier les genres de plantes les plus associés aux échantillons de miel et de pain d'abeille, nous avons utilisé l'analyse des espèces indicatrices (IndVal, avec la fonction « multipatt » du package indicspecies79, utilisant 999 permutations).

Pour tester la contribution des variables affectant les choix foraux, nous avons utilisé l'analyse de redondance partielle (RDA) utilisant Distances Hellinger. Le modèle suit la structure :

RDA (Hellinger_abundance type d'échantillon temps + site conditionnel rucher ruche .

Comme pour le modèle PERMANOVA, le RDA contrôle expérimentalement les variables de conception pour tenir compte de la pseudo-réplication. Le modèle a également été testé avec la profondeur de lecture du séquençage, qui semble diminuer la variation conditionnelle observée d'environ 5 % (tableau supplémentaire S8). L'ordination contrainte a été testée par un test de permutation de type ANOVA dans le package végétalien. Les variations associées aux variables temporelles, spatiales et méthodologiques ont été quantifiées par partitionnement des variations avec la fonction « varpart » du package vegan75.

Extraction de métabolites spécialisés végétaux. Des métabolites spécialisés ont été purifiés à partir d'échantillons de miel provenant de 27 ruches. Tout d'abord, cinq grammes de miel ont été mesurés dans des tubes à centrifuger de 50 ml en trois répétitions. Deux

Différentes méthodes de purification ont été utilisées pour éliminer les sucres et récupérer une aussi grande variété de métabolites spécialisés que possible. La méthode de purification 1 suivait une méthode principalement orientée vers l'enrichissement en favo-noïdes, c'est-à-dire des métabolites moyennement polaires⁸⁰, avec de légères modifications. 15 ml d'eau, ajusté à pH 2 avec HCl, ont été mélangés au miel et agités avec un agitateur magnétique pendant 15 min jusqu'à ce qu'ils soient complètement fluides. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 3 220 G, 25 ° C, 1 min pour éliminer les particules. Le surnageant a été chargé sur une cartouche Oasis 500 mg HLB (Waters, USA), préconditionné avec 10 ml de méthanol, suivi de 10 ml d'eau (pH 2), laissé à l'équilibre pendant 10 min et lavé avec 10 ml d'eau pure. Les analytes ont été élués avec 5 ml de méthanol dans un tube à centrifuger de 15 ml. L'éluant a été éliminé sous un courant d'azote. Avant la mesure, les échantillons ont été reconstitués dans 1 ml d'acide formique/acétonitrile à 0,1 % (70/30) contenant 0,025 mg/ml d'indométacine comme étalon interne (ISTD) et filtrés sur des filtres PTFE de 0,45 µm.

Étant donné que la méthode de purification 1 entraînerait la perte d'alcaloïdes et de composés très polaires lors de l'étape de lavage, les échantillons ont été purifiés avec la méthode 2 qui est basée sur le protocole Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe (QuEChERS). Cela a été largement appliqué pour l'enrichissement de divers composés traces, notamment pour l'analyse des alcaloïdes dans le miel⁸¹. Tout d'abord, 10 ml d'eau et 10 ml d'acétonitrile ont été mélangés dans l'échantillon de 5 g de miel et soigneusement agités jusqu'à ce que le mélange soit homogène. Ensuite, 8,2 g de MgSO₄·7H₂O et 1 g de NaCl ont été ajoutés. Le mélange a été secoué vigoureusement pendant 1 min puis centrifugé pendant 5 min à 2465 G, 25 ° C, 5 min. La couche supérieure a été filtrée à travers un filtre en acétate de cellulose de 0,45 µm, et 1 ml a été séché sous un courant d'azote et redissous dans 100 µl de MeOH/H₂O 1/1 contenant 0,01 mg/ml de benzanilide comme ISTD.

Les analyses ont été effectuées sur un UHPLC Dionex Ultimate 3000 couplé à un spectromètre de masse Termo QExactive Hybrid Quadrupole Orbitrap équipé d'une sonde H-ESI II (Termo Fisher Scientific).

En phase stationnaire, une colonne Acquity UPLC® HSS T3 1,8 µm, 100×2 mm protégée par un Acquity UPLC®

Une colonne de garde HSS T3 1,8 µm, 2,1 x 5 mm (Waters) a été utilisée. Deux méthodes de séparation différentes ont été appliquées aux ensembles d'échantillons préparés par les deux méthodes de purification :

Pour les échantillons purifiés avec la méthode 1, la phase mobile était constituée d'eau + 0,1 % de HCOOH (solvant A) et d'acétonitrile + 0,1 % de HCOOH (solvant B). La température de la colonne était de 40 °C, le débit était de 0,45 ml/min et le gradient était le suivant : 0 à 15 min, 5 à 25 % de B dans A ; 15 à 22 minutes, 25 à 70 % de B dans A ; 22 à 25 minutes, 70 à 100 % de B dans A ; 25 à 26 minutes, 100 % B ; 26 à 26,3 min, 100 à 5 % de B dans A ; 26,3 à 32 min, 5 % de B dans A. Pour les échantillons purifiés avec la méthode 2, la phase mobile était constituée d'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). La température de la colonne était de 40 °C et le débit était de 0,4 ml/min. Le gradient était le suivant : 0 à 22 min, 10 à 72 % de B dans A ; 22 à 22,5 min, 72 à 100 % de B dans A ; 22,5 à 25 minutes, 100 % B dans A ; 25 à 25,5 min, 100 à 10 % de B dans A ; 25,5 à 30 min, 10 % de B dans A. Le volume d'injection pour les deux méthodes était de 3 µl.

Le spectromètre de masse a été utilisé en mode ESI négatif pour la méthode de séparation 1 et en mode positif pour la méthode de séparation 2. Les paramètres MS étaient les suivants : la température du chauffage de la sonde était de 350 °C, la température du capillaire était de 330 °C, le débit de gaz de la gaine était de 350 °C. 50 unités arbitraires, le débit de gaz auxiliaire était de 10 unités arbitraires, la tension capillaire était de 3 kV en mode négatif et de 3,5 kV en mode positif, et le niveau RF de la lentille S était de 60. La plage de balayage était de m/z 100 à 1 500 et la résolution était de 70 000 (FWHM) pour le MS complet et de 17 500 (FWHM) pour le MS2 dépendant des données des analyses. Au cours des premières 1,0 min (méthode de séparation 1) et 0,9 min (méthode de séparation 2) d'éluion, l'éluant a contourné le spectromètre de masse et aucune donnée n'a été enregistrée afin d'éviter la contamination du MS avec des niveaux élevés de glucides qui devraient être encore présent dans les échantillons malgré les mesures de purification.

En tant qu'échantillons à blanc, les solvants utilisés pour la préparation des échantillons ont été injectés et en tant qu'échantillons de contrôle qualité, des échantillons regroupés ont été préparés à partir des deux types d'échantillons (méthodes de purification 1 et 2) en mélangeant 10 µl de répétition 1 de chaque échantillon. Des échantillons à blanc ont été injectés au début, au milieu et à la fin de chaque séquence, et les échantillons QC ont été injectés à intervalles de 10 analyses.

Traitement et évaluation des données pour les métabolites spécialisés. Les données analytiques brutes ont été traitées avec Compound Discoverer 3.2 en utilisant les paramètres suivants : La fenêtre de temps de rétention pour la sélection des spectres était de 1 à 32 min pour l'ensemble de données 1 (acquis en mode ESI négatif avec la méthode de séparation 1) et de 0,9 à 26 min pour l'ensemble de données 2 (acquises en mode ESI négatif avec la méthode de séparation 1), en mode positif ESI avec méthode de séparation 2). L'alignement du temps de rétention a été effectué avec un modèle de courbe adaptative (changement RT maximum 2 min, tolérance de masse maximale 10 ppm). Pour détecter et regrouper des composés inconnus, le seuil S/N était de 3, le seuil d'intensité minimum était de 5 000 000 pour l'ensemble de données 1 et de 10 000 000 pour l'ensemble de données 2, et la tolérance RT était de 1 min. Le seuil S/N pour le remplissage des écarts était de 20. Le résultat, une matrice de données comprenant le temps de rétention et l'intensité de chaque caractéristique de chaque échantillon, a été exporté vers MS Excel pour un traitement ultérieur. Dans les deux ensembles de données, les caractéristiques dérivées du fond analytique ont d'abord été supprimées et les zones de pic de l'ISTD dans tous les échantillons ont été comparées graphiquement afin d'inspecter l'ensemble de données pour détecter les échantillons qui n'avaient pas été injectés correctement. Sur cette base, l'échantillon 23_2 a été exclu de l'ensemble de données 1 et l'échantillon 5_2 a été exclu de l'ensemble de données 2.

Dix, toutes les zones de pic restantes ont été normalisées par rapport à la zone de pic de l'ISTD dans l'analyse respective. Afin de supprimer les caractéristiques peu fiables, les moyennes et l'écart type relatif ont été calculés pour toutes les caractéristiques détectées dans les échantillons de contrôle qualité regroupés. Les entités présentant un écart type relatif supérieur à 33 % ont été considérées comme peu fiables et supprimées des ensembles de données. Ces ensembles de données pré-traités ont été soumis à une analyse de données multivariée (MVDA) à l'aide de SIMCA 17 (Sartorius). Avant MVDA, les données étaient transformées en log et mises à l'échelle de Pareto. Pour le MVDA non supervisé, l'analyse en composantes principales (HCA) et l'analyse de regroupement hiérarchique (HCA) ont été utilisées. Pour le MDVA supervisé, des modèles OPLS-DA avec trois classes correspondant aux trois zones ruchers ont été construits.

Pour suivre les métabolites présents à des niveaux élevés dans toutes les zones de rucher, les surfaces de pic moyennes par zone de rucher ont été calculées pour chaque métabolite dans les deux ensembles de données. Les pics se produisant avec des zones de pic moyennes > 200 000 000 (ensemble de données 1) et > 750 000 000 (ensemble de données 2) dans les trois zones de ruchers ont été soumis à une annotation de pic.

L'annotation des métabolites discriminants et communs a été réalisée soit en comparant les données de temps de rétention ou de MS avec des composés de référence authentiques (niveau ID 1), soit en comparant la formule moléculaire calculée et les MS/

Modèle de fragmentation MS avec des données de littérature ou de base de données (niveau ID 2), ou dans le cas où aucune donnée de littérature ou de base de données n'était disponible, par interprétation théorique de ces données (niveau ID 3).

Disponibilité des données

Les ensembles de données de séquence générés au cours de la présente étude sont disponibles dans le référentiel Sequence Read Archive, dans le BioProject PRJNA889252 <https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA889252?reviewer=gf7m> n7q3mt60s70onkmbf0mf pour l'examen, une fois accepté, sur <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA889252>.

Reçu : 12 mai 2023 ; Accepté : 5 septembre 2023

Published online: 07 September 2023

Les références

1. Ollerton, J., Winfree, R. et Tarrant, S. Combien de plantes à fleurs sont pollinisées par les animaux ? *Oikos* 120, 321-326 (2011).
2. Klein, A.-M. et coll. Importance des pollinisateurs dans l'évolution des paysages pour les cultures mondiales. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274, 303-313 (2007).
3. Klein, AM, Boreux, V., Fornof, F., Mupepele, AC & Pufal, G. Pertinence des abeilles sauvages et gérées pour le bien-être humain. *Curr. Avis. Insecte Sci.* 26, 82-88 (2018).
4. Di Pasquale, G. et al. Les variations dans la disponibilité des ressources en pollen affectent la santé des abeilles domestiques. *PLoS One* 11, e0162818 (2016).
5. Naug, D. Le stress nutritionnel dû à la perte d'habitat peut expliquer les récents effondrements de colonies d'abeilles. *Biol. Conserv.* 142, 2369-2372 (2009).
6. Vodovnik, C., Borshagovski, AM, Hakala, SM, Leponiemi, M. & Freitag, D. Coeffets du régime alimentaire et de l'exposition aux néonicotinoïdes sur la mobilité des abeilles et le choix alimentaire. *Apidologie* 52, 1-10 (2021).
7. Brodschneider, R. & Craillshaim, K. Nutrition et santé des abeilles mellifères. *Apidologie* 41, 278-294 (2010).
8. Waller, GD Évaluation des réponses des abeilles mellifères aux solutions sucrées à l'aide d'un distributeur de fleurs artificielles. *Anne. Entomol. Soc. Suis.* 65, 857-862 (1972).
9. Pamminger, T., Becker, R., Himmelreich, S., Schneider, CW et Bergtold, M. Rapport sur le nectar : Examen quantitatif des concentrations de sucre dans le nectar offert par les fleurs visitées par les abeilles dans les paysages agricoles et non agricoles. *PeerJ* 2019, e6329 (2019).
10. Vaudo, AD et coll. Protéines de pollen : les ratios de macronutriments lipidiques peuvent guider les grandes tendances des préférences formelles des espèces d'abeilles. *Insectes* 11, 132 (2020).
11. Hendriksma, HP & Shafir, S. Les butineuses d'abeilles mellifères équilibrent les carences nutritionnelles des colonies. *Comportement. Écol. Sociobiol.* 70, 509-517 (2016).
12. Zarchin, S., Dag, A., Salomon, M., Hendriksma, HP & Shafir, S. Les abeilles mellifères dansent plus vite pour le pollen qui complète la colonie carence en acides gras essentiels. *Comportement. Écol. Sociobiol.* <https://doi.org/10.1007/s00265-017-2394-1> (2017).
13. Cook, SM, Awmack, CS, Murray, DA et Williams, IH Les préférences alimentaires des abeilles mellifères sont-elles affectées par l'acide aminé du pollen composition?. *Écol. Entomol.* 28, 622-627 (2003).
14. Rotjan, RD, Calderone, NW et Seeley, TD Comment une colonie d'abeilles mellifères a rassemblé une main d'œuvre supplémentaire pour la tâche de recherche de pollen. *Apidologie* 33, 367-373 (2002).
15. Page, RE, Scheiner, R., Erber, J. & Amdam, GV Développement et évolution de la division du travail et de la spécialisation en recherche de nourriture chez un insecte social (*Apis mellifera* L.). *Curr. Haut. Dév. Biol.* 74, 253-286 (2006).
16. Saunders, ME Les insectes pollinisateurs collectent le pollen des plantes pollinisées par le vent : implications pour l'écologie de la pollinisation et le développement durable agriculture. *Insecte. Conserv. Plongeurs.* 11, 13-31 (2018).
17. Hawkins, J. et al. Utiliser le métabarcoding ADN pour identifier la composition forale du miel : un nouvel outil pour enquêter sur les abeilles domestiques préférences de recherche de nourriture. *PLoS ONE* 10, e0134735 (2015).
18. Danner, N., Molitor, AM, Schiele, S., Härtel, S. et Stefan-Dewenter, I. La saison et la composition du paysage affectent la recherche de pollen distances et utilisation de l'habitat des abeilles mellifères. *Écol. Appl.* 26, 1920-1929 (2016).
19. Cofey, MF & Breen, J. Variation saisonnière des sources de pollen et de nectar des abeilles mellifères en Irlande. *J. Apic. Rés.* 36, 63-76 (1997).
20. McMinn-Sauder, H., Lin, CH, Eaton, T. et Johnson, R. Une comparaison de la recherche de pollen et de nectar au printemps chez les abeilles mellifères élevées dans des environnements urbains et agricoles. *Devant. Soutenir. Système alimentaire.* 6, 66 (2022).
21. De Vere, N. et coll. L'utilisation de métabarcodes ADN pour étudier la recherche de nourriture des abeilles mellifères révèle une utilisation limitée de la fleur malgré une forte disponibilité forale. *capacité. Sci. Rep.* 7, 1-10 (2017).
22. Von Der Ohe, W., PersanoOddo, L., Piana, ML, Morlot, M. & Martin, P. Méthodes harmonisées de méllissopalynologie. *Apidologie* 35, 18-25 (2004).
23. Cannizzaro, C. et al. Les paysages forestiers augmentent la diversité du régime alimentaire des abeilles sous les tropiques. *Pour. Écol. Gérer.* 504, 119869 (2022).
24. Wirta, HK, Bahram, M., Miller, K., Roslin, T. et Vesterinen, E. Reconstruire le contexte écosystémique d'une espèce : transmis par le miel L'ADN révèle les rôles de l'abeille. *PLoS One* 17, e0268250 (2022).
25. Wirta, H., Abrego, N., Miller, K., Roslin, T. & Vesterinen, E. L'ADN retrace l'origine du miel en identifiant les plantes, les bactéries et champignons. *Sci. Rep.* 11, 4798 (2021).
26. Tomson, JD, Draguleasa, MA & Tan, MG Les fleurs au nectar caféiné reçoivent plus de pollinisation. *Arthropode. Interagir avec les plantes.* 9, 1-7 (2015).
27. Köhler, A., Pirk, CWW & Nicolson, SW Abeilles et nectar nicotine : dissuasion et survie réduite par rapport au potentiel bienfaits pour la santé. *J. Physiol des insectes.* 58, 286-292 (2012).
28. Rivest, S. & Forrest, JRK Composés de défense dans le pollen : pourquoi apparaissent-ils et comment affectent-ils l'écologie et l'évolution des abeilles ? *Nouveau Phytol.* 225, 1053-1064 (2020).
29. Stevenson, PC, Nicolson, SW & Wright, GA Métabolites secondaires des plantes dans le nectar : impacts sur les pollinisateurs et les fonctions écologiques. *Fonction. Écol.* 31, 65-75 (2017).
30. Roessink, I. & van der Steen, JMM La consommation de pain d'abeille par les abeilles mellifères est rapide : résultats d'une étude sur le terrain de 6 semaines. *J. Apic. Rés.* 60, 659-664 (2021).
31. Eyer, M., Neumann, P. & Dietemann, V. Un regard sur la cellule : stockage du miel chez les abeilles mellifères *Apis mellifera*. *PLoS One* 11, e0161059 (2016).
32. Deagle, BE et coll. Compter avec l'ADN dans les études de métabarcodage : comment devrions-nous convertir les lectures de séquences en données alimentaires ? *Mol. Écol.* 28, 391-406 (2019).
33. Bell, KL et coll. Évaluation quantitative et qualitative du métabarcoding de l'ADN du pollen à l'aide de mélanges d'espèces construits. *Mol. Écol.* 28, 431-455 (2019).
34. Filipiak, M., Walczyńska, A., Denisow, B., Petanidou, T. & Ziolkowska, E. Phénologie et production de pollen, de nectar et de sucre en 1612 espèces végétales provenant de milieux divers. *Écologie* 103, e3705 (2022).
35. Requier, F. et al. Le régime alimentaire des abeilles mellifères dans les habitats agricoles intensifs révèle une richesse florifère étonnamment élevée et un rôle majeur des mauvaises herbes. *Écol. Appl.* 25, 881-890 (2015).
36. Latty, T. & Trueblood, JS Comment les insectes choisissent-ils les fleurs ? Un examen du choix des fleurs multi-attributs et des effets de leurre dans les fleurs. *insectes visiteurs. J. Anim. Écol.* 89, 2750-2762 (2020).

- 37 Milla, L., Schmidt-Lebuhn, A., Bovill, J. et Encinas-Viso, F. Surveillance des ressources forales d'abeilles mellifères avec le métabarcodage de l'ADN du pollen comme outil complémentaire aux enquêtes sur la végétation. *Écol. Solution. Évident.* 3, 10. <https://doi.org/10.1002/2688-8319.12120> (2022).
38. Jones, L. et coll. Les schémas temporels de la recherche de nourriture des abeilles dans un paysage foral diversifié révélés à l'aide du métabarcoding de l'ADN du pollen de Miel. *Intégré. Comp. Biol.* 62, 199-210 (2022).
39. Lowe, A., Jones, L., Brennan, G., Creer, S. & de Vere, N. Progression saisonnière et différences dans l'utilisation des principales ressources forestières par les abeilles et les aérogisseurs dans un paysage horticole et agricole diversifié révélé par l'ADN. métabarcodage. *J. Appl. Écol.* 59, 1484-1495 (2022).
40. Lowe, A. et al. Le changement temporel de la disponibilité alimentaire entraîne des périodes de limitation des ressources et affecte la spécificité du régime alimentaire chez un généraliste. *pollinisateur. Mol. Écol.* <https://doi.org/10.1111/MEC.16719> (2022).
- 41 Ruutinen, L., Ollikka, T., Vartiainen, H. & Seppälä, A. Mehiläishoitoa käytännössä: osa 1 (Suomen mehiläishoitajain liitto SML, 2003).
42. Danner, N., Keller, A., Härtel, S. et Stefan-Dewenter, I. Écologie de la recherche de nourriture des abeilles domestiques : saisons mais pas de formes de diversité paysagère la quantité et la diversité du pollen collecté. *PLoS ONE* 12, e0183716 (2017).
- 43 Schmidt, L.S., Schmidt, J.O., Hima, Rao, Weiji, W. et Ligen, Xu. Préférence alimentaire et survie des jeunes abeilles ouvrières (Hyménoptères : Apidae) se sont nourris de pollen de colza, de sésame et de tournesol. *J. Écon. Entomol.* 88, 1591-1595 (1995).
44. Di Pasquale, G. et coll. Influence de la nutrition pollinique sur la santé des abeilles domestiques : la qualité et la diversité du pollen sont-elles importantes ? *PLoS UN* 8, e72016 (2013).
45. Nasti, R. et coll. Une enquête analytique sur les polyamines de cannelle hydroxylées en tant que biomarqueurs du pollen d'abeille commercial origine. *Int. J. Food Sci. Technologie.* 57, 7787-7796 (2022).
46. Qiao, J. et coll. Profils de phénolamide et de glycoside favonoïde de 20 types de pollen d'abeille monoforal. *Chimie alimentaire.* 405, 134800 (2023).
47. Palmer-Young, EC et coll. Chimie des récompenses forales : variabilité intra- et interspécifique des métabolites secondaires du nectar et du pollen à travers les taxons. *Écol. Monogr.* 89, e01335 (2019).
48. Zhang, H., Liu, R. et Lu, Q. Séparation et caractérisation des phénolamines et des favonoïdes du pollen d'abeille de colza et comparaison de leurs activités antioxydantes et de leurs effets protecteurs contre le stress oxydatif. *Molécules* 25, 1264 (2020).
49. Negri, P. et coll. L'acide abscessique améliore la réponse immunitaire chez *Apis mellifera* et contribue à la santé de la colonie. *Apidologie* 46, 542-557 (2015).
50. Ramirez, L. et al. L'acide abscessique améliore la tolérance au froid des larves d'abeilles. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284, 20162140 (2017).
51. Isidorov, VA, Czyzewska, U., Jankowska, E. & Bakier, S. Détermination des acides de la gelée royale dans le miel. *Chimie alimentaire.* 124, 387-391 (2011).
52. Kokotou, MG, Mantzourani, C., Babaiti, R. & Kokotos, G. Étude des acides gras libres de la gelée royale par chromatographie liquide à haute teneur spectrométrie de masse à résolution (LC-HRMS). *Métabolites* 10, 40 (2020).
53. Cheung, Y., Meenu, M., Yu, X. & Xu, B. Profils d'acides phénoliques et de favonoïdes du miel commercial provenant de différentes sources formelles et géographiques. *Int. J. Food Prop.* 22, 290-308 (2019).
54. Koulis, GA et al. Enquête approfondie sur le profil phénolique de variétés de miel grecques réputées : discrimination variétale et identification de marqueurs foraux par chromatographie liquide – spectrométrie de masse à haute résolution. *Molécules* 27, 4444 (2022).
55. Tomás-Barberán, FA, Martos, I., Ferreres, F., Radovic, BS & Anklam, E. Profils favonoïdes HPLC comme marqueurs de l'origine botanique des miels uniforaux européens : profils favonoïdes HPLC comme marqueurs de miel uniforaux. *J. Sci. Agriculture alimentaire.* 81(5), 485-496. <https://doi.org/10.1002/jsfa.836> (2001).
56. Jerković, I., Kuš, PM, Tuberoso, CIG & Šarolić, M. Analyse phytochimique et physico-chimique du miel de saule polonais (*Salix* spp.): Identification des composés marqueurs. *Chimie alimentaire.* 145, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.004> (2014).
57. Jerković, I. et al. Miel de trèfle rouge (*Trifolium pratense* L.) : Profilage des produits chimiques volatils et déverrouillage antioxydant et anticorrosion capacité. *Chimie. Bouillie.* 70, i-xi (2016).
58. McLoone, P. et coll. Analyse phytochimique qualitative et investigation in vitro des propriétés immunomodulatrices des miels produits au Kazakhstan. *Nat. Prod. Rés.* 37, 996-1001 (2023).
59. Leponiemi, M., Wirta, H. & Freitak, D. L'amorçage immunitaire transgénérationnel contre la loque américaine n'affecte pas la performance des colonies d'abeilles. *Devant. Vétérinaire. Sci.* 10, 202 (2023).
60. Visscher, PK & Seeley, TD Stratégie d'alimentation des colonies d'abeilles domestiques dans une forêt tempérée de feuillus. *Écologie* 63, 1790-1801 (1982).
61. Beekman, M. & Ratnieks, FLW Recherche de nourriture à longue distance par l'abeille domestique *Apis mellifera* L. *Funct. Écol.* 14, 490-496 (2000).
62. Agence européenne pour l'environnement (AEE). Union européenne, Service Copernicus de surveillance des terres. (2018).
63. Mossberg, B. & Stenberg, L. Maastokasvio (Tammi, 2007).
64. Chen, S. et coll. Validation de la région ITS2 en tant que nouveau code-barres ADN pour l'identification des espèces de plantes médicinales. *PLoS UN* 5, 1-8 (2010).
65. White, T., Bruns, T., Lee, S. et Taylor, J. Amplification et séquençage direct de gènes d'ARN ribosomique fongique pour la phylogénétique. *Protocole PCR. Méthodes de guidage Appl.* 18, 315-322 (1990).
66. Vesterinen, EJ, Puisto, AIE, Blomberg, AS & Lilley, TM Tableau pour cinq, s'il vous plaît : Répartition alimentaire chez les chauves-souris boréales. *Écol. Évol.* 8, 10914-10937 (2018).
- 67 Vesterinen, EJ, Kaunisto, KM & Lilley, TM Une réunion de classe mondiale avec plusieurs groupes se régaland de l'insecte en déclin assortiment. *Sci. Représentant* <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73609-9> (2020).
68. Kaunisto, KM et al. Friandises aériennes : prédation des demoiselles sur divers taxons de proies. *J Anim Ecol* 89, 1365-1374 (2020).
69. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahé, F. VSEARCH : un outil open source polyvalent pour la métagénomique. *PairJ* <https://doi.org/10.7717/peerj.2584> (2016).
70. Edgar, RC & Bateman, A. Recherche et regroupement d'ordres de grandeur plus rapides que BLAST. *Bioinformatique* 26, 2460-2461 (2010).
71. Banchi, E. et coll. PLANITS : un ensemble de données de référence de séquences organisées pour le métabarcodage de l'ADN des plantes. *Base de données* 2020, 155 (2020).
72. Lee, T., Alemseged, Y. et Mitchell, A. Dropping Hints : Estimation du régime alimentaire du bétail dans les parcours à l'aide de métabarcodes ADN de matières fécales. *Métabarcode. Métagénome.* 2, e22467 (2018).
73. Alberdi, A., Garin, I., Aizpurua, O. et Aihartza, J. Té écologie alimentaire de la chauve-souris des montagnes *Plecotus macrobullaris* révélé avec des mini-codes-barres ADN. *PLoS One* 7, e35692 (2012).
74. Équipe de base R. dans R : un langage et un environnement pour le calcul statistique. <https://www.r-project.org/> (2022).
75. Oksanen, J. et coll. en végétalien : Forfait Écologie Communautaire. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (2022).
76. Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. & Walker, S. Ajustement de modèles linéaires à effets mixtes à l'aide de lme4. *J.Stat. Logiciel.* 67, 1-48 (2015).
77. Longueur, RV en emmeans : moyennes marginales estimées, également appelées moyennes des moindres carrés. <https://cran.r-project.org/package=emmeans> (2021).
78. Hartig, F. dans DHARMA : Diagnostics résiduels pour les modèles de régression hiérarchiques (multi-niveaux/mixtes). <https://cran.r-project.org/package=DHARMA> (2020).
- 79 De Caceres, M. & Legendre, P. Associations entre espèces et groupes de sites : indices et inférence statistique. *Écologie* 90, 3566-3574 (2009).
80. Zhou, J. et coll. Classification florale du miel par chromatographie liquide – détection par réseau de diodes – spectrométrie de masse en tandem et analyse chimiométrique. *Chimie alimentaire.* 145, 941-949 (2014).
81. Sixto, A., Niell, S. & Heinzen, H. Détermination simple des alcaloïdes pyrrolizidine dans le miel grâce à l'extraction simplifiée au méthanol (QuPPE) et aux modes LC-MS/MS. *ACS Oméga* 4, 22632-22637 (2019).

Remerciements

Nous tenons à remercier Jason Rissanen, Tristan Ubaldí et Jaakko Kuurne pour leur aide dans les travaux sur le terrain, ainsi que Marjo Kilpinen et Eija Hakala pour leur aide dans les travaux de laboratoire. Nous remercions également les deux apiculteurs pour leur expertise et l'entretien des ruches durant l'étude. L'étude a été financée par une subvention à HW de la Fondation Kone, une subvention à ML de la Fondation Emil Aaltonen (220131) et une subvention à DF de la Fondation culturelle finlandaise (00180246). NAWI Graz est remercié pour son soutien au Central Lab Environmental, Plant & Microbial Metabolomics. Accès libre financé par la bibliothèque universitaire d'Helsinki.

Contributions d'auteur

ML, DF, MM-T. et HW a conçu l'étude. ML, MM-T., MT et HW ont réalisé le travail sur le terrain. ML et HW ont effectué les analyses ADN en laboratoire et EP-W. les analyses en laboratoire des métabolites secondaires. EV et HW ont effectué les analyses bioinformatiques et ML, MM-T., AB-S., EP-W. et HW les analyses statistiques. ML et HW ont rédigé la première ébauche du manuscrit. Tous les auteurs ont contribué et approuvé le manuscrit.

Des intérêts concurrents

Les auteurs ne déclarent aucun intérêt concurrent.

Informations Complémentaires

Informations supplémentaires La version en ligne contient du matériel supplémentaire disponible sur <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42102-4>.

La correspondance et les demandes de matériel doivent être adressées à HW

Les informations sur les réimpressions et les autorisations sont disponibles sur www.nature.com/reprints.

Note de l'éditeur Springer Nature reste neutre en ce qui concerne les revendications juridictionnelles dans les cartes publiées et les affiliations institutionnelles.



Open Access Cet article est sous licence internationale Creative Commons Attribution 4.0, qui permet l'utilisation, le partage, l'adaptation, la distribution et la reproduction sur n'importe quel support ou format, à condition que vous accordiez le crédit approprié au(x) auteur(s) original(s) et à la source, fournir un lien vers la licence Creative Commons et indiquer si des modifications ont été apportées. Les images ou tout autre matériel tiers contenu dans cet article sont inclus dans la licence Creative Commons de l'article, sauf indication contraire dans une ligne de crédit du matériel. Si le matériel n'est pas inclus dans la licence Creative Commons de l'article et que votre utilisation prévue n'est pas autorisée par la réglementation statutaire ou dépasse l'utilisation autorisée, vous devrez obtenir l'autorisation directement du détenteur des droits d'auteur. Pour afficher une copie de cette licence, visitez <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© Les auteurs 2023