

DOI: 10.5846/stxb201809021867

何波, 谷战英, 李红英, 黄敦元. 基于 DNA 条形码的白斑切叶蜂粉源植物种类及多样性分析. 生态学报, 2020, 40(6): 2122-2129.

He B, Gu Z Y, Li H Y, Huang D Y. Analysis of species and diversities in the pollen plants of *Megachile strupigera* (Hymenoptera: Megachilidae) by DNA barcoding. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(6): 2122-2129.

基于 DNA 条形码的白斑切叶蜂粉源植物种类及多样性分析

何 波^{1,2}, 谷战英², 李红英¹, 黄敦元^{1,3,*}

1 重庆师范大学, 媒介昆虫重庆市重点实验室, 重庆动物生物学重点实验室, 重庆 401331

2 中南林业科技大学, 经济林培育与保护教育部重点实验室, 育种与栽培国家林业局重点实验室, 长沙 410004

3 中国科学院动物研究所 动物进化和系统学重点实验室, 北京 100101

摘要: 利用人工蜂巢收集白斑切叶蜂 (*Megachile strupigera*) 蜂粮样本, 并通过克隆测序方法, 比较分析了新余市水北镇 (XYSB)、吉安市戈坪乡 (JAGP)、赣州市沙地镇 (GZSD) 和赣州市齐云山自然保护区 (GZQYS) 的 4 种不同林地类型的白斑切叶蜂粉源植物组成及多样性。共鉴定出粉源植物 9 科 10 属 15 种。其中黄荆 *Vitex negundo* 和山牡荆 *Vitex quinata* 为优势种。Chao1 指数、Shannon-wiener 指数和 Simpson 指数分析结果表明, 4 个样地粉源植物的丰富度和多样性依次为 GZQYS>GZSD>XYSB>JAGP。并且, 4 个样地七月上旬的物种丰富度均明显高于八月中旬。同一时期的粉源植物种类及多样性存在显著差异, 表明不同林地利用方式对白斑切叶蜂粉源植物多样性的影响非常明显, 并随人为干扰程度的增高而降低。相同样地中 2 个不同时期均呈现出粉源植物多样性随花期变化而降低的趋势, 但其主要粉源植物种类没有发生改变, 表明该蜂主要粉源植物没有受到花期变化的影响。因此, 黄荆和山牡荆是白斑切叶蜂的主要粉源植物, 对维持白斑切叶蜂种群的稳定具有重要作用。

关键词: DNA 条形码; 白斑切叶蜂; 蜂粮; 粉源植物; 多样性

Analysis of species and diversities in the pollen plants of *Megachile strupigera* (Hymenoptera: Megachilidae) by DNA barcoding

HE Bo^{1,2}, GU Zhanying², LI Hongying¹, HUANG Dunyuan^{1,3,*}

1 Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

2 Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees of Ministry of Education, Key Laboratory of Non-Wood Forest Products of State Forestry Administration, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

3 Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: To clarify the composition and diversity of pollen plants of *Megachile strupigera*, the bee breads from four different types of sample plots, including Shuibei Town, Xinyu City (XYSB), Geping Town, Ji'an City (JAGP), Shadi Town, Ganzhou City (GZSD), and Qiyunshan Nature Reserve, Ganzhou City (GZQYS), were collected by artificial trap-nest and analyzed by cloning and sequencing. In total, 9 families, 10 genera, and 15 species were annotated. *Vitex negundo* and *Vitex quinata* were the dominant species. According to the indexes of Chao1, Shannon-wiener, and Simpson, the richness and diversity of pollen plants from the four sample plots were GZQYS>GZSD>XYSB>JAGP. Furthermore, each sample plot had a much higher species richness in early July than that of in mid-August. The significant differences and

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31970484); 中国博士后科学基金第 57 批面上资助项目 (2015M571120); 重庆市科委基础研究与前沿探索项目 (cstc2018jcyjA1460)

收稿日期: 2018-09-02; **网络出版日期:** 2019-12-17

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: huangdunyan@126.com

diversities of pollen plants among the four sample plots showed that different styles of forest land had significantly different effects on the diversity of pollen plants of *M. strupigera*, which would decrease with the increasing degree of artificial disturbance. For each sample plot, the diversity of pollen plants presented a declining tendency within the two time periods. However, the most abundance plant species did not change, which was not affected by seasonal flowering plants. Therefore, the main pollen plants of *M. strupiger* are *V. negundo* and *V. quinata*, which would play an important role in maintaining the population stability of *M. strupigera*.

Key Words: DNA barcoding; *Megachile strupigera*; bee bread; pollen plants; diversity

近年来,由于气候变化和人为因素的影响,野生蜜蜂面临多种风险,致使传粉者的服务功能在全球许多地区严重下降^[1-5]。鉴于传粉蜜蜂在经济作物授粉和野生植物繁衍方面的重要性,研究人员逐渐重视并尝试保护这些野生蜜蜂资源^[6-8]。粉源植物的多样性和筑巢地点的适应性是影响野生蜜蜂物种多样性最主要的因素^[9-10]。粉源植物多样性通常使用野外观察的方法,但具有一定的局限性,例如对观察的时间和空间具有敏感性,并且在野外观察条件下传粉者的种类难以准确鉴别。

孢粉学(Palynology),作为一种基于形态学鉴定花粉种类的方法,促进了植物与传粉者相互作用机制方面的研究^[11-13]。但其需要相当的分类学技巧和经验^[14],并且有些植物类群的花粉因缺乏显著的物种识别特征而难以区分,如:桔梗科(Campanulaceae)和唇形科(Lamiaceae)^[15-16]。随着DNA条形码的发展,研究人员开始利用该方法来识别蜜蜂蜂粮中含有的植物种类^[14, 17-19]。Hawkins等^[20]指出,与孢粉学相比,DNA条形码可以更精确更迅速地鉴定出蜂粮中的物种组成,且不需要深厚的分类学研究基础。

白斑切叶蜂(*Megachile strupigera*)广泛分布于中国南方地区,是野生植物及农林作物的重要传粉昆虫之一^[21]。该蜂在江西地区1年2代,可在芦苇管制作的人工巢箱内进行筑巢,并在其内制作蜂粮来繁育后代^[22]。本研究使用芦苇管制作的人工巢管收集白斑切叶蜂,通过分子克隆并结合DNA条形码技术鉴别蜂粮中的物种组成,以揭示同样地白斑切叶蜂粉源植物种类及多样性,为该蜂的保护和可持续利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究样地概况

本研究在江西省选择4种不同地貌类型的林地(图1)。其中,新余市水北镇(XYSB)和吉安市戈坪乡(JAGP)地处中亚热带地区,年均温度19.1℃,这两个样地均为山地丘陵,森林植被类型以杉木(*Cunninghamia lanceolata*)、湿地松(*Pinus elliottii*)和油茶(*Camellia oleifera*)等人工林为主。赣州市沙地镇(GZSD),地属低海拔丘陵,年平均气温为19.1℃至20.4℃;该样地以马尾松(*Pinus massoniana*)为主,林下杂灌密集并零星种植部分幼龄油茶。赣州市齐云山自然保护区(GZQYS),位于赣州市崇义县西北边缘地带,地处罗霄山脉的南端,年平均气温17℃,属湿润型季风气候带,常年温暖湿润,雨量充沛;植被类型以常绿阔叶林为主,部分针叶树种为辅的混交林。

1.2 样品采集及DNA提取

根据白斑切叶蜂2个世代的主要发生时期(7月上旬和8月中旬),野外收集该蜂的筑巢巢管,并带回实验室解剖,置于-30℃下保存备用(图1)。同时,对4个样地每个巢箱周围2 km为半径范围内^[23]的所有开花植物进行采集,共收集到开花植物81种,用于建立专用的植物DNA参考数据库(相关DNA序列已上传至NCBI数据库)。

蜂粮DNA提取前先将每个样地单个时期采集的蜂粮混合成一个样本,共得到8份含有花粉混合物的样本。将每份样本加入液氮,研磨时充分混匀,取100 mg用于DNA的提取。植物DNA提取使用新鲜叶片100 mg经液氮研磨后用于DNA的提取。实验具体步骤参照QIAGEN公司DNeasy Plant Mini Kit中的使用手册。



图1 研究地点分布及样品收集

Fig.1 Distribution of sampling points and the collecting information

1.3 PCR 扩增和测序

开花植物和蜂粮分别进行 *rbcL*、*trnH-psbA* 和 ITS2 基因序列的扩增。*rbcL* 扩增引物为: *rbcLa*_For (5'-ATGTCACCAACAGAGACTAAAGC-3') 和 *rbcLa*_Rev (5'-GTAAAATCAAGTCCACCRG-3'); *trnH-psbA* 扩增引物为: *psbA3* (5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3') 和 *trnH05* (5'-CGCGCATGGTGGATTACAAATCC-3'); ITS2 扩增引物为: *ITS2_S2F* (5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3') 和 *ITS2_S3R* (5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3')。PCR 反应体系 (25 μ L): 上下游引物各 1 μ L (10 μ mol/L), DNA 模板 1 μ L (50—100 ng), ddH₂O 12.75 μ L, dNTP 4 μ L, 10 $\times$ LA PCR Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μ L, TaKaRa LA Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增产物送北京中科希林生物有限公司进行纯化、克隆及测序。其中, 植物叶片扩增产物直接测序, 蜂粮扩增产物经克隆后, 每个样本随机挑选 100 个单克隆用于测序。

1.4 数据分析

序列分析用软件 Clustal W 2.1^[24] 进行多重序列比对, 由 Mothur version v.1.30^[25] 软件在 99 % 相似度下进行可操作分类单元 (OTU) 聚类, 随后将 OTU 的代表序列与已建立的 DNA 条形码数据库进行比对和分类。最后, 统计蜂粮中各样本在各个分类水平上的植物群落组成及丰度。

数据处理使用 Excel 2007 进行统计分析, 利用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。运用 R 软件的 spaa 包和 vagan 包计算 Shannon-wiener 指数和 Simpson 指数; Mothur 软件计算 Chao1 指数。统计图由 Excel 2007 和 R 软件绘制。

2 结果

2.1 序列拼接与组装

白斑切叶蜂在 4 个样地的 2 个主要发生时期共采集到 29 个筑巢的巢管, 解剖后共获得 124 个含有蜂粮的虫室。从蜂粮的 *rbcL*、*trnH-psbA* 和 ITS2 基因测序中获得优质序列共 2400 条。在 99% 相似度下将其聚类为

用于物种分类的 OTUs 共 120 个(表 1)。

表 1 白斑切叶蜂蜂粮样品和测序的基本信息

Table 1 Bee bread of *Megachile strupigera* and the sequencing information

地点 Site	时期 Time	巢管数量 Number of nesting tube	虫室数量 Number of cell	有效序 列数量 Number of valid sequences	OTUs 数量 Number of OTUs	不同分类阶元的归类数量 Number of different taxonomic categories		
						科 Family	属 Genus	种 Species
XYSB	7 月上旬	3	9	300	15	3	4	5
XYSB	8 月中旬	4	11	300	15	2	2	3
JAGP	7 月上旬	5	19	300	24	4	5	5
JAGP	8 月中旬	3	21	300	30	2	2	2
GZSD	7 月上旬	4	13	300	9	6	6	8
GZSD	8 月中旬	3	11	300	6	2	2	3
GZQYS	7 月上旬	4	22	300	9	7	7	10
GZQYS	8 月中旬	3	18	300	12	3	3	4
总数 Total		29	124	2400	120	9	10	15

OTU:操作分类单元 Operational taxonomic unit;XYSB:新余市水北镇;JAGP:吉安市戈坪乡;GZSD:赣州市沙地镇;GZQYS:赣州市齐云山自然保护区

2.2 粉源植物 DNA 条形码鉴定

白斑切叶蜂蜂粮的 OTU 代表序列与专用的数据库比对结果表明:*rbcL* 序列比对后通常会出现多个一致性高于 99% 的物种,而无法准确鉴定到种。例如,金毛耳草(*Hedyotis chrysotricha*)和攀茎耳草(*Hedyotis scandens*)序列的一致性为 100%。相反,*trnH-psbA* 和 ITS2 序列虽然也有少数物种未被鉴定到种,但其鉴定成功率比 *rbcL* 更高。3 个基因序列的鉴定准确率为 ITS2>*trnH-psbA*>*rbcL*。然而,使用 *rbcL*、*trnH-psbA* 和 ITS2 序列综合分析,本实验中涉及到的 OTUs 代表序列均能与参考数据库中的开花植物物种序列相对应,物种划分准确率为 100%,结果见表 2。

表 2 OTUs 代表序列与参考数据库的比对结果

Table 2 Alignment results for the representative sequence of OTUs, based on the reference database

鉴定植物种类 Identified plants	<i>rbcL</i>		<i>psbA-trnH</i>		ITS2	
	匹配物种 Species matched	一致性/% Identity	匹配物种 Species matched	一致性/% Identity	匹配物种 Species matched	一致性/% Identity
儿茶 <i>Acacia catechu</i>	<i>A. catechu</i>	100	<i>A. catechu</i>	100	<i>A. catechu</i>	100
金合欢 <i>Acacia farnesiana</i>	<i>A. farnesiana</i>	100	<i>A. farnesiana</i>	100	<i>A. farnesiana</i>	100
藤金合欢 <i>Acacia sinuata</i>	<i>A. sinuata</i>	100	<i>A. sinuata</i>	100	<i>A. sinuata</i>	100
藿香蓟 <i>Ageratum conyzoides</i>	<i>A. conyzoides</i>	100	<i>A. conyzoides</i>	100	<i>A. conyzoides</i>	100
白花鬼针草 <i>Bidens alba</i> var. <i>radiata</i>	<i>B. alba</i> var. <i>radiata</i>	100	<i>B. alba</i> var. <i>radiata</i>	100	<i>B. alba</i> var. <i>radiata</i>	100
	<i>B. pilosa</i>	99.8	<i>B. pilosa</i>	99.4		
醉鱼草 <i>Buddleja lindleyana</i>	<i>B. lindleyana</i>	100	<i>B. lindleyana</i>	100	<i>B. lindleyana</i>	100
清远耳草 <i>Hedyotis assimilis</i>	<i>H. assimilis</i>	100	<i>H. assimilis</i>	100	<i>H. assimilis</i>	100
	<i>H. mellii</i>	99.8			<i>H. mellii</i>	99.1
金毛耳草 <i>Hedyotis chrysotricha</i>	<i>H. chrysotricha</i>	100	<i>H. chrysotricha</i>	100	<i>H. chrysotricha</i>	100
	<i>H. scandens</i>	100				
	<i>H. hedyotideae</i>	99.8				
地耳草 <i>Hypericum japonicum</i>	<i>H. japonicum</i>	100	<i>H. japonicum</i>	100	<i>H. japonicum</i>	100
忍冬 <i>Lonicera japonica</i>	<i>L. japonica</i>	100	<i>L. japonica</i>	100	<i>L. japonica</i>	100
蓝花鼠尾草 <i>Salvia farinacea</i>	<i>S. farinacea</i>	100	<i>S. farinacea</i>	100	<i>S. farinacea</i>	100

续表

鉴定植物种类 Identified plants	<i>rbcL</i>		<i>psbA-trnH</i>		ITS2	
	匹配物种 Species matched	一致性/% Identity	匹配物种 Species matched	一致性/% Identity	匹配物种 Species matched	一致性/% Identity
佛光草 <i>Salvia substolonifera</i>	<i>S. substolonifera</i>	100	<i>S. substolonifera</i>	100	<i>S. substolonifera</i>	100
黄花稔 <i>Sida acuta</i>	<i>S. acuta</i>	100	<i>S. acuta</i>	100	<i>S. acuta</i>	100
	<i>S. rhombifolia</i>	99.8				
黄荆 <i>Vitex negundo</i>	<i>V. negundo</i>	100	<i>V. negundo</i>	100	<i>V. negundo</i>	100
	<i>V. quinata</i>	99.4				
山牡荆 <i>Vitex quinata</i>	<i>V. quinata</i>	100	<i>V. quinata</i>	100	<i>V. quinata</i>	100
	<i>V. negundo</i>	99.4				

rbcL: 编码核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶的大亚基 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; *psbA-trnH*: *psbA* 基因和 *trnH* 基因的间隔区序列 Intergenic spacer region of *trnH* and *psbA* gene; ITS2: 内转录间隔区 Internal transcribed spacer

2.3 粉源植物种类及丰度分析

基于 OTUs 的分类结果,对白斑切叶蜂蜂粮样本中粉源植物种类和相对丰度进行了统计分析(表 1)。在科级分类阶元上,共注释到了菊科(Compositae)、忍冬科(Caprifoliaceae)、藤黄科(Guttiferae)、豆科(Leguminosae)、唇形科(Labiatae)、马钱科(Loganiaceae)、锦葵科(Malvaceae)、茜草科(Rubiaceae)和马鞭草科(Verbenaceae)共 9 个科,其中以马鞭草科植物为优势类群。在属级分类阶元上,共注释到了金合欢属(*Acacia*)、藿香蓟属(*Ageratum*)、鬼针草属(*Bidens*)、醉鱼草属(*Buddleja*)、耳草属(*Hedyotis*)、金丝桃属(*Hypericum*)、忍冬属(*Lonicera*)、鼠尾草属(*Salvia*)、黄花稔属(*Sida*)和黄荆属(*Vitex*)共 10 个属,其中以黄荆属植物为优势类群。在种级分类阶元上,共注释到了儿茶(*Acacia catechu*)、金合欢(*Acacia farnesiana*)、藤金合欢(*Acacia sinuata*)、藿香蓟(*Ageratum conyzoides*)、白花鬼针草(*Bidens alba* var. *radiata*)、醉鱼草(*Buddleja lindleyana*)、清远耳草(*Hedyotis assimilis*)、金毛耳草(*H. chrysotricha*)、地耳草(*Hypericum japonicum*)、忍冬(*Lonicera japonica*)、蓝花鼠尾草(*Salvia farinacea*)、佛光草(*Salvia substolonifera*)、黄花稔(*Sida acuta*)、黄荆(*Vitex negundo*)和山牡荆(*Vitex quinata*)共 15 个种。其中以黄荆和山牡荆为优势种,相对丰度分别为 49.08% 和 30%。4 个样地粉源植物种类之间有所不同,XYSB 和 JAGP 均注释到 5 种植物,优势种均为黄荆(分别为 69.8% 和 74%);GZSD 注释到 9 种植物,优势种为山牡荆(54.3%);GZQYS 注释到 12 种植物,优势种为山牡荆(45.8%)和黄荆(26.6%)。4 个样地的共有优势种为黄荆(图 2)。

2.4 粉源植物多样性分析

本研究选择 Chao、Shannon-wiener 和 Simpson 指数对单个样本内植物种类的丰富度和多样性进行分析。Chao1 指数反映样本中群落的丰富度,Shannon-wiener 指数反映样本中群落的多样性,Simpson 指数反映样本中优势种的集中程度。由表 3 可见,在七月上旬,GZSD 和 GZQYS 的 Chao1 指数(分别为 9.67±1.15 和 10.22±0.19)均显著高于 XYSB 和 JAGP 的 Chao1 指数(均为 5±0.00);八月中旬,JAGP 的 Chao1 指数最低(为 2±0.00),XYSB 和 GZSD 的 Chao1 指数相同(为 3±0.00),GZQYS 最高(为 4±0.00),表明 GZQYS 具有最高的物种丰富度。GZSD 和 GZQYS 在七月上旬的 Shannon-wiener 指数(分别为 2.14±0.17 和 2.41±0.18)均显著高于 XYSB 和 JAGP 的 Shannon-wiener 指数(分别为 1.55±0.02 和 1.53±0.06);八月中旬,GZQYS 的 Shannon-wiener 指数(1.66±0.05)显著高于 XYSB、JAGP 和 GZSD(分别为 0.91±0.15、0.62±0.25 和 0.95±0.25),表明 GZQYS 的物种多样性最高。Simpson 指数统计结果与 Shannon-wiener 指数统计的总体趋势成反比,表明 GZQYS 优势种的集中程度要高于 XYSB、JAGP 和 GZSD。Chao1 指数和 Shannon-wiener 指数越大,Simpson 指数越小,说明样本中的物种丰富度和多样性越高。因此,GZQYS 粉源植物的丰富度和多样性最高,其次是 GZSD,较低为 XYSB,最低的是 JAGP。并且,4 个样地七月上旬的物种丰富度均明显要高于八月中旬。

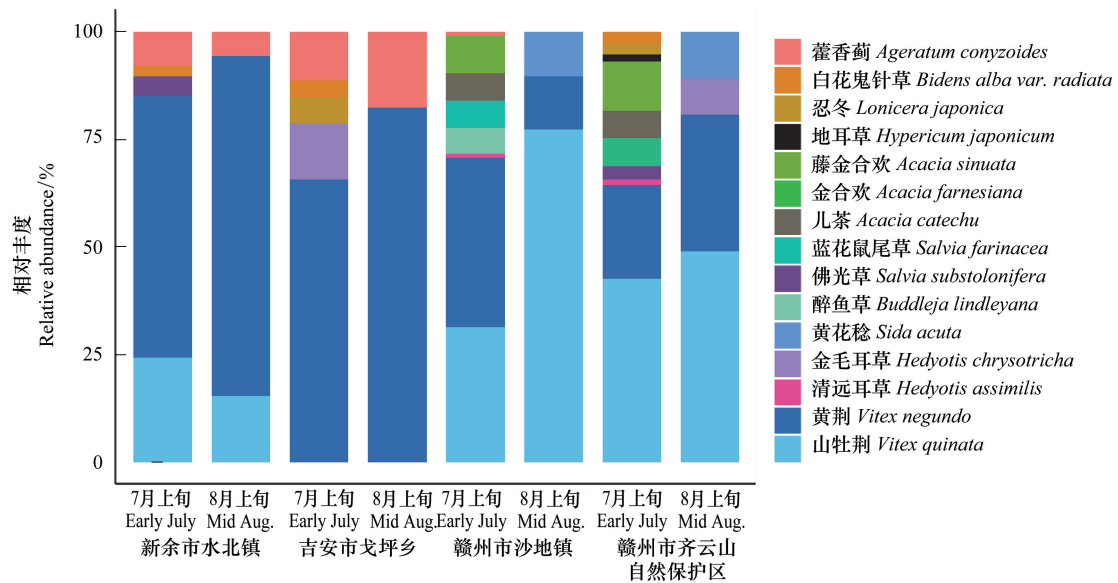


图 2 不同样地白斑切叶蜂粉源植物组成及相对丰度

Fig.2 Composition and relative abundance of pollen plants of *Megachile strupigera* from different sample plots

表 3 白斑切叶蜂粉源植物的多样性指数

Table 3 Alpha diversity indices of pollen plants of *Megachile strupigera*

样地 Sample plots	Chao1 指数 Chao1 index		Shannon-wiener 指数 Shannon-wiener index		Simpson 指数 Simpson index	
	7 月上旬 Early July	8 月中旬 Aug-Mid	7 月上旬 Early July	8 月中旬 Aug-Mid	7 月上旬 Early July	8 月中旬 Aug-Mid
XYSB	5.00±0.00a	3±0.00a	1.55±0.02a	0.91±0.15a	0.44±0.01a	0.66±0.07a
JAGP	5.00±0.00a	2±0.00a	1.54±0.06a	0.62±0.25a	0.47±0.02a	0.73±0.14a
GZSD	9.67±1.15b	3±0.00a	2.14±0.17b	0.95±0.25a	0.30±0.05b	0.64±0.12a
GZQYS	10.22±0.19b	4±0.00a	2.41±0.18c	1.66±0.05b	0.27±0.04b	0.37±0.03b

表中数据为平均值±标准差;同列数据后相同的小写字母表示样本间差异不显著 ($P > 0.05$)

3 讨论

DNA 条形码能更精确更迅速的鉴定出蜂粮中的物种组成,且不需要深厚的分类学研究基础^[17,20]。本研究运用该方法能有效鉴定出白斑切叶蜂蜂粮的植物群落组成。然而,不同基因序列的物种鉴定准确性差异较大。Bruni 等^[14]认为 *rbcL* 序列在蜂粮物种鉴定中的能力有限,而 *trnH-psbA* 是鉴定准确性相对较高的序列。Richardson 等^[26]认为 ITS2 序列在种内和种间变异大,物种正确鉴定率高,具有较高的通用性。本研究,*rbcL*、*trnH-psbA* 和 ITS2 在单独进行物种鉴定时,部分物种不能准确鉴定到种。而采用 *rbcL*+*trnH-psbA*+ITS2 组合作为蜜蜂蜂粮的标准 DNA 条形码,能准确的鉴定蜜蜂蜂粮中植物物种的组成。

本研究使用了克隆测序的方法来获取样本序列,共注释到粉源植物 15 种,隶属于 9 科,10 属。然而,白斑切叶蜂不同样地之间的粉源植物丰富度具有一定的差异,尤其是七月上旬 GZSD 和 GZQYS 两个样地具有显著高的物种丰富度。从 Chao1 指数分析中可以看出,GZSD 和 GZQYS 样地中估算的物种数分别为 9.67 ± 1.15 和 10.22 ± 0.19 ,而本研究实际观察到的物种数分别只有 8 和 10 种。4 个样地不同时期的物种丰富度表明,物种注释数量的准确性随着物种丰富度的增加而降低,一些样本的实际物种数可能会被低估。另外,本研究并没有鉴定到何波等^[22]之前在野外观察到的该蜂其他两种访花植物(红根草 *Lysimachia fortunei* 和二歧蓼 *Polygonum dichotomum*)。因此,我们认为挑取 100 个单克隆还不足以完全反应出样本的实际物种数量,但这

对其主要 OTUs 的丰富度和多样性影响不大。而高通量测序技术作为一种主流的研究方法,可更全面提高白斑切叶蜂粉源植物相对丰度的鉴定准确率。

传粉服务功能对生态系统的维持和稳定至关重要,而土地利用方式改变所引起的植物多样性丧失已成为传粉者多样性丧失的主要驱动力之一^[27-28]。蜜蜂作为传粉昆虫的重要组成部分,与植物多样性之间存在显著正相关关系^[29-32]。本研究发现不同林地利用方式对白斑切叶蜂粉源植物多样性的影响非常明显。XYSB 和 JAGP 由于人为集约管理程度较高,人为干扰严重,导致粉源植物丰富度和多样性较低;GZSD 由于林区无人管理,林内杂灌木较多,使粉源植物的丰富度和多样性较高;而 GZQYS 地处保护区内,人为干扰程度最低,粉源植物组成最为丰富。由此表明,土地利用方式是影响白斑切叶蜂粉源植物多样性的主要因素,这可能与人为干扰程度有关。

Requier 等^[33]研究发现:受当地植物生物多样性和季节性花期变化的影响,蜜蜂在不同时期或不同世代访花差异性显著。本研究通过对四种不同类型生境下白斑切叶蜂粉源植物组成进行分析,均显示 2 种黄荆属植物在该蜂蜂粮中的植物组成中占主导地位,其他植物数量较少。随着花期的变化和世代的交替,该蜂访花植物的种类呈降低的趋势。但是,四个样地不同时期的访花植物种类又存在一定的交叉,且其主要访花植物都为黄荆属植物,即该蜂主要粉源植物种类没有受到花期变化的影响。因此,我们认为黄荆和山牡荆是白斑切叶蜂主要的粉源植物,对维持白斑切叶蜂种群的稳定具有重要作用。

参考文献 (References):

- [1] Potts S G, Biesmeijer J C, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin W E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 2010, 25(6): 345-353.
- [2] Leubhn G, Droege S, Connor E F, Gemmill-Herren B, Potts S G, Minckley R L, Griswold T, Jean R, Kula E, Roubik D W, Cane J, Wright K W, Frankie G, Parker F. Detecting insect pollinator declines on regional and global scales. *Conservation Biology*, 2013, 27(1): 113-120.
- [3] 肖宜安, 张斯斯, 闫小红, 董鸣. 全球气候变暖影响植物-传粉者网络的研究进展. *生态学报*, 2015, 35(12): 3871-3880.
- [4] Potts S G, Imperatriz-Fonseca V, Ngo H T, Aizen M A, Biesmeijer J C, Breeze T D, Dicks L V, Garibaldi L A, Hill R, Settele J, Vanbergen A J. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 2016, 540(7632): 220-229.
- [5] De Palma A, Kuhlmann M, Bugter R, Ferrier S, Hoskins A J, Potts S G, Roberts S P M, Schweiger O, Purvis A. Dimensions of biodiversity loss: spatial mismatch in land-use impacts on species, functional and phylogenetic diversity of European bees. *Diversity and Distributions*, 2017, 23(12): 1435-1446.
- [6] Steffan-Dewenter I, Potts S G, Packer L. Pollinator diversity and crop pollination services are at risk. *Trends in Ecology & Evolution*, 2005, 20(12): 651-652.
- [7] Klein A M, Vaissière B E, Cane J H, Steffan-Dewenter I, Cunningham S A, Kremen C, Tscharntke T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2006, 274(1608): 303-313.
- [8] Kremen C, Williams N M, Aizen M A, Gemmill-Herren B, LeBuhn G, Minckley R, Packer L, Potts S G, Roulston T, Steffan-Dewenter I, Vázquez D P, Winfree R, Adams L, Crone E E, Greenleaf S S, Keitt T H, Klein A M, Regetz J, Ricketts T H. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecology Letters*, 2007, 10(4): 299-314.
- [9] Walther-Hellwig K, Frankl R. Foraging habitats and foraging distances of bumblebees, *Bombus* spp. (Hym., Apidae), in an agricultural landscape. *Journal of Applied Entomology*, 2000, 124(7/8): 299-306.
- [10] Kovács-Hostyánszki A, Espíndola A, Vanbergen A J, Settele J, Kremen C, Dicks L V. Ecological intensification to mitigate impacts of conventional intensive land use on pollinators and pollination. *Ecology Letters*, 2017, 20(5): 673-689.
- [11] Ponnuchamy R, Bonhomme V, Prasad S, Das L, Patel P, Gaucherel C, Pragasaam A, Anupama K. Honey pollen: using melissopalynology to understand foraging preferences of bees in Tropical South India. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101618.
- [12] Villanueva-Gutiérrez R, Echazarreta-González C, Roubik D W, Moguel-Ordóñez Y B. Transgenic soybean pollen (*Glycine max* L.) in honey from the Yucatán peninsula, Mexico. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4022.
- [13] da Rocha Filho L C, Garófalo C A. Nesting biology of *Megachile* (*Chrysosarus*) *guaranitica* and high mortality caused by its cleptoparasite *Coelioxys bertonii* (Hymenoptera: Megachilidae) in Brazil. *Austral Entomology*, 2016, 55(1): 25-31.
- [14] Bruni I, Galimberti A, Caridi L, Scaccabarozzi D, de Mattia F, Casiraghi M, Labra M. A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey. *Food Chemistry*, 2015, 170: 308-315.

- [15] Salmaki Y, Jamzad Z, Zarre S, Bräuchler C. Pollen morphology of *Stachys* (Lamiaceae) in Iran and its systematic implication. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 2008, 203(8): 627-639.
- [16] Khansari E, Zarre S, Alizadeh K, Attar F, Aghabeigi F, Salmaki Y. Pollen morphology of *Campanula* (Campanulaceae) and allied genera in Iran with special focus on its systematic implication. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 2012, 207(3): 203-211.
- [17] Bell K L, de Vere N, Keller A, Richardson R T, Gous A, Burgess K S, Brosi B J. Pollen DNA barcoding: current applications and future prospects. *Genome*, 2016, 59(9): 629-640.
- [18] Bell K L, Fowler J, Burgess K S, Dobbs E K, Gruenewald D, Lawley B, Morozumi C, Brosi B J. Applying pollen DNA meta-barcoding to the study of plant-pollinator interactions. *Applications in Plant Sciences*, 2017, 5(6): 1600124.
- [19] de Vere N, Jones L E, Gilmore T, Moscrop J, Lowe A, Smith D, Hegarty M J, Creer S, Ford C R. Using DNA metabarcoding to investigate honey bee foraging reveals limited flower use despite high floral availability. *Scientific Reports*, 2017, 7: 42838.
- [20] Hawkins J, de Vere N, Griffith A, Ford C R, Allainguillaume J, Hegarty M J, Baillie L, Adams-Groom B. Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: a new tool for investigating honey bee foraging preferences. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134735.
- [21] 吴燕如. 中国动物志, 昆虫纲, 第 44 卷. 膜翅目: 切叶蜂科. 北京: 科学出版社, 2006: 6-19.
- [22] 何波, 黄敦元, 苏田娟, 牛泽清, 谷战英, 朱朝东. 白斑切叶蜂的生物学特性观察. *环境昆虫学报*, 2016, 38(6): 1237-1244.
- [23] Steffan-Dewenter I, Kuhn A. Honeybee foraging in differentially structured landscapes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, 270(1515): 569-575.
- [24] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, Chenna R, McGettigan P A, McWilliam H, Valentin F, Wallace I M, Wilm A, Lopez R, Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [25] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, Hall J R, Hartmann M, Hollister E B, Lesniewski R A, Oakley B B, Parks D H, Robinson C J, Sahl J W, Stres B, Thallinger G G, van Horn D J, Weber C F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [26] Richardson R T, Lin C H, Sponsler D B, Quijia J O, Goodell K, Johnson R M. Application of ITS2 metabarcoding to determine the provenance of pollen collected by honey bees in an agroecosystem. *Applications in Plant Sciences*, 2015, 3(1): 1400066.
- [27] Ollerton J, Erenler H, Edwards M, Crockett R. Extinctions of aculeate pollinators in Britain and the role of large-scale agricultural changes. *Science*, 2014, 346(6215): 1360-1362.
- [28] Ollerton J. Pollinator diversity: distribution, ecological function, and conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2017, 48: 353-376.
- [29] Steffan-Dewenter I, Tschamtk T. Succession of bee communities on fallows. *Ecography*, 2001, 24(1): 83-93.
- [30] Biesmeijer J C, Roberts S P M, Reemer M, Ohlemüller R, Edwards M, Peeters T, Schaffers A P, Potts S G, Kleukers R, Thomas C D, Settele J, Kunin W E. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 2006, 313(5785): 351-354.
- [31] Ebeling A, Klein A M, Schumacher J, Weisser W W, Tschamtk T. How does plant richness affect pollinator richness and temporal stability of flower visits? *Oikos*, 2008, 117(12): 1808-1815.
- [32] 王润, 丁圣彦, 卢训令, 宋博. 黄河中下游农业景观中景观简化对传粉昆虫多样性的影响——以巩义市为例. *生态学报*, 2017, 37(7): 2225-2236.
- [33] Requier F, Odoux J F, Tamic T, Moreau N, Henry M, Decourtye A, Bretagnolle V. Honey bee diet in intensive farmland habitats reveals an unexpectedly high flower richness and a major role of weeds. *Ecological Applications*, 2015, 25(4): 881-890.