



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

JOANA CAVALCANTE DE MOURA

**DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADES FÚNGICAS
ASSOCIADAS À ABELHA *Scaptotrigona* sp. NO AGRESTE PERNAMBUCANO**

Recife
2024

JOANA CAVALCANTE DE MOURA

**DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADES FÚNGICAS
ASSOCIADAS À ABELHA *Scaptotrigona* sp. NO AGRESTE PERNAMBUCANO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia de Fungos da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para obtenção do
título de mestra em Biologia de Fungos.
Área de concentração: Micologia Aplicada

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Neiva Tinti de Oliveira

Coorientador: Dr. Renan do Nascimento Barbosa

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Moura, Joana Cavalcante de.

Diversidade e caracterização de comunidades fúngicas associadas à abelha *Scaptotrigona* sp. no agreste Pernambucano / Joana Cavalcante de Moura. - Recife, 2024.

72f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2024.

Orientação: Neiva Tinti de Oliveira.

Coorientação: Renan do Nascimento Barbosa.

Inclui referências e apêndice.

1. Abelha sem ferrão; 2. Ecologia de fungos; 3. Biodiversidade; 4. Taxonomia. I. Oliveira, Neiva Tinti de. II. Barbosa, Renan do Nascimento. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

JOANA CAVALCANTE DE MOURA

**DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADES FÚNGICAS
ASSOCIADAS À ABELHA *Scaptotrigona* sp. NO AGRESTE PERNAMBUCANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação Biologia de Fungos da
Universidade Federal de Pernambuco como
requisito para a obtenção do título de Mestra
em Biologia de Fungos. Área de concentração:
Micologia Aplicada

.

Aprovada em: 29/01/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Neiva Tinti de Oliveira (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Patricia Vieira Tiago (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr^a. Ana Carla da Silva Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico este trabalho à minha mãe, Patrícia Sousa Cavalcante, cuja força, amor e dedicação foram minha maior fonte de inspiração e incentivo ao longo de toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho:

Aos meus guias espirituais, pela luz, sabedoria e proteção que me acompanharam em cada passo desta jornada.

Aos meus orientadores, pela confiança, paciência e dedicação demonstradas ao longo deste trabalho. À Neiva, pela confiança depositada e pelas sugestões enriquecedoras. Ao Renan, pela paciência, pelos ensinamentos e pela dedicação constante. Suas contribuições foram essenciais para o aprimoramento da pesquisa e para o meu crescimento acadêmico. Sou profundamente grata a vocês.

Ao Domingos Tabosa, proprietário do meliponário, e à Associação Pernambucana de Apicultores e Meliponicultores (APIME), representada pelos Srs. Alexandre Moura, João Luiz (Lula do Mel) e Adgerlan Codácio, por tornarem possível a coleta das amostras e contribuírem significativamente para este trabalho.

À minha família, especialmente aos meus pais, Patrícia e Zezumiel, pelo amor incondicional e pelo apoio constante, que me deram forças para seguir em frente, mesmo nos momentos mais desafiadores. Agradeço também à minha irmã, Juliana, e ao meu sobrinho, Davi, pelo apoio e amor, mesmo à distância, e ao meu irmão e à minha cunhada, Jefferson e Stefhane, por todo o suporte e ajuda nas coletas.

Ao meu namorado, Alan, pelo amor, apoio e compreensão, especialmente nos momentos em que precisei de descanso ou de um incentivo extra.

À Matilde, por todo o amor e incentivo, que foram indispensáveis durante essa jornada.

À minha tia, Vanise, às minhas primas Thainá e Thaianne, e aos meus amigos Natália, Neto e Thalia, pelo apoio e por compartilharem comigo momentos de descontração e alegria.

A todos do Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e Biocontroladores, pela companhia e apoio ao longo desta trajetória. Em especial, aos professores Roger e Patrícia, por estarem sempre dispostos a ajudar; ao Ewerton, por seu auxílio nas coletas e por compartilhar comigo grande parte do que hoje sei fazer na bancada; e à Marília, cujo incentivo foi decisivo para que eu ingressasse neste laboratório e que, além disso, se tornou uma amiga muito querida.

Aos membros da banca examinadora, Patricia e Ana Carla, pelas valiosas contribuições e críticas construtivas, que enriqueceram este trabalho e ampliaram minha compreensão sobre os temas abordados.

Aos meus colegas de curso, por compartilharem dúvidas, discussões e momentos de alegria ao longo desta jornada.

À toda equipe da Micoteca URM, em especial à professora Cristina, pela colaboração na realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Departamento de Micologia e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, pela estrutura e suporte fornecidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho, o meu mais sincero obrigado!

RESUMO

As abelhas sem ferrão (*Apidae: Meliponini*) integram o grupo mais abundante e diversificado de abelhas eussociais, distribuindo-se pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Essas abelhas estabelecem relações ecológicas com uma ampla variedade de organismos, incluindo os fungos. Assim como acontece com muitos insetos, os fungos desempenham um papel crucial na nutrição e proteção contra organismos prejudiciais às abelhas. No entanto, o conhecimento sobre os fungos associados aos substratos relacionados às abelhas sem ferrão ainda é limitado. O presente estudo teve como objetivo caracterizar a comunidade de fungos isolados de pólen, mel e na superfície de ninhos da *Scaptotrigona* sp. criadas em um sítio no Agreste pernambucano. Os isolados foram obtidos por meio da suspensão das amostras de pólen, de mel e da superfície da colmeia em água peptonada, e plaqueamento em meios de cultura Dichloran 18% Glicerol Ágar (DG18) e Extrato de Malte Ágar (MEA) acrescido de cloranfenicol. Um total de 336 isolados foram obtidos, sendo 143 leveduras e 193 fungos filamentosos, e identificados através de características morfológicas e/ou moleculares. Dentre as leveduras foram identificadas espécies pertencentes aos gêneros *Cystobasidium*, *Debaryomyces*, *Gjaerumia*, *Hortaea*, *Moniliella*, *Pseudozyma*, *Rhodospiridiobolus*, *Sporobolomyces*, *Starmerella*, *Torula*, *Trichomonascus*, *Wickerhamiella*, *Zygoascus* e *Zygosaccharomyces*. Dentre os fungos filamentosos foram identificados isolados pertencentes aos gêneros *Anthracina*, *Arcopilus*, *Aspergillus*, *Austropleospora*, *Brevistachys*, *Bulbithecium*, *Cercophora*, *Cladosporium*, *Diaporthe*, *Knufia*, *Microascus*, *Monascus*, *Odontoefibula*, *Paecilomyces*, *Paracamarosporium*, *Penicillium*, *Periconia*, *Phaeosphaeria*, *Phanerochaete*, *Preussia*, *Purpureocillium*, *Sarocladium*, *Scytalidium*, *Spegazzinia*, *Talaromyces*, *Tetraploa*, *Tolypocladium*, *Toxicocladosporium*, *Xerochrysium*, *Xeromphalina*, *Zasmidium* e um novo gênero na família *Cephalothecaceae*. Entre eles, 30 gêneros são relatados pela primeira vez em abelhas sem ferrão. Um total de 18 novas espécies são propostas em diferentes gêneros. A riqueza de espécies foi maior na superfície do ninho, e a diversidade de espécies foi semelhante nos três substratos. A análise dos fungos presentes em substrato de abelhas sem ferrão é fundamental para a ampliação do conhecimento sobre a diversidade desses microrganismos e compreensão das interações entre fungos e abelhas. Este estudo revela o potencial dos substratos investigados para isolar espécies ainda não catalogadas, destacando a relevância de pesquisas sobre a biodiversidade de fungos em ecossistemas específicos.

Palavras-chave: abelha sem ferrão; ecologia de fungos; biodiversidade; taxonomia.

ABSTRACT

Stingless bees (*Apidae: Meliponini*) constitute the most abundant and diverse group of eusocial bees, distributed across tropical and subtropical regions worldwide. These bees establish ecological relationships with a wide variety of organisms, including fungi. Similar to many insects, fungi play a crucial role in the nutrition and protection against harmful organisms for the bees. However, knowledge about fungi associated with substrates related to stingless bees is still limited. The present study aimed to characterize the community of fungi isolated from pollen, honey, and the surface of hives of *Scaptotrigona* sp. raised in a site in the Pernambuco Agreste. The isolates were obtained by suspending pollen, honey, and hive surface samples in peptone water, and plating on Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18) and Malt Extract Agar (MEA) with added chloramphenicol. A total of 336 isolates were obtained, with 143 yeast and 193 filamentous fungi, and identified through morphological and/or molecular characteristics. Among the yeasts, species belonging to the genera *Cystobasidium*, *Debaryomyces*, *Gjaerumia*, *Hortaea*, *Moniliella*, *Pseudozyma*, *Rhodospordiobolus*, *Sporobolomyces*, *Starmerella*, *Torula*, *Trichomonascus*, *Wickerhamiella*, *Zygoascus* and *Zygosaccharomyces* were identified. Among the filamentous fungi, isolates belonging to the *Anthracina*, *Arcopilus*, *Aspergillus*, *Austropleospora*, *Brevistachys*, *Bulbithecium*, *Cercophora*, *Cladosporium*, *Diaporthe*, *Knufia*, *Microascus*, *Monascus*, *Odontoefibula*, *Paecilomyces*, *Paracamarosporium*, *Penicillium*, *Periconia*, *Phaeosphaeria*, *Phanerochaete*, *Preussia*, *Purpureocillium*, *Sarocladium*, *Scytalidium*, *Spegazzinia*, *Talaromyces*, *Tetraploa*, *Tolypocladium*, *Toxicocladosporium*, *Xerochrysium*, *Xeromphalina*, *Zasmidium*, and a new genus in the family *Cephalothecaceae* were identified. Among these, 30 genera reported for the first time in stingless bees. A total of 18 new species are proposed in different genera. Species richness was higher on the nest surface, and species diversity was similar across all three substrates. The analysis of the fungi present in stingless bee substrates is fundamental for expanding knowledge about the diversity of these microorganisms and understanding the interactions between fungi and bees. This study reveals the potential of the investigated substrates to isolate yet uncataloged species, emphasizing the importance of research on fungal biodiversity in specific ecosystems.

Keywords: stingless bee; fungal ecology; biodiversity; taxonomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Cesta de pólen das abelhas sem ferrão. A) Operária da abelha *Melipona beecheii* com destaque para a corbícula. B) Corbícula de operária de *M. bicolor*. B) Macho de *M. bicolor* sem corbícula. 16
- Figura 2.** Célula real de *Scaptotrigona* sp. 17
- Figura 3.** Esquema geral de uma colônia de abelha sem ferrão em ambiente natural 19
- Figura 4.** Interior do ninho de *Scaptotrigona* sp. Pode-se observar os favos de cria, o invólucro de cerume que circunda os favos de cria e os potes de alimento 20
- Figura 5.** Entrada do ninho de *Scaptotrigona* sp. 23
- Figura 6.** Meliponário do Sítio Baixio de Itaúna, Caruaru-PE. Pode-se observar os cortiços e as caixas de criação de *Scaptotrigona* sp. 24
- Figura 7.** Coleta das amostras no ninho de *Scaptotrigona* sp. A) Coleta do pólen, com o auxílio de uma espátula. B) Coleta do mel, pelo método de sucção com seringa descartável. C) Coleta da superfície do ninho, através da fricção do Swab. 32
- Figura 8.** Diagrama aluvial ilustrando a classificação taxonômica das leveduras isoladas neste estudo. 36
- Figura 9.** Diagrama aluvial ilustrando a classificação taxonômica dos fungos filamentosos isolados neste estudo 38
- Figura 10.** Diagrama de Venn mostrando os gêneros de fungos exclusivos e compartilhados entre o mel, pólen e superfície do ninho de *Scaptotrigona* sp. 42
- Figura 11.** Agrupamento dos isolados por gênero usando análise de máxima verossimilhança (ML) para o domínio D1/D2 do gene 26S do rDNA de leveduras isoladas a partir de amostras de mel, pólen e da superfície de ninhos de *Scaptotrigona* sp. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós. 44
- Figura 12.** Colônias de algumas espécies de leveduras obtidas em substratos relacionados à abelha *Scaptotrigona* sp. Cultivos em meio Ágar Sabouraud por 14 dias a 25 °C (da esquerda para a direita): *Starmerella apícola*, *Trichomonascus ciferrii*, *Wickerhamiella versatilis* e *Zygoascus* sp. nov. 45
- Figura 13.** Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências 26S de *Starmerella*. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. *Zygoascus hellenicus* CBS 5839 foi escolhido como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós. 46
- Figura 14.** Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências 26S de *Wickerhamiella*. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. *Yamadazyma tumulicola* CBS 10917 foi escolhida como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós. 47

Figura 15. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências 26S de *Moniliella*. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. *Tilletiaria anomala* CBS foi escolhida como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós. 48

Figura 16. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências 26S de *Zygosaccharomyces*. O isolado obtido neste estudo está em negrito. *Zygotrulaspora mrakii* CBS 4218 foi escolhido como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós. 50

Figura 17. Agrupamento dos isolados por gênero usando análise de máxima verossimilhança (ML) para região ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA de fungos filamentosos isolados a partir de amostras de mel, pólen e da superfície de ninhos de *Scaptotrigona* sp. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós. 51

Figura 18. Colônias de algumas espécies de fungos obtidas em substratos relacionados à abelha *Scaptotrigona* sp. Cultivos em meio Ágar Malte por 7 dias a 25 °C. Primeira linha (da esquerda para a direita): *Aspergillus flavus*, *A. brunneoviolaceus*, *A. chevalieri*, *A. keveii*, *A. micronesiensis*, Segunda linha: *A. petersonii*, *A. subversicolor*, *A. sydowii*, *Aspergillus* sp. nov. 3, *Aspergillus* sp. nov. 4, Terceira linha: *Penicillium austrosinicum*, *P. brasilianum*, *P. chermesinum*, *P. allii-sativi*, *P. citrinum*, Quarta linha: *P. copticola*, *Penicillium* sp. nov. 1, *P. steckii*, *Talaromyces scorteus*, *Talaromyces* sp. nov. 1, Quinta linha: *Paecilomyces formosus*, *Monascus mellicola*, *M. pilosus*, *Purpureocillium* sp. 52

Figura 19. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências β -tubulina de *Aspergillus*. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. *Penicillium cataractarum* KAS 2145 foi escolhido como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós. 54

Figura 20. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências β -tubulina de *Aspergillus*. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. *Talaromyces scorteus* NRRL 1129 foi escolhido como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós. 55

Figura 21. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências Calmodulina de *Talaromyces*. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. *Penicillium citrinum* CBS 24185 foi escolhido como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós. 56

Figura 22. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências *tef1* de *Cladosporium*. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. *Cercospora beticola* CBS 116456 foi escolhido como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Espécies de fungos isolados do mel, pólen e superfície da colmeia (swab) de <i>Scaptotrigona</i> sp. utilizadas no presente estudo. Frequência absoluta (fa), frequência relativa (fr%) e classificação da frequência das espécies identificadas.	38
Tabela 2 –	Densidade e Diversidade de Shannon-Wiener (H') dos fungos isolados por substrato (mel, pólen e superfície de ninhos de <i>Scaptotrigona</i> sp.).	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. OBJETIVOS	14
1.1.1. Objetivo Geral	14
1.1.2. Objetivos Específicos	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1. AS ABELHAS SEM FERRÃO	16
2.1.1. A sociedade das abelhas sem ferrão	18
2.1.2. O pólen coletado pelas abelhas sem ferrão	20
2.1.3. O mel das abelhas sem ferrão	21
2.2. <i>Scaptotrigona</i> Moure, 1942	22
2.3. MELIPONICULTURA	23
2.4. ABELHAS E MICRORGANISMOS	25
2.5. FUNGOS ASSOCIADOS ÀS ABELHAS	27
2.5.1. Leveduras associadas a abelhas nativas	28
2.5.2. Fungos Filamentosos filamentosos associados a abelhas nativas	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. OBTENÇÃO DAS CAIXAS DE CRIAÇÃO	31
3.2. COLETA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS	31
3.3. PURIFICAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	32
3.4. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	33
3.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	33
3.5.1. Extração do DNA genômico, amplificação e sequenciamento de fragmentos do DNA	33
3.5.2. Alinhamento das sequências e análise filogenética	34
3.6. ANÁLISE DOS ÍNDICES DE DIVERSIDADE	34
3.7. DEPÓSITO DOS FUNGOS NA MICOTECA URM E NO HERBÁRIO URM	35
3.8. DEPÓSITO DAS SEQUÊNCIAS NO NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A	72

1. INTRODUÇÃO

As abelhas indígenas sem ferrão (*Meliponini*) compõem o grupo mais amplo de abelhas sociais e estão presentes nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Michener, 2007). São popularmente conhecidas como “abelhas sem ferrão” por apresentarem ferrão atrofiado (Nogueira-Neto, 1997). Também são consideradas indicadoras da qualidade ambiental (Barbosa *et al.*, 2017a) e espécies-chave da Caatinga (Carvalho *et al.*, 2017), por possuírem um papel vital na estrutura, funcionamento e produtividade do ecossistema.

A criação racional das abelhas sem ferrão, denominada de Meliponicultura, é regulamentada pelo CONAMA por meio da Resolução nº 496, de 19 de agosto de 2020, sendo praticada em cortiços ou em caixas de madeira para a produção de mel. É uma atividade de fácil manejo e baixo custo, que vem ganhando espaço em todo território nacional pela vasta diversidade da flora e dos mais variados tipos de clima existentes no Brasil. Em Pernambuco, a criação de abelhas, seja por meio da Apicultura ou por meio da Meliponicultura, está presente em todas as regiões, mas destacamos aqui que na região do Agreste Pernambucano, principalmente nos municípios de Caruaru e Brejo da Madre de Deus, tem se observado uma crescente atividade de meliponicultores. Esse potencial constitui uma fonte de renda adicional, especialmente na agricultura familiar (Magalhães; Venturieri, 2010) e não impede o desenvolvimento de outras atividades pré-estabelecidas culturalmente.

As abelhas sem ferrão apresentam associações ecológicas com uma grande variedade de organismos, incluindo os fungos (Menezes *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2016, 2017b, 2018; de Paula *et al.*, 2023), um grupo bastante diverso, podendo ser encontrado em todos os nichos ecológicos. A evidência mais forte de mutualismo entre abelhas e fungos foi documentada em várias espécies de abelhas sem ferrão. No caso de *Scaptotrigona depilis*, uma espécie nativa do Brasil, as abelhas adultas cultivam *Zygosaccharomyces* em células de cria, onde as larvas se alimentam das pseudo-hifas do fungo, que fornecem o ergosterol necessário para a pupação (Menezes *et al.*, 2015; Paludo *et al.*, 2018, 2019).

Em relação aos fungos associados às abelhas sem ferrão, também são citadas espécies de *Penicillium*, *Mucor* e *Saccharomyces*, os quais são introduzidos nos ninhos pelas próprias abelhas da colônia, durante a coleta e preparo do néctar e pólen, ou de forma accidental devido a manipulações pouco higiênicas durante as etapas de

coleta, processamento e armazenamento do mel (Snowdon, 1999). No estado de Pernambuco, um dos poucos estudos conduzidos e publicados com essa temática, foi o de Barbosa *et al.* (2016) que ao analisarem amostras de mel de diversas abelhas nativas da Caatinga, e isolaram fungos pertencentes aos gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Pichia* e *Kloeckera*. Fungos dos gêneros *Monascus* (Barbosa *et al.* 2017b), *Penicillium* e *Talaromyces* (Barbosa *et al.*, 2018) também foram estudados a partir de amostras de mel, pólen e interior da colmeia da abelha uruçú (*Melipona scutellaris*) em áreas de Mata Atlântica de Pernambuco. Estes últimos estudos foram conduzidos em colaboração com a Associação Pernambucana de Apicultores e Meliponicultores (APIME), que se destaca no Estado pelo seu trabalho de defesa e incentivo à criação das abelhas.

Desta forma, considerando substratos relacionados às abelhas como importantes e uma fonte pouco explorada de fungos, e o contexto promissor para preservação de recursos genéticos e biotecnológicos, este estudo teve por objetivo acessar a diversidade de fungos em substratos associados à *Scaptotrigona* sp., criadas em caixas racionais em um meliponário localizado no Agreste de Pernambuco.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

Caracterizar a comunidade de fungos isolados de pólen, mel e na superfície de ninhos da *Scaptotrigona* sp. criadas em um sítio no Agreste pernambucano.

1.1.2. Objetivos Específicos

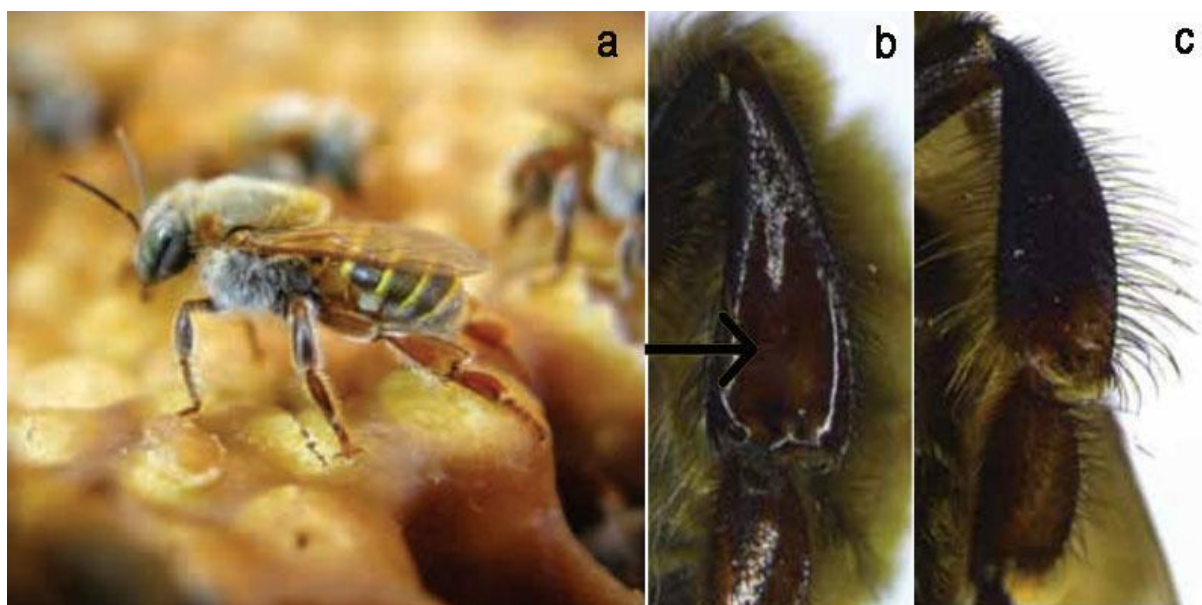
- Caracterizar, utilizando métodos morfológicos e moleculares, os fungos filamentosos e leveduras obtidas de amostras de pólen, de mel e da superfície de ninhos da *Scaptotrigona* sp. criadas no Agreste pernambucano.
- Documentar a ocorrência de espécies raras e novas para o Brasil e para a ciência.
- Enriquecer as bases de dados genéticos de fungos isolados do pólen, mel e superfície de ninho, por meio do sequenciamento e depósito das sequências no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - GenBank).
- Ampliar o conhecimento ecológico e taxonômico da diversidade de fungos associados à *Scaptotrigona* sp.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. AS ABELHAS SEM FERRÃO

As abelhas são insetos da ordem *Hymenoptera*, nome derivado do grego (*hymen* = membrana; *ptera* = asas), assim como as formigas e vespas. Juntamente com as mamangavas (*Bombini*), as abelhas das orquídeas (*Euglossini*) e as melíferas (*Apini*), as abelhas sem ferrão (*Meliponini*) pertencem a um grupo conhecido como abelhas corbiculadas, que é nomeado pela presença de uma cesta para coletar pólen (corbícula), localizada na superfície externa da tíbia posterior da fêmea (Nogueira-Neto, 1997; Silveira; Melo; Almeida, 2002; Michener, 2013; Witter et al., 2014; Witter; Nunes-Silva, 2014) (Figura 1).

Figura 1. Cesta de pólen das abelhas sem ferrão. A) Operária da abelha *Melipona beecheii* com destaque para a corbícula. B) Corbícula de operária de *M. bicolor*. C) Macho de *M. bicolor* sem corbícula.



Fonte: Witter & Nunes-Silva (2014); Villa-Bôas (2018).

As abelhas sem ferrão recebem esse nome por não possuírem glândulas de veneno e por apresentarem o ferrão atrofiado (sem função), e também são chamadas de abelhas “indígenas” ou “nativas” por serem tradicionalmente manejadas pelos povos indígenas (Lopes; Ferreira; Santos, 2005). Segundo Nogueira-Neto (1997), as Meliponini se caracterizam por não construírem células reais, todas nascem e se desenvolvem no interior de células de cria de igual tamanho. No entanto, algumas espécies (pertencentes à antiga Tribo Trigonini) precisam dessa célula especial para

o nascimento de princesas (Nogueira-Neto, 1997; Villas-Bôas, 2012) (Figura 2). Essas abelhas vivem naturalmente nos mais diferentes biomas, construindo seus ninhos em ocos de árvores, cavidades rochosas, no solo ou em altitudes elevadas (Michener, 2000). Em ambientes urbanizados, podem nidificar em tubulações, paredes, entre outros (Siqueira; Martines; Nogueira, 2007; Souza *et al.*, 2015). Alimentam-se de néctar e pólen e armazenam esses alimentos em potes feitos de cerume ou cera, no interior da colméia (Nogueira-Neto, 1997; Witter; Nunes-Silva, 2014).

Figura 2. Célula real de *Scaptotrigona* sp.



Fonte: A autora (2022).

Os meliponíneos compreendem cerca de 550 espécies descritas (Grüter, 2020) e são registradas em grande parte das regiões tropicais e subtropicais do mundo, distribuindo-se na maior parte da América Latina (Michener, 2007). O Brasil é considerado o país com a maior diversidade de meliponíneos, o último levantamento relata a ocorrência de 259 espécies, distribuídas em 28 gêneros, além de 62 ainda não descritas formalmente (Nogueira, 2023).

Dentre os organismos que fornecem serviços ecossistêmicos para os ambientes terrestres, as abelhas sem ferrão são os principais agentes polinizadores de muitas espécies de árvores nativas do Brasil (Kerr, 1997). Costumam ter colônias populosas e perenes e, por isso, comumente exploram uma ampla gama de flores ao longo do ano, sendo consideradas espécies generalistas (Michener, 1979). No entanto, alguns

autores mencionam que essas abelhas podem ter seletividade na coleta do recurso, visando otimizar os custos e benefícios do forrageamento (Ramalho; Silva; Carvalho, 2007).

As abelhas nativas enfrentam dificuldades significativas devido à competição com a abelha europeia, *Apis mellifera* Linnaeus (1758), uma espécie introduzida e altamente adaptada às condições tropicais (Silveira; Melo; Almeida, 2002). A eficiência notável dessas abelhas introduzidas no forrageamento e habilidades de comunicação, combinada com suas colônias numerosas, cria um ambiente competitivo no qual as abelhas nativas muitas vezes lutam para acessar recursos florais (Cane; Tepedino, 2017). A competição intensa por recursos entre as abelhas europeias e as nativas pode comprometer a nutrição destas últimas e o equilíbrio da polinização, principalmente no que diz respeito à diversidade ecológica (Vollet Neto *et al.*, 2018).

2.1.1. A sociedade das abelhas sem ferrão

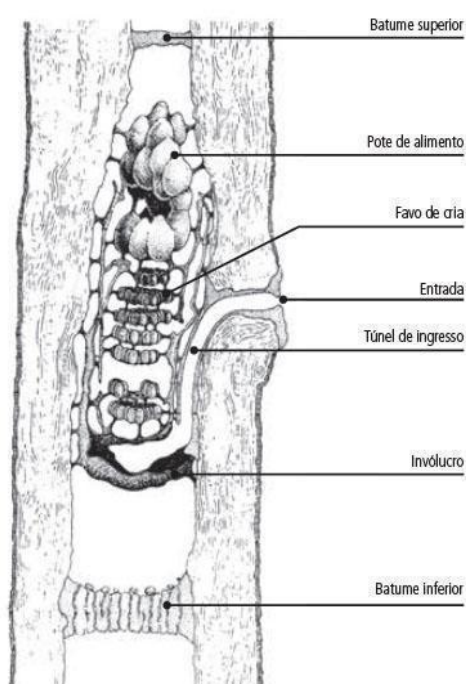
Assim como outros insetos sociais, as abelhas sem ferrão vivem em sociedades compostas por três categorias de indivíduos: rainhas (poedeira ou virgens), operárias e machos. As rainhas são as responsáveis pela postura dos ovos, que dão origem a todas as castas, e desempenham um papel fundamental na organização da colônia, através de um sofisticado sistema de comunicação baseado na utilização de feromônios (Villas-Bôas, 2012). As operárias constituem a maior parte da população de uma colônia, desempenhando uma variedade de tarefas essenciais, como limpeza, cuidado com as crias, forrageamento, construção e abastecimento da colônia (Villas-Bôas, 2012; 2018). Os machos são os indivíduos que têm como principal objetivo acasalar com rainhas virgens (Villas-Bôas, 2012; Witter; Nunes-Silva, 2014).

O número de fêmeas e machos em uma colônia varia de acordo com a espécie, época do ano e estágio de desenvolvimento da colônia. A proporção de fêmeas é alta, representando cerca de 85% a 97% da população total da colônia, incluindo uma rainha fecundada, algumas rainhas virgens e operárias que são a maioria. Os machos correspondem a cerca de 3% a 15% da população total da colônia (Carvalho-Zilze *et al.*, 2011).

Os hábitos de nidificação dessas abelhas são bastante variados e os ninhos são construídos com materiais como barro, resina e outras substâncias vegetais pegajosas coletadas pelas abelhas operárias (Witter; Nunes-Silva, 2014). Em geral, os ninhos são compostos de cera e cerume (cera misturada com própolis/resina), com algumas espécies de abelhas fazendo uso do geoprópolis (mistura de barro e resina) para impermeabilização do ninho (Roubik, 2006; Silva; Paz, 2012). Outros materiais, como lama e fezes de animais, sozinhos ou misturados com cera e resina, também são utilizados na construção dos ninhos (Roubik, 2006; Grüter, 2020).

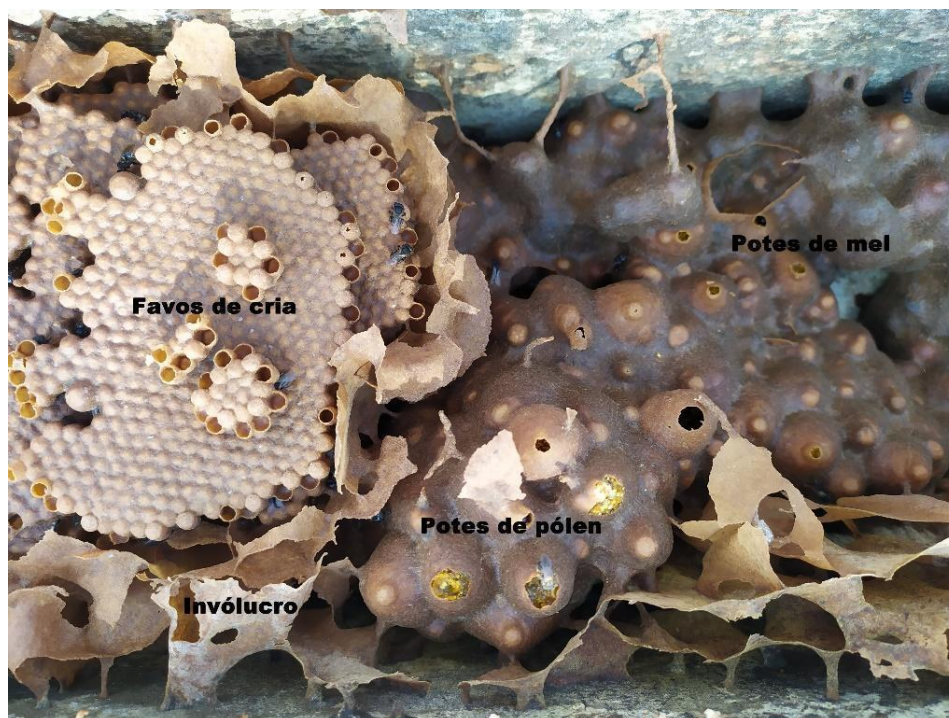
Os ninhos são organizados de diferentes formas, sendo os arranjos das células de criação, os recipientes de armazenamento de alimentos e a arquitetura observada na entrada e no interior do ninho úteis para identificar e reconhecer as espécies (Roubik, 2006). Os potes de mel e de pólen, os favos de cria, os depósitos de cera e resina, o batume, o invólucro e o tubo de entrada, são estruturas que compõem e organizam os ninhos (Villas-Bôas, 2012; 2018) (Figura 3). O mel e o pólen são armazenados em potes separados, o mel amadurecido se encontra nos extremos da cavidade do ninho, enquanto o pólen e algum mel cercam a área de células de cria (Figura 4).

Figura 3. Esquema geral de uma colônia de abelha sem ferrão em ambiente natural.



Fonte: Villas-Bôas (2018).

Figura 4. Interior do ninho de *Scaptotrigona* sp. Pode-se observar os favos de cria, o invólucro de cerume que circunda os favos de cria e os potes de alimento (pólen e mel).



Fonte: A autora (2024).

2.1.2. O pólen coletado pelas abelhas sem ferrão

Os grãos encontrados nas anteras, localizados nos estames das flores, são chamados de pólen e geralmente são de cor amarela (Bogdanov, 2016). Cada grão de pólen contém os cromossomos que formam a herança masculina da planta e uma pequena quantidade de substâncias de reserva, principalmente lipídios ou água com proteínas e carboidratos (Nogueira-Neto, 1997). Esses grãos são coletados e transportados pelas abelhas forrageiras por meio de estruturas especializadas, chamadas corbículas (Silveira; Melo; Almeida, 2002). Durante a coleta ocorre o contato dos corpos das forrageiras com os órgãos sexuais das plantas, o que permite a transferência dos gametas masculinos entre as espécies vegetais, assim, o papel das abelhas na polinização e na reprodução das plantas é incontestável (Imperatriz-Fonseca; Koedam; Hrncir, 2017).

As flores oferecem o pólen e o néctar como alimentos para as abelhas. O pólen é a principal fonte de proteínas, lipídios e vitaminas para as abelhas (Almeida-Muradian *et al.*, 2005), enquanto o néctar, que é transformado em mel, constitui a principal fonte de carboidratos e energia (Villas-Bôas, 2012). Após coletar o pólen, as abelhas o processam adicionando secreções salivares, contendo enzimas (amilase e

glucosidase) (Bogdanov, 2016). Além disso, o pólen processado é misturado ao mel e à geleia real, produzindo o alimento larval (Vit; Pulcini, 1996).

O pólen coletado e armazenado em potes é chamado de saburá ou pão de abelha. Uma vez que os potes são cheios, eles são selados e mantidos fechados por cerca de duas semanas antes de serem consumidos pelas abelhas (Loper *et al.*, 1980). Uma colônia de abelhas sem ferrão tem a capacidade de produzir até 6 kg de saburá em um único ano, dependendo da espécie (Mohammad; Mahmud-Ab-Rashid; Zawawi, 2021).

No interior do ninho o pólen passa por processos químicos e biológicos, durante o armazenamento, o que pode resultar em alterações em sua composição química. Um dos principais processos é a fermentação em ácido láctico, que junto com outros metabólitos produzidos na fermentação, desempenha um papel importante na estabilização do pólen, prevenindo o desenvolvimento de microrganismos que poderiam estragá-lo e contribuindo para a preservação do alimento na colmeia (Herbert; Shimanuki, 1978; Gilliam, 1979). Algumas espécies de abelhas produzem o pólen fermentado seco e relativamente doce, outras pertencentes a *Melipona* e *Scaptotrigona*, produzem e armazenam o pólen úmido e azedo (Menezes *et al.*, 2013).

2.1.3. O mel das abelhas sem ferrão

O mel é um produto natural que é obtido a partir do néctar das plantas, bem como de exsudatos ou excreções de insetos sugadores de plantas, que são coletados pelas abelhas (Khan *et al.*, 2018). O material coletado é misturado com um líquido contendo enzimas digestivas das glândulas hipofaríngeas e mandibulares das abelhas, e armazenado para maturação nos potes de mel (Al-Sherif *et al.*, 2017).

A composição do mel é influenciada por variados fatores, incluindo as condições climáticas, composição do néctar, época da colheita, práticas de manejo do produtor e a espécie de abelha que o produz (Carvalho *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2016). O mel das abelhas sem ferrão contém uma variedade de substâncias bioativas, como compostos fenólicos, aminoácidos, vitamina C, carotenóides e outros compostos que estão relacionados ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano (Beux *et al.*, 2022). Essas substâncias conferem ao mel características únicas em termos de consistência, aroma, cor e sabor, que são completamente diferentes do mel produzido pela abelha

Apis mellifera, o que tem o tornado popular entre os consumidores e altamente comercializado (Rao *et al.*, 2016).

Uma característica adicional deste mel é sua resistência à formação de hidroximetilfurfural (HMF) quando exposto a altas temperaturas (Biluca *et al.*, 2014), o que o torna valioso para uso nas indústrias farmacêutica e alimentícia. O HMF surge da transformação dos monossacarídeos, como frutose e glicose. Esta conversão é mais rápida com o aumento da temperatura, fazendo do HMF um indicador sensível de aquecimento excessivo, processamento inadequado ou armazenamento prolongado e adulterações, que podem ocorrer em xaropes e no mel.

Um estudo recente revelou que o mel das abelhas nativas é o único produto natural conhecido por ser enriquecido com um açúcar biologicamente ativo chamado trealose, que possui propriedades antidiabéticas e não cariogênicas (Fletcher *et al.*, 2020). Alguns estudos têm investigado as propriedades terapêuticas do mel das abelhas sem ferrão, justificando a sua utilização na medicina popular ao longo dos séculos: esses méis têm demonstrado atividades antioxidante (Jimenez *et al.*, 2016; Biluca *et al.*, 2017), antimicrobiana (Pimentel *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2014; Ávila *et al.*, 2019), antifúngica (Hau-Yama *et al.*, 2020), anti-inflamatória (Borsato *et al.*, 2014; Ranneh *et al.*, 2019), citotoxicidade contra células cancerígenas (Kustiawan *et al.*, 2014) e propriedades antidiabéticas (Aziz *et al.*, 2017).

2.2. *Scaptotrigona* Moure, 1942

A Tribo Meliponini é um grupo de abelhas da subfamília Apinae, formada pelo gênero *Melipona* e por outras abelhas sem ferrão conhecidas como trigoniformes. Essas últimas quase sempre constroem células reais, maiores que as células de cria, de onde emergem as futuras rainhas (Nogueira-Neto, 1997). Dentre elas, o gênero *Scaptotrigona* se destaca como uma das linhagens mais diversas e abundantes da América, ocorrendo desde o México até a Argentina (Michener, 2007).

As abelhas do gênero *Scaptotrigona* são, em geral, defensivas, têm o corpo preto brilhante, asas marrons, comprimento corporal varia de 5 a 7 mm e a cabeça e o tórax são fortemente pontuados (Michener, 2007). Os ninhos são encontrados em cavidades de árvores grandes na natureza e a entrada do ninho é feita de cerume em forma de canudo (Figura 5). São conhecidas popularmente como canudo, mandaguari, tubiba, tubuna, entre outros.

Atualmente, o gênero inclui 50 espécies descritas (Engel, 2022a, 2022b) e algumas espécies aguardam descrição, incluindo a citada no presente estudo (*Scaptotrigona* sp.) que pertence ao grupo tubiba.

Figura 5. Entrada do ninho de *Scaptotrigona* sp.



Fonte: A autora (2024).

2.3. MELIPONICULTURA

A criação de abelhas sem ferrão é denominada meliponicultura. Apesar do termo ter sido cunhado por Paulo Nogueira-Neto em 1953, é uma prática secular com relatos desde os primórdios das civilizações antigas, no Egito Antigo (Ballivián, 2008). É, também, uma atividade ancestral nas Américas, sobretudo entre os povos indígenas (Nogueira-Neto, 1997). Nas últimas décadas, a prática da meliponicultura tem ganhado cada vez mais destaque em um contexto de valorização e preservação dos recursos da biodiversidade, com potencial para gerar renda, promover a identidade cultural e fortalecer a conservação das espécies (Villas-Bôas, 2018).

As abelhas são criadas em cortiços ou caixas racionais de madeira (Figura 6). O cortiço se refere a um segmento de tronco de árvore oco que é utilizado como abrigo para as colônias de abelhas sem ferrão (Carvalho *et al.*, 2006). Segundo Villas-Bôas (2012), as caixas racionais são construídas principalmente utilizando a madeira de reflorestamento de *Pinus*, o que evita o uso de árvores nativas. Existem vários

modelos de caixas, que podem ser horizontais ou verticais (Venturieri, 2004; Villas-Bôas, 2012). As horizontais são mais tradicionais nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (Villas-Bôas, 2012).

Figura 6. Meliponário do Sítio Baixo de Itaúna, Caruaru-PE. Pode-se observar os cortiços e as caixas racionais de *Scaptotrigona* sp.



Fonte: A autora (2024).

No Brasil, as espécies mais exploradas pelos meliponicultores são *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata*, *M. subnitida*, *M. scutellaris* e *M. fasciculata*, outras espécies também são criadas em pequena escala em regiões específicas (Jaffe *et al.*, 2015). Nas regiões Norte e Nordeste, a atividade é amplamente difundida, tendo o mel como principal produto valorizado nessa exploração (Ximenes; Vidal, 2023). Além da produção de mel, as abelhas também fornecem outros produtos como cera, pólen e própolis (Paula Neto; Almeida Neto, 2006).

A regulamentação da meliponicultura no Brasil teve seu marco inicial com a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) 346 de 2004 (CONAMA, 2004). Essa resolução, pela primeira vez, estabeleceu diretrizes para a utilização de abelhas silvestres nativas e a criação de meliponários. Dezesesseis anos depois, a Resolução CONAMA 346/2004 foi revogada pela Resolução CONAMA 496/2020 (CONAMA, 2020), que apresenta diferenças significativas em relação à anterior, sendo mais restritiva em alguns aspectos. A resolução vigente exige a obtenção do Cadastro Técnico Federal (CTF) para meliponários de qualquer porte

com fins econômicos ou comerciais, e a partir de 49 colônias para qualquer finalidade. A partir das diretrizes estabelecidas nestas resoluções, os estados são responsáveis por desenvolver seus próprios marcos legais para regulamentar a criação, manejo, comércio e transporte de abelhas-sem-ferrão em seus respectivos territórios.

Em Pernambuco, a criação de abelhas, seja por meio da Apicultura ou por meio da Meliponicultura, está presente nas regiões Metropolitana, Zona da Mata, Agreste e Sertão. No registro da Pesquisa Pecuária Municipal - PPM do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2023), a produção de mel no Estado de Pernambuco foi de 1.854.776 quilogramas em 2022, representando 3% da produção nacional, que foi de 60.722 toneladas. O valor bruto da produção de mel para o Estado foi de 29.830.869,11, confirmando o potencial econômico da atividade (IBGE, 2023; Ximenes; Vidal, 2023). A meliponicultura, portanto, constitui uma fonte de renda adicional, especialmente na agricultura familiar e não impede o desenvolvimento de outras atividades pré-estabelecidas culturalmente (Magalhães; Venturieri, 2010).

2.4. ABELHAS E MICRORGANISMOS

A microbiota relacionada às abelhas inclui bactérias, leveduras, fungos filamentosos e vírus. É dividida em vários grupos: simbiontes intestinais, microrganismos da superfície corporal, microrganismos normais da colmeia (do mel, do pólen, das células de cria, da cera e da própolis) e a patosfera (Schwarz; Huang; Evans, 2015; Smutin *et al.*, 2022). Esses microrganismos irão interagir positivamente, através da fermentação do néctar e maturação do pólen, na produção de moléculas antimicrobianas e nutritivas para as abelhas (Paludo *et al.*, 2018; Menegatti *et al.*, 2018); e negativamente, como patógenos oportunistas (Fünfhaus; Ebeling; Genersch, 2018; Ullah, 2021). O microbioma das abelhas sem ferrão apresenta uma notável variabilidade em termos de composição, diversidade e uniformidade em comparação com as abelhas dos gêneros *Apis* e *Bombus* (Kwong *et al.*, 2017).

Os simbiontes bacterianos das abelhas (*lato sensu*) não se restringem ao sistema digestivo, estão presentes em toda a colmeia, desempenhando um papel importante na formação de produtos apícolas, produzindo várias enzimas (lipases, proteases, aminopeptidases e glicosidases) e convertendo matérias-primas de produtos apícolas em mais produtos digestíveis para armazenamento (Gilliam; Roubik; Lorenz, 1990; Dharampal *et al.*, 2020). *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces*, *Streptococcus* e

Fructobacillus são exemplos de gêneros bacterianos frequentemente encontrados relacionados às abelhas (Díaz *et al.*, 2017; Ngalimat *et al.*, 2019). Zulkhairi Amin *et al.* (2020) verificaram que certos *Bacillus* pareciam contribuir para a proteção de seus hospedeiros contra patógenos. Santos *et al.* (2022), relataram que bactérias pertencentes aos gêneros *Enterococcus*, *Providencia*, *Serratia* e *Vagococcus*, encontradas no alimento larval de *Tetragonisca angustula* e *Melipona* spp., produziam substâncias antimicrobianas contra patógenos Gram-positivos e Gram-negativos. Em contraste, também existem bactérias, como *Lysinibacillus sphaericus*, que são causadoras de doenças nas abelhas (Fünfhaus; Ebeling; Genersch, 2018).

Em relação aos vírus, os estudos até então realizados foram direcionados a questões de sanidade, com investigação de vírus responsáveis pela paralisia aguda das abelhas (ABPV), o vírus da asa deformada (DWV) e o vírus da célula rainha negra (BQCV) (Alvarez *et al.*, 2018; Guimarães-Cestaro *et al.*, 2020). Por outro lado, foram documentados 24 vírus em abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.), sendo a grande maioria deles de RNA de cadeia positiva, pertencentes à família Picornaviridae (Alvarez *et al.*, 2018). Muitos desses vírus patogênicos que afetam as abelhas causam infecções assintomáticas e não têm impacto detectável nas colônias infectadas (McMenamin; Genersch, 2015). No entanto, a presença de certos vírus foi relacionada ao "distúrbio do colapso da colônia (CCD)", uma doença grave que tem ocasionado o desaparecimento de populações de abelhas (Brutscher; McMenamin; Flenniken, 2016). Devido a isso, o estudo epidemiológico desses vírus tornou-se uma questão de vital importância. Quando se refere às abelhas nativas, os estudos ainda são mais escassos.

Diversas espécies de fungos compõem a micobiota das abelhas, com destaque para as leveduras, que ajudam a preservar alimentos armazenados por meio da secreção de enzimas (Echeverrigaray *et al.*, 2021). Além disso, fungos filamentosos estão envolvidos na síntese de biomoléculas que auxiliam no desenvolvimento das abelhas. Estudos mostram que fungos são essenciais para o desenvolvimento das larvas e pupas de abelhas, fornecendo nutrientes vitais (Paludo *et al.*, 2019). Portanto, a interação entre diferentes espécies de fungos pode ser fundamental para a sobrevivência das abelhas sem ferrão.

2.5. FUNGOS ASSOCIADOS ÀS ABELHAS

Os fungos são um grupo extremamente diverso que podem ser encontrados em todos os nichos ecológicos. Eles desempenham um papel fundamental na ciclagem de nutrientes, por meio da decomposição de detritos vegetais. A evolução e a filogenia dos táxons fúngicos são cada vez mais pesquisadas por estudos filogenéticos. Atualmente, existem cerca de 156 mil espécies de fungos descritas, classificadas em 19 filos (Species Fungorum, 2023; Wijayawardene *et al.*, 2022). Entretanto, estima-se que a diversidade global seja de 2,2 a 3,8 milhões de espécies (Hawksworth; Lücking, 2017).

A literatura demonstra que diferentes espécies de fungos compõem a diversidade da microbiota das abelhas (Daniel *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2016, 2017, 2018, 2022; Souza *et al.*, 2018; Tiago *et al.*, 2022; de Paula *et al.*, 2023). O papel das leveduras é semelhante às funções bacterianas, ou seja, podem secretar enzimas que convertem substâncias de alimentos armazenados e ajudam a preservá-los (Echeverrigaray *et al.*, 2021). Os fungos filamentosos também estão envolvidos na síntese de biomoléculas que ajudam no desenvolvimento das abelhas (Paludo *et al.*, 2019).

Um exemplo da relação entre fungos e abelhas sem ferrão foi relatado por Menezes *et al.* (2015). Esses pesquisadores verificaram uma associação entre *Monascus* sp. e a abelha *Scaptotrigona depilis*, e evidenciaram que o crescimento do micélio fúngico no alimento fornecido dentro das células da cria desempenham um papel crucial no desenvolvimento larval dessas abelhas. No estudo realizado por Paludo *et al.* (2018) foi demonstrado que o fungo alimento, inicialmente identificado como *Monascus* sp., seria *Zygosaccharomyces* sp., e que os precursores de esteróis provenientes dessa levedura são essenciais no desenvolvimento das pupas de abelhas. Na ausência desse fungo, a sobrevivência das larvas cai para apenas 8%, uma vez que o tecido fúngico fornece os ergosteróis necessários para a pupação (Menezes *et al.* 2015, Paludo *et al.* 2018). Com o avanço da pesquisa, Paludo *et al.* (2019) demonstraram que *Candida* sp. e *Monascus ruber* interagem com o “fungo alimento” (*Zygosaccharomyces* sp.) por meio da produção de moléculas que modulam seu crescimento, mantendo o fungo em níveis benéficos para as larvas. Essas interações, portanto, podem estar envolvidas na sobrevivência das abelhas sem ferrão.

2.5.1. Leveduras associadas a abelhas nativas

Os ninhos das abelhas possuem uma arquitetura que proporciona um ambiente propício para o crescimento de leveduras, pois são construídos em troncos ocos de árvores, criando condições úmidas e quentes que favorecem o desenvolvimento das leveduras e outros microrganismos. As altas contagens de leveduras nos substratos relacionados às abelhas sugerem que os microrganismos são metabolicamente ativos e que as enzimas produzidas por eles podem ser fundamentais na transformação dos materiais coletados e levados para dentro dos ninhos, melhorando a qualidade nutricional (Rosa *et al.*, 2003; Vollet-Neto *et al.*, 2017). Um estudo realizado por Camargo *et al.* (1992) com a abelha sem ferrão *Ptilotrigona lurida*, relatou que leveduras do gênero *Candida* desenvolvem-se sobre o pólen armazenado e promovem a desidratação do mesmo, sendo um processo importante para evitar a deterioração e prevenir que outros organismos, tais como as moscas da família *Phoridae*, consumam o pólen e causem danos à colônia.

Em geral, as leveduras isoladas de amostras de mel de abelhas sem ferrão demonstraram alta osmotolerância (Echeverrigaray *et al.*, 2021). Certas leveduras são encontradas em partes de flores e, portanto, são recuperadas dos corpos das abelhas adultas após o forrageamento (Costa Neto; Moraes, 2020). Outras são isoladas das células de cria (Paludo *et al.*, 2018) e microhabitats do ninho (Barbosa *et al.*, 2016; Rosa *et al.*, 2003). Por exemplo, a célula de cria de *Scaptotrigona depilis* abriga *Zygosaccharomyces* sp. que fornece precursores de esteróis necessários para a metamorfose desta abelha (Paludo *et al.* 2018, 2019).

O gênero *Starmerella* é amplamente reconhecido como o grupo predominante de leveduras encontradas em abelhas sem ferrão. Este gênero possui aproximadamente 50 espécies, sendo a maioria identificadas como associadas a diferentes espécies de abelhas e seus habitats florais (Daniel *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2018). Estudos indicam que este gênero apresenta características metabólicas distintas, como a preferência por frutose (frutofilia) (Gonçalves, *et al.*, 2020) e a capacidade de produzir soforolipídios (glicolipídios surfactantes) (Cadorin *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2021).

Teixeira *et al.* (2003) descreveram a levedura *Starmerella meliponinorum* isolada a partir de adultos, do mel, do pólen, do própolis e da lixeira de três espécies de abelhas (*Melipona quadrifasciata*, *M. rufiventris* e *Trigona fulviventris*), no Brasil e uma

na Costa Rica. Daniel *et al.* (2013) também descreveram uma nova espécie de levedura denominada *S. neotropicalis*, ao estudarem a diversidade fúngica de *M. quinquefasciata* no Cerrado de Minas Gerais, no Brasil. Em outro estudo, Echeverrigaray *et al.* (2021) demonstraram que *Starmerella* e *Zygosaccharomyces* foram os gêneros predominantes ao analisar amostras de mel de 17 espécies de abelhas dos gêneros *Nannotrigona*, *Melipona*, *Plebeia*, *Scaptotrigona* e *Tetragonisca* cultivadas no sul do Brasil.

Além de *Starmerella* e *Zygosaccharomyces*, outras leveduras também são relatadas associadas às abelhas sem ferrão e seus substratos. Barbosa *et al.* (2016) estudaram a riqueza de leveduras associadas ao mel das abelhas *Melipona mandacaia*, *M. asilvai*, *Patarmona* sp. e *Scaptotrigona* sp. da Caatinga, no Estado de Pernambuco. Com base nas características morfológicas e fisiológicas, esses autores encontraram espécies de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Pichia* e *Kloeckera*. Outro estudo, mais recente, realizado por Meireles *et al.* (2022), relatou a presença de leveduras no pólen, no mel, no alimento larval e no cerúmen de duas abelhas sem ferrão amazônicas, que pertenciam aos gêneros: *Aureobasidium*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hyphopichia*, *Hanseniaspora*, *Kodamaea*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Wickerhamiella* e *Zygosaccharomyces*, revelando uma grande diversidade de leveduras associadas a abelhas sem ferrão no Brasil.

2.5.2. Fungos filamentosos associados a abelhas nativas

Fungos filamentosos associados às abelhas sem ferrão e seus ninhos geralmente possuem um estilo de vida saprofítico (De Paula *et al.*, 2021). Isso significa que eles se alimentam de matéria orgânica em decomposição encontrada nos ninhos, como resíduos de pólen, cera e outros detritos. Entretanto, algumas espécies de fungos, como *Aspergillus flavus*, também foram relatadas como patógenos oportunistas de abelhas (Evison; Jensen, 2018). Além disso, os esporos fúngicos também podem ser utilizados como recurso alimentar por abelhas sem ferrão (Eltz; Brühl; Görke, 2002), embora o valor nutricional desses esporos seja inferior ao do pólen.

Os fungos filamentosos frequentemente associados às abelhas e seus produtos são predominantemente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monascus* e *Cladosporium* (Rosa *et al.*, 2003; Tiago *et al.* 2022; Barbosa *et al.* 2017; 2018). Altas

contagens desses fungos podem indicar uma introdução recente de esporos pelas próprias abelhas da colônia, ou de forma acidental durante as etapas de coleta, processamento e armazenamento do mel (Snowdon; Cliver, 1996; Snowdon, 1999).

Ao estudarem a ocorrência de fungos filamentosos na superfície corpórea de abelhas mortas da espécie Jandaíra (*Melipona subnitida*), do semiárido nordestino, Ferraz *et al.* (2006) relataram a ocorrência de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Monilia*, *Nigrospora*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Gois *et al.* (2010) observaram a presença dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, além de leveduras e bactérias, ao analisarem amostras de mel de *Melipona scutellaris* no Estado da Paraíba.

Barbosa *et al.* (2018) também relataram espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* obtidas de mel, pólen e interior de ninhos de *M. scutellaris*. Esses autores verificaram que algumas espécies produzem extrólitos bioativos, no entanto, os benefícios de tais compostos para seus hospedeiros não foram determinados.

Espécies pertencentes a outros gêneros fúngicos também foram relatados por Barbosa *et al.* (2017), ao registrarem cinco espécies de *Monascus* em mel, pólen e superfície da colmeia de *M. scutellaris*, e descreverem três espécies novas para a ciência (*Monascus flavipigmentosus*, *M. mellicola* e *M. recifensis*). Souza *et al.* (2018) relataram a ocorrência de espécies fúngicas pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Acremonium* e *Cladosporium* na superfície corporal abelhas sem ferrão (*Melipona* spp.) da região metropolitana de Manaus.

Embora não tenha sido relatado nenhum efeito prejudicial desses fungos para a saúde das abelhas nativas sem ferrão, alguns estudos demonstram que a ocorrência de fungos do gênero *Ascosphaera* em abelhas *Apis mellifera* é preocupante, uma vez que esses fungos podem colonizar as colmeias e causar uma doença conhecida como “cria giz”, que resulta na mumificação de larvas e pupas (Evison, 2015; Evison; Jensen, 2018). Além disso, outras doenças fúngicas, como a aspergilose causada por *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger*, têm sido relatadas em abelhas melíferas (Foley *et al.*, 2014; Evison; Jensen, 2018).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DAS CAIXAS DE CRIAÇÃO

Neste estudo foram utilizadas caixas racionais da *Scaptotrigona* sp. localizadas no Sítio Baixio de Itaúna, no município de Caruaru-PE (8°07'15"S 36°06'40"W). A propriedade está inserida no Bioma Caatinga, caracterizado por clima e vegetação seca. Próximo ao meliponário observou-se um lago, plantação de palma forrageira, arbustos e árvores típicas da região (umbuzeiro, baraúna, imburana, algaroba, etc.). As atividades de coleta foram realizadas com autorização do proprietário e foram devidamente registradas no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados) e no SisBio (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) sob registro nº A06CB1C e nº 91260-1, respectivamente. As coletas foram realizadas com o acompanhamento da Associação Pernambucana de Meliponicultores e Apicultores (APIME), que desde 2014 tem colaborado com pesquisas que buscam conhecer a comunidade de fungos em substratos relacionados a abelhas nativas no Estado de Pernambuco.

3.2. COLETA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS

Amostras de pólen e mel foram coletadas diretamente nos potes de armazenamento no interior das caixas de criação. Os potes selecionados para coleta deveriam estar fechados para que inicialmente fosse realizado o procedimento de limpeza externa com o auxílio de água destilada e álcool 70%, conforme Gilliam, Roubik e Lorenz (1990). A amostragem foi realizada da seguinte forma: 3x3x4, sendo três caixas de criação da espécie de abelha estudada, três potes de pólen e de mel em quatro coletas. Após o processo de higienização externa dos potes, as amostras de pólen (no mínimo 25 g) foram coletadas com auxílio de espátulas esterilizadas; o mel (no mínimo 25 mL), pelo método de sucção com seringas descartáveis; e a superfície do ninho, por meio da fricção do Swab por todo o ninho (Figura 7). As amostras foram armazenadas em tubos tipo Falcon e mantidas em caixas isotérmicas até o processamento no laboratório, realizado em até 24h.

Figura 7. Coleta das amostras no ninho de *Scaptotrigona* sp. A) Coleta do pólen, com o auxílio de uma espátula. B) Coleta do mel, pelo método de sucção com seringa descartável. C) Coleta na superfície do ninho, por meio da fricção do Swab.



Fonte: A autora (2024).

O isolamento dos fungos foi realizado seguindo as recomendações utilizadas por Barbosa *et al.* (2017b). Para o mel e pólen, 25 g de cada amostra foram pesadas e suspensas em 225 mL de água peptonada (0,1%) esterilizada e em seguida submetidas à agitação durante cinco minutos. Após agitação, foram feitas diluições de 1:100 e 1:1000 utilizando água peptonada (0,1%) esterilizada. A partir das diluições, 0,1 mL de cada uma delas foi semeado em meio de Dichloran 18% Glicerol Ágar (DG18) e Extrato de Malte Ágar (MEA) acrescido de cloranfenicol. Os swabs, que foram friccionados por toda superfície de cada colmeia, foram transferidos para novos tubos contendo 10 mL de água peptonada (0,1%) esterilizada e agitados em Vortex durante um minuto para liberação dos esporos fúngicos. Posteriormente, 0,1 mL da suspensão foi semeada nos meios DG18 e MEA. As placas de Petri foram incubadas a temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa do tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) durante um período de 7 a 14 dias, e todo experimento foi realizado em triplicata.

3.3. PURIFICAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Para purificação, os fungos isolados foram transferidos para tubos de ensaio e/ou placas de Petri contendo o meio MEA e incubados a temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa do tipo BOD durante 7 a 14 dias. Para a criopreservação, a biomassa fúngica foi transferida para microtubos com tampas rosqueáveis de 1,5 mL contendo 1 mL de solução criopreservante (0,5 mL de solução fisiológica + 0,5 mL de solução glicerol 60%), e armazenada no freezer a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os isolados fúngicos estão criopreservados na coleção de trabalho “Fungal Work Collection: Fungos Fitopatogênicos e

Biocontroladores (FIBIO)", no Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e Biocontroladores, e na Micoteca URM, ambos no Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

3.4. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Para identificação morfológica, foram observadas as características macroscópicas das colônias (cor, aspecto, consistência, presença de pigmento, etc.), características microscópicas (morfologia de estruturas somáticas e reprodutivas), fisiológicas e bioquímicas utilizando-se metodologia e literatura específicas (como exemplo: Barnett *et al.*, 2003; Samson *et al.* 2010; Kurtzman, Fell, Boekhout, 2011, Barbosa *et al.*, 2017b, 2018). Foi realizada uma triagem morfológica para selecionar os morfotipos de interesse para posterior análise molecular.

3.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

3.5.1. Extração do DNA genômico, amplificação e sequenciamento de fragmentos do DNA

A biomassa dos fungos foi obtida a partir de culturas crescidas em MEA contidos em placas de Petri, mantidas a 25 °C por até sete dias. Para extração do DNA genômico foi utilizado o Kit de purificação de DNA genômico da Promega® (Wizard Genomic DNA Purification Kit) conforme metodologia proposta pelo fabricante. Para os fungos filamentosos as regiões ITS1 e ITS2 foram amplificadas utilizando os *primers* V9G e LS266 (Masclaux *et al.*, 1995). Para as leveduras, os domínios D1/D2 do gene 26S do rDNA foram amplificados usando os *primers* LR5 e LR0R (Vilgalys & Hester 1990). Outros *loci* do DNA, tais como β -tubulina, Calmodulina, *RPB2* e *tef1* foram utilizados de acordo com a prévia análise realizada com as sequências das regiões ITS e LSU, utilizando as recomendações descritas em Samson *et al.* (2010). Os produtos da amplificação foram purificados utilizando um mix das enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina contidas no kit Exo+SAP DPK-100 (Cellco), seguindo as recomendações do fabricante, e posteriormente encaminhados para sequenciamento na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento e Expressão Gênica do Centro de Biociências da UFPE.

3.5.2. Alinhamento das sequências e análise filogenética

Os cromatogramas foram analisados e editados utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.2. Após a edição, todas as sequências foram utilizadas para busca das mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn. As sequências experimentais foram selecionadas com base em artigos recentes de taxonomia. Em seguida, as sequências experimentais foram então alinhadas em conjunto com as recuperadas da base de dados utilizando o programa MAFFT v.7 (Yamada; Tomii; Katoh, 2016) e corrigidas manualmente utilizando o BioEdit. As árvores filogenéticas foram construídas por meio do método de máxima verossimilhança (ML) utilizando RAxML-HPc v. 8.2.12 (Stamatakis 2016) em BlackBox com 1000 reamostragens de bootstrap, por meio do CIPRES science gateway (<http://www.phylo.org/>) (Miller *et al.*, 2010). O modelo de substituição nucleotídica foi obtido usando o jModelTest2 2.1.6 (Darriba & Posada, 2014) no XSEDE via CIPRES. A análise de inferência bayesiana (BI) foi realizada no MrBayes 3.2.7a XSEDE via CIPRES. Nas análises bayesianas, a cada 1.000 gerações foram amostradas, e os primeiros 25% das amostras foram descartados.

3.6. ANÁLISE DOS ÍNDICES DE DIVERSIDADE

As comunidades dos fungos foram avaliadas em termos quantitativos e qualitativos a partir de dados populacionais (frequência de ocorrência, abundância relativa) e sua estruturação, analisada por meio de índices ecológicos (riqueza e diversidade). A frequência de ocorrência das espécies foi estimada segundo a equação: $F_i = J_i/k$, onde F_i = frequência de ocorrência da espécie i , J_i = número de amostras nas quais a espécie i ocorreu, K = número total de amostras. A abundância relativa de cada espécie foi calculada aplicando-se a fórmula: $D_i = (N_i/N) \times 100$, onde D_i = abundância da espécie i ; N_i = número de UFC da espécie i ; N = número total de UFC. De acordo com esta fórmula, as abundâncias relativas das espécies foram classificadas como: $< 0,5\%$ = raras, $\geq 0,5 < 1,5\%$ = ocasionais, $\geq 1,5 < 3,0\%$ = comuns, $\geq 3,0\%$ = abundantes. Para o cálculo da diversidade foi utilizado o índice de diversidade de Shannon-Wiener na base logarítmica 2: $H' = \sum (p_i) \times (\log_2 p_i)$, onde p_i = abundância relativa de cada espécie (Shannon; Weaver, 1949). Os diagramas aluviais foram gerados usando o RAWGraphs (<https://app.rawgraphs.io/>). O diagrama de Venn foi construído usando o InteractiVenn (<http://www.interactivenn.net/>) (Herbele *et al.*, 2015).

3.7. DEPÓSITO DOS FUNGOS NA MICOTECA URM E NO HERBÁRIO URM

Alguns isolados foram depositados na Coleção de Culturas URM. Foram seguidos os protocolos estabelecidos pela coleção para cada grupo de fungo a ser depositado, o mesmo se aplica para as lâminas permanentes e fotografias das estruturas dos isolados no Herbário URM (Herbário Pe. Camille Torrand - <http://inct.florabrasil.net/herbario-urm/>).

3.8. DEPÓSITO DAS SEQUÊNCIAS NO *NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION*

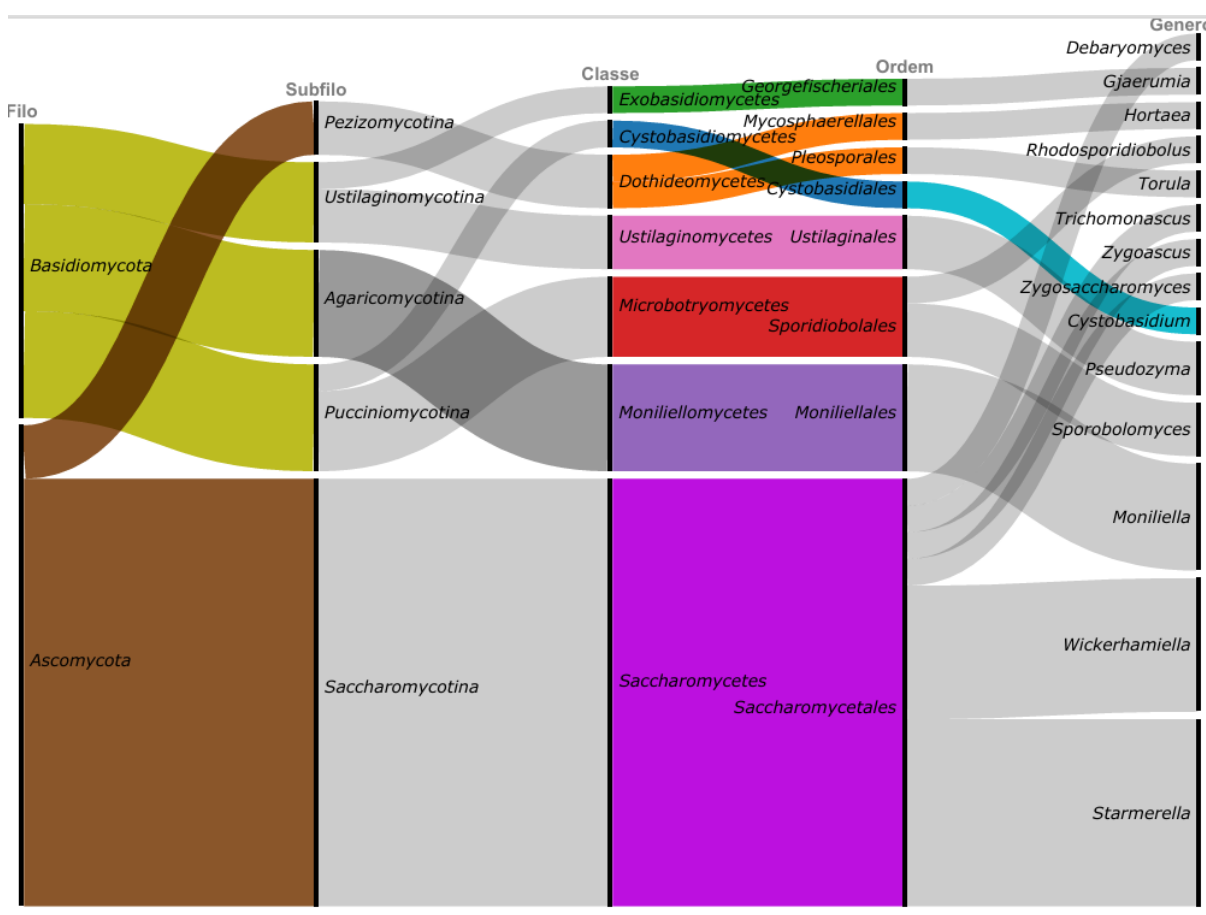
As sequências e anotações relacionadas, utilizadas para a identificação dos fungos, foram depositadas no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O voucher recebido para cada sequência depositada foi associado às informações de depósito da Micoteca, permitindo que os usuários realizem consultas nestas plataformas a fim de levantar dados para análises futuras da diversidade genética de fungos tropicais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 336 isolados fúngicos foram obtidos do mel, do pólen e da superfície da colmeia de *Scaptotrigona* sp., sendo 143 leveduras e 193 fungos filamentosos. Os isolados foram agrupados morfológicamente por características macroscópicas e microscópicas confirmadas por microcultivos em lâminas e/ou análises filogenéticas. A grande maioria dos táxons identificados pertence ao filo *Ascomycota*, que representa o grupo mais expressivo em diversidade dentro do reino Fungi.

As leveduras identificadas pertencem a 14 gêneros, distribuídos entre os filios *Ascomycota* (109 isolados) e *Basidiomycota* (34 isolados) (Figura 8). Os subfilos mais predominantes foram *Saccharomycotina*, dentro de *Ascomycota*, e *Agaricomycotina*, no filo *Basidiomycota*.

Figura 8. Diagrama aluvial ilustrando a classificação taxonômica das leveduras isoladas neste estudo.



Fonte: A autora (2024).

Segundo Blackwell (2017), as leveduras associadas aos insetos incluem *Ascomycota* (*Saccharomycotina*, *Pezizomycotina*) e alguns *Basidiomycota*. Ainda

segundo essa autora, os insetos não possuem a capacidade de sintetizar esteróis, várias vitaminas e enzimas essenciais para a degradação dos materiais presentes na parede celular das plantas, por isso, muitos insetos contam com a assistência de microrganismos, incluindo fungos, para atingirem o sucesso em seu ciclo de vida.

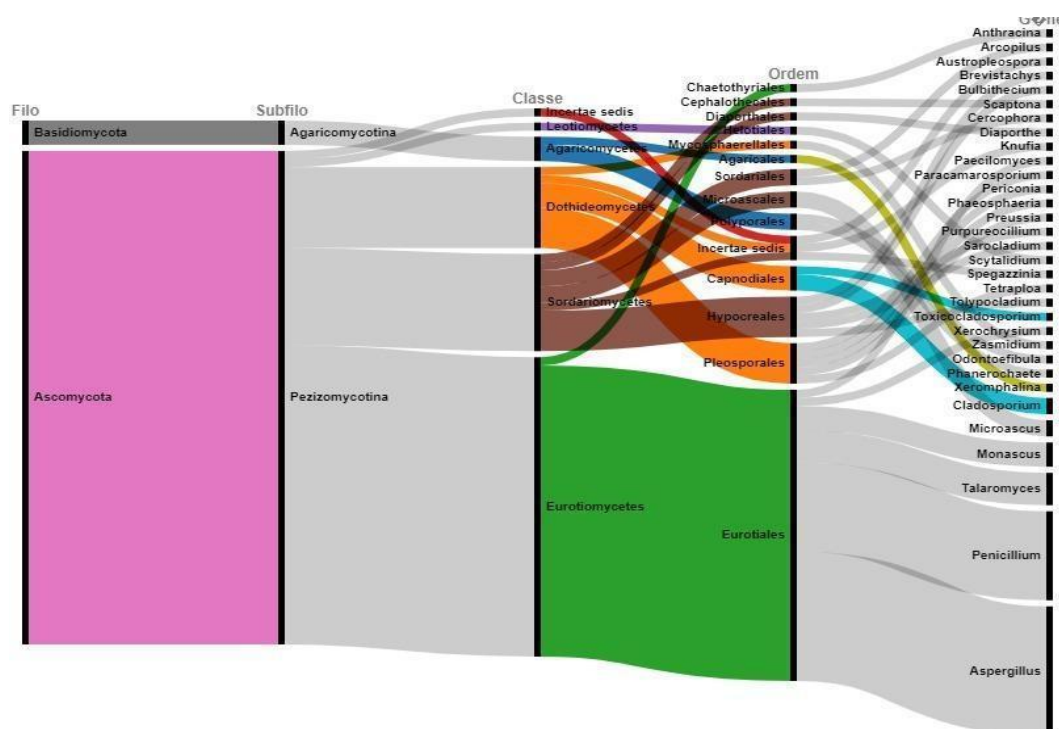
Saccharomycotina é conhecido como o grupo das leveduras, por reproduzir-se assexuadamente por gemulação e não produzir ascocarpos, e engloba as principais espécies isoladas de abelhas sem ferrão (ex. *Starmerella*). Alguns representantes do subfilo *Pezizomycotina* apresentam crescimento semelhante às leveduras ou são dimórficos, mudando entre brotamento e crescimento de hifas, dependendo das condições ambientais. Essas alterações ocorrem quando certos fungos dimórficos assumem a morfologia de levedura em associação com um inseto hospedeiro (Blackwell, 2017). Muitas espécies de *Basidiomycota* também apresentam dimorfismo, alternando entre estágios de levedura e hifas ao longo de seu ciclo de vida (Bandoni, 1995). As leveduras são encontradas nos três subfilos de *Basidiomycota* (Boekhout et al., 2011). *Cryptococcus* (*Agaricomycotina*), *Rhodotorula* (*Pucciniomycotina*) e *Pseudozyma* (*Ustilaginomycotina*) são exemplos de leveduras relatadas em abelhas sem ferrão (Rosa et al., 2003).

Em relação aos fungos filamentosos, os 193 isolados foram identificados entre 32 gêneros (Figura 9). A maioria dos isolados pertence ao filo *Ascomycota*, sendo todos pertencentes a *Pezizomycotina*, com *Eurotiales* sendo o grupo com maior número de representantes.

O estudo de Wynns (2015) evidencia que a presença de estruturas de frutificação altamente reduzidas em *Pezizomycotina* indica que alguns gêneros de fungos evoluíram de maneira convergente com insetos, notavelmente *Ascosphaera*, *Bettsia* e *Eremascus*, especializados em abelhas melíferas e solitárias. Embora esses fungos não tenham sido registrados em abelhas sem ferrão, esse dado é significativo no contexto geral sobre associações de fungos e abelhas.

Ainda sobre os fungos filamentosos, apenas três isolados pertencem ao filo *Basidiomycota* e subfilo *Agaricomycotina* (*Odontoefibula orientalis*, *Phanerochaete* sp. e *Xeromphalina* sp.), e são registrados pela primeira vez em ninhos de abelhas sem ferrão. Este subfilo contém a maioria das espécies descritas de basidiomicetos, incluindo cogumelos que atuam como sapróbios ou estabelecem simbiose micorrízica com plantas, até fungos gelatinosos e uma ampla diversidade de leveduras (Hibbett, 2006).

Figura 9. Diagrama aluvial ilustrando a classificação taxonômica dos fungos filamentosos isolados neste estudo



Fonte: A autora (2024).

Os dados de frequência absoluta e relativa dos fungos isolados estão apresentados na Tabela 1. Foram registradas 85 espécies, sendo classificadas como abundantes (7), comuns (8), ocasionais (20) e raras (50) de acordo com a frequência relativa. O padrão de frequência observado é típico de comunidades em que as espécies dominantes no substrato são mais competitivas, resultando na presença de muitas espécies raras. Esse resultado corrobora a ideia de que as comunidades frequentemente contêm algumas espécies abundantes e muitas espécies raras, conforme mencionado por Odum (1969) e Magurran (1988).

Tabela 1. Espécies de fungos isolados do mel, pólen e superfície do ninho (swab) de *Scaptotrigona* sp. Frequência absoluta (fa), frequência relativa (fr%) e classificação da frequência das espécies identificadas.

ESPÉCIE	CÓDIGO	MEL	PÓLEN	SWAB	FA	FR%	CLASS.
<i>Anthracina</i> sp. nov.	FIBIO 010-E4	0	0	1	1	0,3	R
<i>Arcopilus globulus</i>	FIBIO 009-H4	0	1	0	1	0,3	R

<i>Aspergillus aculeatus</i>	FIBIO 009-F9	0	1	0	1	0,3	R
<i>Aspergillus flavus</i>	FIBIO 010-E2	1	0	0	1	0,3	R
<i>Aspergillus brunneoviolaceus</i>	FIBIO 010-E8	3	0	0	3	0,9	O
<i>Aspergillus chevalieri</i>	FIBIO 009-A8	0	1	2	3	0,9	O
<i>Aspergillus gracilis</i>	URM 8723	2	1	0	3	0,9	O
<i>Aspergillus keveii</i>	FIBIO 009-B6	1	0	0	1	0,3	R
<i>Aspergillus nidulans</i>	FIBIO 008-F5	0	1	0	1	0,3	R
<i>Aspergillus micronesiensis</i>	URM 8767	0	1	0	1	0,3	R
<i>Aspergillus penicillioides</i>	FIBIO 010-H2	1	2	7	10	3,0	A
<i>Aspergillus petersonii</i>	FIBIO 010-F1	0	0	3	3	0,9	O
<i>Aspergillus subversicolor</i>	FIBIO 007-F10	0	0	7	7	2,1	C
<i>Aspergillus sydowii</i>	FIBIO 007-C3	1	1	2	4	1,2	O
<i>Aspergillus</i> sp. nov. 1	FIBIO 007-H5	1	0	0	1	0,3	R
<i>Aspergillus</i> sp. nov. 2	FIBIO 008-B8	0	1	0	1	0,3	R
<i>Aspergillus</i> sp. nov. 3	FIBIO 010-H9	1	0	0	1	0,3	R
<i>Aspergillus</i> sp. nov. 4	FIBIO 010-I1	1	0	0	1	0,3	R
<i>Austropleospora</i> sp.	FIBIO 008-B4	0	0	1	1	0,3	R
<i>Brevistachys</i> sp.	FIBIO 010-D4	0	1	0	1	0,3	R
<i>Bulbithecium</i> sp.	FIBIO 009-I5	0	0	1	1	0,3	R
<i>Cercophora</i> sp.	FIBIO 010-C3	0	1	0	1	0,3	R
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	FIBIO 009-A9	2	0	0	2	0,6	O
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	FIBIO 008-G4	1	1	1	3	0,9	O
<i>Cladosporium harfordiae</i>	FIBIO 007-C10	0	0	2	2	0,6	O
<i>Cladosporium</i> sp. nov. 1	FIBIO 010-E1	2	0	6	8	2,4	C
<i>Diaporthe</i> sp.	FIBIO 010-E6	1	0	0	1	0,3	R
<i>Knufia</i> sp. nov.	FIBIO 010-C2	0	0	2	2	0,6	O
<i>Microascus croci</i>	FIBIO 010-E3	1	0	0	1	0,3	R

<i>Microascus</i> sp.	FIBIO 008-J7	0	0	1	1	0,3	R
<i>Monascus mellicola</i>	FIBIO 008-H3	2	5	15	22	6,5	A
<i>Monascus pilosus</i>	FIBIO 009-B8	0	1	0	1	0,3	R
<i>Monascus</i> sp. nov.	FIBIO 010-B4	0	1	2	3	0,9	O
<i>Odontoefibula orientalis</i>	FIBIO 009-B3	0	0	1	1	0,3	R
<i>Paecilomyces formosus</i>	FIBIO 007-D4	0	0	1	1	0,3	R
<i>Penicillium austrosinicum</i>	FIBIO 010-G10	1	0	0	1	0,3	R
<i>Penicillium brasilianum</i>	FIBIO 010-I4	0	1	0	1	0,3	R
<i>Penicillium chermesinum</i>	FIBIO 010-H4	1	0	1	2	0,6	O
<i>Penicillium allii-sativi</i>	FIBIO 007-H6	2	2	2	6	1,8	C
<i>Penicillium citrinum</i>	FIBIO 009-G8	6	7	8	21	6,3	A
<i>Penicillium copticola</i>	URM 8766	2	0	0	2	0,6	O
<i>Penicillium steckii</i>	FIBIO 007-H10	1	1	2	4	1,2	O
<i>Penicillium</i> sp. nov. 1	FIBIO 010-A7	1	0	0	1	0,3	R
<i>Penicillium</i> sp. nov. 2	FIBIO 010-D5	0	0	1	1	0,3	R
<i>Penicillium</i> sp. nov. 3	FIBIO 010-H3	1	0	0	1	0,3	R
<i>Penicillium oxalicum</i>	FIBIO 010-J7	1	0	0	1	0,3	R
<i>Paracamarosporium</i> sp.	FIBIO 008-H4	0	0	2	2	0,6	O
<i>Periconia</i> sp.	FIBIO 010-C1	0	1	0	1	0,3	R
<i>Phaeosphaeria</i> sp.	FIBIO 010-E7	1	0	0	1	0,3	R
<i>Phanerochaete</i> sp.	FIBIO 010-B7	0	1	0	1	0,3	R
<i>Preussia</i> sp.	FIBIO 009-H5	0	1	0	1	0,3	R
<i>Purpureocillium</i> sp.	FIBIO 008-A8	1	0	0	1	0,3	R
<i>Sarocladium</i> sp.	FIBIO 010-I2	1	0	0	1	0,3	R
<i>Scaptona ramosa</i> gen. nov. et sp. nov.	URM 8721	0	0	2	2	0,6	O
<i>Scytalidium</i> sp.	FIBIO 010-I6	0	1	0	1	0,3	R

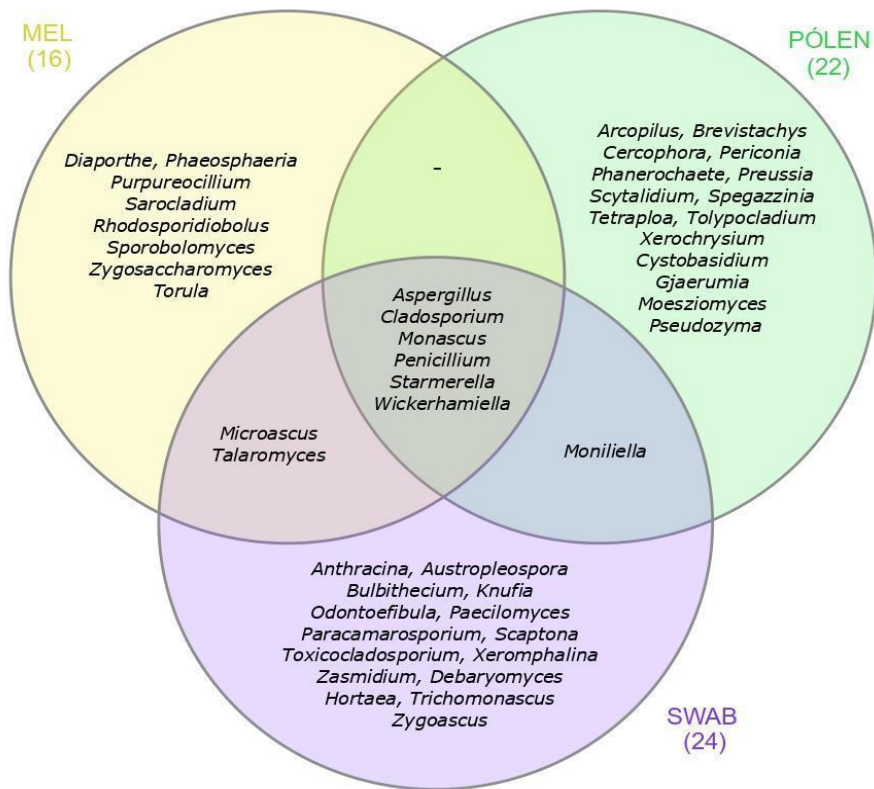
<i>Spegazzinia</i> sp.	FIBIO 009-H10	0	1	0	1	0,3	R
<i>Talaromyces rubrifaciens</i>	FIBIO 010-H5	1	0	0	1	0,3	R
<i>Talaromyces scorteus</i>	FIBIO 007-C8	0	0	34	34	10,1	A
<i>Talaromyces</i> sp. nov. 1	FIBIO 010-J1	1	0	0	1	0,3	R
<i>Tetraploa</i> sp.	FIBIO 009-H6	0	1	0	1	0,3	R
<i>Tolypocladium</i> sp.	FIBIO 010-J8	0	1	0	1	0,3	R
<i>Toxicocladosporium</i> sp.	FIBIO 008-J6	0	0	2	2	0,6	O
<i>Xerochrysium xerophilum</i>	FIBIO 010-J9	0	2	0	2	0,6	O
<i>Xeromphalina</i> sp.	FIBIO 007-F5	0	0	1	1	0,3	R
<i>Zasmidium</i> sp.	FIBIO 009-E1	0	0	1	1	0,3	R
<i>Cystobasidium</i> sp.	FIBIO 009-G4	0	1	0	1	0,3	R
<i>Debaryomyces</i> sp.	FIBIO 007-B7	0	0	1	1	0,3	R
<i>Gjaerumia</i> sp.	FIBIO 010-I3	0	1	0	1	0,3	R
<i>Hortaea werneckii</i>	FIBIO 008-D2	0	0	5	5	1,5	C
<i>Moniliella</i> sp. nov. 1	FIBIO 007-G4	0	0	9	9	2,7	C
<i>Moniliella</i> sp. nov. 2	FIBIO 008-D3	0	1	6	7	2,1	C
<i>Moniliella</i> sp. nov. 3	FIBIO 010-G7	0	0	3	3	0,9	O
<i>Pseudozyma aphidis</i>	FIBIO 007-J6	0	3	0	3	0,9	O
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	FIBIO 009-E4	0	1	0	1	0,3	R
<i>Rhodosporidiobolus poonsookiae</i>	FIBIO 010-J2	1	0	0	1	0,3	R
<i>Sporobolomyces bannaensis</i>	FIBIO 010-H6	1	0	0	1	0,3	R
<i>Sporobolomyces sucorum</i>	FIBIO 010-H7	1	0	0	1	0,3	R
<i>Starmerella apicola</i>	FIBIO 007-A1	6	11	25	42	12,5	A
<i>Starmerella etchellsii</i>	FIBIO 007-B1	5	2	11	18	5,4	A
<i>Starmerella</i> sp. nov.	FIBIO 007-D8	1	1	5	7	2,1	C
<i>Torula</i> sp.	FIBIO 008-A6	1	0	0	1	0,3	R

<i>Trichomonascus ciferrii</i>	FIBIO 007-A6	0	0	2	2	0,6	O
<i>Wickerhamiella versatilis</i>	FIBIO 009-A5	10	7	16	33	9,8	A
<i>Zygoascus</i> sp. nov.	FIBIO 009-A2	0	0	5	5	1,5	C
<i>Zygosaccharomyces</i> sp. nov.	FIBIO 009-C5	1	0	0	1	0,3	R
TOTAL		69	68	199	336		

Fonte: A autora (2024).

Uma maior densidade, dada pela contagem do número de indivíduos, foi encontrada na superfície do ninho (199 isolados, 88 leveduras e 111 filamentosos), seguido pelo mel (69 isolados, 27 leveduras e 42 filamentosos) e, por último, o pólen (68 isolados, 28 leveduras e 40 filamentosos) (Tabela 1). A Figura 10 exibe um diagrama de Venn que ilustra os gêneros de fungos exclusivos e compartilhados entre os três substratos.

Figura 10. Diagrama de Venn mostrando os gêneros de fungos exclusivos e compartilhados entre o mel, pólen e superfície do ninho de *Scaptotrigona* sp.



Fonte: A autora (2024).

Os fungos podem ser introduzidos nos ninhos de diferentes formas, incluindo a entrada por meio de correntes de ar, da água, pelas abelhas durante o forrageamento e até mesmo pelo homem ao manipular as colmeias. Essa variedade de fontes pode explicar a presença desses organismos apenas em um dos substratos e em quantidades reduzidas. *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Monascus*, *Penicillium*, *Starmerella* e *Wickerhamiella* foram os gêneros fúngicos compartilhados entre os três substratos analisados e são comumente isolados de diferentes espécies de abelhas sem ferrão e seus substratos (Echeverrigaray *et al.* 2021; Tiago *et al.* 2022; Santos *et al.* 2023). Enquanto que a maioria dos fungos que estão presentes em apenas um dos microhabitats representam o primeiro registro em substratos relacionados às abelhas nativas.

Os índices ecológicos calculados revelaram que os valores de diversidade (H') são semelhantes entre os substratos analisados (Tabela 2). A partir desses valores, podemos dizer que há uma distribuição equitativa de abundância entre as espécies presentes nos substratos.

Tabela 2. Densidade e Diversidade de Shannon-Wiener (H') dos fungos isolados por substrato (mel, pólen e superfície do ninho de *Scaptotrigona* sp.).

Substratos	Mel	Pólen	Superfície do ninho
Densidade	69	68	199
Diversidade	3,26	3,25	3,16

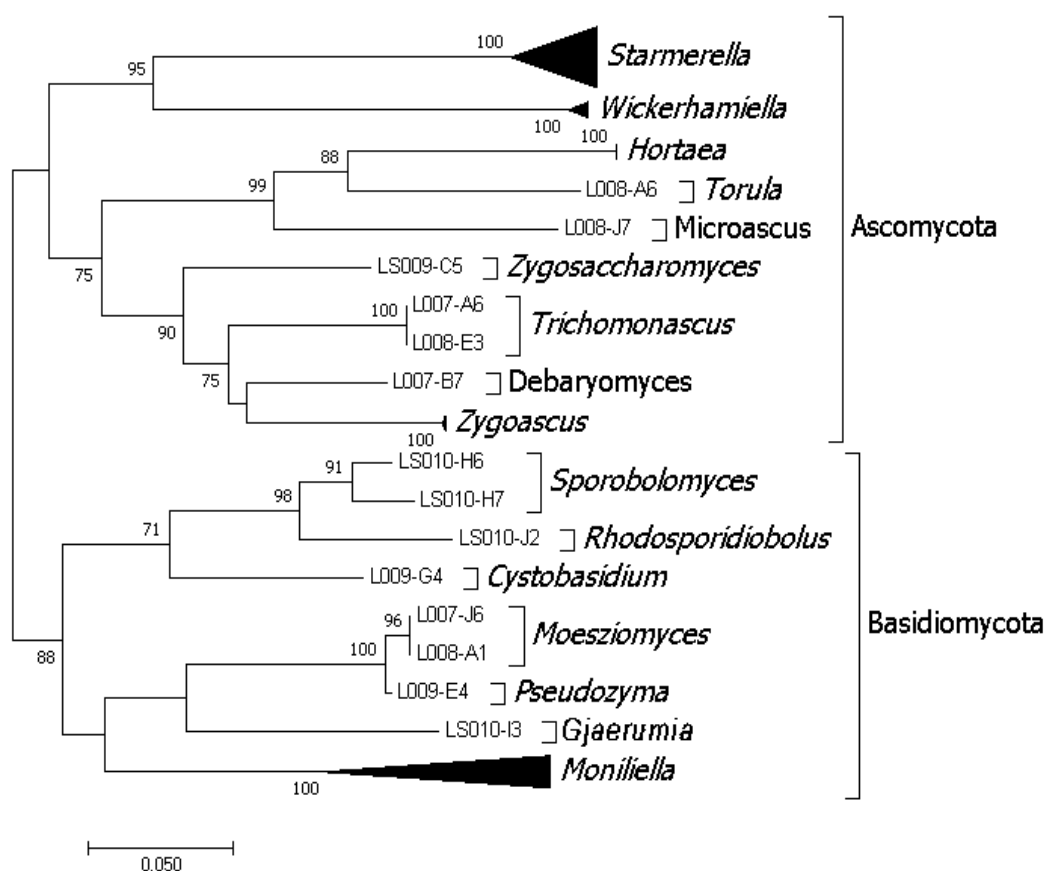
Fonte: A autora (2024).

A falta de estudos abrangentes sobre a diversidade de fungos em substratos relacionados às abelhas nativas dificulta a viabilidade de desenvolver uma argumentação comparativa aprofundada. Diante dessa limitação, este estudo foca na compreensão da ocorrência dos principais grupos de fungos isolados e na identificação de espécies fúngicas. Essa estratégia visa contribuir para o preenchimento das lacunas de conhecimento existentes e proporcionar uma compreensão mais abrangente da micobiota relacionada às abelhas nativas, promovendo avanços significativos na compreensão da ecologia desses ecossistemas específicos.

Os 143 isolados de leveduras corresponderam a 21 espécies identificadas, sendo 13 atribuídas ao filo *Basidiomycota* e oito a *Ascomycota*. Dentre elas, seis espécies não agruparam nos clados de espécies descritas, então acredita-se que sejam novas espécies e serão publicadas posteriormente.

A análise da sequência de nucleotídeos dos domínios D1/D2 da subunidade maior (26S) do gene do rDNA foi utilizada para diferenciar a maioria das espécies de leveduras. Essa região possui cerca de 600 nucleotídeos e foi utilizada por Kurtzman e Robnett (1998), e por Fell *et al.* (2000), para criar um banco de dados universal de sequências para a identificação de leveduras de ascomicetos e basidiomicetos. A Figura 11 apresenta a reconstrução filogenética global com a região LSU para as leveduras, pois esse é o barcorde comum para todos nesse grupo de isolados. Na Figura 12 pode-se observar culturas de algumas espécies identificadas no presente estudo.

Figura 11. Agrupamento dos isolados por gênero usando análise de máxima verossimilhança (ML) para o domínio D1/D2 do gene 26S do rDNA de leveduras isoladas a partir de amostras de mel, pólen e da superfície de ninhos de *Scaptotrigona* sp. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós.



Fonte: A autora (2024).

Figura 12. Colônias de algumas espécies de leveduras obtidas em substratos relacionados à abelha *Scaptotrigona* sp. Cultivos em meio Ágar Sabouraud por 14 dias a 25 °C (da esquerda para a direita): *Starmerella apicola*, *Trichomonascus ciferrii*, *Wickerhamiella versatilis* e *Zygoascus* sp. nov.



Fonte: A autora (2024).

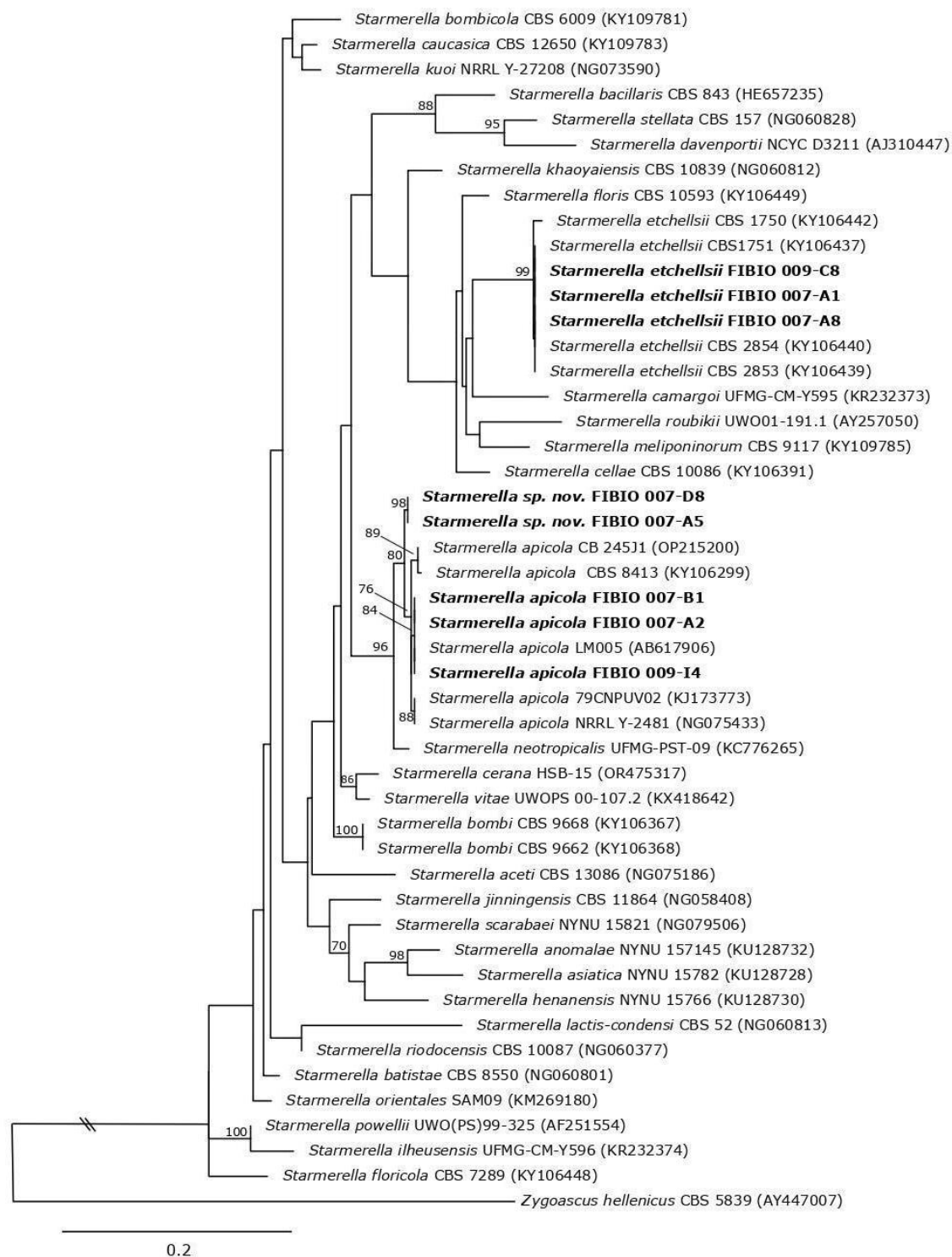
Neste estudo, o gênero *Starmerella* apresentou maior ocorrência e esteve presente nos três substratos. Das três espécies isoladas, uma apresentou caracteres moleculares distintos das outras espécies que tinham descrição taxonômica válida e foi considerada como possível nova espécie, filogeneticamente posicionada próximo a *Starmerella apicola* (Figura 13). Dentre elas, *Starmerella apicola* apresentou a maior frequência relativa (12,5 %), seguida de *Starmerella etchellsii* (5,4 %) e *Starmerella* sp. nov. (2,1 %).

As leveduras deste gênero estão frequentemente associadas a abelhas e outros *Hymenoptera*, assim como a substratos com elevada concentração de açúcar (Rosa *et al.*, 2003). *Starmerella bombicola*, por exemplo, foi documentada em associação com *Apis florea*, bem como com plantas durante o período de floração e insetos polinizadores (Brysch-Herzberg, 2004; Golonka, 2002; Rosa; Lachance, 1998; Rosa *et al.*, 2003). Outra espécie, *S. meliponinorum*, foi isolada em meliponíneos tropicais em diferentes países (Lachance, 2011).

Nas abelhas sem ferrão, *S. etchellsii* e *S. apicola* foram observadas em substratos associados a *Tetragonisca angustula* e *Melipona quadrifasciata*, respectivamente (Rosa *et al.*, 2003). Além disso, Teixeira *et al.* (2003) identificaram a levedura *S. meliponinorum*, isolada de adultos, mel, pólen, própolis e lixeira de três espécies de abelhas (*Melipona quadrifasciata*, *M. rufiventris* e *Trigona fulviventrís*). Daniel *et al.* (2013) descreveram uma nova espécie de levedura, denominada *S. neotropicalis*, ao investigar a diversidade fúngica em *M. quinquefasciata* no Cerrado de Minas Gerais, Brasil. Em um estudo adicional, Echeverrigaray *et al.* (2021) destacaram que, ao analisar amostras de mel de 17 espécies de abelhas dos gêneros

Nannotrigona, *Melipona*, *Plebeia*, *Scaptotrigona* e *Tetragonisca* cultivadas no sul do Brasil, *Starmerella* foi um dos gêneros predominantes.

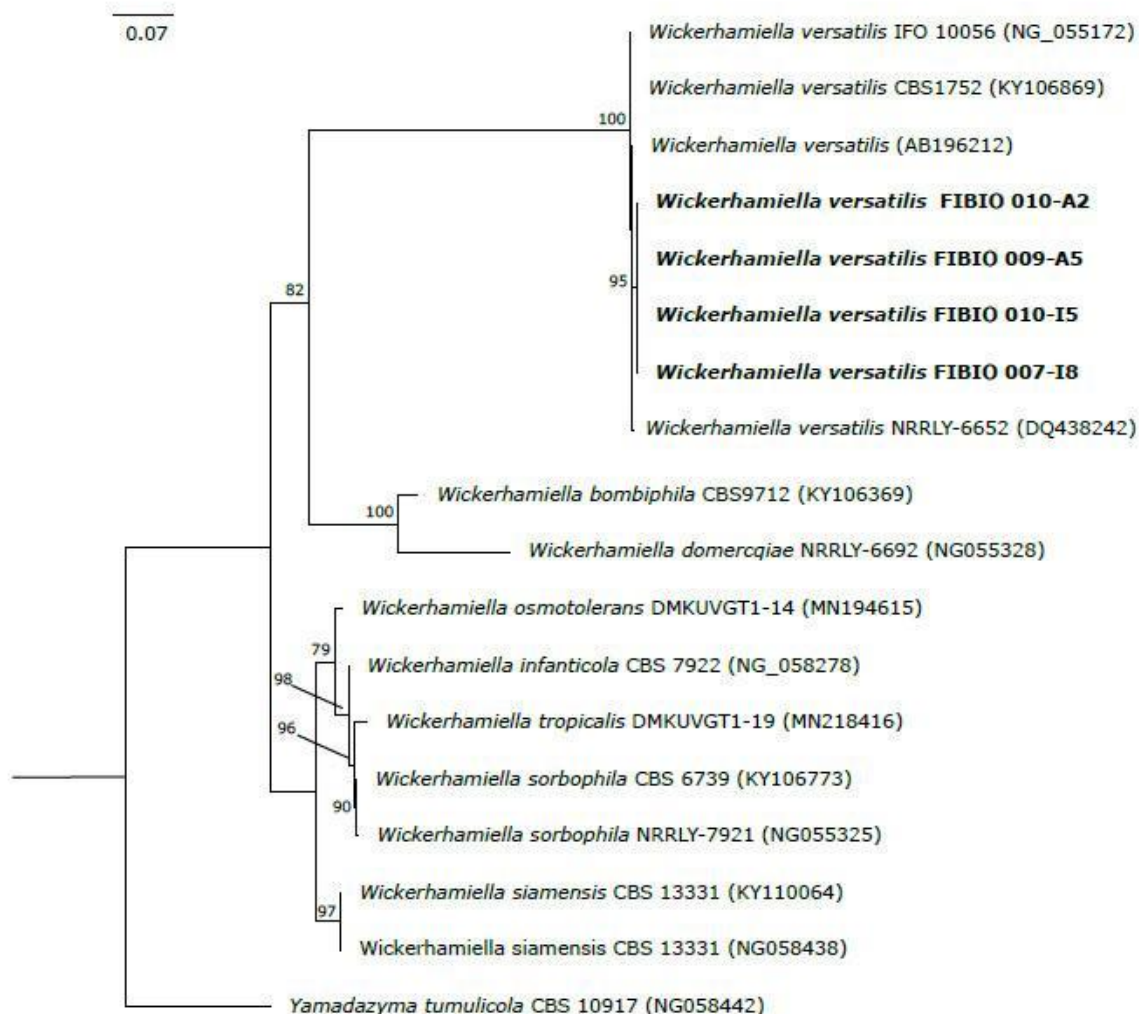
Figura 13. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências 26S de *Starmerella*. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. *Zygoascus hellenicus* CBS 5839 foi escolhido como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós.



Fonte: A autora (2024).

Wickerhamiella, representado apenas pela levedura *W. versatilis* (9,8 %) (Figura 14), foi o segundo gênero e espécie mais frequentes entre as leveduras identificadas neste estudo. Embora algumas espécies desse gênero apresentem ampla distribuição geográfica, a maioria é restrita, com prevalência nos Neotrópicos e na Ásia (de Vega *et al.*, 2017; Lachance; Kurtzman, 2011). As espécies de *Wickerhamiella* são nutricionalmente especializadas e frequentemente isoladas de flores, frutos, folhas e insetos associados (Lachance; Kurtzman, 2011). *Wickerhamiella versatilis* foi identificada em abelhas adultas e própolis de *Frieseomelitta varia* (Rosa *et al.*, 2003) e em amostras de mel de *Plebeia nigriceps* (Echeverrigaray *et al.*, 2021).

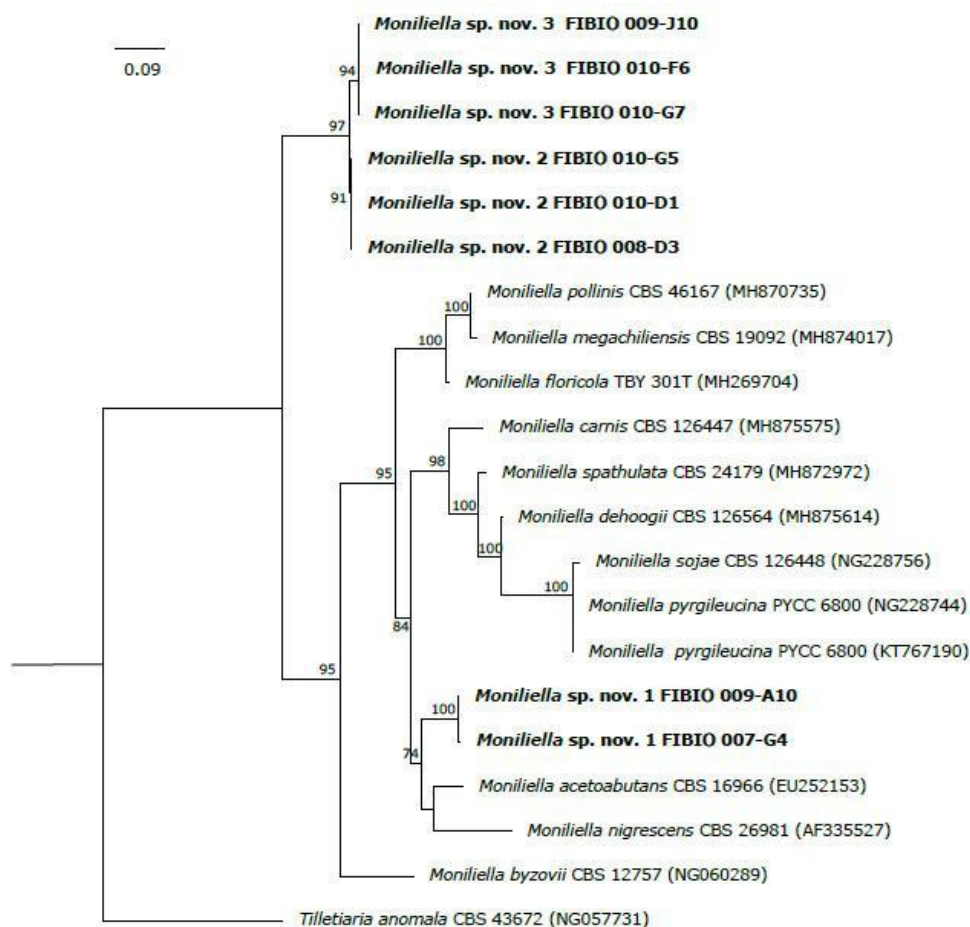
Figura 14. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências 26S de *Wickerhamiella*. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. *Yamadazyma tumulicola* CBS 10917 foi escolhida como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós.



Fonte: A autora (2024).

Moniliella inclui os fungos conhecidos por leveduras negras, pertencentes ao filo *Basidiomycota*, e também foi um gênero bastante representativo neste estudo. As três espécies pertencentes a este gênero foram classificadas como comuns ou ocasionais. A partir das análises moleculares, elas foram consideradas prováveis novas espécies (Figura 15) e serão descritas posteriormente. Leveduras deste gênero são comumente isoladas de plantas (Thanh; Hien, 2019) e estão entre os raros membros de *Basidiomycota* que demonstram xerofília e atividade de fermentação (de Hoog; Smith; Rosa, 2011). Este gênero foi observado na superfície corporal das abelhas *Melipona* spp. da região metropolitana de Manaus (Souza et al., 2018) e a espécie *Moniliella suaveolens* foi relatada em mel de *Plebeia saiqui* (Echeverrigaray et al., 2021).

Figura 15. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências 26S de *Moniliella*. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. *Tilletiaria anomala* CBS foi escolhida como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós.



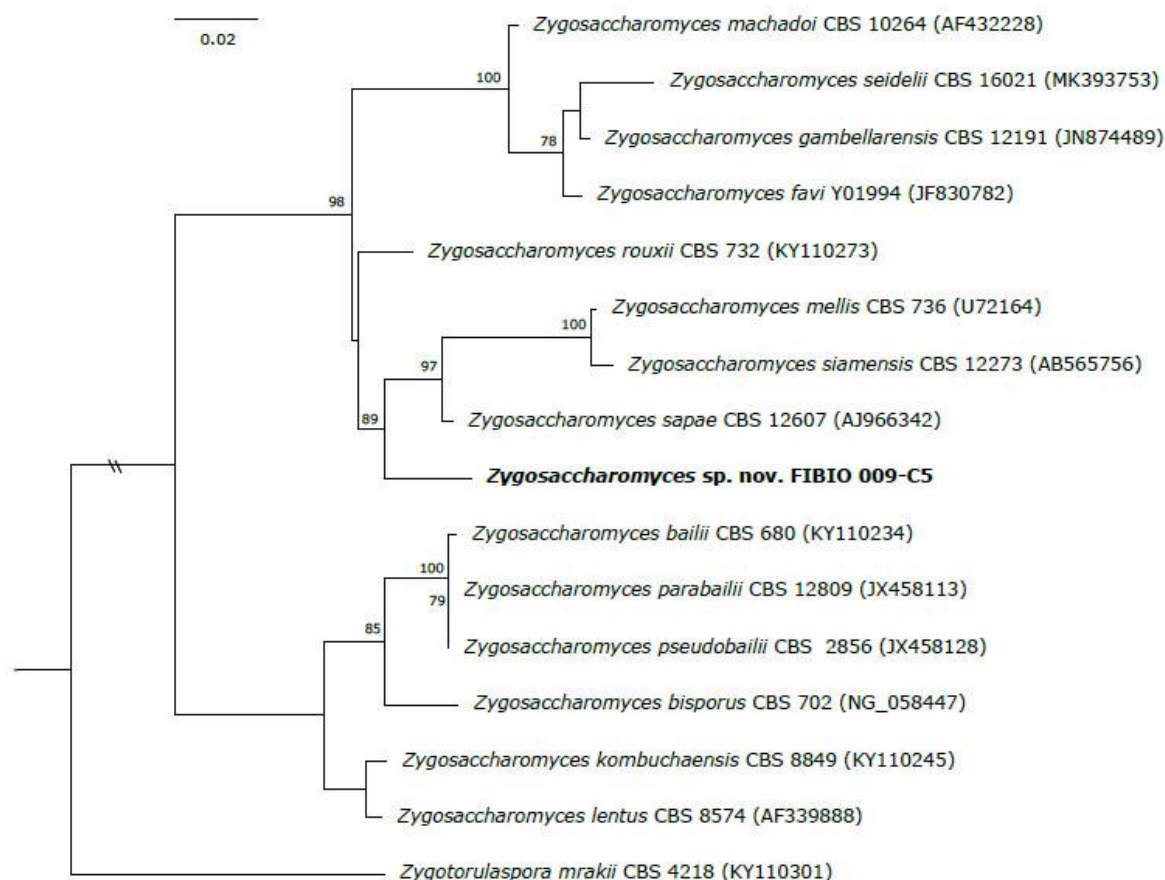
Fonte: A autora (2024).

Hortaea werneckii (1,5 %) foi classificada como comum e esteve restrita a superfície do ninho. Esta levedura é o agente causador da tinea nigra humana, uma dermatofitose superficial caracterizada por manchas marrons ou negras, geralmente nas palmas das mãos (de Hoog e Guého, 1998; Göttlich et al., 1995). É comumente encontrada em ambientes aquáticos hipersalinos e destaca-se como um dos organismos eucarióticos mais halotolerantes (Gostinčar et al., 2011). Este é o primeiro registro dessa espécie em ninhos de abelha sem ferrão.

O gênero *Pseudozyma* foi representado por duas espécies, ambas isoladas do pólen. *Pseudozyma aphidis* (0,9 %) foi classificada como uma espécie ocasional e este é o primeiro registro em substratos de abelha sem ferrão. Neste estudo, *Pseudozyma hubeiensis* (0,3 %) foi uma espécie rara, no entanto, mostrou-se abundante e esteve presente no mel, pólen e superfície do ninho de *Melipona scutellaris* no trabalho realizado por Barbosa (2018).

Neste estudo, foi obtido apenas um representante de *Zygosaccharomyces*. No entanto, espécies desse gênero foram registrados em várias abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona bipunctata*, *S. postica*, *S. tubiba*, *Tetragona clavipes*, *Melipona quadrifasciata*, *M. fasciculata*, *M. bicolor* e *Partamona helleri*) (de Paula et al., 2023). Menezes et al. (2015) relataram que essa levedura se desenvolve dentro das células da cria da *Scaptotrigona depilis*, desempenhando um papel crucial no processo de metamorfose larval. Essas leveduras apresentam a formação de pseudohifas e acumulam ergosterol em seu citoplasma, servindo como fonte alimentar essencial para as larvas (Menezes et al., 2015; Paludo et al. 2018; de Paula et al., 2023). A levedura obtida exibiu características moleculares distintas em comparação com outras espécies e foi considerada como uma novidade taxonômica (Figura 16) e será descrita posteriormente.

Figura 16. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências 26S de *Zygosaccharomyces*. O isolado obtido neste estudo está em negrito. *Zygotulaspora mrakii* CBS 4218 foi escolhido como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós.

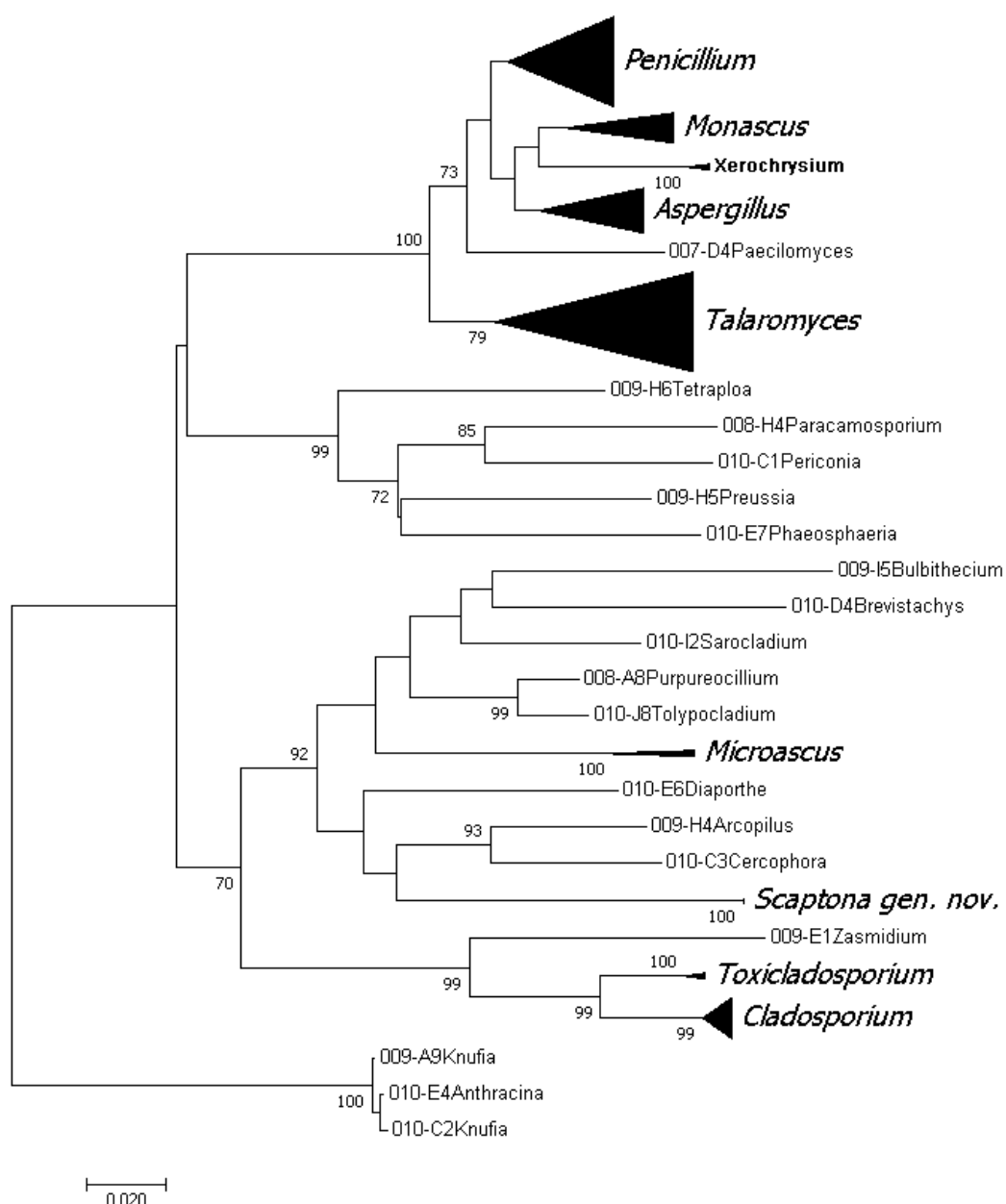


Fonte: A autora (2024).

O gênero *Zygoascus* foi representado por uma única espécie, isolada da superfície do ninho, sendo considerada como uma possível nova espécie. Este é o primeiro registro desse gênero em abelhas sem ferrão. Outros gêneros de leveduras se apresentaram com baixa frequência e foram classificados como espécies ocasionais ou raras: *Cystobasidium* (1), *Debaryomyces* (1), *Gjaerumia* (1), *Rhodosporidiobolus* (1), *Sporobolomyces* (2), *Torula* (1), *Trichomonascus* (2). Dentre eles, apenas *Gjaerumia*, *Cystobasidium* e *Debaryomyces* foram relatados em ambientes associados a abelhas sem ferrão. *Gjaerumia* foi relatado por Santos (2019) no mel, pólen e superfície do ninho de *M. scutellaris*. *Cystobasidium minutum* e *Debaryomyces hansenii* foram isoladas de células de cria de *Melipona seminigra* e *M. interrupta*, respectivamente (Tiago et al., 2022). Além disso, *D. hansenii* também foi relatada no mel, pólen e superfície do ninho de *M. scutellaris* (Barbosa, 2018) e no mel de *Partamona* sp. (Barbosa et al., 2016).

Apesar de a região ITS ser comumente utilizada na identificação de fungos, existem relatos de que suas sequências não são suficientemente adequadas para delimitar grupos fúngicos, especialmente em complexos de espécies (Harder *et al.*, 2013). No entanto, apresentamos a reconstrução filogenética global com a região ITS para os fungos filamentosos, pois esse é o barcode comum para todos nesse grupo de isolados (Figura 17).

Figura 17. Agrupamento dos isolados por gênero usando análise de máxima verossimilhança (ML) para região ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA de fungos filamentosos isolados a partir de amostras de mel, pólen e da superfície de ninhos de *Scaptotrigona* sp. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós.



Fonte: A autora (2024).

Os 193 isolados de fungos filamentosos corresponderam a 65 espécies, sendo 61 pertencentes ao filo *Ascomycota* e três de *Basidiomycota*. A figura 18 ilustra representantes de algumas espécies identificadas no presente estudo.

Figura 18. Colônias de algumas espécies de fungos obtidas em substratos relacionados à abelha *Scaptotrigona* sp. Cultivos em meio Ágar Malte por 7 dias a 25 °C. Primeira linha (da esquerda para a direita): *Aspergillus flavus*, *A. brunneoviolaceus*, *A. chevalieri*, *A. keveii*, *A. micronesiensis*, Segunda linha: *A. petersonii*, *A. subversicolor*, *A. sydowii*, *Aspergillus* sp. nov. 3, *Aspergillus* sp. nov. 4, Terceira linha: *Penicillium austrosinicum*, *P. brasilianum*, *P. chermesinum*, *P. allii-sativi*, *P. citrinum*, Quarta linha: *P. copticola*, *Penicillium* sp. nov. 1, *P. steckii*, *Talaromyces scorteus*, *Talaromyces* sp. nov. 1, Quinta linha: *Paecilomyces formosus*, *Monascus mellicola*, *M. pilosus*, *Purpureocillium* sp.



Fonte: A autora (2024).

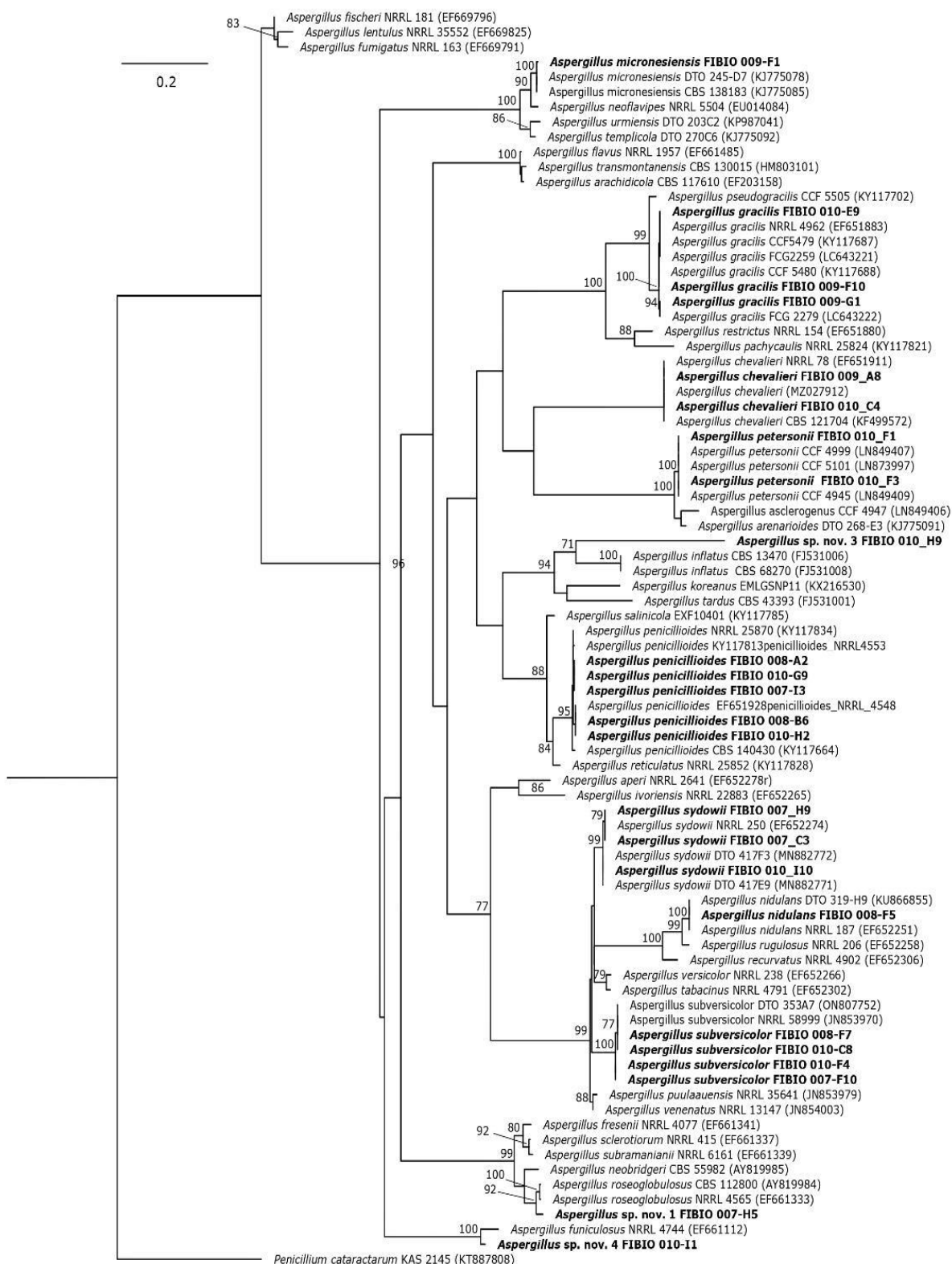
Eurotiales é uma das mais diversas ordens de fungos e foi o grupo mais expressivo neste trabalho, representada pelos gêneros *Aspergillus*, *Monascus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Talaromyces* e *Xerochrysium*. *Aspergillus* (42), *Penicillium* (41) e *Talaromyces* (36) foram os gêneros mais frequentes. *Aspergillus* e *Penicillium* foram isolados nos três substratos, enquanto que *Talaromyces* foi isolado apenas no mel e na superfície dos ninhos. Estes gêneros são ascomicetos encontrados nos mais diversos ambientes, englobando espécies ambientalmente e economicamente importantes (Tsang *et al.*, 2018). Atualmente, considera-se 28 seções de *Aspergillus*, 32 seções de *Penicillium* e oito de *Talaromyces* (Visagie *et al.*, 2024).

Aspergillus foi representado por 16 espécies pertencentes a 11 seções: *Aspergillus* (*A. chevalieri*); *Circumdati* (*Aspergillus* sp. nov. 1); *Cremeri* (*Aspergillus* sp. nov. 3); *Flavi* (*A. flavus*); *Flavipedes* (*A. micronesiensis*); *Nidulantes* (*A. subversicolor*, *A. sydowii*, *A. nidulans*); *Nigri* (*A. aculeatus*, *A. brunneoviolaceus*); *Ochraceorosei* (*Aspergillus* sp. nov. 4); *Petersoniorum* (*A. petersonii*); *Restricti* (*A. gracilis*, *A. penicillioides*, *Aspergillus* sp. nov. 2); *Usti* (*A. keveii*). Dentre elas, *Aspergillus penicillioides* (3,0 %) apresentou maior frequência relativa e esteve presente nos três substratos. A filogenia baseada nas sequências de β -tubulina pode ser observada na Figura 19.

Penicillium foi representado por 11 espécies pertencentes a 6 seções: *Charlesia* (*P. chermesinum*); *Chrysogena* (*P. allii-sativi*); *Citrina* (*P. citrinum*, *P. copticola*, *P. steckii*); *Lanata-Divaricata* (*P. brasilianum*, *P. oxalicum*, *Penicillium* sp. nov. 1); *Ramigena* (*Penicillium* sp. nov. 2) e *Sclerotiorum* (*P. austrosinicum*, *Penicillium* sp. nov. 3). Dentre elas, *Penicillium citrinum* (6,3 %) apresentou maior frequência relativa e esteve presente nos três substratos analisados. A filogenia baseada nas sequências de β -tubulina pode ser observada na Figura 20.

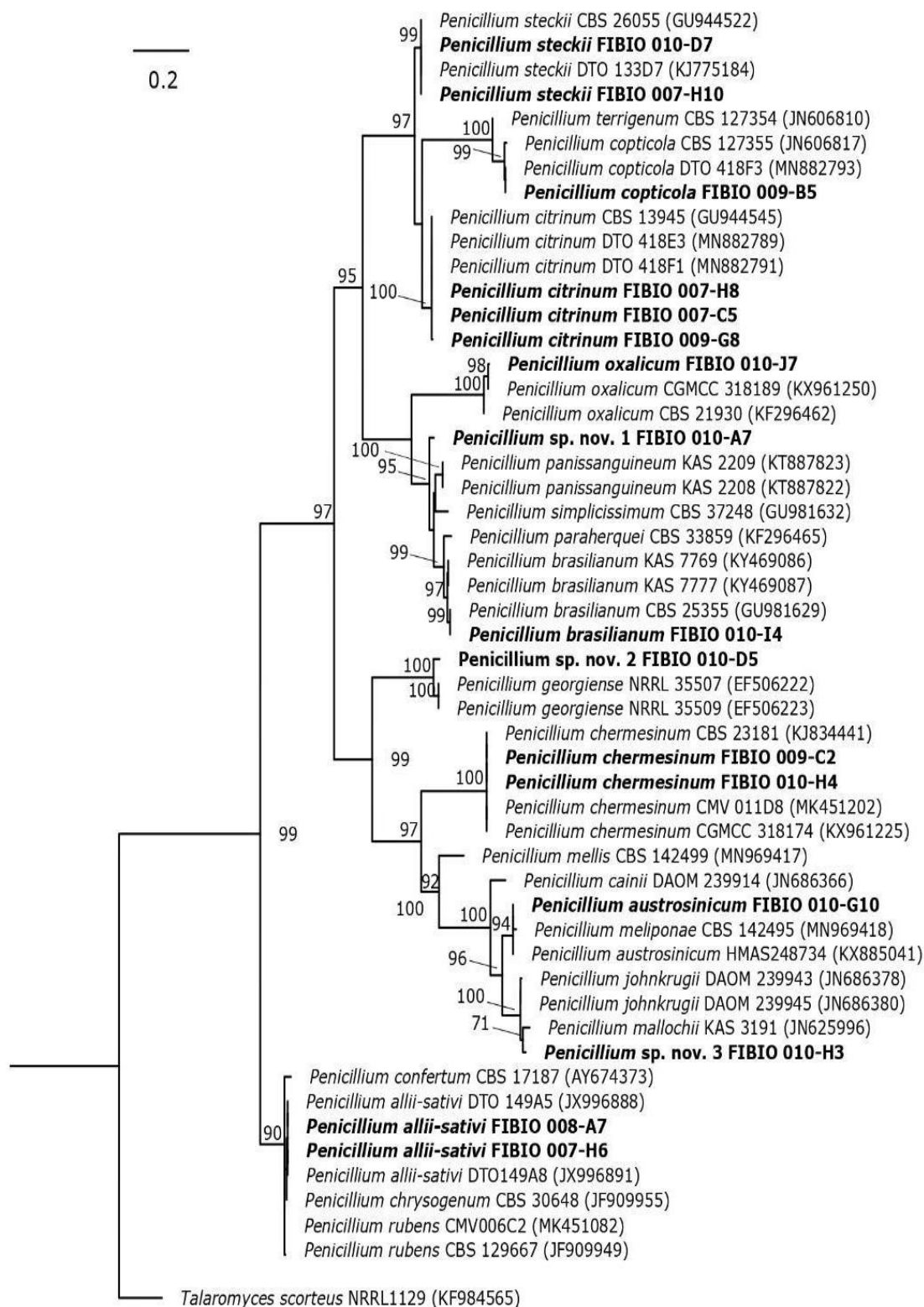
Talaromyces foi representado por três espécies identificadas como pertencentes às seções *Trachyspermi* (*Talaromyces rubrifaciens*), *Helici* (*Talaromyces* sp. nov. 1) e *Islandici* (*Talaromyces scorteus*). *T. scorteus* (10,1 %) foi a espécie mais abundante de todos os fungos filamentosos, e esteve restrita à superfície da colmeia. Esta espécie também foi relatada por Barbosa *et al.* (2018) e por Santos (2019) em substratos da *Melipona scutellaris*. A figura 21 mostra a filogenia dos isolados de *Talaromyces*, baseada nas sequências de Calmodulina.

Figura 19. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências β -tubulina de *Aspergillus*. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. *Penicillium cataractarum* KAS 2145 foi escolhido como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós.



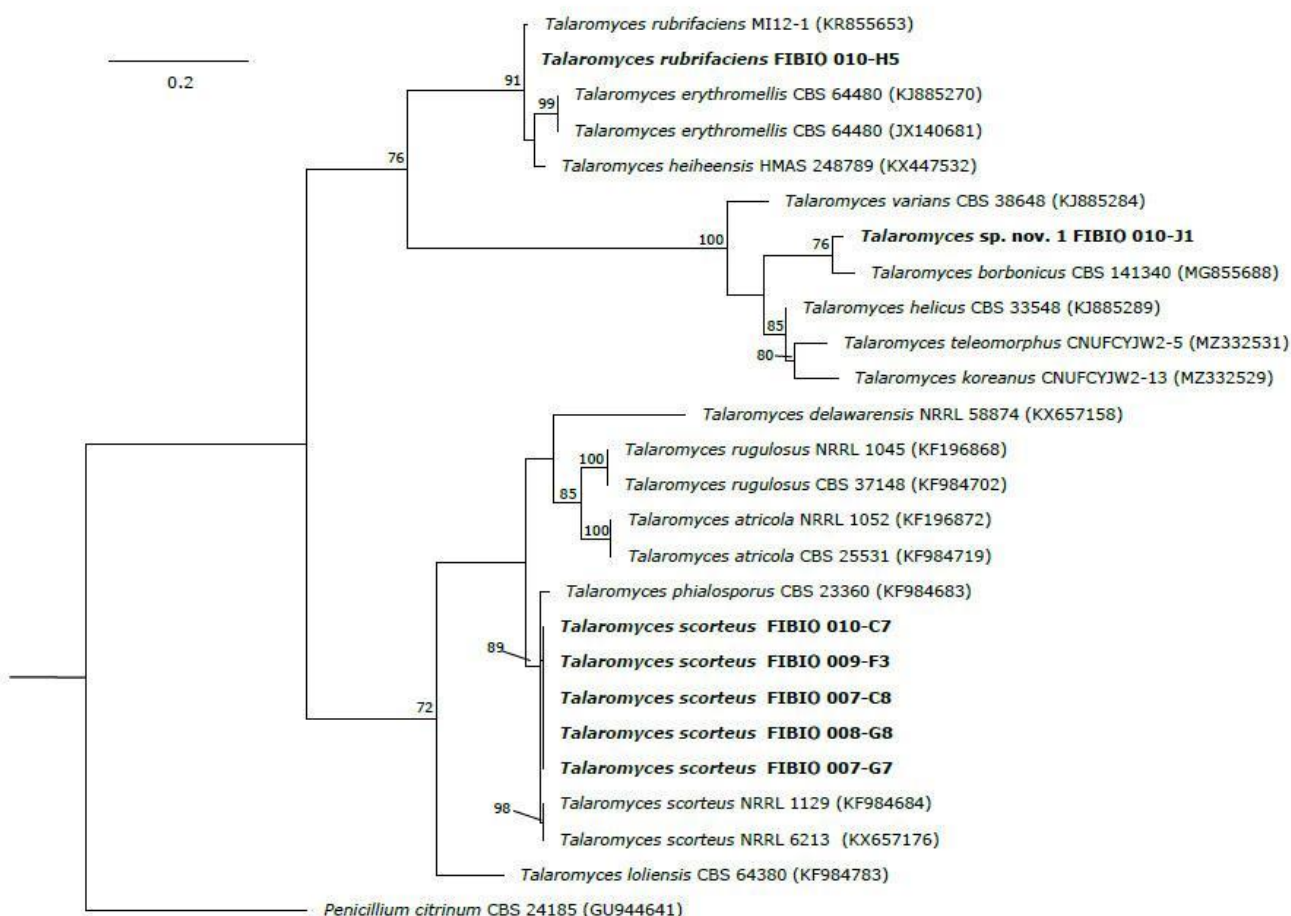
Fonte: A autora (2024).

Figura 20. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências β -tubulina de *Penicillium*. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. *Talaromyces scorteus* NRRL 1129 foi escolhido como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós.



Fonte: A autora (2024).

Figura 21. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências Calmodulina de *Talaromyces*. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. *Penicillium citrinum* CBS 24185 foi escolhido como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós.



Fonte: A autora (2024).

Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* foram registradas na superfície corporal de abelhas mortas da abelha *Melipona subnitida*, do semiárido nordestino (Ferraz *et al.*, 2006) e em amostras de mel de *M. scutellaris* no Estado da Paraíba (Gois *et al.*, 2010). Barbosa *et al.* (2018) também documentaram a presença de espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* em mel, pólen e interior de ninhos de *M. scutellaris*.

Por serem patógenos oportunistas, algumas espécies, como *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger*, têm sido relatadas como causadoras de doenças em abelhas melíferas (Foley *et al.*, 2014; Evison; Jensen, 2018; Becchimanzi; Nicoletti, 2022). Foley *et al.* (2014) mostraram que a presença dessas espécies pode ser prejudicial às colméias, especialmente para as larvas de *Apis mellifera*, e foi confirmado que as abelhas adultas são altamente suscetíveis à infecção por *A. flavus* quando ingerem

conídios. No entanto, não existem estudos sobre a ocorrência de doenças causadas por fungos em abelhas nativas sem ferrão.

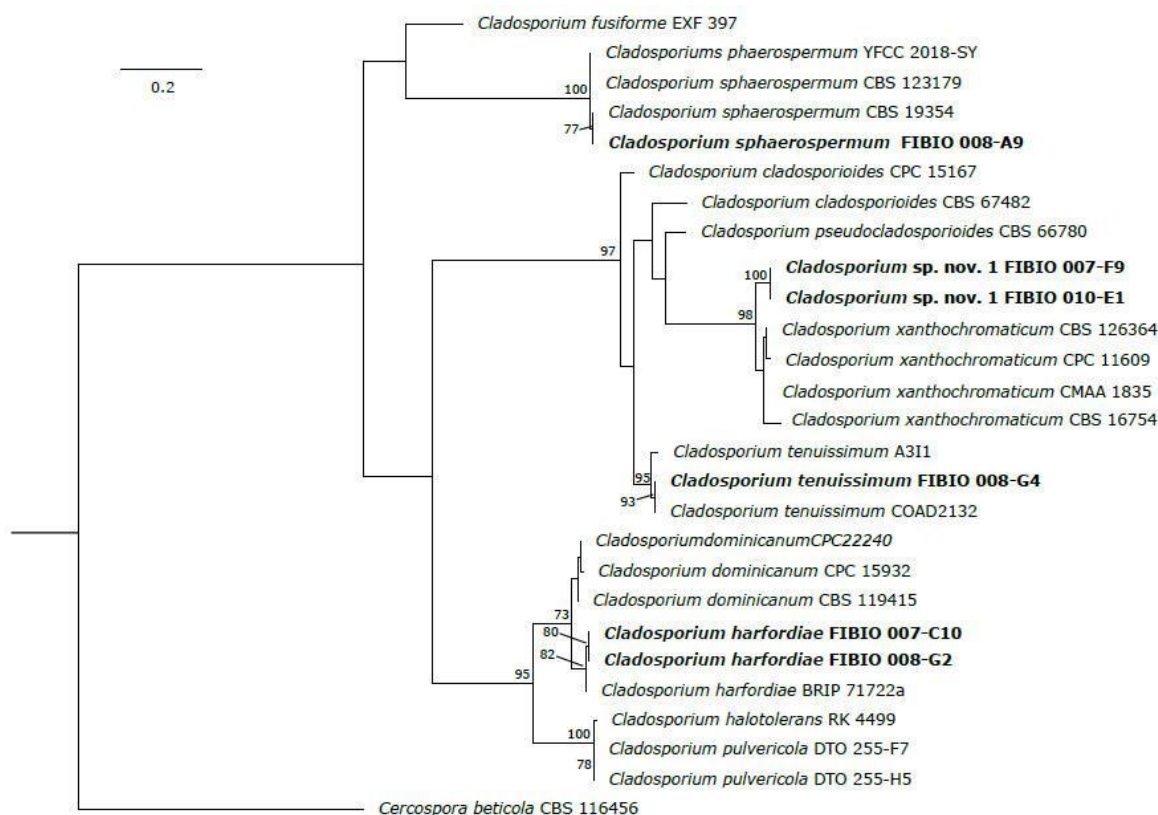
Monascus foi um gênero bem representado, com 26 isolados. Dentre estes, 22 foram identificados como *M. melicolla* (6,5 %), uma com *M. pilosus* (0,3 %) e três apresentaram características distintas das outras espécies que tinham descrição taxonômica válida e foram consideradas como uma provável nova espécie. *M. mellicola* foi descrito por Barbosa *et al.* (2017) ao analisarem amostras de mel, pólen e superfície da colmeia de *M. scutellaris*. Eles também descreveram outras duas espécies (*M. flavipigmentosus* e *M. recifensis*) e relataram a ocorrência de mais cinco espécies pertencentes ao gênero.

Xerochrysium possui espécies xerófilas extremas encontradas em alimentos secos e concentrados, às vezes causando deterioração (Pitt *et al.*, 2013). *Xerochrysium xerophilum* foi encontrado em amostras de melada e mel de flores (néctar) da Espanha (Rodríguez-Andrade *et al.*, 2019). No presente estudo, *X. xerophilum* (0,6 %) foi isolada do pólen e é relatada pela primeira vez em substratos de abelhas sem ferrão.

O gênero *Paecilomyces*, engloba espécies tanto patogênicas quanto sapróbias, e pode ser encontrado em uma ampla gama de ambientes (Kilama, 2007; Barra *et al.*, 2013; Mohammadi; Soltani; Piri, 2016). Neste estudo, *Paecilomyces formosus* (0,3 %) foi classificado como espécie rara e isolado da superfície do ninho. Essa espécie foi relatada no mel e na superfície de ninhos da *Melipona scutellaris* nos trabalhos de Barbosa (2018) e Santos (2019).

As espécies de *Cladosporium* são principalmente consideradas sapróbias, no entanto, algumas também foram retratadas como endofíticas e patógenas em humanos, animais e plantas (Bensch *et al.*, 2012, 2018). Este gênero é frequentemente isolado de abelhas sem ferrão e seus substratos. Neste estudo, ele esteve presente nos três substratos e apresentou 15 isolados, distribuídos em quatro espécies: *C. sphaerospermum* (0,6 %) *C. tenuissimum* (0,9 %), *Cladosporium harfordiae* (0,6 %) e *Cladosporium* sp. nov. 1 (2,4 %) (Figura 22). Este é o primeiro relato de *C. tenuissimum* e *C. harfordiae* em substratos de abelhas sem ferrão. *C. sphaerospermum* foi relatado em mel de *Apis mellifera* e de *Melipona beecheii* do México (Jacinto-Castillo *et al.*, 2022). Além disso, outras espécies como *C. exasperatum* e *C. delicatulum*, foram reportadas no alimento larval de *M. scutellaris* e de *M. quadrifasciata* (Santos *et al.*, 2018).

Figura 22. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada em dados de sequências *tef1* de *Cladosporium*. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. *Cercospora beticola* CBS 116456 foi escolhido como grupo externo. Valores de suporte (>70%) são indicados nos nós.



Fonte: A autora (2024).

Dois isolados provenientes do pólen, agruparam-se na árvore de consenso em um clado distinto dentro da família *Cephalothecaceae*, próximo a *Cryptendoxyla hypophloia* Malloch & Cain. Eles foram meticulosamente comparados com as espécies pertencentes à família, revelando divergências morfológicas significativas em relação a todos os táxons analisados. Esses isolados foram descritos como um novo gênero e espécie da família *Cephalothecaceae*. O artigo com a descrição da espécie e gênero encontra-se publicado na revista *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (DOI 10.1099/ijsem.0.006227) (Apêndice 1).

Outros gêneros de fungos filamentosos ocorreram com baixa frequência, as espécies foram classificadas como ocasionais ou raras, e são relatadas aqui como primeiro registro em abelhas sem ferrão: *Anthracina* (1), *Arcopilus* (1), *Austropleospora* (1), *Brevistachys* (1), *Bulbithecium* (1), *Cercophora* (1), *Diaporthe* (1), *Knufia* (2), *Paracamarosporium* (2), *Periconia* (1), *Phaeosphaeria* (1), *Preussia* (1), *Purpureocillium* (1), *Sarocladium* (1), *Scytalidium* (1), *Spegazzinia* (1), *Tetraploa* (1),

Tolypocladium (1), *Toxicocladosporium* (2) e *Zasmidium* (1). Dentre elas, duas são consideradas prováveis novas espécies: *Anthracina* sp. nov. e *Knufia* sp. nov. e serão descritas posteriormente.

Nas condições desse trabalho, um total de 64 fungos não conseguiram manter-se viáveis por mais de uma geração sob condições de preservação em laboratório, o que impossibilitou a realização do estudo taxonômico dos mesmos.

Ainda há uma lacuna de conhecimento em relação às associações entre microrganismos e as abelhas sem ferrão, assim como a diversidade de espécies de fungos associados a esses insetos permanece pouco explorada. Os fungos obtidos neste estudo estão preservados em uma coleção de trabalho (FIBIO). Conforme as publicações estão sendo preparadas para submissão, ocorrerá o depósito na Micoteca URM. Esse depósito, além de assegurar o registro do isolamento desses fungos e a conservação da biodiversidade, viabiliza o desenvolvimento de estudos taxonômicos adicionais, ampliando a acessibilidade e a aplicação desses fungos em diversos setores, como farmacêutico, alimentício, agrícola e cosmético. Além disso, este estudo buscou enfatizar a importância da investigação micológica em substratos ligados às abelhas nativas, ressaltando o potencial para descobrir novos táxons e contribuir para uma compreensão mais abrangente da diversidade fúngica.

5. CONCLUSÕES

- Fungos de várias espécies foram isolados do mel, do pólen e da superfície do ninho da abelha *Scaptotrigona* sp.
- A superfície do ninho foi o substrato que apresentou maior riqueza de espécies.
- A diversidade de espécies foi similar entre os três substratos.
- *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Monascus*, *Penicillium*, *Starmerella* e *Wickerhamiella* são os gêneros mais frequentes nos três substratos analisados.
- Os substratos relacionados a *Scaptotrigona* sp. apresentaram espécies raras e 18 possíveis espécies novas para ciência, demonstrando a importância da prospecção de fungos nesses ambientes.
- Os gêneros *Hortaea*, *Rhodosporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Trichomonascus*, *Torula*, *Zygoascus*, *Anthracina*, *Arcopilus*, *Austropleospora*, *Brevistachys*, *Bulbithecium*, *Cercophora*, *Diaporthe*, *Knufia*, *Odontoefibula*, *Paracamarosporium*, *Periconia*, *Phaeosphaeria*, *Phanerochaete*, *Preussia*, *Purpureocillium*, *Sarocladium*, *Scytalidium*, *Spegazzinia*, *Tetraploa*, *Tolypocladium*, *Toxicocladosporium*, *Xerochrysium*, *Xeromphalina* e *Zasmidium* foram reportados pela primeira vez em abelhas sem ferrão.
- Um novo gênero monotípico representado pela espécie *Scaptona ramosa*, foi descoberto a partir da superfície do ninho de *Scaptotrigona* sp.

REFERÊNCIAS

- AL-SHERIF, A. A. *et al.* Activity of salivary glands in secreting honey-elaborating enzymes in two subspecies of honeybee (*Apis mellífera* L). **Physiological Entomology**, v. 42, n. 4, p. 397-403, 2017.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B. *et al.* Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of food composition and analysis**, v. 18, n. 1, p. 105-111, 2005.
- ALVAREZ, L. J. *et al.* Detection of honey bee viruses in Argentinian stingless bees (Hymenoptera: Apidae). **Insectes Sociaux**, v. 65, p. 191-197, 2018.
- ÁVILA, S. *et al.* Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. **Food Research International**, v. 123, p. 1-10, 2019.
- AZIZ, M. S. A. *et al.* Pancreatoprotective effects of *Geniotrigona thoracica* stingless bee honey in streptozotocin-nicotinamide-induced male diabetic rats. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 89, p. 135-145, 2017.
- BALLIVIÁN, J. M. P. P. *et al.* Abelhas nativas sem ferrão. **São Leopoldo: Oikos**, p. 128, 2008.
- BANDONI, R. J. Dimorphic heterobasidiomycetes: taxonomy and parasitism. **Studies in Mycology**, n. 38, p. 13-27, 1995.
- BARBOSA, D. B. *et al.* As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 3, n. 4, p. 694-703, 2017a.
- BARBOSA, R. N. *et al.* Brazilian Atlantic Forest and Pampa Biomes in the spotlight: an overview of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* (Eurotiales) species and the description of *Penicillium nordestinense* sp. nov. **Acta Botanica Brasilica**, v. 36, 2022.
- BARBOSA, R. N. *et al.* New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 1883-1912, 2018.
- BARBOSA, R. N. *et al.* Phylogenetic analysis of *Monascus* and new species from honey, pollen and nests of stingless bees. **Studies in mycology**, v. 86, n. 1, p. 29-51, 2017b.
- BARBOSA, R. N. *et al.* Prospection on yeasts from stingless bees honey in Brazilian Tropical Dry Forest (Caatinga). **Gaia Scientia**, v. 10, n. 4, p. 151-159, 2016.
- BARBOSA, R. N. **Caracterização polifásica de fungos isolados de substratos relacionados à *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini) no ambiente de colmeias racionais**. 2018. 148 p. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

BARNETT, J. A. 2003. Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. **Microbiology**, 149(3), 557-567.

BARRA, P. *et al.* Isolamento e identificação de fungos entomopatogênicos e sua avaliação contra *Tribolium confusum*, *Sitophilus zeamais* e *Rhyzopertha dominica* em milho armazenado. **Journal of Pest Science**, v. 217-226, 2013.

BECCHIMANZI, A.; NICOLETTI, R. *Aspergillus*-bees: A dynamic symbiotic association. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 968963, 2022.

BENSCH, K. *et al.* *Cladosporium* species in indoor environments. **Studies in mycology**, v. 89, p. 177-301, 2018.

BENSCH, K. *et al.* The genus *cladosporium*. **Studies in mycology**, v. 72, p. 1-401, 2012.

BEUX, M. R. *et al.* Microbial biodiversity in honey and pollen pots produced by *Tetragonisca angustula* (Jataí). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 65, p. e22210440, 2022.

BILUCA, F. C. *et al.* 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 159, p. 244-249, 2014.

BILUCA, F. C. *et al.* Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 89-97, 2017.

BLACKWELL, M. Made for each other: ascomycete yeasts and insects. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 3, p. 5.3. 13, 2017.

BOEKHOUT, T. *et al.* Discussion of teleomorphic and anamorphic genera of heterobasidiomycetous yeasts. In: **The Yeasts**. Elsevier, 1998. p. 609-625.

BOGDANOV, S. Pollen: collection, harvest, composition, quality. In: THE BEE pollen book. Mühlethurnen: Bee-Hexagon, 2016. ch. 1, PDF (13 p.). Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/StefanBogdanov/publication/304011810_Pollen_Collection_Harvest_Composition_Quality/links/5762c0c808aee61395bef502/Pollen-Collection-Harvest-Composition-Quality.pdf. Acesso em: 9 jun. 2023.

BORSATO, D. M. *et al.* Topical anti-inflammatory activity of a monofloral honey of *Mimosa scabrella* provided by *Melipona marginata* during winter in Southern Brazil. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 7, p. 817-825, 2014.

BRASIL. Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente – Conama N° 346, de 16 de agosto de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 de agosto de 2004.

BRASIL. Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente – Conama N° 496, de 19 DE AGOSTO DE 2020. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 de agosto de 2020.

BRUTSCHER, L. M.; MCMENAMIN, A. J.; FLENNIKEN, M. L. The buzz about honey bee viruses. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 8, p. e1005757, 2016.

BRYSCH-HERZBERG, M. Ecology of yeasts in plant–bumblebee mutualism in Central Europe. **FEMS microbiology ecology**, v. 50, n. 2, p. 87-100, 2004.

CADORIN, G. *et al.* Soforolipídios: Síntese, aplicações e desafios para o desenvolvimento de uma economia mais sustentável. **Metodologias e Aprendizado**, v. 4, p. 45-59, 2021.

CAMARGO, J. M. F. *et al.* Notas prévias sobre a bionomia de *Ptilotrigona lurida* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): associação de leveduras em pólen estocado. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 8, n. 2, p. 391-5, 1992.

CANE, J. H.; TEPEDINO, V. J. Gauging the effect of honey bee pollen collection on native bee communities. **Conservation Letters**, v. 10, n. 2, p. 205-210, 2017.

CARVALHO, A. T. *et al.* Distribuição geográfica atual da abelha jandaíra e previsões para sua distribuição futura. **A abelha jandaíra: no passado, presente e no futuro**, Mossoró: EdUFERSA, p. 73-78, 2017.

CARVALHO, C. A. L. *et al.* Como criar abelhas sem ferrão: do cortiço à caixa racional. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/SECTI-FAPESB. **Série Meliponicultura**; 6. 30 p, 2006.

CARVALHO, C. A. L. *et al.* **Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química**. Insecta-Núcleo de Estudos dos Insetos, 2005.

CARVALHO-ZILSE, G. A. *et al.* Meliponicultura: perguntas mais frequentes sobre abelhas sem ferrão-I. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia: Gislene A. Carvalho-Zilse, **Série Meliponicultura**; 8. 41 p, 2011.

COSTA NETO, D. J.; MORAIS, P. B. The vectoring of *Starmerella* species and other yeasts by stingless bees in a Neotropical savanna. **Fungal Ecology**, v. 47, p. 100973, 2020.

COSTA, N. J. A. *et al.* Aplicação de soforolipídios produzidos por *Starmerella bombicola* em filmes ativos para revestimento de morangos Application of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* in active films for strawberries coating. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 88834-88849, 2021.

CRUZ, C. B. N. *et al.* Antimicrobial activity of honeys from two stingless honeybee species and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) against pathogenic microorganisms. **Acta Amazonica**, v. 44, p. 287-290, 2014.

DANIEL, H. M. *et al.* *Starmerella neotropicalis* fa, sp. nov., a yeast species found in bees and pollen. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. Pt_10, p. 3896-3903, 2013.

DARRIBA, D.; POSADA, D. jModelTest 2.0 Manual v0. 1.1. **Available at**, 2014.

DE HOOG, G. S.; GUÉHO, E. Agents of white piedra, black piedra and tinea nigra. **Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections**. London: Arnold Publications, p. 191-197, 1998.

DE HOOG, G. S.; SMITH, M. T.; ROSA, C. A. Moniliella Stolk & Dakin (1966). In: **The Yeasts**. Elsevier, 2011. p. 1837-1846.

DE PAULA, G. T. *et al.* Further evidences of an emerging stingless bee-yeast symbiosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.

DE PAULA, G. T. *et al.* Stingless bees and microbial interactions. **Current Opinion in Insect Science**, v. 44, p. 41-47, 2021.

DE VEGA, C. *et al.* Flowers as a reservoir of yeast diversity: description of *Wickerhamiella nectarea* fa sp. nov., and *Wickerhamiella natalensis* fa sp. nov. from South African flowers and pollinators, and transfer of related *Candida* species to the genus *Wickerhamiella* as new combinations. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 5, p. fox054, 2017.

DHARAMPAL, P. S. *et al.* Microbial diversity associated with the pollen stores of captive-bred bumble bee colonies. **Insects**, v. 11, n. 4, p. 250, 2020.

DÍAZ, S. *et al.* Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 143, p. 35-39, 2017.

ECHEVERRIGARAY, S. *et al.* Yeast biodiversity in honey produced by stingless bees raised in the highlands of southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 347, p. 109200, 2021.

ELTZ, T.; BRÜHL, C. A.; GÖRKE, C. Collection of mold (*Rhizopus* sp.) spores in lieu of pollen by the stingless bee *Trigona collina*. **Insectes sociaux**, v. 49, p. 28-30, 2002.

ENGEL, M. S. Notes on South American stingless bees of the genus *Scaptotrigona* (Hymenoptera: Apidae), part III: A revised infrageneric classification and new species. **Journal of Melittology**, n. 111, p. 1-29, 2022^a

ENGEL, M. S. Notes on South American stingless bees of the genus *Scaptotrigona* (Hymenoptera: Apidae), Part IV: Four new species of group B from the Andean region. **Journal of Melittology**, n. 112, 2022^b.

EVISON, S. E. F. Chalkbrood: epidemiological perspectives from the host–parasite relationship. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 65-70, 2015.

EVISON, S. E. F.; JENSEN, A. B. The biology and prevalence of fungal diseases in managed and wild bees. **Current opinion in insect science**, v. 26, p. 105-113, 2018.

FELL, J. W. *et al.* Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International**

journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 50, n. 3, p. 1351-1371, 2000.

FERRAZ, R. E. *et al.* Microbiota fúngica de abelhas sem ferrão (*Melipona subnitida*) da região semi-árida do nordeste brasileiro. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO**, v. 2, n. 1, 2006.

FLETCHER, M. T. *et al.* Stingless bee honey, a novel source of trehalulose: A biologically active disaccharide with health benefits. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 12128, 2020.

FOLEY, K. *et al.* The distribution of *Aspergillus* spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. **Veterinary Microbiology**, v. 169, n. 3-4, p. 203-210, 2014.

FÜNFHAUS, A.; EBELING, J.; GENERSCH, E. Bacterial pathogens of bees. **Current opinion in insect science**, v. 26, p. 89-96, 2018.

GILLIAM, M.; ROUBIK, D. W.; LORENZ, B. J. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. **Apidologie**, v. 21, n. 2, p. 89-97, 1990.

GILLIAM, M. Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. **Apidologie**, v. 10, n. 1, p. 43-53, 1979.

GOIS, G. C. *et al.* Qualidade microbiológica do mel de abelhas *Melipona scutellaris*. **Pubvet**, v. 4, n. 09, 2010.

GOLONKA, A. M. **Nectar-inhabiting microorganisms and the dioecious plant species *Silene latifolia***. Duke University, 2002.

GONÇALVES, P. *et al.* The *Wickerhamiella/Starmerella* clade—a treasure trove for the study of the evolution of yeast metabolism. **Yeast**, v. 37, n. 4, p. 313-320, 2020.

GOSTINČAR, C. *et al.* Fungal adaptation to extremely high salt concentrations. *In*: **Advances in applied microbiology**. Academic Press, 2011. p. 71-96.

GÖTTLICH, E. *et al.* Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra. **Mycoses**, v. 38, n. 11-12, p. 489-494, 1995.

GRÜTER, C. Stingless bees. **Cham, Switzerland: Springer International Publishing**, v. 109, n. 4, p. 1182-1186, 2020.

GUIMARÃES-CESTARO, L. *et al.* Occurrence of virus, microsporidia, and pesticide residues in three species of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the field. **The Science of Nature**, v. 107, p. 1-14, 2020.

HARDER, Christoffer B. *et al.* A three-gene phylogeny of the *Mycena pura* complex reveals 11 phylogenetic species and shows ITS to be unreliable for species identification. **Fungal Biology**, v. 117, n. 11-12, p. 764-775, 2013.

HAU-YAMA, N. E. *et al.* Antifungal activity of honey from stingless bee *Melipona beecheii* against *Candida albicans*. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 1, p. 12-18, 2020.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, Robert. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 4, p. 10.1128/microbiolspec. funk-0052-2016, 2017.

HEBERLE, Henry *et al.* InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC bioinformatics**, v. 16, p. 1-7, 2015.

HERBERT JR, E. W.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. **apidologie**, v. 9, n. 1, p. 33-40, 1978.

HIBBETT, D. S. A phylogenetic overview of the Agaricomycotina. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 917-925, 2006.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal 2023.

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lucia; KOEDAM, Dirk; HRNCIR, Michael. A abelha jandaíra: No passado, no presente e no futuro. 2017.

JAFFE, R. *et al.* Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0121157, 2015.

JIMENEZ, M. *et al.* Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 2, p. 151-160, 2016.

KERR, W. E. Meliponicultura—A importância da meliponicultura para o país. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 1, n. 3, p. 42-44, 1997.

KHAN, S. U. *et al.* Honey: Single food stuff comprises many drugs. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 2, p. 320-325, 2018.

KILAMA, P. *et al.* ANTAGONISMO DE PAECILOMYCES SPP. ISOLADO DE RAÍZES DE BANANA (MUSA SPP.) E RIZOSFERA CONTRASTRADOPHOLUS SIMILIS. **Nematropica**, pág. 215-226, 2007.

Kurtzman, C. P.; Fell, J. W.; Boekhout, T. 2011. The yeasts: a taxonomic study. Elsevier.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 331-371, 1998.

KUSTIAWAN, P. M. *et al.* In vitro cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 4, n. 7, p. 549-556, 2014.

KWONG, W. K. *et al.* Dynamic microbiome evolution in social bees. **Science advances**, v. 3, n. 3, p. e1600513, 2017.

LACHANCE, M. A. *Starmerella Rosa & Lachance* (1998). *In: The Yeasts*. Elsevier, 2011. p. 811-815.

LACHANCE, M. A.; KURTZMAN, C. P. *Wickerhamiella van der Walt* (1973). *In: The Yeasts*. Elsevier, 2011. p. 891-897.

LOPER, G. M. *et al.* Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and bee bread. I-Fatty Acids, Sterols, Vitamins and Minerals. **Apidologie**, v. 11, n. 1, p. 63-73, 1980.

LOPES, M.; FERREIRA, J. B.; SANTOS, G. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, v. 2, n. 4, p. 1-3, 2005.

MAGALHÃES, T. L.; VENTURIERI, G. C. Aspectos econômicos da criação de abelhas indígenas sem ferrão (apidae: meliponini) no nordeste Paraense. 2010.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton university press, 1988.

MASCLAUX, F. *et al.* Phylogenetic relationships of human-pathogenic *Cladosporium* (Xylohypha) species inferred from partial LS rRNA sequences. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 33, n. 5, p. 327-338, 1995.

MCMENAMIN, A. J.; GENERSCH, E.. Honey bee colony losses and associated viruses. **Current Opinion in Insect Science**, v. 8, p. 121-129, 2015.

MEIRELES, S. F. *et al.* Yeasts from the nests of two Amazonian stingless bees: screening and PCR-RFLP molecular analysis. **Symbiosis**, v. 87, n. 2, p. 153-163, 2022.

MENEGATTI, C. *et al.* *Paenibacillus polymyxa* associated with the stingless bee *Melipona scutellaris* produces antimicrobial compounds against entomopathogens. **Journal of chemical ecology**, v. 44, p. 1158-1169, 2018.

MENEZES, C. *et al.* The role of useful microorganisms to stingless bees and stingless beekeeping. **Pot-Honey: A legacy of stingless bees**, p. 153-171, 2013.

MENEZES, C. *et al.* A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. **Current Biology**, v. 25, n. 21, p. 2851-2855, 2015.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. JHU press, 2000.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. Baltimore: The John Hopkins University Press. 953 p. 2007.

MICHENER, C. D. The Meliponini. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. H. (Orgs.). **Pot-Honey: um legacy of stingless bees**. New York: Springer, p. 3-17, 2013.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. The CIPRES science gateway: enabling high-impact science for phylogenetics researchers with limited resources. In: **Proceedings of the 1st Conference of the Extreme Science and Engineering Discovery Environment: Bridging from the extreme to the campus and beyond**. 2012. p. 1-8.

MOHAMMAD, S. M.; MAHMUD-AB-RASHID, Nor-K.; ZAWAWI, N. Stingless bee-collected pollen (bee bread): Chemical and microbiology properties and health benefits. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 957, 2021.

MOHAMMADI, S.; SOLTANI, J.I.; PIRI, K. Espécies patogênicas de *Paecilomyces* transmitidas pelo solo e invertebrados apresentam atividade contra fungos e bactérias patogênicas. **Revista de Proteção de Cultivos**, v. 3, pág. 377-387, 2016.

NGALIMAT, M. S. *et al.* Characterisation of bacteria isolated from the stingless bee, *Heterotrigona itama*, honey, bee bread and propolis. **PeerJ**, v. 7, p. e7478, 2019.

NOGUEIRA, D. S. Overview of Stingless Bees in Brazil (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **EntomoBrasilis**, v. 16, p. e1041-e1041, 2023.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**, p. 446-446, 1997.

ODUM, E. P. The Strategy of Ecosystem Development: An understanding of ecological succession provides a basis for resolving man's conflict with nature. **science**, v. 164, n. 3877, p. 262-270, 1969.

PALUDO, C. R. *et al.* Microbial community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee metamorphosis. **PloS one**, v. 14, n. 7, p. e0219696, 2019.

PALUDO, C. R. *et al.* Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1122, 2018.

PAULA NETO, Francisco Leandro de *et al.* **Apicultura nordestina: principais mercados, riscos e oportunidades**. Banco do Nordeste do Brasil, 2006.

PIMENTEL, Renah Boanerges de Queiroz *et al.* Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-14, 2013.

PITT, J. I. *et al.* *Xerochrysium* gen. nov. and *Bettsia*, genera encompassing xerophilic species of *Chrysosporium*. *IMA fungus*, v. 4, p. 229-241, 2013.

RAMALHO, M.; SILVA, M. D.; CARVALHO, C. A. L. Dinâmica de uso de fontes de pólen por *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae): uma análise

comparativa com *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), no Domínio Tropical Atlântico. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 38-45, 2007.

RANNEH, Y. *et al.* Stingless bee honey protects against lipopolysaccharide induced-chronic subclinical systemic inflammation and oxidative stress by modulating Nrf2, NF- κ B and p38 MAPK. **Nutrition & metabolism**, v. 16, p. 1-17, 2019.

RAO, P. V. *et al.* Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 657-664, 2016.

RODRÍGUEZ-ANDRADE, E. *et al.* Diversity of xerotolerant and xerophilic fungi in honey. **IMA fungus**, v. 10, n. 1, p. 1-30, 2019.

ROSA, C. A. *et al.* Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS yeast research**, v. 4, n. 3, p. 271-275, 2003.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M. A. The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1413-1417, 1998.

ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 124-143, 2006.

SAMSON, R. A. *et al.* CBS Laboratory Manual Series. **CBS Laboratory Manual Series**, v. 2, 2010.

SANTOS, A. C. C. *et al.* Antimicrobial activity of supernatants produced by bacteria isolated from Brazilian stingless bee's larval food. **BMC microbiology**, v. 22, n. 1, p. 127, 2022.

SANTOS, A. C. C. *et al.* Bacteria, yeasts, and fungi associated with larval food of Brazilian native stingless bees. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 5147, 2023.

SANTOS, J. E. F. **Fungos isolados de colmeias de *Melipona scutellaris* e avaliação da capacidade de produção de lipases**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2019.

SCHWARZ, R. S.; HUANG, Q.; EVANS, J. D. Hologenome theory and the honey bee pathosphere. **Current opinion in insect science**, v. 10, p. 1-7, 2015.

SHANNON, C.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication, by CE Shannon (and recent contributions to the mathematical theory of communication), W. Weaver**. Uni of illinois Press, 1949.

SILVA, W. P.; PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 146-152, 2012.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. AR; ALMEIDA, E. A. B. Abelhas brasileiras. **Sistemática e Identificação. Fundação Araucária, Belo Horizonte**, v. 253, 2002.

SIQUEIRA, E. L.i; MARTINES, R. B.; NOQUEIRA, F. F. H. Ninhos de abelhas sem ferrao (Hymenoptera, Meliponina) em uma Regiao do rio Araguari, Araguari-MG. *Bioscience Journal*, v. 23, 2007.

SMUTIN, D. *et al.* Micro" bee" ota: honey bee normal microbiota as a part of superorganism. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 2359, 2022.

SNOWDON, J. A. microbiology of honey--meeting your buyers' specifications (why they do what they do). **American Bee Journal**, 1999.

SNOWDON, J. A.; CLIVER, D. O. Microorganisms in honey. **International journal of food microbiology**, v. 31, n. 1-3, p. 1-26, 1996.

SOUZA, J. R. S. *et al.* Occurrence of filamentous fungi associated with stingless bees *Melipona* in meliponaries at the metropolitan region of Manaus, Amazonas. **Rev. da Biol**, v. 18, p. 1-5, 2018.

SOUZA, J. R. S. *et al.* Diversidade fúngica associada a abelhas sem ferrão (*Melipona* spp.) em meliponários na cidade de Manaus e Iranduba, Amazonas, Brasil. 2014.

SOUZA, S. G. X. *et al.* As abelhas sem ferrão (*Apidae: Meliponini*) residentes no campus Federação/Ondina da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. 2015.

STAMATAKIS, A. The RAxML v8. 2. X Manual. **Heidleberg Institute for Theoretical Studies**, v. 845, 2016.

TEIXEIRA, A. C. P. *et al.* *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 339-343, 2003.

THANH, V. N.; HIEN, D. D. *Moniliella floricola* sp. nov., a species of black yeast isolated from flowers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 87-92, 2019.

TIAGO, M. R. M. *et al.* Fungi associated with hives and castes of the Amazonian stingless bees *Melipona interrupta* and *Melipona seminigra*. 2022.

TSANG, C. *et al.* Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era—Past, present and future. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, p. 197-210, 2018.

ULLAH, A. *et al.* Viral impacts on honey bee populations: A review. **Saudi journal of biological sciences**, v. 28, n. 1, p. 523-530, 2021.

VENTURIERI, G. Meliponicultura I: caixa racional de criação. Comunicado Técnico, ISSN 1517-2244. Belém, PA. 2004.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 8, p. 4238-4246, 1990.

VILLAS-BÔAS, J. Manual tecnológico de aproveitamento integral dos produtos das abelhas nativas sem ferrão. **Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN)**, v. 2, 2018.

VILLAS-BÔAS, J. Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão. Brasília. **Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN)**. 96 p, 2012.

Visagie C. M. *et al.* A review of recently introduced *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and other Eurotiales species. **Studies in Mycology** 107: 1–66, 2024. Doi: 10.3114/sim.2024.107.01

VIT, P.; PULCINI, P. Diastase and invertase activities in Meliponini and Trigonini honeys from Venezuela. **Journal of Apicultural Research**, v. 35, n. 2, p. 57-62, 1996.

VOLLET NETO, A. *et al.* Desafios e recomendações para o manejo e o transporte de polinizadores – São Paulo: A.B.E.L.H.A., 2018.

VOLLET-NETO, A. *et al.* Newly emerged workers of the stingless bee *Scaptotrigona aff. depilis* prefer stored pollen to fresh pollen. **Apidologie**, v. 48, p. 204-210, 2017.

WIJAYAWARDENE, N. N. *et al.* Outline of Fungi and fungus-like taxa–2021. **Mycosphere Online: Journal of Fungal Biology**, v. 13, n. 1, p. 53-453, 2022.

WITTER, S. *et al.* As abelhas e a agricultura. **Porto Alegre: EDIPUCRS**, 2014.

WITTER, S.; NUNES-SILVA, P. Manual de boas práticas para o manejo e conservação de abelhas nativas (meliponíneos). **Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul**, v. 1014, p. 144, 2014.

WYNNS, A. A. A evolução convergente de corpos frutíferos altamente reduzidos em *Pezizomycotina* sugere adaptações importantes ao habitat das abelhas. **BMC Biologia Evolutiva**, v. 1, pág. 1-11, 2015.

XIMENES, L. F; VIDAL, M. F. Agropecuária: Mel Natural. 2023.

YAMADA, K. D.; TOMII, K.; KATOH, K. Application of the MAFFT sequence alignment program to large data—reexamination of the usefulness of chained guide trees. **Bioinformatics**, v. 32, n. 21, p. 3246-3251, 2016.

ZULKHAIRI A., F. A. *et al.* Probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey collected across Malaysia. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 1, p. 278, 2020.

APÊNDICE A

INTERNATIONAL JOURNAL OF
SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY
MICROBIOLOGY

RESEARCH ARTICLE

Moura *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2024;74:006227
DOI 10.1099/ijsem.0.006227



Scaptone ramosa gen. nov., sp. nov., isolated from nest of the stingless bee

Joana C. Moura*, Renan N. Barbosa*, Roger F. R. Melo, Cristina M. Souza-Motta and Neiva T. Oliveira

Abstract

In this study, a novel genus is proposed, *Scaptone*, with a novel species, *Scaptone ramosa*, isolated from nests of stingless bees (*Scaptotrigona* sp.). The taxonomic novelty was determined by the phylogenetic analysis of DNA sequences from the internal transcribed spacer regions, small subunit rRNA (18S rRNA), large subunit rRNA (28S rRNA) and the RNA polymerase II second-largest subunit gene (*RPB2*) and paired with our morphological studies. Based on this single species, *Scaptone* is characterized by greyish green to dark grey colonies, densely and profusely branched conidiophores and single-celled, variously shaped hyaline conidia. *Scaptone ramosa* constitutes a distinct, well-supported lineage within *Cephalothecaceae* and can be clearly distinguished from other genera both by DNA sequence analysis and morphological traits. The holotype of *S. ramosa* is URM 95352. The ex-type strain has been deposited in the Micoteca URM culture collection as URM 8721^T and URM 8722. The MycoBank accession number is MB 849456 for the genus and MB 849456 for the species.

INTRODUCTION

Sordariomycetes O.E. Erikss. and Winka is the second largest class in *Ascomycota* [1], and includes most non-lichenized, perithecial or cleistothecial ascomycetes, with a great variety of anamorphs [2]. Species of *Sordariomycetes* can occur in both terrestrial and freshwater habitats [3]. While most are saprobes on soil, litter, dead wood or herbivore dung, some can act as plant pathogens (e.g. *Diaporthe helianthi*) or live as endophytes (e.g. *Trichoderma harzianum*) of various plants. They can also act as pathogens of arthropods (e.g. *Cordyceps gunnii*) or mammals (e.g. *Fusarium oxysporum*).

Cephalothecales was introduced in 2020 by Hyde *et al.* [4] within *Sordariomycetes*. According to the authors, the most striking feature of these fungi is the cephalothecoid peridium, i.e., an ascumatal thick, pseudoparenchymatous wall, with cells that easily fragment along lines of dehiscence (suture lines) into well-defined plates, which can easily separate on spore release; the ascumata is usually a cleistothecium, with eight-spored, evanescent asci, bearing variously shaped ascospores, mostly brown and lacking germ pores; and the asexual morphology includes long, erect, cylindrical, septate conidiophores, with phialidic conidiogenous cells, producing chains of cylindrical, ovate to obovate single-celled conidia.

Cephalothecaceae was proposed in 1917 by Franz Xaver Rudolf von Höhnelt to accommodate *Cephalotheca* Fuckel and other cleistothecial ascomycetes with a cephalothecoid peridium [5]. Later on, the cephalothecoid peridium was no longer considered a valid criteria to support the family, since this pattern of peridium has also been found in a number of unrelated taxa [6] and only the genus *Cephalotheca* was placed in *Cephalothecaceae*. Currently, *Cephalothecales* includes only *Cephalothecaceae*, with five genera, *Albertiniella* Kirschst., *Cephalotheca* Fuckel, *Cryptendoxyla* Malloch and Cain, *Phialemonium* W. Gams and McGinnis and *Victoriomyces* Maggi, Davolos and Persiani. Only two genera have asexual morphs described: *Phialemonium* and *Victoriomyces* [7, 8].

Author affiliations: ¹Department of Mycology, Biosciences Center, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, PE, Brazil.

***Correspondence:** Joana C. Moura, joanacavalcante8@gmail.com; Renan N. Barbosa, renan.rnb@gmail.com

Keywords: *Ascomycota*; *Cephalothecaceae*; phylogeny; *Sordariomycetes*.

Abbreviations: DG18, dichloran 18 % glycerol agar; MEA, malt extract agar; OA, oatmeal agar; OAT, oatmeal-salts agar; PDA, potato dextrose agar; URM, University Recife Mycologia.

The DNA sequences of the two strains (URM 8721^T and URM 8722) have been deposited in GenBank under the accession numbers: OR288154–OR288155 (ITS), OR288156–OR288157 (18S), OR288158–OR288159 (28S), OR714773–OR714774 (*benA*), OR714775–OR714776 (*TEF1a*) and OR725705–OR725706 (*RPB2*).

One supplementary data file is available with the online version of this article.