

DOI: 10.5846/stxb202108102204

张可, 王林玲, 党晓群, 李旭东, 李月, 陆欢欢, 牛泽清, 袁峰, 朱朝东, 黄敦元. 基于 DNA 宏条形码技术的蓝彩带蜂粉源植物多样性研究. 生态学报, 2022, 42(11): 4504-4514.

Zhang K, Wang L L, Dang X Q, Li X D, Li Y, Lu H H, Niu Z Q, Yuan F, Zhu C D, Huang D Y. Analysis of species and diversities in the pollen plants of *Nomia chalybeata* (Hymenoptera: Halictidae) using DNA metabarcoding technique. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(11): 4504-4514.

基于 DNA 宏条形码技术的蓝彩带蜂粉源植物多样性研究

张可¹, 王林玲¹, 党晓群¹, 李旭东¹, 李月¹, 陆欢欢¹, 牛泽清², 袁峰², 朱朝东², 黄敦元^{1,*}

¹ 重庆师范大学生命科学学院媒介昆虫重点实验室, 重庆 401331

² 中国科学院动物研究所动物进化与系统学重点实验室, 北京 100101

摘要: 蓝彩带蜂 (*Nomia chalybeata* Smith, 1875) 隶属隧蜂科彩带蜂属, 是一种典型的广访花性野生蜜蜂, 广泛分布于我国东部地区及日本、韩国、印度、缅甸等国家。本研究基于我国东部 9 个省份 18 个不同样地 20 份蓝彩带蜂蜂粮样本, 包括安徽省 (AHGZ、AHJZ)、重庆市 (CQSMS、CQWS)、福建省 (FJSM)、广西省 (GXHP、GXLZ)、湖南省 (HNHY、HNQY)、海南省 (HNLS、HNWC)、江西省 (JXGX、JXJG6、JXJG8、JXQY6、JXQY8、JXYZ)、山东省 (SDLL)、浙江省 (ZJCS)。利用 DNA 宏条形码研究该蜂粉源植物的多样性, 为全面掌握该蜂的粉源植物及保护策略提供理论依据。结果表明该蜂粉源植物共涉及 47 科, 99 属, 124 种, 其中黄荆 (*Vitex negundo*) 是最优势种, 其次是罗伞树 (*Ardisia quinqueгона*) 和山莓 (*Rubus corchorifolius*)。Alpha 多样性指数分析显示: SDLL 样本的物种丰富度和多样性最高, FJSM 样本的丰富度和多样性最低。不同样地的粉源植物多样性具有差异, 但该蜂同一地点不同时期的粉源植物多样性及结构无显著差异, 主要粉源植物无变化, 表明在同一地点该蜂成虫活动期主要粉源植物的变化不大。

关键词: DNA 宏条形码; 蓝彩带蜂; 粉源植物; 多样性

Analysis of species and diversities in the pollen plants of *Nomia chalybeata* (Hymenoptera: Halictidae) using DNA metabarcoding technique

ZHANG Ke¹, WANG Linling¹, DANG Xiaoqun¹, LI Xudong¹, LI Yue¹, LU Huanhuan¹, NIU Zeqing², YUAN Feng², ZHU Chaodong², HUANG Dunyuan^{1,*}

¹ Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

² Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: *Nomia chalybeata* is a typical polylectic bee species, belonging to the genus *Nomia* of the family Halictidae. It is widely distributed in eastern China, Japan, South Korea, India, Myanmar, and other countries. In this study, 20 bee bread samples of *N. chalybeata* were collected from 18 different places in 9 provinces in eastern China, including Anhui Province (AHGZ, AHJZ), Chongqing City (CQSMS, CQWS), Fujian Province (FJSM), Guangxi Province (GXHP, GXLZ), Hunan Province (HNHY, HNQY), Hainan Province (HNLS, HNWC), Jiangxi Province (JXGX, JXJG6, JXJG8, JXQY6, JXQY8, JXYZ), Shandong Province (SDLL), Zhejiang Province (ZJCS). We studied the diversity in the pollen plants of *N. chalybeata* based on a DNA metabarcoding, so as to provided theoretical basis for comprehensive understanding

基金项目: 科技部科技基础资源调查专项 (2018FY100405); 国家自然科学基金 (31970484); 重庆市科技兴林项目 (渝林科研 2020-5)

收稿日期: 2021-08-10; **采用日期:** 2021-11-01

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: 20170054@cqnu.edu.cn

the pollen plants and protection strategies. The results showed that there were 47 families, 99 genera and 124 species. *Vitex negundo* was the most dominant species, followed by *Ardisia quinqueгона* and *Rubus corchorifolius*. According to the indices of alpha diversity, the species richness and diversity of the sample SDLL were the highest, the sample FJSM were the lowest. The diversity of different sample plot were different. In addition, there was no significant difference in the diversity and structure of pollen plants at different time periods in the same area, and there was no change in the main pollen plants, indicating that the main pollen plants during the adult active period did not change much in the same area.

Key Words: DNA metabarcoding; *Nomia chalybeate*; pollen plants; diversity

昆虫授粉是一种重要的生态交互作用,不仅涉及超过 80% 的被子植物繁殖还参与约 75% 的农作物生产过程^[1-3]。近年来由于农业扩张、传粉昆虫栖息地的丧失和破碎、杀虫剂和除草剂的使用、微生物病原体感染等原因,传粉者数量呈大幅降低趋势^[4-6]。膜翅目蜜蜂总科作为生态系统重要的传粉类群,主要依靠植物的花粉和花蜜作为食物来源,其中花蜜主要提供碳水化合物,花粉主要提供蛋白质和脂质^[7],因此,蜜蜂在特定植物上采食花粉和花蜜以满足自身营养需求的同时帮助这些植物实现了授粉功能^[8-11]。研究表明粉源植物是生态系统中重要的组成部分,是蜜蜂等传粉者赖以生存的物质基础,它们的数量和质量会影响蜜蜂物种多样性^[12-13]。

野生蜜蜂与家养蜜蜂是相对而言的,野生蜜蜂具有种类多、分布广、适应性强等特性,诸多研究表明:特定生态系统中,野生蜜蜂提供的授粉服务功能是家养蜜蜂无法取代的,如在苹果、蓝莓、覆盆子、油茶等经济作物的授粉中,野生蜜蜂扮演非常重要的角色^[14-18]。Angellella^[19]等人对美国中大西洋东岸和弗吉尼亚海滩地区 21 个农场的开花植物系统研究表明,家养蜜蜂和野生蜜蜂之间存在粉源植物资源的竞争。该竞争不仅会抑制野生蜜蜂的数量,而且会降低植物的座果率和结实率。尤其在开花植物资源有限的情况下,这会增加家养蜜蜂和野生传粉者之间的生态位重叠,并加剧对野生传粉者种群的负面影响。

野生蜜蜂类群是野生植物和农作物的重要传粉昆虫,如壁蜂属多数物种因具有易管理、低成本和高传粉效率等特点,所以常作为人工放养野生蜜蜂被广泛应用于苹果、樱桃、梨等果树的授粉^[20];大分舌蜂(*Colletes gigas*)和油茶地蜂(*Andrena camellia*)等野生蜜蜂是湖南、江西等南方地区油茶优势传粉昆虫^[21];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,它的主要粉源植物为黄荆和山牡荆,这对维持白斑切叶蜂种群的稳定具有重要作用^[22]。野生蜜蜂的大部分服务和益处与食物、药物和授粉等有关^[23],但到目前为止对野生蜜蜂的研究多为形态学、线粒体基因、生活方式等方面,对粉源植物研究甚少,而野生蜜蜂群落的丰富度和多样性与授粉有关^[24],因此,了解野生蜜蜂的主要粉源植物的种类组成及其分布情况对促进它们的种群繁衍有着重要意义。

DNA 宏条形码技术是利用高通量测序手段快速获取混合样本中所有物种的混合条形码扩增序列,并通过生物信息学分析手段来鉴定混合样本中物种组成及相对丰度的方法^[25-26]。目前,该方法在植物研究方面常用的序列有:核基因 ITS/ITS2 片段、叶绿体基因 *MatK*、*psbA-trnH*、*rbcL*、*trnL* 等以及不同序列组合^[27]。相比传统的蜂蜜孢粉学(Melissopalynology),DNA 宏条形码技术在花粉鉴定方面具有鉴定速度快、分类分辨率高等优势^[27-29]。Jones^[30]等人使用 DNA 宏条形码技术鉴定来自英格兰和威尔士 441 个意大利蜜蜂蜂蜜样本中的植物类群,将 2017 年与 1952 年(蜂蜜孢粉学)的样本植物类群进行比较,推断出蜜蜂主要觅食植物的变化是由植物在景观中的可用性变化所驱动的,同时也证明了 DNA 宏条形码技术相比显微鉴定技术具有更高的植物分类分辨率。

蓝彩带蜂(*Nomia chalybeata* Smith)属隧蜂科(Halictidae)彩带蜂属(*Nomia*),广泛分布于安徽、山东、江西、福建、广西等我国东部地区,以及日本、韩国、印度、缅甸等国家^[31-32]。该蜂是一种典型的广访花性(Polylectic)野生蜜蜂,主要在腐木及土中筑巢,巢室为一到多丛^[33]。本研究基于蓝彩带蜂在国内的主要分布区,在我国东部 18 个不同样地该蜂巢穴中获取 20 份蓝彩带蜂蜂粮样本,利用 DNA 宏条形码技术研究该蜂粉

源植物的多样性,为全面掌握该蜂的粉源植物及保护策略提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 样品采集

根据蓝彩带蜂成虫活动期,于2020年6月至8月在我国东部地区9个省份共采集18个样地20份蓝彩带蜂的蜂粮样品(在江西省吉安市的井冈山市和青原区分别于6月和8月进行1次样品采集)(表1,附图1)。由于蓝彩带蜂的独栖性,因此同一样地的蓝彩带蜂蜂粮采取混合多个巢穴内蜂粮样本至1—2g,置于2mL无菌离心管内密封保存,每个样品为3个重复,所有样品带回实验室后-20℃留存并用于后续实验。

表1 蓝彩带蜂蜂粮样本采集信息

Table 1 Collection information of bee bread samples of *Nomia chalybeata*

样本 Sample	采集地点 Collecting sites	经纬度 Latitude and Longitude		海拔高度/m Elevation	采集日期 Date of collection
		N°	E°		
AHGZ	安徽省蚌埠市固镇县	33.25	117.37	47.5	2020.8.6
AHJZ	安徽省六安市金寨县	31.36	115.56	189.41	2020.8.4
CQSMS	重庆市四面山自然保护区	28.58	106.37	1133.74	2020.8.30
CQWS	重庆市巫山县当阳乡	31.40	109.98	774.05	2020.8.29
FJSM	福建省三明市胡访镇	26.18	117.23	413.94	2020.8.23
GXHP	广西省北海市合浦县闸口镇	21.71	109.49	-11.24	2020.7.25
GXLZ	广西省柳州市雒容镇	24.38	109.68	100.67	2020.7.24
HNCS	湖南省长沙市跳马镇	28.25	113.17	41.27	2020.8.24
HNHY	湖南省衡阳市衡阳县	26.98	112.43	83.24	2020.8.19
HNLS	海南省陵水黎族自治县	18.40	109.99	-5.66	2020.7.27
HNQY	湖南省永州市祁阳县	26.39	111.85	93.52	2020.7.22
HNWC	海南省文昌市龙楼镇	19.68	111.01	-0.66	2020.7.26
JXGX	江西省赣州市赣县区	25.99	114.83	158.02	2020.8.11
JXJG6	江西省吉安市井冈山市	26.47	114.21	365.73	2020.6.25
JXJG8	江西省吉安市井冈山市	26.47	114.21	365.73	2020.8.13
JXQY6	江西省吉安市青原区	27.07	115.10	116.25	2020.6.26
JXQY8	江西省吉安市青原区	27.07	115.10	116.25	2020.8.14
JXYZ	江西省宜春市袁州区	27.76	114.21	108.07	2020.6.27
SDLL	山东省临沂市兰陵县	34.99	118.12	145.00	2020.8.18
ZJCS	浙江省衢州市常山县	28.98	118.64	104.90	2020.8.25

1.2 DNA 提取

将混合样本加入液氮充分研磨后,使用 E.Z.N.A.® Soil DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA) 按照试剂盒说明书进行 DNA 抽提,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 PCR 扩增和测序

对花粉核基因组的 ITS2 区基因序列进行扩增,使用引物 ITSS2F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'; ITS4R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 反应体系为 20 μL, 其中: 2 μL DNA 模板 (5 ng/μL), 4 μL FastPfu Buffer (5×), 2.5 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 上下游引物各 0.8 μL (5 μmol/L), 0.4 μL FastPfu Polymerase, 添加 ddH₂O 至 20 μL。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 45s, 共 29 个循环; 72℃ 延伸 10 min; 12℃ 保存。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,使用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, U.S.) 将其纯化。纯化后产物送至上海凌恩生物科技有限公司基于 Illumina MiSeq 平台进行双端测序 (2×250 bp)。

1.4 数据处理

1.4.1 数据质控与优化

测序原始数据使用 Trimmomatic^[34] 过滤 read 尾部低质量碱基 (Q<20); 利用 FLASH v1.2.11^[35] 对短片段

进行拼接(重叠区长度 ≥ 10 bp,重叠区错配率 ≤ 0.2),根据引物方向校正拼接序列方向;用 Usearch v10.0 (<http://drive5.com/uparse/>) 去除嵌合体^[36]。最终得到每个样本的有效序列并用于后续类别注释。

1.4.2 OTU 聚类及注释

使用 Usearch v10.0(<http://drive5.com/uparse/>) 软件按照 97%相似性对非重复序列(不含单序列)进行可操作性分类单元(OTU)聚类,得到 OTU 的代表序列^[36]。基于 Unite v8.2 (<http://unite.ut.ee/index.php>) 数据库采用 RDP classifier v2.2 贝叶斯算法 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 对 OTU 代表序列进行物种分类注释分析^[37]。由于引物具有通用性,注释为真菌的 OTU 序列在本研究中被舍弃,同时删除样本测序中小于 10 的序列物种。

1.4.3 分析数据

数据处理在 Excel 2016 软件进行统计,运用 R 软件计算 ACE 指数、Shannon 指数,利用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析及多重比较,利用 Origin 2019b 进行柱状图绘制。基于 OTU 利用 R 软件计算各样本 Bray-Curtis 距离并采用 factoextra 包进行层次聚类(Hierarchical clustering)绘图。利用 R 软件 vegan 包利用非度量多维尺度法(NMDS)对聚类进行 Beta 多样性分析,进一步进行相似性分析(ANOSIM)检验组间是否存在显著差异。

2 结果

2.1 蓝彩带蜂蜂粮测序数据及物种注释

本研究中共获得 2 722 294 条有效序列,平均长度为(338.5 $\pm$ 5.6) bp,序列按照 97%的相似水平进行聚类获得 491 个 OTUs。采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 OTU 代表序列进行物种分类分析,注释结果为 47 科, 99 属,124 种粉源植物(表 2)。

表 2 蓝彩带蜂蜂粮测序基本信息
Table 2 Basic information about bee bread sequencing of *Nomia chalybeata*

样本 Sample	有效序列数量 Number of valid sequences	平均长度 AvgLen/bp	不同分类阶元的归类数量 Number of different taxonomic categories		
			科 Family	属 Genus	种 Species
AHGZ	43344	337.4	12	18	18
AHJZ	50320	336.8	12	15	16
CQSMS	53286	333.2	5	5	5
CQWS	45565	329.0	13	16	19
FJSM	44681	337.0	7	10	10
GXHP	38797	337.0	14	19	21
GXLZ	53809	337.9	8	9	13
HNCS	46687	337.0	5	5	7
HNHY	43209	337.9	9	12	12
HNLS	44522	356.6	11	13	14
HNQY	39098	336.7	5	5	5
HNWC	45587	338.2	9	12	12
JXGX	43802	331.4	6	8	11
JXJG6	43149	337.7	5	6	7
JXJG8	41032	344.3	7	8	8
JXQY6	46409	336.5	6	8	9
JXQY8	47604	342.2	5	7	8
JXYZ	35595	339.6	4	5	5
SDLL	49214	346.7	23	42	49
ZJCS	50867	336.8	11	15	16
总计 Total	906577	—	47	99	124

2.2 蓝彩带蜂粉源植物种类及相对丰度

基于 ITS 扩增子获得的分类结果,获得蓝彩带蜂蜂粮样本粉源植物共 47 科 99 属 124 种,统计分析粉源

植物物种组成和相对丰度(图1)。在属分类阶元上,粉源植物相对丰度较高的属为牡荊属(*Vitex*)、紫金牛属(*Ardisia*)、悬钩子属(*Rubus*)、耳草属(*Hedyotis*)、破布叶属(*Microcos*)、柏拉木属(*Blastus*)、稻属(*Oryza*)、凤仙花属(*Impatiens*)、银莲花属(*Anemone*)、珍珠菜属(*Lysimachia*)等,所占比例分别为43.47%、17.07%、8.35%、5.50%、5.00%、4.03%、2.83%、2.21%、2.12%、1.73%。在种分类阶元上,粉源植物主要包括黄荊(*Vitex negundo*)、罗伞树(*Ardisia quinqueгона*)、山莓(*Rubus corchorifolius*)、疏花耳草(*Hedyotis matthewii*)、破布叶(*Microcos paniculata*)、少花柏拉木(*Blastus pauciflorus*)、野生稻(*Oryza rufipogon*)、野棉花(*Anemone vitifolia*)、水金凤(*Impatiens noli-tangere*)、藜状珍珠菜(*Lysimachia chenopodioides*)等,所占比例分别为43.46%、17.06%、8.35%、5.50%、5.00%、4.03%、2.83%、2.12%、2.09%、1.57%。

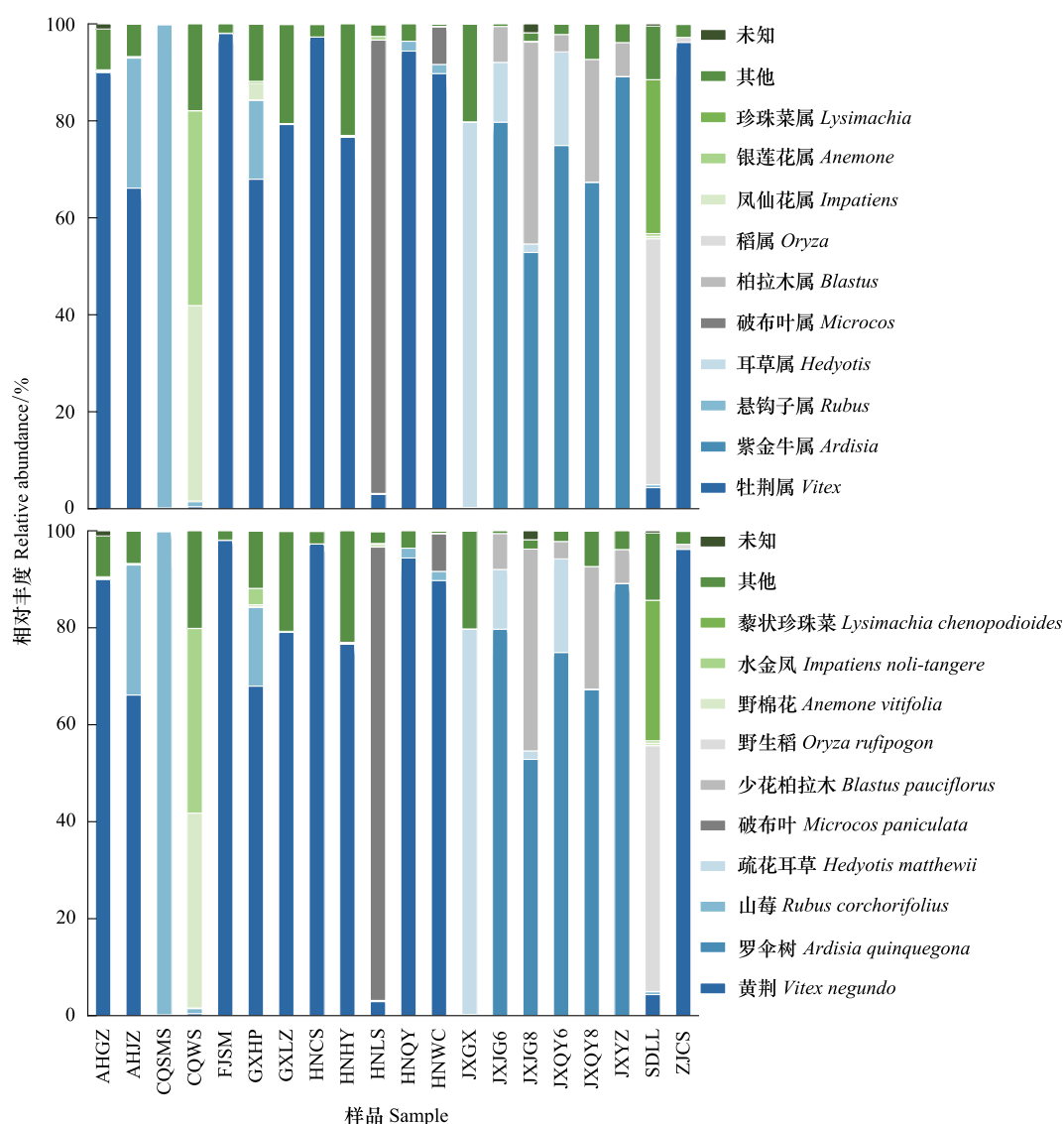


图1 蓝彩带蜂粉源植物在属、种水平的组成及相对丰度

Fig.1 Composition and relative abundance of pollen plants of *Nomia chalybeata* at genus and species level

2.3 蓝彩带蜂粉源植物多样性分析

基于 OTU 水平进行 Alpha 多样性指数分析,利用 ACE 指数、Shannon 指数来反映粉源植物物种丰富度及多样性。CQWS、GXHP、SDLL 的 ACE 指数(分别为 4.69 ± 0.40 、 4.61 ± 0.54 、 4.44 ± 0.46)较高,FJSM 的 ACE 指数(2.72 ± 0.11)最低(图2)。JXGX、SDLL 的 Shannon 指数(分别为 3.52 ± 0.09 、 2.39 ± 0.07)较高,FJSM 的

Shannon 指数(0.33 ± 0.02)最低,不同样地间具有显著差异(附表 1,图 2)。综上,SDLL 样地的丰富度和多样性最高,FJSM 样地的丰富度和多样性最低。

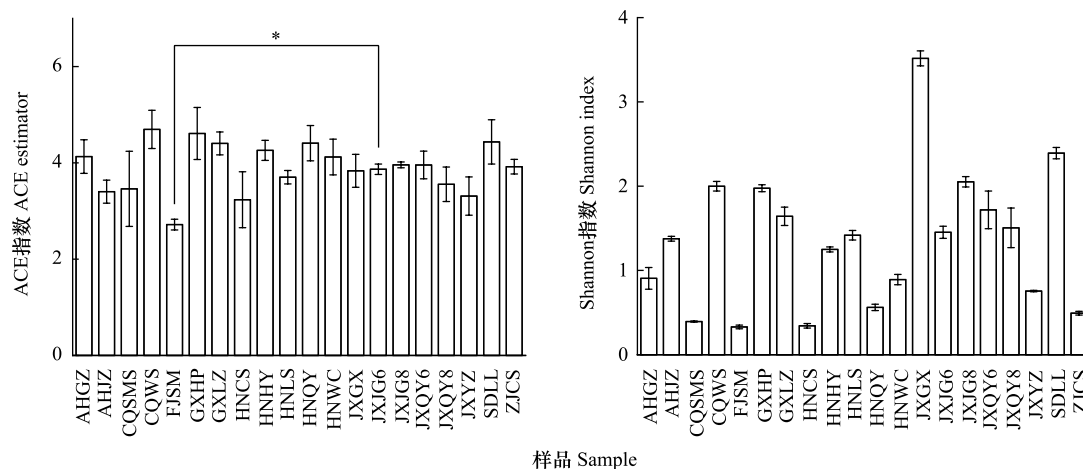


图 2 蓝彩带蜂粉源植物的 Alpha 多样性指数

Fig.2 Alpha diversity of indices of pollen plants of *Nomia chalybeata*

图中数据为平均值 $\pm$ 标准差;Shannon 指数图中未标注显著性差异,Shannon 指数显著性差异见附表 1

2.4 蓝彩带蜂粉源植物层次聚类及结构差异

不同样地蓝彩带蜂粉源植物种类及相对丰度不同,基于此对不同样地蓝彩带蜂粉源植物进行层次聚类分析,采用 Bray-curtis 距离计算各样本间距离。当类距离为 27 时,聚类结果可分为七类(图 3),其中第一聚类(A 聚类,下同)共 10 个样地分别为 AHGZ、AHJZ、FJSM、GXHP、GXLZ、HNCS、HNHY、HNQY、HNWC、ZJCS;第二聚类(B 聚类)共 5 个样地分别为 JXJG6、JXJG8、JXQY6、JXQY8、JXYZ;剩余样地各为一个聚类。各聚类的优势种都不同,A 聚类优势种是黄荆,B 聚类优势种是罗伞树,C 聚类(JXGX)优势种是疏花耳草,D 聚类(CQWS)优势种是野棉花,E 聚类(CQSMS)优势种是山莓,F 聚类(HNLS)优势种是破布叶,G 聚类(SDLL)优势种是野生稻。

利用非度量多维尺度法(NMDS)对 A 聚类进行 Beta 多样性分析结果显示十个样地距离都不远,进一步

对 A 聚类的组间距离进行相似性分析,结果显示 A 聚类两两对比不存在显著差异($P > 0.05$)。对 B 聚类进行 Beta 多样性分析,结果显示 B 聚类五个样地相聚很近(图 4),对 B 聚类的组间距离进行相似性分析,结果显示 B 聚类粉源植物结构两两对比不存在显著差异($P > 0.05$)。其中相同地点不同时期的 JXJG6 和 JXJG8 粉源植物结构不存在显著差异($R^2 = 1, P = 0.1$);JXQY6 和 JXQY8 粉源植物结构也不存在显著差异($R^2 = 0.593, P = 0.1$)。因此在 6 月和 8 月两个时期蓝彩带蜂的粉源植物结构无显著差异。

3 讨论

目前 DNA 宏条形码作为一种新型鉴定手段在蜂蜜溯源、昆虫-植物传粉网络、水生态等研究领域中的应用

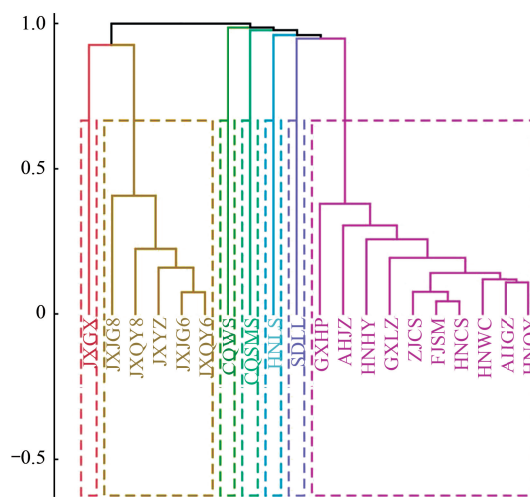


图 3 蓝彩带蜂粉源植物层次聚类图

Fig.3 Hierarchical clustering of pollen plants of *N. chalybeata*

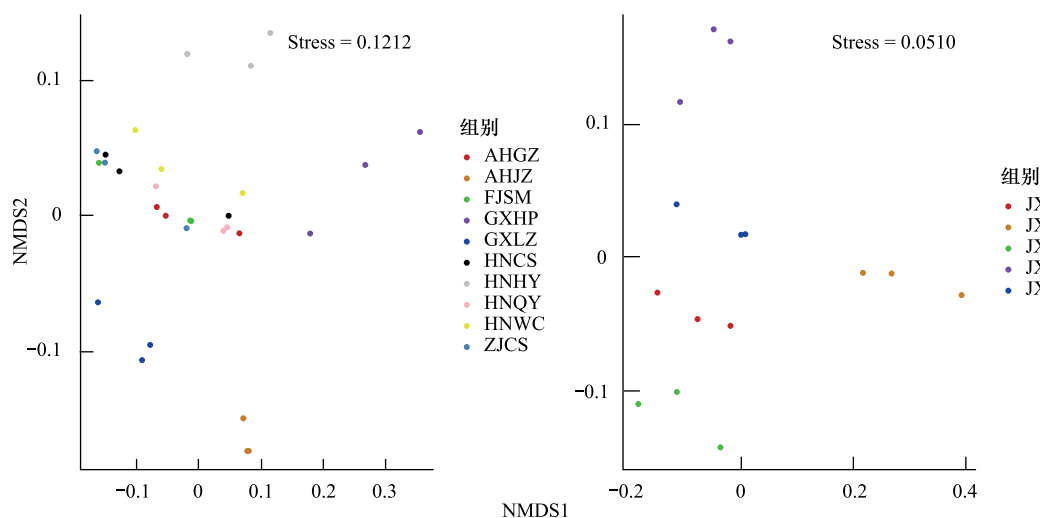


图4 利用非度量多维尺度法(NMDS)对蓝彩带蜂粉源植物 A、B 聚类进行 Beta 多样性分析

Fig.4 The Beta diversity of A and B cluster of pollen plants of *Nomia chalybeata* analyzed by Non-metric multidimensional scaling (NMDS) *Nomia chalybeata*

广泛^[38-40]。对于植物鉴定而言,基于通用引物的可得性、高水平的分类分辨率,生命条形码联盟推荐 *rbcL* 和 *matK* 的质体DNA (ptDNA) 基因区作为标准 DNA 条形码标记^[41]。因为它们是植物核心 DNA 条形码之一,而且一些国家对本地植物区系建立了相应的 *rbcL* DNA 条形码参考库,可大大提升对物种的鉴别能力^[42]。ITS2 作为条形码序列是基于通用引物保守区域的可用性、扩增的方便性以及足够的可变性,甚至可以区分密切相关的物种^[43-45]。近年来在植物类群的定性分析方面, Richardson^[46] 等人利用蜂蜜孢粉学和 ITS2 metabarcoding 对美国俄亥俄州麦迪逊县蜂群采集的花粉进行鉴定,结果显示 ITS2 metabarcoding 鉴定到 19 个植物科,蜂蜜孢粉学仅鉴定到 8 个科,ITS2 序列具有更高的灵敏度和分类分辨率,而且对于花粉的定量分析,使用 ITS2 metabarcoding 和蜂蜜孢粉学共同鉴定优于单独的方法。本研究虽未利用蜂蜜孢粉学进行对比,但研究结果与文献记载基本吻合,进一步补充蓝彩带蜂等野生蜜蜂粉源植物 DNA 宏条形码技术研究方面的空白。

本研究在数据处理方面对样本数据进行一个阈值设置:去除每个样本最大计数数小于 10 的序列,这是由于 DNA 宏条形码会产生假阳性结果^[47-48]。假阳性通常是由于污染、嵌合序列和/或生物信息学管道的错误识别驱动的、缺少条形码空白或样品的稀缺性等原因造成,因此尤其是在濒危物种和入侵物种的监测中,物种的误判对生态系统的影响是非常严重的^[49],DNA 宏条形码在鉴定物种方面仍需与传统鉴定方法(蜂蜜孢粉学)相结合才能更精确、快速的鉴定物种。

基于 OTU 水平,对不同样地的 ACE 指数、Shannon 指数进行分析发现不同地区的 Alpha 多样性是有差异的,这可能是因为蓝彩带蜂的栖息地周围粉源植物不同造成物种丰富度和多样性均有一定程度差异。在山东省临沂市兰陵县采集的蜂粮显示此地蓝彩带蜂粉源植物的物种丰富度和多样性最高,物种丰富度和多样性最低的是福建省三明市胡访镇采集的蜂粮。在江西省吉安市井冈山市和江西省吉安市青原区的两次采集样品 (JXJG6、JXJG8、JXQY6、JXQY8) 的 ACE 指数、Shannon 指数均无差异, Beta 多样性分析结果也显示距离很近,且结构两两对比不存在显著差异,因此在 6 月和 8 月两个时期蓝彩带蜂的粉源植物多样性和结构无显著差异。六月这两个样地主要粉源植物罗伞树的相对丰度分别为 79.7% 和 74.9%,而八月相对丰度分别为 52.8% 和 67.3%,表明该蜂成虫活动期主要粉源植物变化不大,优势粉源植物罗伞树花期约为五月,果期约十一月^[49],从六月至八月的主要粉源植物花期过时,蓝彩带蜂逐渐开始利用其他粉源植物。

早期研究者根据中国科学院馆藏各地送检标本的信息总结蓝彩带蜂到访植物主要有:黄荆、草木犀

(*Melilotus officinalis*)、醉鱼草属(*Buddleja*)、水柳(*Homonoia riparia*)、紫苜蓿(*Medicago sativa*)、槐(*Styphnolobium japonicum*)、益母草(*Leonurus japonicus*)、菊科(*Compositae*)等^[31]。本研究鉴定到的粉源植物中黄荆、草木犀、菊科、醉鱼草属、紫苜蓿、槐均有包含;益母草未被检测,但是本研究中检测到与益母草同属的细叶益母草(*Leonurus sibiricus*)及假鬃尾草(*Leonurus chaituroides*),可能是送检标本采集地有益母草物种分布而没有同属细叶益母草和假鬃尾草的分布,也有可能形态学鉴定有误;水柳在本研究中也未被检测,水柳花期一般为3至5月^[50],而蓝彩带蜂成虫活动期为6至8月^[31],所以标本采集者在水柳上采集到的只是栖息状态下的蓝彩带蜂。

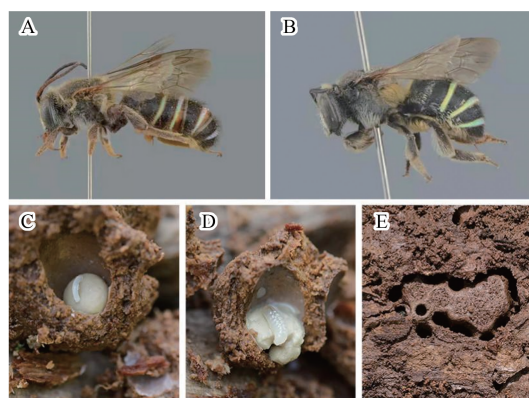
Biesmeijer^[51]等人在英国及荷兰境内的调查表明:蜜蜂和蜜(粉)源植物的多样性呈下降趋势,并对当地的经济作物和野生物种产生不利影响。在群落范围内植物-传粉者相互作用对维持生物多样性十分重要^[52],且粉源植物和传粉昆虫二者间具有密切关联;邓惠等^[53]的研究发现:忍冬属的4种植物花色发生变化则传粉者的访花频率随之改变,花变色的特性、范围差异会导致该物种由不同种类的传粉昆虫进行授粉,这是开花植物与昆虫长期相互适应并共同进化的结果;Goulnik 等^[54]对2017—2019年关于植物-传粉者互作网络等关键词的文章进行分析发现土地利用集约化可能会导致花色的改变、花蜜管平均深度的降低以及花粉质量的降低,花的性状可能与传粉者匹配性状的改变有关,传粉者与其传粉植物间有着十分的密切关系。因此调查研究蓝彩带蜂的主要粉源植物对于维持生物多样性具有重要作用,为研究野生蜜蜂-植物间的相互作用奠定基础。

参考文献(References):

- [1] 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*, 2007, 274(1608): 303-313.
- [2] Lefebvre V, Daugeron C, Villemant C, Fontaine C. Empidine dance flies pollinate the woodland geranium as effectively as bees. *Biology Letters*, 2019, 15(7): 20190230.
- [3] Ollerton J, Winfree R, Tarrant S. How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos*, 2011, 120(3): 321-326.
- [4] Aizen M A, Aguiar S, Biesmeijer J C, Garibaldi L A, Inouye D W, Jung C, Martins D J, Medel R, Morales C L, Ngo H, Pauw A, Paxton R J, Sáez A, Seymour C L. Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. *Global Change Biology*, 2019, 25(10): 3516-3527.
- [5] Barroso-Arévalo S, Vicente-Rubiano M, Puerta F, Molero F, Sánchez-Vizcaíno J M. Immune related genes as markers for monitoring health status of honey bee colonies. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15(1): 72.
- [6] 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.
- [7] Seitz N, Vanengelsdorp D, Leonhardt S D. Are native and non-native pollinator friendly plants equally valuable for native wild bee communities?. *Ecology and Evolution*, 2020, 10(23): 12838-12850.
- [8] 赵盼盼,周嘉聪,林开森,张秋芳,袁萍,曾晓敏,苏莹,徐建国,陈岳民,杨玉盛.海拔梯度变化对中亚热带黄山松土壤微生物生物量和群落结构的影响. *生态学报*, 2019, 39(6): 2215-2225.
- [9] Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces L P, Decourtye A, Kretschmar A, Suchail S, Brunet J L, Alaux C. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72016.
- [10] Scheiner R, Page R E, Erber J. Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 2004, 35(2): 133-142.
- [11] Williams N M, Ward K L, Pope N, Isaacs R, Wilson J, May E A, Ellis J, Daniels J, Pence A, Ullmann K, Peters J. Native wildflower plantings support wild bee abundance and diversity in agricultural landscapes across the United States. *Ecological Applications*, 2015, 25(8): 2119-2131.
- [12] 黄敦元,黄思程,李红英,窦飞越,寇若玫,李月,罗安才.传粉昆虫蜜(粉)源植物的鉴定方法探讨. *重庆师范大学学报:自然科学版*, 2020, 37(3): 1-8.
- [13] 林翰哲,华伟平.武夷山国家级自然保护区野生蜜源植物资源分布研究. *福建农业学报*, 2020, 35(8): 876-882.
- [14] 李捷,朱朝东,王凤鹤,黄敦元,张彦周,丁亮,黄海荣.野生蜜蜂及其传粉作用的研究现状. *生物多样性*, 2007, 15(6): 687-692.
- [15] Fijen T P M, Scheper J A, Boom T M, Janssen N, Raemakers I, Kleijn D. Insect pollination is at least as important for marketable crop yield as

- plant quality in a seed crop. *Ecology Letters*, 2018, 21(11): 1704-1713.
- [16] Garibaldi L A, Steffan-Dewenter I, Winfree R, Aizen M A, Bommarco R, Cunningham S A, Kremen C, Carvalheiro L G, Harder L D, Afik O, Bartomeus I, Benjamin F, Boreux V, Cariveau D, Chacoff N P, Dudenhöffer J H, Freitas B M, Ghazoul J, Greenleaf S, Hipólito J, Holzschuh A, Howlett B, Isaacs R, Javorek S K, Kennedy C M, Krewenka K M, Krishnan S, Mandelik Y, Mayfield M M, Motzke I, Munyuli T, Nault B A, Otieno M, Petersen J, Pisanty G, Potts S G, Rader R, Ricketts T H, Rundlöf M, Seymour C L, Schüepp C, Szentgyörgyi H, Taki H, Tschamtké T, Vergara C H, Viana B F, Wanger T C, Westphal C, Williams N, Klein A M. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science*, 2013, 339(6127): 1608-1611.
- [17] Li H Y, Orr M C, Luo A C, Dou F Y, Kou R M, Hu F, Zhu C D, Huang D Y. Relationships between wild bee abundance and fruit set of *Camellia oleifera* Abel. *Journal of Applied Entomology*, 2021, 145(4): 277-285.
- [18] Mallinger R E, Gratton C. Species richness of wild bees, but not the use of managed honeybees, increases fruit set of a pollinator-dependent crop. *Journal of Applied Ecology*, 2015, 52(2): 323-330.
- [19] Angelella G M, McCullough C T, O'Rourke M E. Honey bee hives decrease wild bee abundance, species richness, and fruit count on farms regardless of wildflower strips. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 3202.
- [20] 窦飞越, 李红英, 宋海涛, 寇若玫, 周泽扬, 罗阿蓉, 黄敦元. 凹唇壁蜂的营巢生物学研究. *环境昆虫学报*, 2021: 1-14. (2021-03-12). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&dbname=CAPJLAST&filename=KCTD20210311002&uniplatform=NZKPT&v=L9va4xRwie6x%25mmd2F6eEI7PHYNE9PmjVx1NhPF2LJt6mBC34kuk6CURvt4GrTWC9LkUJ>.
- [21] 黄敦元, 谷平, 苏田娟, 余江帆, 何波, 牛泽清, 朱朝东. 大分舌蜂主要生物学特性研究. *环境昆虫学报*, 2015, 37(1): 133-138.
- [22] 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.
- [23] Matias D M S, Leventon J, Rau A L, Borgemeister C, Von Wehrden H. A review of ecosystem service benefits from wild bees across social contexts. *Ambio*, 2017, 46(4): 456-467.
- [24] Greenleaf S S, Kremen C. Wild bees enhance honey bees' pollination of hybrid sunflower. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(37): 13890-13895.
- [25] Deagle B E, Kirkwood R, Jarman S N. Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. *Molecular Ecology*, 2009, 18(9): 2022-2038.
- [26] Glenn T C. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 2011, 11(5): 759-769.
- [27] 李磊, 蒋敬, 陈云霞. DNA 宏条形码技术在动植物法医鉴定中的应用进展. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2021, 45(1): 235-241.
- [28] Bell K L, Fowler J, Burgess K S, Dobbs E K, Gruenewald D, Lawley B, Morozumi C, Brosi B J. Applying pollen DNA metabarcoding to the study of plant-pollinator interactions. *Applications in Plant Sciences*, 2017, 5(6): 1600124.
- [29] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [30] Jones L, Brennan G L, Lowe A, Creer S, Ford C R, De Vere N. Shifts in honeybee foraging reveal historical changes in floral resources. *Communications Biology*, 2021, 4(1): 37.
- [31] 黄海荣. 中国彩带蜂亚科(膜翅目: 蜜蜂总科: 隧蜂科)系统分类研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2008.
- [32] Li H Y, Lu H H, Huang S G, Fan X D, Luo A C, Huang D Y. The complete mitogenome of *Nomia chalybeata* (Hymenoptera: Halictidae) and phylogenetic analysis. *Mitochondrial DNA Part B*, 2020, 5(3): 2844-2845.
- [33] Hannan A, Maeta Y, Miyana R. Nesting biology and life cycle of *Nomia (Acunomia) chalybeata* Smith on Iriomote Island, southernmost Archipelago of Japan, with notes on the simultaneous occurrence of diapausing and non-diapausing prepupae within the same nests (Hymenoptera: Halictidae). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 2013, 12(2): 91-99.
- [34] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [35] Magoc T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [36] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [37] Kõljalg U, Nilsson R H, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor A F S, Bahram M, Bates S T, Bruns T D, Bengtsson-Palme J, Callaghan T M, Douglas B, Drenkhan T, Eberhardt U, Dueñas M, Grebenc T, Griffith G W, Hartmann M, Kirk P M, Kohout P, Larsson E, Lindahl B D, Lücking R, Martín M P, Matheny P B, Nguyen N H, Niskanen T, Oja J, Peay K G, Peintner U, Peterson M, Põldmaa K, Saag L, Saar I, Schüßler A, Scott J A, Senés C, Smith M E, Suija A, Taylor D L, Telleria M T, Weiss M, Larsson K H. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 2013, 22(21): 5271-5277.
- [38] Tanaka K, Nozaki A, Nakadai H, Shiba Y, Shimizu-Kadota M. Using pollen DNA metabarcoding to profile nectar sources of urban beekeeping in Kōtō-ku, Tokyo. *BMC Research Notes*, 2020, 13(1): 515.
- [39] Lucas A, Bodger O, Brosi B J, Ford C R, Forman D W, Greig C, Hegarty M, Neyland P J, De Vere N. Generalisation and specialisation in

- hoverfly (Syrphidae) grassland pollen transport networks revealed by DNA metabarcoding. *Journal of Animal Ecology*, 2018, 87(4): 1008-1021.
- [40] 赵彦伟, 陈家琪, 董丽, 麻晓梅, 白洁, 田凯. 环境 DNA 技术在水生态领域应用研究进展. *农业环境科学学报*, 1-15. (2021-09-07). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&dbname=CAPJLAST&filename=NHBH20210907000&uniplatform=NZKPT&v=9ez703Csmh7hfFJ5oNfy21rWseGpYZFBZVS0TL2h0ggHB9U5MHAnpnlhmuJD%25mmd2B0>.
- [41] Hollingsworth P M, Graham S W, Little D P. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19254.
- [42] Hawkins J, De Vere N, Griffith A, Ford C R, Allaingillaume 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.
- [43] Chen S L, Yao H, Han J P, Liu C, Song J Y, Shi L C, Zhu Y J, Ma X Y, Gao T, Pang X H, Luo K, Li Y, Li X W, Jia X C, Lin Y L, Leon C. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [44] Han J P, Zhu Y J, Chen X C, Liao B S, Yao H, Song J Y, Chen S L, Meng F Y. The short ITS2 sequence serves as an efficient taxonomic sequence tag in comparison with the full-length ITS. *BioMed Research International*, 2013, 2013(5): 741476.
- [45] Pang X H, Shi L C, Song J Y, Chen X C, Chen S L. Use of the potential DNA barcode ITS2 to identify herbal materials. *Journal of Natural Medicines*, 2013, 67(3): 571-575.
- [46] 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.
- [47] Potter C, De Vere N, Jones L E, Ford C R, Hegarty M J, Hodder K H, Diaz A, Franklin E L. Pollen metabarcoding reveals broad and species-specific resource use by urban bees. *PeerJ*, 2019, 7(5): e5999.
- [48] Pornon A, Escaravage N, Burrus M, Holota H, Khimoun A, Mariette J, Pellizzari C, Iribar A, Etienne R, Taberlet P, Vidal M, Winterton P, Zinger L, Andalo C. Using metabarcoding to reveal and quantify plant-pollinator interactions. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 27282.
- [49] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第五十八卷. 北京: 科学出版社, 1979.
- [50] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. (第四十四卷第二分册). 北京: 科学出版社, 1996: 87.
- [51] 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.
- [52] Wei N, Kaczorowski R L, Arceo-Gómez G, O'Neill E M, Hayes R A, Ashman T. Pollinators contribute to the maintenance of flowering plant diversity. *Nature*, 2021, 597(7878): 688-692.
- [53] 邓惠, 向甘驹, 郭友好, 杨春峰. 秦岭忍冬属 4 种植物的繁育系统及花色变化的研究. *植物科学学报*, 2017, 35(1): 1-12.
- [54] Goulnik J, Plantureux S, Dajoz I, Michelot-Antalik A. Using matching traits to study the impacts of land-use intensification on plant-pollinator interactions in European grasslands: a review. *Insects*, 2021, 12(8): 680.



附图 1 蓝彩带蜂雄性、雌性蜂及样品采集

Attached Fig.1 Male and female of *Nomia chalybeata* and sample collection

A 雄性蓝彩带蜂; B 雌性蓝彩带蜂; C 蓝彩带蜂的卵; D 蓝彩带蜂的幼虫及蜂粮; E 蓝彩带蜂的巢穴

附表 1 不同样地粉蓝彩带蜂源植物 Shannon-wiener 指数差异分析表
Attached Table 1 Analysis of Shannon-wiener index differences of pollen plants of *Nomia chalybeata* in different areas

P	AH CZ	AH JZ	CQ SMS	CQ WS	FJ SM	GX HP	GX LZ	HN CS	HN HY	HN LS	HN QY	HN WC	JX GX	JX JG 6	JX JG 8	JX QY 6	JX QY 8	JX YZ	SD LL
AH JZ	0.98																		
CQ SMS	0.98	0.03																	
CQ WS	0.23	0.09	0.07																
FJ SM	0.94	0.00	1.00	0.01															
GX HP	0.37	0.02	0.03	1.00	0.00														
GX LZ	0.30	1.00	0.37	0.94	0.27	0.99													
HN CS	0.93	0.00	1.00	0.01	1.00	0.00	0.23												
HN HY	1.00	0.69	0.04	0.05	0.00	0.01	0.97	0.00											
HN LS	0.87	1.00	0.16	0.04	0.04	0.05	1.00	0.02	0.98										
HN QY	1.00	0.00	0.93	0.00	0.32	0.00	0.24	0.29	0.00	0.02									
HN WC	1.00	0.25	0.58	0.00	0.27	0.01	0.25	0.20	0.46	0.08	0.42								
JX GX	0.01	0.04	0.05	0.01	0.02	0.03	0.01	0.02	0.03	0.00	0.01	0.00							
JX JG 6	0.73	1.00	0.23	0.11	0.11	0.21	1.00	0.07	0.99	1.00	0.06	0.10	0.00						
JX JG 8	0.18	0.11	0.07	1.00	0.02	1.00	0.83	0.01	0.06	0.04	0.00	0.00	0.01	0.08					
JX QY 6	0.86	1.00	0.83	1.00	0.79	1.00	1.00	0.78	1.00	1.00	0.87	0.97	0.31	1.00	1.00				
JX QY 8	1.00	1.00	0.94	1.00	0.91	1.00	1.00	0.91	1.00	1.00	0.97	1.00	0.29	1.00	1.00	1.00			
JX YZ	1.00	0.05	0.00	0.10	0.04	0.04	0.60	0.10	0.10	0.32	0.84	1.00	0.06	0.45	0.11	0.96	1.00		
SD LL	0.07	0.06	0.06	0.28	0.02	0.29	0.22	0.01	0.04	0.01	0.00	0.00	0.02	0.02	0.44	0.99	0.96	0.09	
ZJ CS	1.00	0.00	0.88	0.02	0.14	0.00	0.34	0.32	0.00	0.06	1.00	0.51	0.03	0.14	0.02	0.86	0.96	0.13	0.02