

花粉団子の DNA バーコーディングによる種同定技術

試験研究計画名：北海道における花粉交配用ミツバチの安定生産技術の開発

地域戦略名：蜜蜂被害の軽減手法の確立

研究代表機関名：（研）農研機構畜産研究部門

地域の競争力強化に向けた技術開発のねらい：

ミツバチは花蜜の他に、花粉を花粉団子とよばれる塊にして後ろ脚に付着させ、巣に持ち帰ります（図1左）。その花粉団子の種同定によってミツバチが利用している蜜源を明らかにする技術は、花粉種によっては訪花場所の特徴から農薬暴露被害の危険性を示唆する情報になるため、健全な巣箱の管理に貢献すると考えられます。また、ミツバチが訪花した蜜源の植物種が明らかになることで、これまで蜜源が不明のため様々な蜂蜜の混合した百花蜜として販売されていたものが、蜜源を特定した形で付加価値をつけて販売できる可能性があります。蜜源を明らかにするには、蜂蜜に微量に混ざっている花粉を顕微鏡で分析する方法が一般的でしたが、本技術開発は、花粉団子（図1右）の遺伝子情報を解析することにより、花粉分析の経験がなくても比較的取り組みやすい方法を示すことを目的としました。



図1 シロツメクサで花粉を集めるセイヨウミツバチ（左）と、巣に持ち帰った花粉団子（右）

セイヨウミツバチの後ろ脚の外側に、団子状の塊が付着しているのがわかります。これが花粉団子とよばれるもので、シロツメクサの花粉団子はこのような緑褐色をしています。他の花で集めた花粉団子は右の写真のようにさまざまな色をしています。

開発技術の特性と効果：

セイヨウミツバチが巣に持ち帰る花粉団子の DNA を抽出・精製し、バーコード領域を解析することでワーカーが利用している花粉資源の種同定を行う技術を開発しました。抽出・精製は市販のキットを利用することで簡便に行うことができ、バーコード領域は専用のプライマーを用いて PCR にて増幅してシーケンサーで配列を解読します（図2）。今回開発した手法は、セイヨウミツバチの連続訪花性から、1個の花粉団子は基本的に1種類の花から形成されることに注目して設計されています。得られた塩基配列を公開データベースに蓄積された情報と比較し、図鑑等の植生情報を加味することでその植物種を決定することができます。北海道で夏期に得た1,000個以上の花粉団子を対象に種同定を試みた結果、99%以上の花粉団子の種同定（一部は種同定には至らず、属レベルでの同定）に成功しました。本手法の利用例を図3に示します。ひとつの巣箱からサンプリングされた花粉団子から48個をランダムに選び、それらのDNAを個別に精製後、バーコード領域の配列を解読したところ、48個すべての花粉団子について種レベル（一部は属レベル）での同定に成功しました。この時期、セイヨウミツバチがソバヤムラサキツメクサ（アカクローバ）によく訪花していたことがわかります。

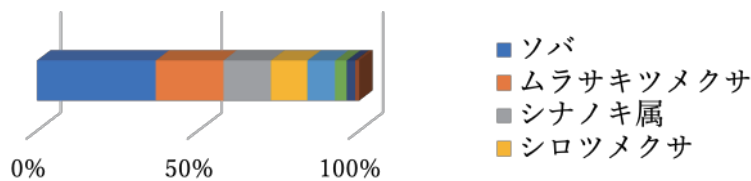
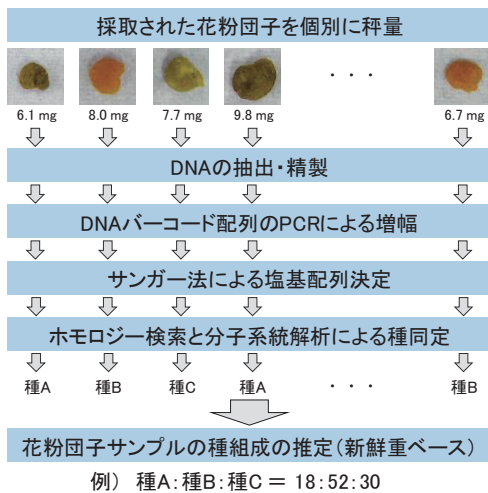


図3 セイヨウミツバチが集めた花粉団子の分析例（北海道で8月上旬にサンプリング）
ソバ、ムラサキツメクサ、シナノキ属の3種の花粉団子が全体の70%以上を占めることがわかります。

開発技術の経済性：

観察者の経験と技術に大きく依存する顕微鏡による形態観察で行われてきた同定作業を簡易化させ、セイヨウミツバチがどのような花粉を集めているのかを効率よく把握するのに役立ちます。この技術を利用することで、顕微鏡を用いて種同定する技術習得の時間（一般に、数年以上は必要とされる）を大幅に削減できます。花粉団子48個のDNA配列の解読に要する費用はおよそ5万円です。花粉種の同定は、花粉種によっては訪花場所の特徴から農薬暴露被害の危険性を示唆する情報になります。

こんな経営、こんな地域におすすめ：

蜂蜜の由来や産地に関する情報を開示し、商品の付加価値を高めて販売することを目指す養蜂業者の方々、および農薬被害を受けやすい時期に巣箱の安全管理を目指す養蜂業者や技術普及員の方々などにおすすめです。

技術導入にあたっての留意点：

巣箱の出入り口に市販の花粉団子トラップ（「花粉採集器」という名称で市販されています。使用方は販売元の情報をご参照ください）を設置することで花粉団子は容易に回収できますが、そこからDNAを抽出・精製して配列を解読するステップは分析専門の業者等に依頼する必要があります。また、得られた塩基配列から植物種を決定する際は、専門家に相談することが望ましいです。

研究担当機関名：（研）農研機構農業環境変動研究センター

お問い合わせは：（研）農研機構農業環境変動研究センター 研究推進室

E-mail niaes_manual@ml.affrc.go.jp

執筆分担（（研）農研機構 農業環境変動研究センター 加茂綱嗣）

図2 DNAバーコーディングによる種同定のスキーム

巣箱の出入り口に花粉団子トラップを設置し、回収された花粉団子を個別に用います。それぞれ新鮮重を測定し、市販のキットを用いてDNAを抽出・精製します。得られた試料はPCRによりバーコード領域（葉緑体 *trnL-trnF* 領域と核 ITS2 領域を併用）を増幅し、サンガー法によって塩基配列を決定します。BLASTによるホモロジー検索によって類似の配列を抽出し、分子系統樹を再構築することで属や種レベルで花粉の同定が可能になります。最後に種ごとに新鮮重を合算し種組成が推定できます。