



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2017 60 stp
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Sesongvariasjon av soppflora i tarm hos den europeiske honningbien (*Apis mellifera*)

The Seasonal Change of the Gut Mycobiota in
Honey Bees (*Apis mellifera*)

Åsmund Andersen
Master i Bioteknologi

Forord

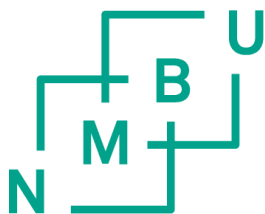
Først og fremst vil jeg takke Professor Knut Rudi som ga meg en mulighet til å skrive masteroppgave om et spennende felt som jeg ville lære mer om. Samtidig som jeg fikk bli en del av MiDiv på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Takk for all hjelp jeg har fått fra deg sammen med Jane Ludvigsen og Linda Hjeljord. Jane du har alltid hjulpet meg uansett hvor håpløst spørsmålet var, samtidig hjulpet meg med finskrivingen av oppgaven. Mens Linda du har gitt meg et mye større og bredere innblikk om teamet sopp. Ikke minst vil jeg takke alle jentene fra MiDiv som også har vært til stor hjelp under alt av labarbeid.

Jeg vil takke Claus Kreibich for hjelp med stell og innsamling av bier sammen med Daniel Münch for hans hjelp til opplæring av dissekering.

Jeg vil takke Peter Valkeneer, Maria Kjetså, Truls Aas og Thomas Strand som har hjulpet meg med finskriving av oppgave. Samtidig som dere har vært med på å skape mange trivelige stunder i løp av studietiden.

Takk til Silje Vågen for å gi meg motivasjon og støtte under skrivingen, samtidig som du alltid har hatt trua på meg igjennom denne lange perioden.

Til slutt vil jeg takke venner og familie (spesielt mine foreldre) som alltid har gitt meg støtte under masterstudiet.



**Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet**

Ås 15.08.2017

Åsmund Andersen

Sammendrag

Den europeiske honningbien (*Apis mellifera*) er den viktigste pollinatoren benyttet innen agrikultur, hvor de har en høy økonomisk verdi. Honningbien er benyttet som modellorganisme og den bakterielle tarmfloraen er godt undersøkt. Det er få studier utført som undersøker sopptarmflora hos honningbien. Derfor ønsket vi å undersøke honningbiens soppflora over en sesong i de forskjellige tarmdelene (honningmage, midtmage, ileum og rektum), sammen med mengde sopp tilstede. Det ble benyttet honningbier fra friske kuber lokalisert i Ås, Norge. Mengden sopp tilstede ble undersøkt med kvantitativ PCR (qPCR). Sammensetningen ble undersøkt med dyrkningsuavhengige og avhengige metoder med sekvensering av ITS1 regionen med bruk av Illumina MiSeq og hele ITS regionen med bruk av Sanger sekvensering. Mengden sopp tilstede observert med qPCR varierte over sesongen i alle tarmdelene utenom honningmagen. Det ble observert høyere mengder sopp i midtmagen i juli, mens det ble observert høyere mengder i rektum i mars og april. Fra dyrkningsuavhengig metode ble det observert variasjon i alfa og betadiversitet (sammen med sammensetningen av soppfloraen) over sesongen. Gjennomgående ble det observert størst andel av gjærsopp, utenom i juni og juli hvor det også ble observert høye mengder med hyfesopper. Det ble identifisert 63 forskjellige isolater med dyrkingsavhengig metode. Ingen av isolater fra dyrkning var delt igjennom hele sesongen, og det var delt noen få isolater mellom nærliggende måneder. Det var tydelig å se en variasjon på soppfloraen over sesongen i de forskjellige tarmdelene. Det tyder på at forandring av både miljø og diet er viktige faktorer som påvirker denne variasjonen.

Abstract

The European honey bee (*Apis mellifera*) are prominent crop pollinators, where they have a large economic value. Honey bees are used as a model organism, and its bacterial gut microbiota is well studied. There are few studies that examines the gut mycobiota in honey bees. We wish to investigate the composition and the amount of the gut mycobiota within different gut compartments (crop, midgut, ileum and rectum) of the honey bee during their forager seasons. We sampled honey bee guts from healthy hives in Ås, Norway. Quantitative PCR (qPCR) was used to determine the amount of fungi present in each of the gut parts. The composition was examined with culture independent and dependent methods. With the use of sequencing of the ITS1 region using Illumina MiSeq and the entire ITS region using Sanger sequencing. The amount of fungi observed with qPCR varied over the season in all the gut compartments, except the crop. Higher amounts of fungi were observed in midgut in July, while higher amounts were observed in the rectum in March and April. From the culture independent method, it was observed variation in alpha and beta diversity (along with the composition of the fungi) over the season. The largest amounts of fungi observed was yeast, except in June and July, which had high amounts of molds as well. There were 63 different isolates identified with culture dependent method. None of the isolates from cultivation were shared throughout the whole season, and a few isolates were shared between adjacent months. A variation in the mycobiota over the season in the different gut compartments were clearly visible. The change of both environment and diet are important factors that affect this variation.

Forkortelser

BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basepar
Crop	Honningmage
ddNTP	Di-deoksyribonukleotidtrifosfat
ddPCR	Digital droplet polymerasekjedereaksjon
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksyribonukleosidtrifosfat
dsDNA	Dobbeltrådig DNA
ITS	Internal transcribed spacer
LM	Lysmikroskop
NGS	Neste Generasjons Sekvensering
OTU	Operational taxonomic unit
PBS	Phosphate buffered saline
PCoA	Principal coordinates analysis
PCR	Polymerasekjedereaksjon
QIIME	Quantitative insight into microbial ecology
qPCR	Kvantitativ polymerasekjedereaksjon
rRNA	Ribosomalt RNA
S.T.A.R Buffer	Stool transport and recovery buffer
SEM	Skanning elektronmikroskop
TGS	Tredje generasjons sekvensering
UNITE Database	User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza Database

Innholdsfortegnelse

1.0 Introduksjon	1
1.1 Europeisk honningbie (<i>Apis mellifera</i>)	1
1.1.1 Livssyklus og overvintring	2
1.1.2 Diett	3
1.1.3 Honningbiens tarmsystem	3
1.1.4 Honningbiens tarmflora	5
1.2 Sopp	6
1.2.1 Systematikk	7
1.2.2 Fysiologi	7
1.2.3 Patogene sopper	9
1.2.4 Sopp hos planter	9
1.3 Bruk av Internal transcribed spacer som taksonomisk markør	10
1.4 Polymerasekjedereaksjon	12
1.4.1 Kvantitativ PCR	12
1.4.2 Digital Droplet PCR	13
1.5 Sekvensering	13
1.5.1 Første generasjons sekvensering	13
1.5.2 Andre generasjons sekvensering	14
1.5.3 Tredjegerasjons sekvensering	15
1.6 Mikroskopering	16
1.6.1 Lysmikroskop	16
1.6.2 Skanning elektronmikroskop	16
1.7 Mål med masteroppgaven	17
2.0 Material og metode	18
2.1 Prøvemateriale	18
2.1.1 Innsamling av tarmdeler og miljøprøver	19
2.1.2 Dissekering	19
2.1.3 Tarmdeler og miljøprøver til dyrkning	20
2.2 Dyrkning	20
2.2.1 Dyrkning av isolater	20
2.2.2 Nedfrysning av isolater og miljøprøver	21
2.2.3 Antibakteriell testing	21
2.3 DNA ekstraksjon	21
2.3.1 Preparering av prøvemateriale	21
2.3.2 Lysing og ekstraksjon	22
2.4.1 Primer optimalisering og testing	22
2.4.2 Kvalitativ PCR	23

2.4.3 Illumina Index PCR.....	23
2.4.4 Kvantitativ PCR.....	23
2.4.5 Digital Droplet PCR.....	23
2.5 PCR Rensning og kvantifisering.....	24
2.5.1 Rensing av PCR produkt med AMPure XP.....	24
2.5.2 Kvantifisering med Qubit og gel.....	24
2.6 Sekvensering.....	25
2.6.1 Sanger sekvensering.....	25
2.6.2 Illumina Miseq sekvensering.....	25
2.7 Mikroskopering.....	25
2.7.1 Skanning elektronmikroskop.....	25
2.7.2 Lysmikroskopering av sopp.....	25
2.8 Datanalyse.....	26
2.8.1 Identifisering og alignment.....	26
2.8.2 Bearbeiding med QIIME og USEARCH v8.....	26
2.8.3 Statistikk.....	27
3.0 Resultater.....	28
3.1 Primer optimalisering.....	28
3.2 Kvantifisering av sopp DNA i tarmdeler.....	28
3.3 Dyrkningsuavhengig metode.....	29
3.3.1 Alfa diversitet.....	30
3.3.2 Beta diversitet.....	31
3.3.3 Fordeling av sopprekker over sesongen.....	32
3.3.4 Fordeling av soppklasser over sesongen.....	35
3.3.5 Dominerende OTUer.....	37
3.4 Dyrkningsavhengig metode.....	39
3.4.1 Sammenligning av isolater over sesong.....	42
3.5 Sammenligning av dyrkningsavhengige og uavhengige metode.....	44
3.6 Synlig sopp i tarm.....	47
3.7 Antibakteriell testing av sopp isolater.....	47
4.0 Diskusjon.....	49
4.1 Sesong variasjon.....	49
4.1.1 Mengde sopp i tarmdelene over sesongen.....	49
4.1.2 Diversitet av sopp i tarmdeler over sesongen.....	50
4.2 Sopp i honningbietarm.....	52
4.2.1 Gjærsoppene.....	52
4.2.2 Hyfesopp.....	53
4.2.3 Kjerne soppflora i honningbietarm.....	53

4.3 Metode vurdering.....	54
4.3.1 Sekvensering av sopp.....	55
4.4 Endringer/optimalisering og videre arbeid.....	56
4.5 Konklusjon	58
Referanser:	59
Vedlegg	- 1 -
Vedlegg A: Prøve oversikt	- 1 -
Vedlegg B: Medie oppskrifter	- 2 -
Vedlegg C: Primere	- 3 -
Vedlegg D: DNA Kvantifisering	- 8 -
Vedlegg E: Sopp fordeling	- 11 -
Vedlegg F: SEM	- 27 -

1.0 Introduksjon

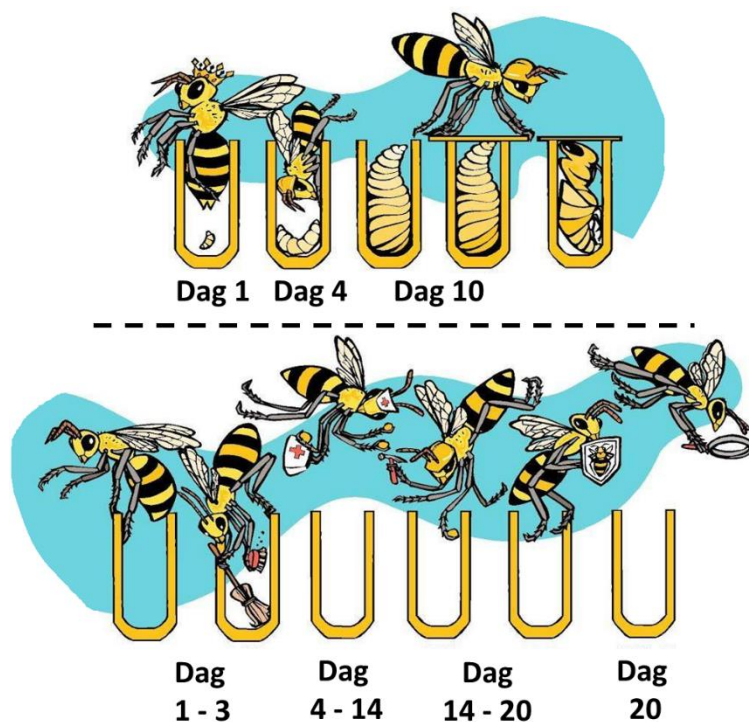
1.1 Europeisk honningbie (*Apis mellifera*)

Den europeiske honningbien (*Apis mellifera*) er den mest brukte bien innen agrikultur i verden (Myerscough et al. 2017). Dette skyldes at den kan tilpasse seg miljø og habitater helt fra Skandinavia, til sentrale deler i Asia og igjennom Afrika (Seeley 1995). Nesten alle planter benyttet innen agrikultur krever pollinerings tjenester fra insekter. Honningbier kan pollinere 75% av matplantene benyttet i jordbruket (Klein et al. 2007), samtidig som de øker mengden avling sammen med kvalitet og holdbarhet (Klatt et al. 2014; Klein et al. 2007). Pollinerings tjenester fra honningbier tilsvarte en økonomisk verdi på 153 milliarder euro ($\approx 1,4$ Billioner Norske Kroner) verden rundt i 2005 (Gallai et al. 2009). I 2015 var verdien på 15 milliarder dollar (≈ 130 milliarder Norske Kroner) i USA alene (Whitehouse 2015).

Det er en økning av agrikultur som er avhengig av pollinerings tjenester, denne økningen er større enn tilgangen på honningbier (Aizen & Harder 2009). Samtidig har det vært flere bikuber som har blitt utsatt for kubekolaps de siste tiårene. Dette innebærer at arbeidere dør eller ikke vender tilbake til kuben. Dette er observert i stor grad i USA, men også i Europa og Japan (Neumann & Carreck 2010). Det er mange faktorer som er med på å forsake kubekolaps. For eksempel er bier utsatt for mye stress, og får sykdommer som kan skyldes parasitter, eller pesticider som er brukt i miljø (Dainat et al. 2012), eller kuber som holdes for tett. I tillegg kan de lide av underernæring som ofte skyldes monokultur i agrikulturen (Archer et al. 2014).

1.1.1 Livssyklus og overvintring

Dronningen legger egg igjennom hele sesongen, med størst fokus i mai for å bygge opp kolonien for sommeren. Bier er holometabole, som betyr at de går igjennom 4 stadier; egg, larve, puppe og voksen, vises i figur 1.1. Alle arbeidere er hunner mens droner er hanner. Arbeiderbier har ansvar for å vedlikeholde kuben, mens droner sin rolle er å parre med dronninger. Utvikling av arbeidere starter ved at dronningbien legger egg i separate celler (Figur 1.1 dag 1). Etter egglegging tar det 3 dager før egget klekker, og larve stadiet starter (Figur 1.1 dag 4). I dette stadiet blir larvene matet med en blanding av pollen og honning/sukker av pleiebier (nursing bee). Etter 6 dager i larvestadiet forpupper larven seg og cellen forsegles av arbeidsbier med et voksbelegg (Figur 1.1 dag 10). Når bien forlater cellen etter puppestadiet er ikke kjertlene ferdig utviklet. De 3 første dagene går derfor til rensing av celler mens kjertlene utvikler seg (Figur 1.1 dag 1-3). Når kjertlene er utviklet går de over til rollen som pleiebie (Figur 1.1 dag 4-14). Pleiebier sin primære oppgave er å mate larver, forsegle celler og stelle dronningen. Etter 10 dager som pleiebie går de over til rollen med å lagre mat. I denne fasen tar de imot nektar og pollen fra trekkende bier samtidig som de beskytter inngangen til kuben (Figur 1.1 dag 14-20). Levert nektar blir omgjort til honning og pollen blir pakket ned i celler. Etter 20 dager som voksen bie, starter de å trekke ut av kuben hvor de samler inn pollen og nektar til kuben (Figur 1.1 dag 20) (Seeley 1995).



Figur 1.1: Viser honningbiens livssyklus, priklet linje separer før og etter puppestadiet. Dager viser fra egglegging (over) og fra fullført puppestadium (under). Figur er hentet og modifisert fra (*The Bee Place* 2017)

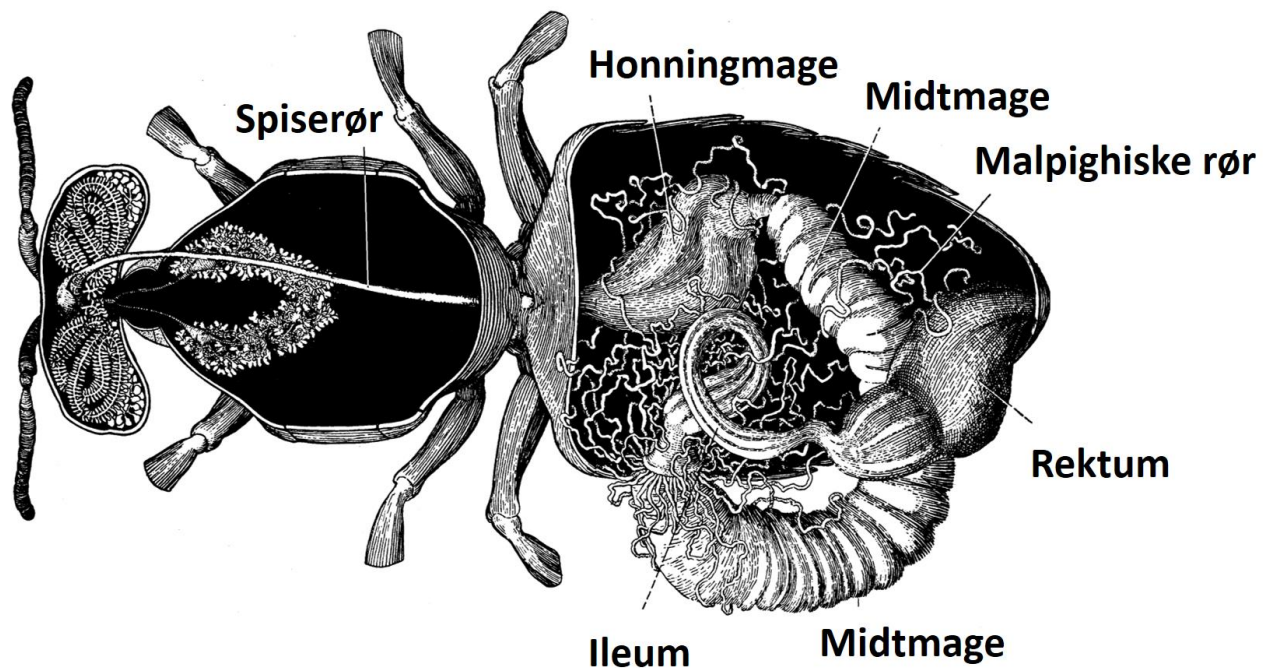
Siden bier ikke kan overleve i kalde temperaturer stopper de å trekke under lave temperaturer. I motsetning til andre insekter går ikke honningbier i en fullstendig dvale under vinteren, de overvintrer ved å holde varmen. Denne varmen produseres med sammentrekninger av flygemuskulaturen som varmer opp kuben til over 10°C, noe som krever mye energi. Samtidig, klynger biene seg sammen som en ball. Dette øker kjernetemperaturen på klyngen til 34°C (Seeley 1995). Bikuber i Norge overvintrer fra september til april, grunnet det kalde klimaet i Norge (Birøkterlag 2017). Fettlegemer fungerer som et lager av fett og proteiner plassert i dorsal (mot buken) og ventral (mot ryggen) deler av abdomen. Sammen med det lagrede sukkeret/honningen i kuben er dette viktige energi reserver under overvintringen (Seeley 1995; Winston 1991). Overvintringen gjør at honningbier kan trekke tidlig på sesongen, og ha tidlig tilgang på ressurser sammenlignet med andre insekter (Winston 1991).

1.1.2 Diett

For å samle næringsstoffer i form av nektar, vann og pollen trekker honningbier i et område på 100 km² rundt kuben. Honningbien trekker oftest til blomster innen 1 km fra kuben, men har ikke noe problem med å trekke 6 km fra kuben (Seeley 1995). Her gir nektar tilgang på karbohydrater mens pollen gir tilgang på proteiner, lipider, vitaminer og mineraler. Pollen inneholder forskjellige mengder mineraler og vitaminer. Dette gjør at biene trenger en variasjon av pollentyper for å dekke behovet (Seeley 1995; Winston 1991). Tilgjengelig pollen og nektar er avhengig av hvilke blomster som er tilstede igjennom sesongen. Samlet pollen fra forskjellige blomster blir direkte levert i celler i kuben og blandet. Her blir det pakket tett for å fjerne luft samtidig som det blandes med honning for å hindre mikrobiell vekst. Mesteparten av pollenet og nektaren blir spist i vårparten for å vedlikeholde den høye eggleggingen og yngelpleien (Seeley 1995). Innen September blir bikubene innført med sukker som erstatning til honningen som blir høstet fra kubene før overvintring (Birøkterlag 2017).

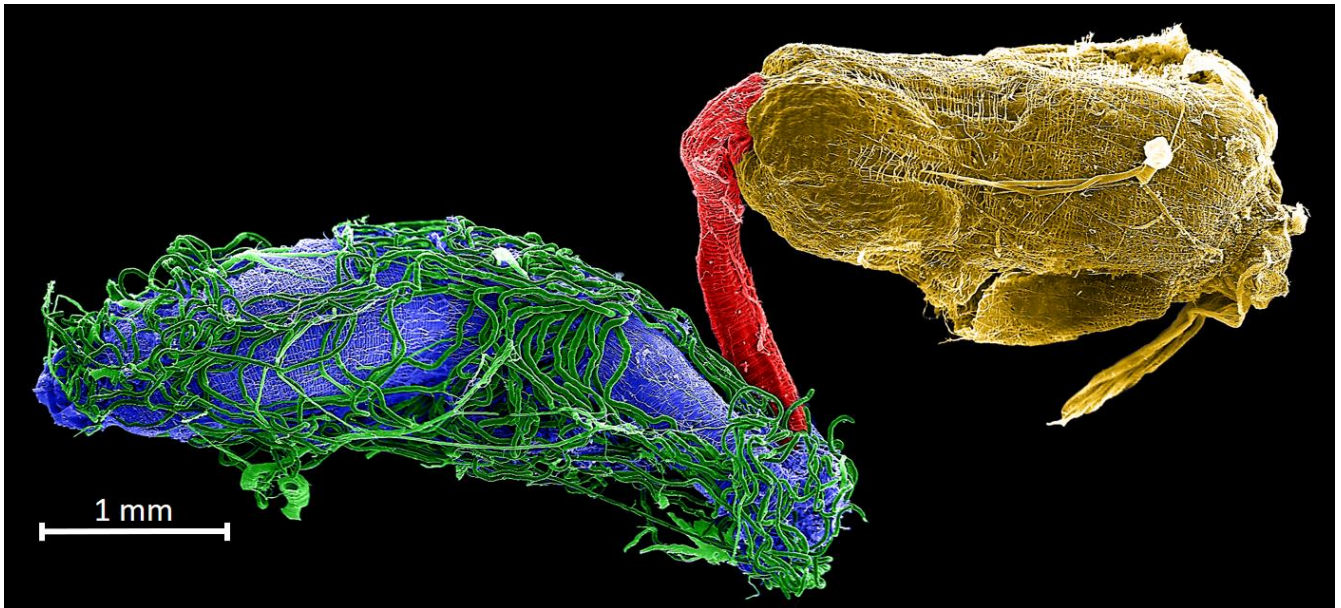
1.1.3 Honningbiens tarmsystem

Tarmsystemet til honningbien består av flere tarmdeler. Disse er honningmagen, midtmagen, ileum, rektum og malpighiske rør. Plassering av de forskjellige tarmdelene er vist i figur 1.2 og 1.3. Her viser figur 1.3 et skanning elektronmikroskop bilde med mer detaljer av midtmage, malpighiske rør, ileum og rektum.



Figur 1.2: Biens tarmsystem. Figur hentet og modifisert fra (Snodgrass 1910).

Mat fraktes langs spiserøret ned til honningmagen, som er en liten fleksibel pose som kan utvides under fylling. Den holder på honning som brukes til energi under flyving, samtidig brukes den som lager av nektar eller vann som transporteres tilbake til kuben (Davis 2004; Douglas 2015; Seeley 1995; Winston 1991). Pollen filtreres raskt videre fra honningmagen til midtmagen. Det er i midtmagen mesteparten av fordøyelsen og absorpsjon av næringsstoffer foregår. Dette er den største delen av tarmsystemet (vises som blått i figur 1.3) (Winston 1991). Langs midtmagen finnes en peritrofiskmembran som hindrer matpartikler fra å komme i direkte kontakt med epitelceller, men slipper igjennom nedbrytningsenzymer (Davis 2004). Solide partikler (pollenskall, fett kuler og døde tarmceller) passerer igjennom midtmagen og den korte tarmdelen ileum (rødt i figur 1.3), direkte til rektum (gult i figur 1.3) til utskillelse (Winston 1991). En ventil finnes mellom midtmagen og ileum for å hindre tilbakestrømming (Snodgrass 1910). Flytende nitrogenavfall blir absorbert fra hemolymfen med malpighiske rør (grønt i figur 1.3) og transportert til tarmen for utskillelse (Winston 1991). Rektum utvider seg for å holde på avfallsstoffer frem til de kan tømme tarmen. Rektum utvider seg mest igjennom vinteren siden ekskresjon stort sett ikke skjer i kuben og må vente til våren når biene trekker ut av kuben (Davis 2004; Winston 1991).



Figur 1.3: Skanning elektronmikroskop bilde av bietarm uten honningmage ved 70x forstørrelse, med illustrasjonsfarging av de forskjellige tarmdelene. Blått viser midtmagen, grønn viser malpighiske rør, rødt viser ileum og gult viser rektum. Foto Åsmund Andersen illustrasjonsfarging utført av Odd Andersen.

1.1.4 Honningbiens tarmflora

Mesteparten av cellene hos en frisk honningbie er mikrobielle. Tarmfloraen kan tilsvare 1-10% av biens kroppsmasse (Douglas 2015). Tarmflora består av arker, bakterier, eukaryoter (oftest gjærceller) (Bäckhed et al. 2005) og virus (Reyes et al. 2010). Siden studier på honningbier er enklere å utføre enn hos mennesker blir bier ofte benyttet som modellorganisme. Mye forskning benytter seg av biens mikrobielle tarmsammensetning for å få en bedre forståelse av sammenkobling mellom tarmflora og vert (Alberoni et al. 2016).

Det er vist at tarmflora har mange viktige roller for verten. Tarmflora er viktige for dannelse av vitaminer (Brodschneider & Crailsheim 2010; Douglas 2015), aminosyrer (Douglas 2015; Gündüz & Douglas 2009), kortkjedede fettsyrer (Zheng et al. 2017), samtidig som tarmflora hjelper nedbrytning av plantemateriale som pollen og komplekse karbohydrater (Douglas 2015; Rokop et al. 2015). Det er vist at aminosyreproduksjonen gir en økt transkripsjon og produksjon av insulinlike signaler, vitellogenin og epitelceller. Dette er med for å gi honningbier en nødvendig normal kroppsvekt (Zheng et al. 2017). Det er også vist at tarmsymbionter kan styrke vekst av andre tarmsymbionter samtidig som de hemmer veksten til potensielle patogene organismer (Rokop et al. 2015).

Larver og nyklekte arbeidere er sterile og tarmfloraen etableres med kontakt ved kuben og fra oral mating (Oral trophallaxis) av eldre arbeidere (Martinson et al. 2012; Powell et al. 2014). Individuer som ikke blir utsatt for denne kontakten oppnår ikke den normale kjernefloraen (Powell et al. 2014). Det er også vist at diett er en viktig faktor som påvirker tarmfloraens sammensetning (Douglas 2015). Det er vist at pollen (McFrederick et al. 2017) og nektar (Anderson et al. 2013) har en viktig rolle med å overføre tarmflora.

Kjernefloraen består av 8 kjernebakteriearter fordelt over de forskjellige tarmdelene. I ileum dominerer 2 gram-negative bakterie arter; *Snodgrassella alvi* og *Gilliamella apicola* (Kwong & Moran 2013) mens rektum er dominert av Gram-positive *Lactobacillus* arter (Martinson et al. 2012). Innen tarmdelene er det størst innhold av bakterier i ileum og rektum, mens det er få bakterier som dominerer i honningmagen og midtmagen (Kwong & Moran 2013; Martinson et al. 2012). Det er bevist at sesongvariasjon påvirker sammensetningen av de forskjellige kjernebakteriene (Ludvigsen et al. 2015).

Det er utført mange studier på bakterie sammensetning hos honningbien men få studier tar for seg soppfunn, ved unntak av patogene sopper. Det er funnet sopp i tarmen tidligere vist i tabell 1.1. Det har kun blitt benyttet dyrkningsavhengige undersøkelser og det er ikke diskutert om det finnes en kjernesoppflora.

Tabell 1.1: Oversikt over soppselekter funnet i honningbietarm med referanse til de som oppdaget den. Alle slektene hører til *Ascomycota* utenom *Nosema* som er del av *Microsporidia*.

Slekt	Referanse
<i>Alternaria</i>	(Gilliam 1997)
<i>Ascosphaera</i>	(Batra et al. 1973)
<i>Aspergillus</i>	(Batra et al. 1973; Foley, K. et al. 2014; Gilliam & Prest 1972; Gilliam 1997)
<i>Aureobasidium</i>	(Batra et al. 1973; Good et al. 2014)
<i>Candida</i>	(Daniel et al. 2013; Gilliam 1997; Ptaszynska et al. 2016)
<i>Cladosporium</i>	(Gilliam & Prest 1972; Gilliam 1997)
<i>Hanseniaspora</i>	(Batra et al. 1973)
<i>Metschnikowia</i>	(Batra et al. 1973; Good et al. 2014)
<i>Nosema</i>	(Fries et al. 2006)
<i>Penicillium</i>	(Gilliam & Prest 1972; Gilliam 1997)
<i>Pichia</i>	(Borsuk et al. 2013; Gilliam 1997)
<i>Saccharomyces</i>	(Batra et al. 1973; Ptaszynska et al. 2016)
<i>Saccharomycodes</i>	(Batra et al. 1973)
<i>Schizosaccharomyces</i>	(Batra et al. 1973)
<i>Zygosaccharomyces</i>	(Batra et al. 1973)

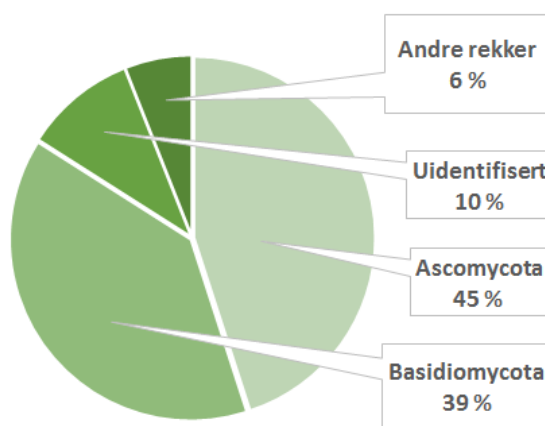
1.2 Sopp

Sopp finnes overalt i miljøet og har mange viktige roller. De er ofte i symbiose med planter ved å hjelpe dem med å ta opp næringsstoffer fra jorda. De er med på å bryte ned dødt plantemateriale som gjør næringsstoffer tilgjengelig som er en viktig del av forskjellige næringskretsløp. Sopp er også viktige hos dyr hvor de er i symbiose, for eksempel hos drøvtyggere hvor de er med på å bryte ned plantemateriale i vomma. Sopp har ikke bare mange viktige roller i naturen, men har også en rekke forskjellige roller innen bioteknologi. Her er sopp mye benyttet innen industri til fermentering av matvarer og produksjon av bioetanol. Men det finnes også mange sykdomsfremkallende sopper som er patogene for planter og dyr (Moore et al. 2011). Soppenes rolle i tarmene med tanke på helseeffekter er lite kjent, og er fortsatt langt

fra å bli forstått (Strati et al. 2016). Men det er oppdaget at gjær kan ha en probiotisk effekt og dermed en positiv effekt på helse (Hatoum et al. 2012).

1.2.1 Systematikk

Sopper er en del av Eukaryotene og hører til soppriket (*Fungi*) som er nærmere i slekt med dyreriket (*Animalia*) enn planteriket (*Plantae*). Det kan være så mange som 1.5 millioner arter av sopp (UNITE 2017). Soppene deles opp i flere rekker; Stilksporesopper (*Basidiomycota*), Sekksporesopper (*Ascomycota*), Endomycorrhizasopper (*Glomeromycota*), Koplingsopper (*Zygomycota*) og Algesopper (*Chytridiomycota*) (Moore et al. 2011). Det er antatt at rekkene sekksporesopper (*Ascomycota*) og stilksporesopper (*Basidiomycota*) inneholder flest arter, 45% av artene hører til *Ascomycota* mens 39% av artene hører til *Basidiomycota* (UNITE 2017), fordeling vist i figur 1.4.



Figur 1.4: Fordeling av antatte arter innen de forskjellige rekkene basert på sekvenser tilgjengelig UNITE og INSD databasene. Verdier hentet fra (UNITE 2017).

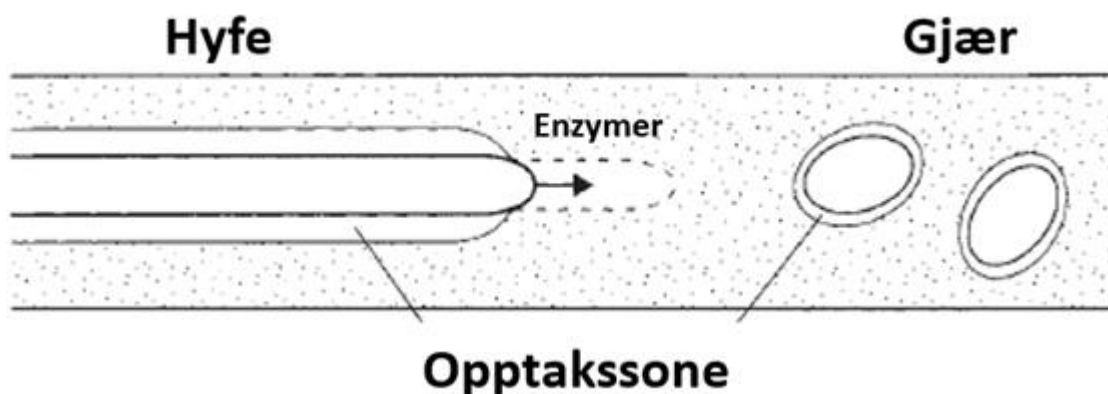
Mange sopper har seksuelle (teleomorph) og aseksuelle (anamorph) stadier. Under disse forskjellige stadiene har soppene forskjellige utseender (Moore et al. 2011). Før utvikling nye molekylære metoder ble de forskjellige seksuelle stadiene tildelt forskjellige navn under det gamle navnssettingssystemet ICBN. Disse navnene var ofte ikke innen samme slekt eller familie (Tang et al. 2015; Underhill, David M & Iliiev, Iliyan D 2014). Dette medfører problematikk når man bruker offentlige databaser til å identifisere soppnukleotidsekvenser (Underhill, David M & Iliiev, Iliyan D 2014). Første Januar 2012 ble ICBN byttet ut med et nytt navnssettingssystem ICN (Zijlstra 2014). ICN har nye navnssettingsregler for sopp, som sier at en sopp skal ha ett navn (Taxonomy 2017). Dette vil hjelpe med å redusere problematikken tilknyttet at en sopp har blitt tildelt forskjellige navn etter seksuelle stadier.

1.2.2 Fysiologi

Sopper er heterotrofe organismer som betyr at de er avhengig av organisk karbon for cellevekst. Dette karbonet er oppnådd på 3 forskjellige måter. Sopper kan være symbionter, hvor de lever sammen med en vert uten å gjøre skade. Som parasitt/patogen hvor den utnytter verten, eller som saprotrof hvor de utnytter dødt materiale. Kun enkeltløselige næringsstoffer kan diffundere igjennom celleveggen med transportproteinene i membranen. Større molekyler må derfor bli oppløst enzymatisk på utsiden før de

kan absorberes. Absorberte næringsstoffer blir først og fremst brukt til primærmetabolisme som driver celleveksten. Etter en stund i vekst vil soppene starte å produsere sekundære metabolitter. Disse er ikke nødvendig for vekst men fungerer som forsvar for soppen, ved å danne pigmenter som beskytter mot UV-stråling eller antibiotika som hindrer vekst av konkurrerende bakterier (Deacon 2006; Moore et al. 2011).

Soppers cellevegg inneholder kitin/kitosan med glukose og vokser i form av hyfer eller som enkeltceller i form av gjær. Gjær er tilpasset til å ta opp oppløste næringsstoffer og til å tilpasse seg raske miljøforandringer. De fleste gjær er oval formet og reproduserer hurtig ved knoppkyting (budding). Noen er stavformet og reproduserer seg ved å dele seg i midten til 2 like store datterceller. Gjærceller er best tilpasset vekst i flytende substrat, mens hyfesopper er bedre tilpasset solide substrater. Dette skyldes at hyfesopp kan penetrere igjennom solide substrater for å ta opp næringsstoffer. Dette gjøres ved å skille ut enzymer ved tuppen av den voksende hyfen som vokser innover i substratet (figur 1.5). Noen enzymer er også bundet til celleveggen. De oppløste næringsstoffene tas opp langs hyfene (Deacon 2006; Moore et al. 2011).



Figur 1.5: Viser næringsopptak av hyfe og gjærsopper samtidig vises det at hyfesopp skiller ut enzymer ved tuppen av den voksende hyfen. Figur hentet og modifisert fra (Deacon 2006)

Noen sopper er dimorfe, hvor de kan opptre både som gjær og som hyfesopp. Dimorf gjær kan danne hyfer/pseudohyfer ved rette miljøfaktorer. Under forandring av form endres cellestrukturen i celleveggen seg, noe som er en viktig virulensfaktor. Cellestrukturen igjenkjennes av immunsystemet, dette gjør det mulig å kjenne igjen patogener. Denne forandringen i cellestruktur er viktig for å unngå vertens immunsystem (Deacon 2006).

Sopper sprer seg med bruk av sporer. Gjærsopper er i stand til å tørke inn til sporer mens hyfesopper produserer sporer. De fleste sporer spres med luftveien og blir oftest spredd med vind eller kastet med regndråper. Noen sopper har mekanismer som fysisk skyter sporene av gårde, ved å bygge opp trykk i kapsler. Når trykket blir høyt nok sprekker kapslene og sporene skytes av gårde 2 meter eller mer. Noen

sopper er tilpasset spredning via insekter ved at de er klebrige og festes til insekter og utnytter insektet som en vektor for å bli spredd (Deacon 2006).

Sporer produseres seksuelt eller aseksuelt, hvor seksuelle sporer er for overlevelse mens aseksuelle sporer benyttes til spredning. Sporer inneholder ofte fargede pigmenter og har en tykk cellevegg (Deacon 2006). Om sporer er i suboptimale tilstander, for eksempler ved mangel på næringsstoffer, feil temperatur eller feil pH vil ikke sporene kunne spire, men holde seg i dvale og utsette spiringen. Denne dvaleformen kalles eksogen dvale og blir brutt når miljøet forandrer seg til optimale tilstander. Men noen sporer spirer selv ikke under disse tilstandene og er avhengig av en annen faktor, som alder eller et fysisk sjokk, dette kalles endogen dvale (Moore et al. 2011). Aseksuelle sporer har eksogen dvale mens seksuelle sporer ofte er i endogen dvale (Deacon 2006).

1.2.3 Patogene sopper

Sopper kan være patogene både for insekter og planter. Patogene sopper hos insekter kalles entomopatogene eller entomogenous, og forårsaker sykdom som hemmer eller dreper insekter. Mesteparten er ectoparasitter som smitter fra utsiden og penetrer igjennom kutikula, eller smitter via tarmsystemet med sporer. Entomopatogene sopper er dimorf og finnes innen de fleste sopprekker, slik som *Ascomycota* og *Basidiomycota* (Moore et al. 2011). Det finnes arter innen *Ascospaera*, *Aspergillus* og *Nosema* som er kjente patogene sopper hos honningbier (Fries et al. 2006; McArt et al. 2014).

Plantepatogene sopper svekker eller dreper planter ved for eksempel dannelse av klorose, nekrose eller ved å forårsake tørke i planten. Sopper penetrer planter igjennom celleveggen fysisk eller enzymatisk, men de kan også benytte skader i celleveggen eller gå inn stomata (spalteåpning). Insekter er ofte en vektor til spredning av plantepatogener, for eksempler barkbiller som infiserer trær de angriper. Slik som ved insektspatogener finnes de innen de fleste sopprekker (Moore et al. 2011).

1.2.4 Sopp hos planter

Pollinatorer besøker planter og under denne interaksjonen overføres ofte mikroorganismer. Det er kjent at det skjer overføring til planter med avføring fra honningbier (McFrederick et al. 2017). Dette er en viktig interaksjon for å spre gjærsopper til blomster. Ved undersøkelser av mikrobielt samfunn er dyrkningsavhengige metoder mest brukt, men dyrkningsuavhengige metoder begynner å bli tatt mer i bruk. Noen slekter av sopp ser ut til å være vanlige medlemmer hos blomster på tvers av planterekker og geografisk område. Slik som *Metschnikowia* (*Ascomycota*) og *Cryptococcus* (*Basidiomycota*). Dyrkningsuavhengige studier som benytter seg av 18S ribosomalt RNA(rRNA) sekvenser er ofte dominert av uidentifiserte sopper (Alekklett et al. 2014), samtidig som de ofte også amplifiserer DNA fra andre arter enn sopp (Hamad et al. 2012).

Studier viser at mikrobiell sammensetning varierer fra plantedel til plantedel. Det er observert mye mikroorganismer i pollen, ofte bakterier fra slekten *Bacillus* sammen med muggsopper fra *Penicillium* og *Botrytis* slektene (Heydenreich et al. 2012). Pollen er sett på som en viktig spredder av mikroorganismer mellom insekter og forskjellige planter (Alekklett et al. 2014). Nektarier er deler av planter som inneholder mest mikroorganismer siden det er høy fuktighet og god tilgang på næringsstoffer. Den mikrobielle sammensetningen er sterkt påvirket av nektars kjemiske egenskaper (Heil 2011). Gjær er ofte funnet hos planter, uavhengig av art og lokalitet, og det er som regel observert svært høy tetthet av gjærceller i nektar (Herrera et al. 2009). Nektar domineres av gjærsopper fra både *Ascomycota* og *Basidiomycota*, mens det er observert få hyfesopper (Alekklett et al. 2014).

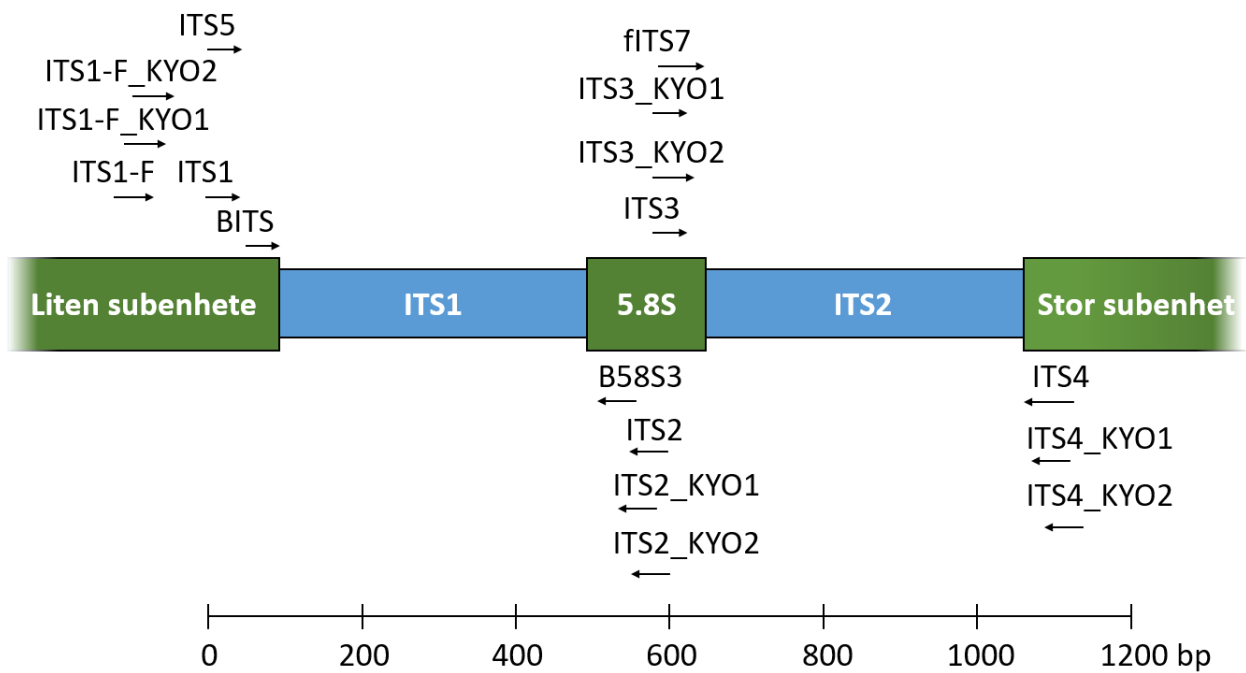
Planter utsettes for en rekke forskjellige abiotiske faktorer (som temperatur og fuktighet) over vekstperioden. Det er gjort få studier som tar for seg sesongvariasjon av det mikrobielle samfunnet hos planter, men det er forventet at sesong skal føre til variasjon i den mikrobielle sammensetningen (Alekklett et al. 2014). Det er vist at sopp sammensetning tilpasser seg forskjellige miljøforhold ved å øke funksjoner som er tilpasset overlevelse i det spesifikke økosystemet (Bastida et al. 2013).

1.3 Bruk av Internal transcribed spacer som taksonomisk markør

Internal transcribed spacers (ITS) regionen er den mest brukte og foretrukne regionen innen molekylær identifikasjon av sopp (Bellemain et al. 2010). De forskjellige rRNA genene sammen med ITS regionene blir benyttet til å bestemme soppens fylogeni (Schoch et al. 2012).

Det eukaryotiske rRNA består av liten subenhet (18S), 5.8S og stor subenhet (28S) rRNA gener. Disse genene transkriberes samtidig av RNA polymerase I. Under den posttranskripsjonelle prosessen fjernes 2 ITS regioner. Disse 2 ITS regionene sammen med 5.8S genet kalles ITS regionen. ITS1 er plassert imellom den lille subenhet og 5.8S, mens ITS2 regionen er plassert imellom 5.8S og den store subenheten (Schoch et al. 2012; Tang et al. 2015). Oppbygning og de mest brukte primere innen ITS sekvensering vises i figur 1.6. Samme systemet er brukt for rRNA genet for den lille subenheten (16S) hos prokaryoter (Liu et al. 2012; Stackebrandt & Goebel 1994; Woese 1987).

Siden ITS ikke er del av de funksjonelle genene til rRNA er disse regionene variable (i sekvens og lengde). Det er disse forskjellene som gjør det mulig å taksonomisk bestemme sopper ved bruk av ITS regionene (Underhill, D. M. & Iliev, I. D. 2014). Det finnes flere kopier av rRNA per genom, og mengden varierer ofte (100-200 kopier). Denne forskjellen gjør at man må være forsiktig med å kvantifisere sopp slekter med bruk av ITS (Tang et al. 2015). Noen primere tilknyttet ITS sekvensering amplifiserer ikke kun sopp DNA. Slik som primeren fITS9 som er kjent for å også amplifisere plante DNA (Taylor et al. 2016) og BITTS primeren som ikke var designet for å utelukke DNA som ikke kommer fra sopp (Bokulich & Mills 2013).



Figur 1.6: Oppbygning av rRNA genot sammen med ITS regionene. Piler indikerer retning på vanlig brukte primere. Basert på (Bokulich & Mills 2013).

Det er flere markører i bruk innen bestemmelse av sopp, men disse er ofte spesialisert innen egne grupper av sopp, slik som translation elongation factor 1- α hos *Fusarium* (O'Donnell et al. 2010) og β -tubulin hos *Penicillium* (Frisvad & Samson 2004). Ved bestemmelse av gjær har D1/D2 regionen av den store subenheten ofte blitt benyttet (Fell et al. 2000). Primere for de proteinkodende genene er ofte veldig spesifikke og har en smal rekkevidde innen arter som blir amplifisert, mens amplifisering av rRNA gener har en bredere rekkevidde (Schoch et al. 2012).

Siden starten av 1990-tallet, har ITS regionen blitt brukt til å bestemme taksonomi av soppisolater. I løpet av de siste årene har undersøkelse av soppøkologi startet å benytte seg av neste generasjons sekvensering (NGS), men grunnet begrensninger tilknyttet leselengder på sekvenseringen har kun deler av ITS regionen blitt sekvensert i form av ITS1 eller ITS2 regionene (Blaalid et al. 2013). Under bearbeiding av sekvensdata fra NGS blir sekvensene delt på artsnivå etter sekvenslikhet. Her blir sekvenser med en likhet på $\geq 97\%$ slått sammen til såkalte operational taxonomic unit (OTU) (Lindahl et al. 2013). Både ITS1 og ITS2 regionene gir begge lik taksonomisk sammensetning ved rekke- og ordensnivå (Blaalid et al. 2013). Noen hevder at ITS1 regionen er i snitt noe mer variabel enn ITS2 regionen (Nilsson et al. 2008). Studier har vist at Illumina MiSeq platformen er best egnet til sekvensering av ITS1 regionen siden det er mulig å sekvensere selv de lengste ITS1 fragmentene (Tang et al. 2015). Andre studier hevder at ITS2 er mer variabel (Bazzicalupo et al. 2013). Men studier viser at både ITS1 og ITS2 gir i stor grad like resultater (Blaalid et al. 2013).

1.4 Polymerasekjedereaksjon

Polymerasekjedereaksjon (PCR) ble oppfunnet på 1980-tallet av Kerry Mullis. Dette gjorde det mulig å amplifisere DNA med 3 trinn. Først denatureres dobbeltrådig DNA (dsDNA) ved å øke temperaturen til 95°C. Andre trinnet binder primere seg til 3' enden av hver tråd ved en temperatur ideelt 2-4°C under smeltetemperaturen til primerne. Under det siste skrittet elongeres DNA tråden ved en temperatur rundt 72°C med bruk av varme stabile polymeraser som binder deoksyribonukleosidtrifosfat (dNTP). Disse stegene blir gjentatt 25-40 ganger. Det skjer en dobling av hvert DNA molekyl per gang. Dette gjør det mulig å undersøke ikke-dyrkbare organismer (Pepper et al. 2014). Det er problematisk å kvantifisere små mengder DNA med vanlig PCR. Andre PCR-baserte metoder gjør det mulig å detektere lave mengder med DNA/RNA. Det er mulig å kvantifisere ved bruk av kvantitativ PCR (qPCR) og digital droplet PCR (Baker 2012).

1.4.1 Kvantitativ PCR

Under qPCR blir mengden PCR produkter som amplifiseres overvåket aktivt under hele PCR perioden. Dette gjør det mulig å estimere mengden DNA/RNA i prøven (Zhang & Fang 2006). Under PCR amplifiseringen binder fluorescensmarkører til DNA. Dette kan gjøres med spesifikke markører eller uspesifikke markører. Uspesifikke markører som SYBR Green og EvaGreen binder til dsDNA, hvor ingen fluoresens skjer i ubundet form men kun når det er bundet til dsDNA (Giulietti et al. 2001). Mengden fluoresens øker med den økende mengden av dsDNA. Det er detektorer som måler mengden fluoresens fra prøven. Når fluorescensen når en bestemt terskel blir en CT-verdi gitt som representerer syklusnummer. Det er med denne CT-verdien det er mulig å kvantifisere mengde DNA. For å kvantifisere mengden DNA benyttes standardkurve laget av en fortynningsrekke hvor den kjente mengden DNA er oppgitt (Zhang & Fang 2006). Under PCR dannes primer dimers som er primere som hybridiserer sammen og danner dsDNA. Disse vil også være med på å danne fluoresenssignal som medfører til feilaktige avlesninger av prøvene. En måte å fjerne denne feilinformasjonen på er ved bruk av smeltekurve. Under dannelsen av smeltekurven øker temperaturen og dsDNA blir separert. Her blir mengden fluoresens målt med en økende temperatur (Kubista et al. 2006). Den synkende mengden av fluoresens ved forskjellige temperaturer vil indikere mengden produkt dannet under PCR og ikke spesifikke produkter (Pepper et al. 2014).

1.4.2 Digital Droplet PCR

Digital droplet PCR (ddPCR) bruker samme primere og prober som ved qPCR, men kan oppnå mye høyere sensitivitet og presisjon. Dette gir et absolutt mål på mengde DNA molekyler og antall kopier av målsekvens (Baker 2012; Manoj 2016). Prøven blir fordelt i 20 000 dråper i en oljeløsning, hvor DNA blir tilfeldig fordelt blant dråpene. Det blir kjørt kvalitativ PCR på dråpene med fluoresens markør som binder til dsDNA under PCR. Dråpene som inneholder målsekvens blir telt som positive mens dråper som ikke inneholder målsekvens blir telt som negative. ddPCR kvantifiserer DNA kopi nummer ved å finne amplifiserbare molekyler i startprøven ved å telle positive dråper. Programvaren beregner konsentrasjonen av målt DNA som antall kopier per μl (Baker 2012). Denne metoden benytter ikke standardkurve slik som ved qPCR.

1.5 Sekvensering

Sekvensering domineres av første og andre generasjons sekvensering, men tredje generasjons sekvensering er allerede tatt i bruk. Første generasjon generer 1 sekvens per prøve, mens andre generasjons sekvensering genererer flere sekvenser per prøve, men har en kortere leselengde. Mens under tredje generasjons sekvensering (TGS) genereres lengre leselengder enn tidligere generasjoner.

1.5.1 Første generasjons sekvensering

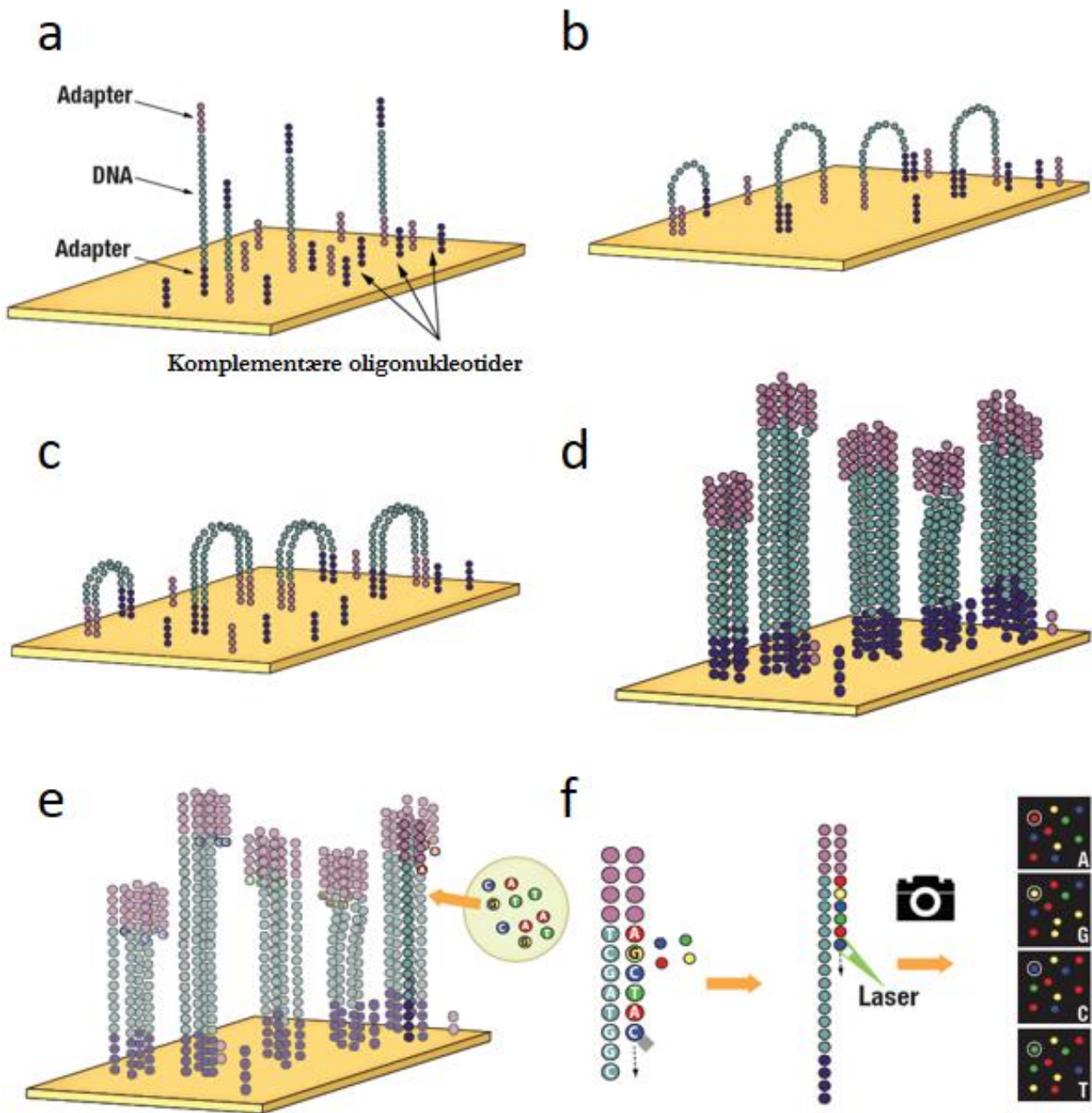
Sanger sekvensering ble funnet opp i 1977 av Fredrick Sanger og hans kollegaer. Sekvenseringen benytter DNA polymerase sammen med primer som driver DNA replikasjon *in vitro* med dNTP og di-deoksyribonukleotidtrifosfat (ddNTP) som mangler OH-gruppe på 3'-enden. både dNTP og ddNTP konkurrerer om å binde under replikasjon. Inkorporering av ddNTP medfører at replikasjonen stopper, noe som gir fragmenter i forskjellige størrelser som kan separeres med elektroforese (Sanger et al. 1977). Metoden har blitt videre utviklet hvor ddNTP er merket med forskjellige fluoresens markører per base. De merkede fragmentene blir separert med kapillær gel elektroforese, underveis blir fluorescensmarkører eksitert av laser i systemet. Avlesing av rekkefølge og fluorescensmarkører gir sekvensen (Metzker 2005). Bruk av Sanger sekvensering kan oppnå leselengder opp til 1200 basepar (bp) med en nøyaktighet opptil 99.999% (Shendure & Ji 2008; Zhang et al. 2011).

1.5.2 Andre generasjons sekvensering

Andre generasjons sekvensering er også kjent som NGS. Det finnes flere plattformer innen NGS, eksempler her er Roche 454 pyrosekvensering (sekvensering ved syntese), SOLiD (sekvensering ved ligering), Ion Torrent (sekvensering ved syntese og pH forandring) og Illumina (sekvensering ved syntese). Bruken av NGS produserer mer data over kortere tid samtidig som det er redusert pris sammenlignet med første generasjons sekvensering. Ulempen er at det gir kortere leselengder med høyere feilprosent sammenlignet med sanger sekvensering. (Shendure & Ji 2008).

Illumina sekvensering startes med å preparere et bibliotek ved å feste spesielle adaptersekvenser på prøvene i begge ender med PCR. Sammen med disse adapterne er unike indekssekvenser som benyttes for å identifisere prøvene bioinformatisk (Illumina 2015). Ved å benytte unike indekser på begge ender av prøvene reduserer muligheten for at indeksene blir tildelt feil prøve under analyse (Nelson et al. 2014) samtidig som det gjør det mulig å merke flere prøver. Disse adapterne er tilpasset og fester seg til komplementære oligonukleotider som befinner seg på en flytcelle (figur 1.7 a). Etter festing blir fragmentene kopiert ved bro amplifikasjon som gjør at det blir dannet rundt 1000 identiske nabokolonier med enkelttrådet DNA (figur 1.7 b-d).

Avlesning er utført med en metode kalt sekvensering ved syntese. Det benyttes 4 forskjellige merkede fluorosensnukleotider for å sekvensere koloniene (figur 1.7 e). Under hver syklus blir 1 fluorokrom merket dNTP tilsatt nukleinsyrekjeden og avlest. Hver base har en unik farge som brukes for å finne sekvensen. En ny base kan ikke binde før fluorokromet er fjernet siden fluorokromet blokker 3'OH enden av den voksende DNA kjeden. Fluorokromene blir eksitert med bruk av laser og intensiteten av fluoresens fra hver koloni fotograferes og måles (figur 1.7 f). Fluorokromene blir enzymatisk fjernet etter avlesning slik at neste base kan binde. DNA trådene blir lest 300 bp hver vei, dette kalles paired end sekvensering. Dette er med på å øke kvaliteten av sekvensene samtidig som det øker sekvens lengden (Illumina 2015). Etter sekvensering blir det gitt en Q-verdi som gir informasjon om kvaliteten på sekvenseringen. En Q-verdi på 20 tilsvarer 99% nøyaktighet mens en Q-verdi på 30 tilsvarer en nøyaktighet på 99.9%. Målet er å prøve å få en så høy Q-verdi som mulig (Illumina 2011).



Figur 1.7: Illumina sekvenseringsprosessen, (a) binding av adaptorer til komplementære oligonukleotider, (b) bro dannelse, (c) bro amplifikasjon, (d) dannelse av nabokolonier, (e) tilføring av fluorokrom merket dNTP, (f) inkorporering av riktig base og deteksjon av fluorescens. Figur er modifisert fra (wetware 2014).

1.5.3 Tredjegenasjons sekvensering

TGS er en ny sekvenserings teknologi som har 3 viktige forbedringer sammenlignet med tidligere sekvenserings generasjoner. Det er en økt leselengde, redusert sekvenseringstid og fjerning av ubalanser dannet under PCR amplifikasjoner (Schadt et al. 2010). Det er 2 kommersielt tilgjengelig TGS DNA sekvenserings teknologier, disse er Pacific Biosciences (PacBio) Single Molecule Real Time (SMRT) sequencing og Nanopore sekvensering av Oxford Nanopore Technologies. Ved bruk av

enkeltmolekylesekvensering, klon amplifikasjon og sekvensering av lengre molekyler, kan alle tre teknologiene produsere leselengder på flere tusen bp, men det er også observert leselengder som passerer 100 000bp (Lee et al. 2016).

1.6 Mikroskopering

Det menneskelige øye har en begrensning som gjør at det ikke kan separere ting som er mindre enn 0,2 mm. Vi må derfor benytte mikroskop for å kunne se små detaljer i objekter som er mindre (Murphy 2002).

1.6.1 Lysmikroskop

Lysmikroskop har en lyskilde, i form av en glødetråd eller LED lampe. Lyset går igjennom en rekke glasslinser for å samle lyset på prøven. Lyset fra prøven går videre igjennom en objektivlinse og et okular hvor begge forstørrer prøven. Det synlige lyset har begrensninger når det kommer til forstørrelse i lysmikroskop. Den beste mulige oppløsningen i lysmikroskop er 0,2 μm , strukturer som er mindre kan ikke skilles (Murphy 2002). For å kunne skille mellom mindre strukturer trengs elektronmikroskop.

Mye biologisk materiale er nesten ikke synlig med vanlig lysmikroskop. Derfor benyttes ulike metoder for å gi prøvene kontrast. Det kan benyttes kontrastfarging hvor selve prøven blir farget som gjør den synlig. Eller så kan det benyttes metoder for å gi optisk kontrast slik som faseforskyvning. Faseforskyvning er en metode som omgjør faseforskyvninger i lyset som går igjennom prøven for å danne et synlig bilde, med bruk av spesielle kondensatorringer i mikroskopet. Dette medfører faseforskyvning og det oppstår en destruktiv interferens (gir et mørkere signal). Dette øker kontrasten og får prøven til å vises som mørk mot en lysere bakgrunn (Murphy 2002).

1.6.2 Skanning elektronmikroskop

Elektronmikroskop benytter seg av elektroner istedenfor lys. Ved å bruke elektroner kan det oppnå bølglengder som er 100 000 ganger kortere enn fotoner fra synlig lys. Dette gir elektronmikroskop enn mye høyere forstørrelses mulighet og oppløsning enn vanlig lysmikroskop (Chandler & Roberson 2009).

Istedenfor en lyskilde benytter elektronmikroskop en elektronkanon som sender en primærstråle med elektroner mot prøven. Disse elektronene kontrolleres med bruk av et vakuumsystem sammen med elektromagnetiske linser. Denne strålen flyttes punkt for punkt over prøven langs en skannings linje (derav navnet). Når primærstrålen treffer prøven kan det medføre at sekundære elektroner eksiteres. Det er dette signalet som gir informasjonen som trengs for å danne topografiske bilder med høy oppløselighet av overflaten. Sekundære elektronene fangs opp av en Evenhart-Thorly detektor og brukes for å genere bilde av prøven (Chandler & Roberson 2009).

1.7 Mål med masteroppgaven

Hos den europeiske honningbien (*Apis mellifera*) er bakteriesamfunn i tarmen godt studert, hvordan bakterier etableres, dens sammensetning og variasjon (Engel et al. 2012; Kwong & Moran 2013; Martinson et al. 2012; Moran 2015; Powell et al. 2014). Det er også gjort flere undersøkelser på hvordan denne bakterielle sammensetningen påvirker honningbiens helse (Brodtschneider & Crailsheim 2010; Rokop et al. 2015; Zheng et al. 2017). Men det er gjort få studier på honningbiens soppflora og ingen av studiene har benyttet dyrkningsuavhengige metoder men kun brukt dyrkingsavhengig metode (Batra et al. 1973; Gilliam & Prest 1972; Gilliam 1997; Good et al. 2014; Ptaszynska et al. 2016).

I henhold til tidligere studier var **hovedmålet med masteroppgaven å utforske soppasamfunn innenfor forskjellige tarmdeler hos honningbien over en sesong. Samtidig ble det undersøkt om sammensetningen av sopp ble påvirket av sesong.** For å undersøke dette ble dyrkingsavhengig og uavhengige metoder benyttet med Sanger og Illumina sekvensering av ITS regionen.

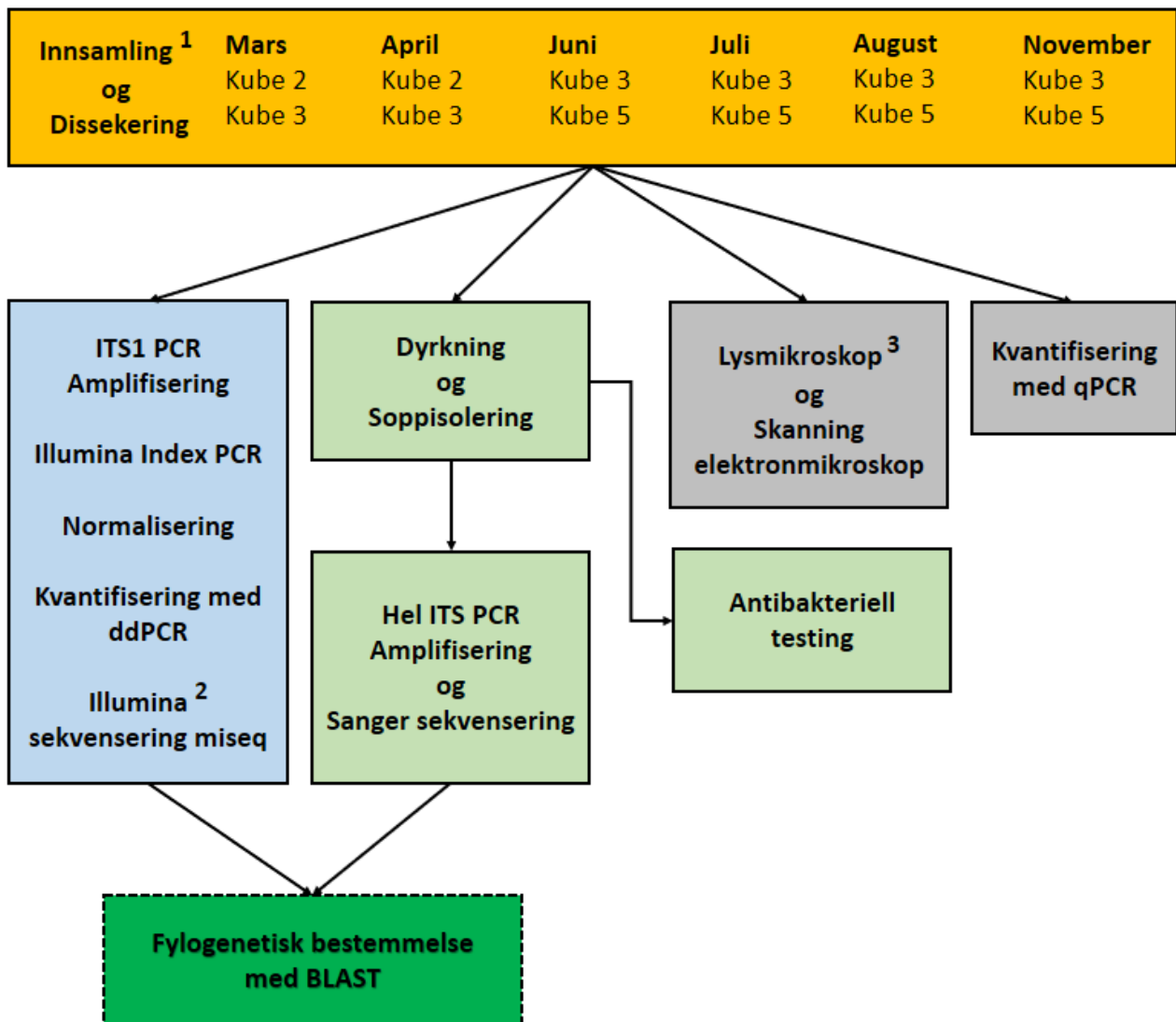
Grunnet lite informasjon om soppasamfunn hos honningbier ble flere undersøkelser utført med følgende delmål.

- Undersøke mengde av sopp tilstede i tarmdelene over sesongen.
- Undersøke hvilken sopper som er tilstede i tarmen over sesongen.
- Se om det finnes en kjernegruppe med sopper tilstede i honningbietarmen.
- Undersøke hvilken sopper som lar seg dyrke.
- Å undersøke om noen av de dyrkbare soppene har en antibakteriell effekt.
- Undersøke om det var synlig soppvekst i tarm med ulike mikroskoperingsteknikker.

2.0 Material og metode

2.1 Prøvemateriale

Bier fra tre kuber i Ås Akershus Norge ble samlet i mars, april, juni, juli, august og november. Det ble originalt benyttet to kuber, kube 2 og kube 3. Men kube 2 mistet dronningen og ble byttet ut med kube 5 fra juni. Figur 2.1 viser flytskjema over forsøkene utført på tarmdelene.



¹) Innsamling utført av medveileder og birøkter

²) Illumina sekvensering og bearbeiding av rådata utført av medveileder

³) Farging og snitting av tarmar til lysmikroskop utført av sykehuset i Østfold

Figur 2.1: Flytskjema som viser en skjematisk framstilling av Material og metode. Blå boks viser den dyrkningsuavhengige prosessen, lysegrønn viser den dyrkningsavhengige prosess og grå viser mikroskopering og kvantifisering. Antall prøver vist i vedlegg tabell A1 og tabell A2.

2.1.1 Innsamling av tarmdeler og miljøprøver

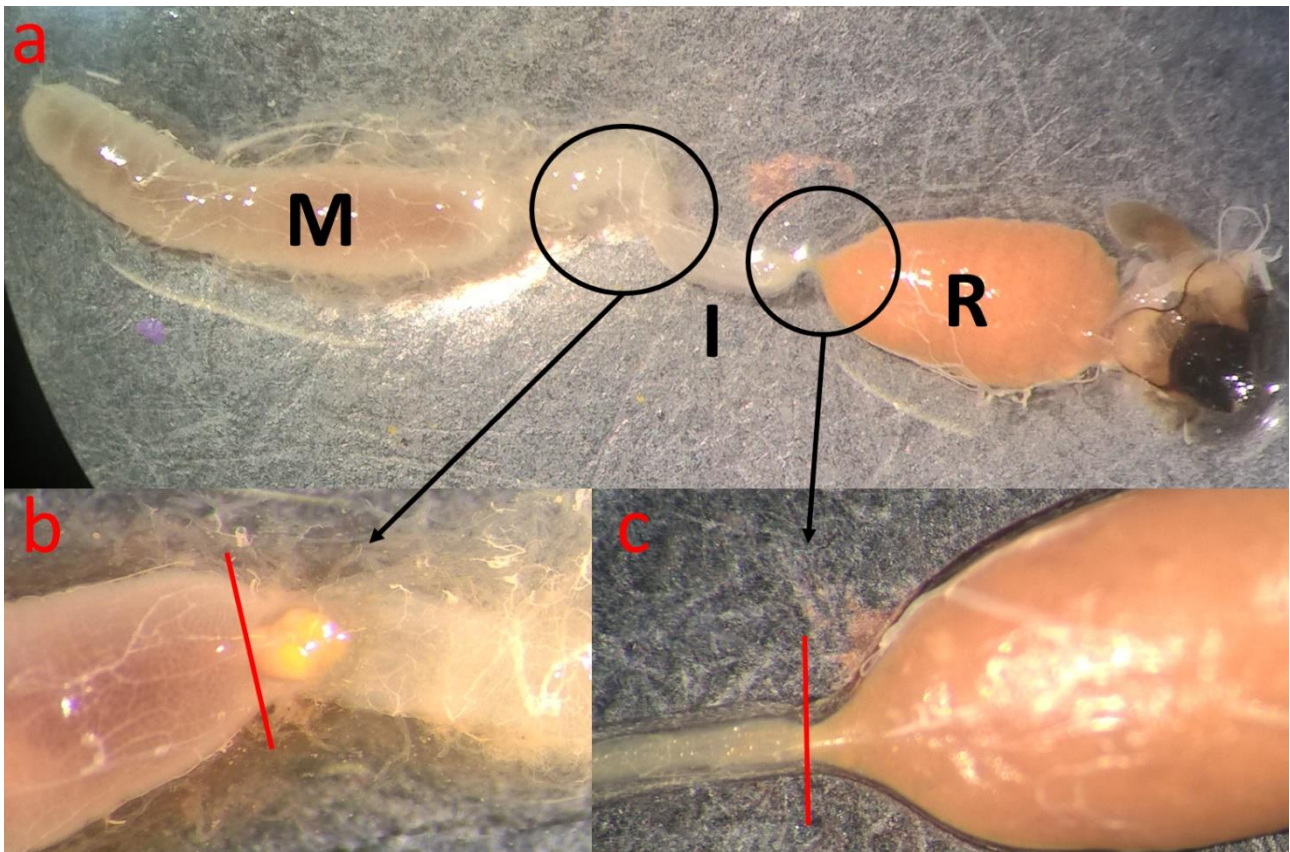
Mars og november var bier samlet i klynge i midten av kuben og bier i ytterkant av klynge ble samlet. Mens i april, juni, juli og august ble bier fra rammen nærmest inngang plukket for å ta bier som har trekket. Mengden individer samlet vises i vedlegg tabell A1.

Sukker ble samlet i mars, april, august og november, pollen ifra april, juni og juli og nektar ifra juni. Alle prøvene ble samlet fra bikuber og løst i Phosphate buffered saline (PBS) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) til sluttvolum på 1 ml for sukker og 500 µl for pollen og nektar.

Sterilt blåkorkrør (Greiner Bio-One, Østerrike) fylt opp til volum på 50ml med blomster av Selje (*Salix caprea*), Hvitveis (*Anemone nemorosa*) og Hagelerkespore (*Corydalis solida*) ble samlet i april. Eple (*Malus domestica*) ble samlet i juni. Blomster ble knust i stomacher (VWR, USA) i 40 ml ringersløsning (Oxoid, England) samme dag som innsamling til ringersløsning (Oxoid, England) ble blakket. Prøver ble sentrifugert i 10 minutter ved 1300 RPM og supernatant ble fortynnet 1:1 med PBS (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany).

2.1.2 Dissekering

Bier ble avkjølt på is i kjøleskap ved 0°C - 4°C før de ble dyppet i 50% etanol og tarm ble dratt ut etter brodden og lagt på desinfisert objektglass som var vasket med 1:10 klor og 70% etanol. Instrumenter ble desinfisert mellom bruk. Dissekering ble gjort under stereo lupe ved 20 ganger forstørrelse. Tarmen ble dryppet med nukleasefritt vann (VWR, USA) for å løsne de malpighiske rørene. De malpighiske rørene ble dratt ned og samlet sammen med ileum. Det ble kuttet imellom rektum og ileum og ileum og midgut som demonstrert i figur 2.2 c og b med skalpell. Bakkroppen ble klippet opp med saks og honningmage ble hentet ut. Honningmage ble ikke samlet inn i mars. Honningmage, midtmage, ileum og rektum ble brukt videre.



Figur 2.2: Honningbietarm uten honningmage. (a) hele tarmen, (b) overgang mellom midtmaten og ileum og (c) overgang mellom ileum og rektum. Røde streker viser områder kuttet. **M** = Midtmaten, **I** = ileum og **R** = rektum.

2.1.3 Tarmdeler og miljøprøver til dyrkning

Under flytting av de malpighiske rørene ble PBS (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) benyttet istedenfor nukleasefritt vann (VWR, USA) for å ikke hemme potensiell soppvekst. Fem tarmdeler fra hver kube ble slått sammen i hvert sitt rør med 3 2,5-3,5mm syrevaskede glasskuler (Sigma-Aldrich, Tyskland) og 300µl med PBS (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany).

2.2 Dyrkning

2.2.1 Dyrkning av isolater

De sammenslåtte tarmdelene ble lysert med FastPrep (MP Biomedicals, USA) ved 1800rpm i 20 sekunder. Rørene ble toppet til 1ml med PBS (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) og blandet. Dyrkingen i mars ble dyrket på fire ulike medier. Disse mediene var PDA, PDA med sukrose, YMA og V8 (Oppskrifter for medier i vedlegg Tabell B1). Det ble økt CO₂ ved bruk av GasPack™ EZ CO₂ sachet (BD, USA) og aerobe forhold ved 25°C og 37°C i 1-2 uker. Dyrkning ble utført ved å dryppe 10 µl på 2-3 punkter på mediet + spredning på 20 µl. Under dyrkning i april, juni og august ble plate spredd med 35 µl samtidig som det kun ble brukt PDA og YMA medium benyttet aerob dyrkning ved 25°C og 37°C. Alle dyrkninger ble utført samme dag som dissekering for ikke å hemme potensiell soppvekst, siden

nedfrysning av prøver reduserer antall dyrkbare sopper (Griffith et al. 2009). Til dyrkning av miljøprøver ble oppløste pollen, nektar, sukker og blomsterprøver benyttet. Samme dyrkingsforhold som tarmdeler.

PDA medium er et næringsfattig medium optimalt for hyfevekst mens YMA medium er et næringsrikt medium optimalt for gjær vekst. Inkubering ved 37°C var også med på å hemme mye hyfevekst, som gjør det lettere å plukke gjær isolater. Alle skåler var tilsatt 100 mg/l kloramfenikol før plate helling for å hindre bakterie vekst under dyrkning.

Etter 2-7 dager inkubering ble hyfe og gjær isolater utvalgt på grunnlag av morfologiske forskjeller. Gjær isolater ble rendyrket på YMA medium mens hyfesopp ble videre rendyrket på PDA mediumet, begge ved 25°C. Isolater ble spredd på nye skåler minimum 3 ganger for å sørge for rene isolater uten forurensing.

2.2.2 Nedfrysning av isolater og miljøprøver

Isolater og miljøprøver ble overført til rør med 1 ml med PBS (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) og 20% glycerol. Det ble overført gjærceller eller hyfe sporer til PBS (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)/glycerol blandingen ble blakket. Gjærisolater og miljøprøver ble fryst ned ved -80°C mens hyfesoppene ble fryst ned ved -40°C.

2.2.3 Antibakteriell testing

Det ble gjennomført et eksperiment for å undersøke noen av gjær isolatenes evne til å hemme bakteriellvekst. Her ble det benyttet 3 gjærisolater fra rektum fra bietarm. 2 av bakterie isolatene stammet også fra bietarm, mens et isolat var *Escherichia coli* kultur. Både gjær og bakterie isolater ble dyrket opp ved 36°C + CO₂ i 2-3 dager hvor gjær ble spredd på YMA medium mens bakterier ble spredd på TSA medium. Alle isolater ble ren spredd to ganger for å sikre seg rene kulturer. Bakterier og gjær ble løst i saltvann (0,85%) til det ble oppnådd en McFarland verdi på 0,8 (tilsvarer 2.4x10⁸ CFU/mL), utenom *E. coli* som hadde en verdi på 0,5 (tilsvarer 1.5x10⁸ CFU/mL). McFarland viser turbiditet av fortyningene. Bakterier ble spredd på TSA skåler med bomullswab 3 ganger for å dekke hele skålen for å danne et bakterieteppe. Deretter ble 3 punkter på 10 µl med gjær pipettert over utstryket. Etter 2 dager inkubering ved 36°C med økt CO₂ ved bruk av GasPack™ EZ CO₂ sachet (BD, USA) ble inhiberings sone fra gjær isolat til bakterie teppe målt med linjal.

2.3 DNA ekstraksjon

2.3.1 Preparering av prøvemateriale

Blomsterprøver ble vakuumfiltrert med sterilt 45 nm nitrocellulose filter (Merck Millipore, Tyskland). Filter, 100 µl av oppløst pollen, nektar, sukker og tarmdeler ble overført til rør med 0,2 g med <106µm syrevaskede glasskuler, 0,425-0,600 mm glasskuler og 2 2,5-3,5 mm syrevaskede glasskuler (Sigma-

Aldrich, Tyskland) og 300 µl stool transport and recovery (S.T.A.R) buffer (Roche, Tyskland). S.T.A.R buffer hemmer degradering av DNA, samtidig som det hindrer vekst (Espy et al. 2006). Mengden S.T.A.R buffer varierte fra tarmdelene. Til rektum og midtmagen ble det benyttet 300 µl mens til ileum og honningmage ble 200 µl benyttet.

20 µl av gjærisolater og ≥ 2.5 cm² hyfer fra hufesopper ble overført til hvert sitt rør med 300 µl STAR buffer og 0,2 g med ≤ 106 µm syrevaskede glasskuler og 2 2,5-3,5 mm syrevaskede glasskuler, med sterilisert utstyr vasket i 1:10 løsning klor, dyppet i 96% etanol og brent av. Prøver ble lagret ved -20°C før videre bruk.

2.3.2 Lysering og ekstraksjon

Mekanisk lysering av prøver ble utført to ganger med FastPrep (MP Biomedicals, USA) ved 1800 rpm i 40 sekunder, med 5 minutters venting mellom hver lysering. Etter lysering ble prøvene sentrifugert ved 13000 rpm i 5 minutter for å skille glasskuler og cellemateriale fra DNA.

MagTM mini kit (LGC, Middlesex, UK) ble benyttet til ekstraksjon av DNA fra isolater og tarmdeler etter produsents anbefalte protokoll. Lysis buffer og proteinase ble tilført supernatanten etterfulgt av inkubering ved 55°C i 10 minutter for å fjerne protein rester. Etanol og paramagnetiske kuler ble tilført DNA suspensjonen for å binde DNA. Suspensjonen gikk igjennom tre vaske trinn med to vaskebuffere for å fjerne urenheter. Siste skrittet ble det vaskete DNA sluppet fra de paramagnetiske kulene med bruk av elution buffer. Ekstraksjonen ble utført automatisk med KingFisherTM Flex Magnetic Particle Processor, (Thermo ScientificTM, Waltham, USA).

2.4 PCR

Full oversikt over alle primere benyttet er vist i vedlegg C1 og temperaturprofiler finnes i vedlegg tabell C2, C3, C4 og C5.

2.4.1 Primer optimalisering og testing

Alle kvalitative PCR og gradient PCR ble utført ved å ta 1 µl templat DNA fra ekstrahert DNA sammen med 5x HotFirePol DNA polymerase Ready to load (Solis BioDyne, Estonia) i 1x konsentrasjon, Forward og revers primer i 0,2 µM konsentrasjon med et sluttvolum på 25 µl. Nukleasefritt vann (VWR, USA) ble brukt som negativ kontroll. Prøvene ble sentrifugert i 5 sekunder før PCR. Alle kvalitative PCR amplifiseringer ble utført med 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster city, USA).

Gradient PCR for testing av optimums temperatur for ITS-1 forward primer og ITS2 revers primer ble utført med Mastercycler[®] (Eppendorf, USA). program ved temperatur på 55,5 °C med en gradient på 8°C.

For testing av primer kombinasjon for amplifisering av sopp DNA ble primere oppgitt i vedlegg tabell C2 testet med kvantitativ PCR med DNA fra soppisolater fra bie tarm og DNA fra bie hjerne.

2.4.2 Kvalitativ PCR

Alle kvalitative PCR ble utført med samme forhold som ved 2.4.1. For å amplifisere ITS1 regionen til Illumina sekvensering fra tarmdeler ble BITS forward primer og B58S3 revers primer benyttet. For å amplifisere hele ITS regionen til sanger sekvensering ble BITS forward primer og ITS4 revers primer benyttet. For å lage standardkurver til qPCR ble templat DNA fra sopp isolat fra tarm benyttet til å amplifisere ITS1 regionen med samme primere som til Illumina sekvensering. For kvantifisering av bie DNA fra de ulike tarmdelene ble standardkurver av vitellogenin benyttet til qPCR. Vitellogenin regionen ble amplifisert med templat DNA fra bie hjerne med Vitellogenin f forward primer og Vitellogenin r revers primer. PCR program vist i vedlegg tabell C3.

2.4.3 Illumina Index PCR

Til ITS1 regionen ble det satt på indeks og Illumina adapterer med index PCR. Først ble ITS1 regionen amplifisert som forklart i 2.4.1 og renses som i 2.5.1. 1 µl rensede PCR produkter ble tilført Illumina adapterer sammen med unike indekser. Det ble benyttet 16 forward og 32 revers indekser, som ga mulighet til 512 forskjellige prøver (oversikt over indeks primere vises i vedlegg tabell C4). Prøvene ble tilsatt 0,2 µM ITS1 forward og revers primere, 1x FIREPol® Master Mix Ready to Load (Solis BioDyne, Estonia) og nuklease fritt vann (VWR, USA) til sluttvolum på 25 µl. Prøvene ble sentrifugert i 5 sekunder før PCR

2.4.4 Kvantitativ PCR

For å bestemme antall gen kopier av sopp DNA og bie DNA ble kvantitativ PCR benyttet. Vitellogenin ble benyttet for å kvantifisere bie DNA mens ITS1 ble benyttet for å kvantifisere sopp DNA. Kvantifiseringen ble utført med LightCycler 480 II (Roche) benyttet med 0,2µM forward og revers primere (vedlegg tabell C5). 5x HOT FIREPol® EvaGreen qPCRMix Plus (Solis BioDyne, Estonia) fortynnet til 1x ble benyttet som fluoresens markør. Det ble benyttet 5 µl templat DNA, sluttvolum 20 µl og nukleasefritt vann (VWR, USA) ble benyttet som negativ kontroll.

Verdier fra fortynningsrekker ble benyttet til å lage standardkurver (vedlegg figur D1 og D2). Utregning av kopinumner til standardkurve ble gjort med SciencePrimer kopinumner kalkulator (Primer 2017) Antall kopinumner sopp DNA ble normalisert mot antall kopinumner bie DNA.

2.4.5 Digital Droplet PCR

For å lage Illumina bibliotek ble prøver som ga utslag på gel etter Illumina indeks PCR valgt til sekvensering og sammenslått. Styrke på gel ble brukt som mål på mengde DNA tatt ut per prøve. Svakt

band 8 µl DNA, normalt band 4 µl DNA og sterkt band 2 µl DNA. Det ble benyttet en DNA standard på alle gelene, som ga band med normal styrke for å unngå potensiell feilavlesning grunnet kontrastforskjeller (Vedlegg figur D3 viser eksempel på gelbilde). Bibliotek ble sammenslått med Biomek® robot (Beckman Coulter, USA) og manuelt rensset som forklart i 2.5.1. før kvantifisering.

For å kvantifisere Illumina biblioteket før sekvensering ble ddPCR benyttet. Det ble laget en fortynningsrekke av biblioteket fra 10^{-3} til 10^{-9} . Hver fortykning ble tilsatt 2x super mix for EvaGreen (BioRad, USA), 10 µM Forward og revers Illumina colony primere. Til en sluttkonsentrasjon på 1x Super mix for evagreen og 0,2 µM primere med et sluttvolum på 23 µl.

Under dråpegenerering ble 20 µl av prøvene sammen med 70 µl olje ble tilført dråpegenereringskassett sammen med pakning og generert med BIO-RAD QX200™ Droplet Generator (BioRad, USA). 40 µl av dråper ble overført til PCR plate som ble forseglet med BIO-RAD PX1™ PCR Plate Sealer (BioRad, USA). Etter forsegling ble PCR med følgende program benyttet 95°C i 5min, 40 sykluser med 95°C i 30s, 60°C i 30s og 72°C i 45s, 5 minutter ved 4°C etterfulgt av 5 minutter ved 90°C før PCR blokken ble kjølt ned til 4°C. Kvantifisering ble utført med BIO-RAD QX 200™ tm droplet reader (BioRad, USA).

2.5 PCR Rensning og kvantifisering

2.5.1 Rensning av PCR produkt med AMPure XP

AMPure® XP kuler (Beckman Coulter, USA) ble benyttet for å rense PCR produktene. Her ble det benytter paramagnetiske kuler med karboksyl molekyler som binder DNA reversibelt. Dette ble gjort for å fjerne små fragmenter, for eksempel primerdimers.

40 µl av PCR produktet ble blandet med 40 µl AMPure XP beads (Beckman Coulter, USA) og inkubert ved romtemperatur i 5 minutter. Prøvene ble satt på magneter i 2 minutter før supernatten ble fjernet. Fortsatt på magnet ble kulene vasket to ganger med fersk blandet 80% etanol, hvor etanolen var i prøvene i 30 sekunder før fjerning. Etter fjerning av etanol lufttørket kulene i 15 minutter før de ble fjernet fra magnet og tilsatt nukleasefritt vann (VWR, USA) og blandet forsiktig opp og ned 10 ganger. Prøvene ble inkubert ved romtemperatur i 2 minutter for eluering av DNA før prøvene ble plassert på magnet i 2 nye minutter og rensset DNA ble tatt ut. Rensning ble utført både manuelt med bordmagnet (VWR, USA) og automatisk med Biomek® robot (Beckman Coulter, USA).

2.5.2 Kvantifisering med Qubit og gel

For å kvantifisere DNA ble Qubit (Thermo Fisher Scientific, USA) benyttet. Dette var gjort ved å blande prøvene med Quant-iT Working solution (bestående av 1:200 blanding av Quant-iT™ reagent med Quant-iT™ buffer). Prøvene stod i romtemperatur i 2 minutter før de ble kvantifisert med Qubit™ fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA).

Undersøkelse av DNA fragmentstørrelse ble gjort med 100 brønns gelelektroforese (VWR, USA) hvor PCR produkt ble kvantifisert på 1.5% agarosegel med PeqGreen RNA/DNA fargestoff (Peqlab, Tyskland) sammen med 100bp DNA ladder, (Solis BioDyne, Estonia) for å indikere fragmentstørrelser. Gelelektroforese ble utført med 130v i 45-60 minutter og visualisering ble gjort med Molecular Imager® Gel Doc™ XR Imaging System (Bio-Rad, USA).

2.6 Sekvensering

2.6.1 Sanger sekvensering

Fra isolater ble Hel ITS PCR produkt sendt til GATC-biotech (Tyskland) for rensing og sangersekvensering med Supremerun 96, etter supremerun anbefalinger. Kun sekvensering av forward (BITS) primer ble utført.

2.6.2 Illumina Miseq sekvensering

Illumina bibliotek med konsentrasjon på 4 nM ble preparert og fortynnet til 7 pM etter 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation protokoll (Illumina, USA). Dette innebar denaturering med NaOH. Prøver ble blandet ved romtemperatur etterfulgt av 5 minutter inkubering ved romtemperatur for å separere trådene. 7 pM biblioteket ble tilsatt 15% PhiX og overført til reagens kartong v3 (Illumina, USA) og sekvensert med Illumina MiSeq sekvenserings platform med 300bp paired end.

2.7 Mikroskopering

2.7.1 Skanning elektronmikroskop

Hele honningbietarm uten honningmage og brodd fra november ble lagt i rør med 1 ml fiksesingsbuffer, bestående av 2% Paraformaldehyde, 0.1M PIPES, 1.25% Glutaraldehyde. Tarm i buffer ble lagret i kjøleskap i 2 mnd. Buffer ble fjernet og tarm ble skyllet 3 ganger med buffer og lagret på buffer i kjøleskap. Etter 24 timer ble buffer fjernet og tarm dehydrert i 15 minutter hver i 70%, 90%, 96% og 4 ganger i 100%. Tarmene tørket med kritisk punktørker og dekket med lag av 80%/20% gull og palladium med Sputter coating. SEM ble utført med Zeiss EVO 50.

2.7.2 Lysmikroskopering av sopp

Hel tarm med brodd fra mars, april og august ble overført til rør med 1ml 4% formaldehyd. Kontrast farging av vev med en universal vevsfarge og hyfesopp, innstøping og snitting ble utført av Sykehuset Østfold med en automatisert metode. Snitt ble undersøkt ved vanlig lysmikroskopering mens for levende hyfer og gjær ble det benyttet fasekontrast. All LM ble utført ved 400x og 1000x forstørrelse.

2.8 Datanalyse

2.8.1 Identifisering og alignment

Isolater fra sanger sekvensering og OTUer fra Illumina sekvensering ble identifisert med BLAST med BLASTn algoritmen (BLAST 2017). BLASTn algoritmen sammenligner og finner de mest like DNA sekvensene fra DNA databasen. Isolater som ikke fant noe lignende sekvens i BLAST databasen ble undersøkt i UNITE soppdatabasen (UNITE 2017). OTUer fra Illumina sekvensering ble sammenlignet med BLASTn algoritmen med sekvenser fra sanger sekvenseringen. OTUer som ikke var tilknyttet sopp ble fjernet. Taksonomi av OTUer ble bestemt med bruk av Mycobank (MycoBank 2017) og Artsdatabanken (Artsdatabasen 2017).

Isolater som ble identifisert likt på taksonomisk nivå med BLAST ble sammenstilt (aligned) med MUSCLE alignment. MUSCLE alignment benyttes til å sammenstille protein og DNA sekvenser og gir høyere nøyaktighet sammenlignet med andre metoder (Edgar 2004). Sammenstillingene ble skilt ved 1bp forskjell med parvis sammenligning (pairwise comparison). Sammenstillinger av hyfesopp og gjærsopp ble benyttet til å danne sirkulære kladogram med neighbor joining algoritme. Dette er en algoritme for å rekonstruere fylogenetiske trær ved å sammenligne nærliggende sekvenser. Det ble benyttet Kimura 80 Substitusjonsmodell som tar for seg mutasjons hastighet. For å illustrere hvor stabile grenene i trærne er, ble det gjort bootstrapping med 1000 replikater.

Sekvensbehandling ble utført med CLC Main Workbench 7.7.3 med MUSCLE addon benyttet. For å lage kladogram av alle hyfe og gjærsopp isolater ble 2 hyfesopp og 7 gjærsopp isolater fjernet for å ikke for korte sekvenssammensetning.

2.8.2 Bearbeiding med QIIME og USEARCH v8

Rå sekvenser fra Illumina MiSeq ble bearbeidet med Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) og USEARCH versjon 8. QIIME er en pipeline for å utføre microbiota analyser av rå DNA sekvenser mens USEARCH benyttes til å filtrere sekvenser og fjerne chimeras.

Paired end sekvenser ble sammenslått med overlapp og demultiplexed med QIIME. Her blir sekvensene fordelt til hver sin prøve basert på informasjonen tilknyttet index primere, samtidig blir primer sekvenser fjernet. For å fjerne sekvenser med dårlig kvalitet ble sekvenser kortere enn 100bp og med en e-verdi lavere enn 0.5 filtrert bort med USEARCH versjon 8. OTUer gruppering av filtrerte sekvenser ble utført med terskel på 97% likhet og sjekket for chimeras di novo i USEARCH versjon 8. OTU tabell ble normalisert til 4000 sekvenser fra hver prøve. Identifisering av mest utbredte OTU Signalsekvenser ble utført med BLAST (BLAST) og UNITE soppdatabasen (UNITE 2017). Alpha og Beta diversitets beregning utført med Core_diversity_analysis med QIIME.

2.8.3 Statistikk

Standard feil av gjennomsnittet (Standard error of the mean) for normalisert soppmengde for de forskjellige tarmdelene ved forskjellige tider ble beregnet med følgende formel

$$\text{standard feil av gjennomsnittet} = \frac{\text{Standardavvik}}{\sqrt{\text{Antallprøver}}}$$

For å undersøke signifikant forskjell av mengde normalisert sopp i bietarm ble det benyttet student t-test med ANOVA ved 5% signifikans nivå med bruk av R versjon 3.3.1 sammen med R commander plugin (med hjelp av Raju Rimal). Følgende model ble benyttet.

Normalisert DNA \sim Tarmdel + Måned + Tarmdel * Måned

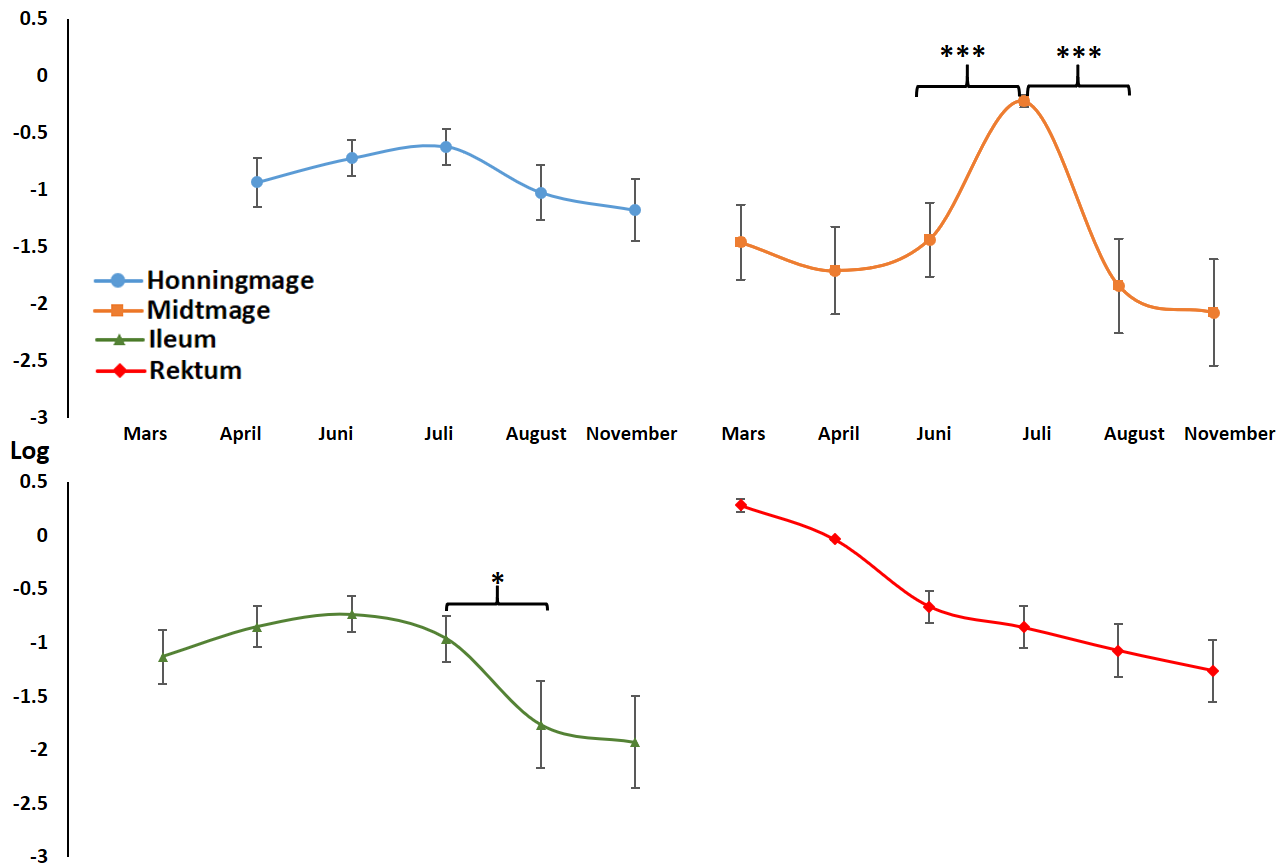
3.0 Resultater

3.1 Primer optimalisering

Primerkombinasjonen BITS/B58S3 for ITS1 regionen amplifiserte alle soppisolater isolert fra honningbietarm men amplifiserte ikke DNA fra bie. Denne kombinasjonen ble valgt som primere til qPCR og Illumina sekvensering. Både BITS/ITS4 og BITS/ITS4_KYO1 primer kombinasjonene for hele ITS regionen amplifiserte alle soppisolatene fra honningbietarm som ble testet under optimaliseringen, samtidig som de ikke amplifiserte bie DNA. BITS/ITS4 kombinasjonen ga 12 sterkere band sammenlignet med BITS/ITS4_KYO1 (Vedlegg figur C1). BITS/ITS4 ble videre testet på alle soppisolatene fra honningbietarm hvor alle isolatene ble amplifisert og ble derfor benyttet til hel ITS sekvensering med sanger sekvensering.

3.2 Kvantifisering av sopp DNA i tarmdeler

Tilfeldige utvalgte tarmprøver viste DNA innhold fra ikke målbart til 5,55 ng/ μ l med Qubit. For å kvantifisere mengden sopp over sesongen ble Kvantitativ PCR benyttet. Normaliserte mengde av DNA er vist i figur 3.1. Rektum inneholder mer sopp DNA enn bie DNA i mars. Høye mengder i april, men mengden ble lavere fra juni og videre. Midtmage inneholdt lave mengder sopp DNA men mengden økte i juni og juli. Mengden gikk ned igjen fra august. Mengden sopp DNA i ileum ble lavere fra juli. Honningmagen hadde en jevn mengde sopp DNA igjennom hele sesongen. Det var ingen signifikant forskjell i mengden DNA i honningmagen over sesongen. Det var signifikant høyere mengde DNA i midtmagen i juli. Det var signifikant lavere mengde DNA i ileum fra august. Det var signifikant lavere mengder DNA fra juni i rektum. P-Verdier og T-Verdier vist i vedlegg tabell D1.



Figur 3.1: Mengden normalisert sopp DNA i forskjellige tarmdeler over forskjellige måneder. Tarmdeler fra to forskjellige bikuber er sammenslått og verdier er oppgitt i log verdier med Standard feil av gjennomsnittet. Blå strek viser honningmage, oransje strek viser midtmage, grønn viser ileum mens rød viser rektum. * betyr P-verdi = <0,05, ** betyr P-verdi 0.01 og *** betyr P-verdi = <0,001. I midtmagen var juli signifikant høyere enn alle andre måneder (***). I ileum var mars signifikant høyere enn november (*), april signifikant høyere enn august (**) og november (***), juni signifikant høyere enn august (***) og november (***) og juli signifikant høyere enn november (**). I rektum var mars signifikant høyere enn juni (**), juli (***), august (***) og november (***) og april var signifikant høyere enn juli (*), august (***) og november (***)

3.3 Dyrkningsuavhengig metode

Det ble forberedt 484 prøver til sekvensering, men kun 130 inneholdt nok DNA til sekvensering. Det var ikke nok DNA i midtmage prøver fra August, honningmage prøver fra april og august eller fra sukker og nektarprøver til sekvensering. Etter normalisering av sekvensene var det 118 prøver igjen. Fra de 118 prøvene ble 2334 OTUer funnet hvor 394 av OTUene ble undersøkt og identifisert om mulig med BLAST og UNITE. De resterende OTUene som ikke ble undersøkt tilsvarte 2% av totale sekvenser fra tarmprøvene. Oversikt i vedlegg Tabell E1.

Av undersøkte OTUer var 135 (34,26%) ikke mulig å bestemme, disse tilsvarte 12% av totale sekvensene fra tarmprøvene. Av disse hadde 23 OTUer ikke noe likhet med databasene (6,78% av sekvensene), 87 OTUer ble identifisert som ukultiverte isolater (4.11% av sekvensene) og 25 OTUer lot seg ikke bestemme (1,18% av sekvensen) siden de ble identifisert som forskjellige sopper som ikke hadde noen sammenheng med hverandre. Blant miljøprøvene ble det ble observert høyest mengde ukjente OTUer (Vedlegg tabell E1).

Av bestemte OTUer ble 67.5% bestemt ned til arts nivå. Iblant OTUene ble det observert både insekts og plante patogen sopper og 9 OTUer bestemt som planter mens 7 OTUer viste seg å være Oomycota. Disse OTUene ble fjernet fra datasettet siden de ikke hører til soppriket, og 377 OTUer ble igjen. Alle tarmdelene hadde $\geq 98.75\%$ andel soppsekvenser utenom 2 rektum prøver 1 fra juni (91,78%) og 1 fra Juli (89.35%).

3.3.1 Alfa diversitet

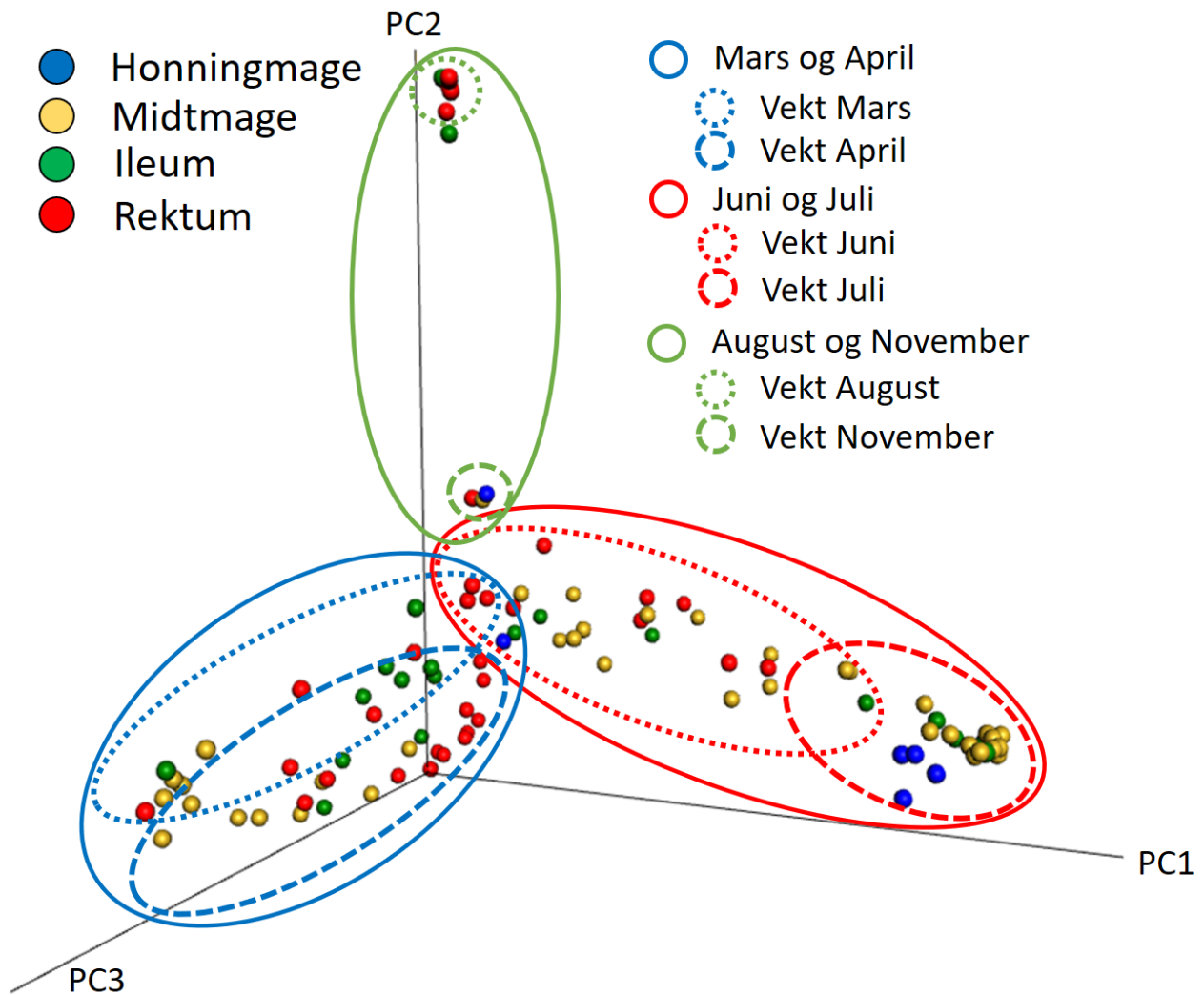
For å undersøke diversitet innad i prøver ble det beregnet alfa diversitet. Her ble mengden observerte arter, Simpsons 1-D og Shannon indeks beregnet, vist i tabell 3.1. Det var en høy diversitet i de forskjellige tarmdelene i april og juni, utenom honningmagen. Midtmagen og rektum er tarmdelene med høyest alfa diversitet hvor rektum hadde høyest alfa diversitet i juni og juli. Antall observerte arter økte fra mars til juni og falt etter juli. Det var flest observerte arter i midtmagen i juni mens honningmagen inneholdt færrest observerte arter. Rarefaction kurven (rarefaction curve) som vist i vedlegg figur E1 viser at antall observerte arter flater ut ved 1500 sekvenser, utenom midtmagen i juli som flatet ut ved 3500 sekvenser.

Tabell 3.1: Alfa diversitet i form av observerte arter, Simpsons 1-D og Shannon indeks med standardavvik i forskjellige tarmdeler over forskjellig tid. Tarmdeler fra to forskjellige bikuber er sammenslått. n viser antall prøver.

		n	Observerte arter	Simpsons 1-D	Shannon indeks
Mars	Midtmage	5	26 ± 4,9	0,57 ± 0,13	1,8 ± 0,5
	Ileum	3	22,4 ± 5,5	0,41 ± 0,13	1,4 ± 0,6
	Rektum	4	22,8 ± 8,6	0,42 ± 0,22	1,6 ± 0,7
April	Midtmage	7	68,5 ± 12,5	0,81 ± 0,08	3,5 ± 0,6
	Ileum	7	42,5 ± 8,8	0,77 ± 0,14	3,1 ± 0,8
	Rektum	15	78,3 ± 26	0,78 ± 0,13	3,4 ± 0,8
Juni	Honningmage	1	17,4 ± 1	0,20 ± 0,01	0,8 ± 0
	Midtmage	13	131,7 ± 39,5	0,80 ± 0,19	4,1 ± 1,1
	Ileum	4	93,5 ± 23,5	0,77 ± 0,19	3,8 ± 1,1
	Rektum	3	86,2 ± 16,4	0,89 ± 0,03	4,2 ± 0,4
Juli	Honningmage	4	54,2 ± 40,2	0,60 ± 0,08	2,3 ± 0,2
	Midtmage	17	82,9 ± 37,7	0,49 ± 0,24	2,1 ± 1,1
	Ileum	7	71,6 ± 23,4	0,48 ± 0,25	2,1 ± 1,1
	Rektum	4	85,2 ± 41,8	0,87 ± 0,05	4,1 ± 0,8
August	Ileum	1	9,4 ± 1	0,33 ± 0,01	1,1 ± 0
	Rektum	7	16,8 ± 15,5	0,39 ± 0,29	1,4 ± 1,3
November	Honningmage	1	6,6 ± 1,4	0,48 ± 0	1 ± 0
	Midtmage	1	22 ± 0	0,81 ± 0	2,8 ± 0
	Ileum	1	28,3 ± 2,4	0,47 ± 0,01	1,4 ± 0
	Rektum	1	13,9 ± 1,1	0,72 ± 0,01	2,3 ± 0

3.3.2 Beta diversitet

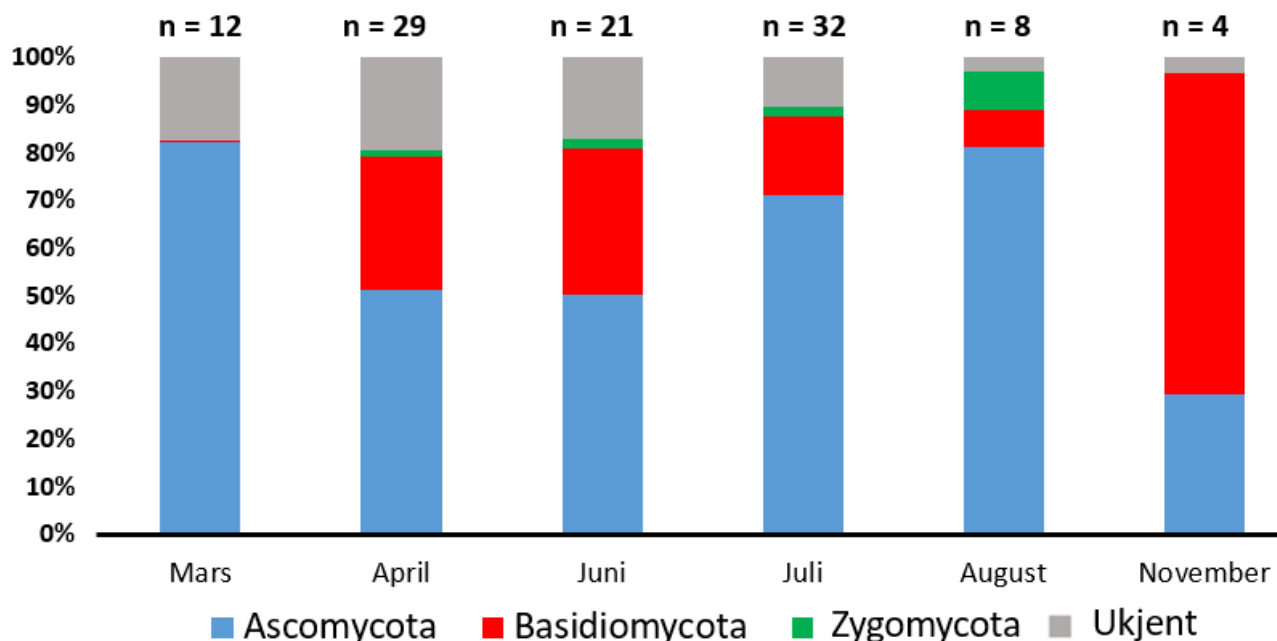
For å undersøke diversitet imellom prøver ble betadiversitets beregninger utført i form av Bray-Curits Principal coordinates analysis (PCoA) plott som vist i figur 3.2. Tarmdelene legger seg forskjellig avhengig av hvilken måned de er innsamlet. Tarmdelene fra mars og april legger seg langs PC3 akse. Tarmdelene fra juni og juli legger seg langs PC1 akse, mens tarmdelene fra august og november legger seg langs PC2 akse. De eneste prøvene som ikke var påvirket av sesong var prøver fra pollen og blomster som la seg mot midten (ikke avbildet i figur 3.2).



Figur 3.2: Bray-Curtis PCoA plott av sopp diversitet i forskjellige tarmdeler over forskjellige måneder. Blå prikker viser honningmage, gule prikker viser midtmage, grønne prikker viser ileum mens røde prikker viser rektum. Blå sirkler viser mars og april, rød sirkel viser juni og juli mens grønn sirkel viser august og november.

3.3.3 Fordeling av sopprekker over sesongen

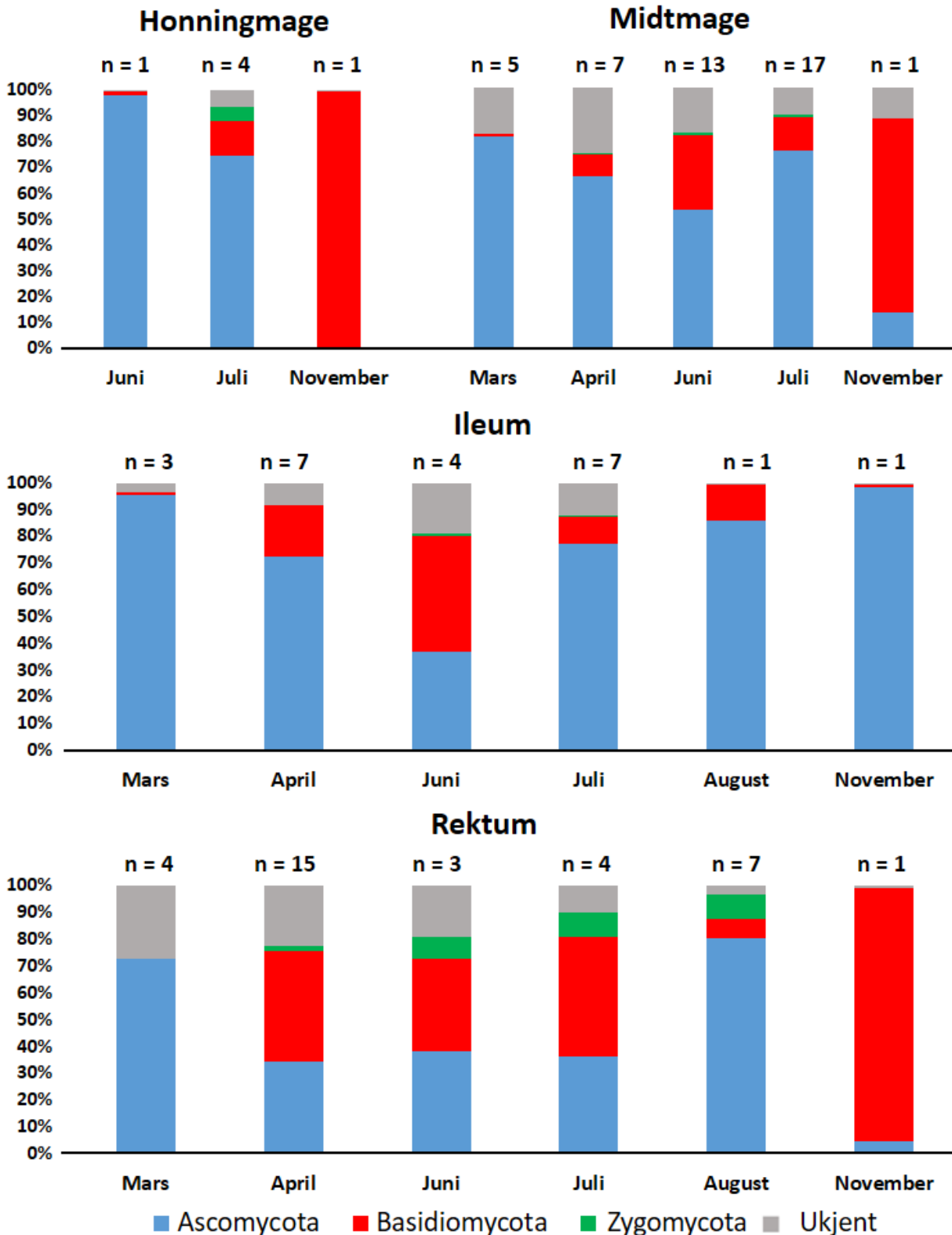
Fordeling av sopprikene fra tarmdelene i mars, april, juni, juli, august og november ble undersøkt, vist i figur 3.3. Det ble observert mest variasjon innen *Ascomycota* og *Basidiomycota*. *Ascomycota* dominerte i mars (81%), april (51%) juni (50%), juli (71%) og august (81%) mens *Basidiomycota* i november (67%). *Ascomycota* var observert i november (29%) og *Basidiomycota* i april (28%), juni (30%) juli (16%) og august (7%). Rundt 20% av sekvensene var ukjent i mars, april, juni og juli.



Figur 3.3: Fordeling av sopprikene i prosent. *Ascomycota* i blått, *Basidiomycota* i rødt, *Zygomycota* i grønt og sopper som er ukjent i grått fra alle tarmdelene i mars, april, juni, juli, august og november. Tarmdeler fra to forskjellige bikuber er sammenslått n viser antall prøver.

Fordeling av sopprikene fra forskjellige tarmdeler i mars, april, juni, juli, august og november ble undersøkt, vist i figur 3.4. Honningmagen var dominert av *Ascomycota* i juni (97%) og Juli (74%) mens november var dominert av *Basidiomycota* (99,5%). I midtmagen dominerte *Ascomycota* i mars (81%), april (66%), juni (53%) og juli (76%) mens *Basidiomycota* dominerte i november (74%). Det var observert *Basidiomycota* i juni (28%) og juli (13%) og *Ascomycota* i november (15%). *Ascomycota* dominerte i ileum i mars (95%), april (73%), juli (77%), august (85%) og november (98%) mens *Basidiomycota* dominerte i juni (43%). Det var observert *Ascomycota* i juni (37%) og *Basidiomycota* i april (19%), juli (10%), og august (14%). I rektum dominerte *Ascomycota* i mars (72%), juni (38%) og i august (80%) mens *Basidiomycota* dominerte i april (41%), juli (44%) og i november (94%). Det var observert *Ascomycota* i april (34%), juli (36%) og *Basidiomycota* i juni (34%).

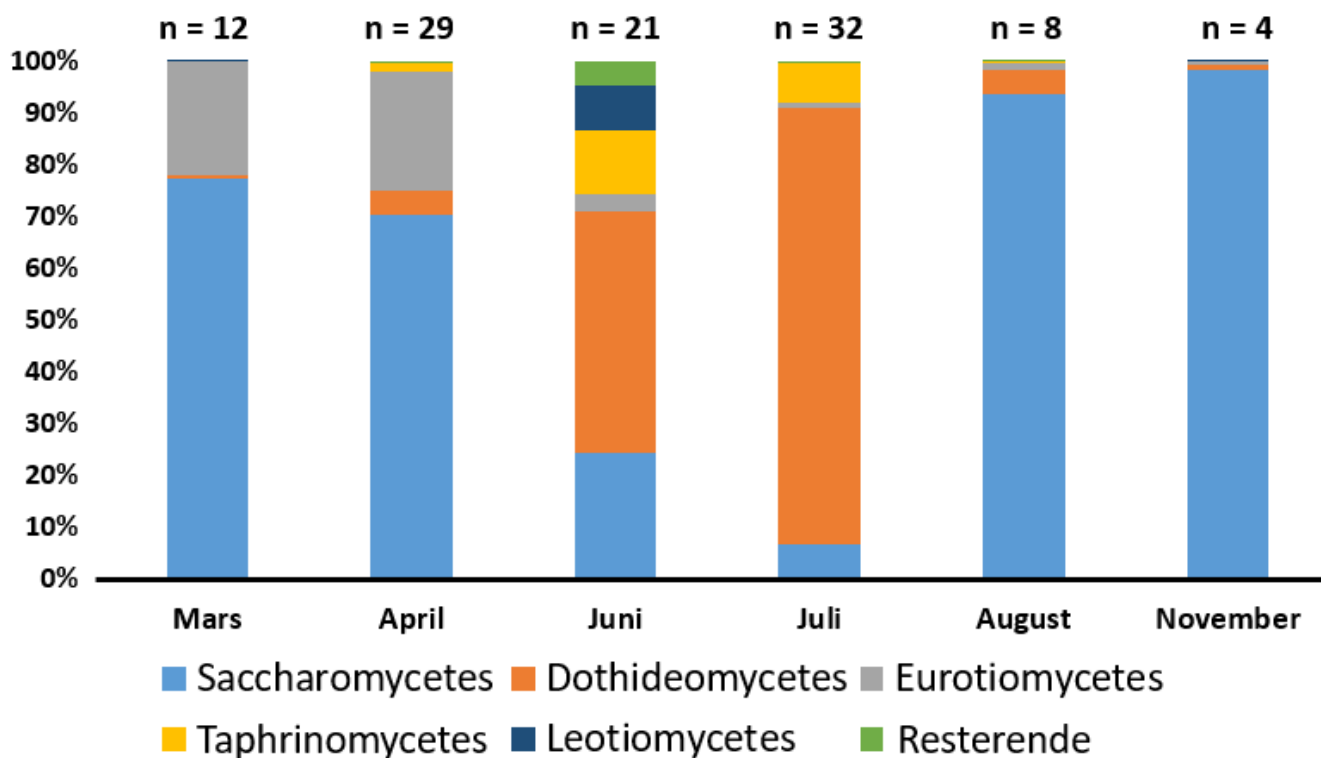
Fordeling av sopprikene *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* blant miljøprøver vises i vedlegg figur E2. Mens detaljert innhold per prøve vises i vedlegg figur E3 og E4.



Figur 3.4: Fordeling av sopprikene i prosent. *Ascomycota* i blått, *Basidiomycota* i rødt, *Zygomycota* i grønt og sopper som er ukjent i grått i forskjellige tarm delene i mars, april, juni, juli, august og november. Tarmdeler fra to forskjellige bikuber er sammenslått. n viser antall prøver.

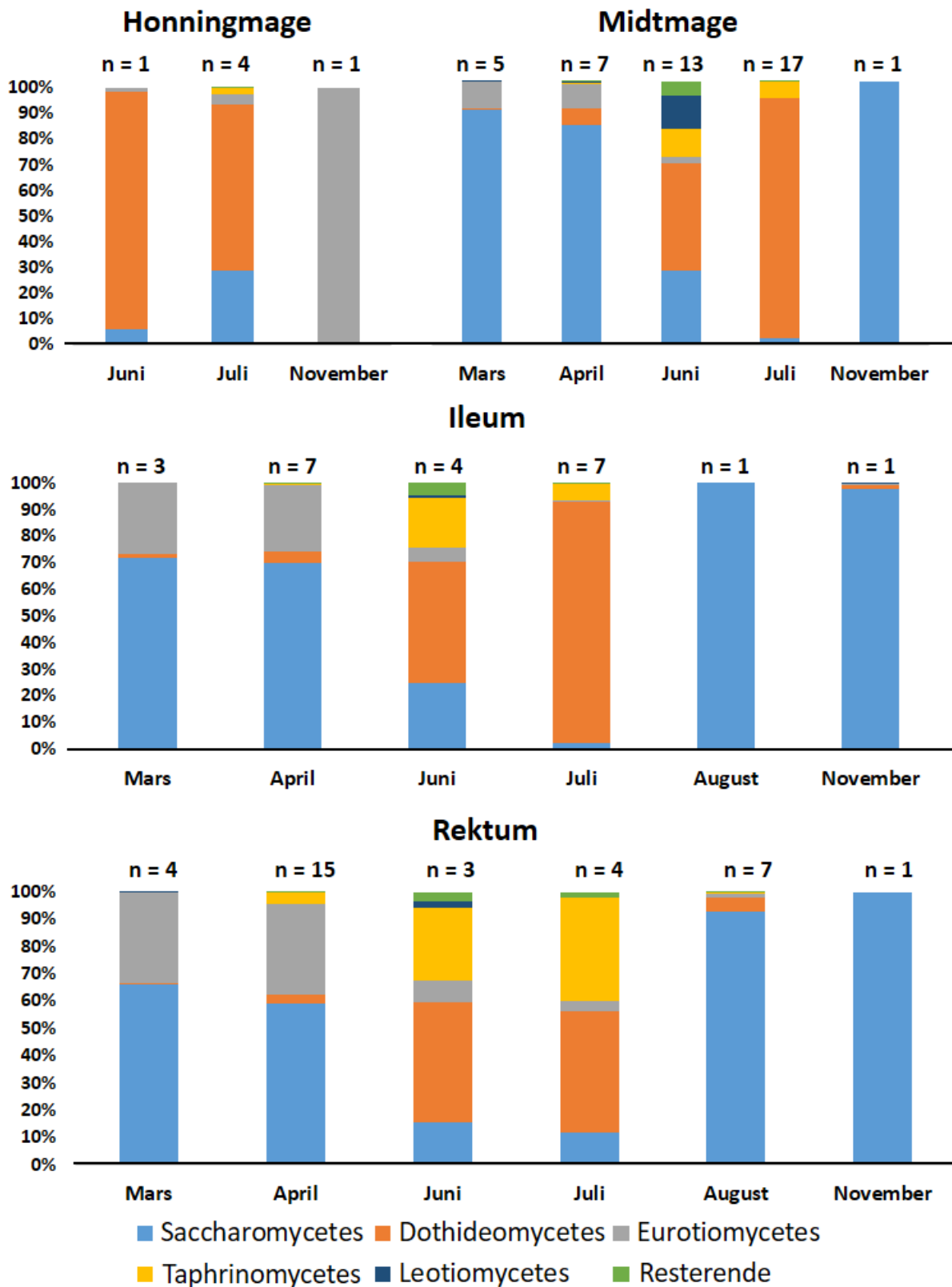
3.3.4 Fordeling av soppklasser over sesongen

Videre ble fordelingen på klassenivå av *Ascomycota* undersøkt ettersom de eneste klassene som viste noe forskjell i *Basidiomycota* var *Tremellomycetes*, *Microbotryomycetes* og *Agaricomycetes*. Disse klassene er kjent som saprofytter, endofytter, mykorrhiza og som plantepatogene. Fordelingen på klassenivå innen *Ascomycota* fra tarmdelene i mars, april, juni, juli, august og november ble undersøkt, vist i figur 3.5.



Figur 3.5: Fordeling av soppklassene *Saccharomycetes*, *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Taphrinomycetes*, *Leotiomycetes* og di resterende soppklassene slått sammen innen *Ascomycota* fra alle tarmdelene i prosent. Tarmdeler fra to forskjellige bikuber er sammenslått. Tarmdeler fra to forskjellige bikuber er sammenslått. n viser antall prøver. Total mengde *Ascomycota* vises i figur 3.3.

Klassen *Saccharomycetes* dominerte i mars (77%), april (70%), august (93%) og november (98%) mens *Dothideomycetes* dominerte i juni (47%) og juli (85%). *Saccharomycetes* var observert i juni (24%), *Eurotiomycetes* observert i mars (22%) og april (23%) og *Taphrinomycetes* observert i juni (13%) og juli (8%).

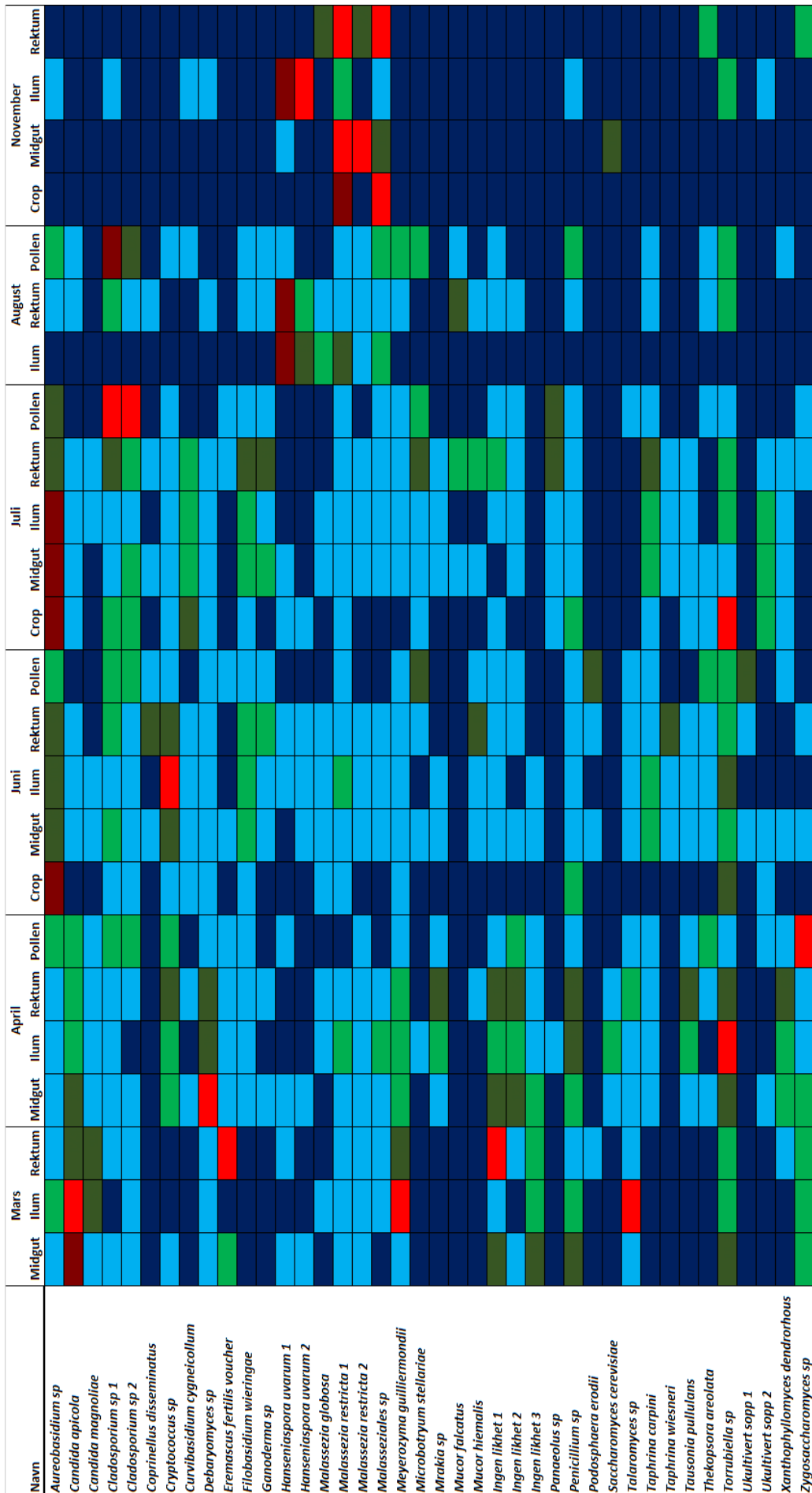


Figur 3.6: Fordeling av soppklassene *Saccharomycetes*, *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Taphrinomycetes*, *Leotiomyces* og di resterende soppklassene slått sammen innen *Ascomycota* i di forskjellige tarmdelene. Tarmdeler fra to forskjellige bikuber er sammenslått. n viser antall prøver. Total mengde *Ascomycota* i hele tarmen vises i figur 3.4.

Fordelingen på klassenivå innen *Ascomycota* fra forskjellige tarmdeler i mars, april, juni, juli, august og november ble undersøkt, vist i figur 3.6. Detaljert innhold per prøve vises i vedlegg figur E5 og E6. I honningmagen dominerte *Dothideomyces* i juni (92%) og juli (64%) utenom i november hvor *Eurotiomyces* dominerte (100%), men det var observert *Saccharomyces* i juli (29%). I midtmagen dominerte *Saccharomyces* i mars (89%), april (83%) og november (100%) mens *Dothideomyces* dominerte i juni (41%) og juli (91%). Det var observert *Saccharomyces* i juni (28%), *Eurotiomyces* i mars (10%) og april (6%), *Tapgriomcetes* i juni (11%) og juli (6%) og av *Leotiomyces* i juni (12%). *Dothideomyces* var ikke tilstede i november. I ileum dominerte *Saccharomyces* i mars (72%), april (70%), august (100%) og november (98%) mens *Dothideomyces* dominerte i juni (46%) og juli (91%). *Saccharomyces* var observert i juni (24%), *Dothideomyces* i april (6%). Det var observert *Eurotiomyces* i mars (26%) og april (25%) og av *Tapgriomcetes* i juni (19%) og juli (6%). *Dothideomyces* var ikke tilstede i august. I rektum dominerte *Saccharomyces* i mars (66%), april (59%), august (92%) og november (100%) mens *Dothideomyces* dominerte i juni (44%) og juli (44%). *Saccharomyces* var observert i juni (15%) og juli (12%), *Eurotiomyces* i mars (33%) og april (33%) og av *Tapgriomcetes* i juni (27%) og juli (38%).

3.3.5 Dominerende OTUer

For sammenligne hvilken OTUer som dominerte i de forskjellige tarmdelene og i pollen, ble et heatmap laget, vist i figur 3.7. Det var ikke observert noen OTUer som dominerte over alle innsamlings tider. Men noen OTUer dominerte over kortere perioder. Som *Aureobasidium sp* som var observert i større mengder i honningmange i juli og i hele tarmen utenom rektum i juli. *Candida apicola* ble observert i større i mengder i midtmagen og ileum i mars og april. *Cryptococcus sp* observert større mengder i ileum i juni. *Debaryomyces sp* observert større mengder i midtmagen i april. 2 forskjellige *Hanseniaspora uvarum* observert større mengder i ileum og rektum i august og i ileum i november. 2 forskjellige *Malassezia restricta* observert større mengder i honningmage, midtmage, rektum i november. *Malassezia restricta* er eneste OTUen som er observert i alle tarmdeler. *Malasseziales sp* observert større mengder i honningmange og rektum i november. *Torrubiella sp* observert i større mengder i ileum i april og honningmagen i juli. *Zygosaccharomyces sp* observert større mengder i pollenprøven fra april. En OTU uten ingen likhet var observert i større mengder i rektum i mars.

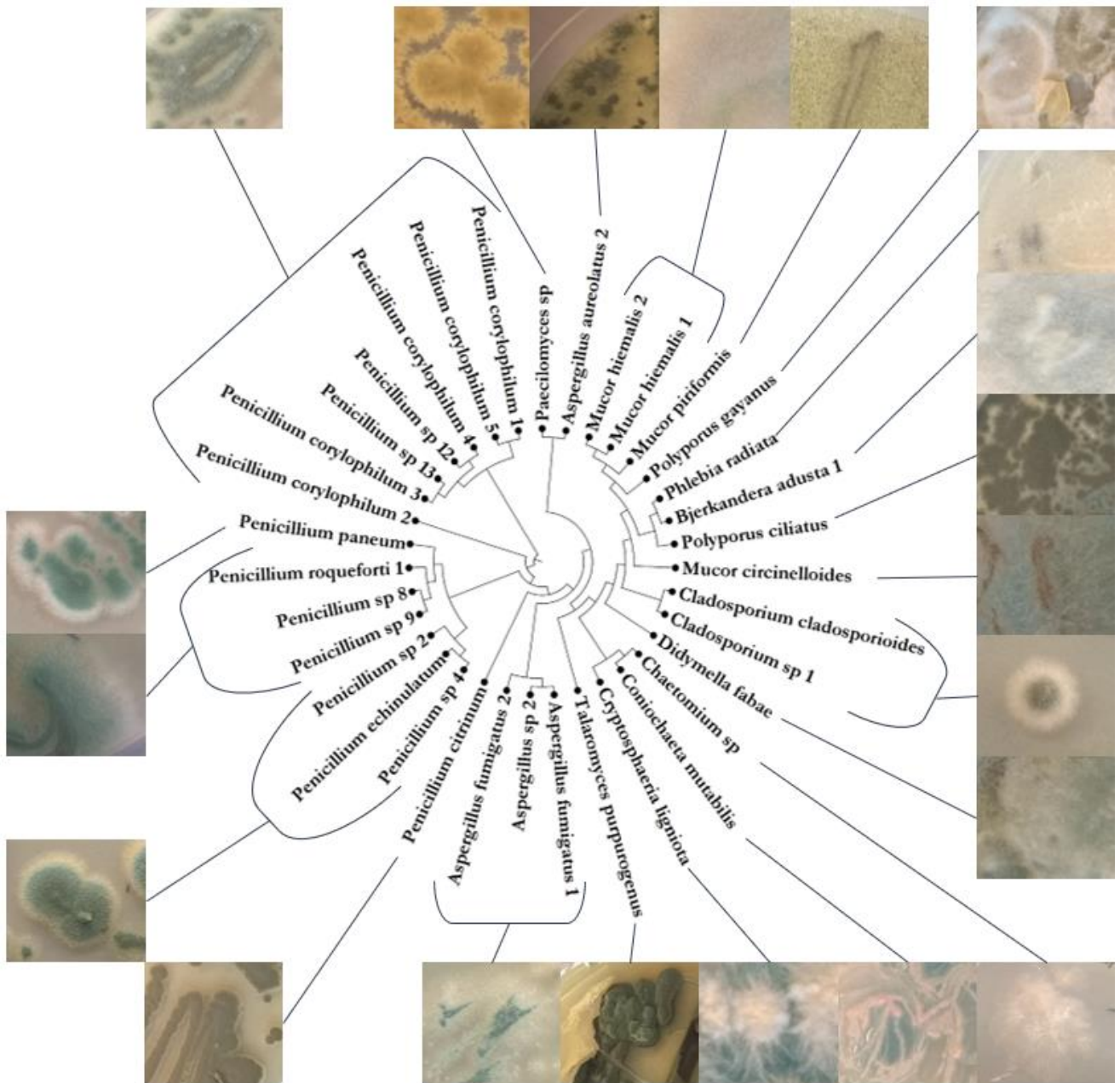


Figur 3.7: Heatmap over dominerende OTUer i forskjellige tarmdeler over forskjellige måneder. Farger viser hvor stor andel av sekvensene i % som er funnet per del. Midt = Midtmage, Crop = Honningmage
Mørkblå: Ingen sekvenser, Lysblå 0-1%, Lysgrønn: 1-5%, Mørkgrønn: 5-20%, Rød: 20-40% og Mørkrød: 40-90%

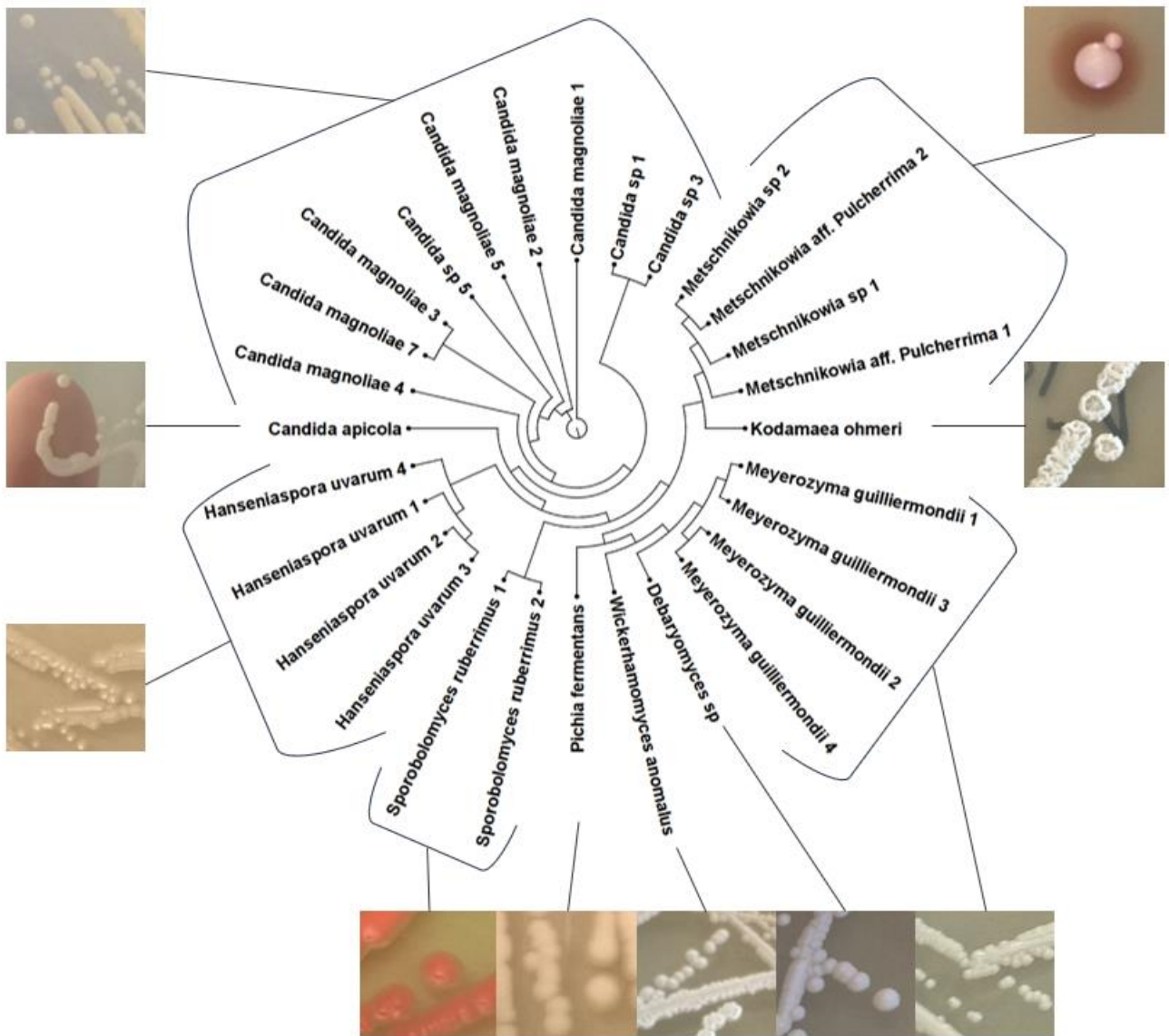
3.4 Dyrkningsavhengig metode

For å få en oversikt over dyrkbare sopper som var tilstede i tarmen ble tarmdeler fra mars, april, juni og august benyttet til dyrkning. Det ble dyrket opp 351 isolater som ble sendt til sekvensering. Tilfeldige isolater viste DNA innhold på fra ikke målbart til 16,3 ng/ μ l med Qubit. 311 av isolatene gav sekvenser fra sekvenseringen. Av disse ble 173 identifisert som hyfesopper og 138 identifisert som gjærsopper. Det var observert 126 forskjellige isolater fra tarm og miljøprøver hvor 63 av isolatene var funnet i tarm segmenter. Det ble isolert 18 forskjellige isolater fra tarmdelene i mars, 27 forskjellige i april, 23 forskjellige i juni og 15 forskjellige i august. 42 av isolatene var unike for tarmene og 21 var delt med miljøprøver i form av blomster, pollen, nektar og sukker.

Det ble oppdaget 35 forskjellige hyfesopp isolater fra tarmene (figur 3.8) hvor 15 av disse var *Penicillium* og 28 forskjellige gjærsopp isolater (figur 3.9) hvor 10 av disse var *Candida*. Her ble 74.6% av isolatene bestemt ned til art resten ned til slekt. Under dyrkning i juni og august var det observert mye gjærisolater fra *Metschikomia* slekten. Det ble oppdaget både plante og insekts patogene isolater. Full oversikt over hyfe og gjærsopper vises i vedlegg i figur E7 og E8.



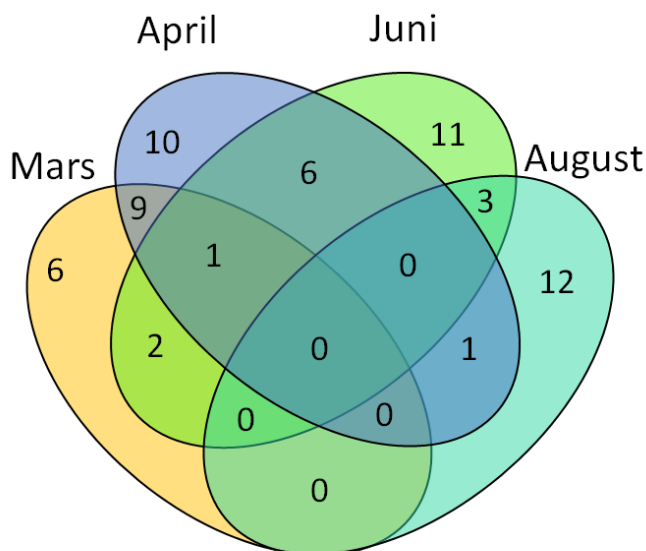
Figur 3.8: Sirkulært kladogram med bilder over hyfesopp isolater funnet i tarmdeler med dyrkingsavhengig metode.



Figur 3.9: Sirkulært kladogram med bilder over gjærsopp isolater funnet i tarmdeler med dyrkingsavhengig metode.

3.4.1 Sammenligning av isolater over sesong

For å undersøke hvor mye av isolatene som ble delt over mars, april, juni og august over alle tarmdelene sammenslått og separat ble venndiagrammer laget, vist i figur 3.10 og 3.11.

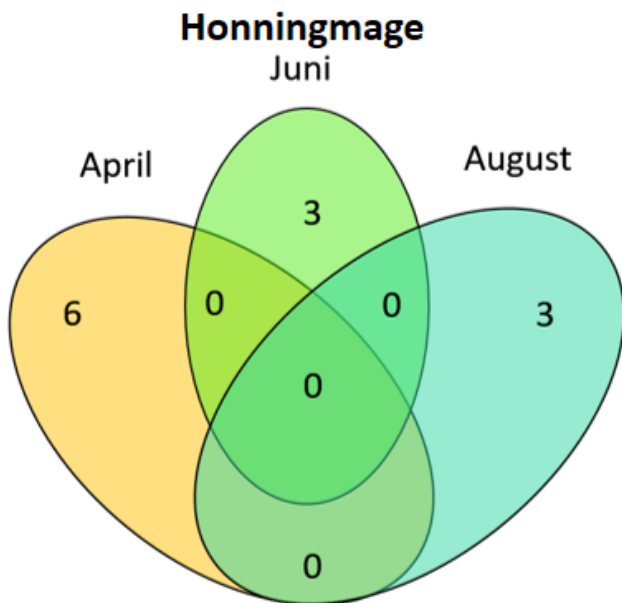


Total antall isolater: 63

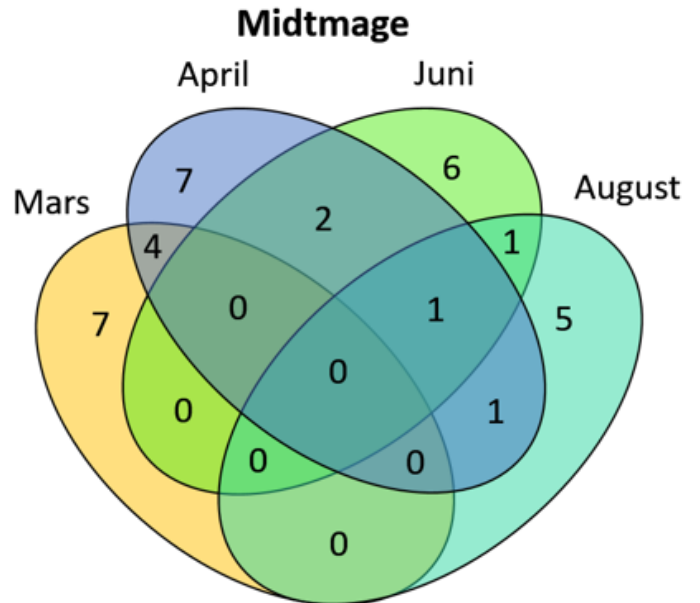
Figur 3.10: Viser sammenligning av isolater fra dyrkningsavhengig metode dyrket opp i mars, april, juni og august. Tarmdeler fra 2 kuber er sammenslått.

Det var ingen isolater delt over alle månedene, flest isolater var delt imellom nærliggende måneder. Hvor 9 isolater var delt mellom mars og april, 6 mellom april og juni og 3 mellom juni og august. 1 isolat var delt mellom april og august og det var ingen isolater delt mellom mars og august. 1 isolat delt imellom mars, april og juni.

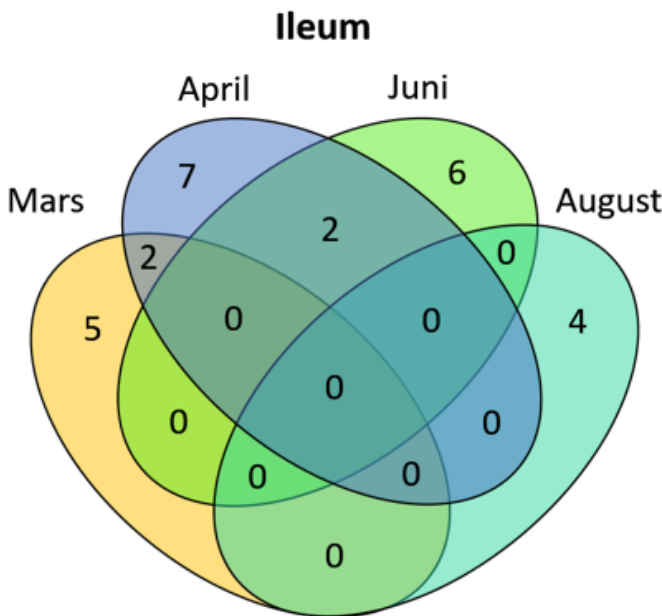
Ingen isolater var delt i honningmagen. I midtmagen var 4 isolater delt mellom mars og april, 2 isolater imellom april og juni, 1 isolat delt imellom juni og august, 1 isolat imellom april og august. 1 isolat ble delt imellom april, juni og august. I ileum var 2 isolater delt imellom mars og april, 2 isolater imellom april og juni, og ingen isolater delt med august. I rektum var 3 isolater delt imellom mars og april, 2 isolater imellom april og juni, 1 isolat imellom mars, april og juni og ingen isolater delt med august. Ingen av tarmdelene hadde isolater som var delt i tarmdeler igjennom sesongen. For en detaljert oversikt over soppisolater funnet i tarmdelene se vedlegg tabell E2 og for isolater funnet i miljøet se vedlegg tabell E3. Oversikt over hvor mange isolater som var delt med miljø vises i vedlegg figur E9 og detaljert i figur E10.



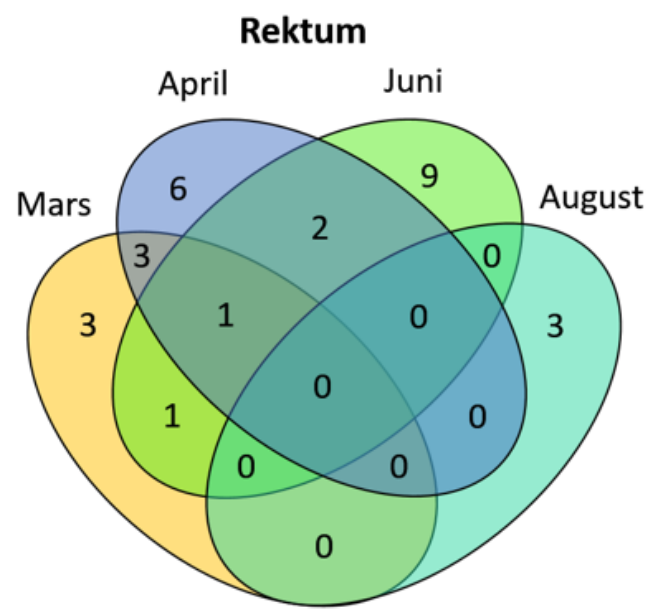
Total antall isolater: 12



Total antall isolater: 31



Total antall isolater: 26



Total antall isolater: 25

Figur 3.11: Sammenligner sopp isolater mellom de forskjellige tarmdelene over mars, april, juni og august. Tarmdeler fra 2 kuber er sammenslått.

3.5 Sammenligning av dyrkningsavhengige og uavhengige metode

Det ble funnet flere slekter med uavhengig metode enn ved avhengig metode. Men grunnet lave mengder sopp DNA ble det ikke mulig å sekvensere alle tarmdelene med dyrkningsuavhengig metode. Med dyrkningsavhengige metode var det mulig å dyrke opp isolater fra alle tarmdelene. Det ble observert totalt 132 forskjellige identifiserte soppleskter. Det var også noen OTUer som ikke lot seg bestemme ned til slekt. Av disse ble det observert 5 forskjellige klasser og 1 familie. Det ble observert 111 slekter, 5 klasser og 1 familie under dyrkningsuavhengig metode som ikke var observert under dyrknings avhengig. Det ble observert 12 slekter som ikke ble observert under dyrkningsuavhengig metode og det var delt 9 slekter delt mellom metodene. Full oversikt over observerte slekter vises i vedlegg tabell E4.

Sammenligning av sekvenser fra isolater fra dyrkningsavhengig metode med OTUer fra dyrkningsuavhengig metode med lokal BLAST ga 8 isolater som matchet med 9 OTUer. Hvor 8 av OTUene var identifisert likt som isolatene. Den siste OTUen kunne ikke bestemmes med BLAST eller UNITE og men kunne bestemmes ved å sammenligne sekvenser fra dyrkningsavhengig og uavhengig metode.

Oversikt over delte slekter er vist i tabell 3.2. Her ble det observert flest bestemte soppleskter i midtmagen med uavhengig metode i juni. Juni og april var månedene som inneholdt flest slekter. Rundt halvparten av observerte slekter under dyrkning var også observert under dyrkningsuavhengig metode. Oversikt over delte slekter og arter vises i tabell 3.3. Alle slektene observert under dyrking i ileum i april, rektum i mars og august var delt med uavhengig metode.

Tabell 3.3 viser hvilken identifiserte sopper som var delt. I honningmagen var kun *Penicillium* slekten delt i juni. Lite delt i august utenom i rektum hvor *Aspergillus* slekten, *Hanseniaspora* slekten med arten *H. uvarium*. Slekten *Candida* var mest delt, i midtmage, ileum og rektum i mars, april og juni.

Tabell 3.2: Oversikt over hvor mange forskjellige identifiserte sopp slekter som ble observert og delt under dyrkningsavhengig og uavhengig metoder. Områder merket med - hadde ingen prøver som ga sekvenser.

		Mars	April	Juni	August
Honingmage	Uavhengig	-	-	9	-
	Avhengig	-	3	3	2
	Delt	-	0	1	0
Midtmage	Uavhengig	11	49	101	-
	Avhengig	5	6	7	4
	Delt	2	5	5	0
Ileum	Uavhengig	13	38	60	2
	Avhengig	5	4	6	4
	Delt	3	4	4	0
Rektum	Uavhengig	21	60	46	30
	Avhengig	2	4	7	2
	Delt	2	3	3	2

Tabell 3.3: Viser hvilken identifiserte sopper som er delt imellom dyrkningsavhengig og uavhengig metode i forskjellige tarmdeler og tid.

	Mars	April	Juni	August
Honingmage			<i>Penicillium sp</i>	
Midtmage	<i>Aspergillus sp</i>	<i>Candida sp</i>	<i>Candida sp</i>	
	<i>Candida sp</i>	<i>Cladosporium sp</i>	<i>Meyerozyma sp</i>	
	<i>Meyerozyma sp</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Mucor sp</i>	
	<i>Candida apicola</i>	<i>Meyerozyma sp</i>	<i>Penicillium sp</i>	
	<i>Candida magnoliae</i>	<i>Candida apicola</i>	<i>Mucor hiemalis</i>	
		<i>Candida magnoliae</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>		
Ileum	<i>Candida sp</i>	<i>Candida sp</i>	<i>Aspergillus sp</i>	
	<i>Penicillium sp</i>	<i>Debaryomyces sp</i>	<i>Candida sp</i>	
	<i>Talaromyces sp</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Penicillium sp</i>	
	<i>Candida apicola</i>	<i>Candida magnoliae</i>	<i>Mucor sp</i>	
			<i>Aspergillus fumigatus</i>	
			<i>Candida magnoliae</i>	
			<i>Mucor hiemalis</i>	
Rektum	<i>Candida sp</i>	<i>Candida sp</i>	<i>Candida sp</i>	<i>Aspergillus sp</i>
	<i>Penicillium sp</i>	<i>Cladosporium sp</i>	<i>Mucor sp</i>	<i>Hanseniaspora sp</i>
	<i>Candida apicola</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
	<i>Candida magnoliae</i>	<i>Penicillium paneum</i>	<i>Mucor hiemalis</i>	
		<i>Candida magnoliae</i>		

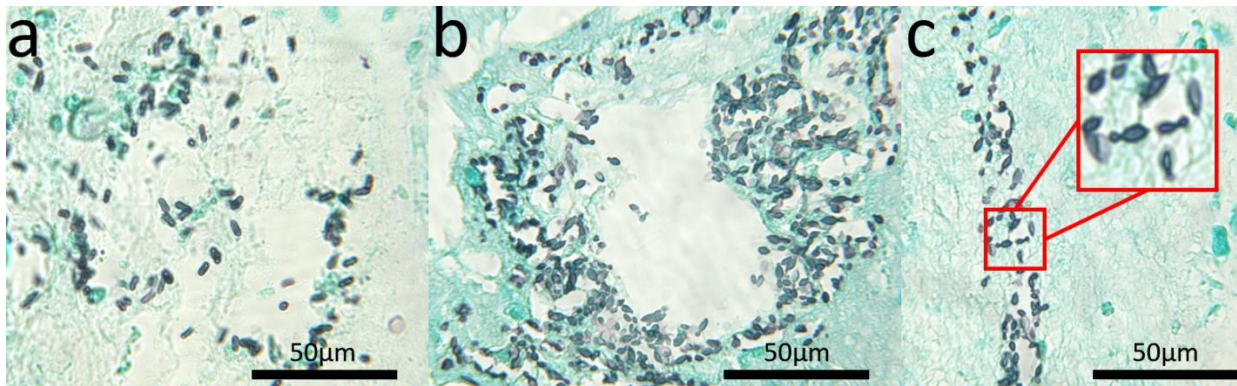
Tabell 3.4: Oversikt over soppsektet funnet i dyrkningsuavhengig og avhengige metode som er delt litteratur. U = Observert under uavhengig metode, A = Observert under avhengig metode og L = Kun observert i litteratur

Slekt	Observed
<i>Alternaria</i>	U, A
<i>Ascosphaera</i>	U
<i>Aspergillus</i>	U, A
<i>Aureobasidium</i>	U
<i>Candida</i>	U, A
<i>Cladosporium</i>	U, A
<i>Hanseniaspora</i>	U, A
<i>Metschnikowia</i>	A
<i>Nosema</i>	L
<i>Penicillium</i>	U, A
<i>Pichia</i>	A
<i>Saccharomyces</i>	U
<i>Saccharomyces</i>	U
<i>Schizosaccharomyces</i>	L
<i>Zygosaccharomyces</i>	U

Mesteparten av soppsektene funnet i bie tarm fra tidligere litteratur ble også observert i denne masteroppgaven vist i tabell 3.4. Det var kun *Nosema* og *Schizosaccharomyces* som ikke ble observert. *Alternaria*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Hanseniaspora* og *Penicillium* ble funnet med både dyrkningsuavhengig og avhengig metode men *Ascosphaera*, *Aureobasidium*, *Saccharomyces* og *Zygosaccharomyces* ble kun observert under uavhengig metode mens *Metschnikowia* og *Pichia* ble kun observert under avhengig metode.

3.6 Synlig sopp i tarm

Gjær celler ble observert i mars og august i tarmene med LM. Gjærceller i august var aktive i knoppsskyting vist i figur 3.12, mens ingen hyfevekst var observert i noen av tarmsnittene.



Figur 3.12: Lysmikroskop bilde tatt ved 400 ganger forstørrelse. a viser tarm fra mars mens b og c viser tarm fra august. Rød boks viser knoppsskyting.

Tarmer fra november ble undersøkt med SEM. Det ble ikke observert noe gjær eller hyfesopp, eksempel bilde vises i vedlegg figur F1.

3.7 Antibakteriell testing av sopp isolater

Det ble benyttet 2 isolater av *Metschnikowia pulcherrima* 2 og 1 isolat av *Hanseniaspora uvarum* 2 til antibakteriell testing imot tre bakterie isolater. Disse isolatene var *Escherichia coli* k-12, *Gilliamella apicola* strain G1 og G5 som ikke inneholder noen antibiotika resistens gener (upublisert data).

Tabell 3.5: Størrelse på hemming sone i mm dannet av *M. pulcherrima* under dyrket sammen med *G. apicola*

Gjær	<i>M. pulcherrima</i> G4	<i>M. pulcherrima</i> G5	<i>M. pulcherrima</i> G4	<i>M. pulcherrima</i> G5
Bakterie	<i>G. apicola</i> 1	<i>G. apicola</i> 1	<i>G. apicola</i> 5	<i>G. apicola</i> 5
Sone	3,25 ± 0,4	1,83 ± 0,7 ¹	2 ± 0	1 ± 0

¹ Dannet rød ring i hemmingssone



Figur 3.13: Bilde av hemningszone dannet av *M. pulcherrima* under antibakteriel testing mot *G. apicola*.

H. wvarum hemmet ingen av bakterie isolatene og ingen av gjær isolatene var i stand til å hemme veksten til *E. coli*. Begge isolatene av *M. pulcherrima* klarte å hemme vekst av begge isolatene av *G. apicola*. I den ene hemningssonen ble rødt pigment synlig. Som vist i tabell AB1 så hadde *M. pulcherrima* G4 større hemmende effekt enn *M. pulcherrima* G5. Bilde av hemningszone vises i Figur 3.13 og rødt pigment vises i figur 3.9.

4.0 Diskusjon

4.1 Sesong variasjon

Soppsamfunn i honningbietarm er et lite undersøkt felt og det er ingen studier som tar for seg hvordan soppsamfunnet forandrer seg over sesongen. Dette er første undersøkelsen som tar for seg sesongvariasjon av soppflora i honningbietarm. Hovedfunnet fra flere av forsøkene viser tydelig at det ble observert sesongvariasjon av soppflora i de forskjellige tarmdelene i honningbietarmen.

4.1.1 Mengde sopp i tarmdelene over sesongen

Det er tydelig å se at sesongen og den forandrende dietten er viktige faktorer som påvirker mengden sopp tilstede i de forskjellige tarmdelene i honningbietarmene. Det ble observert en variasjon av mengde sopp tilstede i tarmen over sesongen med qPCR (figur 3.1). Alle tarmdelene utenom honningmagens viste forskjeller igjennom sesongen. Det var ikke forventet å finne stor variasjon i mengder sopp tilstede i honningmagen siden det er hurtig tømning av honningmagen, og dette gir et kort opphold av mikroorganismer (Douglas 2015). Midtmagen er tarmdelen hvor det ble observert minst sopp igjennom sesongen, utenom i juli hvor den var tarmdelen som inneholdt mest sopp. I juli ble det observert mye av klassen *Dothideomycetes* som var dominert av slekten *Aureobasidium*.

Aureobasidium er en vanlig sopp i miljøet og er ofte assosiert med planter og nektar (de Vega & Herrera 2012). *Aureobasidium* har en optimal vekst temperatur på 25°C (Samson et al. 2010), dette medfører at *Aureobasidium* har en oppblomstring i juli. Dette kan forklare den store mengden observert i tarmene, siden honningbiene kan få med seg store mengder av *Aureobasidium* fra pollen og nektar. Siden pollen trenger et lengre oppholdt i midtmagen under fordøyelse (Davis 2004) kan dette forklare den store mengden sopp observert i juli. De større mengdene med sopp som er observert i rektum i mars og april kan skyldes at biene ikke har startet å trekke og dermed fått tømme tarmen. I denne perioden utvides rektum og holder på avfallsstoffer og rester etter fordøyelsen (Davis 2004). Dette medfører et høyere tarminnhold sammenlignet med resten av sesongen, noe som kan forklare det høyere innholdet av sopp. Mens den lavere mengden i rektum fra juni fram til august kan skyldes at biene trekker og regelmessig tømmer rektum (Davis 2004).

Det ble observert lavere mengden sopp i august og november (midtmagen, ileum og rektum) sammenlignet med starten på sesongen (figur 3.1). I august er det lavere tilgang på blomster som gir mindre tilgang på ny nektar og pollen. I denne perioden trekker biene i hovedsak på lyng og spiser honningdugg på planteoverflater (Ludvigsen et al. 2015). Pollenet spist under denne perioden er fint pakket i kuben for å hindre vekst av mikroorganismer (Seeley 1995). Men den lavere mengden i november kan skyldes at honningbiene var nylig matet med sterilt sukker. Etter at sukkeret har hatt kontakt med kuben ble det observert lave mengder sopp siden ingen av sukkerprøvene samlet inn inneholdt nok DNA til sekvensering. Grunnet dette var det ikke mulig å sammenligne innhold av observerte arter. Det

lave innholdet av sopp i tarmene kan forklare hvorfor det ikke ble observert noe sopp under SEM undersøkelsene som ble utført i november.

4.1.2 Diversitet av sopp i tarmdeler over sesongen

Det ble observert varierende alfa diversitet over sesongen (tabell 3.1). Mengden observerte arter følger samme mønsteret som Simpsons 1-D og Shannon indeks. Under tilfellet det var observert lav Simpsons 1-D og Shannon indeks ble det også observert større mengder av en eller flere OTUer (figur 3.7). Det høye innholdet av disse OTUene vil derfor påvirket Simpsons 1-D og Shannon indeksen negativt å gjøre den lavere.

Den lave diversiteten observert i mars skyldes at midtmagen var dominert av *Candida apicola*, det ble også observert høye innhold av *C. apicola* i ileum i mars. Det har blitt observert *C. apicola* flere ganger i bie tarm (Daniel et al. 2013; Gilliam 1997; Ptaszynska et al. 2016), men også blitt isolert fra blomster, pollen og nektar (Belisle et al. 2012; Daniel et al. 2013). Under dyrkningsavhengig metode ble *C. apicola* oppdaget i sukker fra kubene (vist i vedlegg tabell E3). Siden bier ikke trekker ut og spiser fra blomster i denne perioden kan det høye innholdet stamme fra sukkeret fra kubene.

Det ble også observert store mengder av *Meyerozyma guilliermondii* og *Talaromyces sp* i ileum i mars. Under dyrkning av pollen i juni ble *M. guilliermondii* observert, den er også observert i blomster og frukt (Vadkertiová et al. 2012). Mens *Talaromyces sp* er navnet på det aseksuelle stadiet av *Penicillium*, som er veldig vanlig i miljøet (Moore et al. 2011). Det ble observert *Penicillium* under dyrkning av sukker i mars. Det høye innholdet av *Talaromyces* kan stamme fra sporer fra *Penicillium* observert i sukker. Mens *M. guilliermondii* kan ha utnyttet sukker i tarmen, og vært i tarmen igjennom overvintringen. Men alle disse soppene kan også ha blitt overført ved oral mating imellom biene under overvintringen (Martinson et al. 2012; Powell et al. 2014).

Rektum i mars inneholdt større mengder av *Eremascus fertilis*, som har blitt isolert fra bikube materiale tidligere (Wynns 2015). Det høye innholdet kan skyldes bienes kontakt med kubene under overvintringen (Martinson et al. 2012; Powell et al. 2014). Det ble observert lav diversitet i honningmagen i juni samme med honningmagen, midtmagen og ileum i Juli hvor tarmdelene ble dominert av *Aureobasidium*. *Aureobasidium* er vanlig i miljøet og har blitt funnet i nektar (de Vega & Herrera 2012), og ble også observert under dyrkningsavhengig metode i pollen og nektar i april og fra blomster i april og juni (vist i vedlegg tabell E3). Det ble observert lav diversitet i ileum i august og november sammen med rektum i august. Denne perioden dominerte *Hanseniaspora uvarum* som tidligere er observert i nektar (Belisle et al. 2012) og i tarmene til nektar spisende sommerfugler (Ravenscraft et al. 2017). Det høye innholdet av *Aureobasidium* og *H. uvarum* kan ha kommet med nektar og pollen som biene har spist under trekking i

denne perioden. Siden det kun var 1 ileum i august og 1 honningmage i juni som inneholdt nok DNA til sekvensering er det vanskelig å få en god forståelse av disse tarmdelene.

Den lave diversiteten i honningmagen og rektum i november skyldes at høyt innhold av *Malassezia restricta*. Som det også ble observert høyt innhold av i midtmagen i november. *Malassezia restricta* er assosiert med hud hos mennesker og dyr, hvor den forårsaker flass (Gemmer et al. 2002). Det ble også funnet større mengder av slekten *Malasseziales* i honningmagen og rektum i november. Denne soppfamilien er også assosiert med hudsykdommer hos mennesker og dyr (Guého et al. 1996). I november var det kun 1 prøve per tarmdel som inneholdt nok DNA til sekvensering, samtidig som disse 4 tarmdelene kom fra 4 forskjellige individer. Dette lave antallet prøver gjør det vanskelig å si noe nøyaktig om tarmsammensetningen i november. Siden det høye innholdet av sopp i honningmagen, midtmagen og rektum er assosiert med hudpatogene kan dette skyldes forurensing i prøvene. Det høye innholdet er også observert hos 3 forskjellige individer. Det ble ikke funnet noe litteratur som snakket om disse soppene i miljøet, kun assosiert med mennesker og dyr. Biene var ikke i direkte kontakt med mennesker i denne perioden. Det var også observert lave mengder sopp DNA i november (figur 3.1). Dette vil gjøre at små mengder av forurensinger vil gjøre et større utslag i hva som blir observert.

I periodene hvor biene er innfôret i kuben er det en lavere alfa diversitet. I perioden honningbiene starter å trekke ut av kuben blir alfa diversitet høyere, spesielt antall observerte arter. Siden undersøkelser med dyrkningsavhengig metode ikke var kvantitative kunne det ikke beregnes Simpsons 1-D og Shannon indeks. Det ble kun undersøkt hvilke sopper som var tilstede i tarmen. Antall sopper observert i tarmen viser samme mønster som antall observerte arter fra alfa diverse beregninger fra dyrkningsuavhengig metode.

Når biene trekker ut har de tilgang til forskjellige blomster i miljøet som gir en mer variabel tilgang på mikroorganismer (Moore et al. 2011). Dette viser at miljø er en viktig faktor i å påvirke alfa-diversitet. Det ble også generelt oppdaget høyere alfa-diversitet i midtmagen og rektum. Dette kan forklares med at det er disse tarmdelene hvor mat og matrester oppholdes over lengre tid. Både til fordøyelse og oppbevaring før tømning av tarm (Davis 2004; Winston 1991).

Sesongvariasjonen vises også i betadiversiteten hvor diversiteten i nærliggende måneder samlet seg (figur 3.2). Dette kan forklares med at mars/april, juni/juli og august/november har en lik sammensetning av OTUer (figur 3.7). Det ble observert det samme mønsteret under dyrkningsavhengige metode hvor det var nærliggende måneder som delte flest isolater (figur 3.10 og figur 3.11). Siden tarmdelene samlet seg forskjellig ut fra de forskjellige månedene indikerer dette at sammensetningen er påvirket av sesongen.

4.2 Sopp i honningbietarm

Det ble observert mange forskjellige soppsekter igjennom sesongen i honningbietarmen (Vedlegg Tabell E4). Mange av disse har ikke tidligere blitt funnet i honningbietarm. Det er få studier som tar for seg soppens rolle i tarmsystemet til honningbien, med unntak av sopper som er patogene for honningbier (Foley, Kirsten et al. 2014; Fries et al. 2006). Flere av de observerte slektene kan ha viktige roller i honningbietarmen og i miljøet.

4.2.1 Gjærsoppene

Soppsekter tilknyttet gjærsopper var observert under dyrkningsavhengige og uavhengige metode igjennom hele sesongen. Ingen gjærsopper ble observert med SEM i november men det ble observert gjærceller med LM i mars og August. Det ble observert at gjærcellene var aktive under vekst i form av knoppsskyting i August. Dette er en prosess som krever tilgang på O_2 (Deacon 2006; Moore et al. 2011). Dette kan indikere at gjærceller observert i LM i mars har vært etablert i tarmen en stund. Gjærcellene observert i mars kan også stamme fra kubemateriale eller sukker. Men grunnet lavere temperatur i kubene i denne perioden (Seeley 1995) vil gjærceller tilstede ikke kunne være i aktiv vekst (Deacon 2006; Moore et al. 2011). Siden gjærcellene observert i tarmene i August med LM var under aktiv vekst tyder dette på at dem var ferskt konsumert og ikke hatt et lengre opphold i tarmene. Gjær trenger tilgang på O_2 for å være i aktiv vekst og siden mesteparten av honningbietarmen er anoksisk (Zheng et al. 2017) indikerer dette at dem er ferskt konsumert. Honningbiene i denne perioden var fortsatt aktive med å trekke ut. Dette indikerer at disse gjærsoppene stamme fra miljøet hvor dem var aktiv i vekst.

Det var observert isolater av gjærsopp som hadde antibakteriell effekt mot bakterier som er en del av kjerne bakterie floraen hos honningbier. Dette kan indikere på at bakterie vekst i tarmen kan bli hemmet av sopp tilstede i tarmene. Isolatene av *Metschnikowia pulcherrima* som hemmet bakteriell vekst var isolert fra midtmage i juni og august sammen med andre isolater i slekten *Metschnikowia*. Det er kjent at *M. pulcherrima* produserer et rødt pigment med navnet pulcherrimininsyre (Kluyver et al. 1953) som har en antimikrobiell effekt ved å bruke opp tilgjengelig jern for andre mikroorganismer (Sipiczki 2006). Det er observert en lavere mengde bakterier i midtmagen i juni, juli og august (Ludvigsen et al. 2015). Denne lave bakteriemengden kan skyldes den antibakterielle effekten som er observert av *M. pulcherrima* tilstede i tarmen under denne perioden.

4.2.2 Hyfesopp

Det ble observert flere soppsekter tilknyttet hyfesopp under dyrkningsavhengige og uavhengige metode, men ingen ble observert med mikroskopering (LM og SEM). Det var ikke forventet å finne noen hyfesopp vekst i tarm siden honningbiene var hentet fra friske kuber hvor det ikke har blitt observert patogene sopper. Siden det ikke ble observert noen hyfesopper under mikroskoperinger tyder dette på at hyfesoppene observert under dyrkningsuavhengige og avhengige metode kommer fra hyferester og sporer i tarmen. Sporer trenger tilgang på O₂ for å spire (Madan & Thind 1998; Tacon et al. 1983) mens mesteparten av honningbietarmen er anoksisk (Zheng et al. 2017). Dette medfører at sporene tilstede i tarmen vil være i dvale. Samtidig er de fleste sopper er mesofile og svært få er i stand til å vokse ved temperaturer på 37°C eller høyere, mange sliter med å vokse ved temperaturer på over 30°C (Deacon 2006). Det ble observert under dyrkning at få hyfe isolater var i stand til å vokse ved 35°C, noe som indikerer at mye av hyfesoppene ikke var i stand til å vokse i honningbietarmene.

Flere av hyfesoppene observert fra dyrkningsavhengige og uavhengige metode er tilknyttet plante patogene. Disse soppene finnes normalt i miljøet og bier blir utsatt for disse og frakter dem videre ufrivillig. Det er kjent at bier sprer mikroorganismer i miljøet hvor nektarier hos blomster får overført mikroorganismer via avføringen til bier (McFrederick et al. 2017). Sporer tilstede i bieavføring kan ha en fordel under spiring siden bieavføring inneholder mye næringsstoffer (Seeley 1995). Dette indikerer at bier er med på å spre plantepatogene sopper og andre mikroorganismer rundt i miljøet.

4.2.3 Kjerne soppflora i honningbietarm

Det er kjent at honningbier har en bakteriell kjerneflora som er etablert i hele tarmen utenom honningmagen. Denne kjernefloraen tilsvarer 95% av bakteriene tilstede i tarmen (Sabree et al. 2012). Det er kjent fra studier at kjernefloraen har mange viktige roller tilknyttet nedbryting av mat og beskyttelse imot patogene (Douglas 2015; Gündüz & Douglas 2009; Rokop et al. 2015). Ingen har tidligere beskrevet en kjerne soppflora i tarmen hos honningbien. Det ble observert lavere mengder sopp tilstede i tarmdelene sammenlignet med observert bakterier (Ludvigsen et al. 2015). Dette viser at sopp er mindre etablert i tarmene til honningbier sammenlignet med bakterier. Samtidig ble det ikke observert noen sopp arter eller sekter som dominerte igjennom hele sesongen fra dyrkningsuavhengige metode. Samtidig som det ikke ble observert noen isolater igjennom hele sesongen med dyrkningsavhengige metode. Om det er en kjerne soppflora i honningbietarm utgjør den ikke like mye av sammensetningen som bakteriefloraen.

Det var observert mest *Ascomycota* (figur 3.4) igjennom sesongen av disse var det mest *Saccharomycetes* (gjærsopper) tilstede i tarmdelene (figur 3.6) utenom i sommer parten (juni og juli) hvor det var større deler av *Dothideomycetes* (hyfesopper). Det ble observert både gjærsopper (*C. apicola*, *C. magnoliae*, *Meyerozyma guilliermondii*, *M. restricta* og *Debaryomyces sp*) og hyfesopper (*Cladosporium sp*, *Penicillium sp* og

Torrubiella sp) som var tilstede i større og mindre mengder igjennom hele sesongen (utenom i november) i de forskjellige tarmdelene. Det ble ikke observert noen OTUer som kun var tilstede i 1 tarmdel, men fordelt over flere tarmdeler. Siden det var kun 1 av hver tarmdel i november som lot seg sekvensere, er det vanskelig å si noe om sammensetningen i november. Det var kun *M. restricta* som ble observert i alle tarmdelene igjennom hele sesongen. *M. restricta* er ikke kjent i tarmsystemet hos insekter, utenom noen få billearter som lever av trevirke og kjukesopper (Zhang et al. 2003).

Av sopper observert i honningbietarmen vil gjærsoppene være soppene som kan utføre mest nytte i tarmsystemet. De er tilpasset flytende medier og de fleste tåler høye sukkerkonsentrasjoner (Deacon 2006; Moore et al. 2011), slik som tarminnholdet til honningbien. De produserer essensielle aminosyrer, vitaminer og steroler samtidig som de produserer en rekke enzymer som kan resirkulere nitrogen fra avfallsstoffene til insekter (Bonner 1966). Det er observert blant nektarispisende sommerfugler at de har en viktig rolle ved å danne aminosyrer (Ravenscraft et al. 2017). Noen av gjærsoppene observert kan ha viktige roller i tarmsystemet og potensielt være del av en kjerne soppflora i honningbietarmen. Alle gjærsoppene observert tilstede igjennom hele sesongen tåler høye mengder sukker (Khatab & Kodaki 2016; Samson et al. 2010; Sharma et al. 2005). Dette gjør at de er i stand til å tåle og kunne utnytte de høye mengdene sukkeret i tarmen. Både *C. apicola* og *C. magnoliae* er brukt til fermentering innen bioteknologi (Samson et al. 2010). Hvor *M. guilliermondii* og arter innen *Debaryomyces sp* produserer større mengder vitamin B2 (Riboflavin) (Batra et al. 1973; Gündüz & Douglas 2009). Det må gjøres videre undersøkelser for å kunne si noe om disse soppene er en del av potensiell sopp kjerneflora og om de har noen effekt i tarm.

4.3 Metode vurdering

Det ble gjort flere optimaliseringer underveis i masteroppgaven. For å ikke tynne ut prøvene av honningmage og ileum ble lavere mengder S.T.A.R Buffer benyttet til honningmage og ileum sammenlignet med midtmagen og rektum siden disse tarmdelene har større volum.

Det ble funnet primer kombinasjoner til sekvensering som ikke amplifiserte bie DNA fra prøvene samtidig som de ikke skulle utelukket noen isolater fra dyrkingen. Samme kriteriet ble lagt til primere som ble benyttet til qPCR for å kvantifisere mengde sopp tilstede i tarmene. Kvantifisering av sopp DNA kan bli påvirket av at BITS primer som ble benyttet også kan amplifisere plante DNA (Bokulich & Mills 2013). Men ut fra sekvenseringsdataen var det observert en liten andel av sekvensene som hadde opprinnelse fra planter. Dette tyder på at kvantifiseringen av sopp med qPCR ikke ble sterkt påvirket.

Litteratursøk om temaet i masteroppgaven var utfordrerne. Under lesing av litteratur ble det observert flere artikler som kom med påstander hvor referanse artikkelen ikke inneholdt påstandene nevnt.

4.3.1 Sekvensering av sopp

Med bruk av dyrkningsuavhengig metode var det mulig å observere flere soppsekter i honningbietarm enn hva som var observert tidligere i litteratur. Det ble observert flere forskjellige soppsekter under dyrkningsuavhengig metode enn ved avhengig metode. Men det ble også oppdaget noen sekter under dyrkningsavhengig metode som ikke ble observert under dyrkningsuavhengig metode. Dette mønsteret er også observert i undersøkelser av soppflora i mennesketarm (Huseyin et al. 2017). Dette viser at bruket av både dyrkningsavhengig og uavhengige metoder gjør det mulig å observere flere soppsekter enn kun bruk av en metode.

Noen av slektene observert under dyrkningsuavhengig og avhengig metode ble observert i større grad under dyrkningsuavhengig metode. Den større mengden vil gjøre det lettere å observere disse under dyrkning. Under dyrkningsuavhengig metode ble slekten *Aureobasidium* observert i større mengder i juni og juli i tarmdelene. Under dyrkningsavhengig metode ble *Aureobasidium* ikke observert blant tarmdelene men kun observert blant miljøprøver i april og juni (Vedlegg tabell E3). Under dyrkning av *Aureobasidium* ble det observert at de vokste tregere sammenlignet med de andre sopper tilstede. Dette gjorde det vanskelig å isolere *Aureobasidium* under dyrkning. Det er vanlig at sopper som vokser raskt kan gro over og hemme andre soppers vekst (Huseyin et al. 2017). Den trege veksten til *Aureobasidium* kan forklare hvorfor de ikke ble observert under dyrkningsavhengig metode, med under dyrkningsuavhengige metode. Samtidig ble *Eremascus fertilis* observert under dyrknings uavhengig metode, dette er en sopp som ikke har blitt observert mange ganger tidligere (Wynns 2015). Dette viser dyrkningsuavhengig metodes evne til å observere sopper som ikke er like lett og få dyrket opp samtidig som det kan observeres sjeldne arter.

Det ble observert sekter under dyrknings avhengigmetode som ikke ble observert under dyrkningsuavhengig metode. Primere benyttet under dyrkningsuavhengige metode var testet mot alle isolatene fra dyrkningsavhengig metode. Under denne testen ble DNA fra alle isolatene fra dyrkningsavhengig metode amplifisert. Dette viser at primere benyttet under dyrkningsuavhengig metode skulle også kunne gjøre det mulig sekvensere disse soppene. Sekvensene til isolatene fra dyrkningsavhengigmetode ble sammenlignet med sekvensene fra dyrkningsuavhengig metode med lokal BLAST. Ingen av isolatene som kun ble observert under dyrkningsavhengig metode delte sekvenslikhet med OTUene. I litteratur har 2 av de observerte slektene (*Metschnikowia* og *Pichia*) fra dyrkningen blitt observert flere ganger i honningbie tarm (Batra et al. 1973; Borsuk et al. 2013; Gilliam 1997; Good et al. 2014). Dette indikerer at disse ikke skyldes forurensning under dyrkningen. Grunnen til at disse slektene ikke ble observert kan skyldes for lite DNA ekstrahert tarmdelene. Dette indikerer at disse slektene er tilstede i små mengder. Som beskrevet i punkt 4.2.1 har *Metschnikowia* en antimikrobiell effekt. Noe som gir de en fordel under dyrkning, som igjen kan forklare de større mengdene observert. Dette medfører at dem lettere kan bli observert under dyrkning selv om det er lite tilstede i tarmene.

Bruk av sekvensering til sopp identifikasjon har sine svakheter. Motsetning til bakteriell 16S sekvenser så er ikke ITS databasene like vel etablerte. Mange av sekvensene er ufullstendige eller har ukorrekte taksonomiske beskrivelse. Det er estimert at rundt 20% av sopp sekvensene i International Nucleotide Sequence Databasen har feil på artsnivå (Nilsson et al. 2006). Dette vises i et eksempel hvor et av soppisolatene fra masteroppgaven ble identifisert som barkbille i beste sammenligning av sekvens i BLAST. Et av de større svakhetene med identifisering av mange av sekvensene er at databasene inneholder gamle synonymer etter tidligere navnsetningsregler. Dette medfører at like sopparter blir identifisert som forskjellige arter eller slekter. Dette medfører mye ekstra arbeid for å bestemme taksonomisk navn.

Det er vanskeligere å få taksonomiske beskrivelse kun med bruk av ITS1 sekvensering sammenlignet med hel ITS sekvensering. Dette reflekteres i at rundt 1/3 av undersøkte OTUer fra dyrkningsuavhengig metode ikke kunne bestemmes. Disse OTUer var tilknyttet ukultiverte sopp isolater, sekvenser som ikke har noe sekvens likhet med databasene eller fikk flere ulike taksonomiske navn som ikke hadde noe felleskap. Sekvensene som ikke hadde noe likhet med databasene kan skyldes at primere benyttet også amplifisere noen mengder plante DNA og ikke kun sopp DNA.

Av bestemte OTUer ble nesten alle bestemt ned til slekts nivå, men færre bestemt ned til artsnivå sammenlignet med dyrkningsavhengig metode. Dyrkningsavhengig er lettere å få bestemt ned til artsnivå siden det blir sekvensert større regioner som hele ITS regionen. Dette gir en bedre oppløselighet til bestemmelse sammenlignet med ITS1 regionen.

4.4 Endringer/optimalisering og videre arbeid

Det gjenstår å gjøre mer statistikk for å finne signifikante forskjeller blant diversitetsforskjellene over sesongen. Det bør benyttes non parametriske tester, grunnet stor variasjon i antall prøver tilgjengelig. Ved videre arbeid er det også en mulighet å samle inn flere tarmer som kan gi et økt antall prøver som gjør det lettere og utføre analyser samtidig som det vil gi en økt mengde prøver med sopp.

Siden det er observert så stor sesongvariasjon på soppfloraen, vil undersøkelser fra flere måneder og igjennom overvintring kunne gi en bedre indikasjon på sesongvariasjonen. Dette vil gi bedre innblikk over hvor lenge noen av soppene er observert i tarmen. Dette vil også kunne gi en bedre indikasjon på om det er en kjernesoppflora tilstede i tarmen.

For å gi en mer nøyaktig taksonomiske beskrivelse av isolater kan forskjellige proteinkodende gener sekvenseres. Dette vil gi en enda bedre oppløselighet til bestemmelse av isolater. Flere av isolatene fra dyrkingen ble kun bestemt ned til slektsnivå, hvor noen av dem hadde delte en lav identitet med målsekvensen fra databasen (Vedlegg figur E7 og E8). Dette vil gi en bedre beskrivelse av isolatene.

For å få et kvantitativt mål på dyrkningen av sopper over sesongen kan fortyndinger før utstrykning benyttes. Dette sammen med bruk av flere forskjellige medier og temperatur kan også gi flere isolater. Dette vil gi større isolat samling som kan benyttes til flere undersøkelser videre av isolatenes egenskaper på tarmsystemet. For å få en bedre forståelse over soppens antibakterielle effekt i tarmsystemet trengs det å utføre tester med flere soppisolater imot flere bakterieisolater som har opprinnelse fra tarm. Disse forsøkene burde også bli utført i flytende medier. Samtidig vil undersøkelser av kubemateriale kunne hjelpe med å gi en bedre forståelse over hvor soppen observert i tarmene stammer fra.

Grunnet lave mengder sopp tilstede i bie tarm kan det oppnås bedre resultater under sekvensering med videre optimalisering av lysering og DNA ekstraksjons prosessene. Grunnet lave mengder DNA var det flere av tarmprøvene som ikke kunne sekvenseres. Ved å optimalisere DNA lysering og ekstraksjon metoder vil det være mulig å få sekvensert flere tarmdeler. Siden soppers cellevegger er vanskelige å lysere påvirker dette kvaliteten og mengden DNA man kan få ut av sopp prøver (Deacon 2006; Moore et al. 2011). Det ble observert en rekke forskjellige lyseringsmetoder benyttet til studier av sopp under lesing av litteratur. DNA lyserings matrix benyttet under masteroppgaven er basert på matrixer fra litteratur. Forsøkene i litteraturen tok for seg dyrkningsuavhengig sekvensering av sopper i tarm og miljøprøver.

Det er mulighet for at andre lyseringsforhold kan oppnå bedre resultater. Det kan bli benyttet andre forhold under lyseringen med FastPrep. Det kan benyttes flere sykler samtidig som disse har lengere eller kortere lyseringstid. Men det kan også benyttes andre lyserings teknikker som flytende nitrogen og knuse prøvene i morter. Det kan benyttes mer sopp spesifikke enzymer under enzymatisk lysering. En annen viktig faktor som kunne gitt ut mer DNA var å benytte høyere volum av lysat under selve DNA ekstraksjonsprosessen.

4.5 Konklusjon

Hovedmålet med oppgaven var å undersøke om sesong påvirker soppflorasammensetning i de forskjellige tarmdelene i honningbietarm. Det ble observert signifikante forskjeller i mengde sopp tilstede i alle tarmdelene utenom honningmagen med qPCR. Det ble også observert forskjeller i sammensetning og diversiteten av soppfloraen over sesongen under dyrkningsuavhengig metode. Under dyrkningsavhengig metode ble det ikke observert sopper som var delt over hele sesongen, kun nærliggende måneder som delte isolater. Det ble observert at forandring av miljø og diet er viktige faktorer som påvirker variasjonen. Dyrkningsuavhengig metoder har godt potensiale til å undersøke tarmflorasammensetning, men krever optimalisering av metoder tilknyttet DNA ekstraksjon grunnet lave mengder sopp i tarmene. Men ved å bruke både dyrkningsuavhengig og avhengig metode er det mulig og observer flere sopparter og slekter noe som gir en bedre forståelse av soppflorasammensetningen i honningbietarmene.

Referanser:

- Aizen, M. A. & Harder, L. D. (2009). The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current biology*, 19 (11): 915-918.
- Alberoni, D., Gaggia, F., Baffoni, L. & Di Gioia, D. (2016). Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Applied microbiology and biotechnology*, 100 (22): 9469-9482.
- Aleklett, K., Hart, M. & Shade, A. (2014). The microbial ecology of flowers: an emerging frontier in phyllosphere research. *Botany*, 92 (4): 253-266.
- Amdam, G. V., Simões, Z. L., Hagen, A., Norberg, K., Schrøder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T. B. & Omholt, S. W. (2004). Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental gerontology*, 39 (5): 767-773.
- Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., Walton, A., Jones, B. M. & Corby-Harris, V. (2013). Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 8 (12): e83125.
- Archer, C. R., Pirk, C. W., Wright, G. A. & Nicolson, S. W. (2014). Nutrition affects survival in African honeybees exposed to interacting stressors. *Functional ecology*, 28 (4): 913-923.
- Artsdatabasen. (2017). *Artsdatabasen*. Tilgjengelig fra: <http://www.artsdatabanken.no> (lest 07.04.17).
- Baker, M. (2012). Digital PCR hits its stride. *nature methods*, 9 (6): 541.
- Bastida, F., Hernández, T., Albaladejo, J. & García, C. (2013). Phylogenetic and functional changes in the microbial community of long-term restored soils under semiarid climate. *Soil Biology and Biochemistry*, 65: 12-21.
- Batra, L., Batra, S. & Bohart, G. (1973). The mycoflora of domesticated and wild bees (Apoidea). *Mycopathologia et Mycologia applicata*, 49 (1): 13-44.
- Bazzicalupo, A. L., Bálint, M. & Schmitt, I. (2013). Comparison of ITS1 and ITS2 rDNA in 454 sequencing of hyperdiverse fungal communities. *Fungal Ecology*, 6 (1): 102-109.
- The Bee Place*. (2017). Tilgjengelig fra: <http://www.thebeeplace.com> (lest 03.05.2017).
- Belisle, M., Peay, K. G. & Fukami, T. (2012). Flowers as islands: spatial distribution of nectar-inhabiting microfungi among plants of *Mimulus aurantiacus*, a hummingbird-pollinated shrub. *Microbial Ecology*, 63 (4): 711-718.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P. & Kausrud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC microbiology*, 10 (1): 1.
- Birøkterlag, N. (2017). *Norges Birøkterlag*. Tilgjengelig fra: <http://www.norges-birokterlag.no> (lest 20.04.2017).
- Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Kirk, P. & Kausrud, H. (2013). ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, 13 (2): 218-224.
- BLAST.
- BLAST. (2017). *Basic Local Alignment Search Tool*. Tilgjengelig fra: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (lest 14.08.17).
- Bokulich, N. A. & Mills, D. A. (2013). Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities. *Applied and environmental microbiology*, 79 (8): 2519-2526.
- Bonner, J. (1966). *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*: SIGMA XI-SCI RES SOC PO BOX 13975, RES TRIANGLE PK, NC 27709.
- Borsuk, G., Ptaszynska, A. A., Olszewski, K. & Paleolog, J. (2013). Impact of nosemosis on the intestinal yeast flora of honey bees. *Medycyna Weterynaryjna*, 69 (12): 726-729.
- Brodtschneider, R. & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41 (3): 278-294.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A. & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *science*, 307 (5717): 1915-1920.
- Chandler, D. E. & Roberson, R. W. (2009). *Bioimaging: Current Concepts In Light & Electron Microscopy*: Jones & Bartlett Publishers.

- Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L. & Neumann, P. (2012). Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS one*, 7 (2): e32151.
- Daniel, H. M., Rosa, C. A., Thiago-Calaca, P. S. S., Antonini, Y., Bastos, E., Evrard, P., Huret, S., Fidalgo-Jimenez, A. & Lachance, M. A. (2013). *Starmerella neotropicalis* f. a., sp nov., a yeast species found in bees and pollen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 3896-3903.
- Davis, C. (2004). *The honey bee inside out*: Bee Craft Limited.
- de Vega, C. & Herrera, C. M. (2012). Relationships among nectar-dwelling yeasts, flowers and ants: patterns and incidence on nectar traits. *Oikos*, 121 (11): 1878-1888.
- Deacon, J. W. (2006). *Fungal biology, 4th Edition*: Blackwell publishing.
- Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual review of entomology*, 60: 17-34.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32 (5): 1792-1797.
- Engel, P., Martinson, V. G. & Moran, N. A. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (27): 11002-11007.
- Espy, M., Uhl, J., Sloan, L., Buckwalter, S., Jones, M., Vetter, E., Yao, J., Wengenack, N., Rosenblatt, J. & Cockerill, F. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical microbiology reviews*, 19 (1): 165-256.
- Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. & Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50 (3): 1351-1371.
- Foley, K., Fazio, G., Jensen, A. B. & Hughes, W. O. (2014). The distribution of *Aspergillus* spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. *Veterinary microbiology*, 169 (3): 203-210.
- Foley, K., Fazio, G., Jensen, A. B. & Hughes, W. O. H. (2014). The distribution of *Aspergillus* spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. *Veterinary Microbiology*, 169 (3-4): 203-210.
- Fries, I., Martin, R., Meana, A., Garcia-Palencia, P. & Higes, M. (2006). Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 45 (4): 230-233.
- Frisvad, J. C. & Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in mycology*, 49 (1): C174.
- Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J. & Vaissière, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological economics*, 68 (3): 810-821.
- Gardes, M. & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2 (2): 113-118.
- Gemmer, C. M., DeAngelis, Y. M., Theelen, B., Boekhout, T. & Dawson Jr, T. L. (2002). Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. *Journal of clinical microbiology*, 40 (9): 3350-3357.
- Gilliam, M. & Prest, D. B. (1972). Fungi isolated from the intestinal contents of foraging worker honey bees, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 20 (1): 101-103.
- Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS microbiology letters*, 155 (1): 1-10.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. & Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25 (4): 386-401.
- Good, A. P., Gauthier, M. P. L., Vannette, R. L. & Fukami, T. (2014). Honey Bees Avoid Nectar Colonized by Three Bacterial Species, But Not by a Yeast Species, Isolated from the Bee Gut. *Plos One*, 9 (1): 8.
- Griffith, G., Ozkose, E., Theodorou, M. & Davies, D. (2009). Diversity of anaerobic fungal populations in cattle revealed by selective enrichment culture using different carbon sources. *Fungal Ecology*, 2 (2): 87-97.

- Guého, E., Midgley, G. & Guillot, J. (1996). The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69 (4): 337-355.
- Gündüz, E. A. & Douglas, A. (2009). Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276 (1658): 987-991.
- Hamad, I., Sokhna, C., Raoult, D. & Bittar, F. (2012). Molecular detection of eukaryotes in a single human stool sample from Senegal. *PloS one*, 7 (7): e40888.
- Hatoum, R., Labrie, S. & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in microbiology*, 3.
- Heil, M. (2011). Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in plant science*, 16 (4): 191-200.
- Herrera, C. M., de Vega, C., Canto, A. & Pozo, M. I. (2009). Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of botany*, 103 (9): 1415-1423.
- Heydenreich, B., Bellinghausen, I., König, B., Becker, W. M., Grabbe, S., Petersen, A. & Saloga, J. (2012). Gram-positive bacteria on grass pollen exhibit adjuvant activity inducing inflammatory T cell responses. *Clinical & Experimental Allergy*, 42 (1): 76-84.
- Huseyin, C. E., O'Toole, P. W., Cotter, P. D. & Scanlan, P. D. (2017). Forgotten fungi—the gut mycobiome in human health and disease. *FEMS Microbiology Reviews*: fuw047.
- Ihrmark, K., Bödeker, I., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M. & Clemmensen, K. E. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS microbiology ecology*, 82 (3): 666-677.
- Illumina, i. (2011). *Quality Scores for Next-Generation Sequencing*. Tilgjengelig fra: http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf (lest 01.05.2017).
- Illumina, I. (2015). *Diagnosing and Preventing Flow Cell Overclustering on the MiSeq® System*. Tilgjengelig fra: <https://support.illumina.com/content/dam/illumina/marketing/documents/products/other/miseq-overclustering-primer-770-2014-038.pdf> (lest 01.05.2017).
- Khattab, S. M. R. & Kodaki, T. (2016). A novel production method for high-fructose glucose syrup from sucrose-containing biomass by a newly isolated strain of osmotolerant *Meyerozyma guilliermondii*.
- Klatt, B. K., Holzschuh, A., Westphal, C., Clough, Y., Smit, I., Pawelzik, E. & Tscharrntke, T. (2014). *Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value*. Proc. R. Soc. B: The Royal Society. 20132440 s.
- Klein, A.-M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C. & Tscharrntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274 (1608): 303-313.
- Kluyver, A., Van der Walt, J. & Van Triet, A. (1953). Pulcherrimin, the pigment of *Candida pulcherrima*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 39 (7): 583-593.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B. & Strömbom, L. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27 (2): 95-125.
- Kwong, W. K. & Moran, N. A. (2013). Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family Neisseriaceae of the Betaproteobacteria, and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of Orbaceae fam. nov., Orbales ord. nov., a sister taxon to the order 'Enterobacteriales' of the Gammaproteobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63 (6): 2008-2018.
- Lee, H., Gurtowski, J., Yoo, S., Nattestad, M., Marcus, S., Goodwin, S., McCombie, W. R. & Schatz, M. (2016). Third-generation sequencing and the future of genomics. *BioRxiv*: 048603.
- Lindahl, B. D., Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Carlsen, T., Kjøller, R., Kõljalg, U., Pennanen, T., Rosendahl, S. & Stenlid, J. (2013). Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers—a user's guide. *New Phytologist*, 199 (1): 288-299.

- Liu, K. L., Porrás-Alfaro, A., Kuske, C. R., Eichorst, S. A. & Xie, G. (2012). Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, 78 (5): 1523-33.
- Ludvigsen, J., Rangberg, A., Avershina, E., Sekelja, M., Kreibich, C., Amdam, G. & Rudi, K. (2015). Shifts in the midgut/pyloric microbiota composition within a honey bee apiary throughout a season. *Microbes and environments*, 30 (3): 235-244.
- Madan, M. & Thind, K. (1998). *Physiology of fungi*: APH Publishing.
- Manoj, P. (2016). Droplet digital PCR technology promises new applications and research areas. *Mitochondrial DNA Part A*, 27 (1): 742-746.
- Martinson, V. G., Moy, J. & Moran, N. A. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and environmental microbiology*, 78 (8): 2830-2840.
- McArt, S. H., Koch, H., Irwin, R. E. & Adler, L. S. (2014). Arranging the bouquet of disease: floral traits and the transmission of plant and animal pathogens. *Ecology Letters*, 17 (5): 624-636.
- McFrederick, Q. S., Thomas, J. M., Neff, J. L., Vuong, H. Q., Russell, K. A., Hale, A. R. & Mueller, U. G. (2017). Flowers and wild megachilid bees share microbes. *Microbial ecology*, 73 (1): 188-200.
- Metzker, M. L. (2005). Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome research*, 15 (12): 1767-1776.
- Moore, D., Robson, G. D. & Trinci, A. P. (2011). *21st Century Guidebook to Fungi*: Cambridge University Press.
- Moran, N. A. (2015). Genomics of the honey bee microbiome. *Curr Opin Insect Sci*, 10: 22-8.
- Murphy, D. B. (2002). *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*: John Wiley & Sons.
- MycoBank. (2017). *MycoBank Database*. Tilgjengelig fra: <http://www.mycobank.org/> (lest 07.04.17).
- Myerscough, M. R., Khoury, D. S., Ronzani, S. & Barron, A. B. (2017). Why Do Hives Die? Using Mathematics to Solve the Problem of Honey Bee Colony Collapse. I: *The Role and Importance of Mathematics in Innovation*, s. 35-50: Springer.
- Nelson, M. C., Morrison, H. G., Benjamino, J., Grim, S. L. & Graf, J. (2014). Analysis, optimization and verification of Illumina-generated 16S rRNA gene amplicon surveys. *PLoS one*, 9 (4): e94249.
- Neumann, P. & Carreck, N. L. (2010). *Honey bee colony losses*: Taylor & Francis.
- Nilsson, R. H., Ryberg, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Larsson, K.-H. & Kõljalg, U. (2006). Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS one*, 1 (1): e59.
- Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N. & Larsson, K.-H. (2008). Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary bioinformatics online*, 4: 193.
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Sarver, B. A., Balajee, S. A., Schroers, H.-J., Summerbell, R. C., Robert, V. A., Crous, P. W. & Zhang, N. (2010). Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (10): 3708-3718.
- Pepper, I. L., Gerba, C. P. & Gentry, T. (2014). *Environmental microbiology*: Academic press. 728 s.
- Powell, J. E., Martinson, V. G., Urban-Mead, K. & Moran, N. A. (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and environmental microbiology*, 80 (23): 7378-7387.
- Primer, S. (2017). *Copy number calculator for realtime PCR*. Tilgjengelig fra: <http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr> (lest 08.11.16).
- Ptaszynska, A. A., Borsuk, G., Mullenko, W. & Wilk, J. (2016). Impact of vertebrate probiotics on honeybee yeast microbiota and on the course of nosemosis. *Medycyna Weterynaryjna-Veterinary Medicine-Science and Practice*, 72 (7): 430-434.
- Ravenscraft, A., Berry, M., Hammer, T., Peay, K. & Boggs, C. (2017). Structure and function of the bacterial and fungal gut flora of Neotropical butterflies. *bioRxiv*: 128884.
- Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., Angly, F. E., Heath, A. C., Rohwer, F. & Gordon, J. I. (2010). Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, 466 (7304): 334-338.
- Rokop, Z., Horton, M. & Newton, I. (2015). Interactions between Cooccurring Lactic Acid Bacteria in Honey Bee Hives. *Applied and environmental microbiology*, 81 (20): 7261-7270.

- Sabree, Z. L., Hansen, A. K. & Moran, N. A. (2012). Independent studies using deep sequencing resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honey bees. *PLoS One*, 7 (7): e41250.
- Samson, R., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. & Andersen, B. (2010). Food and indoor fungi. CBS laboratory manual series 2. *Utrecht: CBS-Fungal Biodiversity Centre*.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74 (12): 5463-5467.
- Schadt, E. E., Turner, S. & Kasarskis, A. (2010). A window into third-generation sequencing. *Human molecular genetics*, 19 (R2): R227-R240.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K. & Crous, P. W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (16): 6241-6246.
- Seeley, T. (1995). *The wisdom of the hive* Cambridge: MA: Harvard University Press.
- Sharma, P., Meena, N., Aggarwal, M. & Mondal, A. K. (2005). *Debaryomyces hansenii*, a highly osmo-tolerant and halo-tolerant yeast, maintains activated Dhog1p in the cytoplasm during its growth under severe osmotic stress. *Current genetics*, 48 (3): 162-170.
- Shendure, J. & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26 (10): 1135-1145.
- Sipiczki, M. (2006). Metschnikowia strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Applied and environmental microbiology*, 72 (10): 6716-6724.
- Snodgrass, R. E. (1910). *Anatomy of the honey bee*: Kessinger Publishing, LLC.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44 (4): 846-849.
- Strati, F., Di Paola, M., Stefanini, I., Albanese, D., Rizzetto, L., Lionetti, P., Calabrò, A., Jousson, O., Donati, C. & Cavalieri, D. (2016). Age and gender affect the composition of fungal population of the human gastrointestinal tract. *Frontiers in microbiology*, 7.
- Tacon, F. L., Skinner, F. & Mosse, B. (1983). Spore germination and hyphal growth of a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae* (Gerdemann and Trappe), under decreased oxygen and increased carbon dioxide concentrations. *Canadian Journal of Microbiology*, 29 (10): 1280-1285.
- Tang, J., Iliev, I. D., Brown, J., Underhill, D. M. & Funari, V. A. (2015). Mycobiome: Approaches to Analysis of Intestinal Fungi. *Journal of immunological methods*, 421: 112-121.
- Taxonomy, I. A. F. P. (2017). *International Code of Nomenclature*. Tilgjengelig fra: <http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php> (lest 12.05.2017).
- Taylor, D. L., Walters, W. A., Lennon, N. J., Bochicchio, J., Krohn, A., Caporaso, J. G. & Pennanen, T. (2016). Accurate Estimation of Fungal Diversity and Abundance through Improved Lineage-Specific Primers Optimized for Illumina Amplicon Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (24): 7217-7226.
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S. & Sato, H. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PloS one*, 7 (7): e40863.
- Underhill, D. M. & Iliev, I. D. (2014). The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14 (6): 405-416.
- Underhill, D. M. & Iliev, I. D. (2014). The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol*, 14 (6): 405-16.
- UNITE. (2017). *Species Hypothesis graph*. Tilgjengelig fra: <https://unite.ut.ee/index.php> (lest 04.02.2017).
- Vadkertiová, R., Molnárová, J., Vránová, D. & Sláviková, E. (2012). Yeasts and yeast-like organisms associated with fruits and blossoms of different fruit trees. *Canadian journal of microbiology*, 58 (12): 1344-1352.
- wetware, O. (2014). *Illumina handout*. Tilgjengelig fra: http://openwetware.org/images/7/7a/DOE_JGI_Illumina_HiSeq_handout.pdf (lest 10.02.17).

- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18 (1): 315-322.
- Whitehouse, T. (2015). *Announcing New Steps to Promote Pollinator Health*. Tilgjengelig fra: <https://obamawhitehouse.archives.gov/blog/2015/05/19/announcing-new-steps-promote-pollinator-health> (lest 02.05.2017).
- Winston, M. L. (1991). *The biology of the honey bee*: harvard university press.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51 (2): 221.
- Wynns, A. A. (2015). Convergent evolution of highly reduced fruiting bodies in Pezizomycotina suggests key adaptations to the bee habitat. *BMC evolutionary biology*, 15 (1): 145.
- Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A. & Zhang, G. (2011). The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of genetics and genomics*, 38 (3): 95-109.
- Zhang, N., Suh, S.-O. & Blackwell, M. (2003). Microorganisms in the gut of beetles: evidence from molecular cloning. *Journal of invertebrate pathology*, 84 (3): 226-233.
- Zhang, T. & Fang, H. H. (2006). Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70 (3): 281-289.
- Zheng, H., Powell, J. E., Steele, M. I., Dietrich, C. & Moran, N. A. (2017). Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 201701819.
- Zijlstra, G. (2014). Important changes in the rules of nomenclature, especially those relevant for palaeobotanists. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 207: 1-4.

Vedlegg

Vedlegg A: Prøve oversikt

Tabell A1: Prøve oversikt av tarmdeler. Illumina viser antall prøver til illumina og qPCR. Dyrkning viser hvor mange prøver som ble benyttet til dyrkning. LM og SEM viser hvor mange hele tarmar som gikk til mikroskopering.

Måned og kube oversikt		Illumina	Dyrkning	LM	SEM
Mars	Kube 2	30 ¹	15 ¹	3	-
	Kube 3	30 ¹	15 ¹	3	-
April	Kube 2	40 ²	20 ²	2	-
	Kube 3	40 ²	20 ²	2	-
Juni	Kube 3	40 ²	20 ²	-	-
	Kube 5	40 ²	20 ²	-	-
Juli	Kube 3	40 ²	-	-	-
	Kube 5	40 ²	-	-	-
August	Kube 3	40 ²	20 ²	2	-
	Kube 5	40 ²	20 ²	2	-
November	Kube 3	40 ²	-	-	2
	Kube 5	40 ²	-	-	2

1) Tarm delt opp i 3 deler, Midmage, ileum og Rektum.

2) Tarm delt opp i 4 deler, Honningmage, Midmage, ileum og Rektum.

Tabell A2: Prøve oversikt av miljøprøver. Pollen, sukker og nektar viser antall miljøprøver hentet fra kuber. Illumina viser antall prøver tatt ut til Illumina sekvensering og qPCR. Dyrkning viser hvor mange prøver benyttet til dyrkning.

Måned	Lokalitet	Pollen	Sukker	Nektar	Illumina	Dyrkning
Mars	Kube 2	-	1	-	1	1
	Kube 3	-	1	-	1	1
April	Kube 2	1	1	-	2	2
	Kube 3	1	1	-	2	2
Juni	Kube 3	1	-	1	2	2
	Kube 5	1	-	1	2	2
Juli	Kube 3	1	-	-	-	-
	Kube 5	1	-	-	-	-
August	Kube 3	1	-	-	-	1
	Kube 5	1	-	-	-	1
November	Kube 3	-	1	-	1	-
	Kube 5	-	1	-	1	-
April	Selje	-	-	-	2	1
April	Hvitveis	-	-	-	2	1
April	Hagelerkspore	-	-	-	2	1
Juni	Eple	-	-	-	2	1

Vedlegg B: Medie oppskrifter

Tabell B1: Oppskrifter for forskjellige medier

Komponent	PDA	YMA	V8	PDA med sukrose	TSA
PDB	24g	-	-	24g	-
Gjær ekstrakt	-	3g	-	-	-
Malt	-	3g	-	-	-
Glukose	-	10g	-	-	-
Pepton	-	5g	-	-	-
Tomat juice	-	-	300 ml	-	-
CaCO ₃	-	-	3g	-	-
Sukrose	-	-	-	150g	-
TSB	-	-	-	-	30g
Agar	20g	20g	20g	20g	20g
Springvann	1 liter	1 liter	700 ml	1 liter	1 liter

Vedlegg C: Primere

Tabell C1: Oversikt over primere benyttet, sammen med primer sekvenser.

Navn	Mål	Sekvens	Kilde
BIT5	ITS	ACCTGCCGGARGGATCA	(Bokulich & Mills 2013)
B58S3	ITS	GAGATCCRTTGYTRAAAGTT	(Bokulich & Mills 2013)
ITS1-F	ITS	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	(Gardes & Bruns 1993)
ITS2	ITS	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	(White et al. 1990)
ITS4	ITS	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(White et al. 1990)
ITS1-F_KYO1	ITS	CTHGGTCATTTAGAGGAASTAA	(Toju et al. 2012)
ITS2_KYO1	ITS	CTRYGTTCTTCATCGDT	(Toju et al. 2012)
ITS3_KYO1	ITS	AHCGATGAAGAACRYAG	(Toju et al. 2012)
ITS4_KYO1	ITS	TCCTCCGCTTWTGWTGWTGC	(Toju et al. 2012)
fITS7	ITS	GAACACAGCGAAATGTGA	(Ihrmark et al. 2012)
Vitellogenin f	Vitellogenin	GTTGGAGAGCAACATGCAGA	(Amdam et al. 2004)
Vitellogenin r	Vitellogenin	TCGATCCATTCCTTGATGGT	(Amdam et al. 2004)
Illumina colony forward	Illumina colony	AATGATACGGCGACCACCGAGATCT	Illumina
Illumina colony revers	Illumina colony	CCAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	Illumina

Tabell C2: Oversikt over primere benyttet under primer optimalisering. Til denaturering, anealing og elongering ble det brukt 30 sykler. Alle programmer hadde en aktiverings temperatur på 95°C i 15 minutter. Denaturering ved 95°C i 30 sekunder. All anealings trinn varte i 30 sekunder temperaturer vist i tabell. All elongering foregikk ved 72°C, tid vist i tabell. Alle slutt elongering foregikk ved 72°C i 7 minutter.

Mål	Primer combo For / Rev	Anealing	Elongering
ITS1	BITS/B58S3	55°C	1 minutt
Hel ITS	BITS/ITS4	55°C	1 minutt
Hel ITS	BITS/ ITS4_KYO1	55°C	1 minutt
ITS1	ITS1-F_KYO1/ ITS2_KYO1	47°C	30 sekunder
ITS2	ITS3_KYO1/ ITS4_KYO1	47°C	30 sekunder
ITS2	fITS7/ITS4	52°C	45 sekunder
ITS1	ITS1-F/ITS2	56.1°C	45 sekunder

Tabell C3: Oversikt over primere benyttet til PCR og temperaturprofiler. Til denaturering, anealing og elongering ble det brukt 30 syklere utenom ved Illumina index PCR som gikk 10 syklere. Alle programmene hadde en aktiverings temperatur på 95°C tid vist i tabell. Denaturering ved 95°C i 30 sekunder. Anealing vist i tabell. Elongerings temperatur var 72°C tid vist i tabell. All slutt elongering foregikk ved 72°C i 7 minutter.

Mål	Primer For/Rew	combo	Aktiverings	Anealing	Elongering
ITS1	BITS/B58S3		15 min	55°C 30 sek	45 sek
Hel ITS	BITS/ITS4		15 min	55°C 30 sek	1 min
Vitellogenin	Vitellogenin f/ Vitellogenin r		15 min	54°C 30 sek	30 sec
Illumina index	Illumina index F/ illumina index R		5 min	55°C 1 min	1 min

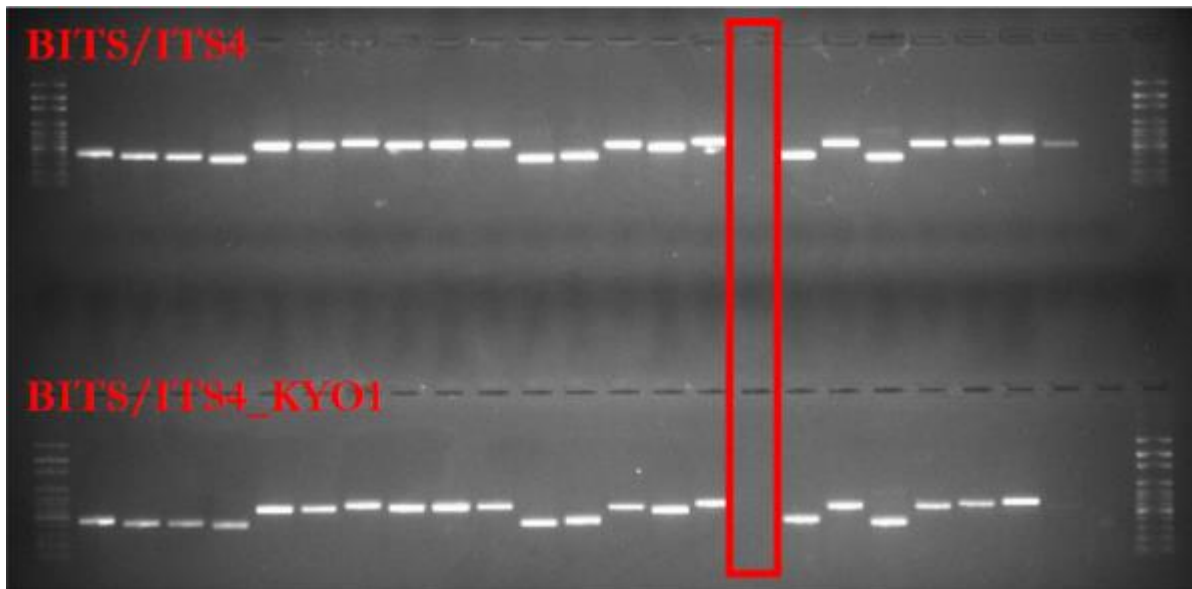
Tabell C4: Oversikt over 16 forward (F1-F16) og 36 rewers primerne benyttet (R1-R36). Området i grønt viser koloni-amplifiseringsregionen. Områder i svart viser Illumina sekvenseringsprimer. Områder i rødt viser unike ineks primer sekvens. Områder i blått er genspesifikke områder til ITS1 primerne, lyseblått er BITS primer og mørkeblått er B58S3 primer.

F1 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**agtcaa**ACCTGCGGARGGATCA
F2 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**agttcc**ACCTGCGGARGGATCA
F3 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**atgtca**ACCTGCGGARGGATCA
F4 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**ccgtcc**ACCTGCGGARGGATCA
F5 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**gtagag**ACCTGCGGARGGATCA
F6 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**gtccgc**ACCTGCGGARGGATCA
F7 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**gtgaaa**ACCTGCGGARGGATCA
F8 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**gtggcc**ACCTGCGGARGGATCA
F9 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**gtttcg**ACCTGCGGARGGATCA
F10 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**cgtagc**ACCTGCGGARGGATCA
F11 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**gagtgg**ACCTGCGGARGGATCA
F12 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**ggtagc**ACCTGCGGARGGATCA
F13 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**actgat**ACCTGCGGARGGATCA
F14 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**atgagc**ACCTGCGGARGGATCA
F15 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**attcct**ACCTGCGGARGGATCA
F16 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**caaaag**ACCTGCGGARGGATCA

R1 caagcagaagacggcatacagagatCGTGATgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R2 caagcagaagacggcatacagagatACATCGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R3 caagcagaagacggcatacagagatGCCTAAgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R4 caagcagaagacggcatacagagatTGGTCAgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R5 caagcagaagacggcatacagagatCACTCTgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R6 caagcagaagacggcatacagagatATTGGCgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R7 caagcagaagacggcatacagagatGATCTGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R8 caagcagaagacggcatacagagatTCAAGTgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R9 caagcagaagacggcatacagagatCTGATCgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R10 caagcagaagacggcatacagagatAAGCTAgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R11 caagcagaagacggcatacagagatGTAGCCgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R12 caagcagaagacggcatacagagatTACAAGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R13 caagcagaagacggcatacagagatTTGACTgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R14 caagcagaagacggcatacagagatGGAACgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R15 caagcagaagacggcatacagagatTGACATgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R16 caagcagaagacggcatacagagatGGACGGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R17 caagcagaagacggcatacagagatCTCTACgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R18 caagcagaagacggcatacagagatGCGGACgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R19 caagcagaagacggcatacagagatTTTACgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R20 caagcagaagacggcatacagagatGGCCACgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R21 caagcagaagacggcatacagagatCGAAACgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R22 caagcagaagacggcatacagagatCGTACGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R23 caagcagaagacggcatacagagatCCACTgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R24 caagcagaagacggcatacagagatGCTACCgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R25 caagcagaagacggcatacagagatATCAGTgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R26 caagcagaagacggcatacagagatGCTCATgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R27 caagcagaagacggcatacagagatAGGAATgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R28 caagcagaagacggcatacagagatCTTTTgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R29 caagcagaagacggcatacagagatTAGTTGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R30 caagcagaagacggcatacagagatCCGGTGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R31 caagcagaagacggcatacagagatATCGTGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R32 caagcagaagacggcatacagagatTGAGTGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R33 caagcagaagacggcatacagagatCGCCTGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R34 caagcagaagacggcatacagagatGCCATGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R35 caagcagaagacggcatacagagatAAAATGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT
R36 caagcagaagacggcatacagagatTGTTGGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAGATCCRTTGYTRAAAGTT

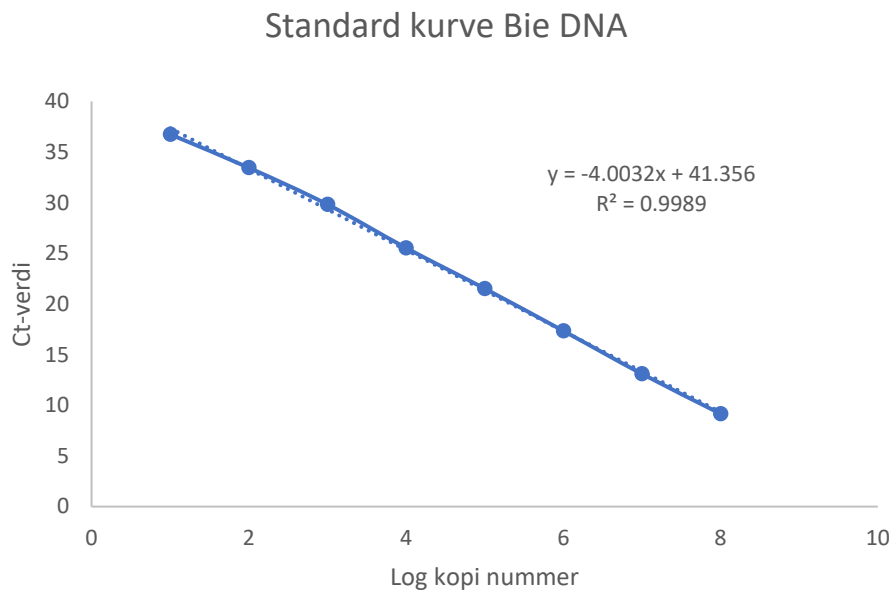
Tabell C5: Primere benyttet til qPCR og program. Til denaturering, anealing og elongering ble det brukt 30 sykler. Alle programmene hadde en aktiverings temperatur på 95°C i 15 minutter. Denaturering ved 95°C i 30 sekunder. Anealing temperatur vist i tabell i 30 sekunder. All elongering foregikk ved 72°C tid oppgitt i tabell.

Mål	Primer combo	Anealing	Elongation
ITS1	BITS/B58S3	55°C	45 sec
Vitellogenin	Vitellogenin f/Vitellogenin r	54°C	30 sec

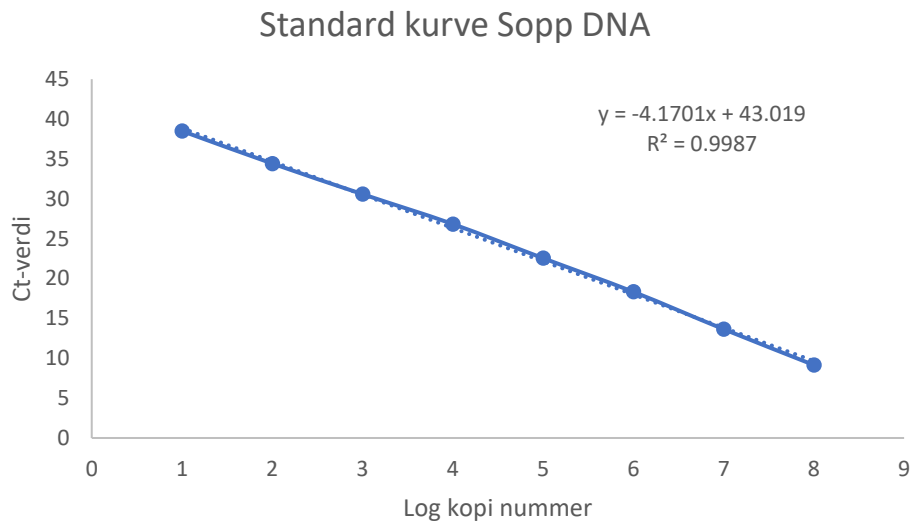


Figur C1 PO1: Gel bilde fra primer optimalisering, øverste rad med primer kombinasjonen BITS/ITS4, nederste med kombinasjonen BITS/ITS4_KYO1 og rød boks indikerer brønner med bie DNA.

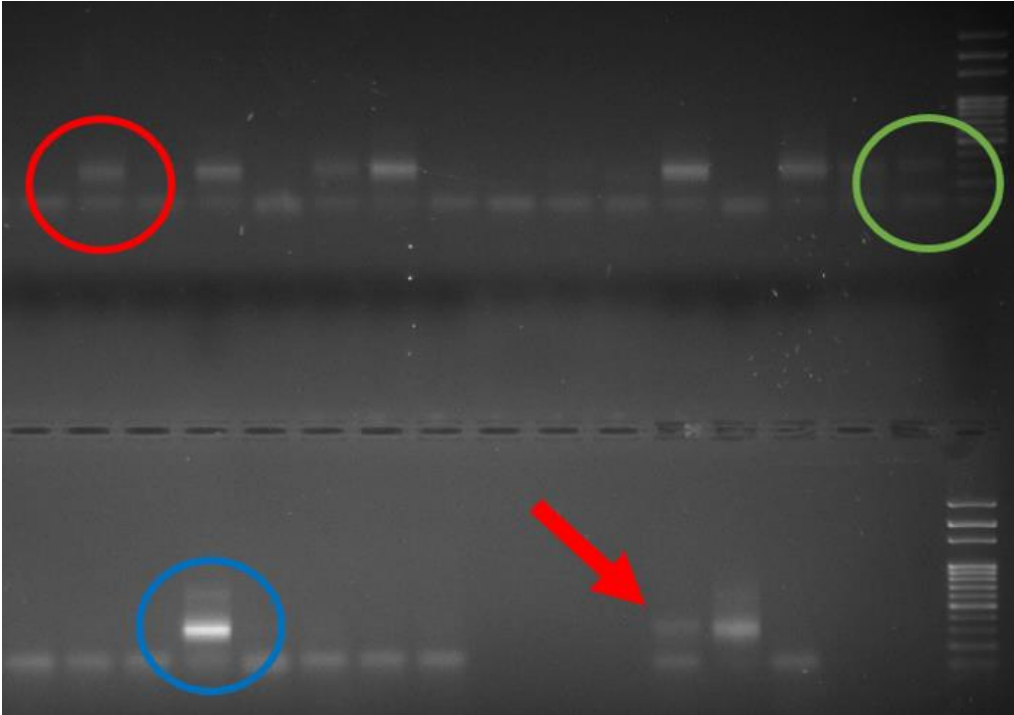
Vedlegg D: DNA Kvantifisering



Figur D1: Logaritmisk standardkurve for bie DNA



Figur D2: Logaritmisk standardkurve for sopp DNA



Figur D3: Gelbilde som viser styrke på band bruk til bibliotek dannelse. Rød ring viser medium, blå ring viser sterk mens grønn ring viser svak. Rød pil viser medium standard benyttet.

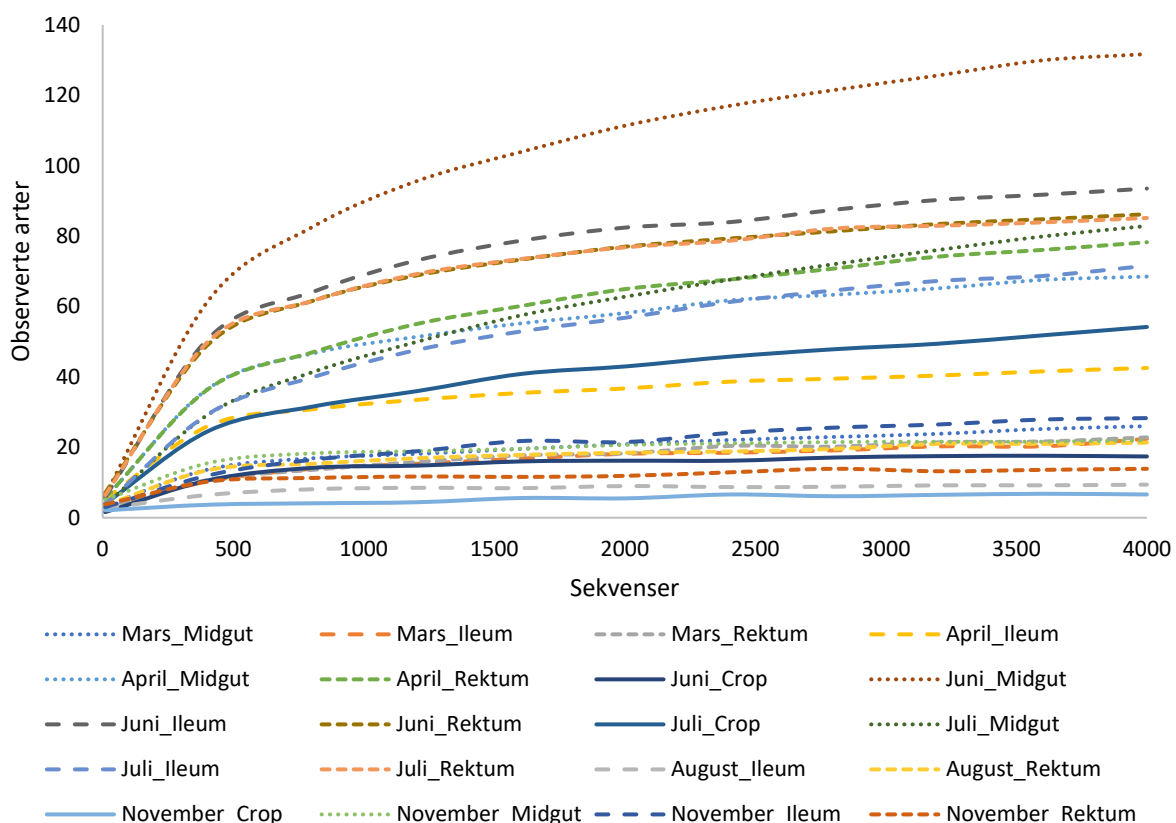
Tabell D1: Viser T-verdier og P-verdier for sammenligning av normalisert DNA i forskjellige tarmdeler over forskjellige måneder.

Tarmdel	Måned	Verdier	Mars	April	Juni	Juli	August
Hanningmage	Juni	T-Verdi	-	-1006	-	-	-
		P-Verdi	-	0,999	-	-	-
	Juli	T-Verdi	-	-1469	0,721	-	-
		P-Verdi	-	0,998	1	-	-
	August	T-Verdi	-	0,424	-1431	-1893	-
		P-Verdi	-	1	0,999	0,963	-
	November	T-Verdi	-	1146	2152	2614	0,721
P-Verdi		-	0,999	0,877	0,565	1	
Midtmage	April	T-Verdi	-1192	-	-	-	-
		P-Verdi	0,999	-	-	-	-
	Juni	T-Verdi	0,115	-1307	-	-	-
		P-Verdi	1	0,999	-	-	-
	Juli	T-Verdi	5940	-7133	5825	-	-
		P-Verdi	1,48e-06	1,05e-09	2,80e-06	-	-
	August	T-Verdi	-1840	0,648	-1955	-7781	-
		P-Verdi	0,974	1	0,948	2,00E-16	-
	November	T-Verdi	2965	1773	3080	8906	1125
		P-Verdi	0,305	0,982	0,237	2,00E-16	0,999
Ileum	April	T-Verdi	1325	-	-	-	-
		P-Verdi	0,999	-	-	-	-
	Juni	T-Verdi	1876	1325	-	-	-
		P-Verdi	0,966	0,999	-	-	-
	Juli	T-Verdi	0,788	0,537	-1089	-	-
		P-Verdi	1	1,0	0,999	-	-
	August	T-Verdi	-2987	4312	-4864	-3775	-
		P-Verdi	0,292	0,004	3,78E-04	0,032	-
	November	T-Verdi	3757	5082	5634	4545	0,770
		P-Verdi	0,034	1,34E-04	7,94e-06	1,59E-03	1
Rektum	April	T-Verdi	-1515	-	-	-	-
		P-Verdi	0,997	-	-	-	-
	Juni	T-Verdi	-4556	3041	-	-	-
		P-Verdi	0,002	0,259	-	-	-
	Juli	T-Verdi	-5460	3945	-0,904	-	-
		P-Verdi	1,99e-05	0,018	1	-	-
	August	T-Verdi	-6522	5007	-1967	-1063	-
		P-Verdi	4,95e-08	1,91E-04	0,945	0,999	-
	November	T-Verdi	7429	5914	2874	1970	0,907
		P-Verdi	1,26E-10	1,71E-06	0,367	0,945	1

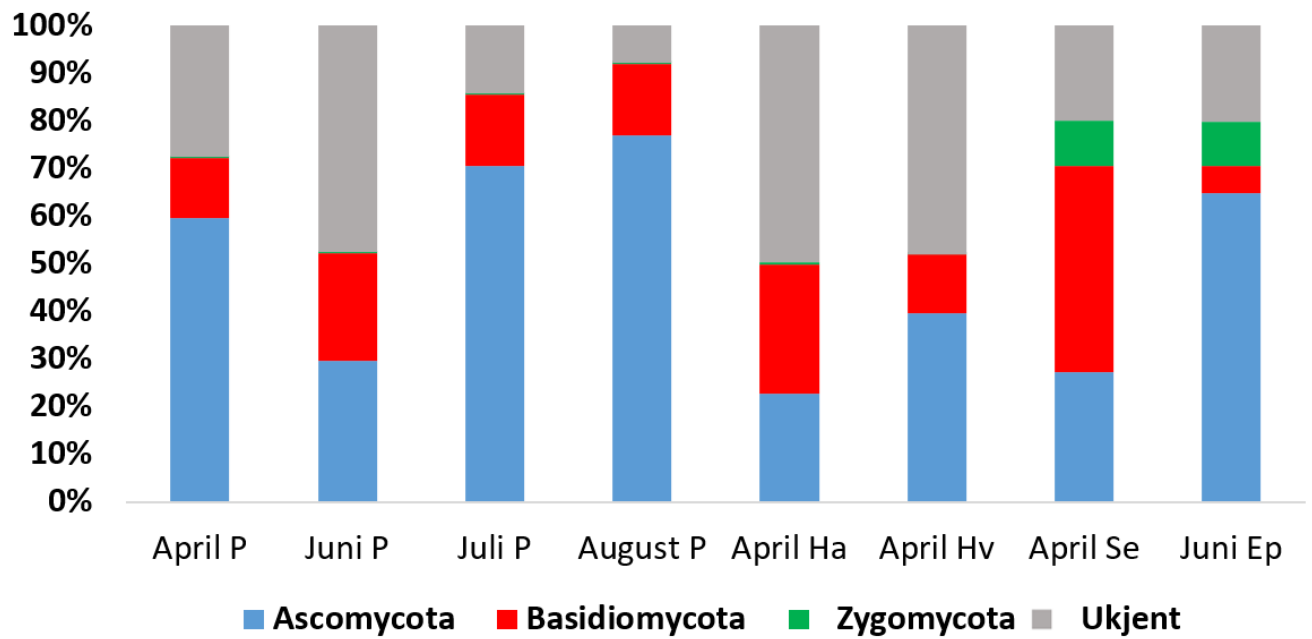
Vedlegg E: Sopp fordeling

Tabell E1: Viser fordeling av sekvensene fra dyrknings uavhengig metode på rekke nivå, sammen med sekvenser som ikke kunne bestemmes med BLAST, sekvenser uten likhet, uidentifiserte soppisolater og antall som ikke ble bestemt.

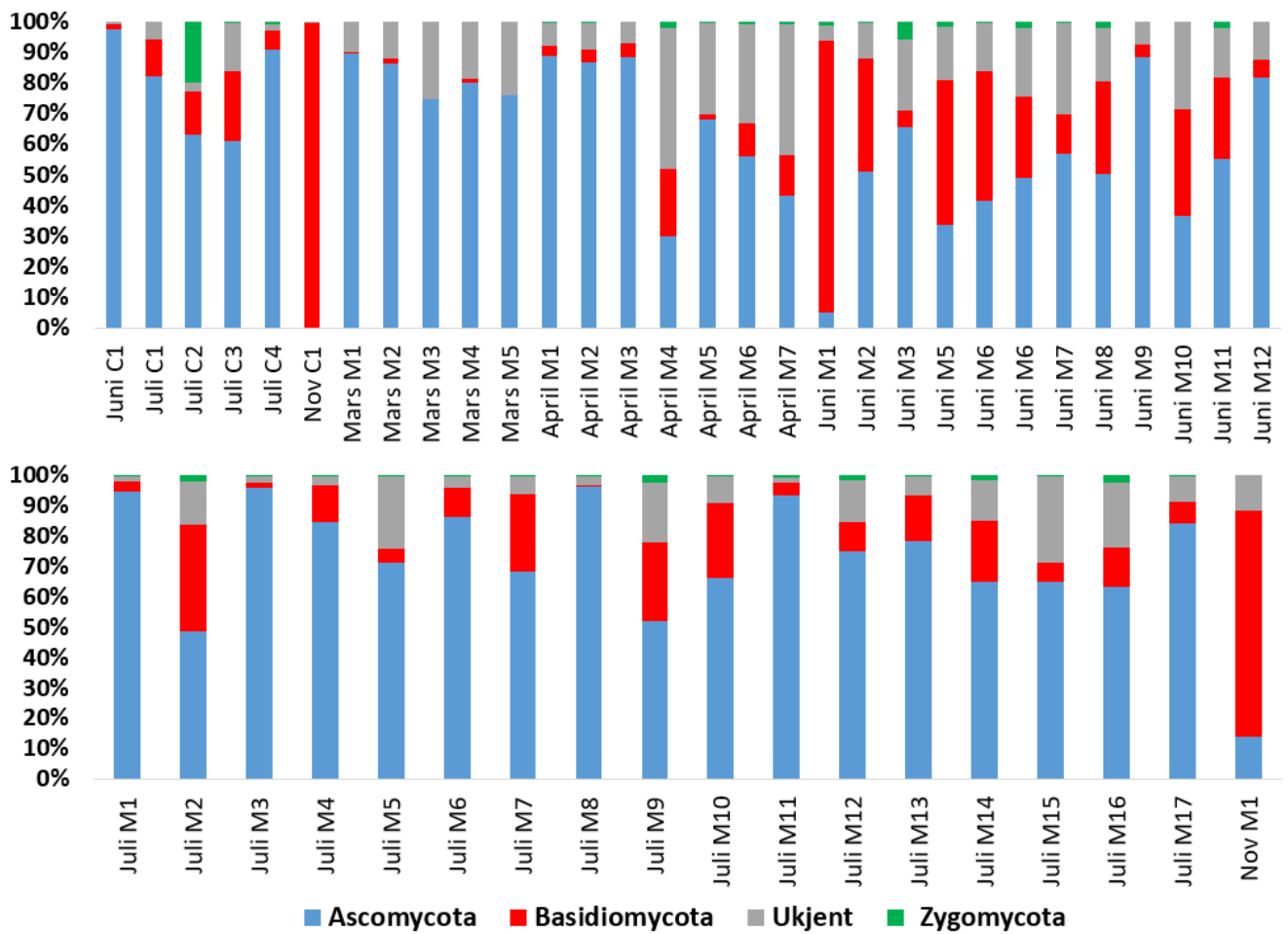
	Antall OTUer	% av 424000 sekvenser fra tarm	% av 48000 sekvenser fra miljø
<i>Ascomycota</i>	125	61,67	49,25
<i>Basidiomycota</i>	107	21,77	17,09
<i>Zygomycota</i>	11	2,03	1,78
Ikke bestembare	25	1,18	5,43
Sekvenser uten likhet	23	6,78	0,90
Ukultiverte isolater	87	4,11	7,15
Ikke Bestemt	1941	2,12	12,13
<i>Oomycota</i>	7	0,16	1,64
Planter	9	0,18	4,63



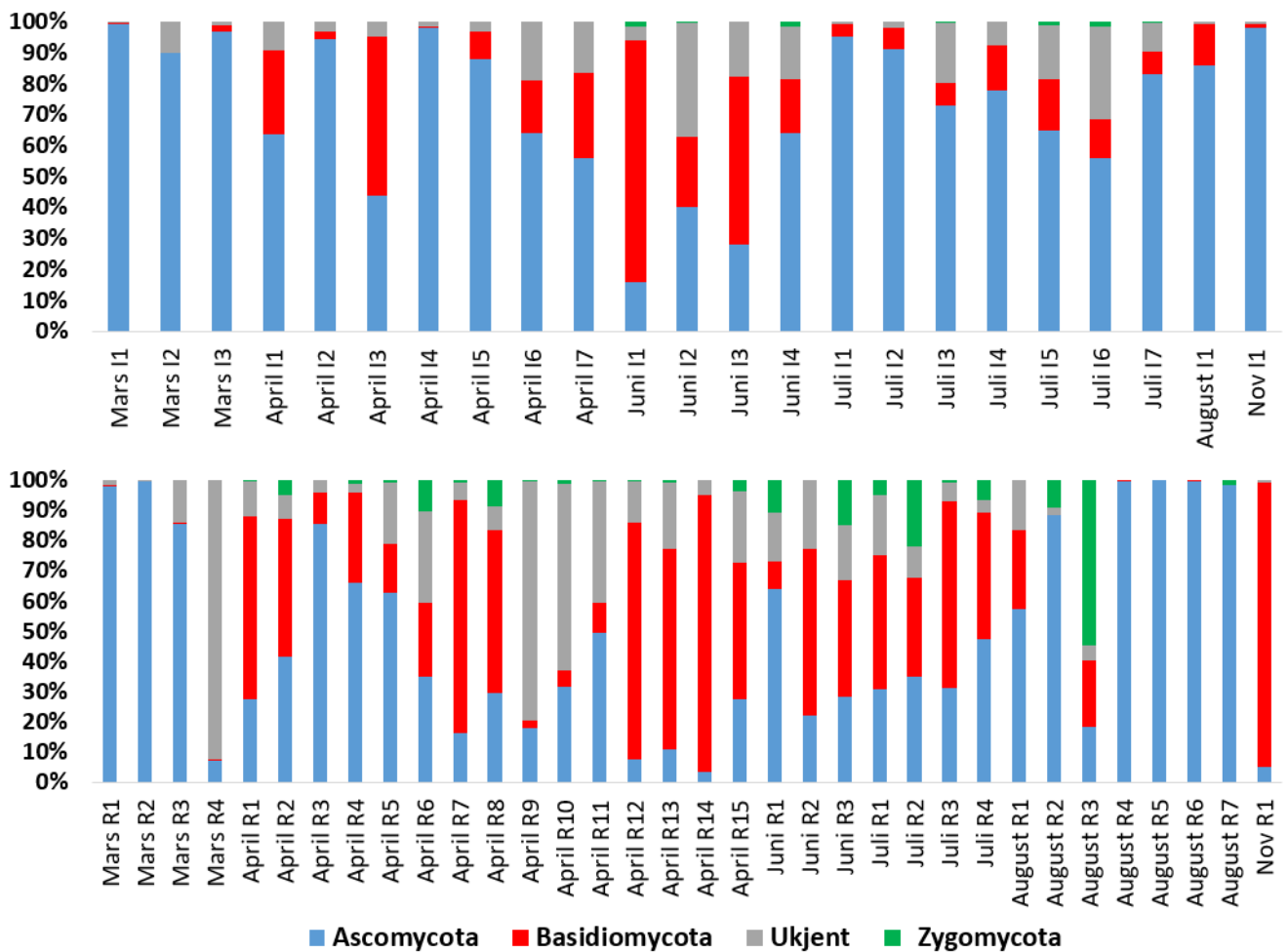
Figur E1: Rarefaction kurve som viser antall observerte arter ved økende mengder sekvenser.



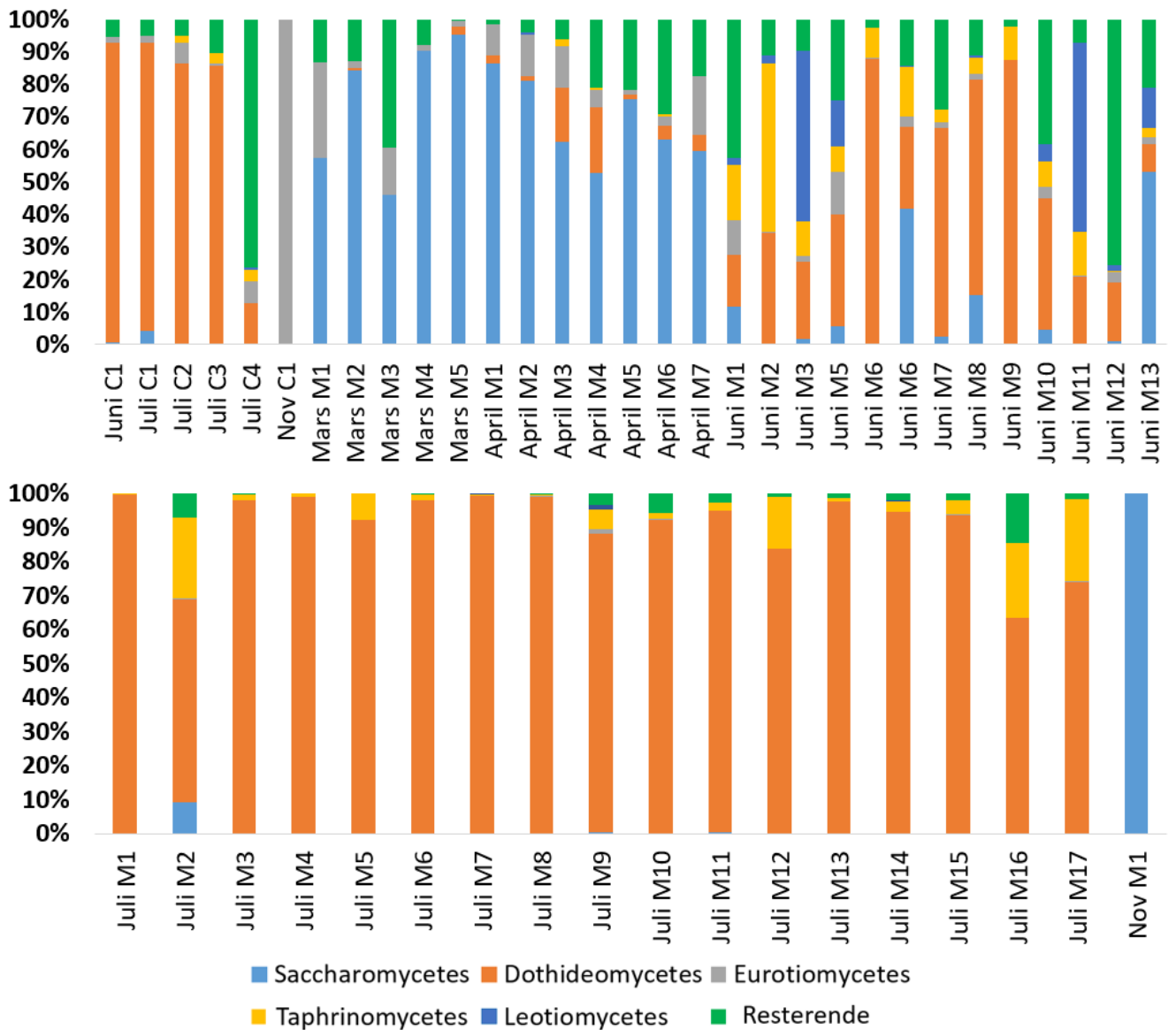
Figur E2: Viser fordeling av sopprikene *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* og sopper som er ukjent fra miljøprøver i prosent. P er pollen prøver, Ha er Hagelerkespore, Hv er hvitveis, Se er Selje og Ep er Eple.



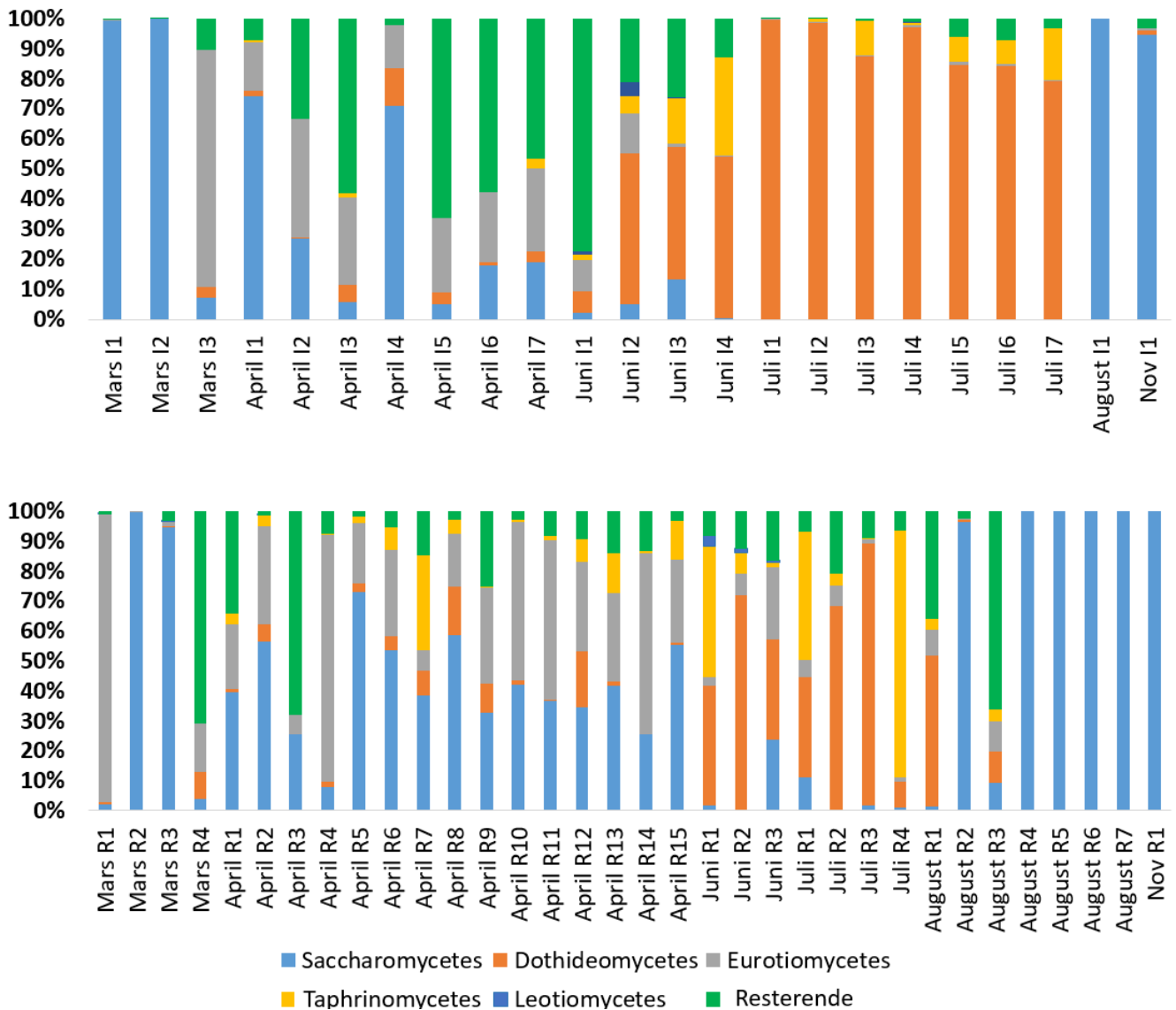
Figur E3: Viser fordeling av sopprikene *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zycomycota* og sopper som er ukjent fra forskjellige individer i prosent. Prøver merket med C indikerer honningmage og prøver merket med M indikerer Midtmage.



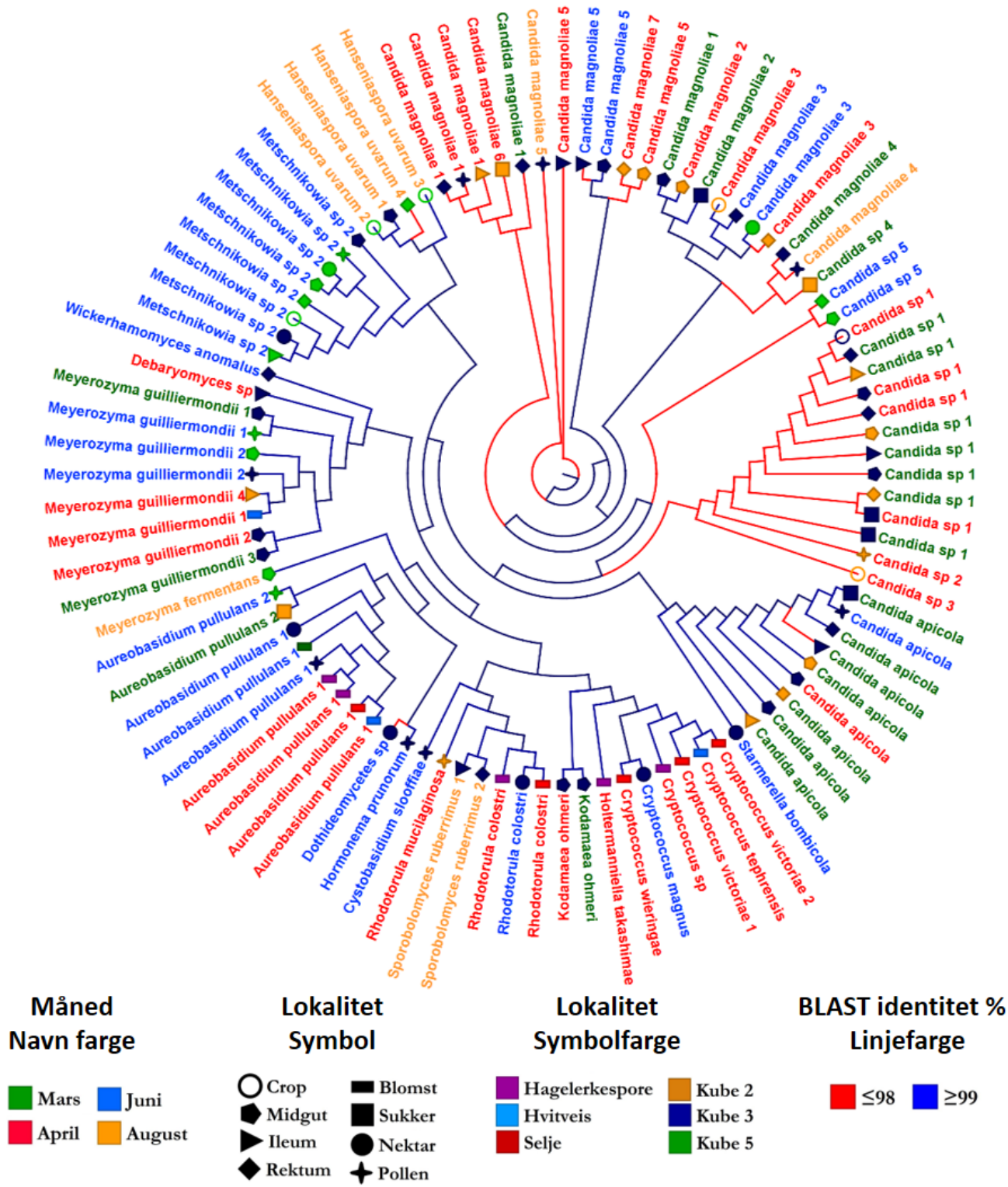
Figur E4: Viser fordeling av sopprikene *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zycomycota* og sopper som er ukjent fra forskjellige individer i prosent. Prøver merket med I indikerer ileum og prøver merket med R indikerer rektum.



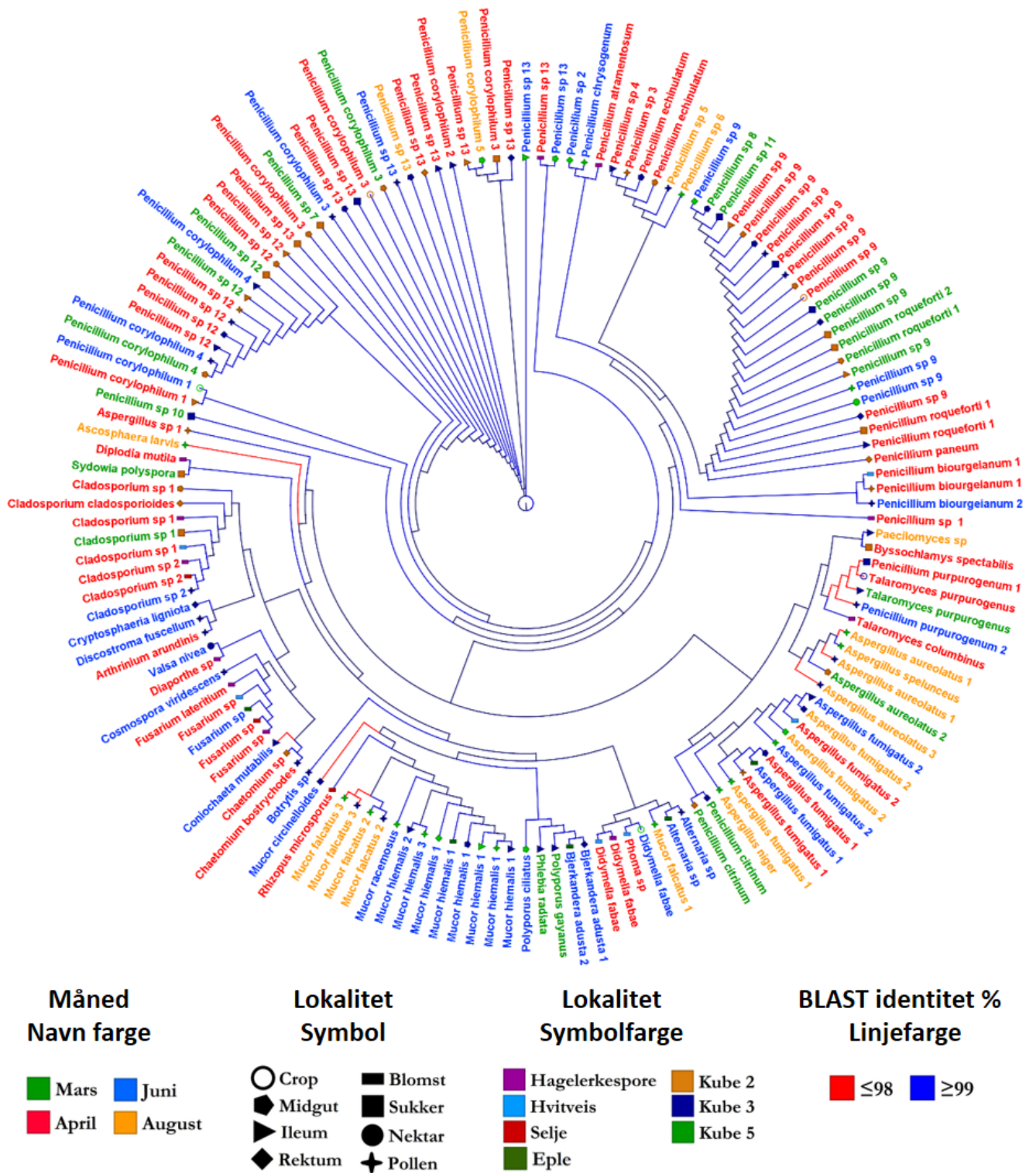
Figur E5: Fordeling av soppklassene *Saccharomycetes*, *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Taphrinomycetes*, *Leotiomyces* og de resterende soppklassene slått sammen innen *Ascomycota* fra forskjellige individer i prosent. Prøver merket med C indikerer honningmage og prøver merket med M indikerer Midtmage.



Figur E6: Fordeling av soppklassene *Saccharomycetes*, *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Taphrinomycetes*, *Leotiomyces* og de resterende soppklassene slått sammen innen *Ascomycota* fra forskjellige individer i prosent. Prøver merket med I indikerer ileum og prøver merket med R indikerer rektum.



Figur E7: Sirkulært kladogram over alle gjærsoppisolatene fra dyrkningsavhengig metode. Mangler: *Metschnikowia sp 1* isolert fra ileum i Kube 5 fra august, *Meyerozyma fermentans* isolert fra ileum i Kube 5 fra august, *Metschnikowia aff. Pulcherrima 2* isolert fra honningmage i Kube 5 fra august, *Metschnikowia sp 1* isolert fra pollen i Kube 5 fra juni, *Metschnikowia chrysoperlae* isolert fra pollen i Kube 5 fra juni, *Metschnikowia aff. Pulcherrima 1* isolert fra midtmagen i Kube 3 fra juni og *Metschnikowia sp 1* isolert fra rektum i Kube 3 fra juni for å danne sekvens sammenstilling med lengde på over 400bp.



Figur E8: Sirkulært kladogram over alle hyfesoppisolatene fra dyrkningsavhengig metode.

Mangler: *Mucor piriformis* isolert fra midtmagen i Kube 5 i august og *Aspergillus sp 2* isolert fra midtmagen i Kube 3 i august for å danne sekvens sammenstilling med lengde på over 400bp.

Tabell E2: Oversikt over identifiserte soppisolater funnet i forskjellige tarmdeler og måned funnet under dyrkningsavhengig metode.

	Mars	April	Juni	August
Honningsmage	-	<i>Candida magnoliae</i> 3	<i>Didymella fabae</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i> 2
		<i>Candida</i> sp 1	<i>Metschnikowia</i> sp 2	<i>Hanseniaspora uvarum</i> 3
		<i>Candida</i> sp 3	<i>Penicillium corylophilum</i> 1	<i>Metschnikowia</i> aff. <i>Pulcherrima</i> 2
		<i>Penicillium corylophilum</i> 3		
		<i>Penicillium</i> sp 9		
		<i>Talaromyces purpurogenus</i>		
Midtmage	<i>Aspergillus aureolatus</i> 2	<i>Candida magnoliae</i> 2	<i>Candida</i> sp 5	<i>Aspergillus</i> sp 2
	<i>Candida apicola</i>	<i>Candida magnoliae</i> 5	<i>Candida magnoliae</i> 5	<i>Hanseniaspora uvarum</i> 1
	<i>Candida magnoliae</i> 1	<i>Cladosporium</i> sp 1	<i>Metschnikowia</i> aff. <i>Pulcherrima</i> 1	<i>Mucor piriformis</i>
	<i>Candida</i> sp 1	<i>Penicillium corylophilum</i> 3	<i>Metschnikowia</i> sp 2	<i>Penicillium corylophilum</i> 5
	<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>Penicillium echinulatum</i>	<i>Mucor hiemalis</i> 1	<i>Penicillium</i> sp 13
	<i>Penicillium corylophilum</i> 3	<i>Penicillium</i> sp 12	<i>Penicillium</i> sp 13	<i>Pichia fermentans</i>
	<i>Penicillium corylophilum</i> 4	<i>Penicillium</i> sp 9	<i>Pichia guilliermondii</i> 2	
	<i>Penicillium roqueforti</i> 1	<i>Pichia guilliermondii</i> 2	<i>Polyporus ciliatus</i>	
	<i>Penicillium</i> sp 8			
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> 1			
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> 3			
Ileum	<i>Candida apicola</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> 1	<i>Aspergillus fumigatus</i> 2	<i>Metschnikowia</i> sp 1
	<i>Candida</i> sp 1	<i>Candida apicola</i>	<i>Candida magnoliae</i> 5	<i>Paecilomyces</i> sp
	<i>Penicillium</i> sp 12	<i>Candida magnoliae</i> 1	<i>Coniochaeta mutabilis</i>	<i>Pichia fermentans</i>
	<i>Penicillium</i> sp 9	<i>Candida magnoliae</i> 5	<i>Metschnikowia</i> sp 2	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> 1
	<i>Phlebia radiata</i>	<i>Candida</i> sp 1	<i>Mucor hiemalis</i> 1	
	<i>Polyporus gayanus</i>	<i>Debaryomyces</i> sp	<i>Mucor hiemalis</i> 2	
	<i>Talaromyces purpurogenus</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>Penicillium corylophilum</i> 4	
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> 2	<i>Penicillium</i> sp 13	
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> 4		
		<i>Penicillium corylophilum</i> 1		
		<i>Penicillium corylophilum</i> 2		
		<i>Penicillium echinulatum</i>		
		<i>Penicillium roqueforti</i> 1		
		<i>Penicillium</i> sp 4		
		<i>Penicillium</i> sp 9		
		<i>Penicillium</i> sp 12		
	<i>Penicillium</i> sp 13			

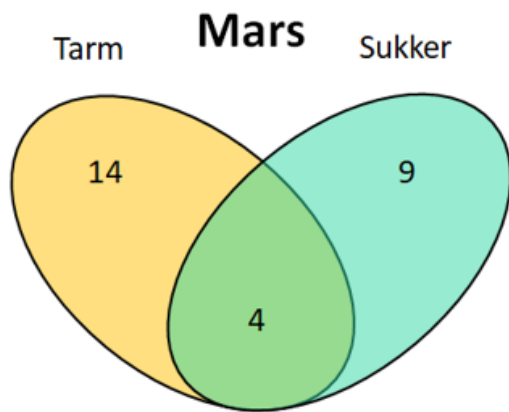
	Mars	April	Juni	August
Rektum	<i>Candida apicola</i>	<i>Candida magnoliae</i> 1	<i>Bjerkandera adusta</i> 1	<i>Aspergillus fumigatus</i> 2
	<i>Candida magnoliae</i> 1	<i>Candida magnoliae</i> 3	<i>Candida magnoliae</i> 3	<i>Hanseniaspora uvarum</i> 4
	<i>Candida magnoliae</i> 4	<i>Candida magnoliae</i> 7	<i>Candida</i> sp 5	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> 2
	<i>Candida</i> sp 1	<i>Candida</i> sp 1	<i>Cryptosphaeria ligniota</i>	
	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Chaetomium</i> sp	<i>Metschnikowia</i> sp 1	
	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Metschnikowia</i> sp 2	
	<i>Penicillium</i> sp 9	<i>Penicillium</i> sp 9	<i>Mucor circinelloides</i>	
		<i>Penicillium</i> sp 12	<i>Mucor hiemalis</i> 1	
		<i>Penicillium</i> sp 13	<i>Penicillium</i> sp 2	
			<i>Penicillium</i> sp 9	

Tabell E3: Oversikt over identifiserte soppisolater funnet i blomster, pollen, nektar og sukker i forskjellige måneder funnet under dyrkningsavhengig metode.

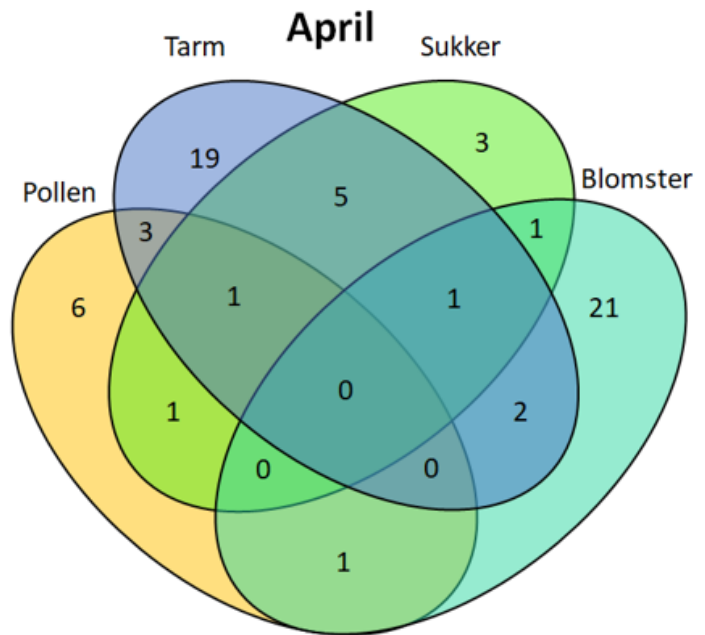
	Mars	April	Juni	August
Blomst	-	<i>Aureobasidium pullulans</i> 1	<i>Alternaria</i> sp	-
		<i>Aspergillus fumigatus</i> 2	<i>Aspergillus fumigatus</i> 1	
		<i>Cladosporium</i> sp 1	<i>Aureobasidium pullulans</i> 1	
		<i>Cladosporium</i> sp 2	<i>Bjerkandera adusta</i> 2	
		<i>Cryptococcus</i> sp	<i>Fusarium</i> sp	
		<i>Cryptococcus tephrensis</i>	<i>Mucor hiemalis</i> 1	
		<i>Cryptococcus victoriae</i> 1		
		<i>Cryptococcus victoriae</i> 2		
		<i>Cryptococcus wieringae</i>		
		<i>Diaporthe</i> sp		
		<i>Didymella fabae</i>		
		<i>Diplodia mutila</i>		
		<i>Fusarium lateritium</i>		
		<i>Fusarium</i> sp		
		<i>Holtermanniella takashimae</i>		
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> 1		
		<i>Penicillium atramentosum</i>		
		<i>Penicillium biourgeianum</i> 1		
		<i>Penicillium</i> sp 1		
		<i>Penicillium</i> sp 13		
		<i>Phoma</i> sp		
		<i>Rhizopus microsporus</i>		
		<i>Rhodotorula colostri</i>		
		<i>Talaromyces columbinus</i>		

	Mars	April	Juni	August
Pollen	-	-	<i>Alternaria sp</i>	<i>Aspergillus aureolatus 1</i>
			<i>Aspergillus fumigatus 2</i>	<i>Aspergillus niger</i>
			<i>Aureobasidium pullulans 1</i>	<i>Ascosphaera larvis</i>
			<i>Aureobasidium pullulans 2</i>	<i>Aspergillus aureolatus 1</i>
			<i>Botrytis sp</i>	<i>Aspergillus aureolatus 3</i>
			<i>Candida apicola</i>	<i>Aspergillus fumigatus 1</i>
			<i>Cladosporium sp 2</i>	<i>Aspergillus spelunceus</i>
			<i>Cosmospora viridescens</i>	<i>Candida magnoliae 4</i>
			<i>Cystobasidium slooffiae</i>	<i>Candida magnoliae 5</i>
			<i>Discostroma fuscillum</i>	<i>Mucor falcatus 1</i>
			<i>Hormonema prunorum</i>	<i>Mucor falcatus 2</i>
			<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	<i>Mucor falcatus 3</i>
			<i>Metschnikowia sp 1</i>	<i>Mucor falcatus 3</i>
			<i>Metschnikowia sp 2</i>	<i>Penicillium sp 5</i>
			<i>Meyerozyma guilliermondii 1</i>	<i>Penicillium sp 6</i>
			<i>Meyerozyma guilliermondii 2</i>	
			<i>Mucor hiemalis 1</i>	
			<i>Mucor hiemalis 3</i>	
			<i>Mucor racemosus</i>	
			<i>Penicillium biourgeianum 2</i>	
		<i>Penicillium chrysogenum</i>		
		<i>Penicillium corylophilum 3</i>		
		<i>Penicillium corylophilum 4</i>		
		<i>Penicillium purpurogenum 2</i>		
		<i>Penicillium sp 9</i>		
		<i>Penicillium sp 13</i>		
Nektar	-	-	<i>Aureobasidium pullulans 1</i>	-
			<i>Cryptococcus magnus</i>	
			<i>Dothideomycetes sp</i>	
			<i>Metschnikowia sp 2</i>	
			<i>Rhodotorula colostri</i>	
			<i>Starmerella bombicola</i>	
			<i>Valsa nivea</i>	
			<i>Candida magnoliae 3</i>	
			<i>Metschnikowia sp 2</i>	
Sukker	<i>Aureobasidium pullulans 2</i>	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	-	-
	<i>Candida apicola</i>	<i>Candida magnoliae 6</i>		
	<i>Candida magnoliae 2</i>	<i>Candida sp 1</i>		
	<i>Candida sp 1</i>	<i>Penicillium corylophilum 3</i>		
	<i>Candida sp 4</i>	<i>Penicillium purpurogenum 1</i>		
	<i>Cladosporium sp 1</i>	<i>Penicillium roqueforti 1</i>		

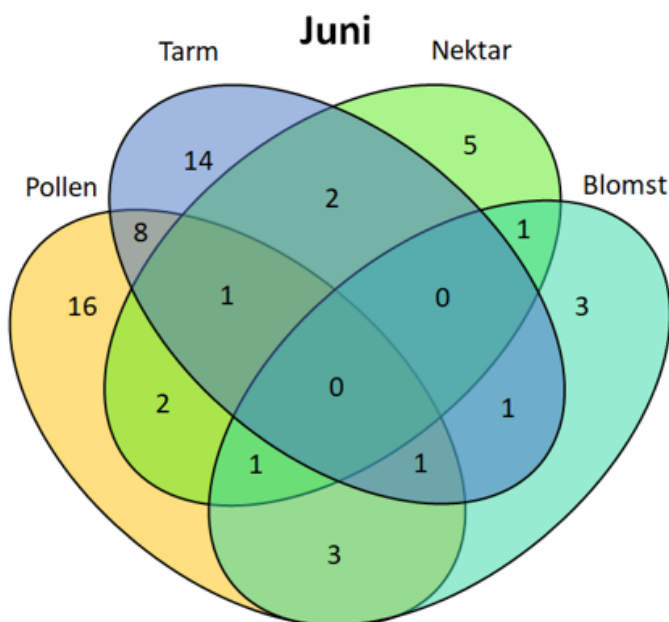
Mars	April	Juni	August
<i>Penicillium roqueforti</i> 2	<i>Penicillium sp 13</i>	-	-
<i>Penicillium sp 7</i>			
<i>Penicillium sp 9</i>			
<i>Penicillium sp 10</i>			
<i>Penicillium sp 11</i>			
<i>Penicillium sp 12</i>			
<i>Penicillium sp 12</i>			



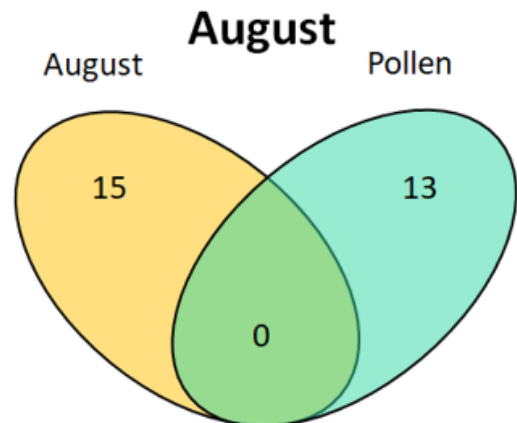
Total antall isolater: 28



Total antall isolater: 58



Total antall isolater: 49



Total antall isolater: 28

Figur E10: Venndiagram som viser delte soppisolater med miljøprøver i form av sukker, nektar, blomster og pollen fra di forskjellige månende.

Tabell E4: Oversikt over 132 sopplesker funnet sammen med OTUer kun bestemt ned til klasse og familie funnet i tarm med dyrkningsavhengig og uavhengig metode.

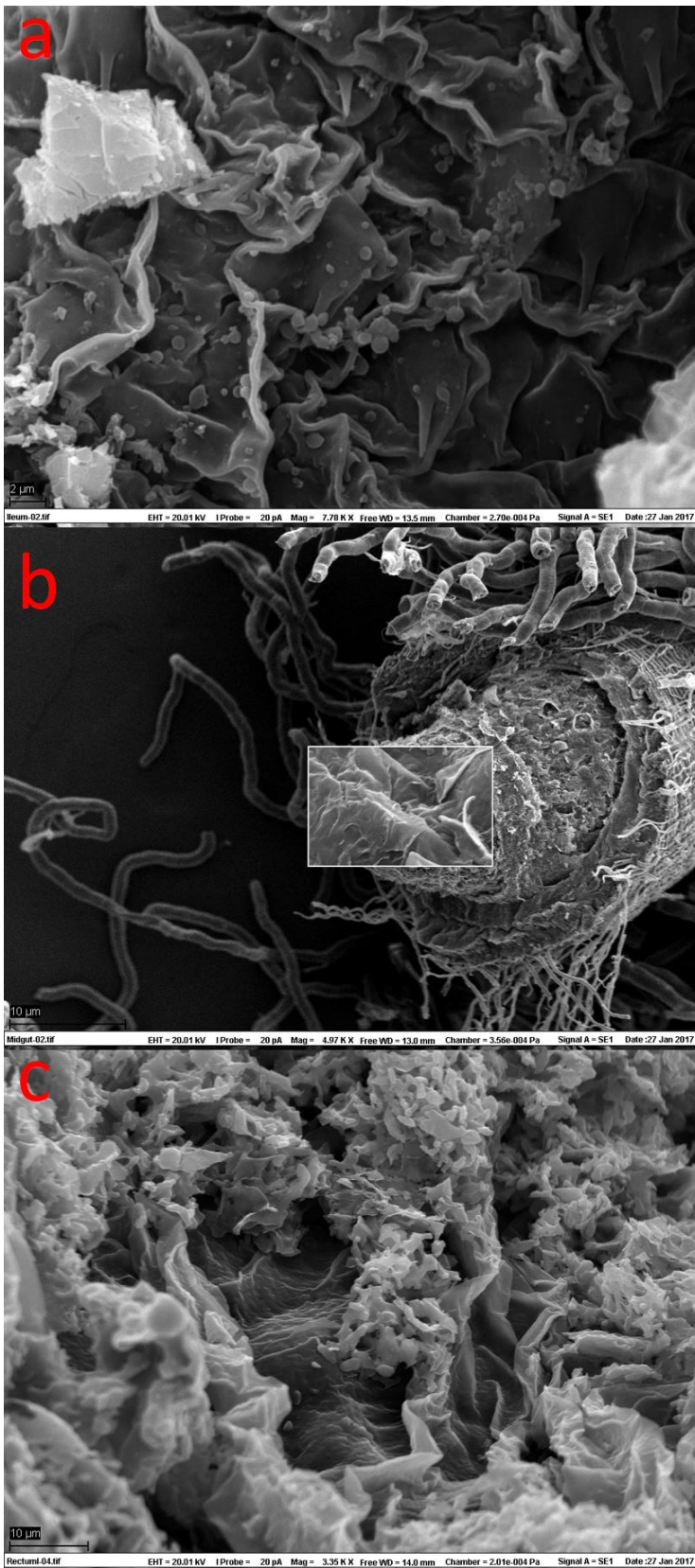
¹ går kun ned til klasse.

² går kun ned til familie.

Slekt	Uavhengig	Avhengig	Slekt	Uavhengig	Avhengig
<i>Agrocybe</i>	x		<i>Erythrobasidium</i>	x	
<i>Alternaria</i>	x		<i>Eurotiales</i>	x	
<i>Antennariella</i>	x		<i>Filobasidium</i>	x	
<i>Ascosphaera</i>	x		<i>Fomes</i>	x	
<i>Aspergillus</i>	x	x	<i>Fusarium</i>	x	
<i>Aureobasidium</i>	x		<i>Galerina</i>	x	
<i>Bjerkandera</i>		x	<i>Ganoderma</i>	x	
<i>Boeremia</i>	x		<i>Gymnopus</i>	x	
<i>Botrytis</i>	x		<i>Hanseniopsis</i>	x	x
<i>Candida</i>	x	x	<i>Helgardia</i>	x	
<i>Capnobotryella</i>	x		<i>Heterobasidium</i>	x	
<i>Chaetomium</i>		x	<i>Holtermanniella</i>	x	
<i>Chaetothyriales</i> ¹	x		<i>Hyphodontia</i>	x	
<i>Chondrostereum</i>	x		<i>Hypholoma</i>	x	
<i>Cladosporium</i>	x		<i>Itersonilia</i>	x	
<i>Claviceps</i>	x		<i>Kloeckera</i>	x	
<i>Coniochaeta</i>		x	<i>Knufia</i>	x	
<i>Coniozyma</i>	x		<i>Kodamaea</i>		x
<i>Conocybe</i>	x		<i>Krasilnikovozyma</i>	x	
<i>Coprinellus</i>	x		<i>Lachnum</i>	x	
<i>Coprinopsis</i>	x		<i>Leptosphaeria</i>	x	
<i>Coprinus</i>	x		<i>Leptospora</i>	x	
<i>Crepidotus</i>	x		<i>Leucosporidium</i>	x	
<i>Crocicreas</i>	x		<i>Lophiostomataceae</i> ²	x	
<i>Cryptosphaeria</i>		x	<i>Lophodermium</i>	x	
<i>Curvibasidium</i>	x		<i>Lycoperdon</i>	x	
<i>Cystobasidium</i>	x		<i>Malasseziales</i> ¹	x	
<i>Cystofilobasidium</i>	x		<i>Melampsora</i>	x	
<i>Cytospora</i>	x		<i>Metschnikowia</i>		x
<i>Debaryomyces</i>	x	x	<i>Meyerozyma</i>	x	
<i>Diatrype</i>	x		<i>Microbotryum</i>	x	x
<i>Didymella</i>		x	<i>Microcyclospora</i>	x	
<i>Dioszegia</i>	x		<i>Microsphaera</i>	x	
<i>Dothiorella</i>	x		<i>Microstroma</i>	x	
<i>Endosporium</i>	x		<i>Monilinia</i>	x	
<i>Entomophthora</i>	x		<i>Mortierella</i>	x	
<i>Epicoccum</i>	x		<i>Eremascus</i>	x	

Slekt	Uavhengig	Avhengig	Slekt	Uavhengig	Avhengig
<i>Mrakia</i>	x		<i>Saccharomycodes</i>	x	
<i>Mucor</i>	x	x	<i>Scoliciosporum</i>	x	
<i>Muriphaeosphaeria</i>	x		<i>Scopuloides</i>	x	
<i>Mutinus</i>	x		<i>Seimatosporium</i>	x	
<i>Nectria</i>	x		<i>Sporidiobolales</i> ¹	x	
<i>Neofabraea</i>	x		<i>Sporidiobolus</i> ¹	x	
<i>Nigrograna</i>	x		<i>Sporobolomyces</i>	x	x
<i>Paecilomyces</i>		x	<i>Sporormiella</i>	x	
<i>Panaeolus</i>	x		<i>Starmerella</i>	x	
<i>Paracamarosporium</i>	x		<i>Steccherinum</i>	x	
<i>Paraleptosphaeria</i>	x		<i>Strobilurus</i>	x	
<i>Parmelia</i>	x		<i>Sydowia</i>	x	
<i>Penicillium</i>	x	x	<i>Talaromyces</i>	x	x
<i>Peniophora</i>	x		<i>Taphrina</i>	x	
<i>Phacidium</i>	x		<i>Tausonia</i>	x	
<i>Phaeosphaeria</i>	x		<i>Thekopsora</i>	x	
<i>Phaeothecoidiella</i>	x		<i>Tilletiopsis</i>	x	
<i>Phenoliferia</i>	x		<i>Torrubiella</i>	x	
<i>Phlebia</i>		x	<i>Trichaptum</i>	x	
<i>Phoma</i>	x		<i>Tricholoma</i>	x	
<i>Physcia</i>	x		<i>Tubaria</i>	x	
<i>Pichia</i>		x	<i>Urocystis</i>	x	
<i>Pleurophoma</i>	x		<i>Vagicola</i>	x	
<i>Polyporales</i> ¹	x		<i>Valsa</i>	x	
<i>Polyporus</i>		x	<i>Venturia</i>	x	
<i>Psathyrella</i>	x		<i>Vishniacozyma</i>	x	
<i>Pseudoplectania</i>	x		<i>Wallemia</i>	x	
<i>Pseudozyma</i>	x		<i>Wickerhamomyces</i>		x
<i>Puccinia</i>	x		<i>Xanthophyllomyces</i>	x	
<i>Resinicium</i>	x		<i>Xanthoria</i>	x	
<i>Rhodotorula</i>	x		<i>Xylomelasma</i>	x	
<i>Saccharomyces</i>	x		<i>Zygosaccharomyces</i>	x	

Vedlegg F: SEM



Figur F1: Skanning elektronmikroskop bilde av honningbietarm. (a) er ileum, (b) er midtmagen og (c) er rektum



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway