

## 中华蜜蜂蜂粮细菌与粉源植物相关性分析\*

阮雪<sup>1,2</sup>, 张可<sup>1,2,3</sup>, 邓飞<sup>4</sup>, 陈林杰<sup>1,2</sup>, 龙金桂<sup>1,2</sup>, 曾繁清<sup>1,2</sup>, 黄敦元<sup>1,2</sup>

- (1. 重庆师范大学 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;  
2. 重庆师范大学 昆虫与分子生物学研究所 媒介生物控制和利用重庆市重点实验室, 重庆 401331;  
3. 沈阳市一二六中学, 沈阳 110000; 4. 重庆四面山森林资源管理局, 重庆 江津 402260)

**摘要:**蜂粮是蜜蜂采集植物花粉储存于巢脾巢房后,经微生物作用转化而成的可长期贮存和易于消化的幼虫食物。探究中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)蜂粮细菌多样性与粉源植物之间的相关性,有助于进一步揭示自然界中“植物-传粉者-微生物”三者互作机制。通过高通量测序技术对重庆四面山地区不同海拔(500、700和900 m)及不同季节(5、7和9月)采集的中华蜜蜂蜂粮样本进行了粉源植物鉴定与细菌多样性分析。结果显示:粉源植物共涉及26目44科80属,其中出现频率最高的属为栗属(*Castanea*)、槲木属(*Aralia*)和悬钩子属(*Rubus*)。蜂粮细菌群落的操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)分布呈现明显的异质性,蜜蜂乳杆菌属(*Apilactobacillus*)在群落中占据绝对优势。Beta多样性分析表明,粉源植物在不同季节( $R^2=0.6808, p=0.0010$ )和海拔梯度( $R^2=0.1945, p=0.0030$ )上均具有统计学意义上的差异;蜂粮细菌群落在不同季节间具有统计学意义上的差异( $R^2=0.5970, p=0.0010$ ),但在海拔梯度方面不具有统计学意义上的差异( $R^2=0.0810, p=0.0660$ )。基于OTU水平的相关性分析显示,粉源植物和蜂粮细菌群落之间整体呈统计学意义上的正相关( $N=27, R=0.1991, p=0.0040$ ),且在不同季节内均保持统计学意义上的正相关(5月: $N=9, R=0.3236, p=0.0486$ ;7月: $N=9, R=0.3580, p=0.0253$ ;9月: $N=9, R=0.3390, p=0.0430$ )。在属水平上,部分粉源植物与特定细菌类群呈统计学意义上的正相关( $p<0.05$ ),如蜜蜂乳杆菌属(*Apilactobacillus*)与玉蜀黍属(*Zea*)呈强正相关( $r=0.800, p<0.05$ )。结果表明重庆四面山地区中华蜜蜂粉源植物种类明显影响了蜂粮中细菌群落的结构与组成,研究结果可为该地区中华蜜蜂种群保护、蜂粮发酵优势细菌种群的鉴定和人工蜂粮的研制提供科学依据,并为揭示“植物-传粉者-微生物”三者间互作关系奠定基础。

**关键词:**中华蜜蜂;粉源植物;蜂粮细菌;相关性分析;高通量测序

中图分类号:Q968

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2026)01-0115-10

蜜蜂通过采集粉源植物的花粉与花蜜,为种群提供蛋白质、脂肪、维生素和矿物元素等必需营养物质<sup>[1-5]</sup>。花粉是蜂群唯一的蛋白质来源,对幼虫孵化及工蜂腺体的发育至关重要。粉源植物主要指能为蜜蜂提供大量花粉并常伴少量花蜜的植物类群,它们是蜂群食料的主要来源,亦是养蜂业可持续发展的物质基础<sup>[6-7]</sup>。蜂粮是蜜蜂将采集的花粉团储存于巢房后,经咀嚼、蜜液湿润、压实并封盖,然后在微生物作用下发酵而成的花粉酿制品<sup>[8]</sup>。蜂粮营养价值较高,为蜂群繁殖阶段的关键蛋白质饲料<sup>[9]</sup>。蜂粮中的花粉来源具有多样性,主要来自粉源植物,包括有粉少蜜和有粉有蜜的植物,亦可能混入由花蜜或蜂蜜携带的其他植物花粉<sup>[10-11]</sup>。同样地,蜂粮中微生物的来源也具有多途径性,包括花粉表面附着的花朵微生物、花蜜或蜂蜜中的细菌以及蜜蜂采集与酿造过程中引入的蜂体及巢内环境微生物<sup>[12-14]</sup>。尽管来源复杂,蜂粮样本中的花粉与细菌仍主要源自粉源植物。作为经蜜蜂加工和长期发酵的终产物,蜂粮中的花粉组成与细菌群落并非随机混合,而是反映了蜜蜂的采集偏好以及微生物在巢内环境下的定植与互作关系。

粉源植物与蜜蜂及蜂巢内的微生物群落之间存在紧密的互作关系。花朵作为微生物传播的关键枢纽,蜜蜂在访花过程中既可能将自身携带的细菌传入花部,亦可将花朵附生的微生物带回蜂巢<sup>[14]</sup>。这些微生物通过蜂粮

\* 收稿日期:2025-07-11 修回日期:2025-12-30 网络出版时间:2026-03-26T15:56

资助项目:重庆市自然科学基金面上项目(No. CSTB2022NSCQ-MSX0985);国家自然科学基金面上项目(No. 31970484);重庆市现代农业产业技术体系(No. CQMAITS202316)

第一作者简介:阮雪,女,研究方向为传粉生态学,E-mail:2023110513014@stu.cqnu.edu.cn;通信作者简介:黄敦元,男,教授,博士生导师,E-mail:20170054@cqnu.edu.cn

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/50.1165.N.20260326.1050.002

喂养和社会行为在蜂群内传播,并在促进花粉降解、提高营养利用率、解毒、增强宿主健康等方面具有重要功能<sup>[13-14]</sup>。同时,花朵微生物还能改变花蜜的化学成分与挥发性物质的组成,进而影响植物的授粉成功率<sup>[15]</sup>。已有研究表明,蜜蜂采集的花粉组成与它携带的细菌群落之间未必始终存在明显的关联,但某些特定花粉类型可能与特定优势细菌的丰度明显相关,提示该类植物可能成为这些细菌的贮存库<sup>[16]</sup>。例如,熊蜂(*Bombus* spp.)采集的花粉细菌多样性与植物多样性呈正相关,且部分细菌属与特定花粉类型的丰度密切相关<sup>[17]</sup>。此外,蜂花粉与蜂粮中常可检出蜜蜂核心肠道菌群<sup>[18]</sup>,这表明蜂粮作为一个微生态系统,是研究“植物-蜜蜂-微生物”三者互作的理想载体。

中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)是中国本土重要的传粉昆虫之一,具有体型小、耐寒性强、善于利用零星蜜源等特点<sup>[19]</sup>,在复杂山地生态系统及本土植物传粉中较意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)更具优势<sup>[18]</sup>。然而,受全球气候变化<sup>[20]</sup>、外来蜂种竞争<sup>[21]</sup>、生境质量下降<sup>[22]</sup>、病原侵扰<sup>[23]</sup>等多重因素影响,该蜂种的种群数量与分布范围正急剧缩减<sup>[24]</sup>。为深入解析中华蜜蜂蜂粮的粉源植物组成及它们与细菌群落的相关性,可采用 DNA 宏条形码技术对粉源植物进行鉴定。该技术具有鉴定快速、分类分辨率高等优势,已广泛应用于蜜蜂粉源植物组成分析<sup>[25]</sup>。相较于传统蜂孢粉学方法,该技术不依赖高水平的分类学专业知识,能高效处理批量样本,并对部分科属植物具有更高的分辨率<sup>[26]</sup>。例如,基于 ITS2 区域的宏条形码已成功应用于意大利蜜蜂与熊蜂的粉源植物研究中,并证实该技术在揭示蜜蜂采食偏好方面的有效性<sup>[10]</sup>。同时,结合 16S rRNA 基因高通量测序技术,可系统解析蜂粮中细菌的组成与多样性特征<sup>[27]</sup>。

基于上述研究背景,以重庆四面山不同海拔与季节条件下采集的中华蜜蜂蜂粮为研究样本,整合 DNA 宏条形码与 16S rRNA 基因高通量测序技术,结合多元统计分析方法,旨在探究以下科学问题:中华蜜蜂蜂粮中粉源植物组成及细菌群落结构在不同海拔和季节间是否存在明显差异?粉源植物群落与蜂粮细菌群落之间是否具有明显的相关关系?研究结果有望从“植物-传粉者-微生物”三者互作视角揭示中华蜜蜂对当地粉源资源的利用特征及该蜂种蜂粮共生微生物的组成,并为筛选蜂粮发酵优势菌种与开发人工蜂粮产品提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 蜂粮样品采集

蜂粮样品采集工作于重庆四面山市级自然保护区开展。依据海拔梯度设置了 500、700 和 900 m 共 3 个采样带,并于 2020 年 5、7 和 9 月各进行 1 次样品采集。在每个海拔采样带,综合考虑地形通达性和原生植被分布特征,各设置 1 个独立采样点。采样点之间的直线距离均大于 2 km,超过中华蜜蜂通常的采集活动半径(1~1.5 km),从而有效确保各采样点内蜂群的粉源采集范围互不重叠,以反映不同海拔特有的粉源植物谱。

为获取蜜蜂近期采集的蜂粮,在采样前 2 日于蜂群长势相近的蜂箱中随机选取未贮粉的巢脾区域(面积约 25 cm<sup>2</sup>)进行标记,供工蜂在随后 48 h 内贮存新采集的花粉。采样时驱离蜜蜂,为避免后续植物 DNA 与细菌 DNA 分析间的潜在交叉污染并确保 2 类样品来源的一致性,使用 2 把无菌镊子从同一标记区域的不同巢房中分别采集蜂粮。具体操作如下:从标记区域内随机选取 20 个巢房,先用第 1 把无菌镊子取其中 10 个巢房内的全部蜂粮,混合后置于一支 5 mL 无菌离心管中,作为粉源植物分析样品;随即用第 2 把无菌镊子采集剩余 10 个巢房内的全部蜂粮,混合后转入另一支 5 mL 无菌离心管,作为细菌群落分析样品。该流程保证每个蜂群每次采样获得 1 组“植物-细菌”配对样品。所有样品现场液氮速冻,随后转至 -80 °C 超低温冰箱中保存。

需采集的蜂粮样品涉及 3 个海拔梯度、3 个季节和 3 个生物学重复,且由于每个蜂粮样品需分开采集 2 份分别用于粉源植物分析与细菌群落分析,因此最终获得粉源植物分析样品和细菌群落分析样品共计 54 份,两者各半。样品采集信息及编号见表 1。

### 1.2 DNA 提取

蜂粮样本自 -80 °C 超低温冰箱中取出后,置于预冷研钵中,加入液氮迅速研磨至均匀粉末状。采用 E. Z. N. A.® 土壤 DNA 试剂盒(美国 Omega Bio-tek 公司生产)分别对蜂粮样本中的粉源植物基因组 DNA 进行提取,操作严格遵循试剂盒说明书流程。提取完成后,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 完整性进行检测。蜂粮细菌基因组 DNA 提取方法与上述步骤一致,最后利用 NanoDrop 2000 型微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司生产)测定 DNA 浓度与纯度,并以 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值作为纯度评价指标。所有样本均设置 3 次重复实验。

表 1 中华蜜蜂蜂粮粉源植物及细菌样本采集信息

Tab. 1 The collection information about bee bread of *A. cerana cerana*

样本类型	样本	纬度	经度	海拔/m	采集日期
粉源植物	PMay_L	北纬 28.78°	东经 106.37°	500	2020-05-10
	PMay_M	北纬 28.74°	东经 106.38°	700	2020-05-10
	PMay_H	北纬 28.64°	东经 106.33°	900	2020-05-10
	PJul_L	北纬 28.78°	东经 106.37°	500	2020-07-09
	PJul_M	北纬 28.74°	东经 106.38°	700	2020-07-09
	PJul_H	北纬 28.64°	东经 106.33°	900	2020-07-09
	PSep_L	北纬 28.78°	东经 106.37°	500	2020-09-02
	PSep_M	北纬 28.74°	东经 106.38°	700	2020-09-02
	PSep_H	北纬 28.64°	东经 106.33°	900	2020-09-02
蜂粮细菌	BMay_L	北纬 28.78	东经 106.37°	500	2020-05-10
	BMay_M	北纬 28.74°	东经 106.38°	700	2020-05-10
	BMay_H	北纬 28.64°	东经 106.33°	900	2020-05-10
	BJul_L	北纬 28.78°	东经 106.37°	500	2020-07-09
	BJul_M	北纬 28.74°	东经 106.38°	700	2020-07-09
	BJul_H	北纬 28.64°	东经 106.33°	900	2020-07-09
	BSep_L	北纬 28.78°	东经 106.37°	500	2020-09-02
	BSep_M	北纬 28.74°	东经 106.38°	700	2020-09-02
	BSep_H	北纬 28.64°	东经 106.33°	900	2020-09-02

注: May 代表 5 月, Jul 代表 7 月, Sep 代表 9 月, L 代表 500 m, M 代表 700 m, H 代表 900 m, P 表示粉源植物, B 表示蜂粮细菌, 下同。

### 1.3 PCR 扩增和测序

#### 1.3.1 蜂粮粉源植物 DNA

为鉴定蜂粮中的粉源植物组成, 选取 ITS2 区作为分子标记进行扩增。所用引物序列如下: ITSS2F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'; ITS4R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 反应在 ABI GeneAmp<sup>®</sup> 9700 型 PCR 仪上进行, 反应体系总体积 20  $\mu$ L, 包含: 2  $\mu$ L DNA 模板 (5 ng  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>)、4  $\mu$ L FastPfu 缓冲液、2  $\mu$ L dNTPs (2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)、正反向引物 (5  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 各 0.8  $\mu$ L、4  $\mu$ L FastPfu 聚合酶, 剩余体积以 ddH<sub>2</sub>O 补足。扩增程序设置为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 随后进行 29 个循环的 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s、55  $^{\circ}$ C 退火 30 s、72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s; 循环结束后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 最后于 10  $^{\circ}$ C 恒温保存。

PCR 产物经质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 切取目的条带, 使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒 (美国 Axygen Biosciences 公司生产) 进行纯化, 纯化产物经 QuantiFluor<sup>™</sup>-ST 蓝荧光定量系统 (美国 Promega 公司生产) 进行检测合格后。送样上海凌恩生物科技有限公司进行后续克隆及 Illumina PE250 平台双端测序。

#### 1.3.2 蜂粮细菌 DNA

为分析蜂粮中细菌群落结构, 选用针对 16S rRNA 基因 V3-V4 区的通用引物进行扩增: 341F: 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3'; 806R: 5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'。PCR 扩增在 ABI GeneAmp<sup>®</sup> 9700 型 PCR 仪上进行, 反应体系、扩增程序、产物检测、纯化及测序步骤均与 1.3.1 节所述方法一致。

### 1.4 数据处理

#### 1.4.1 粉源植物数据的过滤与注释

为准确鉴定粉源植物, 对测序获得的 ITS2 序列进行如下筛选: 1) 所用引物具有一定通用性, 可能扩增出非

目标真菌序列,故将所有注释为真菌的操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)予以剔除;2) 鉴于 DNA 宏条形码中多拷贝基因的 PCR 扩增可能引起扩增子丰度偏差,设定 OTU 总丰度阈值为 10,将总丰度低于 10 的 OTU 视为假阳性并进行剔除<sup>[28]</sup>。在进行 Venn 分析时,进一步将物种序列平均数即 3 个重复的物种序列总数的算术平均值低于 10 的物种过滤掉。

#### 1.4.2 细菌序列数据的处理与筛选

细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区测序数据的处理流程如下:使用 FLASH v1.2.11 软件对双端测序读段进行拼接(重叠长度不低于 10 bp,错配率不高于 0.2)<sup>[29]</sup>;利用 Trimmomatic 工具过滤读段末端质量值低于 20 的碱基,并对任一 10 bp 滑动窗口内平均质量值低于 20 的区段进行修剪(从该窗口起始位置开始)。经质控后,剔除长度小于 50 bp 的读段<sup>[30]</sup>;使用 Usearch v10.0 软件(<http://drive5.com/uparse/>)通过从头组装与参考序列比对相结合的方式去除嵌合,并生成非冗余单序列。基于 97% 相似性对非冗余序列进行 OTU 聚类,获取 OTU 代表序列<sup>[26]</sup>。随后,采用基于 Silva 数据库(Release 138.1, <http://www.arb-silva.de>)的 RDP 分类器 2.2 版贝叶斯算法对 OTU 代表序列进行物种注释。注释结果中“细菌\_norank”表示该分类单元在 Silva 数据库的分类体系中尚无明确科学名称,因此标记为未分类。

为进一步聚焦于细菌群落,按以下方式筛选 OTU:由于所有引物具有一定的广泛特异性,注释为线粒体和叶绿体来源的 OTU 均被剔除。初步分析显示,各样本中多数 OTU 及较低分类阶元上的类群相对丰度极低。因此设定相对丰度阈值为 0.1%,仅保留中华蜜蜂蜂粮样本中属水平(最低注释水平)相对丰度不低于 0.1% 的类群进行后续分析。

#### 1.4.3 数据分析

所有基础数据处理与统计分析在 Excel 2016 软件中完成,组间差异采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析。基于 OTUs,使用 R 软件计算样本间的 Bray-Curtis 距离,并通过 factoextra 包绘制层次聚类图。Beta 多样性分析采用非度量多维尺度分析(NMDS),基于 vegan 包<sup>[31]</sup>实现,并辅以相似性分析(ANOSIM)检验组间差异是否具有统计学意义。当  $p < 0.05$  时,有关统计学检验结果具有统计学意义。相关结果利用 ggplot2 包<sup>[32]</sup>进行可视化。此外,采用 Cytoscape 软件进行物种相关性的网络可视化构建。

## 2 结果与分析

### 2.1 中华蜜蜂粉源植物与蜂粮细菌群落测序结果分析

对中华蜜蜂蜂粮样本进行高通量测序,经质量优化与阈值筛选后,共获得 1 149 673 条有效 ITS 序列,平均长度为  $(342.66 \pm 6.39)$  bp,按 97% 相似度聚类得到 1 016 个 OTU;对中华蜜蜂蜂粮进行细菌序列分析,经质量优化和阈值筛选后,共获得 724 865 条有效 16S rRNA 序列,平均序列长度为  $(415.98 \pm 4.06)$  bp,在相同相似度水平下聚类得到 20 002 个 OTU。

使用 RDP 分类器对 OTU 代表序列进行物种注释,结果显示:粉源植物来源的序列共注释到 26 目 44 科 80 属;细菌来源的序列注释结果涵盖 486 目 808 科 1 754 属(表 2)。

### 2.2 中华蜜蜂优势粉源植物属及核心细菌属分析

中华蜜蜂粉源植物的鉴定共涉及 80 个属,各样本基于 ITS 序列鉴定得到的粉源植物属数量平均为 14 个。其中,PMay\_H 样本的粉源植物属数量最低,为  $(10 \pm 0.8)$ ,而 P Sep\_H 样本的粉源植物属数量最高,为  $(21 \pm 2.6)$ 。通过频率统计,筛选出在 27 个样本中出现频率较高的 10 个优势粉源植物属,依次为栗属(*Castanea*)、榉木属(*Aralia*)、悬钩子属(*Rubus*)、蒿属(*Artemisia*)、芸薹属(*Brassica*)、柯属(*Lithocarpus*)、盐麸木属(*Rhus*)、野桐属(*Mallotus*)、杜英属(*Elaeocarpus*)和女贞属(*Ligustrum*),它们在样本中的出现频率分别为 24、20、18、15、15、15、15、14、12 和 12 次。值得注意的是,蒿属和盐麸木属仅于 7 和 9 月在中华蜜蜂粉源植物中被检出(图 1a)。

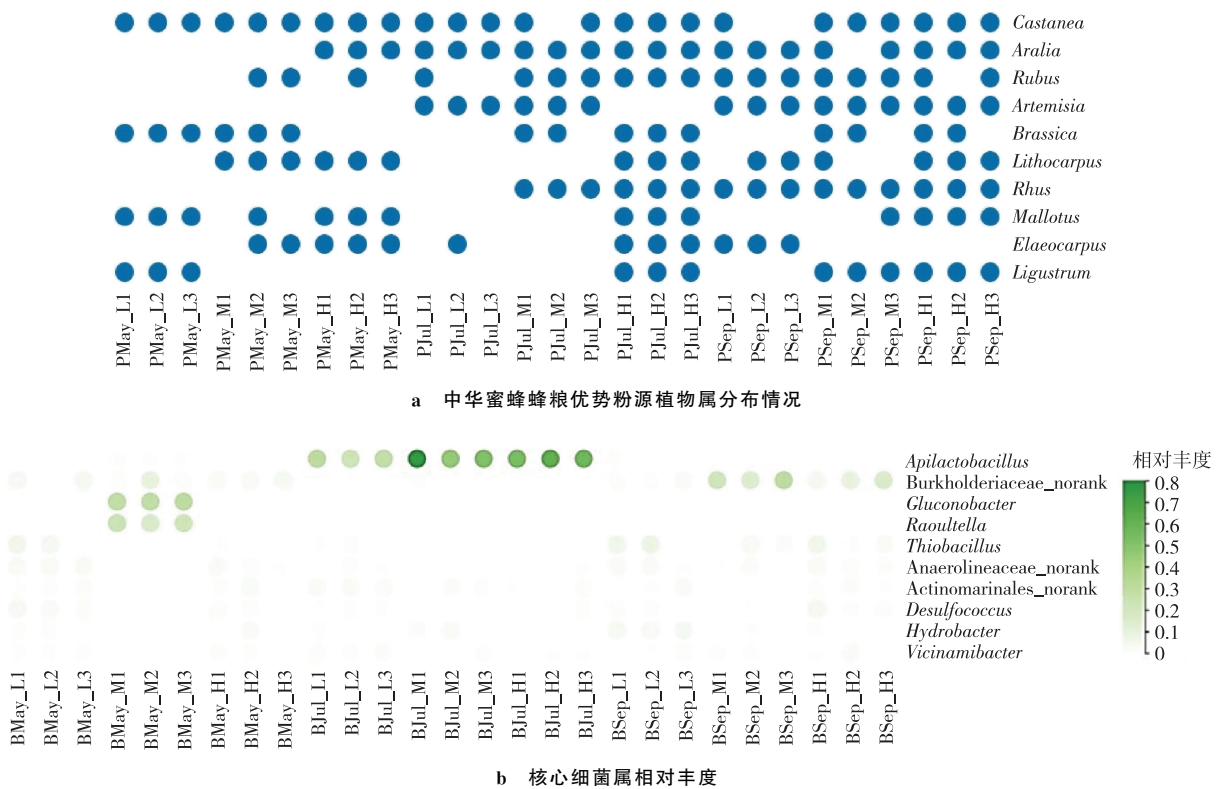
在蜂粮细菌群落方面,中华蜜蜂蜂粮细菌群落 OTU 分布表现出明显异质性。群落结构分析显示,它们的 OTU 组成复杂但多样性较低,具体表现为:全部 OTU 中仅有 1 个相对丰度超过 10% 的优势 OTU(占 15.96%),且丰度高于 1% 的 OTU 仅有 4 个。经 16S rRNA 基因序列比对,该优势 OTU 与蜜蜂乳杆菌属(*Apilactobacillus*)典型菌株的序列相似性高达 99%,表明该属细菌在蜂粮细菌群落中占据绝对优势地位。其余 OTU 的相对丰度均低于 1%(图 1b)。

表 2 中华蜜蜂粉源植物及蜂粮细菌不同分类水平物种数量统计

Tab. 2 Statistics of species numbers about *A. cerana cerana* nectar plants and bee bread bacteria at different taxonomic levels

样本	目数	科数	属数
PMay_L	7	9	11
PMay_M	9	10	13
PMay_H	6	6	10
PJul_L	12	13	15
PJul_M	11	13	14
PJul_H	14	15	21
PSep_L	7	7	11
PSep_M	11	13	17
PSep_H	13	16	21
BMay_L	301	440	713
BMay_M	263	397	645
BMay_H	300	463	841
BJul_L	294	441	743
BJul_M	203	311	507
BJul_H	288	442	743
BSep_L	302	442	720
BSep_M	274	400	640
BSep_H	310	445	697

注:表中各样本数据为平均值。



注:图 a 中蓝色圆圈出现代表此种粉源植物属在样本中存在。

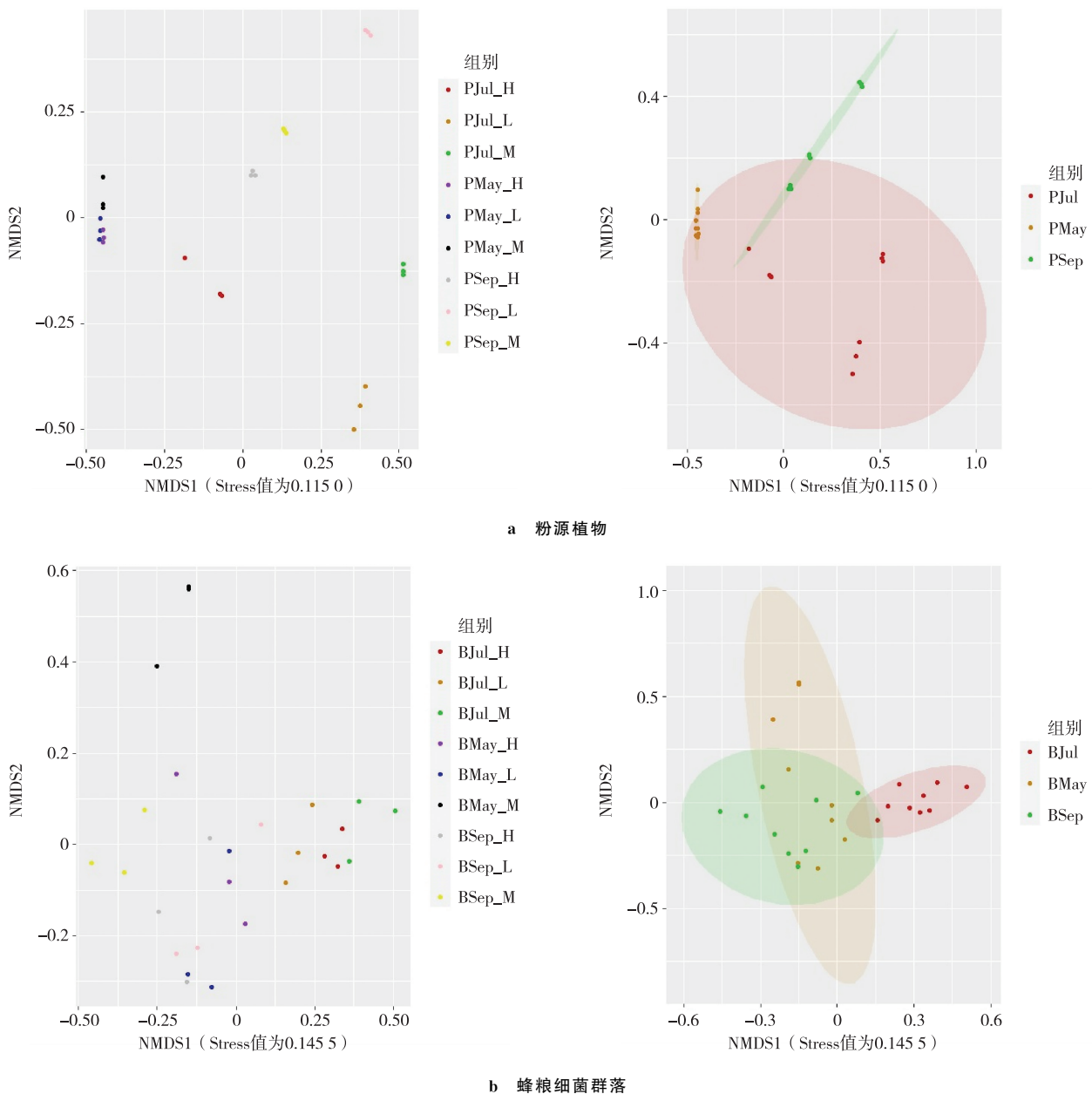
图 1 中华蜜蜂蜂粮优势粉源植物属分布情况及核心细菌属相对丰度

Fig. 1 Distribution of dominant pollen plant genera and relative abundance of core bacterial genera in the diet of *A. cerana cerana*

### 2.3 中华蜜蜂粉源植物及蜂粮细菌群落多样性分析

基于 NMDS 排序分析,中华蜜蜂粉源植物的 Beta 多样性在不同季节间呈现明显差异性(图 2a),ANOSIM 分析进一步支持组间具有统计学意义上的差异( $R^2=0.6808, p=0.001$ )。此外,粉源植物的 Beta 多样性海拔梯度亦具有统计学意义上的差异( $R^2=0.1945, p=0.003$ )。进一步两两比较显示,500 m(L)与 700 m(M)海拔之间的粉源植物组成具有统计学意义上的差异( $R^2=0.2027, p=0.036$ ),而 500 m(L)与 900 m(H)之间( $R^2=0.1457, p=0.135$ )与 700 m(M)与 900 m(H)之间( $R^2=0.1217, p=0.303$ )的差异不具有统计学意义。

另一方面,中华蜜蜂蜂粮细菌群落的 Beta 多样性亦随季节变化而明显不同(图 2b),ANOSIM 分析结果同样证实了组间具有统计学意义上的差异( $R^2=0.597, p=0.001$ )。然而,细菌群落各海拔梯度上的差异不具有统计学意义( $R^2=0.081, p=0.066$ ),因此后续未对各海拔梯度上的蜂粮细菌群落与粉源植物进行相关性分析。



注:stress 值小于 0.2 即表示样本间组成相似性的二维投影失真较小,结果可接受。说明分析结果具有一定解释意义,可用于初步分析。

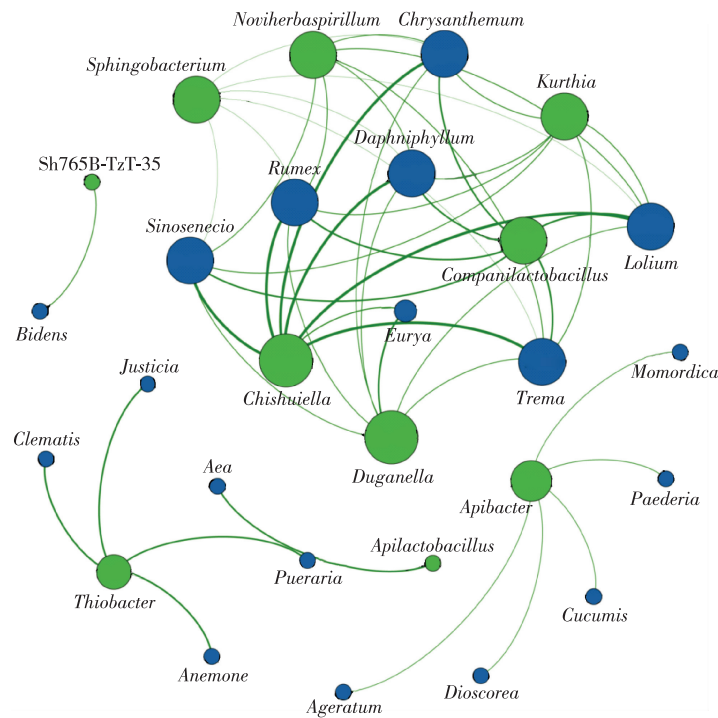
图 2 中华蜜蜂蜂粮粉源植物和细菌群落 Beta 多样性分析(非度量多维尺度法)

Fig. 2 Beta diversity analysis of pollen plant and bacterial community in bee bread of *A. cerana cerana* (Non-metric multidimensional scaling)

### 2.4 中华蜜蜂粉源植物及蜂粮细菌群落相关性分析

基于 OTU 水平,对粉源植物和蜂粮细菌群落的 Bray-curtis 距离进行 Mantel 检验,结果显示二者群落结构呈统计学意义上的正相关( $N=27, R=0.1991, p=0.0040$ )。进一步分季节(5、7 和 9 月)进行 Mantel 检验,结果表明在这 3 个时期,粉源植物与蜂粮细菌群落均存在统计学意义上的正相关(5 月: $N=9, R=0.3236, p=0.0486$ ;7 月: $N=9, R=0.3580, p=0.0253$ ;9 月: $N=9, R=0.3390, p=0.0430$ )。综上所述,中华蜜蜂粉源植物组成与蜂粮中细菌群落结构具有明显的关联性。

通过 Spearman 相关分析进一步探究粉源植物属与蜂粮细菌属之间的相关性,结果发现部分粉源植物属与特定蜂粮细菌属存在明显的关联性(图 3)。具体表现为:蜜蜂乳杆菌属与玉蜀黍属(*Zea*)呈统计学意义上的相关( $p<0.05$ ),*Apibacter* 属与鸡矢藤属(*Paederia*)、黄瓜属(*Cucumis*)、薯蓣属(*Dioscorea*)、苦瓜属(*Momordica*)及藿香蓟属(*Ageratum*)呈统计学意义上的相关( $p<0.05$ ),*Thiobacter* 属与爵床属(*Justicia*)、银莲花属(*Anemone*)、葛属(*Pueraria*)及铁线莲属(*Clematis*)呈统计学意义上的相关( $p<0.05$ ),杜榭氏菌属(*Duganella*)和 *Chishuiella* 与柃属(*Eurya*)呈统计学意义上的相关( $p<0.05$ )。



注:蓝色圆圈为粉源植物属,绿色圆圈为细菌属。

图 3 中华蜜蜂粉源植物属和蜂粮细菌属水平之间正相关的共现网络

Fig. 3 Co-occurrence network of positive correlations between pollen plant genus and bacterial genus in bee bread of *A. cerana cerana*

## 3 讨论

花是传粉昆虫与植物之间微生物交流的重要媒介<sup>[33]</sup>,蜜蜂与花朵共享部分微生物群落<sup>[34]</sup>。访花昆虫可将细菌引入花蜜微生物群落<sup>[35]</sup>,这些微生物进而影响花蜜的化学性质、挥发性物质释放并对传粉者的吸引力产生一定的影响<sup>[34]</sup>。花粉与花蜜作为传粉昆虫幼虫的食物,其携带的微生物同样对蜂群发育具有潜在影响<sup>[36]</sup>。花基质上的微生物可以直接或通过动物媒介影响授粉和植物适应性<sup>[37]</sup>。

McFrederick 等人<sup>[33]</sup>发现广访花性野生蜂(*Ceratina calcarata*)的花粉和细菌群落间无明显相关关系,分析认为这可能源于该蜂访花的粉源植物属的多样性较高(平均 34 属,范围 16~61 属),导致蜂粮细菌来源复杂,整体多样性较高,从而掩盖了群落间的关联。相比之下,重庆四面山地区的中华蜜蜂访花植物属数量较少(平均 14 属,范围 10~21 属)。在此条件下,中华蜜蜂可能为获取充足花粉而集中访问少数几种植物从而更稳定、大量地获取与之相关的特定细菌类群,这可能是当地粉源植物与蜂粮细菌群落呈现明显相关关系的原因。

进一步分析发现,该地区中华蜜蜂蜂粮中某些植物属和特定细菌属之间存在显著相关性。例如,蜜蜂乳杆

菌属与玉蜀黍属呈强正相关( $r=0.800, p<0.05$ )。蜜蜂消化系统微生物群主要由乳杆菌属(*Lactobacillus*)和双歧杆菌(*Bifidobacterium*)组成<sup>[38]</sup>。其中,亲果乳酸菌中原属于乳杆菌属的部分菌株,近些年被重新分类为蜜蜂乳杆菌属,以体现它们对蜜蜂宿主的特异适应性<sup>[39]</sup>。该属包含多个物种,其如 *Apilactobacillus kunkeei* 已被证实可抑制蜜蜂病原体,并广泛存在于已知 9 种蜜蜂属的肠道菌群中<sup>[40]</sup>。与蜜蜂共生的 *A. kunkeei* 和 *Apilactobacillus apinorum* 菌株生态位涵盖蜜蜂体表、花朵及蜂产品(蜂蜜、蜂王浆、蜂粮)。该类乳酸菌以果糖为主要生长底物,因而常栖息于富含果糖的环境中,可见于多种植物性基质,如葡萄(*Vitis vinifera*)、榴莲(*Durio zibethinus*)、无花果(*Ficus carica*)、香蕉(*Musa nona*)、可可(*Theobroma cacao*)和豆类<sup>[38]</sup>。糖类是乳酸发酵的关键底物,常见于玉米(*Zea mays*)、高粱(*Sorghum bicolor*)等禾本科作物中<sup>[33]</sup>。因此,玉蜀黍属植物可能作为蜜蜂乳杆菌属的自然储存库,它们的花粉细菌群落值得后续开展比较研究。此外,*Apibacter* 属与鸡矢藤属、黄瓜属、薯蓣属、苦瓜属及藜香蓟属也呈明显相关关系。*Apibacter* 属是蜜蜂肠道中的一类特化菌属<sup>[41]</sup>。Kešnerová 等人<sup>[42]</sup>对意大利蜜蜂肠道菌群的动态研究发现,冬季样本的 Alpha 多样性最低,此时 *Apibacter* 属、*Bombella* 属和 *A. kunkeei* 等机会性定殖菌丰度明显下降。而与 *Apibacter* 相关的植物物种如藜香蓟(*Ageratum conyzoides*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、穿龙薯蓣(*Dioscorea nipponica*)、苦瓜(*Momordica charantia*)和鸡矢藤(*Paederia foetida*)的花期均集中于夏季,表明 *Apibacter* 属可能在夏季通过粉源植物在蜂群中传递与交换<sup>[43]</sup>。

综上所述,重庆四面山地区中华蜜蜂的粉源植物与蜂粮细菌在多样性、季节动态及群落构成上均显示出明显关联性。蜜蜂、微生物和被子植物之间的互惠关系代表了相互作用群落的“涌现性适应”效应<sup>[37]</sup>,即 3 类群落在长期协同演化中形成的整体适应特性,超过各自独立功能之和,对维持生态稳定性具有重要意义。上述结果从“植物-传粉者-微生物”互作视角,解析了中华蜜蜂对本土粉源资源的利用特点及其蜂粮中共生微生物的组成,不仅可为蜂粮发酵优势菌种的筛选及人工蜂粮产品的研发提供理论支撑,也为深入揭示三方互作机制奠定基础。尽管初步明确了粉源植物与蜂粮菌群的相关性,但如何利用该规律指导筛选优质粉源植物以提升蜂群的抗逆性,仍有待进一步探索。未来研究将致力于推动相关理论成果向保育实践转化。

#### 参考文献:

- [1] COOK S M, AWMACK C S, MURRAY D A, et al. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition[J]. *Ecological Entomology*, 2003, 28(5): 622-627.
- [2] GHOSH S, JEON H, JUNG C. Foraging behaviour and preference of pollen sources by honey bee (*Apis mellifera*) relative to protein contents[J]. *Journal of Ecology and Environment*, 2020, 44(1): 4.
- [3] HÖLLDOBLER B, WILSON E O. The Superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies[M]. New York: WW Norton & Company, 2008.
- [4] DI PASQUALE G, SALIGNON M, LE CONTE Y, et al. Influence of pollen nutrition on honey bee health; do pollen quality and diversity matter[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72016.
- [5] GLOAG R, DING G L, CHRISTIE J R, et al. An invasive social insect overcomes genetic load at the sex locus[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2017, 1: 11.
- [6] 陈盛禄. 中国蜜蜂学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.  
CHEN S L. The apicultural science in China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001.
- [7] 张兵伟, 王露露, 赵良成, 等. 北京市野生蜜粉源植物资源调查[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(S1): 18-22.  
ZHANG B W, WANG L L, ZHAO L C, et al. Investigation of wild nectar and pollen plant resources in Beijing[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2010, 32(S1): 18-22.
- [8] 陆曹阳, 杨麒楠, 张翠平, 等. 蜂粮的营养成分生物学活性及应用研究[J]. 中国蜂业, 2024, 75(12): 62-66.  
LU C Y, YANG Q N, ZHANG C P, et al. Study on the nutritional composition biological activity and application of bee bread [J]. *Apiculture of China*, 2024, 75(12): 62-66.
- [9] 魏福伦, 邱发应. 中蜂蜂粮生产初探[J]. 遵义师范学院学报, 2008, 10(2): 64-65.  
WEI F L, QIU F Y. An initial study on the production of *Apis sinensis* smith bread[J]. *Journal of Zunyi Normal College*, 2008, 10(2): 64-65.
- [10] BÄNSCH S, TSCHARNTKE T, WÜNSCHERS R, et al. Using ITS2 metabarcoding and microscopy to analyse shifts in pollen diets of honey bees and bumble bees along a mass-flowering crop gradient[J]. *Molecular Ecology*, 2020, 29(24): 5003-5018.
- [11] 郭新军, 孟长军, 封婧. 基于山地蜂蜜花粉组成的中华蜜蜂传粉多样性研究[J]. 生态学报, 2023, 43(23): 9721-9732.

- GUO X J, MENG C J, FENG J. Diversity of plants foraged by *Apis cerana* based on pollen composition in honey samples in several mountainous areas[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2023, 43(23): 9721-9732.
- [12] CORBY-HARRIS V, MAES P, ANDERSON K E, et al. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers[J]. *PLoS one*, 2014, 9(4): e95056.
- [13] ENGEL P, KWONG W K, MCFREDERICK Q, et al. The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions[J]. *mBio*, 2016, 7(2): e02164-e02115.
- [14] KELLER A, MCFREDERICK Q S, DHARAMPAL P, et al. (More than) Hitchhikers through the network: the shared microbiome of bees and flowers[J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2021, 44: 8-15.
- [15] RERING C C, BECK J J, HALL G W, et al. Nectar-inhabiting microorganisms influence nectar volatile composition and attractiveness to a generalist pollinator[J]. *New Phytologist*, 2018, 220(3): 750-759.
- [16] MCFREDERICK Q S, REHAN S M. Characterization of pollen and bacterial community composition in brood provisions of a small carpenter bee[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(10): 2302-2311.
- [17] SOOKHAN N, LORENZO A, TATSUMI S, et al. Linking bacterial diversity to floral identity in the bumble bee pollen basket [J]. *Environmental DNA*, 2021, 3(3): 669-680.
- [18] 李还原. 东、西方蜜蜂蜂花粉和蜂粮中的微生物多样性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2020.
- LI H Y. Study on the microbial diversity of bee pollen and bee bread by *Apis cerana* and *Apis mellifera* [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2020.
- [19] 王华堂, 李良斌, 陈海玉, 等. 中蜂的传粉作用研究[J]. *环境昆虫学报*, 2022, 44(1): 84-91.
- WANG H T, LI L B, CHEN H Y, et al. Progress in pollination by *Apis cerana cerana* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2022, 44(1): 84-91.
- [20] CHEN C, WANG H H, LIU Z G, et al. Population genomics provide insights into the evolution and adaptation of the eastern honey bee (*Apis cerana*) [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(9): 2260-2271.
- [21] STOUT J C, MORALES C L. Ecological impacts of invasive alien species on bees[J]. *Apidologie*, 2009, 40(3): 388-409.
- [22] LI Z Y, GUO D Z, WANG C, et al. 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.
- [23] LIU S, WANG L H, GUO J, et al. Chinese Sacbrood virus infection in Asian honey bees (*Apis cerana cerana*) and host immune responses to the virus infection[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2017, 150: 63-69.
- [24] THEISEN-JONES H, BIENEFELD K. The Asian honey bee (*Apis cerana*) is significantly in decline[J]. *Bee World*, 2016, 93(4): 90-97.
- [25] BELL K L, FOWLER J, BURGESS K S, et al. Applying pollen DNA metabarcoding to the study of plant-pollinator interactions [J]. *Applications in Plant Sciences*, 2017, 5(6): 1600124.
- [26] HAWKINS J, DE VERE N, GRIFFITH A, et al. Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: a new tool for investigating honey bee foraging preferences[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134735.
- [27] SHANG Z, CHEN K, HAN T T, et al. Natural foraging selection and gut microecology of two subterranean rodents from the Eurasian Steppe in China[J]. *Animals*, 2024, 14(16): 2334.
- [28] PORNON A, ESCARAVAGE N, BURRUS M, et al. Using metabarcoding to reveal and quantify plant-pollinator interactions [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27282.
- [29] MAGOČ T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [30] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [31] OKSANEN J, BLANCHET F G, FRIENDLY M, et al. vegan: Community ecology package (version 2.5-7) [CP/OL]. (2020-11-30) [2023-11-28]. <https://github.com/vegandevs/>.
- [32] WICKHAM H. ggplot2: elegant graphics for data analysis. [M]. New York: Springer, 2009.
- [33] MCFREDERICK Q S, REHAN S M. Wild bee pollen usage and microbial communities co-vary across landscapes[J]. *Microbial Ecology*, 2019, 77(2): 513-522.
- [34] MCFREDERICK Q S, THOMAS J M, NEFF J L, et al. Flowers and wild megachilid bees share microbes[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 2017, 73(1): 188-200.
- [35] VANNETTE R L, FUKAMI T. Dispersal enhances beta diversity in nectar microbes[J]. *Ecology Letters*, 2017, 20(7): 901-910.
- [36] XIONG Z R, SOGIN J H, WOROBO R W. Microbiome analysis of raw honey reveals important factors influencing the bacterial and fungal communities[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 13: 1099522.

- [37] STEFFAN S A, DHARAMPAL P S, KUENEMAN J G, et al. Microbes, the ‘silent third partners’ of bee-angiosperm mutualisms[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2024, 39(1):65-77.
- [38] CROVADORE J, CHABLAIS R, RAFFINI F, et al. Draft genome sequences of 3 strains of *Apilactobacillus kunkeei* isolated from the bee gut microbial community[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2021, 10(13):e00088-e00021.
- [39] VERGALITO F, TESTA B, COZZOLINO A, et al. Potential Application of *Apilactobacillus kunkeei* for human use; evaluation of probiotic and functional properties[J]. *Foods*, 2020, 9(11):1535.
- [40] ARREDONDO D, CASTELLI L, PORRINI M P, et al. *Lactobacillus kunkeei* strains decreased the infection by honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Nosema ceranae*[J]. *Beneficial Microbes*, 2018, 9(2):279-290.
- [41] 张雪, 李兴安, 苏秦之, 等. 用于蜜蜂和熊蜂肠道微生物分类的细菌 16S rRNA 数据库优化[J]. *生物多样性*, 2019, 27(5):557-566.
- ZHANG X, LI X A, SU Q Z, et al. A curated 16S rRNA reference database for the classification of honeybee and bumblebee and bumblebee gut microbiota [J]. *Biodiversity Science*, 2019, 27(5):557-566.
- [42] KEŠNEROVÁ L, EMERY O, TROILO M, et al. Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer [J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(3):801-814.
- [43] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志 第七十一卷 第二分册 被子植物门 双子叶植物纲 茜草科 茜草亚科[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- Chinese Botanical Commission of the Chinese Academy of Sciences. *Flora of China*, volume 71, part 2, Angiosperms, Dicotyledons, Rubiaceae, Rubioideae[M]. Beijing: Science Press, 1999.

## Analysis of the Correlation between Pollen Source Plants and Bee Bread Bacteria in the *Apis cerana cerana*

RUAN Xue<sup>1,2</sup>, ZHANG Ke<sup>1,2,3</sup>, DENG Fei<sup>1</sup>, CHEN Linjie<sup>1,2</sup>,  
LONG Jingui<sup>1,2</sup>, ZENG Fanqing<sup>1,2</sup>, HUANG Dunyuan<sup>1,2</sup>

- (1. Key Laboratory of Conservation and Utilization of Pollinator Insect of the Upper Reaches of the Yangtze River, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chongqing Normal University; 2. Chongqing Key Laboratory of Vector Biology Control and Utilization, Institute of Insect and Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331; 3. Shenyang No. 126 Middle School, Shenyang 110000; 4. Simian Mountain Forest Resource Service Center, Jiangjin, Chongqing 402260, China)

**Abstract:** Bee bread is a food source for larvae formed through the storage of plant pollen collected by honeybees in honeycomb cells, which undergoes microbial fermentation to become durable and easily digestible. Studying the correlation between bacterial diversity in bee bread of the Chinese honeybee (*Apis cerana cerana*), pollen-source plants can further elucidate the interactions among plants, pollinators and microorganisms in natural ecosystems. High-throughput sequencing was used to analyze pollen-source plants and bacterial DNA in bee bread collected from the Simian Mountain area of Chongqing at different altitudes (500, 700 and 900 m) and during different months (May, July and September). A total of 26 orders, 44 families and 80 genera of pollen-source plants were identified. The three most frequently occurring genera were *Castanea*, *Aralia* and *Rubus*. The bacterial community in the bee bread showed significant heterogeneity in operational taxonomic unit (OTU) distribution, with *Apilactobacillus* being absolutely dominant. Beta diversity analysis revealed significant differences in pollen-source plant composition across different months and altitude gradients ( $R^2 = 0.6808$ ,  $p = 0.0010$ ;  $R^2 = 0.1945$ ,  $p = 0.0030$ ). The bacterial community composition differed significantly across months ( $R^2 = 0.5970$ ,  $p = 0.0010$ ), but not across altitude gradients ( $R^2 = 0.0810$ ,  $p = 0.0660$ ). At the OTU level, pollen-source plants and bee bread bacterial communities were significantly correlated ( $N = 27$ ,  $R = 0.1991$ ,  $p = 0.0040$ ). Significant correlations were also observed within each sampling month (May:  $N = 9$ ,  $R = 0.3236$ ,  $p = 0.0486$ ; July:  $N = 9$ ,  $R = 0.3580$ ,  $p = 0.0253$ ; September:  $N = 9$ ,  $R = 0.3390$ ,  $p = 0.0430$ ). Correlation analysis at the genus level indicated significant associations between certain pollen-source plants and bee bread bacteria, such as between *Apilactobacillus* and *Zea* ( $r = 0.800$ ,  $p < 0.05$ ). These results demonstrate that the diversity of pollen-source plants significantly influences and determines the structure and composition of bacterial communities in Chinese honeybee bee bread in the Simian Mountain area of Chongqing. It provides a scientific basis for conserving local Chinese honeybee populations, clarifying dominant fermentative bacteria in bee bread and developing improved artificial bee bread products. It also contributes to a deeper understanding of tripartite plant-pollinator-microbe interactions in natural ecosystems.

**Keywords:** *Apis cerana cerana*; pollen-source plants; bee bread bacteria; correlation analysis; high-throughput sequencing

(责任编辑 陈新颖)