

蜜蜂与熊蜂肠道真菌群落组成与代谢潜力解析

徐子萌, 郎浩宇, 伍秋祥, 王小斐*, 郑浩*

中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100193

徐子萌, 郎浩宇, 伍秋祥, 王小斐, 郑浩. 蜜蜂与熊蜂肠道真菌群落组成与代谢潜力解析[J]. 生物工程学报, 2026, 42(1): 467-487.
XU Zimeng, LANG Haoyu, WU Qiuyang, WANG Xiaofei, ZHENG Hao. Gut fungal community composition and metabolic potential in honeybees and bumblebees[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2026, 42(1): 467-487.

摘要: 蜜蜂与熊蜂作为重要的农业传粉昆虫, 其肠道微生物在宿主营养代谢、免疫调节与环境适应中发挥关键作用。尽管肠道细菌群落已被广泛研究, 肠道真菌的组成特征与生态功能尚缺乏系统性认知。为了系统揭示传粉昆虫肠道真菌的群落结构与潜在功能, 本研究基于文献公开数据的内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)扩增子测序结果, 系统解析了中华蜜蜂(*Apis cerana*)、意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)、美洲熊蜂(*Bombus impatiens*)和黑尾熊蜂(*Bombus vosnesenskii*)肠道真菌群落的结构特征; 同时结合从采集自北京市百花山国家级自然保护区的蜜蜂(*Apis* spp.)和熊蜂(*Bombus* spp.)肠道样本中分离获得的 25 株可培养真菌, 开展了全基因组分析。结果表明, 子囊菌门(Ascomycota)为优势类群, 不同宿主之间真菌多样性与群落组成存在显著差异。系统发育分析表明, 分离菌株在种属水平上具有较高的一致性, 并表现出多样的基因组结构。功能注释显示, 肠道真菌广泛参与碳水化合物代谢、细胞结构维持与信号调控, 梅奇酵母属(*Metschnikowia*)菌株在糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GH)与糖基转移酶(glycosyl transferases, GT)等 CAZymes 家族中表现出高度富集。此外, 部分菌株具备非核糖体肽(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)与 β -内酰胺类代谢产物的合成能力, 可能在菌群竞争和宿主互作中发挥生态调节功能。本研究揭示了蜂类肠道真菌群落的多样性与功能潜力, 丰富了对昆虫微生物组结构与生态作用的理解, 为传粉昆虫健康维持与微生态干预提供了理论基础。

关键词: 蜜蜂; 熊蜂; 肠道真菌; 内部转录间隔区(ITS)扩增子测序; 全基因组测序

资助项目: 国家重点研发计划(2024YFA0917000)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2024YFA0917000).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Xiaofei, xiaofei.wang@cau.edu.cn; ZHENG Hao, hao.zheng@cau.edu.cn

Received: 2025-06-13; Accepted: 2025-08-14; Published online: 2025-09-05

Gut fungal community composition and metabolic potential in honeybees and bumblebees

XU Zimeng, LANG Haoyu, WU Qiuyang, WANG Xiaofei*, ZHENG Hao*

College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: Honeybees and bumblebees are key agricultural pollinators, whose gut microbiota play critical roles in host nutrient metabolism, immune regulation, and environmental adaptation. While gut bacterial communities have been extensively studied, the composition and ecological functions of gut fungi remain poorly understood. This study aims to fill this knowledge gap by systematically characterizing the diversity, phylogeny, and functional potential of pollinator gut fungi. In this study, we analyzed the gut fungal community structures of four pollinator species—*Apis cerana*, *Apis mellifera*, *Bombus impatiens*, and *Bombus vosnesenskii*—based on publicly available internal transcribed spacer (ITS) amplicon sequencing data. Additionally, we conducted whole-genome analyses of 25 cultivable fungal strains isolated from the gut of *Apis* spp. and *Bombus* spp. individuals collected from the Beijing Baihuashan National Nature Reserve. The results showed that *Ascomycota* was the dominant fungal phylum across all hosts, with significant differences in fungal diversity and community composition among host species. Phylogenetic analysis indicated high taxonomic consistency of isolated strains at the genus and species levels, along with diverse genome architectures. Functional annotations revealed that gut fungi were broadly involved in carbohydrate metabolism, cellular structure maintenance, and signal transduction. Notably, *Metschnikowia* strains exhibited significant enrichment in CAZyme families, particularly glycoside hydrolases (GH) and glycosyltransferases (GT). In addition, some strains possess biosynthetic gene clusters for secondary metabolites, such as nonribosomal peptide synthetase (NRPS) and β -lactones, which suggested potential roles in microbial competition and fungus-host interactions. This study uncovers the diversity and functions of fungal communities in bee guts, enriching our understanding of insect microbiomes and providing a theoretical foundation for pollinator health maintenance and microbiota-targeted interventions.

Keywords: honeybees; bumblebees; gut fungi; internal transcribed spacer (ITS) amplicon sequencing; whole-genome sequencing

蜜蜂和熊蜂作为关键的农业授粉昆虫，在保障粮食生产安全和维护生态系统稳定等方面发挥着重要的作用。研究表明，在全球 107 种主要农作物中，超过 90% 的作物授粉过程离不开蜂类的参与^[1]，而在人类摄入的食物中，超过 1/3 需要依靠其完成授粉过程^[2]。蜂类的授粉活动可以有效提高作物的产量和质量，例如在撒

哈拉以南的非洲地区，蜂类授粉助力棉花产量从 37% 提升至 62%^[3-4]，给农业生产带来了显著的经济效益。

然而近年来，全球蜜蜂和熊蜂数量急剧下降，部分物种甚至濒临灭绝^[5]。越来越多的证据表明，农药广泛使用^[6-8]、气候变化加剧^[9-11]、栖息地不断丧失^[12-14]以及病原体感染^[15-17]等是驱

动蜂类种群衰退的主要原因。特别是自 2005 年起, 美国等多个国家的蜂巢内出现大量工蜂离奇消失的现象, 该现象被称为蜜蜂群崩溃症 (colony collapse disorder, CCD), 受到了专家学者的广泛关注^[18]。随着蜂群数量的持续减少, 保护蜜蜂和研究其健康状态成为了现代农业领域的重要课题。

蜜蜂和熊蜂抵御外界环境压力的能力与寄居于肠道中的微生物群落紧密相关。肠道微生物群, 即由细菌、真菌等多种微生物构成的复杂生态系统, 在宿主的营养代谢、免疫调节及疾病防御中扮演着核心角色^[19]。随着高通量测序技术的进步和发展, 研究者逐步揭示了蜜蜂和熊蜂肠道微生物的结构特征——组成相对简单、特异性强。目前已知有 9 种细菌为其主要成员, 约占肠道总菌量的 95% 以上^[20]。其中, 有 5 种细菌广泛且稳定地存在于不同个体中, 构成其核心菌群。包括 2 种革兰阴性菌 *Snodgrassella* 和吉利氏菌 (*Giliamella*), 2 种乳杆菌属 *Lactobacillus*、*Bombilactobacillus* 以及 1 种双歧杆菌属 *Bifidobacterium*^[21]。这些菌群参与了宿主免疫调节、营养消化和抗病防御等多方面的生命活动^[22], 例如蜜蜂肠道微生物群可以消化和代谢食物中的碳水化合物^[23], 产生短链脂肪酸并促进宿主体重增加^[24]。

当前, 昆虫微生物组研究多聚焦于细菌群落, 但已有研究指出, 真菌, 尤其是酵母类真菌, 在多种昆虫体内普遍存在, 不仅在营养互补、信号传导和免疫调节中发挥作用, 还可能通过与细菌共建微生态系统, 促进宿主适应力的提升^[25-26]。例如, 在某些白蚁和果蝇体内, 真菌与细菌共存构成稳定的微生物群落, 对宿主营养获取与环境适应发挥协同作用^[27-28]。这提示有必要将真菌纳入昆虫微生物组研究的核心视野, 尤其是在传粉昆虫这一关键生态类群中, 其功能潜力亟待系统发掘。

作为肠道微生物群的重要组成部分, 真菌在维持蜂类健康中可能同样扮演着重要角色。然而与细菌群落的研究相比, 关于蜂类肠道真

菌的研究仍相对滞后, 其多样性与功能机制尚未得到充分揭示^[29]。已有的研究表明, 子囊菌门 (Ascomycota) 和担子菌门 (Basidiomycota) 真菌是蜜蜂肠道真菌的重要组成部分^[30]。此外, 蜜蜂的肠道真菌群在宿主营养和免疫等方面也发挥着重要的作用, 可以增强宿主对于环境的适应性^[31-32]。例如, 蜜蜂肠道共生真菌接合酵母 (*Zygosaccharomyces* sp.) 可以作为类固醇的重要来源, 促进幼虫正常发育, 并通过与其他共生真菌的互作, 共同参与调控宿主的生长过程^[33]; 小星裂酵母属 (*Starmerella*) 则能发酵少量碳水化合物, 产生活性糖脂索福罗脂 (sophorolipids), 具有一定的乳化与抗菌能力, 可能帮助其在蜜蜂肠道或蜂粮中适应高糖环境, 并抑制病原微生物的生长^[34]。这些发现提示肠道真菌在维系蜂类健康方面可能具有重要而独特的功能, 但其多样性与具体作用机制仍有待深入探索。

目前, 真菌群落研究主要依赖于内部转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 高通量测序技术^[35]。ITS 区由于在真菌分类中具有良好的物种分辨率, 已被广泛应用于环境样本中真菌的鉴定和群落结构分析, 为理解真菌群落的多样性提供了基础。然而, ITS 分析主要关注群落组成, 尚难以揭示各类群的生态功能和潜在作用。为深入理解蜂类肠道真菌在营养代谢、宿主互作等方面的功能特征, 有必要结合代表性真菌分离株的全基因组测序数据, 从群落结构延伸至功能层面, 进一步拓展对其生态潜力的认知。

因此, 本研究综合运用 ITS 扩增子测序与代表性真菌的全基因组信息, 系统解析蜜蜂与熊蜂肠道真菌群落的分类组成、多样性差异、系统发育关系及代谢潜力, 以期全面评估其在蜂类健康中的生态功能, 突出真菌在宿主微生态中的重要作用, 并为蜜蜂与熊蜂的保护与管理提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验昆虫

本研究整体包括 2 部分分析: 一是基于文

献与数据库公开数据开展的 ITS 扩增子群落结构分析；二是基于实地采集的蜂类个体进行肠道真菌分离培养及代表性菌株的全基因组测序。

用于 ITS 扩增子分析的样本包括中华蜜蜂 (*Apis cerana*)、意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*)、美洲熊蜂 (*Bombus impatiens*) 和黑尾熊蜂 (*Bombus vosnesenskii*)，其详细信息见表 1。

用于真菌分离与培养的昆虫样本，具体包括中华蜜蜂 (*Apis cerana*) 与多种熊蜂，如长足熊蜂 (*Bombus longipes*)、火红熊蜂 (*Bombus pyrosoma*)、红光熊蜂 (*Bombus ignitus*) 和地熊蜂 (*Bombus terrestris*) 等，采集地点为北京市百花山国家级自然保护区。所有样本在分离前均经健康状态评估，实验过程中使用单个昆虫肠道进行真菌分离，样本间未进行混合处理，以确保分离菌株来源的准确性和可比性。

1.2 供试培养基及主要试剂

实验中使用酵母膏胨葡萄糖培养基 (yeast extract peptone dextrose medium, YPD) 进行菌株培养。ITS 扩增使用的 ITS1F 和 ITS4 引物对参考 Yan 等的研究设计^[40]，并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系中使用的 2×Rapid Taq Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 主要仪器设备

恒温培养箱(上海龙跃仪器设备有限公司)；超净工作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司)；

塑料方盒(福建喇叭花环保科技有限公司)；变速组织研磨器套装[天根生化科技(北京)有限公司]；PCR 扩增仪、移液枪(Eppendorf 公司)；接种环(Biologix 公司)；培养皿(浙江柏美特医用塑料有限公司)；镊子(启东市维特斯工具有限公司)。

1.4 ITS 扩增子分析

为分析蜜蜂与熊蜂肠道真菌群落结构，本研究收集了文献与公共数据库中包含 ITS 区域的高通量测序数据(表 1)。所得原始双端测序数据以 FASTQ 格式整理，并使用 QIIME2 (v2023.5) 进行分析^[41]。具体流程包括对序列质量进行统计评估、对测序数据进行去噪、拼接与去除嵌合体，最终获得特征表、代表性序列文件及去噪统计信息。为确保物种分类的准确性，基于 UNITE 数据库(v10, 99% 相似度, 2024 年 4 月发布版本)训练 Naive Bayes 分类器^[42]，并用于对代表性序列进行物种注释，获得每条扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)对应的分类标签。通过绘制真菌群落分类组成柱状图，展示不同宿主样本中真菌类群在门、纲等水平的组成差异，并计算 Shannon、Simpson 和 Chao1 等 α 多样性指标以评估样本内群落多样性。此外，为进一步探讨不同宿主间肠道真菌群落的结构异同，基于纲水平的相对丰度数据进行了主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 和非度量多维尺度分析 (non-metric multidimensional scaling, NMDS)，揭示群

表1 本研究中用于ITS分析的蜜蜂与熊蜂肠道真菌高通量测序样本信息

Table 1 High-throughput ITS sequencing samples of gut fungal communities from *Apis cerana*, *Apis* spp. and *Bombus* spp. used in this study

Host	Number	Sample source	Reference
<i>Apis cerana</i>	6	Animal Experimental Research Base of Shandong Agricultural University	[36]
<i>Apis mellifera</i>	44	Tocal Agricultural College Bee Research and Training Centre in Paterson; Department of Agricultural, Forest and Food Sciences	[29,37-38]
<i>Bombus impatiens</i>	19	Monterey, California	[39]
<i>Bombus vosnesenskii</i>	58	Monterey, California	[39]

落结构的 β 多样性分布格局。

1.5 肠道真菌的分离与培养

使用镊子取出蜜蜂和熊蜂的完整肠道，将其置于 100 μ L 25% (体积分数)甘油溶液中，并使用研磨棒充分研磨肠壁组织，随后将样品存储于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中。取部分样品接种至 YPD 固体培养基，并采用三区划线法进行菌落分离，在 30 $^{\circ}$ C 培养 2–3 d 后，观察菌落形态并挑选单菌落。对选定菌落进行四区划线纯化培养，以确保获得单一菌株。

1.6 可培养真菌的 ITS 条带扩增与初步鉴定

选取从多个蜜蜂与熊蜂肠道样本中分离获得的 25 个纯化菌落，使用 ITS1F 和 ITS4 引物对 ITS 1-5.8S–ITS 2 区域进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积为 30 μ L，包括 $2\times$ Rapid Taq Master Mix 15 μ L，引物 ITS1F (TCCGTAG GTGAACCTGCGG) 和 ITS4 (TCCTCCGCTTATT GATATGC) 各 1 μ L (工作浓度为 10 μ mol/L)，适量无菌水补足，并用枪头挑取单菌落作为 DNA 模板。PCR 反应条件为： 95 $^{\circ}$ C 初始变性 8 min； 95 $^{\circ}$ C 15 s， 56 $^{\circ}$ C 15 s， 72 $^{\circ}$ C 30 s，30 个循环； 72 $^{\circ}$ C 终延伸 7 min。扩增产物使用 1% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳进行检测，确保获得清晰且大小正确的条带。

扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 一代测序。测序结果上传至 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 BLAST 比对，以确定菌株的初步分类信息。

1.7 全基因组测序与生物信息学分析

为深入解析菌株的遗传特性与潜在功能，本研究对前期鉴定获得的目标菌株进行了全基因组测序与详细的生物信息学分析。首先，将纯培养的菌株样品送至北京诺禾致源科技股份有限公司，采用 Illumina NovaSeq 平台进行高通量测序，以获取高质量的基因组原始测序数据。原始数据使用 fastp (v0.20.1) 进行质量控制

(quality control, QC)^[43]，具体包括去除接头序列 (adapter trimming)、低质量碱基过滤 (quality filtering) 以及统计测序数据的整体质量情况，确保后续分析数据的准确性与可靠性。其次，利用 SPAdes 软件 (v3.15.3) 进行基因组从头组装^[44]，以获得目标菌株的高质量基因组序列。此外，采用 BUSCO 工具 (v5.4.3) 评估基因组组装的完整性和基因覆盖度^[45]，使用的参考数据库为 fungi_odb10 (版本号：2024-01-08)，以验证组装质量。为进一步明确各菌株的系统发育关系及分类准确性，采用 FastANI-based search and ANI identification (FASANI) 工具对每株菌株与数据库中已知真菌参考基因组进行快速比对分析，以计算两者间的平均核苷酸相似度 (average nucleotide identity, ANI)^[46]。为确保系统发育分析的准确性与分类注释的可靠性，所有比对使用的参考基因组均来自 NCBI RefSeq 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>)。本研究将分离菌株与这些参考基因组进行全基因组序列比对，并计算 ANI 值，用于辅助判断物种亲缘关系和系统发育聚类准确性。比对所使用的参考菌株及其数据库信息详见表 2。随后，采用 Funannotate (v1.8.9) 软件进行基因结构预测与注释^[47]，明确编码基因的基因结构、外显子-内含子分布及相关调控元件特征。进一步采用 InterProScan (v5.55-88.0)^[48] 以及 eggNOG-mapper (v2.1.6)^[49] 对预测获得的蛋白序列进行功能注释，以揭示目标菌株基因组的蛋白功能域、代谢通路、碳水化合物活性酶家族及潜在生物学功能。此外，使用 antiSMASH 软件 (v7.0) 预测菌株基因组中的次生代谢产物生物合成基因簇 (biosynthetic gene clusters, BGCs)^[50]，探讨目标菌株可能具有的次生代谢产物生物合成能力及其在生物防治或药物开发中的潜在应用价值。

本研究测得的真菌全基因组数据已存储在国家微生物科学数据中心 (National Microbiology Data Center, NMDC)，登录号为 NMDC40084645。

表2 本研究中用于系统发育分析的参考真菌基因组信息

Table 2 Reference genomes used for phylogenetic analysis in this study

NCBI accession number	Taxon	Strain
GCA_030556705.1	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	NRRL Y-7112
GCA_015708715.1	<i>Kodamaea ohmeri</i>	UWOPS01-666b4
GCA_030573055.1	<i>Metschnikowia anglica</i>	UWOPS01-666b4
GCA_030569435.1	<i>Metschnikowia koreensis</i>	CBS 8854
GCA_030561035.1	<i>Wickerhamiella bombiphila</i>	NRRL Y-27640
GCA_000026365.1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	CBS 732
GCA_042851295.1	<i>Zygosaccharomyces</i> sp.	NBRC 1877
GCA_030572115.1	<i>Starmerella apicola</i>	NRRL Y-2481
GCA_030555795.1	<i>Starmerella sorbosivorans</i>	NCYC 2938
GCA_030579915.1	<i>Starmerella bombi</i>	NRRL Y-17081

2 结果与分析

2.1 基于 ITS 的蜜蜂与熊蜂肠道真菌群落结构和多样性特征分析

为解析蜜蜂和熊蜂肠道真菌群落的组成特征,本研究基于 ITS 扩增子测序数据,对中华蜜蜂(*Apis cerana*)、意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)、美洲熊蜂(*Bombus impatiens*)和黑尾熊蜂(*Bombus vosnesenskii*)这 4 种宿主的肠道样本进行了系统分析。图 1A 展示了真菌群落在门水平的相对丰度分布情况,分析中保留相对丰度最高的前 5 个门类,其余统一归为 others 处理。子囊菌门(Ascomycota)真菌在所有宿主中均为优势类群,占据主导地位。担子菌门(Basidiomycota)真菌主要分布于蜜蜂(*A. cerana* 和 *A. mellifera*)样本中,平均相对丰度为 5.82%,在部分个体中相对丰度超过 20.00%,而在熊蜂中平均相对丰度较低,仅为 1.04%。毛霉门(Mucoromycota)真菌则在黑尾熊蜂中检出比例较高,最高相对丰度可达 98.36%,但在大多数样本中丰度较低,为 0.96%–11.57%,提示其在该宿主中可能具有高度个体差异性。此外,未分类门(Unclassified)在各宿主中均有分布,可能反映了数据库覆盖的局限或存在尚未鉴定的真菌类群。

为进一步揭示各门类真菌在更细分类群水

平的组成特征及宿主间差异,本研究进一步在纲水平分析真菌群落结构(图 1B)。分析中仅保留相对丰度最高的前 10 个纲类,其余统一归为 others 处理。来自于囊菌门的酵母菌纲(Saccharomycetes)几乎在所有宿主样本中广泛存在。伞菌纲(Agaricomycetes)仅出现在蜜蜂样本中,并在所有中华蜜蜂中被检出,相对丰度为 0.64%–5.36%。座囊菌纲(Dothideomycetes)和散囊菌纲(Eurotiomycetes)主要分布于熊蜂个体,平均相对丰度分别为 15.28% 和 37.08%。部分纲如小丛梗孢纲(Moniliellomycetes)仅在意大利蜜蜂个体中被检出,最高相对丰度可达 11.47%。未分类纲(Unclassified)在全部样本中亦占一定比例,说明昆虫肠道真菌群落中仍存在大量未被充分认识和注释的类群,具有重要的研究潜力。通过比较各宿主之间的物种组成,发现中华蜜蜂与黑尾熊蜂的群落结构差异最为显著,提示不同传粉昆虫在肠道真菌群落构成上存在宿主特异性。

为进一步评估不同传粉昆虫肠道真菌群落的复杂性,本研究使用 Shannon、Simpson 和 Chao1 指数这 3 种常见 α 多样性指标,比较 4 种宿主间群落的物种丰富度与均匀性(图 1C–1E)。Shannon 指数结果显示,黑尾熊蜂的多样性水平最高,显著高于其他 3 种昆虫,意大利蜜蜂最

低, 差异具有统计学显著性。Simpson 指数的变化趋势与 Shannon 指数一致, 黑尾熊蜂样本中群落均匀性最高, 意大利蜜蜂最低。Chao1 指数分析表明, 黑尾熊蜂具有最高的物种估计丰富度, 且显著高于其余 3 种昆虫。综合来看, 黑尾熊蜂与意大利蜜蜂的多样性差异最大, 其余 2 种宿主的多样性水平居中且彼此更为接近。

总体而言, 不同宿主昆虫在真菌群落组成及多样性水平上均存在明显差异, 黑尾熊蜂展现出更为复杂且均衡的肠道真菌群落结构, 而意大利蜜蜂则呈现出相对单一的群落特征。为进一步评估不同宿主间肠道真菌群落结构的差异性, 本研究基于纲水平的相对丰度数据, 计算 Bray-Curtis 距离, 并开展 β 多样性分析。主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)结果显示, 蜜蜂属和熊蜂属样本在 PCoA1 坐标轴上呈现出明显的分离趋势, 表明不同宿主之间的真菌群落结构存在显著差异(图 1F)。基于二维坐标系上群落分布的 PERMANOVA 分析进一步表明, 宿主物种对真菌群落结构具有显著影响($R^2=0.2109$, $P=0.0010$), 支持了 PCoA 分析结果。此外, 非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)同样揭示了清晰的样本聚类模式, 蜜蜂和熊蜂样本在二维空间中呈明显分离(图 1G)。NMDS 分析的应力值为 0.201, 表明降维拟合效果较好, NMDS 结果与 PCoA 分析相互印证, 共同表明宿主身份在塑造肠道真菌群落结构中发挥着关键作用。

总体来看, 4 种传粉昆虫在肠道真菌类群的组成和多样性水平上均表现出明显差异。蜜蜂样本中以酵母菌纲为主, 熊蜂样本则表现出更高的纲水平多样性。在 α 多样性方面, 黑尾熊蜂具有最高的物种丰富度与均匀性, 意大利蜜蜂最低。这些在群落组成和多样性层面的差异也反映在 β 多样性分析中, 提示宿主生态位或生理特征可能驱动其肠道真菌群落的差异化组装。

2.2 基因组特征评估与系统发育分析

基于前述 ITS 扩增子测序揭示的 4 种蜂类肠道真菌群落组成差异, 为深入探究蜜蜂与熊蜂肠道真菌的遗传特征及其系统发育关系, 进一步从北京市百花山国家级自然保护区的蜜蜂与熊蜂肠道样本中分离获得了 25 株(编号为 B1-B25)真菌菌株并进行 Sanger 测序, BLAST 比对结果如表 3 所示, 这些菌株主要隶属于梅奇酵母属 (*Metschnikowia*)、柯达酵母属 (*Kodamaea*)、小星裂酵母属 (*Starmerella*)、拟威克酵母属 (*Wickerhamiella*) 和接合酵母属 (*Zygosaccharomyces*) 等, 涵盖了蜂类肠道中常见的酵母型真菌类群。

在此基础上, 对上述 25 株真菌开展全基因组测序, 所有样本均采用 Illumina 平台进行双端高通量测序, 并经由 SPAdes 软件完成 *de novo* 组装, 获得了覆盖度高、组装质量良好的基因组序列。从基因组完整度、G+C 含量、基因组大小与编码能力等维度对真菌基因组特征进行了系统性评估(图 2)。

BUSCO 分析结果显示, 大多数菌株的基因组完整度较高, 其中 12 株超过 95%, 5 株达到 98% 以上, 具备良好的分析基础(图 2A 左)。接合酵母属 (*Zygosaccharomyces*) 和柯达酵母属 (*Kodamaea*) 菌株表现出最高的 BUSCO 评分, 来源于包括红光熊蜂、火红熊蜂和长足熊蜂在内的多种熊蜂, 提示其基因组结构较为稳定; 而主要来自地熊蜂和中华蜜蜂的小星裂酵母属 (*Starmerella*) 与拟威克酵母属 (*Wickerhamiella*) 的部分菌株完整度略低, 可能存在基因缺失或组装不完整现象。G+C 含量分析显示不同属间存在明显差异, 范围为 39.02%–58.93% (图 2A 中)。其中, 小星裂酵母属 (*Starmerella*) 菌株的 G+C 含量较高, 柯达酵母属 (*Kodamaea*) 与接合酵母属 (*Zygosaccharomyces*) 相对较低, 主要分离自红光熊蜂与火红熊蜂个体。图 2A 右展示了蛋白编码区总长度与基因组大小之间的关系, 整体呈显著正相关趋势。梅奇酵母属

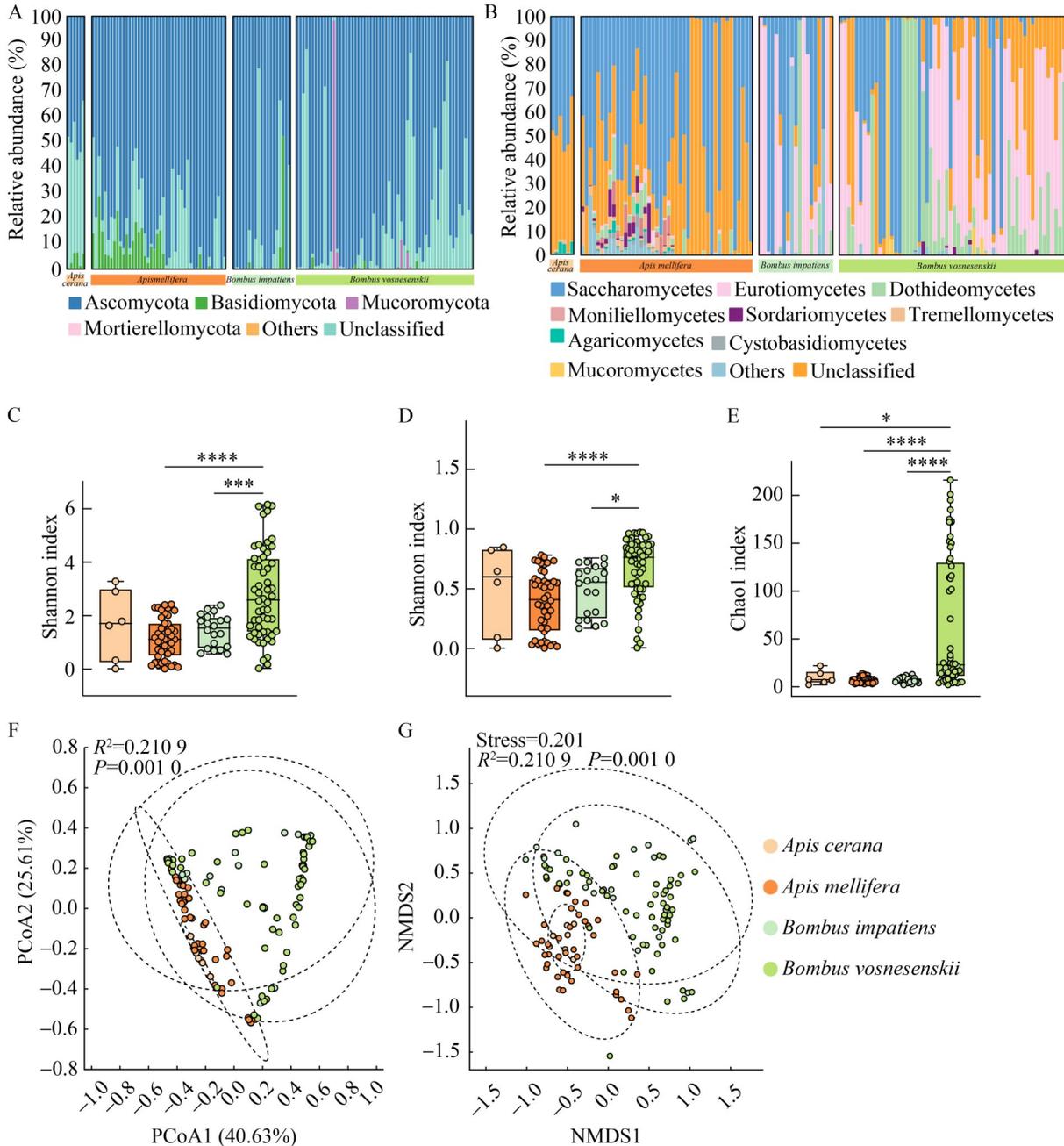


图1 四种传粉昆虫肠道真菌群落结构及多样性分析 A: 不同昆虫宿主中肠道真菌的门水平组成。柱状图显示蜜蜂和熊蜂中主要真菌门的相对丰度, 包括Ascomycota、Basidiomycota、Mucoromycota等。B: 真菌群落的纲水平组成分析。柱状图展示了在蜜蜂和熊蜂中主要真菌纲的相对丰度分布, 包括Saccharomycetes、Eurotiomycetes、Dothideomycetes等。C–E: 昆虫间肠道真菌群落的 α 多样性比较, 包括香农指数(Shannon index) (C)、辛普森指数(Simpson index) (D)以及Chao1多样性指数(E)。采用Kruskal-Wallis检验统计显著性, 显著性水平标注为: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。F–G: 昆虫间肠道真菌群落的 β 多样性比较。包括基于纲水平的蜜蜂和熊蜂肠道真菌群落PCoA分析图(F)以及基于纲水平的蜜蜂和熊蜂肠道真菌群落NMDS分析图(G)。

Figure 1 Composition and diversity of gut fungal communities in four pollinator species. A: Phylum-level composition of gut fungal communities in different insect hosts. Bar plots show the relative abundances of major fungal phyla in the guts of *Apis cerana*, *Apis mellifera*, *Bombus impatiens*, and *Bombus vosnesenskii*, including Ascomycota, Basidiomycota, and Mucoromycota. B: Class-level composition of fungal communities. The relative abundances of dominant fungal classes, such as Saccharomycetes, Eurotiomycetes, and Dothideomycetes, are presented for each *A. cerana*, *A. mellifera*, *B. impatiens*, and *B. vosnesenskii* species. C–E: Comparison of α -diversity indices among pollinators, including Shannon index (C), Simpson index (D), and Chao1 index (E). Statistical significance was assessed using the Kruskal-Wallis test, with significance levels indicated as * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. F–G: Comparison of β -diversity of gut fungal communities among pollinators, including principal coordinates analysis (PCoA) (F) and non-metric multidimensional scaling (NMDS) (G) at the class level.

表3 分离菌株的BLAST比对结果

Table 3 BLAST results of isolated fungal strains

Isolate ID	Sample source	BLAST result
B1	<i>Bombus terrestris</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
B2	<i>Apis cerana</i>	<i>Saccharomyces</i> sp.
B3	<i>Apis cerana</i>	<i>Nakaseomyces bracarensis</i>
B4	<i>Bombus terrestris</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
B5	<i>Bombus terrestris</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
B6	<i>Bombus terrestris</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
B7	<i>Bombus ignitus</i>	<i>Pleurotus djamor</i>
B8	<i>Bombus ignitus</i>	<i>Ganoderma boninense</i>
B9	<i>Bombus ignitus</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>
B10	<i>Bombus ignitus</i>	<i>Metschnikowia</i> sp.
B11	<i>Bombus ignitus</i>	<i>Umbelopsis</i> sp.
B12	<i>Apis cerana</i>	<i>Candida sorbosivorans</i>
B13	<i>Bombus terrestris</i>	<i>Starmerella magnoliae</i>
B14	<i>Apis cerana</i>	<i>Starmerella apicola</i>
B15	<i>Bombus pyrosoma</i>	<i>Starmerella bombi</i>
B16	<i>Bombus terrestris</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>
B17	<i>Bombus terrestris</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>
B18	<i>Bombus terrestris</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>
B19	<i>Bombus terrestris</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>
B20	<i>Bombus pyrosoma</i>	<i>Metschnikowia persici</i>
B21	<i>Bombus pyrosoma</i>	<i>Candida</i> sp.
B22	<i>Bombus pyrosoma</i>	<i>Metschnikowia</i> sp.
B23	<i>Bombus pyrosoma</i>	<i>Metschnikowia reukaufii</i>
B24	<i>Bombus longipes</i>	<i>Metschnikowia reukaufii</i>
B25	<i>Bombus pyrosoma</i>	<i>Metschnikowia reukaufii</i>

(*Metschnikowia*)菌株基因组最大,对应的编码区也最长,反映出其潜在的基因复杂性,该属菌株全部来自地熊蜂和中华蜜蜂;接合酵母属(*Zygosaccharomyces*)和拟威克酵母属

(*Wickerhamiella*)则表现出较高的编码区占比,说明其基因组结构更为紧凑,这些菌株均分离自地熊蜂、火红熊蜂和长足熊蜂个体。

鉴于 ITS 序列难以支撑高分辨率的系统发育分析,在确认基因组质量可靠后,首先通过平均核苷酸相似度(average nucleotide identity, ANI)分析筛选用于系统发育分析的参考基因组。采用 FASANI 工具,将每株分离菌株与 NCBI RefSeq 数据库中的高质量参考基因组进行比对。基于 ANI 值(>95% 为同种,75%–95% 为同属不同种),为每株分离菌株筛选出其最相似的参考菌株(在系统树中以红色加粗字体标示)。随后,结合这些筛选出的高相似度参考基因组以及分离菌株,采用基于核心基因的最大似然法^[36],构建了高分辨率的系统发育树(图 2B)。具体而言,*Zygosaccharomyces* 属和 *Kodamaea* 属分别聚类于子囊菌门(Ascomycota)下的酵母菌纲(Saccharomycetes)酵母目(Saccharomycetales)酵母科(Saccharomycetaceae)和毕赤酵母菌纲(Pichiomycetes)金丝酵母菌目(Seriales)德巴利酵母科(Debaryomycetaceae),形成清晰独立的分支;*Wickerhamiella* 属和 *Starmerella* 属的菌株均归属于子囊菌门(Ascomycota)下的 Dipodascomycetes 纲 Dipodascales 目口蘑科(Trichomonascaceae),但在科内部又各自聚集成独立分支;*Metschnikowia* 属的菌株则归属于子囊菌门(Ascomycota)下的毕赤酵母菌纲

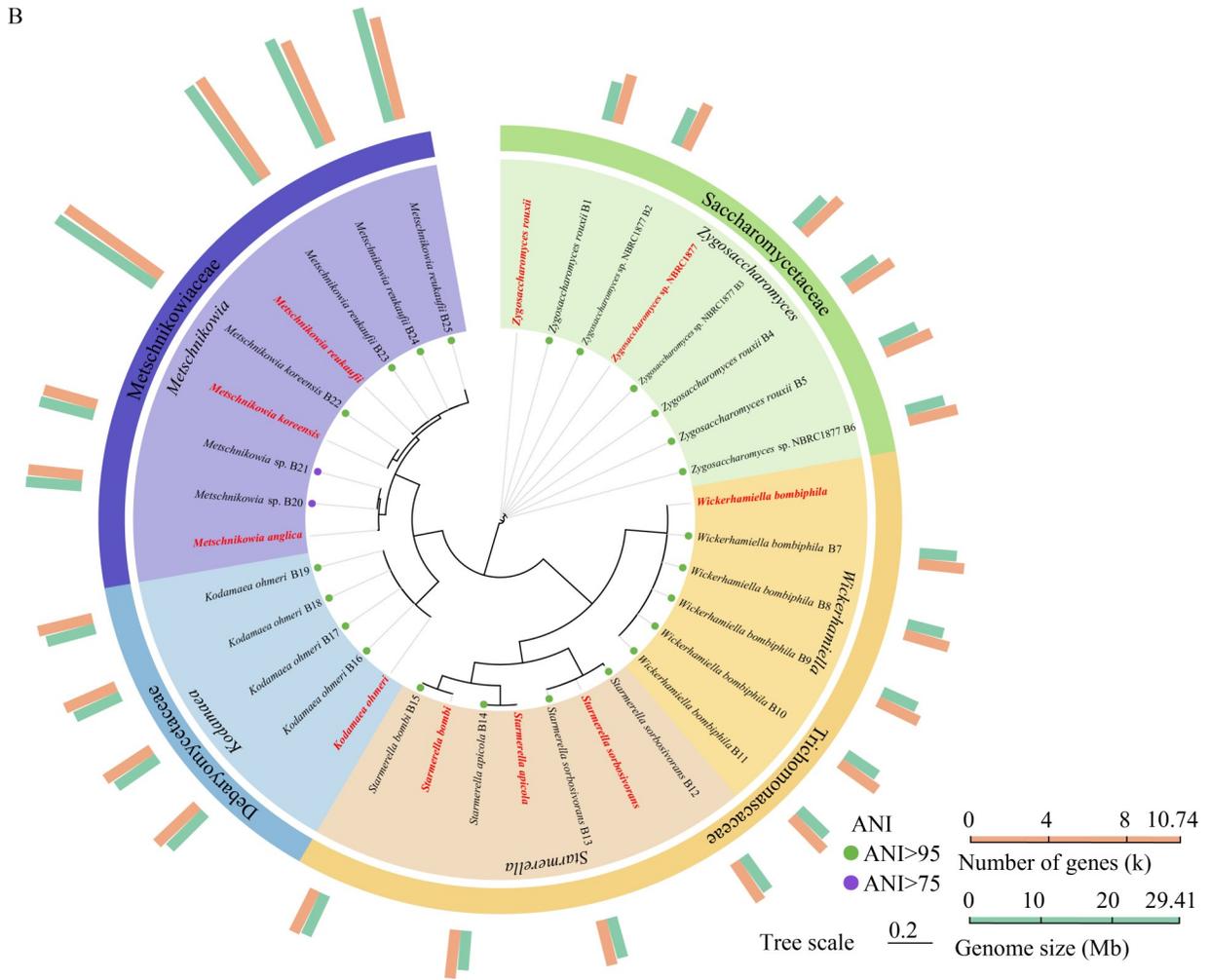
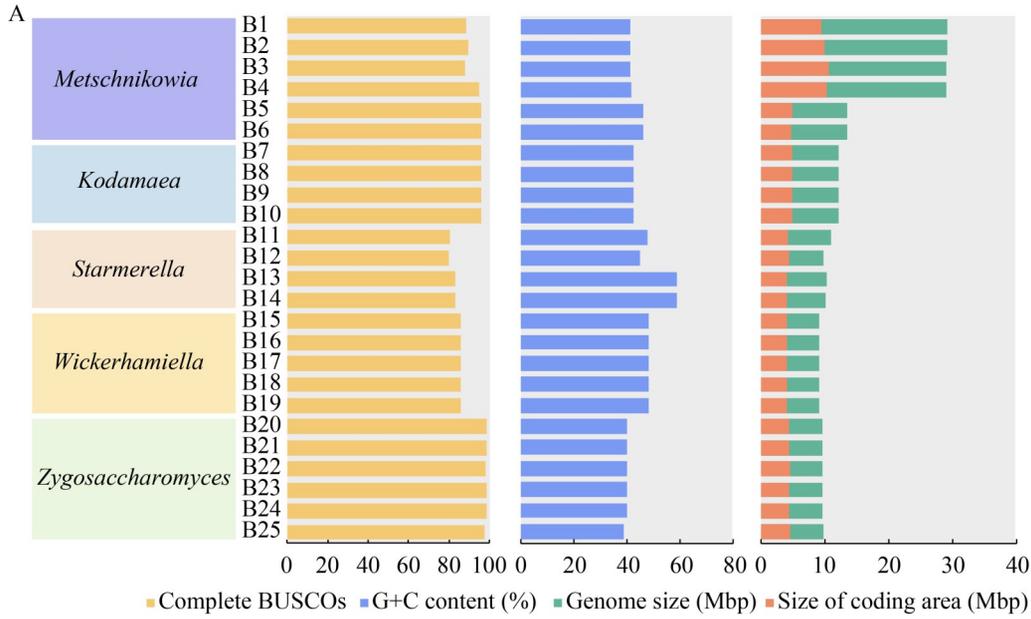


图2 分离获得的蜜蜂和熊蜂肠道真菌菌株的系统发育关系与基因组特征分析 A: 不同菌株的基因组特征统计, 包括基因组大小(Mb)、编码区长度(Mb)、G+C含量(%)、蛋白编码基因数量(千)及BUSCO完整性评分(%)。5个属级分类单元分别为: 接合酵母属、拟威克酵母属、小星裂酵母属、柯达酵母属和梅奇酵母属, 对应昆虫肠道中典型酵母菌群。B: 基于全基因组平均核苷酸相似性(ANI)构建的系统发育树, 显示所分离的25株真菌的系统演化关系。颜色标注代表不同属级分类单元, 树形结构中ANI>95%的节点被标记为同种水平聚类。

Figure 2 Phylogenetic relationships and genomic features of fungal strains isolated from the guts of bumblebees (*Bombus* spp.) and honeybees (*Apis* spp.). A: Summary of genomic features of 25 gut-associated fungal strains, including genome size (Mb), total coding sequence length (Mb), G+C content (%), number of predicted protein-coding genes (in thousands), and BUSCO completeness scores (%). These isolates belong to five representative yeast genera commonly found in insect guts: *Zygosaccharomyces*, *Wickerhamiella*, *Starmerella*, *Kodamaea*, and *Metschnikowia*. B: Whole-genome-based phylogenetic tree constructed using average nucleotide identity (ANI) values, illustrating the evolutionary relationships among the isolated strains. Genus-level classifications are indicated by distinct branch colors. Nodes with ANI values greater than 95% are labeled to denote clusters at the species level.

(Pichiomycetes) 金丝酵母菌目(Serinales)梅奇酵母科(Metschnikowiaceae), 形成一个明显独立的演化分支, 显示出较高的系统发育独立性。

在系统树外围, 绿色和橙色柱状图分别展示了每个菌株的基因组大小和预测基因数量。分析结果显示, 不同属间的基因组结构差异显著。梅奇酵母属(*Metschnikowia*)部分菌株的预测基因数量超过 10 000 个, 表明其具备更为复杂的基因组成和潜在功能。接合酵母属(*Zygosaccharomyces*)和柯达酵母属(*Kodamaea*)菌株的基因数量虽不足 5 000 个, 但呈现较高的基因密度。小星裂酵母属(*Starmerella*)和拟威克酵母属(*Wickerhamiella*)菌株则兼具适中的基因组规模和基因数量。

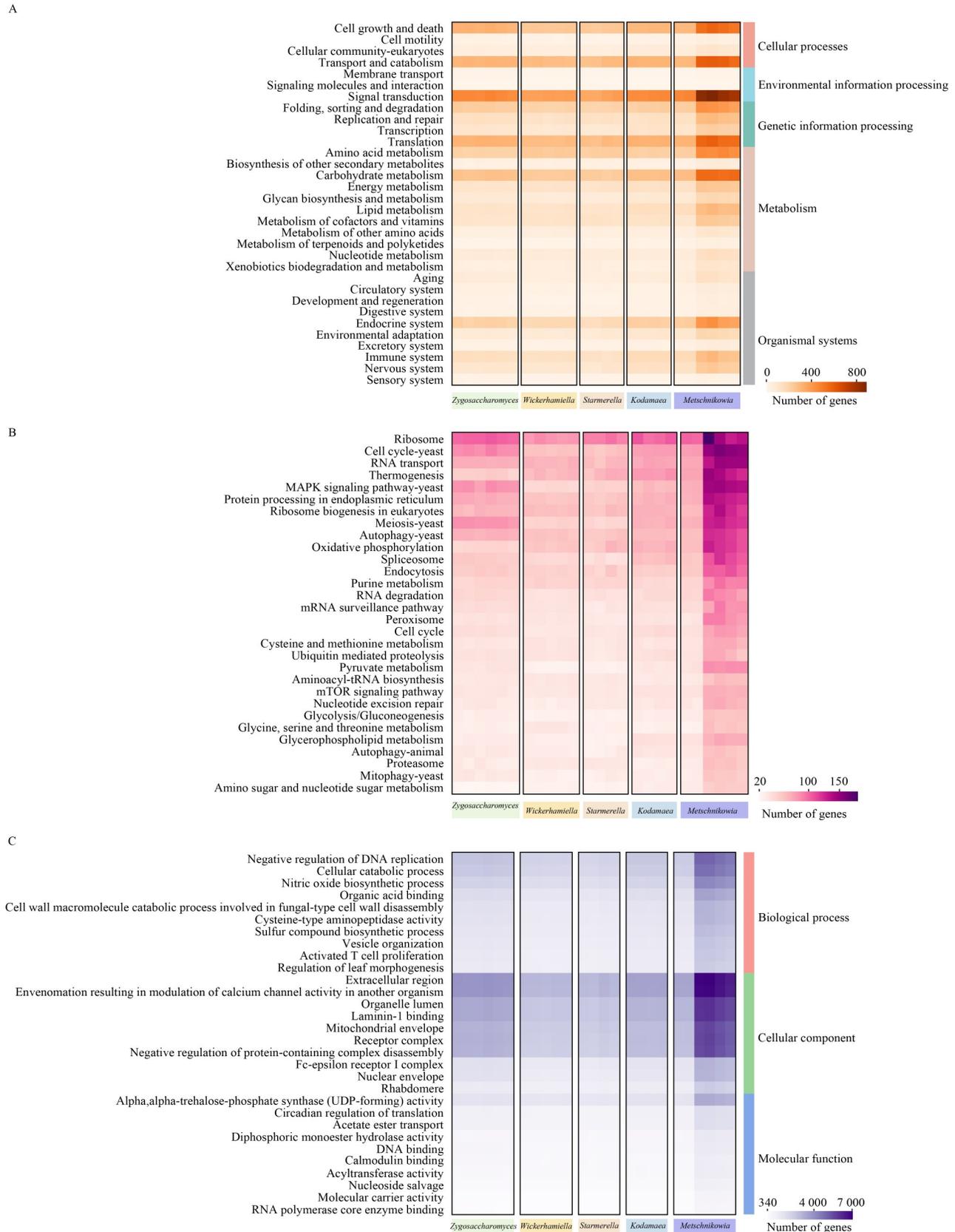
基于平均核苷酸相似度(ANI)进一步评估物种关系, 结果显示多数菌株与参考菌株的 ANI 值高于 95% (以绿色圆点标注), 为同种关系; 少数菌株如部分梅奇酵母属(*Metschnikowia*)样本, 其 ANI 值为 75%–95% (以紫色圆点标注), 代表同属不同种, 存在一定演化独立性。

2.3 基因组功能注释与代谢潜力分析

为深入解析蜜蜂与熊蜂肠道真菌的功能特征及其潜在生态角色, 本研究对分离获得的 25 株

真菌全基因组进行了系统注释分析, 涵盖代谢通路、基因功能分类、碳水化合物活性酶及次级代谢产物合成潜力等方面。

在代谢通路注释方面, 使用 KEGG 数据库对基因功能进行分级归类分析。如图 3A 所示, 在第 1 级分类(L1)中, 真菌基因主要富集于代谢(metabolism)模块, 在各属真菌中占比约为 31%。其次为遗传信息处理(genetic information processing)和生物体系统(organismal systems), 基因占比分别为 20% 和 19%, 说明肠道真菌具有较强的能量转化和环境适应潜力。在第 2 级分类(L2)中, 多个核心代谢通路的基因注释数量较为丰富, 主要包括信号传导(signal transduction)、翻译(translation)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)等。其中, 梅奇酵母属(*Metschnikowia*)表现最为突出, 该属菌株在上述通路中注释到的基因数量分别为 700、480、458 和 369 个, 高于其他真菌属类。这些梅奇酵母属(*Metschnikowia*)菌株均分离自地熊蜂和中华蜜蜂, 显示出其在特定宿主肠道中可能具有更强的代谢潜力。进一步在第 3 级分类(L3)中筛选丰度最高的 30 条通路, 如图 3B 所示, 核糖体



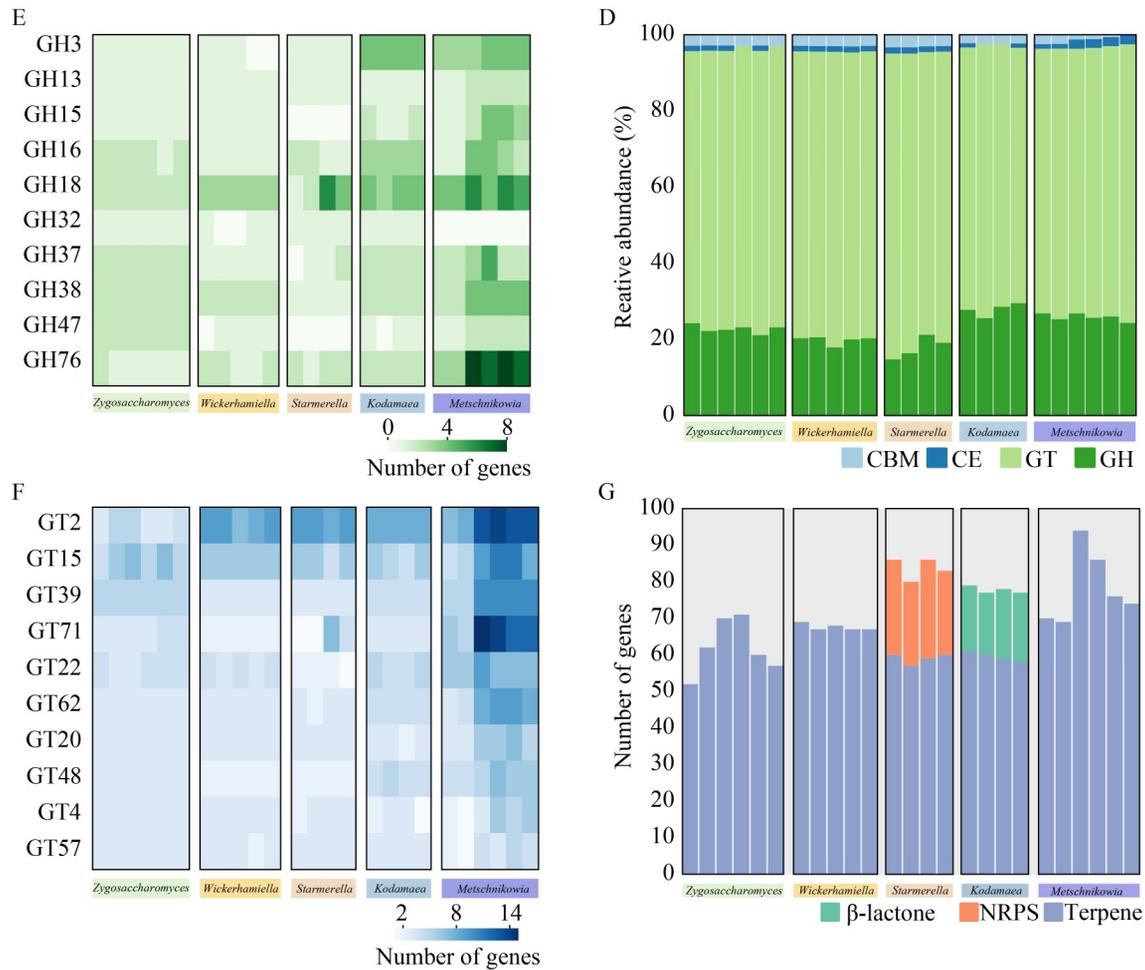


图3 分离获得的肠道真菌菌株的功能注释与代谢潜力分析 A: 基于KEGG数据库一级分类(L1)的基因数量统计, 展示各属真菌在代谢(metabolism)、遗传信息处理(genetic information processing)、环境信息处理(environmental information processing)等主要代谢模块中的基因分布情况。B: 各属真菌在代表性三级通路(L3)中的基因数量, 包括核糖体(ribosome)、细胞周期(cell cycle-yeast)、RNA转运(RNA transport)等, 揭示其基础代谢能力与潜在生理功能差异。C: GO注释结果, 展示各属菌株在生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)与分子功能(molecular function, MF)这三个维度的基因注释数量, 揭示其在胞器结构、生物合成及信号传导等方面的功能分化。D: 各属真菌编码的碳水化合物活性酶(CBM、CE、GT、GH)总量分布, 进一步支持其在碳水化合物代谢与宿主生态互动中的多样化潜能。E: 不同GH亚家族在各属真菌中的基因数量对比。F: 不同GT亚家族在各属真菌中的基因数量对比。G: 次级代谢合成潜力分析, 包括非核糖体肽合成酶(NRPS)、萜类(terpene)及β-内酯(β-lactone)等基因簇在不同属真菌中的基因数量。

Figure 3 Functional annotation and metabolic potential analysis of gut fungal strains isolated from bees. A: KEGG-based classification at Level 1 (L1), showing the number of annotated genes in major functional categories including metabolism, genetic information processing, and environmental information processing across different fungal genera. B: Distribution of genes across representative Level 3 (L3) KEGG pathways such as ribosome, cell cycle-yeast, and RNA transport, reflecting differences in basic metabolic activity and potential

physiological functions among genera. C: Gene ontology (GO) annotation results, illustrating the number of annotated genes in biological process (BP), cellular component (CC), and molecular function (MF) categories for each genus, and highlighting functional differentiation in organelle structure, biosynthesis, and signal transduction. D: Total number of carbohydrate-active enzymes (CAZymes) annotated in each genus, including CBM, CE, GT, and GH families, supporting their diverse roles in carbohydrate metabolism and host-microbe interactions. E: Comparative heatmap of gene counts across fungal genera for the top glycoside hydrolase (GH) subfamilies, indicating their involvement in polysaccharide degradation. F: Comparative heatmap of gene counts for the top glycosyltransferase (GT) subfamilies across genera, reflecting their potential in cell wall synthesis, glycan modification, and stress response. G: Predicted biosynthetic potential of secondary metabolites, including gene clusters encoding nonribosomal peptide synthetases (NRPS), terpenes, and β -lactones in different fungal genera.

(ribosome)、细胞周期(cell cycle-yeast)、RNA 转运(RNA transport)等基本代谢路径在各属真菌中均有分布,其中梅奇酵母属(*Metschnikowia*)仍在相关通路中保持基因数优势,该属内所有菌株在上述3条通路中的注释到的基因数量分别为131、128和120个,提示其代谢活性与适应能力可能更强。

综合KEGG注释结果可以看出,肠道真菌在多个代谢通路中发挥关键作用。为明确其在细胞功能层面的具体分布,本研究结合基因本体数据库(gene ontology, GO)数据库对基因进行了多维度注释(图3C)。三大功能类别中细胞组分(cellular component, CC)相关基因数量最多,在各属真菌中占比均超过50%,主要定位于胞器腔(organelle lumen)、线粒体包膜(mitochondrial envelope)和细胞外区域(extracellular region)等关键结构。其中梅奇酵母属(*Metschnikowia*)和接合酵母属(*Zygosaccharomyces*)在上述通路中注释到的基因数量较多,平均基因总数分别为30206个和20647个,显示其在能量代谢与宿主互动中可能具有一定活性,值得注意的是,这2类菌株绝大多数来源于熊蜂个体,包括地熊蜂、长足熊蜂和火红熊蜂,提示其宿主来源可能与其功能特征密切相关;生物过程(biological process, BP)类基因主要富集于细胞代谢过程(cellular catabolic process)、DNA复制负调控(negative regulation of DNA replication)和一氧化

氮生物合成过程(nitric oxide biosynthetic process)等功能,在梅奇酵母属(*Metschnikowia*)中分别注释到23246、24346和20446个基因,进一步反映出其在代谢调控和应激响应中的潜在功能优势;分子功能(molecular function, MF)中,仅有合成海藻糖-6-磷酸[α , α -trehalose-phosphate synthase (UDP-forming) activity]相关的功能基因在各属中普遍富集,平均基因数量为1052个,提示肠道真菌可能通过海藻糖代谢参与胁迫应答。

蜜蜂和熊蜂肠道细菌在糖类降解过程中的代谢分工已较为明确,如双歧杆菌(*Bifidobacterium*)和吉利氏菌(*Gilliamella*)可以高效利用肠道内的多糖^[21]。但真菌在该过程中的作用尚不明确,其底物利用潜力缺乏系统研究。鉴于蜜蜂和熊蜂的饮食结构以富含碳水化合物的花粉和花蜜为主^[51],这些底物中富含复杂多糖与可发酵糖类,肠道真菌在底物降解过程中的作用可能同样重要。为评估肠道真菌在碳源获取与营养转化方面的潜在功能,本研究进一步结合CAZy数据库,开展碳水化合物活性酶的注释分析,揭示其在多糖降解及糖基转移中的具体酶类组成(图3D)。结果显示,所有菌株的CAZymes主要由糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GH)和糖基转移酶(glycosyl transferases, GT)组成,占比均超过95%,远高于碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CE)和

碳水化合物结合结构域(carbohydrate-binding modules, CBM)。未检测到多糖裂解酶(polysaccharide lyases, PL)与辅助氧化还原酶(auxiliary activities, AA)类成员,表明肠道真菌在碳水化合物代谢中主要通过糖苷键的水解与合成参与底物降解及结构重塑。在GH家族中,如图3E所示,GH16、GH18与GH76为各属真菌中相对丰度较高的酶类,注释到的基因总数分别为49、84和66个。这些酶主要参与多糖底物的降解过程,如 β -葡聚糖、几丁质和甘露聚糖等,为肠道真菌在花粉、蜂粮等天然底物的降解过程中提供了分子基础。在GT家族中,如图3F所示,GT2、GT15与GT71为主要的优势类群,基因注释总数分别为200、155和119个,广泛参与细胞壁合成、糖链修饰及应激响应等糖基转移过程,指示肠道真菌不仅具有分解复杂底物的能力,也可能通过合成胞外多糖参与生物膜形成、群体感应及宿主互作等过程。梅奇酵母属(*Metschnikowia*)在上述关键GH(GH16、GH18、GH76)与GT(GT2、GT15、GT71)家族中均表现出较高的基因丰度,该属菌株共注释到相关基因260个,其中GH类关键酶80个,GT类关键酶180个,高于其他属的水平。提示其兼具强降解力与结构重塑能力,在复杂肠道环境中可能处于代谢核心地位。

除了在底物降解中可能发挥重要作用外,肠道真菌是否也具有合成具有生理活性的次级代谢产物的能力,是另一个值得关注的问题。已有研究表明,蜜蜂肠道中的共生细菌可合成多种次级代谢产物,如非核糖体肽(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)和核糖体合成和翻译后修饰肽类(ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, RiPPs),在维持微生物群落结构、抑制致病菌定殖、调节宿主免疫反应以及介导微生物间信号传导等方面发挥重要作用^[51]。然而,目前关于肠道真菌是否具备类似的合成能力及其在群落结构维持中的潜在作用仍知之甚少。为进一步探索其在生态

适应与群落竞争中的潜力,本研究利用antiSMASH对这些真菌的次级代谢产物合成能力进行了预测分析。不同菌属之间在次级代谢产物相关基因数量上存在差异(图3G)。其中,梅奇酵母属(*Metschnikowia*)菌株在整体次级代谢基因数量上表现最为突出,部分菌株相关基因数量接近100个,表明其在合成多种代谢产物方面具有显著优势,可能具备更复杂的代谢调控能力与环境应答策略。总体而言,各菌株普遍含有合成萜类化合物(terpene)的能力,主要来源于红光熊蜂的小星裂酵母属(*Starmerella*)和柯达酵母属(*Kodamaea*)的菌株还具备与 β -内酰胺类(β -lactone)与非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)相关的基因簇,在对应代谢通路中平均注释基因数量分别为18个和24个。这表明部分肠道真菌可能具有合成抗菌或信号类分子的能力,有助于在复杂肠道微环境中维持种群稳定与生态位竞争。

3 讨论与结论

本研究通过整合ITS扩增子测序与真菌全基因组分析,全面解析了蜜蜂与熊蜂肠道真菌群落的组成、系统发育关系及潜在功能特征。研究结果显示,肠道真菌不仅在宿主微生态中广泛存在,而且在代谢调控、环境适应与宿主互作中具有不可忽视的重要作用。

群落结构分析表明,子囊菌门(Ascomycota)为蜜蜂和熊蜂肠道真菌的优势类群,这一特征与果蝇^[52]、白蚁^[53]等昆虫肠道的真菌群落结构高度一致。已有研究显示,在果蝇中,子囊菌门真菌如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)可通过代谢挥发物影响宿主的嗅觉偏好、食物摄取行为及繁殖选择,对宿主的营养与生殖具有正向调节作用^[54]。而在木食性昆虫如白蚁中,子囊菌门成员则与纤维素降解相关,可表达裂解多糖单加氧酶,通过氧化机制促进纤维素降解,为宿主提供可利用碳源^[55]。这些研究表明,子囊菌门真菌不仅在多类昆虫中广泛存在,而

且在底物降解、宿主调控等方面发挥多重功能,具备高度的生态适应性与共生潜力。本研究中,不同宿主间的真菌组成呈现出显著宿主特异性分布,进一步支持了昆虫肠道微生物群落受宿主物种影响的观点^[56]。其中,黑尾熊蜂表现出最高的真菌多样性和群落异质性,可能与其广泛的地理分布和多样化的食源有关^[57]。

在系统发育层面,本研究构建的核心基因系统树与真菌的分类学一致性较高,不同属间的基因组大小、G+C含量和功能基因数量差异明显。已有研究表明,真菌基因组结构常与其生态位适应紧密相关,基因组越大、基因越丰富的物种往往在环境适应和代谢能力上更具优势^[26]。以分离自地熊蜂和中华蜜蜂肠道的梅奇酵母属(*Metschnikowia*)菌株为例,其基因组规模与编码基因数量在本研究中处于较高水平,这一结构性特征为后续功能层面的深入探讨提供了基础。此外,与细菌相比,真菌作为真核微生物,其基因组在结构和规模上普遍更为庞大,编码基因数量也显著更多^[56,58]。这种基因组上的复杂性为其在代谢调控、信号传导以及与宿主的互作中提供了更为多样的遗传基础,提示其在肠道微生态系统中可能发挥着不同于细菌的生态功能。

功能注释显示,肠道真菌广泛参与碳水化合物代谢、信号转导、能量转换及细胞结构维护等生物过程。已有文献指出,真菌在昆虫肠道中可通过多糖降解、短链脂肪酸生成等途径参与宿主营养代谢,同时也可能通过分泌次级代谢产物调节宿主免疫或在微生物群落中与共生细菌展开竞争^[23-24]。本研究进一步揭示,来自地熊蜂和中华蜜蜂肠道的梅奇酵母属(*Metschnikowia*)在多类碳代谢通路及糖苷水解酶(GH)与糖基转移酶(GT)等 CAZymes 家族中均表现出显著富集,显示其在碳水化合物代谢相关功能上具有较强的潜力。具体而言,GH16、GH18 和 GH76 是该属中富集程度较高的 3 类 GH 家族。其中,GH16 主要催化 β -1,3/1,4-葡聚

糖水解,靶向植物细胞壁中常见的结构性多糖^[59];GH18 家族包括几丁质酶和 N-乙酰- β -葡萄糖胺酶,能有效分解真菌细胞壁或昆虫几丁质^[60],不仅在梅奇酵母属(*Metschnikowia*)中高丰度表达,也在拟威克酵母属(*Wickerhamiella*)、小星裂酵母属(*Starmerella*)和柯达酵母属(*Kodamaea*)中表现出较高水平的富集,可能与定殖、竞争或免疫相关功能有关;GH76 则作用于甘露聚糖底物^[61],广泛存在于植物种子和酵母壁中,适用于复杂花粉来源的碳源分解。在 GT 家族中,梅奇酵母属(*Metschnikowia*)同样在 GT2、GT15 和 GT71 这 3 类糖基转移酶中表现出较高的基因丰度。其中,GT2 家族参与真菌细胞壁葡聚糖的合成,是维持细胞结构稳定的关键酶系^[62],该家族在拟威克酵母属(*Wickerhamiella*)、小星裂酵母属(*Starmerella*)和柯达酵母属(*Kodamaea*)中亦表现出较高丰度;这 3 类菌株大多来源于熊蜂个体,尤其以红光熊蜂和地熊蜂为主,提示熊蜂肠道真菌在细胞结构重塑方面可能具有一致的适应策略。GT15 涉及蛋白糖基化,参与多糖链的延伸与修饰^[63];GT71 与应激调控有关,可能在宿主肠道环境变化下增强真菌适应性^[64],该家族在小星裂酵母属(*Starmerella*)的部分菌株中亦表现出一定程度的富集。综上,梅奇酵母属(*Metschnikowia*)在多种关键酶类中的高丰度分布表明其不仅具备较强的多糖降解能力,还可能参与细胞结构的构建和环境适应,在蜂类肠道中发挥重要的代谢和生态功能。

值得注意的是,非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)和 β -内酰胺类等次级代谢产物通常由细菌合成,在微生物群落平衡、信号传导及宿主免疫调节方面发挥重要作用^[65]。本研究在蜂类肠道真菌中也检测到了与上述代谢产物相关的基因簇,特别是在柯达酵母属(*Kodamaea*)和小星裂酵母属(*Starmerella*)菌株中,提示肠道真菌可能具备一定的化学生态调节潜力。NRPS 产物

是一类结构多样的肽类化合物, 具有抗菌、免疫调节、铁螯合等功能^[66], 在微生物群落竞争与宿主防御中具有重要生态意义; 而 β -内酰胺类代谢物结构类似于传统抗生素, 可抑制细胞壁合成, 在微生境中可能帮助宿主抑制潜在致病菌或调节共生网络^[67]。这些次级代谢产物不仅有助于宿主在复杂微生境中的生态位维持与菌群竞争, 还可能通过化学生态作用影响宿主的免疫调控过程, 这与已有真菌 NRPS 类产物研究高度一致^[68]。这些发现进一步拓展了对蜂类肠道真菌生态功能的认知, 表明其在维持菌群稳定性和宿主健康方面可能发挥重要作用。此外, 柯达酵母属(*Kodamaea*)和小星裂酵母属(*Starmerella*)菌株主要来源于红光熊蜂, 提示其代谢能力可能与特定宿主生态位密切相关。

蜜蜂肠道细菌也被证实在碳水化合物利用中具有显著分工与协同机制, 如吉利氏菌(*Gilliamella apicola*)和星状双歧杆菌(*Bifidobacterium asteroides*)分别在果胶和寡糖代谢中发挥关键作用^[21]。本研究中 GH 与 GT 家族在真菌 CAZymes 组成中占据绝对优势, 提示其可能与细菌在底物利用上形成互补, 共同拓展宿主对多样化植物碳源的适应能力, 并维持微生态系统的稳定性。这种跨界微生物间的代谢协作机制, 值得在未来通过联合培养、代谢产物分析等实验手段加以深入验证。

此外, 虽然部分分离菌株在 ITS 条带测序结果中被注释为相同种, 但在形态特征、生长状态及来源宿主等方面表现出一定差异。已有研究指出, 即使为同一物种, 不同宿主来源或生态环境下的菌株在其基因组组成、代谢潜力及宿主适应性等方面可能存在差异^[69]。因此, 本研究对多个物种注释相同但来源背景不同的代表性菌株进行了全基因组测序, 旨在探讨其在宿主适应性、碳源利用能力及次级代谢产物合成等方面的潜在功能差异, 进一步为揭示肠道真菌的生态功能提供基础, 也为后续开展比

较基因组与功能验证研究提供依据。

需要注意的是, 本研究中分离获得的部分真菌可能具有多重生态来源。已有研究表明, 多种酵母和丝状真菌可存在于植物花部、花蜜或花粉中, 并通过采食行为进入传粉昆虫的消化道^[70-71]。因此, 部分真菌可能并非典型的肠道共生种群, 而是在宿主取食过程中进入肠道并短暂存留的过渡类群。近年研究亦发现, 一些来源于植物或环境的微生物在传粉昆虫肠道内可实现稳定定殖, 并在营养转化、抗氧化或抗菌防御等方面发挥潜在功能, 这一现象提示传粉昆虫肠道真菌组成不仅受宿主自身因素影响, 还可能与采食植物的种类、季节和地理环境密切相关^[72-73]。未来可进一步结合植物群落调查与微生物共现网络分析, 深入探讨肠道真菌的定殖机制及其与宿主生态行为之间的关系。

总体而言, 本研究强调了肠道真菌作为传粉昆虫共生微生物的重要组成部分, 不仅在群落多样性上具有显著宿主差异, 在功能层面也展现出丰富的生态潜力。尽管昆虫肠道微生物研究长期聚焦于细菌, 真菌的作用较少被探讨, 近年来的研究已逐步揭示其在营养补偿^[74]、环境适应^[75]甚至抗农药反应中的重要作用^[76]。本研究所获得的数据为深入理解肠道真菌在宿主健康维持中的角色奠定了基础, 也为开发真菌益生资源、推动传粉昆虫保护与干预策略提供了新视角。

作者贡献声明

徐子萌: 方案设计、实验操作、初稿写作、数据管理; 郎浩宇: 数据管理、方案设计、稿件润色修改; 伍秋祥: 实验操作; 王小斐: 监督指导、稿件润色修改; 郑浩: 监督指导、经费支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] POTTS SG, IMPERATRIZ-FONSECA V, NGO HT, AIZEN MA, BIESMEIJER JC, BREEZE TD, DICKS LV, GARIBALDI LA, HILL R, SETTELE J, VANBERGEN AJ. Safeguarding pollinators and their values to human well-being[J]. *Nature*, 2016, 540(7632): 220-229.
- [2] KHALIFA SAM, ELSHAFIEY EH, SHETAIA AA, EL-WAHED AAA, ALGETHAMI AF, MUSHARRAF SG, AIAJMI MF, ZHAO C, MASRY SHD, ABDEL-DAIM MM, HALABI MF, KAI GY, AL NAGGAR Y, BISHR M, DIAB MAM, EL-SEEDI HR. Overview of bee pollination and its economic value for crop production[J]. *Insects*, 2021, 12(8): 688.
- [3] STEIN K, COULIBALY D, STENCHLY K, GOETZE D, POREMBSKI S, LINDNER A, KONATÉ S, LINSENMAIR EK. Bee pollination increases yield quantity and quality of cash crops in Burkina Faso, West Africa[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 17691.
- [4] SÁEZ A, AIZEN MA, MEDICI S, VIEL M, VILLALOBOS E, NEGRI P. Bees increase crop yield in an alleged pollinator-independent almond variety[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 3177.
- [5] CAMPBELL JW, BAMMER M, BUSTAMANTE TA, ELLIS JD. The health of commercial *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) colonies after foraging in Florida watermelon and blueberry[J]. *Environmental Entomology*, 2019, 48(5): 1197-1202.
- [6] ZHANG Q, FU LL, CANG T, TANG T, GUO MC, ZHOU BB, ZHU GH, ZHAO MR. Toxicological effect and molecular mechanism of the chiral neonicotinoid dinotefuran in honeybees[J]. *Environmental Science and Technology*, 2022, 56(2): 1104-1112.
- [7] BARON GL, JANSEN VAA, BROWN MJF, RAINE NE. Pesticide reduces bumblebee colony initiation and increases probability of population extinction[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2017, 1(9): 1308-1316.
- [8] NICHOLSON CC, KNAPP J, KILJANEK T, ALBRECHT M, CHAUZAT MP, COSTA C, De la RÚA P, KLEIN AM, MÄND M, POTTS SG, SCHWEIGER O, BOTTERO I, CINI E, de MIRANDA JR, Di PRISCO G, DOMINIK C, HODGE S, KAUNATH V, KNAUER A, LAURENT M, et al. Pesticide use negatively affects bumble bees across European landscapes[J]. *Nature*, 2023, 628(8007): 355-358.
- [9] SOROYE P, NEWBOLD T, KERR J. Climate change contributes to widespread declines among bumble bees across continents[J]. *Science*, 2020, 367(6478): 685-688.
- [10] KAZENEL MR, WRIGHT KW, GRISWOLD T, WHITNEY KD, RUDGERS JA. Heat and desiccation tolerances predict bee abundance under climate change[J]. *Nature*, 2024, 628(8007): 342-348.
- [11] McAFEE A, CHAPMAN A, HIGO H, UNDERWOOD R, MILONE J, FOSTER LJ, GUARNA MM, TARPY DR, PETTIS JS. Vulnerability of honey bee queens to heat-induced loss of fertility[J]. *Nature Sustainability*, 2020, 3(5): 367-376.
- [12] PINDAR A, RAINE NE. Safeguarding pollinators requires specific habitat prescriptions and substantially more land area than suggested by current policy[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 1040.
- [13] NOVOTNY JL, REEHER P, VARVARO M, LYBBERT A, SMITH J, MITCHELL RJ, GOODELL K. Bumble bee species distributions and habitat associations in the Midwestern USA, a region of declining diversity[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2021, 30(3): 865-887.
- [14] KLINE O, JOSHI NK. Mitigating the effects of habitat loss on solitary bees in agricultural ecosystems[J]. *Agriculture*, 2020, 10(4): 115.
- [15] BUDGE GE, SHIRLEY MDF, JONES B, QUILL E, TOMKIES V, FEIL EJ, BROWN MA, HAYNES EG. Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(8): 1588-1597.
- [16] GROSSAR D, KILCHENMANN V, FORSGREN E, CHARRIÈRE JD, GAUTHIER L, CHAPUISAT M, DIETEMANN V. Putative determinants of virulence in *Melissococcus plutonius*, the bacterial agent causing European foulbrood in honey bees[J]. *Virulence*, 2020, 11(1): 554-567.
- [17] DAISLEY BA, PITEK AP, CHMIEL JA, AL KF, CHERNYSHOVA AM, FARAGALLA KM, BURTON JP, THOMPSON GJ, REID G. Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus* larvae infection in honey bees[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(2): 476-491.
- [18] VANENGELSDORP D, EVANS JD, SAEGERMAN C, MULLIN C, HAUBRUGE E, NGUYEN BK, FRAZIER M, FRAZIER J, COX-FOSTER D, CHEN YP, UNDERWOOD R, TARPY DR, PETTIS JS. Colony collapse disorder: a descriptive study[J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6481.
- [19] 陈勃生, 鲁兴萌, 邵勇奇. 鳞翅目昆虫肠道微生物的多样性及其与宿主的相互作用[J]. *昆虫学报*, 2017, 60(6): 710-722.
- CHEN BS, LU XM, SHAO YQ. Diversity of the gut microbiota in lepidopteran insects and their interaction with hosts[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60(6): 710-722 (in Chinese).
- [20] 李晨伊, 周欣, 郑浩. 蜜蜂肠道微生物群落研究进展. *微生物学报*, 2018, 58(6): 1016-1024.
- LI CY, ZHOU X, ZHENG H. Gut microbiota of social honey bees[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 1016-1024 (in Chinese).
- [21] ZHENG H, PERREAU J, POWELL JE, HAN BF, ZHANG ZJ, KWONG WK, TRINGE SG, MORAN NA. Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(51): 25909-25916.
- [22] ZHENG H, STEELE MI, LEONARD SP, MOTTA EVS, MORAN NA. Honey bees as models for gut microbiota research[J]. *Lab Animal*, 2018, 47(11): 317-325.
- [23] RAYMANN K, MORAN NA. The role of the gut

- microbiome in health and disease of adult honey bee workers[J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2018, 26: 97-104.
- [24] ZHENG H, POWELL JE, STEELE MI, DIETRICH C, MORAN NA. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain *via* bacterial metabolism and hormonal signaling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(18): 4775-4780.
- [25] STEFANINI I. Yeast-insect associations: it takes guts[J]. *Yeast*, 2018, 35(4): 315-330.
- [26] SUH SO, McHUGH JV, POLLOCK DD, BLACKWELL M. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts[J]. *Mycological Research*, 2005, 109(3): 261-265.
- [27] HOANG D, KOPP A, CHANDLER JA. Interactions between *Drosophila* and its natural yeast symbionts-is *Saccharomyces cerevisiae* a good model for studying the fly-yeast relationship?[J]. *PeerJ*, 2015, 3: e1116.
- [28] BRUNE A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(3): 168-180.
- [29] CALLEGARI M, CROTTI E, FUSI M, MARASCO R, GONELLA E, de NONI I, ROMANO D, BORIN S, TSIAMIS G, CHERIF A, ALMA A, DAFFONCHIO D. Compartmentalization of bacterial and fungal microbiomes in the gut of adult honeybees[J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2021, 7: 42.
- [30] HAN WS, YE ZY, GU YF, ZHONG YH, GAO JL, ZHAO S, WANG SJ. Gut microbiota composition and gene expression changes induced in the *Apis cerana* exposed to acetamiprid and difenoconazole at environmentally realistic concentrations alone or combined[J]. *Frontiers in Physiology*, 2023, 14: 1174236.
- [31] ROQUE WF, de MOURA JM, SANTOS-SILVA L, Da SILVA GF, de CARVALHO LAL, PINHEIRO DG, WOBETO C, SOARES MA. Fungal community structure in bees: influence of biome and host species[J]. *Symbiosis*, 2024, 94(1): 31-50.
- [32] CUI P, KONG K, YAO Y, HUANG ZD, SHI SP, LIU P, HUANG YC, ABBAS N, YU LS, ZHANG YL. Community composition, bacterial symbionts, antibacterial and antioxidant activities of honeybee-associated fungi[J]. *BMC Microbiology*, 2022, 22(1): 168.
- [33] PALUDO CR, PISHCHANY G, ANDRADE-DOMINGUEZ A, SILVA-JUNIOR EA, MENEZES C, NASCIMENTO FS, CURRIE CR, KOLTER R, CLARDY J, PUPO MT. Microbial community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee metamorphosis[J]. *PLoS One*, 2019, 14(7): e0219696.
- [34] DETRY R, SIMON-DELSON N, BRUNEAU E, DANIEL HM. Specialisation of yeast genera in different phases of bee bread maturation[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(11): 1789.
- [35] NILSSON RH, LARSSON KH, TAYLOR AFS, BENGTSSON-PALME J, JEPPESEN TS, SCHIGEL D, KENNEDY P, PICARD K, GLÖCKNER FO, TEDERSOO L, SAAR I, KÖLJALG U, ABARENKOV K. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D259-D264.
- [36] LI ZY, GUO DZ, WANG C, CHI XP, LIU ZG, WANG Y, WANG HF, GUO XQ, WANG NX, XU BH, GAO Z. Toxic effects of the heavy metal Cd on *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae): oxidative stress, immune disorders and disturbance of gut microbiota[J]. *Science of The Total Environment*, 2024, 912: 169318.
- [37] CERQUEIRA AES, HAMMER TJ, MORAN NA, SANTANA WC, KASUYA MCM, da SILVA CC. Extinction of anciently associated gut bacterial symbionts in a clade of stingless bees[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(9): 2813-2816.
- [38] FERNANDES KE, STANFIELD B, FROST EA, SHANAHAN ER, SUSANTIO D, DONG AZ, TRAN TD, COKCETIN NN, CARTER DA. Low levels of hive stress are associated with decreased honey activity and changes to the gut microbiome of resident honey bees[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(4): e0074223.
- [39] RUTKOWSKI D, LITSEY E, MAALOUF I, VANNETTE RL. Bee-associated fungi mediate effects of fungicides on bumble bees[J]. *Ecological Entomology*, 2022, 47(3): 411-422.
- [40] YAN QL, LI SH, YAN QS, HUO XK, WANG C, WANG XF, SUN Y, ZHAO WY, YU ZL, ZHANG Y, GUO RC, LV QB, HE X, YAO CL, LI ZM, CHEN F, JI QR, ZHANG AQ, JIN H, WANG GY, et al. A genomic compendium of cultivated human gut fungi characterizes the gut mycobiome and its relevance to common diseases[J]. *Cell*, 2024, 187(12): 2969-2989.e24.
- [41] BOLYEN E, RIDEOUT JR, DILLON MR, BOKULICH NA, ABNET CC, AL-GHALITH GA, ALEXANDER H, ALM EJ, ARUMUGAM M, ASNICAR F, BAI Y, BISANZ JE, BITTINGER K, BREJNROD A, BRISLAWN CJ, BROWN CT, CALLAHAN BJ, CARABALLO-RODRÍGUEZ AM, CHASE J, COPE EK, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(8): 852-857.
- [42] ABARENKOV K, NILSSON RH, LARSSON KH, TAYLOR AFS, MAY TW, FRØSLEV TG, PAWLOWSKA J, LINDAHL B, PÖLDMAA K, TRUONG C, VU D, HOSOYA T, NISKANEN T, PIIRMANN T, IVANOV F, ZIRK A, PETERSON M, CHEEKE TE, ISHIGAMI Y, JANSSON AT, et al. The UNITE database for molecular identification and taxonomic communication of fungi and other eukaryotes: sequences, taxa and classifications reconsidered[J]. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52(D1): D791-D797.
- [43] CHEN SF. Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp[J]. *iMeta*, 2023, 2(2): e107.
- [44] PRJIBELSKI A, ANTIPOV D, MELESHKO D, LAPIDUS A, KOROBENNIKOV A. Using SPAdes *de novo* assembler[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*,

- 2020, 70(1): e102.
- [45] MANNI M, BERKELEY MR, SEPPEY M, SIMÃO FA, ZDOBNOV EM. BUSCO update: novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(10): 4647-4654.
- [46] JAIN C, RODRIGUEZ-R LM, PHILLIPPY AM, KONSTANTINIDIS KT, ALURU S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 5114.
- [47] PALMER JM, STAJICH JE. Funannotate v1.8.1: Eukaryotic genome annotation[Software]. Available from <https://zenodo.org/records/4054262>
- [48] BAEK M, DiMAIO F, ANISHCHENKO I, DAUPARAS J, OVCHINNIKOV S, LEE GR, WANG J, CONG Q, KINCH LN, SCHAEFFER RD, MILLÁN C, PARK H, ADAMS C, GLASSMAN CR, DeGIOVANNI A, PEREIRA JH, RODRIGUES AV, van DIJK AA, EBRECHT AC, OPPERMAN DJ, et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network[J]. *Science*, 2021, 373(6557): 871-876.
- [49] CANTALAPIEDRA CP, HERNÁNDEZ-PLAZA A, LETUNIC I, BORK P, HUERTA-CEPAS J. eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(12): 5825-5829.
- [50] BLIN K, SHAW S, AUGUSTIJN HE, REITZ ZL, BIERMANN F, ALANJARY M, FETTER A, TERLOUW BR, METCALF WW, HELFRICH EJN, van WEZEL GP, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(W1): W46-W50.
- [51] LANG HY, LIU YW, DUAN HJ, ZHANG WH, HU XS, ZHENG H. Identification of peptides from honeybee gut symbionts as potential antimicrobial agents against *Melissococcus plutonius*[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 7650.
- [52] TAFESH-EDWARDS G, ELEFThERIANOS I. The role of *Drosophila* microbiota in gut homeostasis and immunity[J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2208503.
- [53] SANTANA RH, CATÃO ECP, LOPES FAC, CONSTANTINO R, BARRETO CC, KRÜGER RH. The gut microbiota of workers of the litter-feeding termite *Syntermes wheeleri* (Termitidae: Syntermitinae): archaeal, bacterial, and fungal communities[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 70(2): 545-556.
- [54] PALANCA L, GASKETT AC, GÜNTHER CS, NEWCOMB RD, GODDARD MR. Quantifying variation in the ability of yeasts to attract *Drosophila melanogaster*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75332.
- [55] YU WS, WU YM, LI DC. Oxidative cleavage of cellulose by fungi in the termite gut[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 284: 138222.
- [56] ENGEL P, MORAN NA. The gut microbiota of insects: diversity in structure and function[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(5): 699-735.
- [57] DOUGLAS AE. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms[J]. *Annual Review of Entomology*, 2015, 60: 17-34.
- [58] NARANJO-ORTIZ MA, GABALDÓN T. Fungal evolution: cellular, genomic and metabolic complexity[J]. *Biological Reviews*, 2020, 95(5): 1198-1232.
- [59] LI JJ, CAO CJ, JIANG YT, HUANG QH, SHEN YL, NI JF. A novel digestive GH16 β -1,3(4)-glucanase from the fungus-growing termite *Macrotermes barneyi*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 192(4): 1284-1297.
- [60] RENAUD S, DUSSUTOUR A, DABOUSSI F, POMPON D. Characterization of chitinases from the GH18 gene family in the myxomycete *Physarum polycephalum*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2023, 1867(6): 130343.
- [61] SOLANKI V, KRÜGER K, CRAWFORD CJ, PARDO-VARGAS A, DANGLAD-FLORES J, Le MAI H, KLASSEN L, ABBOTT DW, SEEBERGER PH, AMANN RI, TEELING H, HEHEMANN JH. Glycoside hydrolase from the GH76 family indicates that marine *Salegentibacter* sp. Hel_I₆ consumes alpha-mannan from fungi[J]. *The ISME Journal*, 2022, 16(7): 1818-1830.
- [62] LAMPUGNANI ER, FORD K, HO YY, van de MEENE A, LAHNSTEIN J, TAN HT, BURTON RA, FINCHER GB, SHAFEE T, BACIC A, ZIMMER J, XING XH, BULONE V, DOBLIN MS, ROBERTS EM. Glycosyl transferase GT2 genes mediate the biosynthesis of an unusual (1, 3; 1, 4) - β -glucan exopolysaccharide in the bacterium *Sarcina ventriculi*[J]. *Molecular Microbiology*, 2024, 121(6): 1245-1261.
- [63] ONOUE T, TANAKA Y, HAGIWARA D, EKINO K, WATANABE A, OHTA K, KAMEI K, SHIBATA N, GOTO M, OKA T. Identification of two mannosyltransferases contributing to biosynthesis of the fungal-type galactomannan α -core-mannan structure in *Aspergillus fumigatus*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 16918.
- [64] YANG Y, WANG J, HAN FC, ZHANG JT, GAO M, ZHAO YX, CHEN YC, WANG YD. Characterization of UGT71, a major glycosyltransferase family for triterpenoids, flavonoids and phytohormones-biosynthetic in plants[J]. *Forestry Research*, 2024, 4: e035.
- [65] BUTKOVICH LV, VINING OB, O' MALLEY MA. New approaches to secondary metabolite discovery from anaerobic gut microbes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2025, 109(1): 12.
- [66] SÜSSMUTH RD, MAINZ A. Nonribosomal peptide synthesis-principles and prospects[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(14): 3770-3821.
- [67] KIM D, KIM S, KWON Y, KIM Y, PARK H, KWAK K, LEE H, LEE JH, JANG KM, KIM D, LEE SH, KANG LW. Structural insights for β -lactam antibiotics[J]. *Biomolecules & Therapeutics*, 2023, 31(2): 141-147.

- [68] IACOVELLI R, BOVENBERG RAL, DRIESSEN AJM. Nonribosomal peptide synthetases and their biotechnological potential in *Penicillium rubens*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2021, 48(7/8): kuab045.
- [69] LOFGREN LA, NGUYEN NH, VILGALYS R, RUYTINX J, LIAO HL, BRANCO S, KUO AL, LaBUTTI K, LIPZEN A, ANDREOPOULOS W, PANGILINAN J, RILEY R, HUNDLEY H, NA H, BARRY K, GRIGORIEV IV, STAJICH JE, KENNEDY PG. Comparative genomics reveals dynamic genome evolution in host specialist ectomycorrhizal fungi[J]. New Phytologist, 2021, 230(2): 774-792.
- [70] POZO MI, MARIËN T, VAN KEMENADE G, WÄCKERS F, JACQUEMYN H. Effects of pollen and nectar inoculation by yeasts, bacteria or both on bumblebee colony development[J]. Oecologia, 2021, 195(3): 689-703.
- [71] JACQUEMYN H, POZO MI, ÁLVAREZ-PÉREZ S, LIEVENS B, FUKAMI T. Yeast-nectar interactions: metacommunities and effects on pollinators[J]. Current Opinion in Insect Science, 2021, 44: 35-40.
- [72] DHARAMPAL PS, HETHERINGTON MC, STEFFAN SA. Microbes make the meal: oligolectic bees require microbes within their host pollen to thrive[J]. Ecological Entomology, 2020, 45(6): 1418-1427.
- [73] ZHANG YX, ZHANG SK, XU LT. The pivotal roles of gut microbiota in insect plant interactions for sustainable pest management[J]. npj Biofilms and Microbiomes, 2023, 9(1): 66.
- [74] FIERS WD, LEONARDI I, ILIEV ID. From birth and throughout life: fungal microbiota in nutrition and metabolic health[J]. Annual Review of Nutrition, 2020, 40: 323-343.
- [75] MIMS TS, AL ABDALLAH Q, STEWART JD, WATTS SP, WHITE CT, ROUSSELLE TV, GOSAIN A, BAJWA A, HAN JC, WILLIS KA, PIERRE JF. The gut mycobiome of healthy mice is shaped by the environment and correlates with metabolic outcomes in response to diet[J]. Communications Biology, 2021, 4: 281.
- [76] AL NAGGAR Y, WUBET T. Chronic exposure to pesticides disrupts the bacterial and fungal co-existence and the cross-kingdom network characteristics of honey bee gut microbiome[J]. Science of The Total Environment, 2024, 906: 167530.