不同试剂盒对传粉昆虫携带混合花粉 DNA 提取效果比较*

李 月[1**] 魏 玮[1] 刘文平[1] 赵凯旋[1] 周泽扬[1]
朱朝东[2] 罗阿蓉[2***] 黄敦元[1***]

（1. 农业农村部长江上游传粉昆虫资源保护与利用重点实验室（部省共建），重庆师范大学生命科学学院，重庆 401331；
2. 中国科学院动物研究所，北京 100101）

摘 要 **【目的】** 传粉昆虫所携带花粉的准确鉴定是构建传粉网络的重要环节。本研究通过比较不同植物试剂盒在微量混合花粉 DNA 提取中的差异，以阐明不同试剂盒的提取效果，并明确满足 DNA 提取的混合花粉最低需求量。**【方法】** 将不同地区中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*、凹唇壁蜂 *Osmia excavata* 和白斑切叶蜂 *Amegachile strupigera* 体表携带的花粉进行混合。利用上海生工磁珠法植物基因组 DNA 抽提试剂盒（CZ）、北京 BioTeke（百泰克）离心柱型微量样品基因组 DNA 提取试剂盒（BT）、美国 Omega E.Z.N.A.®MicroElute 基因组 DNA 提取试剂盒（EZ）、北京天根微量样品基因组 DNA 提取试剂盒（TG）及江苏吉锐 Genloci®TNA 抽提试剂盒（GL）提取混合花粉 DNA。基于 *ITS2* 宏条形码技术获取测序数据，通过方差、线性判别和层次聚类分析，比较 5 种试剂盒提取效果。最后，调整试剂盒 BT 的提取方法，降低混合花粉的需求量。**【结果】** 试剂盒 TG 与 GL 提取混合花粉 DNA 浓度较高，试剂盒 CZ、BT 和 EZ 提取混合花粉 DNA 浓度较低，前者浓度约为后者的 5-15 倍。试剂盒 EZ 和 TG 提取混合花粉样品的 DNA 纯度与其它试剂盒存在显著差异。5 种试剂盒检测到植物种类分别为（143 ± 12）（CZ）、（167 ± 8）（BT）、（160 ± 10）（EZ）、（160 ± 6）（TG）和（161 ± 16）种（GL），且不同试剂盒在目、科和属水平上具有显著提取优势的植物，部分植物只能由特定试剂盒提取到 DNA 模板。此外，试剂盒 BT 通过花粉所鉴定的植物种类最多，且能提取到合格 DNA 模板的最低混合花粉质量为 0.02 mg。**【结论】** 不同试剂盒提取微量混合花粉效果不同且各有优势，混合花粉质量最低可以降至 0.02 mg。本研究为选择提取微量混合花粉 DNA 试剂盒继而用于传粉网络研究提供参考。

关键词 传粉昆虫；混合花粉；粉源植物；DNA 试剂盒；DNA 宏条形码

Comparison of different kits for the extraction of mixed pollen DNA carried by pollinators

LI Yue[1**] WEI Wei[1] LIU Wen-Ping[1] ZHAO Kai-Xuan[1] ZHOU Ze-Yang[1]
ZHU Chao-Dong[2] LUO A-Rong[2***] HUANG Dun-Yuan[1***]

(1. Key Laboratory of Conservation and Utilization of Pollinator Resources in the Upper Reaches of the Yangtze River of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China;
2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract **[Objectives]** To compare the performance of different kits in extracting DNA from micro mixed pollen and determine which kits meet the minimum demands of DNA extraction from mixed pollen samples. [**Methods**] Pollen carried on the body surface of *Apis cerana cerana*, *Osmia excavata* and *Amegachile strupigera* from different regions was mixed. Genomic DNA was extracted using the Shanghai BioTeke Magnetic Bead Extraction Kit (CZ), the Beijing BioTeke Centrifugal

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金（31970484）；科技部科技基础资源调查专项（2018FY100405）；中国科学院动物进化与系统学重点实验室开放课题（O529YX5105）

**第一作者 First author，E-mail：15583713308@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors，E-mail：20170054@cqnu.edu.cn；luoar@ioz.ac.cn

收稿日期 Received：2022-02-14；接受日期 Accepted：2022-04-25

Column Genomic DNA Extraction Kit (BT), the Omega E.Z.N.A.® MicroElute Genomic DNA Extraction Kit (EZ), the Beijing Tiangen Genomic DNA Extraction Kit (TG) and the Jiangsu Jirui Genloci® TNA Extraction Kit (GL). Sequencing data were obtained based on *ITS* macro-barcoding and the results obtained from the five kits were compared in terms of variance and analyzed using linear discrimination and hierarchical clustering analysis. The extraction method of the BT kit was adjusted to reduce the amount of mixed pollen required. **[Results]** The concentration of DNA obtained using the TG and GL kits was 5-15 times higher than that obtained using the CZ, BT and EZ kits. The purity of the DNA obtained using the EZ and TG kits was significantly different from that obtained using the other kits. The number of plant species detected by each kit was as follows: (167 ± 8) (BT), (161 ± 16) (GL), (160 ± 10) (EZ), (160 ± 6) (TG), (143 ± 12) (CZ). Some kits were significantly better at extracting DNA from specific plant orders, families and genera. Indeed, some plant DNA could only be extracted to templates by specific kits. The smallest quantity of mixed pollen that could be extracted to a qualified DNA template was 0.02 mg. **[Conclusion]** Different kits varied in their ability to extract the DNA of different plant orders, families and genera. DNA could be extracted from mixed pollen samples as low as 0.02 mg. These findings provide information to guide the selection of kits for extracting DNA from mixed pollen samples.

Key words insect pollinator; mixed pollen; pollen source plants; DNA kits; DNA metabarcoding

昆虫传粉是生态系统服务功能的重要组成部分，在整个传粉服务链条中占比近 90%（Wardhaugh，2015），传粉昆虫与开花植物之间的互惠互利关系构成了复杂的传粉网络（方强和黄双全，2014）。以蜜蜂类为代表的传粉昆虫在维持陆地生态系统平衡的同时，也为人类带来直接和间接的利益，其中中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是我国特有的蜜蜂遗传资源，分布地区广泛、野生资源丰富、民间饲养基础好，并且对保持生态均衡、增进农业丰收有重要作用，是本土开花植物的主要授粉昆虫（王华堂等，2022）。凹唇壁蜂 *Osmia excavata* 作为果园重要的野生传粉昆虫，因为在授粉和管理方面具有众多优势而受到大量研究者关注，是壁蜂属中商业化较为成功的蜜蜂之一（刘丽等，2019）。白斑切叶蜂 *Amegachile strupigera* 主要分布于上海、江苏、浙江、安徽、福建、广西、海南、四川、云南、香港等地，是野生植物及部分农林作物的有效传粉昆虫之一（何波等，2020）。中华蜜蜂、凹唇壁蜂和白斑切叶蜂皆属于广泛分布的多访花性昆虫，是农、林、牧业植物的有效传粉者，具有重要的研究价值。

研究昆虫体表是否携带花粉，以及准确鉴定花粉的构成成分，既是判断传粉昆虫的直接证据，也是传粉网络构建的重要基石（Zhao *et al.*，2016）。通过鉴定花粉以确定蜜（粉）源植物的方法有：1）蜂蜜孢粉学技术（Melissopalynologing）：在扫描电镜下观察花粉的外部形态并且结合蜜（粉）源植物的花粉形态来鉴定花粉种类。该方法不仅非常耗时，并且需要专业知识，且易受操作影响（Bruni *et al.*，2015），而且许多植物只能鉴定到科级及以上阶元，例如桔梗科和唇形科的花粉微观形态特征无法很好被区分（Salmaki *et al.*，2008；Khansari *et al.*，2012）。2）DNA 宏条形码技术（DNA metabarcoding）：该方法有效结合了通用分子标记与高通量测序方法，因具有成本低（Yu *et al.*，2012）、敏感性高（Richardson *et al.*，2015）等特点，广泛应用于混合花粉的鉴定（Yu *et al.*，2012）、微生物组成（Nelson *et al.*，2014）、生物多样性评估（Gibson *et al.*，2014）和传粉网络的构建（Bell *et al.*，2017）等方面。目前，该技术在植物研究方面常用的分子标记有核基因 *ITS / ITS2*、叶绿体基因 *MatK*、*psbA-trnH*、*rbcL*、*trnL* 等以及不同序列组合（李磊等，2021），其中 *ITS2* 基因具有信息量大、稳定性好、区分度高以及鉴定范围广等特点（Chen *et al.*，2010；Pang *et al.*，2013），常被作为花粉 DNA 条形码分子标记应用于植物定性分析方面（Baksay *et al.*，2020；Gous *et al.*，2021）。

混合花粉 DNA 提取效果的优劣是影响 DNA 宏条形码鉴定是否准确的重要因素（Bell *et al.*，2017）。目前，提取植物基因组 DNA 常用方法为试剂盒法，其具有操作简便、快速及纯度高等优点（王洪梅等，2015）。不同试剂盒的提取原理

及产品质量不同，导致提取效果存在一定差异（陆铮铮和李芳，2018），李会等（2013）比较3 种植物试剂盒在玉米 *Zea mays*、水稻 *Oryza sativa* 和大豆 *Glycine max* 上的 DNA 提取效果，发现天根试剂盒（DP305）效果更优。李梅阁等（2018）发现最适合浆果 DNA 提取是 Qiagen DNeasy®植物基因组提取试剂盒。林雪玲等（2019）发现 Biospin 植物基因组 DNA 提取试剂盒对台湾牛樟 *Cinnamomum kanehirae* 的总 DNA 提取效果优于天根植物基因组 DNA 提取试剂盒。因此，依据实验目的和研究对象选择适合的 DNA 提取试剂盒显得至关重要。

蜜蜂科 Apidae 传粉昆虫因具有携粉足且体毛多等特点，其体表携带花粉相对较多。例如野生油茶地蜂 *Andrena camelina* 每只携粉足及花粉篮携粉量为（1.64 ± 0.56）mg，每只携粉足花粉总数为（9 068 ± 2 364）粒（Li *et al.*，2021）；中华蜜蜂每只携粉足携粉量可达（4.15 ± 0.85）mg，花粉数为（11 496 ± 1 871）粒（邱建生，2015）。而其他类群的传粉昆虫因不具备携粉足，所以体表携带的花粉量相对更少（Bell *et al.*，2017；罗长维，2018）。目前，有关传粉昆虫所携带混合花粉的 DNA 提取方法的研究相对较少，而且人为混合花粉定性或定量研究中所使用样品量远高于传粉昆虫体表携粉量（Bell *et al.*，2019；Lang *et al.*，2019），因此，选择并优化混合花粉 DNA 提取试剂盒显得尤为重要。为比较不同试剂盒提取传粉昆虫体表微量混合花粉 DNA 的效果，以及探索提取 DNA 所需混合花粉样品的最低需求量。本研究利用 5 种微量植物 DNA 提取试剂盒对传粉昆虫体表混合花粉进行总 DNA 提取与提取效果差异分析，然后筛选出鉴定植物数量最多的试剂盒进行混合花粉降量实验，以期为微量混合花粉 DNA 提取的试剂盒选择，以及低携粉量蜜蜂的粉源植物鉴定提供参考。

1 材料与方法

1.1 混合花粉样品

本研究供试花粉主要来源于中华蜜蜂（重庆市四面山自然保护区）、凹唇壁蜂（山东、新疆、江西等地）和白斑切叶蜂（江西、湖南、广东等地）体表。使用无菌水洗刷蜜蜂体表花粉，通过离心法使花粉粒沉淀，在无菌条件下，将所得花粉充分混合以用于后续实验。

1.2 微量植物 DNA 提取试剂盒筛选

DNA 提取试剂盒选择标准：1）能提取微量植物基因组 DNA；2）目前在植物相关研究中使用广泛。基于以上标准，本研究选择 5 种试剂盒：上海生工磁珠法植物基因组 DNA 抽提试剂盒（CZ）、北京 BioTeke（百泰克）离心柱型微量样品基因组 DNA 提取试剂盒（BT）、美国 Omega E.Z.N.A.®MicroElute 基因组 DNA 提取试剂盒（EZ）、北京天根微量样品基因组 DNA 提取试剂盒（TG）和江苏吉锐 Genloci®TNA 抽提试剂盒（GL）。

1.3 微量混合花粉 DNA 提取、PCR 扩增和测序

设置 3 个不同质量的微量混合花粉梯度（1.0、1.5 和 2.0 mg），按照相应试剂盒提取指导手册，用 5 种试剂盒分别对混合花粉基因组 DNA 进行 3 次技术性重复提取。取每个梯度下 2.0 μL 总 DNA 进行 1.0 %琼脂糖凝胶电泳检测，以及分光光度检测（OD_{260} /OD_{280} 值）。对 DNA 模板的 *ITS2* 区进行 PCR 扩增，引物序列为 2F：5′-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3′，4R：5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′。PCR 反应体系为 20 μL，其中：DNA 模板 10 ng，5×FastPfu Buffer 4 μL，dNTPs 2.5 μL（2.5 mmol/L），上下游引物各 0.8 μL（5 μmol/L），TransStrat FastPfu Polymerase 0.4 μL，添加 ddH_2O 至 20 μL。反应程序为：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s，共 29 个循环；72 ℃延伸 10 min；10 ℃保存。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后，送上海凌恩生物科技有限公司进行测序。

1.4 测序数据处理与分析

利用 Trimmomatic v0.33 对测序数据过滤优化（Bolger *et al.*，2014）；通过 FLASH v1.2.11 软件对优化数据进行拼接（重叠区长度 ≥10 bp，

重叠区错配率≤ 0.2）（Magoč and Salzberg，2011）；最后利用 Usearch v10.0（http://drive5.com/uparse/）去除嵌合体，获得高质量有效序列。利用 Usearch v10.0 对有效序列在相似性 97 %的水平上进行操作分类单元（Operational taxonomic unit，OTU）聚类（Bokulich *et al.*，2013；Edgar，2013）。基于 UNITE v8.0 数据库（http://unite.ut.ee/index.php），利用 Ribosomal database program（RDP）classifier v2.2 基于贝叶斯算法（http://rdp.cme.msu.edu/）对 OTU 代表序列在不同分类水平进行注释（Kõljalg *et al.*，2013），由于 PCR 引物具有通用性，舍弃注释为真菌的 OTU 序列（Wang *et al.*，2007）。基于注释结果，在 Excel v2016 中进行数据统计，然后利用 SPSS v25.0 进行单因素方差分析（One-way ANOVA）研究组间是否存在显著差异，并使用 GraphPad Prism v8.0 进行可视化。利用在线 Galaxy workflow framework 进行线性判别分析[Linear discriminant analysis（LDA）effect size，LEfSe]揭示差异显著的分类特征（LDA > 4.0）（Segata *et al.*，2011）。最后使用 R 语言“pvclust”包进行层次聚类分析（Suzuki and Shimodaira，2006）。

1.5　微量混合花粉降量

利用检测植物种类最多的试剂盒（BT），对 DNA 提取所需的 1.0 mg 混合花粉进行进一步降量。对试剂盒提取步骤进行调整：水浴裂解时间根据质量选择 60-90 min；选择 40 μL 洗脱缓冲液。拟定的混合花粉质量梯度为 0.5、0.1、0.05、0.02 和 0.01 mg。混合花粉降量：取 1.0 mg 混合花粉，加入 100 μL ddH_2O 振荡混匀，用移液枪吸取 50 μL 的混合物加入到新的离心管，放入离心机 12 000 r/min 离心 3 min，弃上清，重复离心一次，得到 0.5 mg 混合花粉。按照同样的方法获得其他质量的微量混合花粉。

使用调整后的试剂盒对不同混合花粉质量进行基因组 DNA 提取，取 DNA 模板 2 μL 进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测与分光光度检测（OD_{260} / OD_{280} 值）。PCR 扩增引物及反应体系同上，PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测，条带清晰明亮即为合格。

2　结果与分析

2.1　不同试剂盒提取混合花粉 DNA 的浓度和纯度比较

不同 DNA 提取试剂盒提取混合花粉样品的 DNA 纯度和浓度具有差异（图 1）。GL 获得的 DNA 浓度最高，为（122.4 ± 22.4）mg/L，而 CZ 得到的 DNA 浓度最低，为（7.9 ± 2.0）mg/L，5 种试剂盒提取的模板纯度与浓度都满足后续测序标准。在相同混合花粉质量下，BT 和 EZ 提取混合花粉样品的 DNA 浓度无显著差异（P > 0.05），但二者与其它试剂盒皆具显著差异（P < 0.05）；TG 和 GL 无显著差异（P>0.05），但二者与其它试剂盒皆具显著差异（P<0.05）。EZ 和 TG 提取混合花粉样品的 DNA 纯度与其它试剂盒存在显著差异（P<0.05），CZ、BT 以及 GL 之间皆无显著差异（P>0.05）。

2.2　不同试剂盒提取混合花粉 *ITS2* 基因测序和分类注释

不同试剂盒提取不同质量混合花粉所得 DNA 模板经过 Illumina PE250 平台测序，序列数和序列平均长度见表 1。分类注释结果显示，5 种试剂盒总共得到植物 248 种，其中 CZ 鉴定得到（143 ± 12）种植物，BT 鉴定得到（167 ± 8）种，EZ 鉴定得到（160 ± 10）种，TG 鉴定得到（160 ± 6）种，GL 鉴定得到（161 ± 16）种（表 2）。基于试剂盒 BT 提取的基因组 DNA 综合检测的植物种类最多，试剂盒 CZ 最少。

2.3　不同试剂盒提取混合花粉差异分析

线性判别分析显示，5 种试剂盒存在提取优势植物类群上的差异（图 2）。在目水平，唇形目（Lamiales）和十字花目（Brassicales）为 CZ 组优势目，杜鹃花目（Ericales）、伞形目（Apiales）和无患子目（Sapindales）为 BT 组优势目，酢浆草目（Oxalidales）为 EZ 组优势目，菊目（Asterales）和壳斗目（Fagales）为 TG 组优势目，蔷薇目（Rosales）为 GL 组优势目；在科水平，木犀科（Oleaceae）和十字花科（Brassicaceae）为 CZ 组优势科，五列木科（Pentaphylacaceae）

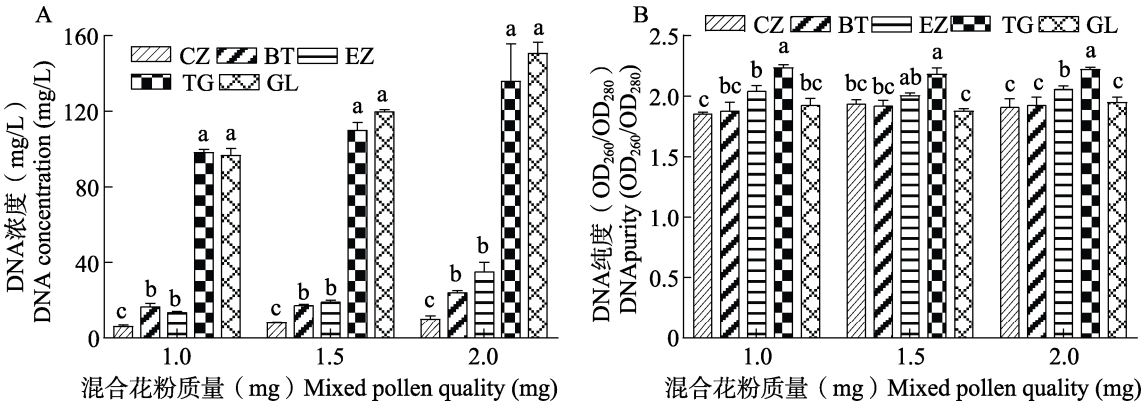

图 1　不同试剂盒提取 3 个质量混合花粉 DNA 的浓度（A）和纯度（B）比较

Fig. 1　Comparison of concentration (A) and purity (B) of three quality mixed pollen DNA extracted by different kits

CZ：上海生工磁珠法植物基因组 DNA 抽提试剂盒；BT：北京 BioTeke（百泰克）离心柱型微量样品基因组 DNA 提取试剂盒；EZ：美国 Omega E.Z.N.A.®MicroElute 基因组 DNA 提取试剂盒；TG：北京天根微量样品基因组 DNA 提取试剂盒；GL 江苏吉锐 Genloci®TNA 抽提试剂盒。图 2 同。

数据为平均值±标准差；柱上标有不同的字母表示在相同样品质量下不同试剂盒提取 DNA 浓度或纯度存在显著差异（$P < 0.05$）。

CZ: Shanghai BioTeke Magnetic Bead Extraction Kit; BT: Beijing BioTeke Centrifugal Column Genomic DNA Extraction Kit; EZ: Omega E.Z.N.A.® MicroElute Genomic DNA Extraction Kit; TG: Beijing Tiangen Genomic DNA Extraction Kit; GL: Jiangsu Jirui Genloci® TNA Extraction Kit. The same as Fig. 2.

Data in the figure are mean ± SD; Histograms with different letters indicate significant differences in the concentration or purity of DNA extracted by different kits at the same sample mass ($P < 0.05$).

表 1　不同试剂盒提取混合花粉 *ITS* 基因测序后数据

Table 1　Different kits extract mixed pollen *ITS* gene sequencing data

试剂盒 DNA kit	混合花粉质量（mg） Mixed pollen quality (mg)	序列数 Sequences	平均长度（bp） Average length (bp)	试剂盒 DNA kit	混合花粉质量（mg） Mixed pollen quality (mg)	序列数 Sequences	平均长度（bp） Average length (bp)
CZ	1.0	56 823	330	TG	1.0	47 483	335
	1.5	52 664	326		1.5	41 976	334
	2.0	50 350	330		2.0	54 315	333
BT	1.0	47 987	336	GL	1.0	45 103	335
	1.5	42 628	337		1.5	52 737	334
	2.0	43 921	336		2.0	36 272	335
EZ	1.0	47 450	336				
	1.5	42 375	338				
	2.0	46 540	335				

CZ：上海生工磁珠法植物基因组 DNA 抽提试剂盒；BT：北京 BioTeke（百泰克）离心柱型微量样品基因组 DNA 提取试剂盒；EZ：美国 Omega E.Z.N.A.®MicroElute 基因组 DNA 提取试剂盒；TG：北京天根微量样品基因组 DNA 提取试剂盒；GL 江苏吉锐 Genloci®TNA 抽提试剂盒。表 2 同。

CZ: Shanghai BioTeke magnetic bead extraction kit; BT: Beijing BioTeke centrifugal column genomic DNA extraction kit; EZ: Omega E.Z.N.A.® MicroElute genomic DNA extraction kit; TG: Beijing Tiangen genomic dna extraction kit; GL: Jiangsu Jirui Genloci® TNA extraction kit. The same as table 2.

表 2　不同试剂盒提取不同微量混合花粉在种水平已注释的数量统计

Table 2　The annotated quantity statistics of different trace mixed pollen extracted by different kits at the species level

试剂盒 Kit	混合花粉质量（mg） Mixed pollen quality (mg)			平均值±标准差 Mean±SD
	1.0	1.5	2.0	
CZ	128	144	158	143±12
BT	162	178	162	167±8
EZ	153	175	156	161±10
TG	161	168	153	160±6
GL	147	183	153	161±16

和五加科（Araliaceae）为 BT 组优势科，杜英科（Elaeocarpaceae）为 EZ 组优势科，菊科（Asteraceae）和壳斗科（Fagaceae）为 TG 组优势科，蔷薇科（Rosaceae）为 GL 组优势科；在属水平，芸薹属（*Brassica*）为 CZ 组优势属，鹅掌柴属（*Schefflera*）和柃木属（*Eurya*）为 BT 组优势属，杜英属（*Elaeocarpus*）为 EZ 组优势属，蔷薇属（*Rosa*）、苹果属（*Malus*）、李属（*Prunus*）和丁香属（*Syringa*）为 GL 组优势属（图 2）。

2.4　混合花粉提取植物层次聚类

为进一步分析传粉昆虫体表携带混合花粉中植物类群与试剂盒的对应关系，本研究采用欧式距离法，对科水平的粉源植物进行定性层次聚类分析。结果显示所有科水平植物可聚为 4 类（图 3）。第一聚类植物为大麻科（Cannabaceae）、樟科（Lauraceae）和报春花科（Primulaceae），特定试剂盒为 CZ 和 GL；第二聚类为爵床科（Acanthaceae）、伞形科（Apiaceae）、桦木科（Betulaceae）、胡桃科（Juglandaceae）、泡桐科（Paulowniaceae）、悬铃木科（Platanaceae）和蓼科（Polygonaceae），特定试剂盒为 BT；第三聚类植物为冬青科（Aquifoliaceae）、天门冬科（Asparagaceae）、胡颓子科（Elaeagnaceae）、桃金娘科（Myrtaceae）、竹柏科（Podocarpaceae）和荨麻科（Urticaceae），特定试剂盒为 EZ；剩下的科水平植物属于第四聚类。

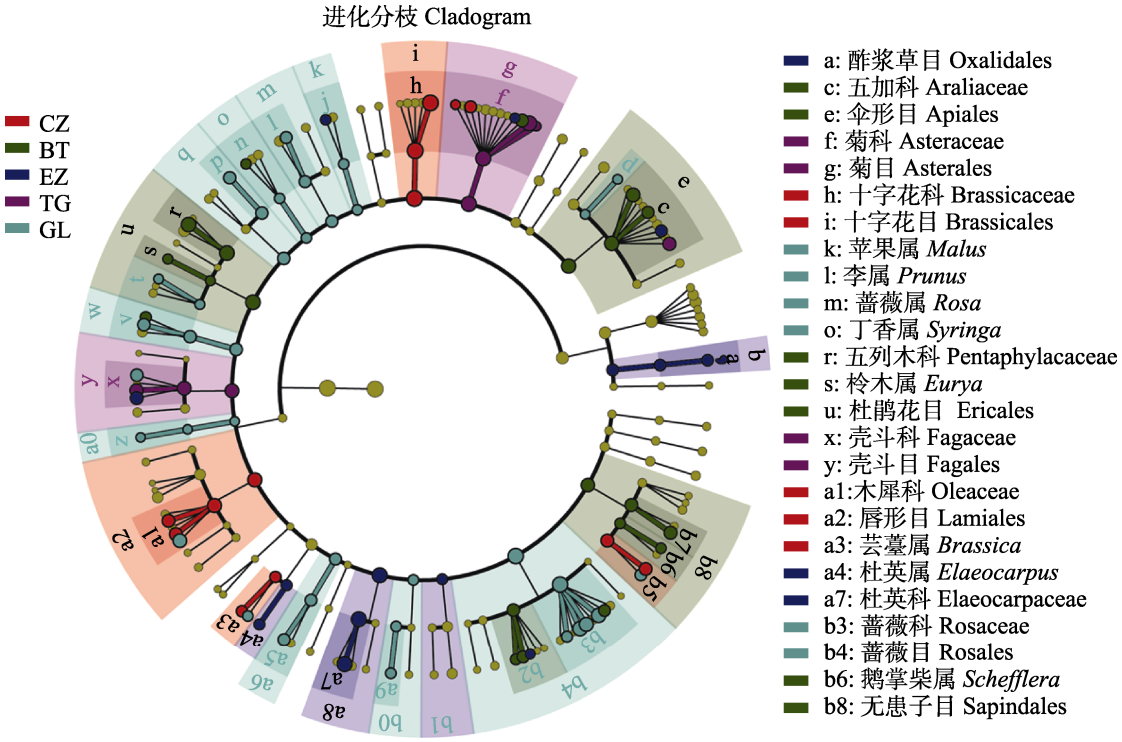

图 2　不同试剂盒混合花粉粉源植物 LEfSe 分析

Fig. 2　LEfSe analysis of mixed pollen nectar plants from different kits

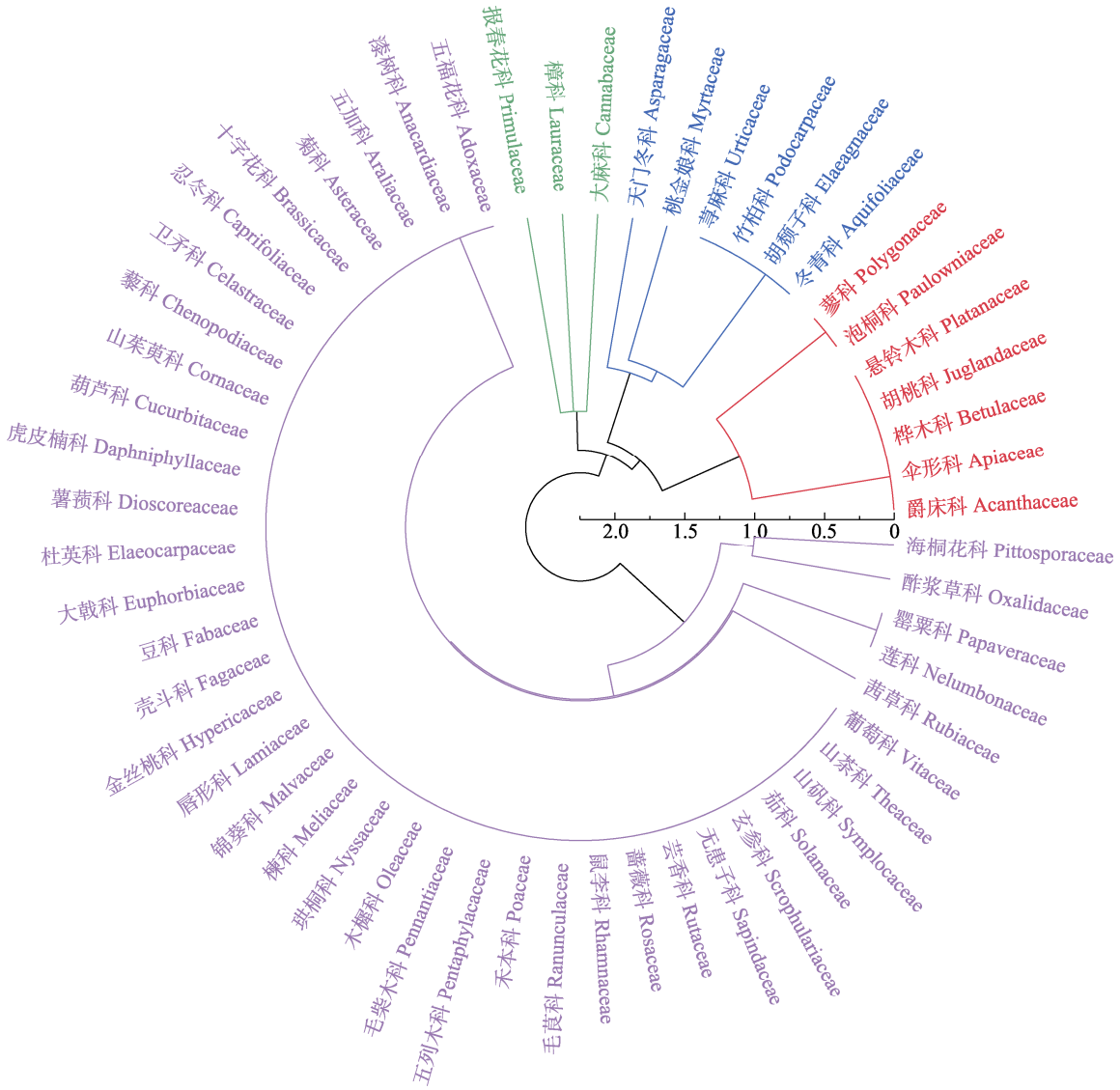

图 3　混合花粉粉源植物层次聚类分析

Fig. 3　Hierarchical clustering of mixed pollen nectar plants

绿色：第一聚类；红色：第二聚类；蓝色：第三聚类；紫色：第四聚类。

Green: First cluster; Red: Second cluster; Blue: Third cluster; Purple: Fourth cluster.

2.5　微量混合花粉降量

不同试剂盒提取不同质量混合花粉所得 DNA 模板经过 Illumina PE250 平台测序，并对序列进行分类注释，结果显示，鉴定粉源植物最多的试剂盒为 BioTeke 离心柱型微量样品基因组 DNA 提取试剂盒（BT），利用 BT 试剂盒提取更低质量（< 0.1 mg）的混合花粉，结果显示，0.5、0.1、0.05 和 0.02 mg 混合花粉的 PCR 产物条带单一且明亮，这表明提取的基因组 DNA 均可以较好地进行下游分析。而 0.01 mg 混合花粉 PCR 产物未出现明亮条带。因此本研究获得试剂盒提取的最低混合花粉质量为 0.02 mg（图 4）。

3　讨论

本研究结果表明，不同 DNA 试剂盒对混合花粉 DNA 模板的提取浓度及纯度效果均有影响，这与 Claassen 等（2013）及 Stephen 等（2015）关于不同试剂盒提取基因组 DNA 的研究一致。本研究中，CZ 提取混合花粉样品的 DNA 浓度显著最低，可能是由于利用磁珠吸附 DNA 时，

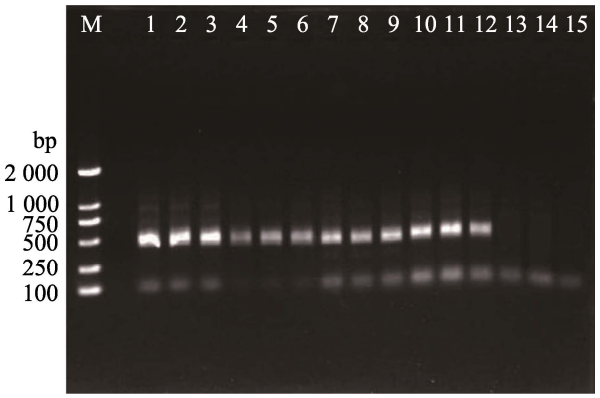

图 4　BT 提取不同质量混合花粉基因组 DNA 的 PCR 扩增电泳结果

Fig. 4　Results of PCR amplification and electrophoresis of different quality mixed pollen genomic DNA extracted by BT

BT：北京 BioTeke（百泰克）离心柱型微量样品基因组 DNA 提取试剂盒；M：DL 2 000 marker；1-3：0.5 mg 混合花粉基因组 DNA 扩增产物；4-6：0.1 mg 混合花粉基因组 DNA 扩增产物；7-9：0.05 mg 混合花粉基因组 DNA 扩增产物；10-12：0.02 mg 混合花粉基因组 DNA 扩增产物；13-15：0.01 mg 混合花粉基因组 DNA 扩增产物。

BT: Beijing BioTeke Centrifugal Column Genomic DNA Extraction Kit; M: DL 2 000 marker; 1-3: 0.5 mg of mixed pollen genomic DNA amplification product; 4-6: 0.1 mg of mixed pollen genomic DNA amplification product; 7-9: 0.05 mg of mixed pollen genomic DNA amplification product; 10 -12: 0.02 mg mixed pollen genomic DNA amplification product; 13-15: 0.01 mg mixed pollen genomic DNA amplification product.

舍弃的下清液中还余未被完全吸附的 DNA。此外，高纯度的 DNA 模板 OD_{260} / OD_{280} 值稳定在 1.8-2.0 之间，但 EZ 和 TG 提取混合花粉样品的 DNA 模板 OD_{260} / OD_{280} 值略高于纯 DNA 的比值，且 DNA 纯度与其它试剂盒存在显著差异（图 1），这可能是由于 EZ 和 TG 试剂盒在 DNA 沉淀步骤中添加了核酸助沉剂，导致提取的模板中可能存在少量的 RNA 残余，但对 PCR 扩增无影响，可加 RNA 酶消解。

在本研究选取的 5 种微量植物 DNA 提取试剂盒中，磁珠法植物基因组 DNA 抽提试剂盒不需要高速离心，但提取过程需要磁力架；BioTeke 离心柱型微量样品基因组 DNA 提取试剂盒综合能检测到最多的粉源植物种类且耗时较短、操作较简单，但对每个样本提取成本也最高；E.Z.N.A.®MicroElute 基因组 DNA 提取试剂盒和 Genloci®TNA 抽提试剂盒耗时较长，需要 3-4 h；天根微量样品基因组 DNA 提取试剂盒和 Genloci®TNA 抽提试剂盒提取的模板浓度较高；Genloci®TNA 抽提试剂盒操作步骤较为繁琐，过程中需要使用酚和氯仿，提取成本较低。综上，本研究中 BioTeke 离心柱型微量样品基因组 DNA 提取试剂盒能更全面地反映微量混合花粉样品中粉源植物组成。

通过层次聚类分析进一步发现大麻科、樟科和报春花科的 DNA 仅可以被磁珠法基因组 DNA 抽提试剂盒和 Genloci®TNA 抽提试剂盒提取，此 3 科花粉皆为近球形，具 3 或 4 孔沟，其中樟科花粉外壁薄易破碎（汤庚国和向其柏，1995；孙京田等，2003）；爵床科、伞形科、桦木科、胡桃科、泡桐科、悬铃木科和蓼科仅可被 BioTeke 离心柱型微量样品基因组 DNA 提取试剂盒检测，这几科植物花粉几乎皆为长球形，花粉外壁具网状雕纹且萌发孔形状较复杂，其中胡桃科和廖科具有两层外壁（卢龙斗等，1999；周忠泽等，2000；胡嘉琪等，2005；杨德奎等，2007；毛霞等，2016）。只有 E.Z.N.A.® MicroElute 基因组 DNA 提取试剂盒检测到冬青科、天门冬科、胡颓子科、桃金娘科、竹柏科和荨麻科，这几科花粉具长圆形、球形、三角形等多种形状，多数花粉表面具纹饰、突起，少数表面光滑（倪京满和赵汝能，1990；高艳春等，2004）。不同试剂盒可特异提取植物 DNA 可能是由于植物花粉壁结构对不同的裂解方法或裂解材料具有不同的敏感性（Henderson *et al.*，2013）。因此，根据不同的植物样品选择不同试剂盒更有利于花粉破壁裂解，得到高浓度、高质量的 DNA 模板，基于此结论，本研究中 5 种试剂盒的特异选择能为其他研究者的实验进一步开展奠定基础。例如，何波等（2016）利用人工巢管研究了白斑切叶蜂的主要生物学特性，另观察统计了该蜂到访植物种类，仅初步确定了报春花科、廖科等为其蜜源植物，结合本研究可进一步探究其蜜（粉）源植物多样性。Lang 等（2019）为研究基因组浅层测序（Genome-skimming）技术在人工混合花粉定量分析中的有效性，需将已知植物种类花粉进行混合，可结合本研究针对性选取试剂盒，以提取

高质量 DNA 用于后续分析。

目前在通过混合花粉鉴定蜜（粉）源植物种类的相关研究中，供试混合花粉用量较大（Lang *et al.*，2019），而某些具有授粉能力的野生传粉昆虫携粉量不多且较难收集，例如，麻风树的主要传粉昆虫大头金蝇 *Chrysomya megacephala* 与紫绿蝇 *Lucilia porphyrina*（罗长维，2018）。此外，同一类昆虫体型越小，携粉量越小（Robertson *et al.*，1992）。基于此，本研究利用检测植物种类最多的试剂盒，进行混合花粉质量降低实验，结果表明在满足后续测序要求的情况下，混合花粉质量最低值为 0.02 mg，这使 DNA 提取所需的花粉量大为降低。目前市场上有很多不同质量、种类的植物 DNA 提取试剂盒，本研究仅选取了 5 种品牌试剂盒进行测评，而不同品牌之间存在较大差异，因此在今后的研究中，可扩大不同提取原理的植物 DNA 提取试剂盒的选择范围，从而进一步筛选出可检测不同植物类型的最适 DNA 提取试剂盒。

参考文献 (References)

Baksay S, Pornon A, Burrus M, Mariette J, Andalo C, Escaravage N, 2020. Experimental quantification of pollen with DNA metabarcoding using *ITS1* and *trnL*. *Scientific Reports*, 10(1): 1–9.

Bell KL, Burgess KS, Botsch JC, Dobbs EK, Read TD, Brosi BJ, 2019. Quantitative and qualitative assessment of pollen DNA metabarcoding using constructed species mixtures. *Molecular Ecology*, 28(2): 431–455.

Bell KL, Fowler J, Burgess KS, Dobbs EK, Gruenewald D, Lawley B, Morozumi C, Brosi BJ, 2017. Applying pollen DNA metabarcoding to the study of plant-pollinator interactions. *Applications in Plant Sciences*, 5(6): 1600124.

Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Caporaso JG, 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 10(1): 57–59.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B, 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114–2120.

Bruni I, Galimberti A, Caridi L, Scaccabarozzi D, De Mattia F, Casiraghi M, Labra M, 2015. A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey. *Food Chemistry*, 170(1): 308–315.

Chen SL, Yao H, Han JP, Liu C, Song JY, Shi LC, Zhu YJ, Ma XY, Gao T, Pang XH, Luo K, Li Y, Li XW, Jia XC, Lin YL, Leon C, 2010. Validation of the *ITS2* region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 5(1): e8613.

Claassen S, Toit ED, Kaba M, Moodley C, Zar HJ, Nicol MP, 2013. A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*, 94(2): 103–110.

Fang Q, Huang SQ, 2014. Progress in pollination ecology at the community level. *Chinese Science Bulletin*, 59(6): 449–458. [方强, 黄双全, 2014. 群落水平上传粉生态学的研究进展. 科学通报, 59(6): 449–458.]

Gao YC, Zhang LX, Liu Q, Wang ZX, Wang PP, 2004. A study on morphology pollen carried on the body of *Hoplitis pyrrhosoma*. *Bulletin of Botanical Research*, 24(2): 166–169. [高艳春, 张丽香, 刘强, 王振兴, 王平平, 2004. 火红拟孔蜂蜂体携带花粉形态的研究. 植物研究, 24(2): 166–169.]

Gibson J, Shokralla S, Porter TM, King I, van Konynenburg S, Janzen DH, Hallwachs W, Hajibabaei M, 2014. Simultaneous assessment of the macrobiome and microbiome in a bulk sample of tropical arthropods through DNA metasystematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(22): 8007–8012.

Gous A, Eardley CD, Johnson SD, Swanevelder DZ, Willows-Munro S, 2021. Floral hosts of leaf-cutter bees (Megachilidae) in a biodiversity hotspot revealed by pollen DNA metabarcoding of historic specimens. *PLoS ONE*, 16(1): e0244973.

He B, Gu ZY, Li HY, Huang DY, 2020. Analysis of species and diversities in pollen plants of *Megachile strupigera* (Hymenoptera: Megachilidae) by DNA barcoding. *Acta Ecologica Sinica*, 40(6): 2122–2129. [何波, 谷战英, 李红英, 黄敦元, 2020. 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, 40(6): 2122–2129.]

He B, Huang DY, Su TJ, Niu ZQ, Gu ZY, Zhu CD, 2016. Bionomics of *Megachile strupigera* Cockerell (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Environmental Entomology*, 8(6): 1237–1244. [何波, 黄敦元, 苏田娟, 牛泽清, 谷战英, 朱朝东, 2016. 白斑切叶蜂的生物学特性观察. 环境昆虫学报, 8(6): 1237–1244.]

Henderson G, Cox F, Kittelmann S, Vahideh HM, Zethof M, Noel SJ, Waghorn GC, Janssen PH, 2013. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PLoS ONE*, 8(9): e74787.

Hu JQ, Cui HB, Zhang YL, 2005. Pollen morphology of the tribe Ruellieae (Acanthaceae) from China. *Journal of Systematics and Evolution*, 43(2): 123–150. [胡嘉琪, 崔鸿宾, 张玉龙, 2005. 国

产爵床科芦莉花族植物的花粉形态. 植物分类学报, 43(2): 123–150.]

Khansari E, Zarre S, Alizadeh K, Attar F, Aghabeigi F, Salmaki Y, 2012. Pollen morphology of *Campanula* (Campanulaceae) and allied genera in Iran with special focus on its systematic implication. *Flora*, 207(3): 203–211.

Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, Bates ST, Bruns TD, Bengtsson-Palme J, Callaghan TM, Douglas B, Drenkhan T, Eberhardt U, Dueñas M, Grebenc T, Griffith GW, Hartmann M, Kirk PM, Kohout P, Larsson E, Lindahl BD, Lücking R, Martín MP, Matheny PB, Nguyen NH, Niskanen T, Oja J, Peay KG, Peintner U, Peterson M, Põldmaa K, Saag L, Saar I, Schüßler A, Scott J A, Senés C, Smith ME, Suija A, Taylor DL, Telleria MT, Weiss M, Larsson KH, 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 22(21): 5271–5277.

Lang DD, Tang M, Hu JH, Zhou X, 2019. Genome‐skimming provides accurate quantification for pollen mixtures. *Molecular Ecology Resources*, 19(6): 1433–1446.

Li H, Ren ZY, Wang Y, Wang JG, 2013. Comparison on the DNA extraction effects of different DNA extraction kits from crop seeds. *Hubei Agricultural Sciences*, 52(8): 1956–1958. [李会, 任志莹, 王颖, 王建忠, 2013. 不同DNA提取试剂盒提取作物种子基因组 DNA 效果的比较. 湖北农业科学, 52(8): 1956–1958.]

Li HY, Luo AC, Hao YJ, Dou FY, Kou RM, Michael CO, Zhu CD, Huang DY, 2021. Comparison of the pollination efficiency of *Apis cerana* with wild bees in oil-seed camellia fields. *Basic and Applied Ecology*, 56: 250–258.

Li L, Jiang J, Chen YX, 2021. Recent advances in the application of DNA metabarcoding technology in forensic identification of animals and plants. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)*, 45(1): 235–241. [李磊, 蒋敬, 陈云霞, 2021. 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, 45(1): 235–241.]

Li MG, Wu YJ, Yang YG, Deng TT, Wang B, Chen Y, 2018. Comparison of extraction methods of genomic DNA and optimization of PCR for Berries. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 18(6): 60–67. [李梅阁, 吴亚君, 杨艳歌, 邓婷婷, 王斌, 陈颖, 2018. 浆果基因组 DNA 提取方法比较及 PCR 优化. 中国食品学报, 18(6): 60–67.]

Lin XL, Zheng R, He TY, Yang J, Zheng YS, 2019. Extraction of total DNA and PCR verification for *Cinnamomum kanehirae*. *Anhui Agricultural Sciences Bulletin*, 25(2): 7–9. [林雪玲, 郑蓉, 何天友, 杨杰, 郑郁善, 2019. 台湾牛樟总DNA提取方法研究及其 PCR 验证. 安徽农学通报, 25(2): 7–9.]

Liu L, Li LL, Ou YF, Li C, Yu Y, Qu CH, Qu ZL, Men XY, Ye BH, 2019. Fruit-setting and yield increase for apple pollination by *Osmia excavata* Alfken and evaluation of economic value in Shandong province. *Apiculture of China*, 70(8): 65–68. [刘丽, 李丽莉, 欧阳芳, 李超, 于毅, 曲诚怀, 曲在亮, 叶保华, 门兴元, 2019. 山东省凹唇壁蜂为苹果授粉坐果增产及经济价值评估. 中国蜂业, 70(8): 65–68.]

Lu LD, Xie LX, Sun FC, Du QY, 1999. Study on the pollen morphology of the genus *Paulownia*. *Journal of Henan Normal University*, 27(4): 104–106. [卢龙斗, 谢龙旭, 孙富丛, 杜启艳, 1999. 泡桐属植物花粉形态研究. 河南师范大学学报, 27(4): 104–106.]

Lu ZZ, Li F, 2018. Comparison of the DNA extraction effects of tree kits on the tobacco after baking. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 33(1): 181–184. [陆铮铮, 李芳, 2018. 3 种试剂盒提取烤后烟叶 DNA 的效果比较. 云南农业大学学报, 33(1: 181–184.]

Luo CW, 2018. Pollination efficiency of major pollinators for *Jatropha curcas*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 31(4): 849–855. [罗长维, 2018. 麻疯树主要传粉昆虫的传粉效率比较研究. 西南农业学报, 31(4): 849–855.]

Magoč T, Salzberg SL, 2011. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21): 2957–2963.

Mao X, Li XC, Liu JJ, Fu XX, 2016. Scanning electron microscope observation on pollen morphology of six tree species in Juglandaceae. *Journal of Plant Resources Environment*, 25(4): 104–106. [毛霞, 李晓春, 刘晶晶, 淑香香, 2016. 胡桃科 6 个树种花粉形态的扫描电镜观察. 植物资源与环境学报, 25(4): 104–106.]

Nelson MC, Morrison HG, Benjamino J, Grim SL, Graf J, 2014. Analysis, optimization and verification of illumina-generated 16S rRNA gene amplicon surveys. *PLoS ONE*, 9(4): e94249.

Ni JM, Zhao RN, 1990. SEM and LM observation of the pollen of the genus *Asparagus* in Gansu. *Journal of Lanzhou University*, 1(1): 17–19. [倪京满, 赵汝能, 1990. 甘肃天门冬属植物花粉形态学的比较观察. 兰州大学学报, 1(1): 17–19.]

Pang XH, Shi LC, Song JY, Chen XC, Chen SL, 2013. Use of the potential DNA barcode *ITS2* to identify herbal 348 materials. *Journal of Natural Medicines*, 67(3): 571–575.

Qiu JS, 2015. Study on the pollinators of camellia plants in southwest China. Doctoral dissertation. Beijing: China Academy of Forestry. [邱建生, 2015.中国西南山茶属植物传粉昆虫研究. 博士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院.]

Richardson RT, Lin CH, Sponsler DB, Quijia JO, Goodell K, Johnson RM, 2015. Application of ITS2 metabarcoding to

determine the provenance of pollen collected by honey bees in an agroecosystem. *Applications in Plant Sciences*, 3(1): 1400066.

Robertson AW, 1992. The relationship between floral display size, pollen carryover and geitonogamy in *Mmyosotis colensoi* (Kkirk) macbride (Bboraginaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 46(1): 333–349.

Salmaki Y, Jamzad Z, Zarre S, Bräuchler C, 2008. Pollen morphology of *Stachys* (Lamiaceae) in Iran and its systematic implication. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 203(8): 627–639.

Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C, 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6): R60.

Shun JT, Yang DK, Kong Y, 2003. Study on pollen morphology of five species of Primulaceae. *Shandong Sciences*, 16(2): 18–21. [孙京田, 杨德奎, 邱军, 孔勇, 2003. 报春花科 5 种植物的花粉形态研究. 山东科学, 16(2): 18–21.]

Stephen CY, Lin SW, Lai KM, 2015. An evaluation of the performance of five extraction methods: Chelex 100, QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAamp DNA Investigator Kit, QIAsymphony DNA Investigator Kit and DNA IQ. *Science & Justice Journal of the Forensic Science Society*, 55(3): 200–208.

Suzuki R, Shimodaira H, 2006. Pvclust: An R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics*, 22(12): 1540–1542.

Tang GG, Xiang QB, 1995. Study on pollen morphology of Lauraceae. *Journal of Systematics and Evolution*, 33(2): 161–171. [汤庚国, 向其柏, 1995. 樟科植物花粉形态研究. 植物分类学报, 33(2): 161–171.]

Wang HM, Cao Y, Bai H, Li CM, 2015. Optimizing condition of extracting genomic DNA on *Populus davidiana* by kit. *Forestry Science & Technology*, 40(3): 1–4. [王洪梅, 曹焱, 白卉, 李春明, 2015. 试剂盒法提取山杨基因组 DNA 的条件优化. 林业科技, 40(3): 1–4]

Wang HT, Li LB, Chen HY, Zhang XF, Chen LD, Zhao HX, 2022. Progress in pollination by *Apis cerana cerana*. *Journal of Environmental Entomology*, 44(1): 84–91. [王华堂, 李良斌, 陈海玉, 张学锋, 陈隆达, 赵红霞, 2022. 中蜂的传粉作用研究. 环境昆虫学报, 44(1): 84–91.]

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR, 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Eenvironmental Mmicrobiology*, 73(16): 5261–5267.

Wardhaugh CW, 2015. How many species of arthropods visit flowers? *Arthropod–Plant Interactions*, 9(6): 547–565.

Yang DK, Song LB, Song YM, 2007. Research on pollen morphology of Platanaceae. *Shandong Sciences*, 5(1): 21–23. [杨德奎, 宋立波, 宋艳梅, 2007. 悬铃木科花粉形态的研究. 山东科学, 5(1): 21–23.]

Yu DW, Ji Y, Emerson BC, Wang X, Ye C, Yang C, Ding Z, 2012. Biodiversity soup: Metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(4): 613–623.

Zhao YH, Ren ZX, Lázaro A, Wang H, Bernhardt P, Li HD, Li DZ, 2016. Floral traits influence pollen vectors' choices in higher elevation communities in the Himalaya-Hengduan mountains. *BMC Ecol*ogy, 16(1): 1–8.

Zhou ZZ, Xu RX, Zhuang YL, Lin ZQ, 2000. Study on pollen exine ultrastructure of the Polygonaceae. *Journal of Systematics and Evolution*, 38(5): 446–451. [周忠泽, 许仁鑫, 庄永龙, 林中清, 2000. 蓼科花粉外壁超微结构的研究. 植物分类学报, 38(5): 446–451.]