

# 利用基因條碼鑑定蜂花粉來源植物之研究

徐培修<sup>\*1</sup>、羅時玟<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 行政院農業委員會苗栗區農業改良場

<sup>2</sup> 國立嘉義大學植物醫學系

## 摘 要

本研究已建立分子鑑定蜂花粉來源植物之技術，以 *rbcL* 及 *trnH-psbA* 雙基因條碼對花粉 DNA 進行 PCR 增幅，與 GenBank 資料庫比對序列以鑑定植物種類。調查 2020 年春季南投縣名間鄉西方蜜蜂蜂場收集之蜂花粉，分離出 17 種蜂花粉，鑑定出 16 種植物，結果顯示 *rbcL* 單條碼種級鑑別力低，但 *trnH-psbA* 單條碼即可鑑定出多種植物。優勢粉源植物前三者為藿香薊 (*Ageratum conyzoides*)、山黃麻 (*Trema orientalis*)、大花咸豐草 (*Bidens pilosa* var. *radiata*)，重量佔比分別為 21%、21%、12%。臺灣植物基因條碼資料庫的建立，應有助於蜂花粉分子鑑定應用技術之基礎。

關鍵詞：基因條碼、蜂花粉、西方蜜蜂

## 前 言

西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 是常見的植物授粉媒介，被認為是極具經濟重要性的農作物授粉昆蟲 (Watanabe, 1994; Klein *et al.*, 2007; Le Conte and Navajas, 2008; Rader *et al.*, 2009)，亦為全球主要飼養的經濟蜂種。臺灣蜂產業目前普遍飼養的蜂種也是西方蜜蜂 (Lu, 2018)，以生產蜂蜜、蜂王漿及蜂花粉等為主，我國蜂產品年產值 (2019 年) 估計超過新臺幣 30 億元 (行政院農業委員會, 2020; 財政部關務署, 2021)，此外需蜂類授粉之農作物年產值 (2019 年) 估計達新臺幣 662 億元 (行政院農業委員會, 2020)，可見西方蜜蜂對於我國農業之貢獻不容小覷。

\*論文聯繫人

e-mail: pshsu@mdais.gov.tw

近 20 年來西方蜜蜂遭遇生存困境，歐洲及北美洲等地區出現西方蜜蜂消失的現象 (Stokstad, 2007; Brown and Paxton, 2009; Potts *et al.*, 2010)，棲地受到破壞或劇變導致食物資源匱乏推測為蜂群異常的原因之一 (Naug, 2009)，營養不良是影響蜜蜂健康的壓力根源 (Brodschneider and Crailsheim, 2010)。蜜蜂主要藉由造訪植物的花朵採集花蜜及花粉以獲取營養，花蜜提供碳水化合物作為能量來源 (Nicolson *et al.*, 2007)，花粉則提供蛋白質、脂質及其他微量營養素等生長發育不可或缺的物質 (Vaudo *et al.*, 2015)。由於不同植物的花粉對蜜蜂的營養價值差異甚鉅 (Haydak, 1970; Crailsheim, 1990)，因此粉源植物種類的調查對於維繫蜂群健康至關重要，且粉源植物多樣性及其組成直接或間接影響蜂產品（包括蜂蜜、蜂王漿、蜂花粉及蜂膠）的品質及安全。

確認環境中的蜜粉源植物是挑選蜂場之重要先決條件，蜂農須藉此評估蜂產品生產潛能。調查某一特定區域之粉源植物種類傳統上採用目視法，在蜂場周邊觀察蜜蜂採集植物花粉的行為，再鑑定植物種類。目視法之優點為可詳細記錄蜜蜂採集行為、植物生長環境及開花特性等（徐，2018；許等，2018），缺點諸如野外調查相當耗費時間人力，且外勤蜂覓食半徑平均為 5.5 公里 (Beekman and Ratnieks, 2000)，等於調查範圍約需涵蓋 9,500 公頃，難以收集完整資料，同時調查人員須具備植物分類學專業知識。由於目視法具直觀且操作簡易之特性，雖然無法避免調查偏差，且常發生非專業調查人員誤判植物種類之情事，目視法仍為我國調查粉源植物種類之主要方式（徐，2018；許等，2018）。另一種調查方式為孢粉法，收集蜂花粉以顯微鏡觀察花粉形態鑑定植物種類 (Shubharani *et al.*, 2013; Alves and dos Santos, 2014)。孢粉法之優點為免除野外調查作業即可收集蜂群覓食之完整資訊，缺點為須設置光學顯微鏡甚或電子顯微鏡，設備成本較高，同時調查人員須具備孢粉分類學專業知識，製作玻片標本及鑑定流程須累積豐富經驗並熟稔專業技術，且常有種級分類鑑別度不足之情形 (Rahl, 2008; Khansari *et al.*, 2012)。孢粉形態研究須建構於植物分類學基礎之上，是近百年開始發展的學門領域，臺灣孢粉分類學系統至 1972 年黃增泉編著之臺灣植物花粉圖誌出版後才有所依循（黃，1984），可惜至今我國孢粉分類專業人才仍屬少數，在蜂產業僅應用於蜂蜜產地鑑定技術 (Yang *et al.*, 2012)，並無應用於臺灣粉源植物辨識之研究。

隨著分子生物技術演進，近年利用基因條碼 (DNA barcoding) 鑑定生物物種成為生物多樣性領域之顯學 (Gregory, 2005)，基因條碼具備分析快速且富含分子演化資訊之特性，應用於花粉 DNA 研究即展現突破傳統孢粉形態分類瓶頸之潛力 (Bennet and Parnetti, 2006; Matsuki *et al.*, 2008; Longhi *et al.*, 2009)。基因條碼技術為利用生物基因組中特定相同位序的短 DNA 片段作為分子特徵，建立 DNA 片段資料庫用以比對鑑定生物物種，最先發現的動物基因條碼已廣泛應用於動物分類研究 (Hebert *et al.*, 2003)。植物基因條碼歷經多年研究仍有很大局限性，至今尚未找到一個特定基因座可作為植物通用基因條碼 (Chase and Fay, 2009; Chen *et al.*, 2010)，辨識度較高的 DNA 片段主要位於質體 DNA 的 *matK*、*rbcL* 及 *trnH-psbA* 非編碼間隔區，以及核糖體 DNA 的 *ITS* 等 4 個區域 (Li *et al.*, 2015)。*matK* 具高演化速率、適合的長度、明顯的種間差異及低核鹼基置換率 (Min and Hickey, 2007; Selvaraj *et al.*, 2008)，可惜目前尚未設計出通用引子對 (universal primer)。*rbcL* 具極易增幅的特性，廣泛應用於系統發生研究，但此基因演化速率緩慢，在被子植物種間差異小，僅適合作為科級或屬級通用基因條碼 (Kress *et al.*, 2005)。*trnH-psbA* 兩端均為高度保守的編碼區，目前已設計出被子植物通用引子對 (Shaw *et al.*, 2007)，且非編碼間隔區序列具極明顯的種間差異 (Kress and Erickson, 2007)，然而因分子演化複雜度過高、序列長度變化過大 (Chang *et al.*, 2006) 及高插入 / 缺失率 (insertion/deletion rate) 導致序列比對易出現歧異的結果 (Chase *et al.*, 2007)。*ITS* 位於 rRNA 基因之間，而 rRNA 基因高度保守的序列普遍存在於各種生物，目前已設計出通用引子對 (White *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 2016)，且 *ITS* 序列具極明顯的種間差異，已廣泛應用於系統發生研究 (Álvarez and Wendel, 2003)，但由於分子協同演化 (concerted evolution) 不完整及其易受真菌 *ITS* 序列污染之特性導致擴增及定序的難度大幅提升 (Hollingsworth *et al.*, 2011)。綜上所述，多數研究建議植物基因條碼須包含兩個以上基因座 (Chase *et al.*, 2007; Kress and Erickson, 2007; Fazekas *et al.*, 2008; CBOL Plant Working Group, 2009; Hollingsworth *et al.*, 2011)，近期應用於花粉 DNA 研究的組合有 *rbcL* + *matK* (Richardson *et al.*, 2015)、*rbcL* + *trnH-psbA* (Galimberti *et al.*, 2014; Bruni *et al.*, 2015) 及 *rbcL* + *ITS* (Bell *et al.*, 2017) 等。

鑒於臺灣針對蜜粉源植物種類之研究或調查報告非常少（安及鄭，1993；徐等，2019），蜂產業卻極需瞭解蜜粉源植物種類及分布，因此必須建立精準、快速及簡易之調查方式以改善現況。考量各基因座之特性，以使用通用引子對且易增幅為前提，本研究嘗試利用 *rbcL* + *trnH-psbA* 的組合鑑定蜂花粉來源植物，評估此方法於我國應用之可行性。本研究以分析春季南投縣一處蜂場收集之蜂花粉為例，期望能夠以此方法瞭解蜂場周圍環境中粉源植物的物種組成及其生物學特性。

## 材料與方法

### 一、蜂花粉樣本來源

本研究場域為苗栗區農業改良場南投蜂場，位於南投縣名間鄉 (E23.85183, N120.69447)。調查期間自 2020 年 3 月 9 日至 2020 年 3 月 13 日，共 5 日，此段期間以目視法判定蜂場周邊主要開花植物為藿香薊 (*Ageratum conyzoides*)、大花咸豐草 (*Bidens pilosa* var. *radiata*) 及荔枝 (*Litchi chinensis*)，荔枝栽培面積約為 41 公頃。場域內共飼養 66 群西方蜜蜂 (*Apis mellifera*)，平均蜂勢為 8 脾，每日自 7:00 至 12:00 於蜂箱出入口架設花粉收集器，採集到之蜂花粉立刻保存至  $-20^{\circ}\text{C}$  直到後續分析時才取出使用。調查期間採集到的蜂花粉總重量約為 22 公斤，將所有蜂花粉混合均勻後，隨機自其中取出 205.2g 作為本研究分析使用的樣本。

### 二、花粉粒形態分類及鑑定

本研究以光學顯微鏡 (Zeiss, Axio Scope A1, China) 觀察樣本中所有花粉團，總計約有 36000 個花粉團。依花粉粒形態特徵區辨，當一個花粉團中相同形態的花粉粒數量達 90% 以上時定義為單一植物來源花粉團，計算方式為每 100 顆花粉粒中有 90 顆以上相同，否則為混合植物來源花粉團。本研究之樣本分離出 17 種單一植物來源花粉團，分別編號為 A~Q 並記錄其重量，總計 160.3g，混合植物來源花粉團為 44.9g。後續分析僅使用單一植物來源花粉團，觀察其花粉粒形態並依臺灣植物花粉圖誌分類檢索表鑑定植物種類 (Huang, 1972)。

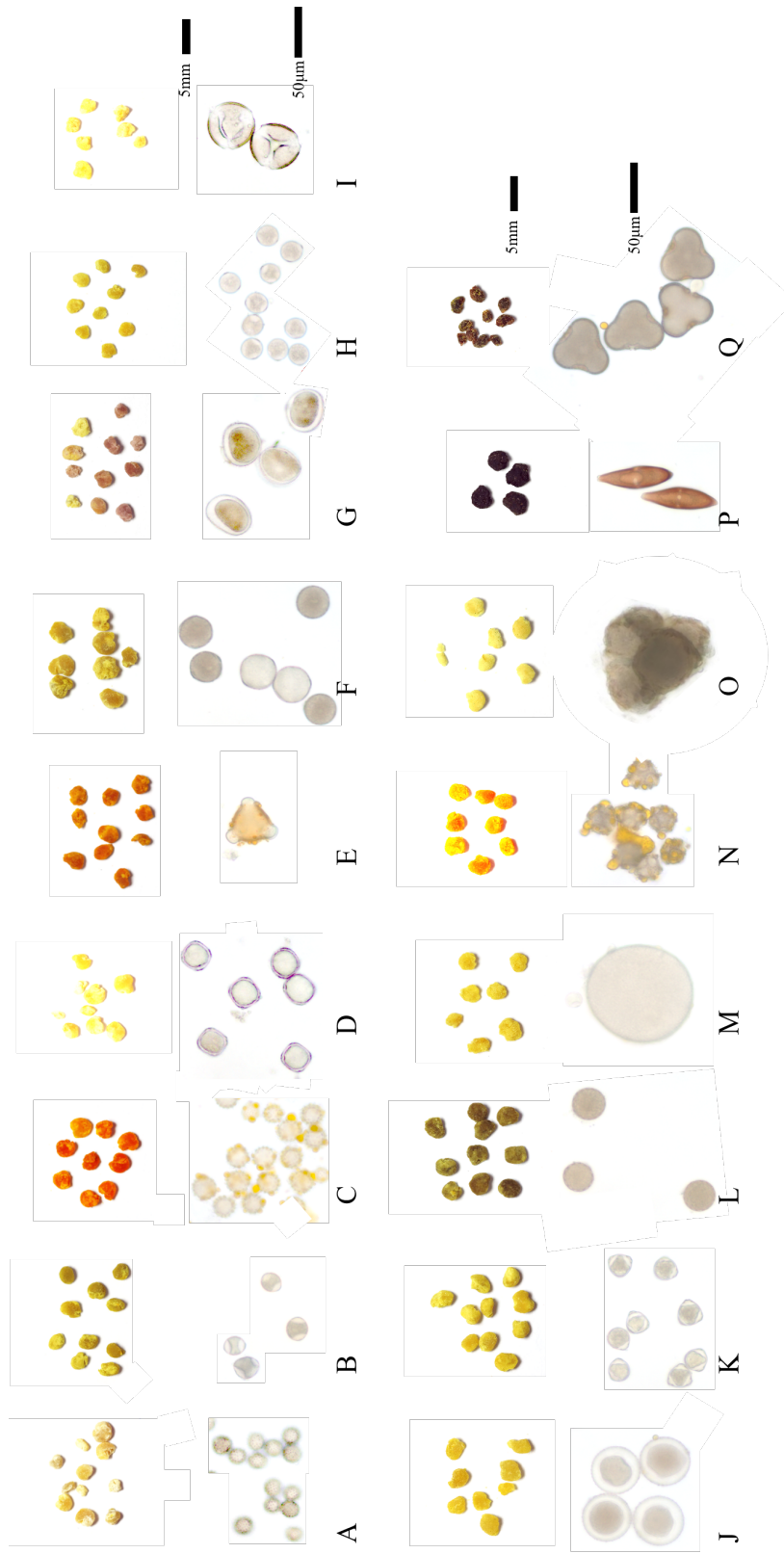
### 三、花粉基因分子鑑定

分別取花粉團樣本 A~Q 各 100mg，以 Plant Genomic DNA Purification Kit (Protech, Taiwan)，依照說明書之步驟進行 DNA 萃取。以萃取之 DNA 為模板，分別利用 *rbcL* 及 *trnH-psbA* 兩個基因通用引子對進行 PCR 反應擴增序列，*rbcL* 使用的引子對為 F: 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' (Kress and Erickson, 2007) 和 R: 5'-ATGAATGTCTACGCGGTGGACT-3' (de Vere *et al.*, 2012)，*trnH-psbA* 使用的引子對為 F: 5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3' (Sang *et al.*, 1997) 和 R: 5'-CGCGCATGGTGGATTACAATCC-3' (Ford *et al.*, 2009)，兩者之 PCR 反應設定相同，分別進行處理及分析。每一 PCR 反應總體積為 50 $\mu$ l，內容物含 F 引子 1 $\mu$ l、R 引子 1 $\mu$ l、Fast-Run<sup>TM</sup> Taq 5x Master Mix (Protech, Taiwan) 10 $\mu$ l、花粉團樣本 DNA 4 $\mu$ l 及滅菌二次水 34 $\mu$ l。反應條件為 (1) 94 $^{\circ}$ C，9 分鐘 (2) 90 $^{\circ}$ C，30 秒、58 $^{\circ}$ C，30 秒、72 $^{\circ}$ C，40 秒為一循環，進行 40 循環 (3) 72 $^{\circ}$ C，7 分鐘。反應結束後，PCR 產物以 1.5% 瓊脂膠體進行電泳，於紫外光下觀察是否有產物及產物分子量大小，再將產物樣本送交商業公司 (Genomics, Taiwan) 進行一代定序 (Sanger sequencing) 分析。後續以 Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) 軟體針對雙向序列人工比對及除錯，將修正完成之 *rbcL* 及 *trnH-psbA* 兩組樣本序列移除引子片段後以 BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) 軟體與 GenBank 資料庫序列比對相似程度以鑑定植物種類。

## 結 果

以花粉粒形態特徵區辨分離出的 17 種單一植物來源花粉團，樣本編號 A~Q，其花粉團顏色、外觀及花粉粒形態如圖一所示。比較孢粉分類與分子分類之判定結果並無歧異，而 *rbcL* 與 *trnH-psbA* 兩組基因條碼之判定結果亦無歧異。但三種特徵鑑定之分類單元 (taxon) 不盡相同，以致分類階層鑑別度有所差異，孢粉形態特徵種級、屬級鑑別度均為 47%、科級鑑別度為 94%；*rbcL* 單條碼之種級鑑別度最低，僅 35%，屬級鑑別度為 71%，科級鑑別度為 94%；*trnH-psbA* 單條碼之種級鑑別度較高，為 82%，屬級、科級鑑別度均為 94%；若結合雙條碼之種級鑑別度最高，達 88%，屬級、科級鑑別度均為 94% (表一)。





圖一、蜂花粉樣本之花粉團（上）及花粉粒（下），(A) 藿香薊 (B) 山黃麻 (C) 咸豐草 (D) 欖樹 (E) 茶樹 (F) 柚 (G) 王棕 (H) 葎草 (I) 銀合歡 (J) 銳脈木薑子 (K) 楊梅 (L) 青莧 (M) 玉米 (N) 兔仔菜 (O) 水丁香 (P) 未知物種 (Q) 木棉。

Fig. 1. Bee pollen pellets (above) and pollen grains (below) of samples. (A) *Ageratum conyzoides* (B) *Trema orientalis* (C) *Bidens pilosa* (D) *Zelkova serrata* (E) *Camellia sinensis* (F) *Citrus maxima* (G) *Roystonea regia* (H) *Humulus scandens* (I) *Leucaena leucocephala* (J) *Litsea acutivena* (K) *Morella rubra* (L) *Amaranthus hybridus* (M) *Zea mays* (N) *Ixeris chinensis* (O) *Ludwigia octovalvis* (P) Unknown (Q) *Bombax ceiba*.

表一、以孢粉形態分類特徵、*rbcL* 及 *trnH-psbA* 基因條碼鑑定蜂花粉來源植物種類之結果比較

Table 1. Comparison of the identification results of bee pollen samples based on the palynology, *rbcL* and *trnH-psbA* barcodes

Sample ID	Palynological characteristics		<i>rbcL</i> sequence alignments		<i>trnH-psbA</i> sequence alignments	
	Identifiable taxonomic rank	Identified taxon	Identifiable taxonomic rank	Identified taxon	Identifiable taxonomic rank	Identified taxon
A	Subfamily	Asteroidae	Species	<i>Ageratum conyzoides</i>	Species	<i>Ageratum conyzoides</i>
B	Species	<i>Trema orientalis</i>	Species	<i>Trema orientalis</i>	Species	<i>Trema orientalis</i>
C	Subfamily	Asteroidae	Genus	<i>Bidens</i> spp.	Species	<i>Bidens pilosa</i>
D	Species	<i>Zelkova serrata</i>	Genus	<i>Zelkova</i> spp.	Species	<i>Zelkova serrata</i>
E	Family	Theaceae	Genus	<i>Camellia</i> spp.	Species	<i>Camellia sinensis</i>
F	Family	Rutaceae	Genus	<i>Citrus</i> spp.	Species	<i>Citrus maxima</i>
G	Family	Areaceae	Genus	<i>Roystonea</i> spp.	Genus	<i>Roystonea</i> spp.
H	Species	<i>Humulus scandens</i>	Species	<i>Humulus scandens</i>	Species	<i>Humulus scandens</i>
I	Family	Fabaceae	Species	<i>Leucaena leucocephala</i>	Genus	<i>Leucaena</i>
J	Species	<i>Litsea acutivena</i>	Family	Lauraceae	Species	<i>Litsea acutivena</i>
K	Species	<i>Morella rubra</i>	Species	<i>Morella rubra</i>	Species	<i>Morella rubra</i>
L	Family	Amaranthaceae	Genus	<i>Amaranthus</i> spp.	Species	<i>Amaranthus hybridus</i>
M	Species	<i>Zea mays</i>	Subtribe	Chionachninae/Tripsacinae	Species	<i>Zea mays</i>
N	Tribe	Cichorieae	Tribe	Cichorieae	Species	<i>Ixeris chinensis</i>
O	Species	<i>Ludwigia octovalvis</i>	Species	<i>Ludwigia octovalvis</i>	Species	<i>Ludwigia octovalvis</i>
P	None	Unidentifiable	None	Unidentifiable	None	Unidentifiable
Q	Species	<i>Bombax ceiba</i>	Family	Malvaceae/Tiliaceae	Species	<i>Bombax ceiba</i>

依據花粉團樣本之 *rbcL* 及 *trnH-psbA* 基因條碼與 GenBank 資料庫序列比對結果，再以雙條碼序列交叉對照後鑑定出 16 種植物，相似度最高之序列登錄編號及其序列相似度皆列於表二。其中樣本 G 雖僅能鑑別至屬級，但臺灣該屬僅 1 種，因此判定該樣本為王棕 (*Roystonea regia*)；另樣本 P 雙條碼序列比對相似度均太低，且花粉粒形態特徵不明，因此無法判定為何種植物。*rbcL* 基因條碼序列相似度較高，相似度 100% 的種類有 14 種，相似度 99% 以上的種類有 2 種；*trnH-psbA* 基因條碼序列相似度較低，相似度 100% 的種類僅 5 種，相似度 99% 以上的種類有 7 種，相似度 90-99% 的種類有 4 種。由於非編碼間隔區序列中常會出現多個重複之腺嘌呤或胸腺嘧啶 (AT-rich region)，此片段可能影響定序分析之結果 (Devey *et al.*, 2009)，本研究之樣本中具同元聚合情形 (homopoly) 的種類有 8 種，此 8 種 *trnH-psbA* 基因條碼序列相似度均未達 100% (表二)。

花粉團樣本之個別重量占樣本總重量之百分比列於表三，前三名分別為藿香薊、山黃麻 (*Trema orientalis*)、大花咸豐草 (*B. pilosa*)，重量佔比分別為 21%、21%、12%，重量佔比 2-5% 的種類有 6 種，重量佔比 1% 以下的種類有 8 種，混合植物來源花粉團重量佔比為 22%。在本研究已鑑定之 16 種蜂花粉來源植物中，25% 為農作物，75% 為非農作物；38% 為栽培植物，62% 為野生植物；44% 為草本植物，56% 為木本植物；62% 為外來種，38% 為原生種 (表三)。

## 討 論

本研究分離出 17 種蜂花粉，以植物基因條碼成功鑑定其中 16 種，分別歸屬於 13 科 16 屬，鑑別度高達 94%；若以孢粉分類特徵僅能成功鑑定其中 7 種，鑑別度為 47%，因此分子鑑定技術未來應用於我國蜜粉源植物調查之可行性極高。儘管 *rbcL* 的種級鑑別能力有限，但在大多數情況下 *trnH-psbA* 的種級鑑別度很高，而本研究樣本中有 9 種必須依賴 *trnH-psbA* 序列才得以成功鑑定，是此方法成功的關鍵所在。*rbcL* 在本研究樣本分析中的表現不佳並非異常，其實與多數研究結果相符 (Hollingsworth *et al.*, 2011; Bruni *et al.*, 2012)，不過 CBOL Plant Working Group (2009)



表二、蜂花粉來源植物之分子鑑定

Table 2. Molecular identification of bee pollen samples

Sample ID	Identified plants	<i>rbcL</i> molecular identification			<i>trmH-psbA</i> molecular identification			
		Sequence ID	I	I%	Sequence ID	I	I%	HP
A	<i>Ageratum conyzoides</i>	MK905238.1	542/542	100.00	GQ435093.1	401/401	100.00	N
B	<i>Trema orientalis</i>	KJ688644.1	542/542	100.00	KM895387.1	380/384	98.96	N
C	<i>Bidens pilosa</i>	NC_047269.1	542/542	100.00	MN433106.1	450/463	97.19	Y
D	<i>Zelkova serrata</i>	NC_041074.1	542/542	100.00	NC_041074.1	337/339	99.41	Y
E	<i>Camellia sinensis</i>	MH460639.1	542/542	100.00	KU198266.1	464/465	99.78	Y
F	<i>Citrus maxima</i>	KY055833.1	542/542	100.00	KY055833.1	511/515	99.22	Y
G	<i>Roystonea regia</i>	AY012488.1	542/542	100.00	MK756791.1	691/701	98.57	Y
H	<i>Humulus scandens</i>	NC_039730.1	542/542	100.00	NC_039730.1	371/371	100.00	N
I	<i>Leucaena leucocephala</i>	MH549900.1	542/542	100.00	MH069941.1	505/505	100.00	N
J	<i>Litsea acutivena</i>	NC_050362.1	542/542	100.00	NC_050362.1	448/451	99.33	Y
K	<i>Morella rubra</i>	KY476637.1	542/542	100.00	KY476637.1	445/445	100.00	N
L	<i>Amaranthus hybridus</i>	MH598930.1	542/542	100.00	MF143703.1	281/282	99.65	Y
M	<i>Zea mays</i>	MK348606.1	535/540	99.07	GU575286.1	585/586	99.83	N
N	<i>Ixeris chinensis</i>	MK534800.1	542/542	100.00	LT722062.1	323/355	90.99	Y
O	<i>Ludwigia octovalvis</i>	MH050042.1	542/542	100.00	KX827312.1	495/495	100.00	N
P	Unidentifiable							
Q	<i>Bombax ceiba</i>	NC_037494.1	541/542	99.82	NC_037494.1	488/489	99.80	N

Note: Sequence ID = accession number of sequence match in GenBank; I = base pair identities; HP = presence of AT rich region within sequence.

表三、蜂花粉的物種組成、樣本重量占比及可能來源

Table 3. Nectar composition, percentage (w/w) and sources of pollen samples

Sample ID	Identified plants	W%	Economics	Cultivation	Herb/Wood	Origin
A	<i>Ageratum conyzoides</i>	21.386	Non-crop	Wild	Herb	Alien
B	<i>Trema orientalis</i>	21.136	Non-crop	Wild	Tree	Native
C	<i>Bidens pilosa</i>	11.849	Non-crop	Wild	Herb	Alien
D	<i>Zelkova serrata</i>	5.450	Non-crop	Wild	Tree	Native
E	<i>Camellia sinensis</i>	4.376	Crop	Cultivated	Shrub	Alien
F	<i>Citrus maxima</i>	2.689	Crop	Cultivated	Tree	Alien
G	<i>Roystonea regia</i>	2.654	Non-crop	Cultivated	Tree	Alien
H	<i>Humulus scandens</i>	2.030	Non-crop	Wild	Herb	Native
I	<i>Leucaena leucocephala</i>	2.011	Non-crop	Wild	Tree	Alien
J	<i>Liitsea acutivena</i>	1.291	Non-crop	Wild	Tree	Native
K	<i>Morella rubra</i>	1.059	Crop	Cultivated	Tree	Native
L	<i>Amaranthus hybridus</i>	0.985	Non-crop	Wild	Herb	Alien
M	<i>Zea mays</i>	0.566	Crop	Cultivated	Herb	Alien
N	<i>Ixeris chinensis</i>	0.487	Non-crop	Wild	Herb	Native
O	<i>Ludwigia octovalvis</i>	0.068	Non-crop	Wild	Herb	Alien
P	Unidentifiable	0.060				
Q	<i>Bombax ceiba</i>	0.003	Non-crop	Cultivated	Tree	Alien

Note: W = weight of single sample/weight of total samples

建議選用此基因條碼，以維持一定程度的標準化及全球基因資料庫之兼容性。雖然 *trnH-psbA* 單條碼幾乎可辨別本研究樣本中所有物種，但這是一個非編碼間隔區，富含單核苷酸重複序列，可能導致定序錯誤以致物種鑑定錯誤 (Devey *et al.*, 2009)，而本研究樣本中有 8 種有此情形。其中樣本 G 的 *trnH-psbA* 序列片段較長，同元聚合物使得定序讀取提早終止，導致序列比對難度增加。此外樣本 L 的 *trnH-psbA* 序列片段較短，Kress *et al.* (2005) 發現某些物種的 *trnH-psbA* 序列過短以致缺乏種級鑑別力，所幸本次分析仍可比對至種級階層。綜上所述，本研究建議分子鑑定技術仍須採用 *rbcL* + *trnH-psbA* 雙基因條碼的組合才能確保種級鑑別力。

本研究認為臺灣孢粉分類系統鑑別度不高之原因有三：(1) 許多物種之花粉粒具多型性，易造成誤判或特徵混淆。(2) 花粉經蜜蜂混合花蜜及唾液後，常有花粉壁破裂或特徵模糊的情形。(3) 許多外來物種於參考文獻中未有紀錄。相較於以花粉粒形態鑑定蜂花粉來源植物，基因條碼無疑是更快速且高度標準化的方法，而此技術也更適合分析包含不同物種 DNA 的複雜環境基質，像是蜂花粉這類多種花粉的混合物 (Hajibabaei *et al.*, 2011; Galimberti *et al.*, 2012, 2014; Yoccoz *et al.*, 2012)。基因條碼可與次世代定序技術 (Next-Generation Sequencing) 結合使用以獲得更多 DNA 片段數，進而可以處理大量花粉樣品或深度分析植物與授粉者之間的交互反應 (Bell *et al.*, 2017)，甚至花粉含量非常少的蜂蜜也可進行分析 (de Vere *et al.*, 2017; Lucas *et al.*, 2018; Utzeri *et al.*, 2018)。然而花粉分子鑑定技術之應用成效取決於本土植物基因條碼資料庫完整與否 (Burgess *et al.*, 2011; Bruni *et al.*, 2012; de Vere *et al.*, 2012)，例如樣本 N 的 *trnH-psbA* 序列相似度僅 90.99% (表二)，在此樣本孢粉特徵及 *rbcL* 序列沒有鑑別力的狀況下，樣本 N 很可能其實並非兔仔菜 (*Ixeris chinensis*) 而是同族近似物種，只是 GenBank 未收錄該物種之序列。又例如樣本 P 在資料庫中無法交叉比對到相應物種 (表一)，可能為經濟重要性很低或較為稀少的物種，然而使用孢粉特徵亦難以檢索，本研究不排除該樣本並非花粉之可能性。總之，臺灣植物總數眾多且歧異度相當高，約有 3600 種被子植物 (許等, 2010)，目前我國並未有計畫性的建立植物基因條碼資料庫，這將會是未來應用分子鑑定技術之最大瓶頸。

由蜂花粉的物種組成及花粉團樣本重量占比可得知本研究場域之優勢粉源植物 (表三)。調查期間南投蜂場的主要蜜源植物為荔枝，然而在本研究分離出的 17

種花粉團樣本中不存有荔枝花粉，可能原因有三：(1) 荔枝雄花花期已過，蜜蜂沒有採集到荔枝花粉。(2) 因環境氣候或植物生理原因，荔枝花粉產出率低下。(3) 多數造訪荔枝花之外勤蜂以採蜜為主，採集花粉量極低。然而本研究無法證實上述理論。另針對主要粉源植物，原先僅觀察到藿香薊及大花咸豐草，除此二者外本研究證實山黃麻亦為產粉量高之主要粉源植物，此外大花咸豐草僅占 12% 位居第三名，有別於坊間普遍認定之刻板印象。本研究無法釐清造成花粉採集量差異之原因來自於蜜蜂天生偏好不同，或植群面積、距離不同，或植物開花數、花粉量不同等，然而三種主要粉源植物重量占比合計為 54%，顯見蜂群能利用的粉源植物雖然非常多元，但仍有選擇特定主要造訪植物之趨勢，de Vere *et al.* (2017) 研究亦指出英國威爾斯出產的蜂蜜中含有 39 種花粉，不過其中 3 種花粉數量合計即占 60%，為主要蜜粉源植物。另本研究樣本中菊科 (Asteraceae) 植物花粉為大宗，重量占比合計為 34%，研究已證實菊科花粉對蜜蜂之營養價值較差，不易吸收消化，長期食用會增加蜂群死亡率 (Nicolson and Human, 2013; Frias *et al.*, 2015)，所以應補充餵飼非菊科之花粉蜂糧來維持蜂群健康。本研究統計蜂群能利用的粉源植物主要以非農作物、野生的外來種植物居多，因樣本過小並無代表性，但本研究提出之方法後續非常值得擴大採樣範圍，用於初步對養蜂地點周邊蜜粉源植物的探勘，或探索未知林地蜜粉源資源，幫助蜂農挑選適合場地或深入瞭解當地環境，將可提供決定性的輔助資訊。

## 結 論

本研究闡明藉由植物基因條碼分析本地蜜粉源植物類群將有助於蜂農養蜂管理及蜂產品生產之決策，而分子鑑定技術精準、快速及簡易之操作方式是耗時費力的孢粉分類學之有效替代方法，此技術對其他研究領域如植物與授粉者交互作用的生態學研究，至蜜蜂營養來源的生理學研究均有廣泛的參考價值。

## 誌 謝

本試驗南投蜂場之養蜂管理工作、蜂花粉收集及保存由黃玉員小姐及陳榮宗先生協助，謹表謝忱。

## 引用文獻

- 行政院農業委員會。2020。農業統計年報（108年）。
- 安奎、鄭元春。1993。臺灣產蜜源植物圖說。臺北：臺灣省立博物館。
- 徐培修。2018。蜜蜂蜜粉源植物調查方法與應用。苗栗區農業專訊 83：16-18。
- 徐培修、顏君靜、吳姿嫻。2019。生態廊道蜜粉源植物圖鑑。苗栗：行政院農業委員會苗栗區農業改良場。
- 財政部關務署。2021。海關進出口統計。檢自 <https://portal.sw.nat.gov.tw/APGA/GA35>。
- 許再文、黃朝慶、牟善傑、王震哲。2010。台灣植物的多樣性。科學發展 456：22-31。
- 許俊凱、陳芬蕙、吳家禎、汪澤宏。2018。林木開花的商機 — 蓮華池的蜜源植物初探。林業研究專訊 25：28-35。
- 黃增泉。1984。簡介臺灣之孢粉學研究。行政院國家科學委員會研究彙刊 B：基礎科學 6：59-70。
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Álvarez, I. and J. F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29:417-434.
- Alves, R. de F. and F. de A. R. dos Santos. 2014. Plant sources for bee pollen load production in Sergipe, northeast Brazil. *Palynology* 38:90-100.
- Beekman, M. and F. L. W. Ratnieks. 2000. Long range foraging in the honey bee. *Funct. Ecol.* 14:490-496.
- Bell, K. L., J. Fowler, K. S. Burgess, E. K. Dobbs, D. Gruenewald, B. Lawley, C. Morozumi, and B. J. Brosi. 2017. Applying pollen DNA metabarcoding to the study of plant-pollinator interactions. *Appl. Plant Sci.* 5:1600124.
- Bennet, K. D. and L. Parducci. 2006. DNA from pollen: principles and potential. *The Holocene* 16:1031-1034.
- Brodshneider, R. and K. Crailsheim. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41:278-294.
- Brown, M. J. F. and R. J. Paxton. 2009. The conservation of bees: A global perspective. *Apidologie* 40:410-416.



- Bruni, I., F. de Mattia, S. Martellos, A. Galimberti, P. Savadori, M. Casiraghi, P. L. Nimis, and M. Labra. 2012. DNA barcoding as an effective tool in improving a digital plant identification system: a case study for the area of Mt. Valerio, Trieste (NE Italy). *PLoS ONE* 7:e43256.
- Bruni, I., A. Galimberti, L. Caridi, D. Scaccabarozzi, F. de Mattia, M. Casiraghi, and M. Labra. 2015. A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey. *Food Chem.* 170:308-315.
- Burgess, K. S., A. J. Fazekas, P. R. Kesanakurti, S. W. Graham, B. C. Husband, S. G. Newmaster, D. M. Percy, M. Hajibabaei, and S. C. H. Barrett. 2011. Discriminating plant species in a local temperate flora using the rbcL+matK DNA barcode. *Methods Ecol. Evol.* 2:333-340
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:12794-12797.
- Chang, C. C., H. C. Lin, I. P. Lin, T. Y. Chow, H. H. Chen, W. H. Chen, C. H. Cheng, C. Y. Lin, S. M. Liu, and S. M. Chaw. 2006. The chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite* (Orchidaceae): comparative analysis of evolutionary rate with that of grasses and its phylogenetic implications. *Mol. Biol. Evol.* 23:279-291.
- Chase, M. W. and M. F. Fay. 2009. Barcoding of plants and fungi. *Science* 325:682-683.
- Chase, M. W., R. S. Cowan, P. M. Hollingsworth, C. van den Berg, S. Madrinan, G. Petersen, O. Seberg, T. Jorgensen, K. M. Cameron, M. Carine, N. Pedersen, T. A. J. Hedderson, F. Conrad, G. A. Salazar, J. E. Richardson, M. L. Hollingsworth, T. G. Barraclough, L. Kelly, and M. Wilkinson. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56:295-299.
- Chen, S., H. Yao, J. Han, C. Liu, J. Song, L. Shi, Y. Zhu, X. Ma, T. Gao, X. Pang, K. Luo, Y. Li, X. Li, X. Jia, Y. Lin, and C. Leon. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE* 5:e8613.
- Cheng, T., C. Xu, L. Lei, C. Li, Y. Zhang, and S. Zhou. 2016. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Mol. Ecol. Resour.* 16:138-149.
- Crailsheim, K. 1990. The protein balance of the honey bee worker. *Apidologie* 21:417-430.

- de Vere, N., T. C. G. Rich, C. R. Ford, S. A. Trinder, C. Long, C. W. Moore, D. Satterthwaite, H. Davies, J. Allainguillaume, S. Ronca, T. Tatarinova, H. Garbett, K. Walker, and M. J. Wilkinson. 2012. DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. *PloS One* 7:e37945.
- de Vere, N., L. E. Jones, T. Gilmore, J. Moscrop, A. Lowe, D. Smith, M. J. Hegarty, S. Creer, and C. R. Ford. 2017. Using DNA metabarcoding to investigate honey bee foraging reveals limited flower use despite high floral availability. *Sci. Rep.* 7:42838
- Devey, D. S., M. W. Chase, and J. J. Clarkson. 2009. A stuttering start to plant DNA barcoding: microsatellites present a previously overlooked problem in non-coding plastid regions. *Taxon* 58:7-15.
- Fazekas, A. J., K. S. Burgess, P. R. Kesanakurti, S. W. Graham, S. G. Newmaster, B. C. Husband, D. M. Percy, M. Hajibabaei, and S. C. H. Barrett. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3:e2802.
- Ford, C. S., K. L. Ayres, N. Toomey, N. Haider, J. van Alpen Stahl, L. J. Kelly, N. Wikströmn, P. M. Hollingsworth, R. J. Duff, S. B. Hoot, R. S. Cowan, M. W. Chasem, and M. J. Wilkinson. 2009. Selection of candidate DNA barcoding regions for use on land plants. *Bot. J. Linn. Soc.* 159:1-11.
- Frias, B. E. D., C. D. Barbosa, A. P. Lourenço. 2015. Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): impact on adult health. *Apidologie* 47:15-25.
- Galimberti, A., F. de Mattia, A. Losa, I. Bruni, S. Federici, M. Casiraghi, S. Martellos, and M. Labra. 2012. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Res. Int.* 50:55-63.
- Galimberti, A., F. de Mattia, I. Bruni, D. Scaccabarrozi, A. Sandionigi, M. Barbuto, M. Casiraghi, and M. Labra. 2014. A DNA barcoding approach to characterize pollen collected by honeybees. *PloS ONE* 9:e109363.
- Gregory, T. R. 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature* 434:1067.
- Hajibabaei, M., S. Shokralla, X. Zhou, G. A. Singer, and D. J. Baird. 2011. Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS ONE* 6:e17497.

- Haydak, M. H. 1970. Honey bee nutrition. Annual Reviews of Entomology 42:611-643.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. de Waard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. Royal Soc. B 270:313-321.
- Hollingsworth, P. M., S. W. Graham, and D. P. Little. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. PLoS ONE 6:e19254.
- Huang, T. C. 1972. Pollen flora of Taiwan. p. 297. National Taiwan University, Botany Dept., Taipei.
- Khansari, E., S. Zarre, K. Alizadeh, F. Attar, F. Aghabeigi, and Y. Salmaki. 2012. Pollen morphology of *Campanula* (Campanulaceae) and allied genera in Iran with special focus on its systematic implication. Flora 207:203-211.
- Klein, A. M., B. E. Vaissière, J. H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S. A. Cunningham, C. Kremen, and T. Tschardt. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc. Royal Soc. B 274:303-313.
- Kress, W. J. and D. L. Erickson. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. PLoS ONE 2:e508.
- Kress, W. J., K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt, and D. H. Janzen. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102:8369-8374.
- Le Conte, Y. and M. Navajas. 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. Rev. Sci. Tech. 27:499-510.
- Li, X. W., Y. Yang, R. J. Henry, M. Rossetto, Y. Wang, and S. Chen. 2015. Plant DNA barcoding: from gene to genome. Biol. rev. biol. proc. Camb. Philos. Soc. 90:157-166.
- Longhi, S., A. Cristofori, P. Gatto, F. Cristofolini, M. S. Grando, and E. Gottardini. 2009. Biomolecular identification of allergenic pollen: a new perspective for aerobiological monitoring? Ann. Allergy Asthma Immunol. 103:508-514.
- Lu, M. C. 2018. Beekeeping on Taiwan Island. In: P. Chantawannakul et al. (eds), Asian beekeeping in the 21st century p. 159-173. Springer, Singapore.
- Lucas, A., O. Bodger, B. J. Brosi, C. R. Ford, D. W. Forman, C. Greig, M. Hegarty, L. Jones, P. J. Neyland, and N. de Vere. 2018. Floral resource partitioning by

- individuals within generalised hoverfly pollination networks revealed by DNA metabarcoding. *Sci. Rep.* 8:5133.
- Matsuki, Y., R. Tateno, M. Shibata, and Y. Isagi. 2008. Pollination efficiencies of flower-visiting insects as determined by direct genetic analysis of pollen origin. *Am. J. Bot.* 95:925-930.
- Min, X. J. and D. A. Hickey. 2007. Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. *Mol. Ecol. Notes* 7:365-373.
- Naug, D. 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biol. Conserv.* 142:2369-2372.
- Nicolson, S. W. and H. Human. 2013. Chemical composition of the 'low quality' pollen of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Apidologie* 44:144-52.
- Nicolson, S. W., Nepi M., and Pacini E. 2007. Nectaries and nectar p. 395. Springer, Dordrecht.
- Potts, S. G., J. C. Biesmeijer, C. Kremen, P. Neumann, O. Schweiger, and W. E. Kunin. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25:345-353.
- Rader, R., B. G. Howlett, S. A. Cunningham, D. A. Westcott, L. E. Newstrom-Lloyd, M. K. Walker, D. A. J. Teulon, and W. Edwards. 2009. Alternative pollinator taxa are equally efficient but not as effective as the honeybee in a mass flowering crop. *J. Appl. Ecol.* 46:1080-1087.
- Rahl, M. 2008. Microscopic identification and purity determination of pollen grains. *Methods Mol. Med.* 138:263-269.
- Richardson, R. T., C. H. Lin, J. O. Quijia, N. S. Riusech, K. Goodell, and R. M. Johnson. 2015. Rank-based characterization of pollen assemblages collected by honey bees using a multi-locus metabarcoding approach. *Appl. Plant Sci.* 3:1500043.
- Sang, T., D. J. Crawford, and T. F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am. J. Bot.* 84:1120-1136.
- Selvaraj, D., R. K. Sarma, and R. Sathishkumar. 2008. Phylogenetic analysis of chloroplast *matK* gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. *Bioinformation* 3:24-27.
- Shaw, J., E. B. Lickey, E. E. Schilling, and R. L. Small. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am. J. Bot.* 94:275-288.

- Shubharani, R., P. Roopa, and V. Sivaram. 2013. Pollen morphology of selected bee forage plants. *Global Journal of Bio-Science and Biotechnology* 2:82-90.
- Sievers, F., A. Wilm, D. G. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J. D. Thompson, and D. G. Higgins. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7:539.
- Stokstad, E. 2007. The case of the empty hives. *Science* 316:970-972.
- Utzeri, V. J., A. Ribani, G. Schiavo, F. Bertolini, S. Bovo, and L. Fontanesi. 2018. Application of next generation semiconductor based sequencing to detect the botanical composition of monofloral, polyfloral and honeydew honey. *Food Control* 86:342-349.
- Vaudo, A. D., J. F. Tooker, C. M. Grozinger, and H. M. Patch. 2015. Bee nutrition and floral resource restoration. *Curr. Opin. Insect Sci.* 10:133-141.
- Watanabe, M. E. 1994. Pollination worries rise as honey bees decline. *Science* 265:1170.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis *et al.* (eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* p. 315-322. Academic, London.
- Yang, F. C., S. H. Chen, and J. T. Wu. 2012. Combining melissopalynology and flavonoid analysis for the identification of Litchi- and Longan-honeys in Taiwan. 12th International Palynological Congress, 23-30 Aug., 2012 in Tokyo, Japan.
- Yoccoz, N. G., K. A. Bråthen, L. Gielly, J. Haile, M. E. Edwards, T. Goslar, H. Von Stedingk, A. K. Brysting, E. Coissac, F. Pompanon, J. H. Sønstebo, C. Miquel, A. Valentini, F. De Bello, J. Chave, W. Thuiller, P. Wincker, C. Cruaud, F. Gavory, M. Rasmussen, M. T. P. Gilbert, L. Orlando, C. Brochmann, E. Willerslev, and P. Taberlet. 2012. DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth form diversity. *Mol. Ecol.* 21:3647-3655.



# Study on identification of bee pollen flora using DNA barcoding

Pei-Shou Hsu\*<sup>1</sup>, Shi-Wen Luo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan

<sup>2</sup> Department of Plant Medicine, National Chiayi University

## ABSTRACT

In the present study, we investigated molecular identification technology of species origin for bee pollen pellets using *rbcL* and *trnH-psbA* multibarcoding to amplify pollen DNA, and to identify plant species by sequence alignments with GenBank database. The investigation was carried out in *Apis mellifera* apiary at Mingjian Township, Nantou County in 2020 spring. The bee pollen samples were collected from the apiary, 17 bee pollen pellets were separated, and 16 plant species were identified. It was suggested that *rbcL* alone has low species level taxonomic resolution, but *trnH-psbA* identified a variety of plant species. The top three dominant pollen source plants are *Ageratum conyzoides*, *Trema Orientalis*, and *Bidens pilosa* var. *radiata*, which account for 21%, 21%, and 12% by weight, respectively. Establishment of barcoding database for nectar sources is fundamental for application of molecular approaches to pollen identification in Taiwan.

**Keywords:** gene barcoding, bee pollen, *Apis mellifera*

\*Corresponding author email: pshsu@mdais.gov.tw

