

Honigbienen schützen durch Futtersaftprod

Gemeiner Natterkopf (*Echium vulgare*) wird häufig von Honigbienen besucht und produziert Pyrrolizidin-Alkaloide (PA) als sekundäre Inhaltsstoffe. Eines dieser Alkaloide ist Echimidin, welches für diese Untersuchungen aus Natterkopf isoliert wurde.



Im Verlauf der Evolution haben Pflanzen verschiedene sekundäre Inhaltsstoffe unter anderem zur chemischen Abwehr von Pflanzenteilen wie Wurzeln, Blättern und vor allem in den Blütenköpfen vor. Auch Nektar und Pollen können diese Schadstoffe ins Volk ein. Der Wissenschaftler Matteo Lucchetti entdeckte während seiner Doktorarbeit an der Universität Bern, dass die Produktion von Futtersaft gelingt es aber den Bienen, ihre Larven vor den Giftstoffen im Pollen zu schützen. Wir st

FLAVIE RONCORONI, MATTEO LUCCHETTI, VERENA KILCHENMANN UND CHRISTINA KAST,
AGROSCOPE, ZENTRUM FÜR BIENENFORSCHUNG, 3003 BERN

Pollen enthält oft eine besonders hohe Konzentration an sekundären Inhaltsstoffen und stellt deshalb ein Risiko für Bienen dar, wenn diese «giftigen» Pollen eintragen. Im Volk wird der gesammelte Pollen mit Honig, Nektar und Drüsensekreten vermischt und anschliessend als Bienenbrot in den Waben eingelagert. Frisch geschlüpfte, junge Bienen konsumieren viel Bienenbrot. Es dient als Proteinquelle, um unter anderem ihre Futtersaftdrüsen und ihre Flugmuskulatur zu entwickeln.² Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe im Pollen können folglich direkt eine negative Wirkung auf die jungen Bienen haben.

Auch Ammenbienen konsumieren Bienenbrot, um Futtersaft für die Brutaufzucht zu produzieren. Sie versorgen Arbeiterinnen- und Drohnenlarven mit Futtersaft, welcher für die sehr jungen Larven eine sehr ähnliche Zusammensetzung wie Gelée royale, der Diät für Königinnenlarven, hat. In den ersten drei Tagen enthält Futtersaft/Gelée royale fast keinen Pollen, und später nur sehr wenig.³ Deshalb sind die Larven der Honigbiene kaum in direktem Kontakt mit «giftigem» Pollen. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe im Pollen könnten aber einen indirekten Effekt auf die Larven haben, falls diese Giftstoffe in den Futtersaft/Gelée royale übertragen werden.

Modellpflanze Natterkopf für sekundäre Polleninhaltsstoffe

Für unsere Fragestellung wählten wir den Gemeinen Natterkopf (*Echium vulgare*, Fotos oben). Diese Pflanze ist in der Schweiz weitverbreitet, produziert grosse Mengen an Pollen und Nektar und ist für Bienen eine sehr beliebte Trachtpflanze mit langer Blütezeit von Mai bis Oktober. Der Natterkopf enthält sogenannte Pyrrolizidin-Alkaloide (PA) als sekundäre Inhaltsstoffe, wie zum Beispiel Echimidin oder Echivulgarin. In der Schweiz ist der Natterkopf die Hauptursache für unerwünschte PA in den Bienenprodukten Honig und Pollen.^{4,5} Natterkopfpollen enthält besonders hohe PA-Gehalte.⁶

Produktion ihre Larven vor Giftstoffen im Pollen



FOTOS: Ruedi Ritter

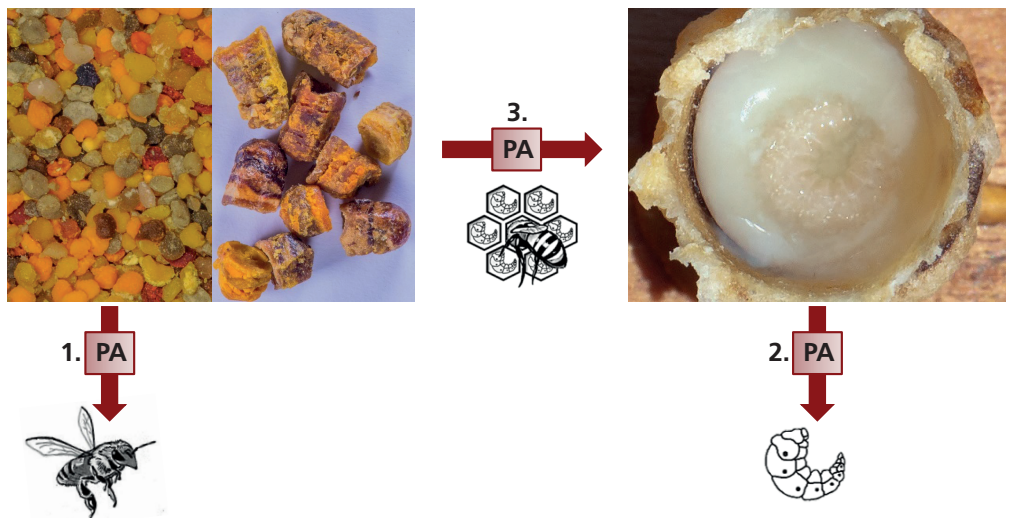
hr gegen andere Organismen entwickelt. Diese Stoffe sind deshalb oft giftig für Tiere und Menschen. Sie kommen in verschiedenen se chemischen Stoffe enthalten. Wenn Bienen Blütenpflanzen besuchen, um solchen Nektar oder Pollen zu sammeln, tragen sie der Agroscope und Universität de Neuchâtel, dass diese Pflanzeninhaltsstoffe die Entwicklung der Bienen beeinträchtigen. Durch ellen hier die Ergebnisse vor, welche in der wissenschaftlichen Zeitschrift «Proceedings of the Royal Society B» veröffentlicht wurden.¹

Unsere Experimente

Um die Giftigkeit des Natterkopfpollens für Honigbienen in Laborversuchen zu testen, isolierte Matteo Lucchetti verschiedene PA aus Natterkopfb Blüten. Die in diesem Artikel beschriebenen Bienenversuche wurden alle mit Echimidin als Beispiel eines PAs durchgeführt. Das isolierte Echimidin wurde dafür zu PA-freiem Pollen, der Larvendiat oder Bienenbrot beigemischt. Wir untersuchten Gelée royale (und nicht Arbeiterinnenfuttersaft), da wir dadurch genügende Mengen an Drüsensekret für unsere Analysen ernten konnten.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht (siehe Abbildung rechts):

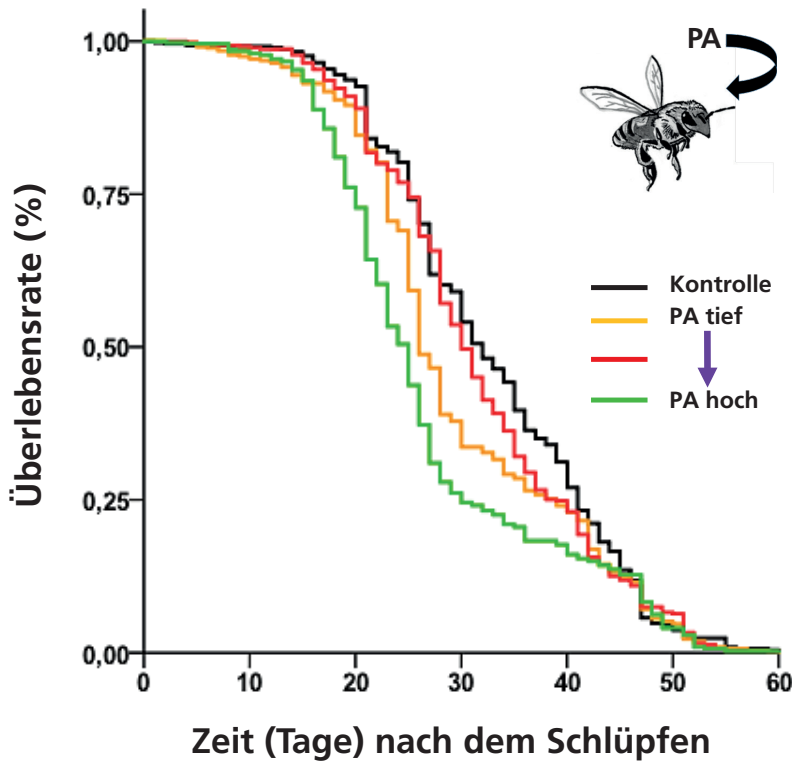
1. Sind PA giftig für die jungen, erwachsenen Bienen?
2. Sind PA giftig für Larven?
3. Welchen PA-Anteil finden wir im Futtersaft?



Ein PA aus dem Natterkopf (Echimidin) wurde zu PA-freiem Pollen und zur Larvendiat zugegeben, um die Giftigkeit für erwachsene Bienen (1. Experiment) und Larven (2. Experiment) zu untersuchen. Welcher PA-Anteil wird aus dem Bienenbrot in den Futtersaft übertragen (3. Experiment)? Das PA Echimidin wurde zu PA-freiem Bienenbrot zugegeben. Ammenbienen konsumieren das PA-haltige Bienenbrot und produzieren Gelée royale. Im Anschluss an die Bestimmung der PA-Konzentration im Gelée royale kann ein möglicher Filtereffekt ermittelt werden.



Toxizität von PA für die erwachsenen Bienen. Kontrolle (schwarz) und drei unterschiedlichen Echimidin-Konzentrationen in Pollen 0,2 mg/g (gelb), 1,5 mg/g (rot) und 7,7 mg/g (grün).



1. Beeinträchtigung von frisch geschlüpften Bienen

Das aus dem Natterkopf isolierte Echimidin wurde mit PA-freiem Pollen gemischt und in «Liebefelder Kästchen» frisch geschlüpften Bienen gefüttert, um mögliche Effekte der PA auf die Lebensdauer von erwachsenen Bienen zu testen.

Für die Kontrolle wurden Bienen mit Pollen ohne Echimidin gefüttert. Für die Testserien wurden den Bienen drei unterschiedliche Echimidin-Konzentrationen in Pollen angeboten. Die höchste Konzentration ist in einer ähnlichen Grössenordnung wie der

natürliche totale PA-Gehalt im Natterkopfpollen. Die «Liebefelder Kästchen» wurden in einen Brutschrank gestellt. Tote Bienen wurden jeden Tag gezählt und entfernt. Diese Experimente wurden mehrmals wiederholt und in der nebenstehenden Grafik zusammengefasst (Abbildung links). Sie zeigten, dass erwachsene Bienen Echimidin relativ gut vertragen, denn wir beobachteten keine erhöhte Sterberate in den ersten 15 Tagen. Die Bienen, welche mit den beiden tieferen Echimidin-Dosen (gelbe und rote Kurve) gefüttert wurden, zeigten eine ähnliche Überlebensrate wie die Kontrollbienen (schwarz; keinen statistisch relevanten Unterschied zur gelben und roten Kurve). Die Überlebensrate der Bienen, welche mit der hohen Dosis (grüne Kurve) gefüttert wurden, war jedoch vermindert (statistisch relevant).

2. Beeinträchtigung der Larven

Die Larventests (Abbildung unten) wurden nach dem Protokoll von Aupinel et al. durchgeführt.⁷ Der Diät wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen des isolierten Echimidins beigemischt.

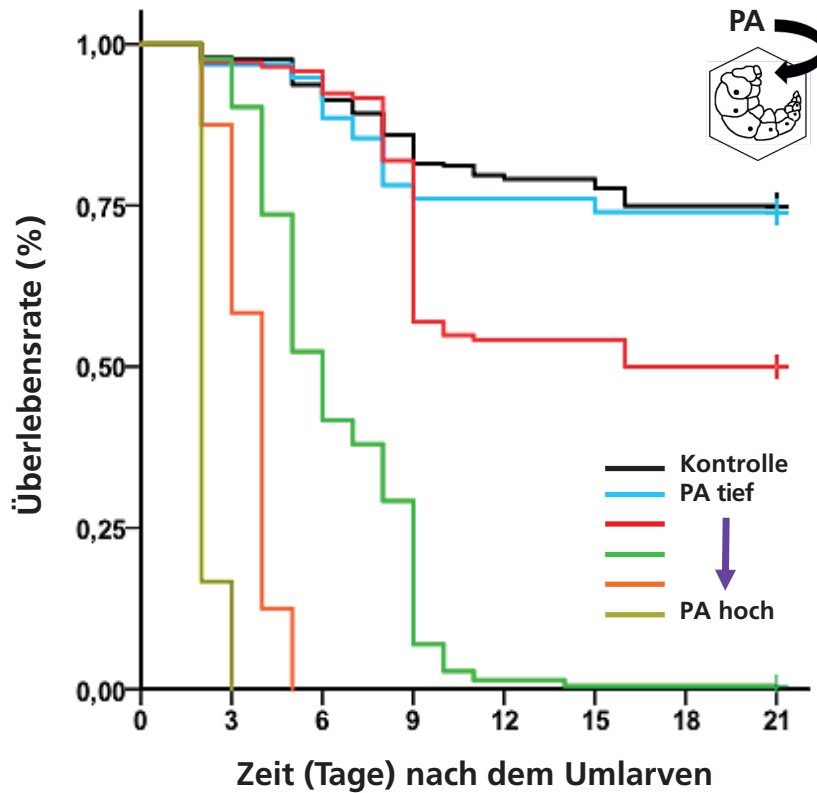
Bei einer Konzentration von 15 µg/g Echimidin (hellblaue Kurve in Abbildung rechts) beobachteten

Larventest: Die Larven wurden im Labor mit einer Diät aus Zucker, Hefeextrakt und Gelée royale gefüttert und in einem Brutschrank aufgezogen.





wir keinen negativen Effekt auf das Überleben der Larven. Die Schlupfrate der Bienen nach 21 Tagen war für diese Konzentration ca. 75 % und damit vergleichbar zur Kontrolle ohne Echimidin (schwarze Kurve; Schlupfrate ebenfalls ca. 75 %). Bei einer leicht höheren Konzentration von 20 µg/g Echimidin (rote Kurve) war die Schlupfrate ca. 50 % und damit deutlich geringer. Noch deutlicher war dieser Effekt für höhere Echimidin-Konzentrationen. Die Überlebensrate der Larven wie auch die Schlupfrate der Bienen war stark vermindert bei einer Echimidin-Konzentration von 40 µg/g (grüne Kurve) oder höheren Konzentrationen (orange und olivfarbenen Kurven). Bei diesen Konzentrationen schlüpften keine oder nur noch vereinzelte Bienen. Im Gegensatz zu den erwachsenen Bienen reagierten die Larven sehr empfindlich auf Zugabe von PA in der Diät.



Toxizität vom PA für Larven. Kontrolle (schwarze Kurve) und fünf unterschiedliche Echimidin-Konzentrationen: 15 µg/g (hellblaue Kurve), 20 µg/g (rote Kurve), 40 µg/g (grüne Kurve), 400 µg/g (orange Kurve) und 4000 µg/g (olivfarbene Kurve).

3. Übertragung von PA vom Bienenbrot in den Gelée royale

Unsere Hypothese «Larvenpflege schützt Larven vor sekundären Pflanzeninhaltsstoffen» ist gültig, falls der PA-Gehalt im Gelée royale (3. Experiment) in einem Konzentrationsbereich liegt, für welchen im Larventest (2. Experiment) keine verminderte Schlupfrate der Larven beobachtet wurde. Um dies zu untersuchen, wurden Versuche in modifizierten Miniplus-Systemen (Minivolk mit Bienen und Futterreserven, ohne Königin) durchgeführt, welchen ein netzbespanntes Käfig vorgeschaltet war, sodass die Bienen keinen Pollen von aussen eintragen konnten (Foto rechts).

Das PA Echimidin wurde in einer Konzentration von 2000 µg/g (2 mg/g) in Bienenbrot gemischt und in einer Wabe ins Minivolk gegeben. Ebenso wurden junge Larven in Näpfchen umgelarvt und ins Minivolk gegeben, damit die Bienen Weiselzellen ziehen, aus denen wir Gelée royale entnehmen konnten.

Gelée royale wurde jeweils nach drei Tagen geerntet und der Echimidin-Gehalt bestimmt. Die durchschnittliche Echimidin-Konzentration war 2 µg/g (Abbildung nächste Seite).

Damit war der durchschnittliche Echimidin-Gehalt im Gelée royale deutlich geringer als 15 µg/g, einer PA-Konzentration in der Larvendiat, für welche keine verminderte Schlupfrate beobachtet wurde (Abbildung oben, hellblaue Kurve, ähnlich wie schwarze Kontrollkurve). Die Ammenbienen wirken so quasi als «Filter» für die Larven, denn durch die Futtersaftproduktion wird die PA-Konzentration im Futtersaft ungefähr tausendfach reduziert.



Modifiziertes Minivolk-System.

Risikoeinschätzung für die erwachsenen Bienen

Erwachsene Bienen vertragen die untersuchten Giftstoffe relativ gut, denn wir beobachteten keine akuten Vergiftungserscheinungen innerhalb der ersten Tage. Hohe Gehalte beeinträchtigten allerdings die Überlebensrate. Falls Bienen fast ausschliesslich Natterkopfpollen sammeln, kann folglich ihre Lebensdauer verkürzt sein. Da die Honigbienen in natürlicher Umgebung Pollen verschiedener Blütenpflanzen sammeln (man spricht dann von einem polyektischen Insekt) und als Bienenbrot einlagern, werden Polleotypen verschiedener Pflanzenarten gemischt und somit allfällige Giftstoffe verdünnt. Zudem kann ein hoher PA-Gehalt eine abschreckende Wirkung auf die Bienen haben, sodass sie weniger Pollen mit sehr hohen PA-Gehalten sammeln.⁸ Aus den genannten Gründen ist vermutlich das Risiko für die erwachsenen Honigbienen gering, falls die Völker in einer Umgebung mit vielfältigem Trachtangebot stehen.

Risikoeinschätzung für die Larven

Im Gegensatz dazu bewirkten schon geringe Mengen der untersuchten

PA hoch



Ammenbienen konsumierten Bienenbrot mit einer Echimidin-Konzentration von 2000 µg/g und produzierten Gelée royale. In diesem wurde anschliessend eine durchschnittliche Echimidin-Konzentration von 2 µg/g ermittelt. Bienen wirken als «Filter»: Durch die Futtersaftproduktion wird die Echimidin-Konzentration durchschnittlich 1000 × reduziert.

Giftstoffe eine verminderte Schlupfrate. Larven sind folglich extrem empfindlich gegenüber PA. Da aber Futtersaft höchstens sehr wenig Pollen enthält, sind sie im Volk diesen Giftstoffen kaum ausgesetzt. Es ist aber wichtig, zu verstehen, welche Menge der Giftstoffe vom Bienenbrot in den Futtersaft übertragen wird, um das Überleben der Larven ermitteln zu können. Wir konnten zeigen, dass nur ein kleiner Bruchteil der im Pollen und Bienenbrot vorhandenen PA auch wirklich in den von Ammenbienen produzierten Futtersaft/Gelée royale gelangt. Dadurch stellen diese Pflanzengiftstoffe für die empfindlichen Larven kaum ein Risiko dar. Im Verlaufe der Evolution haben sich die Honigbienen gut angepasst, da sie ihre Larven mit Futtersaft versorgen.

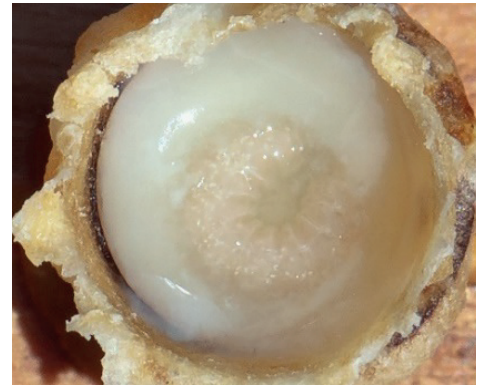
Vorteile der Futtersaftproduktion

Die Futtersaftproduktion bietet für soziale Insekten wie die Honigbienen wesentliche Vorteile. Futtersaft ist leichter verdaulich im Vergleich zu einer ausschliesslichen Pollendiät wie dies für die Larven von Wildbienen und Hummeln der Fall ist. Futtersaft bewirkt eine schnellere Reifung der Larven und damit eine raschere Volksentwicklung und hat eine antimikrobielle Wirkung, die Infektionen bei Larven verhindern kann. Ausserdem schützen die Pflegeebenen durch die Produktion von Futtersaft die Larven vor Giftstoffen im Pollen, wie in dieser Untersuchung gezeigt wurde.¹

Pflegeebene als «Filter»




PA tief



Schutz vor Pflanzenschutzmitteln

Im Pollen können nicht nur natürlich Giftstoffe, sondern auch Pflanzenschutzmittel vorhanden sein. Pestizide können auf dem gleichen Weg wie die natürlichen Pflanzengiftstoffe von Blütenpflanzen zu Pollen, zu Bienenbrot und in den Futtersaft gelangen und damit die Entwicklung der Honigbienen beeinträchtigen. Solche Testsysteme eignen sich deshalb zur Beurteilung der Pflanzenschutzmittel. Es ist wichtig, dieses Risiko für die Bienen einzuschätzen, um ihre Gesundheit garantieren zu können.

Diese Arbeit war eine Zusammenarbeit zwischen dem Zentrum für Bienenforschung und Christophe Praz und Gaetan Glauser von der Université de Neuchâtel. Den Link zu dieser Publikation sowie weitere Informationen zu PA in Bienenprodukten finden Sie auf unserer Webseite: www.apis.admin.ch Bienen > Bienenprodukte > Honig > Schadstoffe im Honig > Pyrrolizidin Alkaloide. 

Literatur

1. Lucchetti, M. A.; Kilchenmann, V.; Glauser, G.; Praz, C.; Kast, C. (2018) Nursing protects honeybee larvae from secondary metabolites of pollen. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1875), 20172849. (DOI: 10.1098/rspb.2017.2849).
2. Crailsheim, K. (1990) The protein balance of the honey bee worker. *Apidologie* 21(5): 417–429.
3. Babendreier, D.; Kalberer, N.; Romeis, J.; Fluri, P.; Bilger, F. (2004)

Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plant. *Apidologie* 35: 293–300.

4. Kast, C.; Dübecke, A.; Kilchenmann, V.; Bieri, K.; Böhlen, M.; Zoller, O.; Beckh, G.; Lüllmann, C. (2014) Analysis of Swiss honeys for pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Apicultural Research* 53(1): 75–83.
5. Kast, C.; Kilchenmann, V.; Reinhard, H.; Droz, B.; Lucchetti, M. A.; Dübecke, A.; Beckh, G.; Zoller, O. (2018) Chemical fingerprinting identifies *Echium vulgare*, *Eupatorium cannabinum* and *Senecio* spp. as plant species mainly responsible for pyrrolizidine alkaloids in bee-collected pollen. *Food Additives & Contaminants: Part A* 35(2): 316–327.
6. Lucchetti, M. A.; Glauser, G.; Kilchenmann, V.; Dübecke, A.; Beckh, G.; Praz, C.; Kast, C. (2016) Pyrrolizidine alkaloids from *Echium vulgare* in honey originate primarily from floral nectar. *Journal of agricultural and food chemistry* 64(25): 5267–5273.
7. Aupinel, P.; Fortini, D.; Dufour, H.; Tasei, J.; Michaud, B.; Odoux, J.; Pham-Delegue, M. (2005). Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of insectology* 58(2): 107–111.
8. Reinhard, A.; Janke, M.; von der Ohe, W.; Kempf, M.; Theuring, C.; Hartmann, T.; Schreier, P.; Beuerle, T. (2009). Feeding deterrence and detrimental effects of pyrrolizidine alkaloids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of chemical ecology* 35(9): 1086–1095.