

第十八屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA18-372

作品名稱：歐洲蜂與紅麴菌的可能共生關係探討

姓名：洪宇潔

關鍵詞：紅麴菌、歐洲蜂、共生

歐洲蜂與紅麴菌的可能共生關係探討

摘要

紅麴菌是備受矚目的熱門保健素材，但有關紅麴菌在自然界中的生態棲位與扮演的角色則鮮為人知。近年來蜜蜂族群的健康以及其對於人類社會的衝擊備受關注，有文獻指出巴西無螫蜂與紅麴菌具有共生關係，存在於蜂巢中的紅麴菌能提升幼蜂的存活率。為了釐清與人類關係更直接密切的歐洲蜂（也就是一般養殖的蜜蜂）是否也與紅麴菌存在類似的關係，本研究針對歐洲蜂的天然蜂巢樣品進行真菌調查。巢片的直接觀察顯示，歐洲蜂巢中存在相當數量的真菌孢子，而花粉粒觀察結果顯示真菌孢子的來源很有可能是透過花粉的採集。本研究分離出的菌株經過形態觀察以及 ITS 和 β -tubulin 基因序列比對，確認三種蜂巢樣品中皆存在紅麴菌 *Monascus ruber/pilosus* 菌株，證實歐洲蜂蜂巢內確實有紅麴菌存在。由於紅麴菌普遍存在於不同蜂類物種以及不同的蜜源和地點的蜂巢中，此一結果顯示紅麴菌與蜂群可能具有共生關係。未來我們將以歐洲蜂與紅麴菌共生機制，以及紅麴菌的傳遞途徑做為研究方向，期待能對蜜蜂生態及人類經濟有所貢獻。

目錄

中文摘要.....	1
目錄.....	2
一、研究動機.....	3
二、研究目的.....	4
三、研究設備及器材.....	6
四、研究過程與方法.....	8
五、研究結果.....	12
(一)分子鑑定結果.....	12
(二)DNA 定序結果.....	14
(三)親緣關係樹的建立與分析.....	15
(四)顯微鏡觀察結果.....	16
六、討論.....	19
七、結論.....	23
八、參考資料.....	24

一、研究動機

蜂類在生態系統中扮演重要角色，牠們是關鍵的傳粉媒介。在全球 107 種主要作物中，蜂類協助高於 90 % 的作物授粉(Klein, et al., 2006)，牠們不僅協助維持生態多樣性，也為人類帶來許多經濟效益。近年來，由於病原菌感染、農藥施放、棲地流失及氣候變遷等因素(Potts, et al., 2010)，世界各地陸續發現蜂群數量減少的趨勢(Cameron, et al., 2011)，這可能造成植物授粉的困難，進而導致生態系崩潰。因此，維護蜂類生態是當務之急。

維持蜂類生態健康有許多面向，例如：減少農藥使用、減緩地球暖化、減少開墾野生林地等，良好的共生關係也是維持生態平衡要素。我們在探討文獻時讀到紅麴屬(*Monascus*)真菌與巴西無螫蜂(*Melipona scutellaris*)具有共生關係，所以我們想知道人類普遍養殖用於產蜜，與人類關係更為密切的歐洲蜂(*Apis mellifera*)，是否也與紅麴菌有類似的共生關係，以及這種共生關係對於近年人類所關切的蜜蜂健康的可能影響。此外，由於現今的紅麴菌株均經過人類長期的馴化培養，可能與自然界中的野生菌株有一定程度的差異，造成紅麴菌生態研究的失真。我們想要知道野生紅麴菌株在生態系中所扮演的角色，並且探究紅麴菌散佈與傳遞的可能方式。

二、研究目的

(一)研究背景

1.紅麴菌與巴西無螫蜂的共生關係

文獻(Menezes, et al., 2015)指出巴西無螫蜂的幼蟲存活率與紅麴屬真菌有密切的關係。育雛工蜂會將食物反芻，並將半液體食物鋪在育幼蜂室中，待女王蜂將卵產在食物上面，工蜂再把蜂室封起來。當幼蜂發育完成時，才會自行開啟蜂蠟。在此過程中，卵大約在產出後三日孵化，當卵即將孵化時，紅麴菌菌絲開始擴張。紅麴菌生長在巢壁上及幼蟲的食物表面。在蜂蛹發育的過程中，真菌量因被食用漸漸下降，之後完全被幼蟲吃光而消失。

因為研究者只有在蜂巢中發現菌絲(mycelium)，而沒有分生孢子(conidia)，推測這些真菌可能停留在蜂的消化道中，並透過交哺而傳播。不同於無螫蜂，其他與真菌共生的物種，例如某些螞蟻、白蟻則會把孢子儲存在巢特定的構造中。該研究顯示，在有紅麴菌菌絲生長的育幼蜂室中，幼蟲存活率顯著大於沒有紅麴菌生長的。此研究認為紅麴屬真菌與無螫蜂共生的機制為真菌的次級代謝產物使育幼食物免於受微生物污染。

在演化史中，不乏植物與真菌共生的例子，如菌根菌與植物之間的絕對共生關係。動物與真菌共生的例子雖較少見，但社會性昆蟲如螞蟻確實與特定真菌會形成互利共生關係。因此，紅麴菌與無螫蜂共生的實例令我們十分好奇，加上紅麴菌在野生環境中的生態地位是個尚未研究透徹的領域，我們想了解世界各地廣泛養殖用於生產蜂蜜的歐洲蜂，是否也與紅麴菌具有共生關係。

2.紅麴菌(*Monascus*)基本認識

紅麴屬於真菌界(*Fungi*)、子囊菌門(*Ascomycota*)、散囊菌綱(*Eurotiomycetes*)、散囊菌目(*Eurotiales*)、紅麴菌科(*Elaphomycetaceae*)、紅麴菌屬(*Monascus*)。紅麴為東方的傳統食品和中藥，為腐生生物，多生長於穀物。法國學者 Van Tieghem 於 1884 年首先建立紅麴屬(*Monascus*)。紅麴菌的主要特徵為：菌絲內具有隔膜(septum)，且呈無色、褐色，或是紅色，菌絲末端會產生大型厚壁子囊果，擁有燈泡狀分生孢子，菌落呈橘紅色或褐色。

表 1 國際公認的紅麴菌物種

	BCRC ID	ATCC ID	CBS ID
<i>Monascus pilosus</i>	31502	16363	286.34
<i>Monascus ruber</i>	31532	15670	135.60
<i>Monascus purpureus</i>	31542	16365	109.07
<i>Monascus floridanus</i>	33310	64205	-
<i>Monascus sanguineus</i>	33446	200613	123568
<i>Monascus lunispora</i>	33640	204397	113675
<i>Monascus pallens</i>	33641	200612	-
<i>Monascus argentinensis</i>	33998	-	109402
<i>Monascus eremophilus</i>	-	62925	123361

- : Not in collection.

3. 歐洲蜂(*A. mellifera*)基本認識

歐洲蜂屬於動物界(*Animalia*)、節肢動物門(*Arthropoda*)、昆蟲綱(*Insecta*)、膜翅目(*Hymenoptera*)、蜂科(*Apidae*)、蜜蜂屬(*Apis*)。歐洲蜂在世界各地被廣泛養殖用於產蜜(圖 1)，其亞種義大利蜂(*A. mellifera ligustica*)為臺灣產值最高的蜂種。歐洲蜂的優點為，其性情較溫順，蜂蜜、花粉產量大，不易分巢等等；缺點為方向感弱，易迷失至其他蜂箱。



圖 1 人工養殖的歐洲蜂蜂巢與蜜蜂

(二) 研究目標

1. 調查養殖用於產蜜的歐洲蜂蜂巢中是否有紅麴菌存在，以釐清紅麴菌存在於蜂巢中是否為一普遍的現象。
2. 進行紅麴菌分離株的鑑定與比對，以了解此種共生關係是否具有菌種專一性。
3. 如果共生關係存在，歸納紅麴菌的可能傳遞散播路徑。

三、研究設備及器材

(一) 樣品

1. 蜂巢樣品(養蜂過程中產出的天然蜂巢，非使用人工基礎巢片進行養殖者)

表 2 蜂巢樣品來源

樣品來源	桃園市觀音區桃 83 鄉道 102 一蜜蜂養殖場 (24°58'55.1"N 121°08'08.2"E)	
	咸豐草蜜	2018 / 9 / 20
	(<i>Bidens pilosa</i>)	(流蜜期 5、6 月，約 6 月中封蓋)
樣品採集	日本女貞蜜	2018 / 9 / 10
時間	(<i>Ligustrum liukiense</i>)	(流蜜期 5 月初，約 5 月中封蓋)
	白千層蜜	2018 / 9 / 20
	(<i>Melaleuca leucadendron</i> Linn)	(約 9/6 開花，尚未封蓋)

註：蜜源為開放空間，採集地點為定位方圓 3~4 km。採集後蜂巢樣品儲存於 4°C。

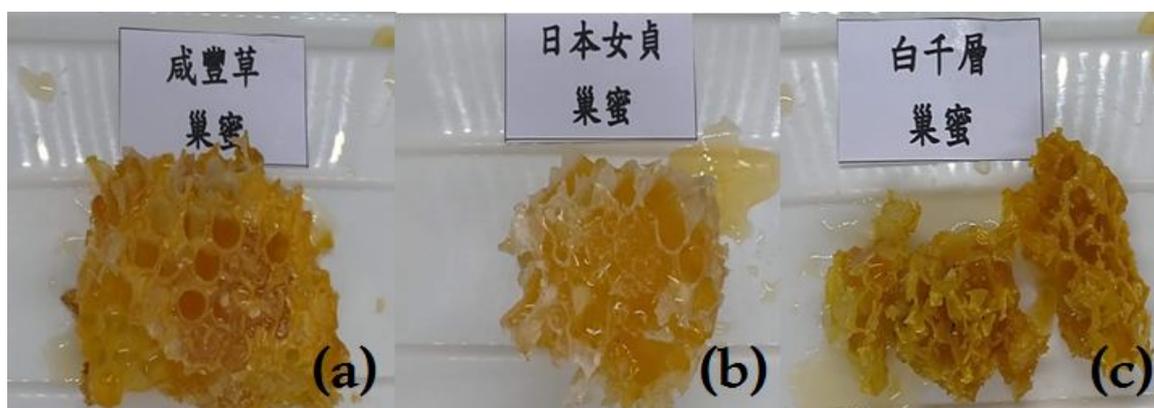


圖 2 切割後的蜂巢樣品——(a)咸豐草、(b)日本女貞與(c)白千層(圖片提供:唐婉瑋)

2. 花粉樣品(未滅菌)(圖 3)

樣品來源：臺東縣卑南鄉臺 9 線附近 (22°52'07.9"N 121°06'53.5"E)



圖 3 花粉樣品

(二)真菌培養器材

1.培養基

(1)液態培養基 PDB 配置：Potato Dextrose Broth (24 g/L)。

(2)固態培養基 PDA 配置：Potato Dextrose Broth (24 g/L)、Agar Powder (20 g/L)、Chloramphenicol (Crm, 氯黴素) (25 mg/L in EtOH)。

2.塗盤器材：Peptone water (0.1%)、接種環、L 型玻棒、滅菌棉棒。

(三)磨菌粉器材：液態氮或酒精、研鉢、濾網、PDB 菌液。

(四)抽 DNA 器材

Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit、Lysis Buffer、Binding Buffer、Proteinase K solution(保存於-20°C，使用前加無菌水(10 mg/1 mL))、Wash Buffer(使用前加酒精(10 mL Wash Buffer /55 mL Ethanol))、Elution Buffer、Spin column、Collection tube。

(五)DNA 濃度測定儀：Qubit dsDNA BR Assay Kit、Qubit dsDNA BR standard 1、Qubit dsDNA BR standard 2、Qubit reagent。

(六)PCR 器材

1.PCR 反應器：Perkin Elmer geneAMP PCR system 2400、Applied Biosystems thermal cycler 2720。

2.PCR 藥品：ddH₂O、2.5 μM dNTP、1 μM ITS-1/ ITS-4、β-tubulin-3/β-tubulin-4r primer、1X S-T Exsel buffer (10X) with 20 μM MgSO₄、1/10 Exsel high fidelity DNA polymerase、template DNA。

(七)電泳器材

1.電泳膠配置：Agarose low EEO (1 g)、0.5X TAE buffer (100 mL)。

2.緩衝液配置：50X TAE buffer (10 mL)、dH₂O (990 mL)。

3.凝膠電泳藥品：1Kb SMB Ladder DNA Marker II (5 μL)、6X Loading Dye(1 μL)。

4.其他：電泳槽、溴化乙錠(Ethidium bromide, EtBr)、DigiGel 數位式核酸電泳分析系統(Topbio)與震盪機(Major Science)。

(八)玻片製作器材：Polyvinyl alcohol-lactic acid-glycerol (PVLG)、載玻片與蓋玻片。

(九)其他器材：無菌操作台(JW-5N)、NewClassic MF 精密天平(Mettler Toledo)、乾浴機(Major Science)、加熱攪拌儀(Harmony)、Cube 迷你微量離心機(GeneReach)、Vortex Genie 2 震盪機(Scientific Industries)、離心機(Hermle)、10、20、100、200、1000 μL 微量滴管(Labnet、Socorex、Gilson)、Labophot 顯微鏡(Nikon)、LUS-150R 低溫震盪培養箱(Lian Shen Enterprise co., LTD)、TG5 低溫震盪培養箱(FISRTEK)與滅菌釜(TM-328)。

四、研究過程與方法

(一)研究架構(圖 4)

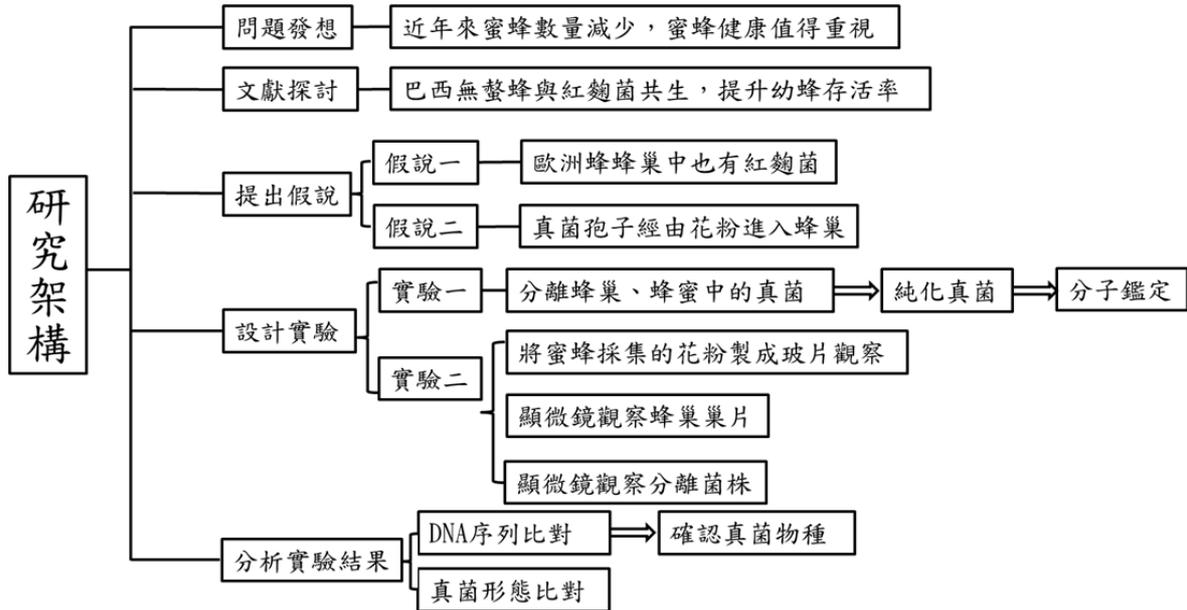


圖 4 研究架構圖

(二)實驗設計

1.假說一：臺灣蜂農所飼養的歐洲蜂，蜂巢中也有紅麴菌。

實驗一：我們向桃園一蜂農取得天然建造且未滅菌蜂巢樣品。以蜜源區分，分別為日本女貞、白千層和咸豐草。本實驗目的為分離並培養蜂巢內的真菌，以利觀察及確認品種。我們參考文獻(Barbosa, et al., 2017)中分離真菌的方法，加入 0.1% Peptone water 塗盤。Peptone water 可以提供微生物較溫和的環境，中和微生物細胞表面的電荷和疏水性聚集的力量，提高菌株分離的成功率。而 PDA 中加入 chloramphenicol (Crm)是為了抑制細菌生長，以利觀察真菌。

(1)分離蜂蜜中的真菌

- 取蜂蜜 1 mL 加 9 mL 0.1% Peptone water 稀釋成 10 mL。接著序列稀釋 10^1 、 10^2 與 10^3 倍，取稀釋液 100 μ L，於 PDA (+ Crm 100 mg/L)上以 L 型玻棒塗盤培養。
- 以步驟 a 方法，但未進行序列稀釋，取稀釋液 100 μ L，直接塗盤。
- 將培養皿置於 28°C 培養箱，培養大約 7 日，不能太久以免菌落重疊影響實驗結果。

(2)分離蜂巢中的真菌

(方法一)

- 隨機選取數個蜂室，以棉棒沾 0.1% Peptone water 擦拭蜂室表面，用棉棒直接於 PDA (+ Crm 25mg/L)塗盤培養。
- 將培養皿置於 28°C 培養箱，培養大約 7 日。

(方法二)

- a. 隨機選取一小塊蜂巢(約 4~8 個蜂室)，放入含 3 mL 0.1% Peptone water 離心管中，震盪後用棉棒直接於 PDA (+ Crm 25 mg/L) 塗盤培養。
- b. 將培養皿置於 28°C 培養箱，培養大約 7 日。

(3) 純化真菌過程：初步分離後，以接種環四區畫線，將培養基上外觀不同的菌落分離到無添加 Crm 的 PDA 上培養，確認培養基中只有單一菌種。將培養皿中的各個外觀不同菌落以 tip 後端挖取圓塊，放在 PDB 中培養，作為下一步抽取 DNA 的樣品。選取菌落 LFB-1、LFB-2、LFB-3、LFB-4、LFB-5、LFB-6、LFD-1、LFD-2、LFD-3、LFY、LFW、MFG-2、MFG-3、MFB-1、MFB-2、MFB-3、MFB-4、MYP、MYR、MYW、MFO、MFY、BFB-1、BFB-2、BFW、BYW、BBA、BFD-1、BFD-2、BFD-3。

(4) 分子鑑定

a. 磨菌粉(液態氮法)

- (a) 將 PDB 培養的菌液以濾網瀝乾，將瀝出的菌置於研鉢中。
- (b) 取適量液態氮加入研鉢中，趁液態氮汽化之前搥碎菌體，磨成菌粉。
- (c) 將菌粉裝入 50 mL 離心管，放入真空烘箱烘乾。

磨菌粉(酒精研磨法)

- (a) 將 PDB 菌液以濾網瀝乾，瀝出的菌置於研鉢中。
- (b) 取適量 75 % 酒精加入研鉢，磨碎菌體。
- (c) 將研鉢中的酒精及菌裝入 50 mL 離心管，並且離心。
- (d) 離心後將酒精取出。
- (e) 將菌粉裝入 50 mL 離心管，放入真空烘箱烘乾。

b. 管柱萃取純化法(Column Purification)：抽取 DNA，使用 Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit。

- (a) 將所有菌株的菌粉各取 0.025 g 到 1.5 mL 管中，加入 200 μ L Lysis Buffer。
- (b) 加入 20 μ L Proteinase K solution 後，震盪 15 秒。
- (c) 以防爆夾夾住 1.5 mL 管的蓋子，在 56 °C 中乾浴 2 小時，每 30 分鐘稍微搖晃混和
- (d) 將 1.5 mL 管微離心，加入 200 μ L Binding Buffer，震盪 15 秒後置於 70 °C 中乾浴 15 分鐘。
- (e) 加入 200 μ L Ethanol (96~100%)，震盪 15 秒，再微離心。
- (f) 抽取步驟 e 的液體，裝入 Spin column 中，以 13,000 g 離心 1 分鐘。
- (g) 丟棄 F. Spin column 的下管，裝入新的 2 mL 管。在 Spin column 中加入 600 μ L Wash Buffer，以 13,000 g 離心 1 分鐘。
- (h) 丟棄 G. Spin column 的下管，裝入新的 2 mL 管。在 Spin column 中加入 600 μ L Wash Buffer，以 13,000 g 離心 1 分鐘。

- (i) 丟棄 H. Spin column 的下管，裝入新的 2 mL 管，以 13,000 g 離心 3 分鐘。
- (j) 丟棄 I. Spin column 的下管，裝入新的 1.5 mL 管。加入 100 μ L Elution Buffer，靜置 1 分鐘，再以 13,000 g 離心 1 分鐘，此步驟重複兩次，中間不用丟棄下管。
- (k) 液體總體積為 200 μ L 留下清液，即為抽取出的 DNA，保存於 -20°C 冰箱。
- c. 測定 DNA 濃度：抽得 DNA 後，以 Qubit DNA 螢光定量法測定濃度，以確保 PCR 成功機率。
- (a) 將 Qubit reagent 1 μ L 與 199 μ L Qubit buffer 混合。
- (b) 取步驟(a)混合液 190 μ L，分別加入兩種標準液各 10 μ L。
- (c) 取步驟(a)混合液 190 μ L，分別加入 DNA 樣品 10 μ L。
- d. 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)：為了將我們的目標基因序列定序以進行物種的鑑別，首先進行 PCR 增幅。
- (a) 將 ddH₂O、Reaction buffer、Primers(表 3)、dNTP、模板 DNA、DNA 聚合酶依不同條件加入 200 μ L 管，配製成 25 μ L 混合液。
- (b) 將 25 μ L 混合液放入 PCR 反應器 Perkin Elmer geneAMP PCR system 2400 或 Applied Biosystems thermal cycler 2720，使用不同條件的溫度循環，經過 35 個循環後降溫。
- (c) PCR 產物儲存於 -20 °C 冰箱。

表 3 PCR 中使用的引子

Primer	Sequence(5'-3')	References	Target genes
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White, et al., 1990	Eukaryotes
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'		
β tub3	5'-TGGGCYAAGGGTYAYTAYAC-3'	Huang, et al., 2009	fungi
β tub4r	5'-GCCTCAGTRAAYTCCATYTCRTCCAT-3'		

(R=A/G, Y=C/T)

- e. 凝膠電泳(Gel electrophoresis)確認 PCR 產物品質：將 PCR 產物送廠定序之前，必須確認 PCR 是否成功。凝膠電泳可以確認 PCR 產物的品質和專一性。
- (a) 電泳膠配置：以 Agarose low EEO 10 g、0.5X TAE buffer 1 L 的比例加入血清瓶，加熱到混合液呈澄清。稍微降溫後倒入膠盤中。
- (b) 緩衝液配置：50X TAE buffer 10 mL 加入 dH₂O 990 mL，混合均勻。
- (c) 將 5 μ L PCR 產物與 1 μ L Loading Dye 混合，載入電泳膠。以 100 伏特電泳約 30 分鐘。
- (d) 將電泳膠置於 EtBr，以 30 rpm 轉速，搖晃 20 分鐘。再以 DigiGel 數位式核酸電泳分析系統 UV 光照射膠體、拍照紀錄。

f.將剩下的 PCR 產物送廠定序，取得序列後使用 Geneious R8 軟體，於 NCBI 資料庫比對序列，找出最符合的真菌物種。

2.假說二：真菌孢子經由花粉進入蜂巢。

實驗設計：以顯微鏡觀察，比對圖鑑並歸納結果。

(1)蜂巢巢片：取蜂巢樣品的巢片於顯微鏡觀察並攝影。

(2)花粉

a.取得花粉樣品(未滅菌)，挑出不同顏色的花粉。

b.將壓碎的花粉放在玻片後加上 Polyvinyl alcohol-lactic acid-glycerol (PVLG)，蓋上蓋玻片，以 50 °C 乾浴。

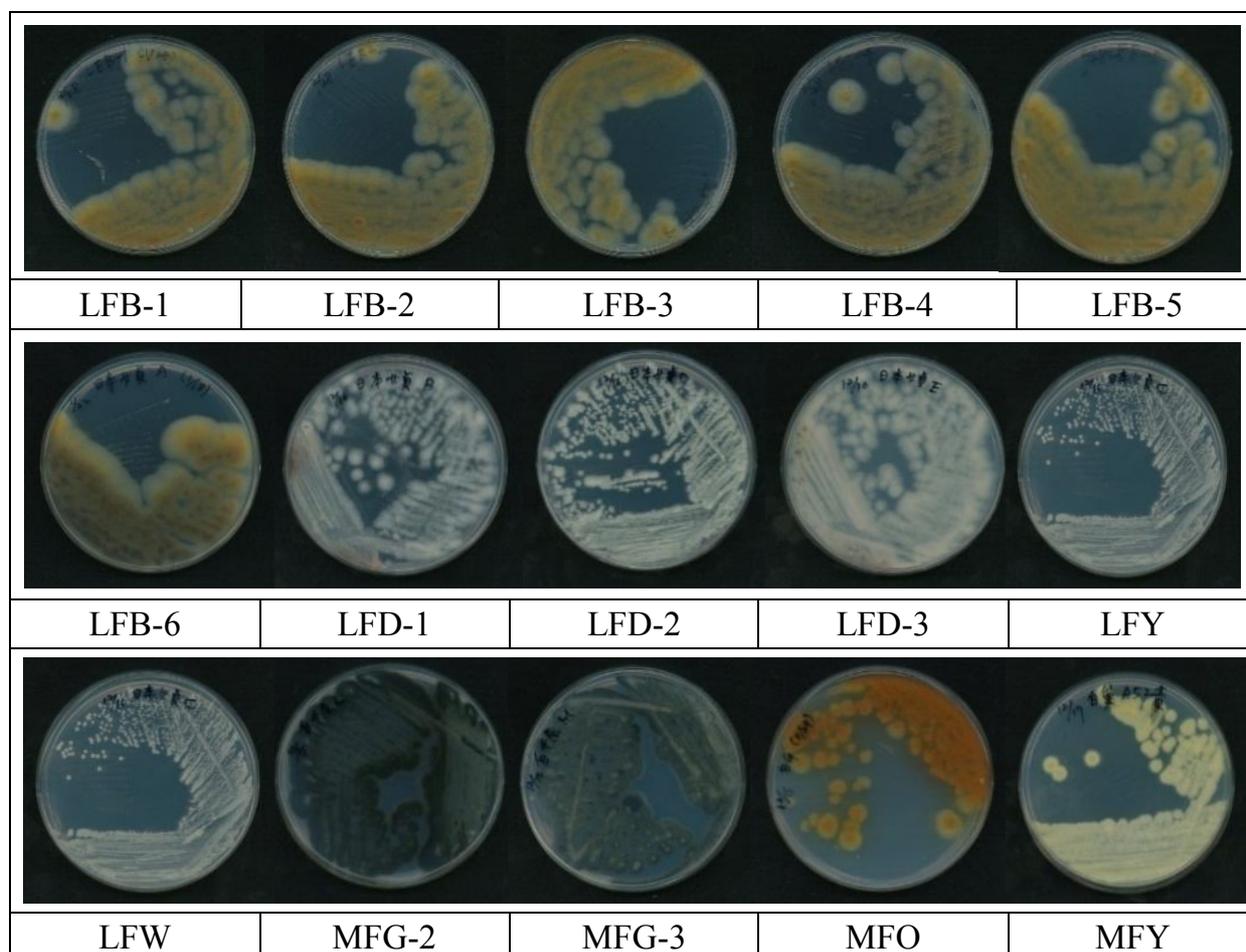
c.用木夾夾在蓋玻片上，放置在 50°C 烘箱中兩天。

d.使用顯微鏡觀察，並且與蜂巢樣品中的孢子進行比對。

五、研究結果

(一)分子鑑定結果(圖 5)

- 咸豐草蜜源：從咸豐草蜂巢中純化 8 株菌株， β -tubulin 基因序列比對及 ITS 基因序列比對結果顯示 BFB-1、BFB-2 為紅麴菌 *Monascus ruber/pilosus*。有兩株菌株經由顯微鏡觀察後排除其為絲狀真菌，其中 BYW 為酵母菌，BBA 為細菌。其他四株則由顯微鏡觀察後排除其為紅麴菌 (BFW、BFD-1、BFD-2、BFD-3)。
- 日本女貞蜜源：從日本女貞蜂巢中純化 11 株菌株，其中 β -tubulin 基因序列比對及 ITS 基因序列比對結果顯示 LFB-1、LFB-2、LFB-3、LFB-4、LFB-5 為紅麴菌 *Monascus ruber/pilosus*，其他則由顯微鏡觀察後排除其為紅麴菌(LFY、LFD-1、LFD-2、LFD-3、LFW)，LFB-6 由顯微鏡觀察後認為其疑似為紅麴菌，尚待定序。
- 白千層蜜源：從白千層蜂巢中純化 11 株菌株，其中由 β -tubulin 基因序列比對結果顯示 MFB-1、MFB-4、MFO 為紅麴菌 *Monascus ruber/pilosus*。ITS 基因序列比對結果顯示 MFB-1、MFB-3、MFY 為紅麴菌 *Monascus ruber/pilosus*。另有一株 MYR 經由顯微鏡觀察後排除為絲狀真菌(為酵母菌)。其他菌株則由顯微鏡觀察後排除其為紅麴菌(MYW、MYP、MFG-2、MFG-3、MFB-2)。



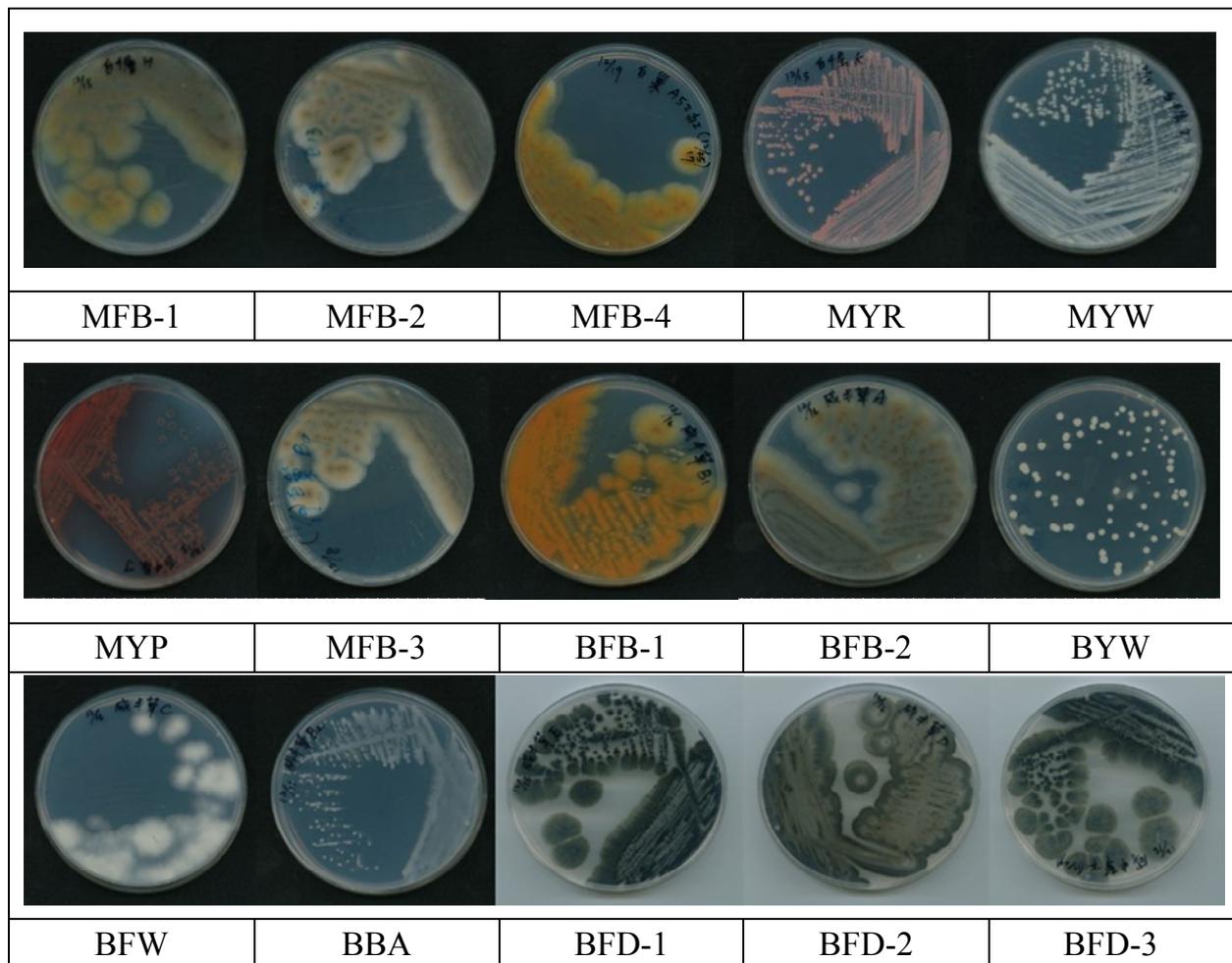


圖 5 真菌分離株於平板培養基上的形態

(二)DNA 定序結果

目前共分離獲得 12 株紅麴菌株，分子鑑定結果如表 4。

表 4 β -tubulin 和 ITS 引子對鑑定出的物種

編號	β -tubulin	ITS
LFB-1	<i>Monascus ruber/pilosus</i>	<i>Monascus ruber/pilosus</i>
LFB-2	<i>Monascus ruber/pilosus</i>	<i>Monascus ruber/pilosus</i>
LFB-3	<i>Monascus ruber/pilosus</i>	<i>Monascus ruber/pilosus</i>
LFB-4	<i>Monascus ruber/pilosus</i>	<i>Monascus ruber/pilosus</i>
LFB-5	<i>Monascus ruber/pilosus</i>	<i>Monascus ruber/pilosus</i>
MFB-1	<i>Monascus ruber/pilosus</i>	<i>Monascus ruber/pilosus</i>
MFB-3	-	<i>Monascus ruber/pilosus</i>
MFB-4	<i>Monascus ruber/pilosus</i>	-
MFO	<i>Monascus ruber/pilosus</i>	-
MFY	-	<i>Monascus ruber/pilosus</i>
BFB-1	<i>Monascus ruber/pilosus</i>	<i>Monascus ruber/pilosus</i>
BFB-2	<i>Monascus ruber/pilosus</i>	<i>Monascus ruber/pilosus</i>

(-：尚未完成)

(β -tubulin: LFB-1、LFB-2、LFB-3、LFB-4、LFB-5、MFB-1、MFO、BFB-1、BFB-2，ITS: MFB-1 為唐婉瑋提供)

(三)親緣關係樹的建立與分析(圖 6、7)

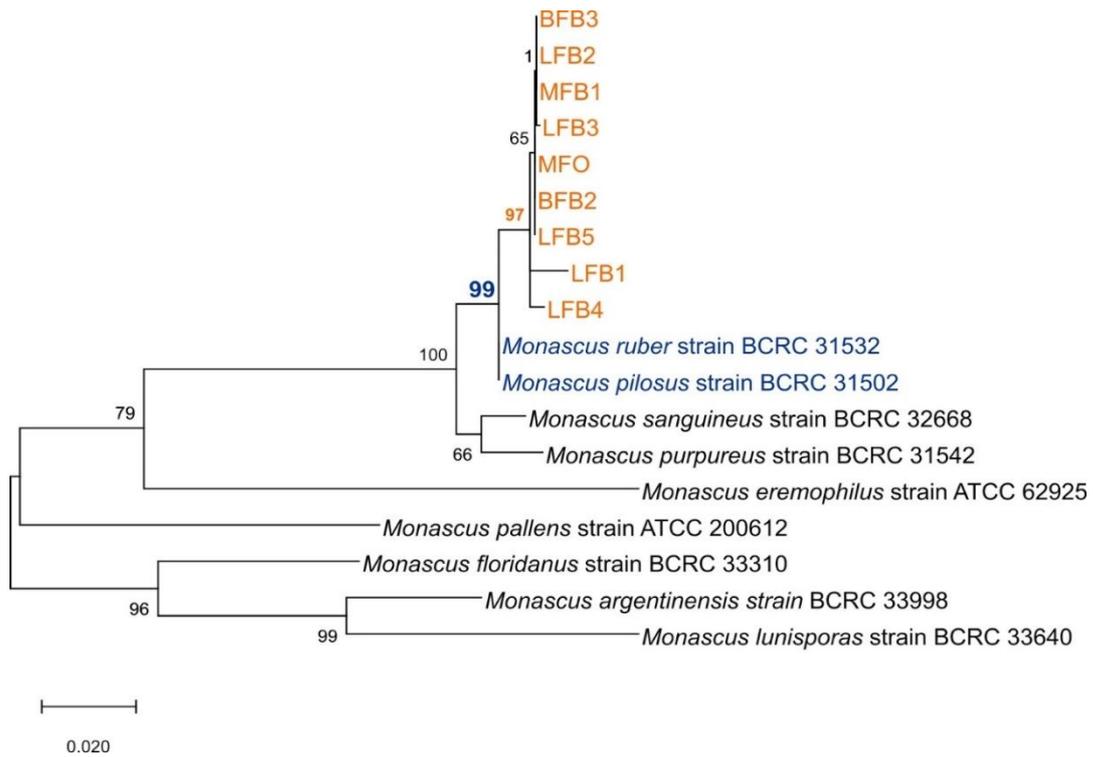


圖 6 以 β -tubulin 基因序列所建立的親緣關係樹(林志輝提供)

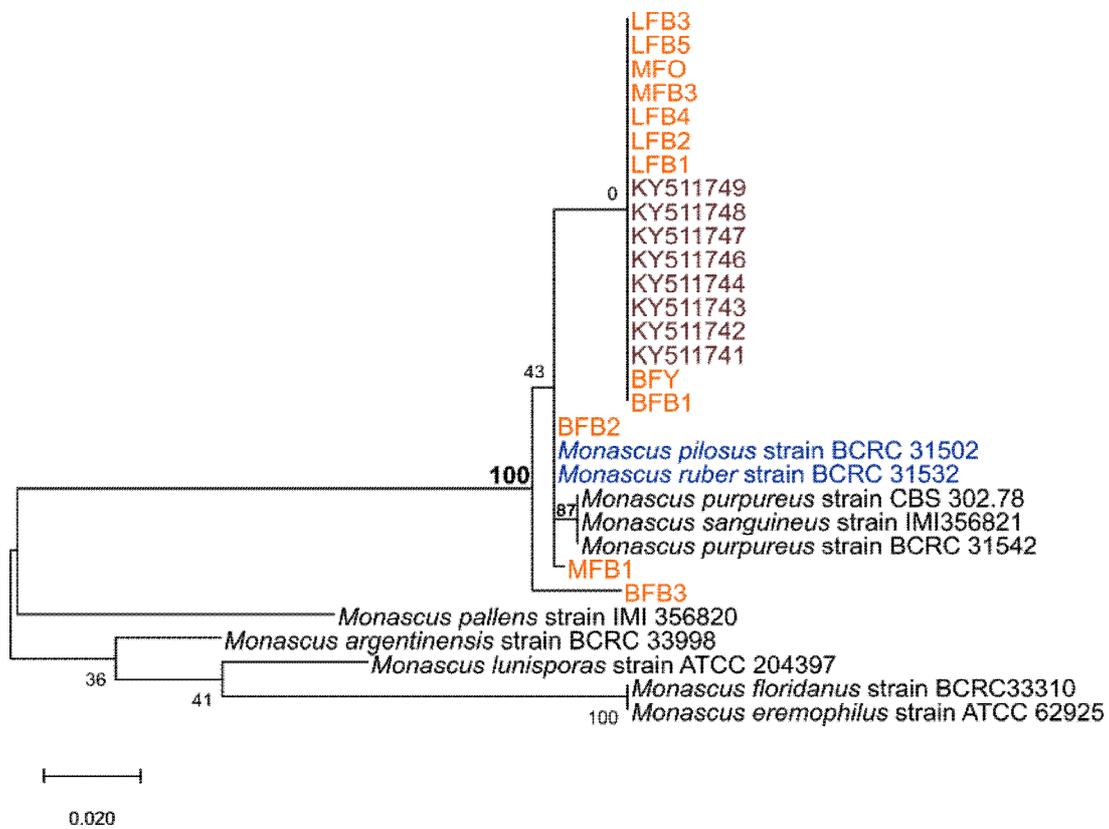


圖 7 以 ITS 基因序列所建立的親緣關係樹(林志輝提供)

(四)顯微鏡觀察結果

1.蜂巢內分離出的紅麴菌株形態(圖 8)

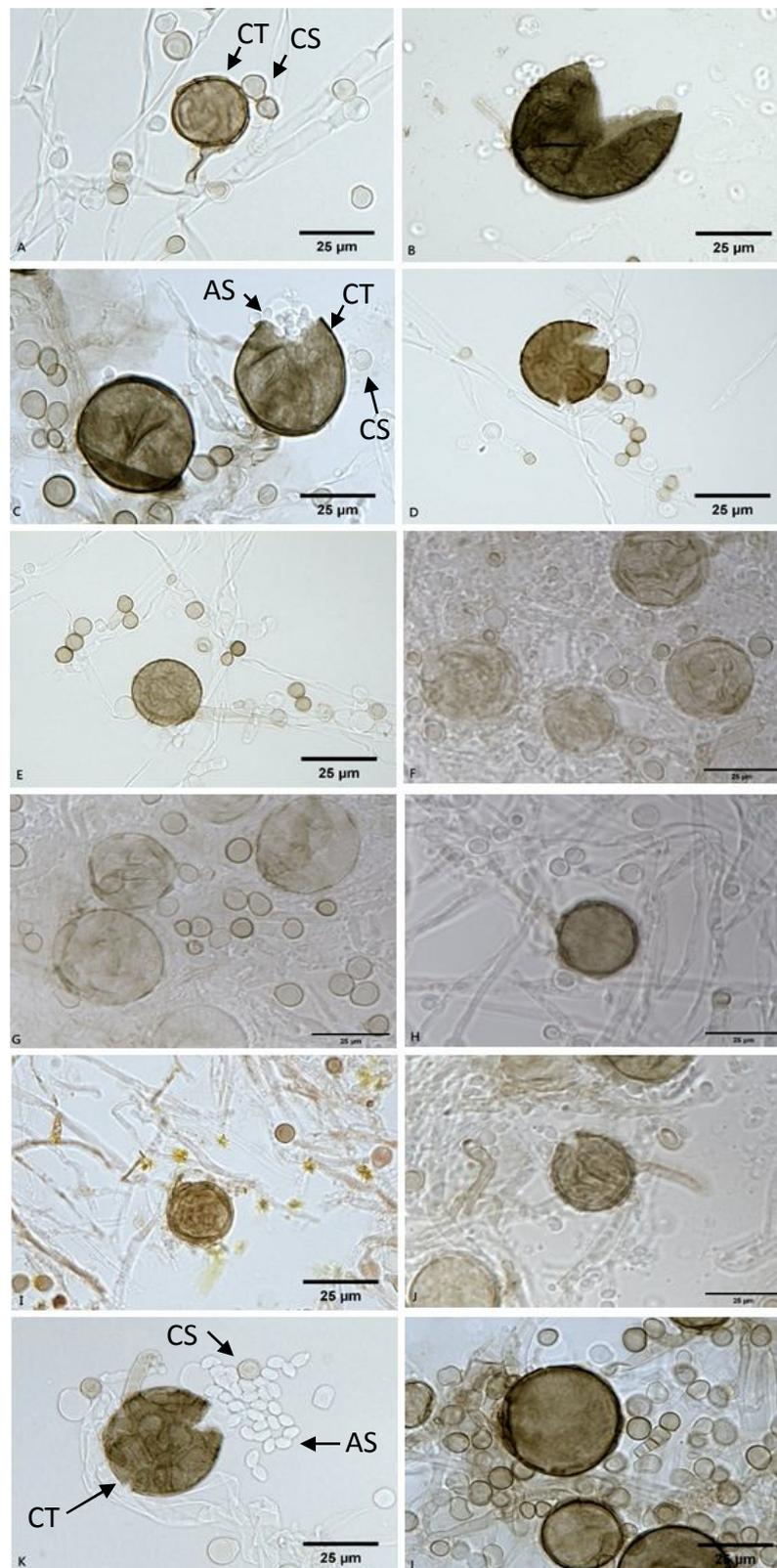


圖 8 蜂巢中分離之紅麴菌子囊果、子囊孢子及分生孢子型態(A:LFB-1, B:LFB-2, C:LFB-3, D:LFB-4, E:LFB-5, F:MFB-1, G:MFB-2, H:MFB-3, I: MFO, J:MFY, K:BFB-1, L:BFB-2, CT:Cleistothecium, CS:Conidial spore, AS:Ascospore.)(圖片提供:林志輝)

2. 蜂巢巢片

三個蜂巢樣品巢片中共出現六種真菌構造，其中褐色水滴狀的 *Alternaria* 孢子和黑色圓形的 *Nigrospora* 孢子在三個樣品中皆有出現；咸豐草和日本女貞皆有的為褐色桑葚狀，近似於 *Torula* 與褐色簇狀，近似於 *Penicillium* 的孢子，日本女貞和白千層皆有的為橘黃色橢圓形，近似於 *Agrocybe* 的孢子，而褐色圓形紅麴菌的子囊果(*Cleistothecium*)僅在白千層樣品中出現。另外，巢片中還有許多球形、三角形或帶有尖刺的球形的花粉，在三個樣品中皆有出現(圖 9)。

表 5 蜂巢巢片中的真菌孢子出現情形

可能的物種		日本女貞	白千層	咸豐草
<i>Alternaria</i>	鏈隔孢菌屬	O	O	O
<i>Nigrospora</i>	球黑孢黴屬	O	O	O
<i>Torula</i>	假絲酵母屬	O	-	O
<i>Penicillium</i>	青黴屬	O	-	O
<i>Monascus</i>	紅麴屬	-	O	-

O：有出現 -：無出現

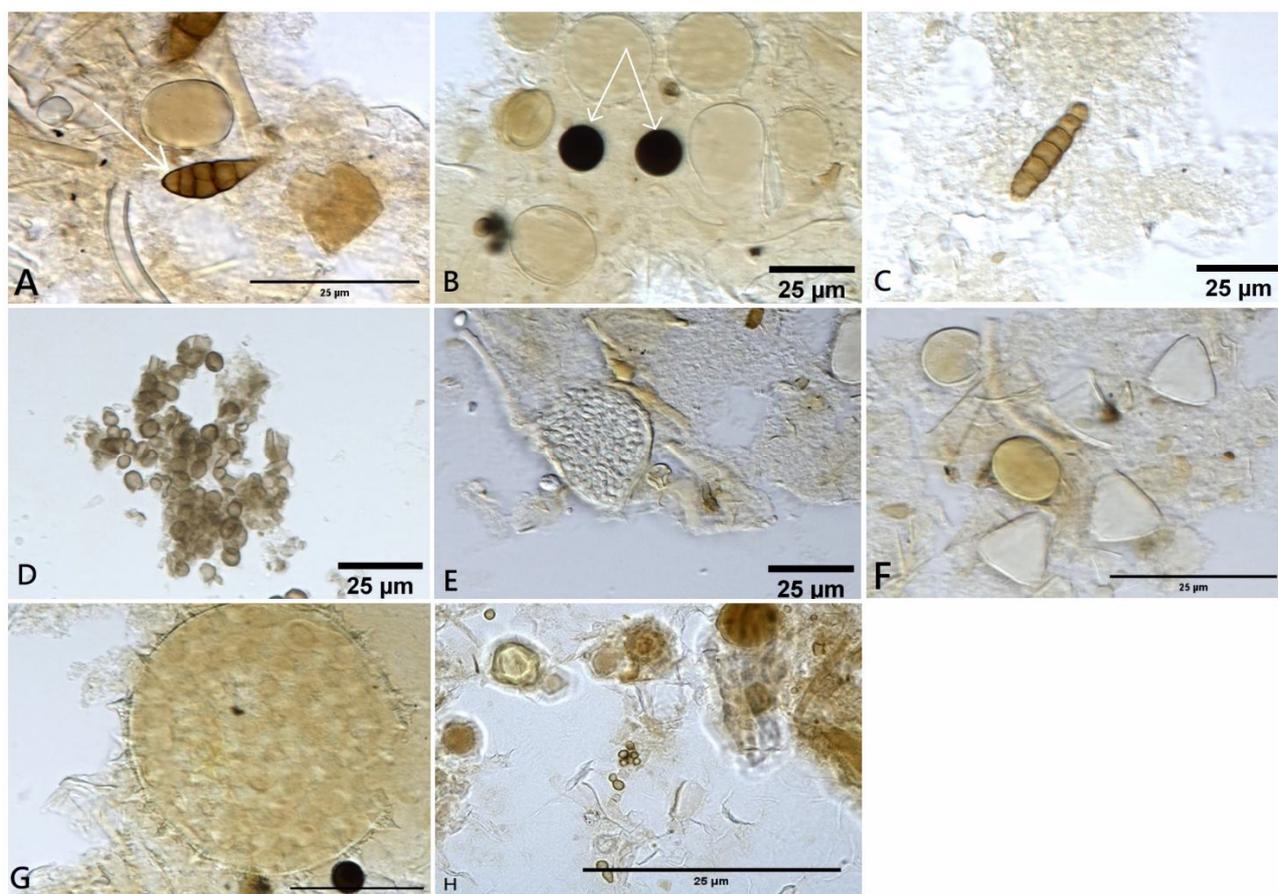


圖 9 蜂巢巢片中的真菌及花粉構造(A:*Alternaria*, B:*Nigrospora*, C:*Torula*, D:*Penicillium*, E:*Cleistothecium*, F:圓形和三角形花粉, G:圓形具刺棘花粉, H:*Monascus*) (圖片提供:林志輝)

3.花粉的顯微鏡照片(圖 10)

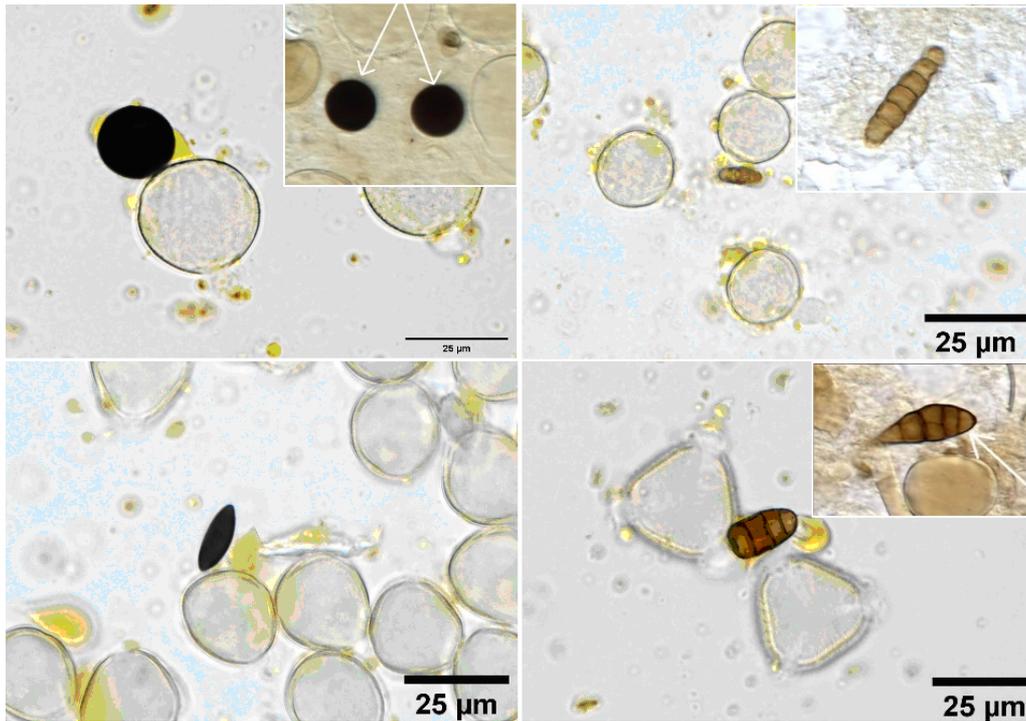


圖 10 花粉中的真菌孢子以及與巢片中孢子的對應比較(圖片提供:林志輝)

六、討論

(一)研究結果概要

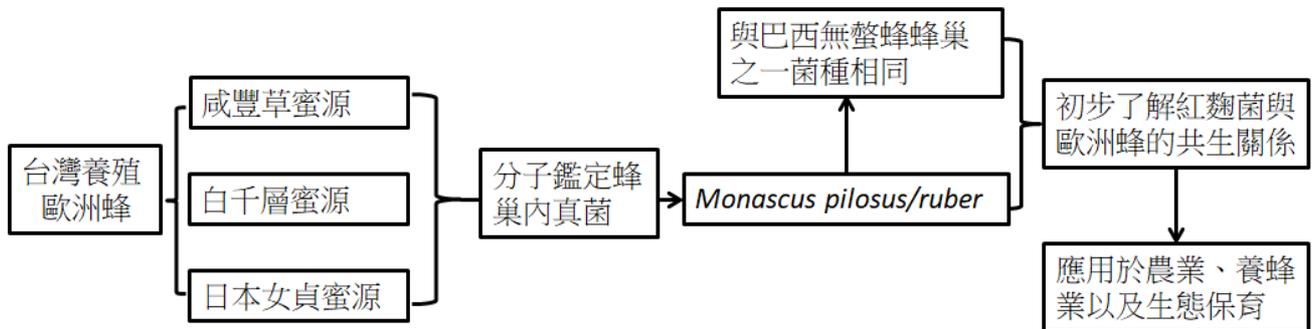


圖 11 研究結果概要

(二)分離菌株定序比對與親緣關係樹的建立

本研究所分離的紅麴菌株，其 β -tubulin 與 ITS 基因序列經由 PCR 增幅定序後，排除非紅麴菌屬的菌株，接著使用 MEGA X 軟體以最大似然法(Maximum likelihood)進行 500 次 bootstrap，並繪製保守性親緣關係樹。並過去文獻指出 β -tubulin 基因序列較 ITS 序列對於紅麴屬的物種分類具有較佳的解析度(Park, et al., 2004)，因此本研究採取以 β -tubulin 基因序列的親緣關係樹作為主要的菌種鑑定手段(圖 6)。但由於研究無螫蜂與紅麴菌共生關係的文獻中僅使用較傳統的 ITS 序列進行分析，為了能橫向比較討論，本研究同時也進行 ITS 序列親緣關係樹的建立與分析(圖 7)。由定序比對結果可以知道，歐洲蜂巢中確實有紅麴菌存在，且皆屬於 *M. pilosus/ruber* 物種。這些紅麴菌株在 β -tubulin 親緣關係樹中不但明顯屬於 *M. pilosus/ruber* 物種(99% bootstrap 保守性)，且自成一分支(97% bootstrap 保守性，圖 6)，顯示蜜蜂蜂巢中的紅麴菌株與現今經人類馴化用於紅麴米培養的菌株間存在一定程度的差異。

本研究所分析的樣品分別來自於不同蜜源，但分離出的菌株間具有高度相似性，顯示紅麴菌存在於蜂巢內並非局部的單一現象。此外，ITS 序列親緣關係樹分析結果顯示，本研究所分離出的紅麴菌株(圖 7，橘色)，與無螫蜂研究中所分離出的菌株(圖 7，深紅色)高度相似，由於該研究的樣點位於巴西，距離臺灣遙遠，且無螫蜂與歐洲蜂為不同物種，兩者相同之處為社會性的築巢蜂類，顯示確實有特定的紅麴菌族群與社會性築巢蜂類相關。除了紅麴菌與青黴菌，我們從蜂巢樣品中也分離並定序出數種真菌，多為植物病原菌或植物共生菌(表 6)，這樣的結果顯示，確實有相當數量的真菌孢子是來自於蜜蜂採蜜的過程。

表 6 蜂巢樣品中鑑定之其他真菌菌種

物種	Primer
<i>Aureobasidium pullulans</i>	ITS
<i>Candida fermenticarens</i>	ITS
<i>Pseudotaeniolina giobosa</i>	ITS / β -tubulin
<i>Talaromyces philosporus</i>	ITS
<i>Quambalaria cyanescens</i>	ITS

(三)與巴西無螫蜂的研究比較

由於文獻(Barbosa, et al., 2017)沒有進行 β -tubulin 基因序列定序，我們僅就解析度較低的 ITS 基因序列，與其作比較(圖 7 中編號 KY 之序列)，結果發現本研究的大多數分離株，ITS 序列與無螫蜂研究中的部分菌株 ITS 序列 100%相同。但是在巴西無螫蜂的研究中存在較多的紅麴菌物種(表 7)，而我們在歐洲蜜蜂蜂巢中所分離出的菌株皆屬於同一個物種(*M. pilosus/ruber*)，顯示紅麴菌在不同的地理環境或是與不同的蜂類物種間的共生關係雖然普遍存在，但交互作用與配對組合可能有所不同，而 *M. pilosus/ruber* 很可能為這種共生現象的主要紅麴物種。本研究所分離的紅麴菌株在演化樹上自成一類，並且與巴西無螫蜂蜂巢中的菌株有部分高度相似，考量臺灣與巴西地理位置遙遠且分處於南北半球，蜂巢內紅麴菌族群間的高度近似顯示特定紅麴菌族群與蜂類的共生現象可能已存在了相當的時間。

表 7 巴西無螫蜂蜂巢內的紅麴菌 (Barbosa, et al., 2017)

菌種
<i>M. flavipigmentosus</i>
<i>M. mellicola</i>
<i>M. recifensis</i>
<i>M. argentinensis</i>
<i>M. floridanus</i>
<i>M. lunisporas</i>
<i>M. pallens</i>
<i>M. purpureus</i>
<i>M. ruber*</i>

*：為本研究中出現的 *M. ruber/pilosus* 菌種

(四)顯微鏡觀察結果

我們於白千層蜂巢巢片上發現少許紅麴子囊果，經由子囊果及子囊孢子形態可初步判定其為紅麴菌構造。此發現為直接證明巢片內確實有紅麴菌，但大多數的巢片樣品都無法直接觀察到紅麴菌，可能是由於紅麴菌在蜂巢內生長並不特別旺盛，或是已被蜜蜂幼蟲取食。

由於無螫蜂會拆舊的巢片去蓋新的蜂巢，因此過去文獻推測巢片材料的再利用，是紅麴菌在無螫蜂群中傳播的途徑。但本研究所觀察的歐洲蜜蜂並不會回收舊巢片材料，因此排除了此種假設。歐洲蜜蜂在建造蜂巢時，是由工蜂分泌蜂蠟，形成白色薄片後用足將其移至顎部，用口咀嚼後吐出，再加以塑形築成蜂巢。由於花粉是蜜蜂的主食之一，因此在巢片中也有觀察到大量的花粉顆粒。已知花粉中帶有許多真菌孢子，加上蜂巢內分離出許多植物病原或是共生真菌，因此我們認為這些真菌孢子，包含紅麴菌，是隨花粉一起帶入蜂巢。實際觀察花粉也可以觀察到少許真菌孢子，且有些種類與巢片中的相符。雖然並沒有直接觀察到紅麴菌的孢子，但這樣的結果可以間接的支持紅麴菌孢子是經花粉進入蜂巢的假設。而目前只有直接觀察到少數的紅麴菌孢子，可能是由於樣本數偏低，以及紅麴菌的子囊果和分生孢子較沒有顯著可辨識的形狀或顏色，所以不容易直接辨識。

(五)社會性昆蟲與真菌的共生關係

在其他的社會性昆蟲中，蜚蠊目大白蟻亞科(subfamily *Macrotermitinae*)與擔子菌門(*Basidiomycota*)的雞肉絲菇(*Macrolepiota albuminosa*)有互利共生的關係，雞肉絲菇協助分解植物基質，白蟻可透過食用真菌花園表面的小菌球(fungal nodules)獲得穩定氮源及養分。而白蟻則提供適合雞肉絲菇適合生長的環境，否則其將無法與其他真菌競爭。所以只有在白蟻的蟻巢上，雞肉絲菇才能長出子實體(朱宇敏, 2008)。此外，在南美洲的熱帶雨林中，膜翅目 (*Hymenoptera*)的切葉蟻(genus *Atta*)具有收集新鮮樹葉，並在真菌花園培育擔子菌 *Leucoagaricus gongylophorus* 作為食物的行為(Hölldobler & Wilson, 2010)。

蜜蜂是社會性昆蟲，而本研究顯示牠們與紅麴菌可能具有共生關係，且此關係已經過長期演化並非偶然出現。他種社會性昆蟲與真菌共生的例子告訴我們這樣的關係並非罕見，且真菌有可能對於昆蟲的健康有益。過去的研究已證實攝食紅麴菌絲對於無螫蜂幼蟲的存活率有顯著的影響，因此紅麴菌對歐洲蜂的健康的影响是我們接下來最感興趣的問題。

(六)研究應用及未來展望

以往我們認為真菌對於動物多半有病原性，但在文獻中看到的例子似乎是紅麴菌與無螫蜂有緊密的互利共生關係：無螫蜂提供紅麴菌所喜好的高糖環境，而紅麴菌作為幼蜂的食物且提升其生存率。因此紅麴菌在歐洲蜂蜂巢內所扮演的角色是我們未來的研究方向，我們想知道紅麴菌是否如同文獻中作為幼蟲的食物，以及它們對於蜜蜂族群健康的影響。由於現行人工飼養時，會在蜂箱內置入人工半巢片以加速蜂巢的形成，這些人工半巢片為回收蜂巢加上部分石蠟融熔混合後壓製而成，這樣的人工半巢片對於歐洲蜂巢內的菌相、紅麴菌以及蜂群健康有無影響將是很有趣的研究課題。如果紅麴菌對於蜂群的健康有正向的影響，對蜂群/巢外添加紅麴菌或許會對蜂農產生正向效益。以上的研究需要實際養蜂，且需要一個能人為控制的實驗環境，我們想觀察紅麴菌是否會被蜜蜂帶入蜂巢傳遞至蜜源植物，或是分巢時被帶入新蜂巢，但目前因為技術、資金的緣故，尚無法進行此實驗。

由我們的結果產生的另一個問題是：紅麴菌如何進入蜂巢？紅麴菌在蜜蜂與開花植物的生態中扮演何種角色？解決這個問題需要從花、蜂巢、蜜蜂三個面向下手，以便釐清紅麴菌進入蜂巢的機制，以及他們如何在蜂群間傳播；而紅麴菌是長期與蜜蜂一起演化，抑或是不斷由某途徑進入蜂巢，也是我們所好奇的。

生物的共生關係在生態系中是有特殊意義的，尤其是對兩者生存皆有利的互利共生，其由兩種物種緊密的生活在一起，一物種的生存狀態與其共生夥伴的生存有密切相關。我們期望此研究的發現能應用在維持蜜蜂的健康上，讓蜜蜂的數量能維持穩定，並在經濟層面，對人類的農業、養蜂業有所助益。

七、結論

- (一)咸豐草、日本女貞與白千層三個蜜源的蜂巢樣品皆鑑定出紅麴菌株，屬於 *Monascus pilosus/ruber* 物種，它們在親緣關係樹內自成一群，顯示蜜蜂與特定紅麴菌族群具密切關係。
- (二)巴西無螫蜂與歐洲蜂屬於不同物種，且具不同棲地及蜜源，但兩者蜂巢中皆有紅麴菌，顯示紅麴菌與蜂類間可能具有普遍的生態關聯。
- (三)歐洲蜂蜂巢中的紅麴菌皆屬於單一物種，顯示此共生關係可能具有物種專一性。
- (四)歐洲蜂蜂巢內有紅麴菌存在，其主要分布在蜂巢巢片上，而非蜂蜜中。
- (五)從花粉中含有與巢片中相同的真菌孢子，可推測紅麴菌孢子是藉由花粉進入蜂巢。
- (六)本研究可增進養蜂的相關知識，進而應用在確保農業上農作物的授粉順利。此外，本研究結果也可以協助生態保育，將紅麴與蜂類的共生關係應用於維持蜜蜂族群的健康，對於物種多樣性的維持以及人類經濟的發展皆有所助益。

八、參考資料

(一)中文部分

1. Diana Cox-Foster, Dennis van Engelsdorp, 林慧珍譯 (2009)。蜜蜂消失了？。 *科學人雜誌*, 87(5)。
2. 朱宇敏 (2008)。白蟻、雞肉絲菇和炭角菌間的恩怨情仇。 *中央研究院週報*, 1167。檢自 <https://newsletter.sinica.edu.tw> (Aug. 11, 2019)。
3. 陳怡孜、戴俊典、林育昞、鄭奕帝、謝右文 (2009)。由現代藥理與傳統功效看中藥紅麴臨床生藥學。 *The Journal of Taiwan Pharmacy*, 25(4), 132-136。
4. 趙大衛等 (民 101)。 *基礎生物(下)*。台南市：翰林。

(二)英文部分

1. Alexandra-Maria Klein, Bernard E. Vaissière, James H. Cane, Ingolf Steffan-Dewenter, Saul A. Cunningham, Claire Kremen, & Teja Tscharntke. (2006). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B*, 274, 303–313.
2. Benjamin F. Kaluza, Helen M. Wallace, Tim A. Heard, Vanessa Minden, Alexandra Klein and Sara D. Leonhardt. (2018). Social bees are fitter in more biodiverse environments. *Nature: Scientific reports*.
3. Cristiano Menezes, Ayrton Vollet-Neto, Anita Jocelyne Marsaioli, Davila Zampieri, Isabela Cardoso Fontoura, Augusto Ducati Luchessi, & Vera Lucia Imperatriz-Fonseca. (2015). A Brazilian Social Bee Must Cultivate Fungus to Survive. *Cell*, 25 (21), 2851-2855.
4. Hölldobler B, Wilson EO. (2010). *The Leafcutter Ants: Civilization by Instinct*. New York: W. W. Norton & Company.
5. Houn G. Park, Elena K. Stamenova, and Shung-Chang Jong. (2004). Phylogenetic relationships of *Monascus* species inferred from the ITS and the partial β -tubulin gene. *Botanical Bulletin- Academia Sinica*, 45, 325-330.
6. Neil A. Campbell, Jane B. Reece. (2016). *Biology, 8th Edition*. Pearson Education, Inc.
7. R.N. Barbosa, S.L. Leong, & O. Vinnere-Pettersson, A.J. Chen, & C.M. Souza-Motta, J.C. Frisvad, R.A. Samson, N.T. Oliveira, & J. Houbraken. (2017). Phylogenetic analysis of *Monascus* and new species from honey, pollen and nests of stingless bees. *Studies in Mycology*, 86, 29–51.
8. Simon G. Potts, Vera Imperatriz-Fonseca, Hien T. Ngo, Marcelo A. Aizen, Jacobus C. Biesmeijer, Thomas D. Breeze, Lynn V. Dicks, Lucas A. Garibaldi, Rosemary Hill, Josef Settele, & Adam J. Vanbergen. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540, 220–229.
9. Sydney A. Cameron, Jeffrey D. Lozier, & James P. Strange, Jonathan B. Koch, & Nils Cordes, Leellen F. Solter, & Terry L. Griswold. (2011). Patterns of

widespread decline in North American bumble bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 662–667.