



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

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE FUNGOS ISOLADOS DE
SUBSTRATOS RELACIONADOS À *Melipona scutellaris* (APIDAE:
MELIPONINI) NO AMBIENTE DE COLMEIAS RACIONAIS**

RECIFE

2018

RENAN DO NASCIMENTO BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE FUNGOS ISOLADOS DE
SUBSTRATOS RELACIONADOS À *Melipona scutellaris* (APIDAE:
MELIPONINI) NO AMBIENTE DE COLMEIAS RACIONAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Orientador:

Neiva Tinti de Oliveira

Co-orientadores:

Cristina Maria de Souza-Motta

Bruno Severo Gomes

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Barbosa, Renan dos Nascimento

Caracterização polifásica de fungos isolados de substratos relacionados à *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini) no ambiente de colmeias racionais / Renan do Nascimento Barbosa. – 2018.

148 f. : il.

Orientadora: Neiva Tinti de Oliveira.

Coorientadores: Cristina Maria de Souza-Motta, Bruno Severo Gomes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de pós-graduação em Biologia de Fungos, Recife, 2018.

Inclui referências e apêndices.

1. Fungos 2. Ecologia 3. Biologia – Classificação I. Oliveira, Neiva Tinti de (orient.) II. Souza-Motta, Cristina Maria de (coorient) III. Gomes, Bruno Severo (coorient.) III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 250

Elaborado por Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

RENAN DO NASCIMENTO BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE FUNGOS ISOLADOS DE
SUBSTRATOS RELACIONADOS À *Melipona scutellaris* (APIDAE:
MELIPONINI) NO AMBIENTE DE COLMEIAS RACIONAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia de Fungos do Departamento de
Micologia do Centro de Biociências da
Universidade Federal de Pernambuco, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 27/ 02/ 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira / UFPE

Dra. Lidiane Roberta Cruz da Silva Ramos / UFRPE

Profa. Dra. Patrícia Vieira Tiago / UFPE

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães / UFPE

Profa. Dra. Laura Mesquita Paiva / UFPE

Para minha avó Maria Celeste Gaia
(*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais Edna Maria e José Nunes, e minha irmã Renata Barbosa, meus eternos professores e incentivadores. Mãe agradeço por ser meu grande alicerce, exemplo de força, coragem e perseverança.
- À professora Neiva T. Oliveira, pelos conhecimentos transmitidos, paciência e confiança em mim depositada desde o mestrado, bem como à professora Cristina M. Souza-Motta e ao professor Bruno Severo Gomes, pela colaboração e co-orientação e por abrirem as portas da Micoteca URM desde o final da minha graduação.
- Aos professores do Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e Biocontroladores, profa. Patrícia Tiago e prof. Roger Melo, e aos demais estudantes e amigos Ewerton, Ivana, Ana Carla, Felipe, Amanda, Sergio Ramos e tantos outros que passaram algum tempo por lá, por todos esses anos de convivência, apoio, colaboração e descontração, tornando sempre agradável a rotina no laboratório.
- À toda equipe da Micoteca URM, em especial à Profa. Maria José, Profa. Débora Massa, Eliane Barbosa, Ana Regis, Rosana, Luan, Suzana, Marília Maciel, Roberta Cruz por sempre estarem dispostos a ajudar e atender aos meus “pequenos” pedidos.
- Aos amigos do Laboratório de Fungos Ambientais, Jadson Bezerra, Karla Torres, Gianne Rizzuto, Diany Lisboa, e aos professores Laura Mesquita e Alexandre Machado por se fazerem presentes durante esse ciclo.
- Ao Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (anteriormente conhecido por CBS) por toda receptividade, em especial ao Jos Houbraken pela supervisão durante o período sandúiche, pelo input na identificação dos fungos e nos artigos que foram e estão sendo escritos. Ao Rob Samson e demais do grupo Applied and Industrial Mycology: Jan Dijksterhuis, Martin Meijer, Bart Kraak, Joyce Woudenberg, Amanda Chen, Frank Segers, Elke van Nieuwenhuijzen, Tom van den Brule e Xuewei Wang, por tornarem minha estadia no CBS muito mais agradável.
- Ao Teun Boekhout pela colaboração na realização dos testes e na descrição das leveduras.
- Aos demais amigos que o período sandúiche na Holanda me proporcionou: Luana Rossato, Mauricio Castrillon, Alejandra Giraldo e Marcelo Sandoval pela convivência e troca de conhecimentos em outras áreas da Micologia.

- Ao Jens Frisvad por toda receptividade em seu laboratório na Technical University of Denmark e por realizar toda a análise dos extrólitos.
- À Associação Pernambucana de Apicultores e Meliponicultores (APIME), por viabilizar todas as coletas, e por não medir esforços para ajudar.
- À banca avaliadora pelas valiosas contribuições.
- À Universidade Federal de Pernambuco, bem como ao Departamento de Micologia e a Pós-Graduação em Biologia de Fungos.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida no Brasil. Ao Programa Ciências sem Fronteiras, por meio do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela bolsa de estudos concedida na Holanda.
- À todos que, de alguma forma, contribuíram com a construção desta estapa profissional.

Muito obrigado!

RESUMO

As abelhas sem ferrão pertencem ao grupo mais abundante, importante e diverso de abelhas tropicais eussociais. Dentre essas, a espécie *Melipona scutellaris* conhecida popularmente como urucu-do-nordeste, é uma das espécies mais criadas no nordeste brasileiro. Grande variedade de organismos pode estar associada a abelhas, entre eles os micro-organismos com os quais possuem uma estreita relação ecológica. Como ocorre com muitos insetos, os fungos parecem desempenhar um importante papel para a nutrição da abelha e proteção contra organismos prejudiciais. O conhecimento sobre fungos associados a substratos relacionados à abelhas, ainda é incipiente e poucos isolados foram identificados utilizando técnicas de taxonomia polifásica. O presente estudo teve por objetivo identificar por meio de taxonomia polifásica isolados de fungos obtidos a partir do mel, pólen e da superfície da colmeia da abelha *M. scutellaris*. Os isolados foram obtidos por meio da diluição/ suspensão dos substratos coletados em água peptonada e plaqueamento em meios de cultura DG18 e ágar extrato de malte com cloranfenicol. No total foram obtidos 1.623 isolados, sendo 1.375 leveduras e 248 fungos filamentosos. Dentre os fungos filamentosos, as amostras purificadas foram identificadas como pertencente aos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Phyllosticta*, *Lichtheimia*, *Monascus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Pithomyces*, *Talaromyces* e *Xylaria*. Dentre as leveduras foram reportados isolados pertencentes aos gêneros *Aureobasidium*, *Blastobotrys*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kodamaea*, *Metschnikowia*, *Starmerella*, *Priceomyces*, *Meyerozyma*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces*, *Pseudozyma* e *Cutaneotrichosporon*. Um total de 12 novas espécies são propostas em diferentes gêneros. A comunidade dos fungos mostrou-se mais similar entre o pólen e a superfície da colméia. O perfil de extrólitos relevou que muitos isolados produziram compostos desconhecidos e/ou nunca detectados entre os gêneros analisados. A família biossintética do composto geodina produzido por novas espécies de *Penicillium* e *Monascus*, sugerem que este grupo de metabólitos tem uma função particular no habitat da abelha. A diversidade de fungos observada provavelmente deve estar associada aos hábitos de forrageamento desses insetos. Desta forma, este estudo reforça que os dados obtidos em prospecções micológicas de substratos relacionados às abelhas sem ferrão podem trazer melhor compreensão sobre a riqueza dos fungos em diferentes nichos pouco explorados.

Palavras-chave: Biodiversidade. Ecologia de fungos. Mata Atlântica. Taxonomia.

ABSTRACT

Stingless bees belong to the most abundant, important and diverse group of tropical euphoric bees. Among these, *Melipona scutellaris* popularly known as Uruçu-do Nordeste, is one of the most created species in the Brazilian northeast. A large variety of organisms may be associated with bees, among them the microorganisms with which they have a close ecological relationship. As with many insects, fungi seem to play an important role in bee nutrition and protection against harmful organisms. The knowledge about fungi associated with bee - related substrates is still incipient and few isolates have been identified using taxonomy with polyphasic approach. The present study aimed to identify by polyphasic approach fungal isolates from honey, pollen and the surface of the nests of *M. scutellaris*. The isolates were obtained by dilution / suspension of the extracts collected in peptone water and plating in culture media DG18 and agar malt extract with chloramphenicol. In total, 1,623 isolates were obtained, being 1,375 yeasts and 248 filamentous fungi. Among the filamentous fungi, the purified samples were identified as belonging to the genus *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Phyllosticta*, *Lichtheimia*, *Monascus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Pithomyces*, *Talaromyces* and *Xylaria*. Among the yeasts, isolates belonging to the genus *Aureobasidium*, *Blastobotrys*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kodamaea*, *Metschnikowia*, *Starmerella*, *Priceomyces*, *Meyerozyma*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces*, *Pseudozyma* and *Cutaneotrichosporon* were reported. A total of 12 new species are proposed in different genera. The fungi community showed to be more similar between the pollen and the surface of the hive. The profile of extrolites revealed that many isolates produced previously unknown compounds and / or never detected between the genera analyzed, and biosynthetic family of the compound geodina produced by new species of *Penicillium* and *Monascus*, suggest that this group of metabolites has a particular function in the habitat of the bee. The diversity of fungi observed should probably be associated with the foraging habits of these insects. In this way, this study reinforced the data from mycological prospection substrates related to stingless bees can provide a better understanding of fungal richness in different unexplored niches.

Key-words: Biodiversity. Fungal ecology. Atlantic Forest. Taxonomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Indivíduos da espécie <i>Melipona scutellaris</i> . A- operária, B- macho e C- rainha.....	18
FIGURA 2 - Meliponário e caixa de criação de <i>M. scutellaris</i> no Horto Zoobotânico de Dois Irmãos, Recife-PE.	21
FIGURA 3 - Diferentes entradas dos ninhos de espécies de abelhas nativas.	23
FIGURA 4 - Quantitativo da classificação das espécies de fungos em raras, comuns, abundantes e ocasionais, a partir dos isolados de amostras de mel, pólen e na superfície das colmeias de <i>Melipona scutellaris</i> utilizadas no presente estudo.....	60
FIGURA 5 - Dendrograma de similaridade representativos das comunidades de fungos filamentosos e leveduras isoladas do mel, pólen e da superfície das colmeias de <i>Melipona scutellaris</i> utilizadas no presente estudo.	61
FIGURA 6 - 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 na superfície das colmeias de <i>Melipona scutellaris</i> coletadas no presente estudo. Valores de bootstrap a partir de 1000 repetições são indicados nos nós.....	62
FIGURA 7 - Ilustração de algumas das culturas de espécies de fungos filamentosos obtidas em substratos relacionados a abelha <i>Melipona scutellaris</i> no presente estudo. [...].	67
FIGURA 8 - Agrupamento dos isolados por gênero usando análise de máxima verossimilhança (ML) para o domínio D1/D2 do gen 26S do rDNA leveduras isoladas a partir de amostras de mel, pólen e na superfície das colmeias de <i>Melipona scutellaris</i> coletadas no presente estudo. Valores de bootstrap a partir de 1000 repetições são indicados nos nós.	73
FIGURA 9 - Ilustração de algumas das culturas de espécies leveduras obtidas em substratos relacionados a abelha <i>Melipona scutellaris</i> no presente estudo. [...].	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Panorama com os gêneros de fungos relatados à abelhas nativas do Brasil	39
TABELA 2- Meios e condições de cultivo utilizados para crescimento dos fungos a serem submetidos a análise de extrólitos.....	54
TABELA 3- Espécies de fungos isolados a partir de amostras de mel, pólen e na superfície das colmeias de <i>Melipona scutellaris</i> utilizadas no presente estudo. Frequência absoluta (fa), frequência relativa (fr%) e classificação da frequência em cada substrato analisado.....	57
TABELA 4- Taxa, Densidade, Diversidade de Shannon-Wiener (H'), Equitabilidade de Pielo (e) e Dominância de Berger-Parker dos fungos isolados a partir de amostras de mel, pólen e na superfície das colmeias de <i>Melipona scutellaris</i> utilizadas no presente estudo.....	61

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Principais árvores onde a urucu nordestina nidifica em Pernambuco segundo Almeida, 1974.....	20
QUADRO 2- Vegetais visitados por <i>Melipona scutellaris</i> para coleta de néctar em Pernambuco segundo Almeida (1974).	25
QUADRO 3- Regiões gênicas e primers utilizados durante o procedimento de identificação por Biologia Molecular dos fungos obtidos no mel, pólen e superfície da colmeia de <i>Melipona scutellaris</i>	52
QUADRO 4- Extrólitos detectados em isolados das espécies de <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Talaromyces</i> e <i>Monascus</i> obtidas de mel, pólen e superfície das colmeias da abelha <i>Melipona scutellaris</i>	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 MATA ATLÂNTICA E AS ABELHAS SEM FERRÃO.....	16
2.2 <i>MELIPONA SCUTELLARIS</i> LATREILLE.....	18
2.3 MELIPONICULTURA.....	20
2.4 A COLMEIA/NINHO DAS ABELHAS SEM FERRÃO	22
2.5 O PÓLEN COLETADO PELAS ABELHAS SEM FERRÃO	24
2.6 O MEL DAS ABELHAS SEM FERRÃO	25
2.7 ABELHAS E MICRO-ORGANISMOS.....	28
2.8 FUNGOS E INSETOS.....	29
2.9 FUNGOS ASSOCIADOS A ABELHAS.....	32
2.9.1 Leveduras associadas a abelhas nativas.....	33
2.9.2 Fungos Filamentosos associadas a abelhas nativas	36
2.10 IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS – ABORDAGEM POLIFÁSICA.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.1 OBTENÇÃO DAS CAIXAS DE CRIAÇÃO E AMOSTRAS.....	50
3.1.1 Área de estudo.....	50
3.1.2 Coleta do material.....	50
3.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS.....	51
3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS.....	51
3.3.1 Extração de DNA, PCR e sequenciamento.....	51
3.3.2 Identificação e análises filogenéticas.....	53
3.3.3 Caracterização macro e micromorfológica.....	53
3.3.4 Análise de extrólitos totais.....	54
3.4 ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DOS ISOLADOS.....	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
6 CONCLUSÕES.....	79

REFERÊNCIAS.....	80
APÊNDICE A- NEW <i>PENICILLIUM</i> AND <i>TALAROMYCES</i> SPECIES FROM HONEY, POLLEN AND NESTS OF STINGLESS BEES.....	94
APÊNDICE B - PHYLOGENETIC ANALYSIS OF <i>MONASCUS</i> AND NEW SPECIES FROM HONEY, POLLEN AND NESTS OF STINGLESS BEES.....	124
APÊNDICE C - FUNGAL PLANET DESCRIPTION SHEETS: 400- 468.....	147

1 INTRODUÇÃO

Os meliponíneos compreendem as abelhas que apresentam como característica principal a atrofia do ferrão. Esses insetos são registrados em grande parte das regiões tropicais, ocupando praticamente toda a América Latina e África, além do sudeste asiático e norte da Austrália, mas o continente americano é o que apresenta a maior diversidade (BÔAS, 2012). Segundo Pedro (2014) no Brasil existem cerca de 244 espécies de abelhas sem ferrão, e possivelmente outras 89 formas ainda não descritas, distribuídas em 29 gêneros. Dessas, aproximadamente 87 são endêmicas, correspondendo cerca de 20% das espécies estimadas para a região Neotropical.

Estudos que buscam conhecer a comunidade de micro-organismos associados a insetos não são recentes. Por exemplo, Douglas (1989) estimou que 10% das espécies de insetos conhecidas podem abrigar micro-organismos simbiotes, e muitos destes representam associações fúngicas. Exemplos bem conhecidos incluem formigas cortadeiras com seus jardins de fungos (Currie, 2001). No entanto, o papel ecológico de muitos fungos e outros micro-organismos que podem viver em simbiose com insetos ainda é pouco explorado (Blackwell, 2010).

Estudos que buscaram conhecer os fungos associados às abelhas (*latu senso*) foram conduzidos por vários autores: Betts (1920) mostrou alguns desses organismos como saprófitos comuns ao ambiente da colmeia; Egorova (1971) isolou a partir do pão das abelhas os fungos *Aspergillus flavus*, *A. versicolor*, *Mucor alboalter*, *Penicillium granulatum*, *P. solitum* e *Sporotrichum olivecum*; Gilliam et al. (1988) verificaram que o fungo *Ascosphaera apis* era o causador da doença *chalkbrood* que ataca abelhas *Apis mellifera*.

As abelhas, em especial as sem ferrão, possuem uma complexa organização social e podem estar associadas a outros organismos, tais como bactérias (Machado 1971, Cruz-Landim 1996), fungos (Gilliam & Roubik 1990), ácaros (Eickwort 1990) e outros insetos de várias ordens (Salt 1929; Wilson 1971; Kistner 1982; Wille 1983; Melo 1996). No que se refere aos fungos, são poucos os relatos desses micro-organismos em associação com as abelhas sem ferrão. Roubik & Wheller (1982) relataram a ocorrência de fungos do gênero *Stemphylium* em ninhos de *Melipona fasciata* no Panamá. Anos depois, também no Panamá, Gilliam et al. (1990) relataram no mel dessa mesma espécie de abelha a ocorrência de um fungo descrito como “verde gelatinoso”.

As abelhas despertam grande interesse comercial devido a produção do mel, mas uma das suas mais importantes funções é a contribuição ecológica para o ambiente natural. Sabe-se

que a microbiota do mel é constituída por bactérias na forma esporulada, como as do gênero *Bacillus*, e outros micro-organismos como leveduras e fungos filamentosos, sendo comuns as espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Penicillium* e *Mucor*. Esses micro-organismos podem estar envolvidos em atividades de deterioração do produto, produção de enzimas, toxinas, conversão metabólica do alimento, produção de fatores de crescimento (vitaminas e aminoácidos) e de fatores inibidores de micro-organismos competidores (Carvalho et al., 2010).

Considerando o supracitado, tem-se como hipótese que o pólen, o mel e a superfície das colmeias das abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* são fontes de diferentes espécies de fungos, muitas ainda desconhecidas pela ciência. A riqueza de fungos filamentosos é maior na superfície das colmeias do que no pólen e no mel. A riqueza de fungos filamentosos é maior no pólen do que no mel e a de leveduras é maior no mel. Os isolados fúngicos obtidos dos substratos podem ser potenciais produtores de micotoxinas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.2 Objetivo geral

Identificar fungos no pólen, mel e na superfície das colmeias da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 criadas em caixas racionais em áreas de Floresta Atlântica em Pernambuco.

1.1.3 Objetivos específicos

- Isolar e identificar utilizando taxonomia morfológica e/ou molecular fungos filamentosos e leveduras em amostras de pólen coletado e armazenado, em amostras de mel e na superfície das colmeias de *M. scutellaris*;
- Contribuir para estimativa da riqueza de fungos associados a abelhas em áreas de Floresta Atlântica;
- Detectar a ocorrência de espécies raras para o Brasil e para a ciência, nesses tipos de substratos;
- Enriquecer as bases de dados genéticos de fungos isolados em ambiente de Floresta Atlântica;
- Ampliar o conhecimento ecológico e taxonômico da diversidade de fungos associados a abelhas nativas em áreas de Floresta Atlântica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MATA ATLÂNTICA E AS ABELHAS SEM FERRÃO

A Mata Atlântica é um dos biomas que tem seu conjunto de fisionomias e formações florestais distribuídas ao longo da costa atlântica brasileira. Antes da colonização européia, esse tipo de vegetação cobria uma faixa correspondente a 1.300.000 km², cerca de 15% do território nacional, porém apenas 8% dessa área preserva suas características bióticas originais. É a segunda maior formação de floresta chuvosa do Brasil e um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo. Devido ao seu grau de endemismo em diversos grupos de organismos é considerada um *hotspot* (Conservation International do Brasil et al., 2000, SOS Mata Atlântica, 2009).

No Brasil a Mata Atlântica está distribuída em faixas litorâneas, florestas de baixada, matas interioranas e campos de altitude; e juntamente com a Caatinga é a vegetação predominante na região Nordeste. No Estado de Pernambuco, a Mata Atlântica está distribuída predominantemente na Zona da Mata, podendo também ocorrer brejos de altitude no Sertão e no Agreste pernambucano (Freire, 1990; Sales et al., 1998).

Por ser um *hotspot*, é importante o conhecimento da diversidade de espécies, entre essas, das abelhas e dos fungos, presentes nos fragmentos para que sejam estabelecidas estratégias de conservação ou recuperação. Em um ambiente de Mata Atlântica, Ramalho (2003) enfatizou que as abelhas silvestres sem ferrão representam cerca de 70% de todas as abelhas em atividade.

Poucos são os estudos de ecologia de comunidades de abelhas da Mata Atlântica em comparação aos estudos em áreas de Cerrado, Caatinga e Campos Sulinos. Essa relativa escassez de levantamentos em áreas cobertas por floresta deve-se em grande parte à dificuldade da captura de abelhas em flores no dossel (Gonçalves e Brandão, 2008).

Segundo Michener (2013), a tribo Meliponini é integrada por mais de 500 espécies descritas. Segundo Amaral (2009) o gênero *Melipona* apresenta o maior número de espécies (cerca de 70), com distribuição em toda região neotropical. De acordo com Silveira et al. (2002), o Brasil possui cerca de 192 espécies de abelhas sem ferrão pertencentes a diversos gêneros.

Uma curiosidade sobre as abelhas do Brasil é que o primeiro registro foi feito pelo Padre Jose Antonio Anchieta que registrou a abundância do mel e das espécies de abelhas aqui existentes, e diz:

“Encontram-se quase vinte espécies diversas de abelhas, das quais umas fabricam o mel nos troncos das árvores, outras em cortiços construídos entre os ramos, outras debaixo da terra, donde sucede que haja grande abundância de cera. Usamos do mel para curar feridas, que saram facilmente pela proteção divina. A cera é usada unicamente na fabricação de velas”. (Palazuelos Ballivián, 2008).

Segundo o Dr. Paulo Nogueira Neto, um dos mais importantes estudiosos das abelhas nativas, a cera das velas de muitos lugares da América Latina, é extraída das abelhas, sendo provável que a maior parte do mel e da cera usados nos três primeiros séculos após o descobrimento seja originário da abelha Uruçu (Nogueira Neto *apud* Mel e Abelhas Brasileiras, 2004).

Até 1840, as abelhas que existiam no Brasil eram somente as nativas, indígenas ou meliponíneos, sendo o mel dessas a principal fonte adoçante até a chegada da cana-de-açúcar. As abelhas “europeias” foram introduzidas na América Central e do Sul, provavelmente pelo Brasil, no final do século XVIII, e foram trazidas da Espanha e de Portugal por volta de 1838 pelo padre Manoel Severiano. Em 1839, o padre Antônio Carneiro Aureliano introduziu no Rio de Janeiro a abelha européia: alemã ou negra (*Apis mellifera mellifera*) e austríaca (*Apis mellifera carnica*), ambas procedentes do Velho Mundo, porém, não com o propósito de produzir mel, mas sim, para produção de velas de cera, necessárias para as missas da Corte. Novas colônias foram introduzidas no sul e sudoeste do país por imigrantes italianos e alemães entre os anos de 1845 e 1880. No final do século XX, foi introduzida *Apis mellifera ligustica* popularmente conhecida por abelha italiana (Palazuelos Ballivián, 2008).

As abelhas apresentam grande importância nos mais diversos ecossistemas terrestres, mas essa importância vem sendo negligenciada, pois devido às alterações que o homem tem causado no ambiente, a riqueza desses e de outros insetos vem sendo reduzida pela destruição de locais de nidificação, redução na disponibilidade de recursos tróficos e eliminação de colônias naturais (Kerr et al., 1996). A conservação das abelhas é de inquestionável importância para a manutenção da biodiversidade, pois elas representam a principal forma de dispersão e reprodução de várias plantas, resultando em frutos e sementes que constituem a principal fonte de alimento para grande número de aves e mamíferos (Gimenes, 2002).

2.2 *MELIPONA SCUTELLARIS* LATREILLE

As abelhas pertencem ao Reino Animalia, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Hymenoptera e encontram-se agrupadas na superfamília Apoidea, a qual pertencem as abelhas sem ferrão nativas do Brasil (Pereira et al., 2006; Amaral, 2009). Essa superfamília é subdividida em oito famílias, entre essas a Apidae que se subdivide em quatro subfamílias: Apinae, Meliponinae, Bombinae e Euglossinae. Por sua vez a subfamília Meliponinae se divide em duas tribos: Meliponini, que possui apenas o gênero *Melipona* e a tribo Trigonini, que na região neotropical possui dez gêneros (Pereira et al., 2006; Amaral, 2009). Apesar dos esforços sobre o conhecimento da fauna de Apoidea, as abelhas brasileiras ainda são pouco conhecidas e estudadas (Batalha Filho et al., 2007).

A espécie *Melipona scutellaris* foi uma das primeiras espécies de abelhas a serem domesticadas pelos índios Potiguaras, Kiriri, Xucuru, Pataxó, Paiaku, Tupicuruba e Aymoré. Rapiadamente se tornou uma das espécies de abelhas sem ferrão mais criadas no nordeste brasileiro, pois os colonizadores portugueses, por apreciarem o incomparável mel, logo aprenderam as técnicas de criação (Kerr et al. 1996; Imperatriz-Fonseca et al. 2007; Alves et al., 2012). Popularmente é conhecida por “uruçu”, termo com origem no tupi “eiru’su” que significa “abelha grande”, assim como eram conhecidas as abelhas que permeavam a cultura dos povos nativos da zona da mata do litoral nordestino. O termo uruçu foi empregado para outras abelhas do mesmo gênero de porte avantajado, tanto no nordeste quanto na Amazônia, assim os criadores, conhecidos por meliponicultores, convencionalmente chamam a espécie de uruçu nordestina ou verdadeira (A Abelha Uruçu, 2004) (Figura 1).

Figura 1. Indivíduos da espécie *Melipona scutellaris*. A- operária, B- macho e C- rainha.



Fonte: http://www.ib.usp.br/uruçu/ingles/colecao_01.htm

O tamanho corporal é relativamente grande, entre 10 e 13 mm de comprimento total e massa corporal acima de 60 mg, enquanto que a grande maioria das espécies dos demais gêneros de Meliponini (*Partamona* Schwarz, 1939, *Plebeia* Schwarz, 1938, *Scaptotrigona* Moure, 1942, *Tetragonisca* Moure, 1946, *Trigona* Jurine, 1807, *Trigonisca* Moure, 1950, etc) possui menos de 8 mm de comprimento (Silva et al. 2011).

Melipona scutellaris é considerada o meliponíneo com maior distribuição no norte e nordeste do Brasil, restrita à porção norte do domínio tropical Atlântico, e ocorrência registradas desde o Estado do Rio Grande do Norte até o Estado da Bahia, sendo uma das mais importantes na geração de renda para agricultura familiar e na manutenção de áreas com vegetação natural (Alves et al., 2012). Embora tenha distribuição relativamente ampla, a Mata Atlântica sofreu grande redução, e os fragmentos florestais remanescentes são pequenos e encontram-se isolados por extensas áreas de atividades agropecuárias, fragmentando a população. A área de ocupação de abelhas dessa espécie é estimada em menos de 500km². Portanto, atualmente está categorizada como Em Perigo (EN) (ICMBio, 2014).

Como já mencionado, a urucu é conhecida devido ao seu mel, considerado medicinal principalmente na zona rural nordestina, sendo empregado como fortificante, afrodisíaco, no tratamento de gripes, bronquite, coqueluche, fadiga, câncer, amebíase, trombose, catarata, úlcera, gastrite, cefaleia, acidente vascular cerebral, hemorragia pós-parto, micose oral entre outras como picada de cobra e mordida de cães portadores de raiva (Costa-Neto, 2002; Alves e Rosa, 2007; Aleves et al., 2008; Ferreira et al., 2009; Alves et al., 2009). No tocante ao seu sabor, esse mel é rico em princípios aromáticos, conferindo-lhe um sabor diferenciado, o que estimula seu emprego como alimento. Além disso, o preço pelo qual é comercializado chega a ser 20 vezes mais caro que o mel de *Apis mellifera*.

Preferencialmente essa espécie nidifica em áreas de mata úmida, com árvores de grande porte e floradas abundantes (Quadro 1), sendo assim os fragmentos de Mata Atlântica no litoral nordestino é seu habitat natural ideal para nidificação (Rodrigues e Ferraz, 2004), além de serem encontradas na microrregião do brejo no Estado da Paraíba e na região do Seridó do Rio Grande do Norte (Marinho et al., 2002).

Quadro 1. Principais árvores onde a urucu nordestina nidifica em Pernambuco segundo Almeida, 1974.

Nome científico	Nome vulgar
<i>Inga</i> sp.	Ingá
<i>Tabebuia avellanedae</i>	Pau d'arco roxo
<i>Tapirira guianensis</i>	Pau pombo
<i>Bombax gracilipes</i>	Mungaba
<i>Caraipa densifolia</i>	Camaçari
<i>Eschweilera luschnathii</i>	Embiriba
<i>Hymenaea martiana</i>	Jatobá
<i>Spondias lutea</i>	Cajá
<i>Galezia gorazema</i>	Pau d'alho
<i>Bowdichia virgilloides</i>	Sucupira mirim
<i>Micropholis</i> sp.	Prijui
<i>Ocotea</i> sp.	Louro
<i>Tabebuia roseoalba</i>	Pau d'arco
<i>Byrsonima sericea</i>	Murici
<i>Tabebuia chrysotricha</i>	Pau d'arco amarelo
<i>Parkia pendula</i>	Visgueiro

Seu papel ecológico diz respeito à polinização de flores durante suas atividades de coleta do néctar, o que contribui para a manutenção do ecossistema com a produção de frutos e sementes (Kerr et al. 1996), sendo bastante seletivas para vegetação característica de Mata Atlântica e capoeira (A Abelha Uruçu, 2004).

Dentre as espécies da subtribo Meliponina, *M. scutellaris* destaca-se como a mais conhecida e manejada. Com o aumento da meliponicultura no Estado e a procura por produtos das abelhas sem ferrão, a busca de informações sobre a urucu vem aumentando.

2.3 MELIPONICULTURA

A criação de abelhas sem ferrão é denominada Meliponicultura. É uma prática secular, com relatos desde os primórdios das civilizações antigas, no Egito Antigo (Palazuelos Ballivián 2008). A meliponicultura brasileira, inicialmente praticada pelos índios, foi por muito tempo uma atividade praticada por pequenos e médios produtores, utilizando mão de obra familiar, sendo portanto considerada uma atividade econômica complementar (Coletto-Silva 2005). É uma atividade bastante difundida nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, tendo o mel, o principal produto valorativo de exploração (Alves et al. 2007). Apesar de também ser praticado com outros gêneros, na região Nordeste destaca-se a criação de espécies de abelhas do gênero *Melipona*, principalmente a espécie *M. scutellaris* uma vez que as abelhas deste gênero apresentam porte corpóreo avantajado e normalmente proporcionam satisfatórias colheitas de mel (Alves et al. 2009).

As abelhas são criadas em cortiços ou em caixas de madeira para a produção de mel, não sendo possível generalizar um único modelo de caixa, pois a escolha depende da biologia de cada espécie (Figura 1). De forma geral, são blocos retangulares, ocos, construídos com madeira, sendo geralmente escolhido o *Pinus*, madeira exótica amplamente cultivada no Brasil e de fácil acesso, o que evita o uso das árvores nativas. Entre os modelos de caixa é possível separar em dois grupos, o das caixas horizontais e o das caixas verticais, sendo o primeiro mais tradicional nas regiões Norte e Nordeste no Brasil (Villas-Bôas, 2012).

Figura 2. Meliponário e caixa de criação de *M. scutellaris* no Horto Zoobotânico de Dois Irmãos, Recife-PE.



Fonte: O autor, 2015.

A meliponicultura se enquadra dentro dos conceitos de diversificação e uso sustentável da terra, sendo integrada a plantios florestais de fruteiras e de culturas de ciclo curto, podendo contribuir com o aumento da produção agrícola e regeneração da vegetação natural. O trabalho de polinização é fundamental para uma maior diversidade vegetal, pois garante a fecundação cruzada das plantas garantindo o polimorfismo genético (Kerr et al, 1996). Essa diversidade pode ser ainda mais favorecida quando é bem aceita a introdução da criação racional pela comunidade local, como foi observado no trabalho de Venturieri et al. (2003) quando a introdução de *Melipona fasciculata* entre os agricultores de Bragança-PA foi bem sucedida, chamando a atenção de meliponicultores experientes e da população em geral.

Embora seja uma atividade secular a falta de técnicas e manejo adequados são os fatores limitantes do desenvolvimento da meliponicultura. Sila e Lages (2001) verificaram que a falta de um manejo adequado tinha implicações negativas no retorno econômico da atividade. Segundo Viera et al. (2009) a alimentação artificial tem se mostrado uma boa técnica de manejo durante os períodos de seca e escassez de alimento, melhorando as condições gerais das colmeias e aumentando a produção durante o período de floração das plantas melíferas.

2.4 A COLMEIA/NINHO DAS ABELHAS SEM FERRÃO

As abelhas sem ferrão apresentam vários hábitos de nidificação, com grande complexidade estrutural. Os ninhos geralmente são constituídos de cera e cerume (cera com adição de própolis) e algumas espécies utilizam geoprópolis (barro adicionado de resina) para impermeabilização. Outros materiais, como barro, detritos vegetais e até mesmo fezes secas de outros animais, principalmente mamíferos, também podem ser utilizados no processo de nidificação (Michener, 2007). Essas abelhas frequentemente nidificam cavidades pré-existent, tais como ocos de árvores, fendas de rochas, cavidades nos solos e interiores de cupinzeiros, podendo existir ninhos expostos ou semi-expostos (Kleinert-Giovannini 1989; Kerr 1999). Algumas espécies, ainda podem nidificar ocasionalmente em outros tipos de cavidades naturais ou artificiais, como barrancos, paredes e frestas de muros (Nogueira-Neto e Sakagami 1966).

A arquitetura observada na entrada (Figura 3) e no interior do ninho é útil para auxiliar na identificação e reconhecimento de gêneros e até mesmo das espécies (Roubik, 2006). Os meliponíneos possuem um modo característico de construção do ninho, com várias estruturas que variam de acordo com a espécie, como: tubo de entrada, batume, potes de alimento, células de cria, invólucro e pilares para conectar esses elementos (Sakagami, 1982). A Uruçu do Nordeste faz seu ninho em ocos de árvores velhas de até 80 m de altura. Estes são construídos basicamente de cera pura ou cerume e a entrada é formada com barro e própolis moldando em forma de estrias ou sulcos (Kerr et al. 1996).

A área de cria dos Meliponini é bastante interessante, uma vez que dependendo da espécie, os favos podem ser em forma de cacho ou em forma de discos horizontais. Uma particularidade é que no gênero *Melipona* não ocorre a construção de células de tamanho maior onde normalmente é depositada a maior quantidade de alimento, assim rainhas, operárias e machos nascem e se desenvolvem dentro de células de cria de tamanho igual, por esse motivo acredita-se que as castas sejam determinadas por meio de fatores genéticos e alimentares (Kerr, 1950; Sakagami, 1982; Kerr et al., 1996; Nogueira-Neto, 1997; Michener, 2000; Ferreira-Caliman, 2008; Jarau et al., 2010).

Figura 3. Diferentes entradas dos ninhos de espécies de abelhas nativas.



Fonte: http://www.ispn.org.br/arquivos/mel008_31.pdf

Os aspectos biológicos das abelhas sociais são extremamente diversificados, com características interessantes como a capacidade de regulação do clima dentro dos ninhos conhecida também como endotermia colonial. A manutenção da homeostase no ninho (com o controle de variáveis como umidade relativa e termorregulação colonial) é um aspecto importante em abelhas sociais, principalmente para a sobrevivência da cria. A capacidade de termorregulação colonial é decorrente, em parte, às características estruturais do ninho (isolamento térmico), como também ao fato da endotermia dos indivíduos (Heinrich, 1993; Carvalho, 2009).

2.5 O PÓLEN COLETADO PELAS ABELHAS SEM FERRÃO

Denomina-se pólen os grãos que são encontrados nas anteras (localizadas nos estames florais) que, em geral, são de coloração amarelo. Cada grão de pólen, além de conter os cromossomos que constituíram a herança masculina da futura planta, contém uma pequena quantidade de substâncias de reserva, principalmente lipídeos ou água com proteínas e carboidratos (Nogueira-Neto, 1997).

Os grãos de pólen manipulados pelos meliponíneos recebem o nome de samora nos Estados do Centro-Sul e Sudeste, e de saburá ou samburá na Amazônia e no Nordeste. Os meliponíneos empregam suas mandíbulas para trabalhar o pólen, assim utilizam neste processo secreções provenientes das glândulas mandibulares e hipofaringeanas (Nogueira-Neto, 1997).

Nos potes de estocagem é depositada a massa de pólen, sucos digestivos e micro-organismos. Posteriormente, os potes são fechados para que ocorra a fermentação. Inicialmente, sob condições de aerobiose ocorre sucessão de tipos bacterianos, diminuição do pH e da tensão de oxigênio. O produto resultante é rico em pólen e micro-organismos, com pH em torno de 5,0 a 6,0 (Silva e Zucoloto, 1994). A massa fermentada apresenta cor marrom levemente amarelado, odor característico, pH em torno de 2,6, com baixo número de micro-organismos (alguns anaeróbios) e está pronto para ser consumido pelas abelhas (Machado, 1971, Silva e Zucoloto, 1994). Esses processos diferem de acordo com o grupo a que pertence a abelha, e permitem uma melhor assimilação dos nutrientes e melhor preservação do alimento estocado (Machado, 1971).

A flora apícola é definida como o conjunto de espécies vegetais que as abelhas utilizam como fonte de néctar e/ou pólen para sua sobrevivência e produção de mel (Anacleto, 2007). *Melipona scutellaris* apresenta preferência pela vegetação característica de Mata Atlântica e capoeira em detrimento da vegetação de campo, e é bastante seletiva com relação à escolha de fontes alimentares. Foram encontradas evidências de pasto apícola para *M. scutellaris*, as plantas: Guamirim (*Mosiera* sp.); Taquari (*Ichnanthus* sp.); Caliandra (*Caliandra brevipes*); Cambará (*Wulffia stenoglossa*); Marmeleiro (*Croton alagoensis*); Jaquemotia (*Jaquemontia* sp.); Purga-de-caboclo (*Cayaponia cabocla*) (Rodrigues et al. 2003, 2010). Segundo o estudo de Almeida (1974) as famílias botânicas mais visitadas pela urucu para as coletas de néctar em Pernambuco são citadas no quadro abaixo (Quadro 2).

Quadro 2. Vegetais visitados por *Melipona scutellaris* para coleta de néctar em Pernambuco segundo Almeida (1974).

Nome científico	Nome vulgar
<i>Andira nítida</i>	Angilim
<i>Bixa orellana</i>	Urucum
<i>Bombax gracilipes</i>	Munguba
<i>Bowdichia virgiloides</i>	Sucupira
<i>Byrsonima sericea</i>	Murici
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga
<i>Eschweilera luschnathii</i>	Embiriba
<i>Hymenaea martiana</i>	Jatobá
<i>Spondias mombin</i>	Cajá
<i>Tabebuia avellaneda</i>	Pau d'arco roxo
<i>Tabebuia chrysotricha</i>	Pau d'arco amarelo

2.6 O MEL DAS ABELHAS SEM FERRÃO

O mel é uma substância açucarada que pode ser produzido a partir do néctar das flores (conhecido por mel floral) e de outras partes da planta (mel extra-floral), ou de excreções de insetos sugadores de plantas (mel de melato). O material é misturado com um líquido rico em enzimas digestivas secretado pelas glândulas hipofaringeanas das abelhas, armazenado e maturado nos potes de mel (Correia-Oliveira et al. 2008; Mendes, 2009; Carvalho et al. 2010).

Considerado como um dos alimentos mais puros da natureza, o mel é amplamente consumido devido ao seu sabor agradável e por apresentar-se como importante fonte de energia (Alves et al., 2009). Historicamente, o mel pode ser considerado como uma das primeiras fontes de açúcar para o homem, uma vez que desde os períodos pré-hispânicos o mel e o pólen das abelhas nativas sem ferrão já eram utilizados na dieta das comunidades indígenas americanas (Carvalho et al., 2005).

No Brasil até o século XIX, o mel das abelhas sem ferrão era utilizado na alimentação tanto pelos índios quanto pelos brancos, além do aproveitamento da cera pelos padres jesuítas na confecção de velas. As comunidades Maias e Nahoas no México mantêm o costume de misturar o mel da abelha *Melipona beecheii* Bennet, 1831 com bebida oferecida a seus Deuses durante as cerimônias religiosas, além de sua utilização em misturas como remédio (Carvalho

et al., 2005). O mel dos meliponíneos apresenta uma longa tradição de consumo e a ele também são atribuídos vários usos medicinais (Gonçalves et al., 2005), entretanto quando comparado com o mel de *Apis*, pouco se conhece sobre esse produto (Souza, 2008; Mendes, 2009).

Apesar da grande diversidade de abelhas sem ferrão, a abelha *A. mellifera* é considerada como a principal espécie produtora de mel utilizado para consumo humano devido a sua domesticação antiga e por ser originária dos principais países consumidores de mel (Carvalho et al., 2005).

A composição do mel está relacionada a diversos fatores, entre esses a espécie de abelha, o estado fisiológico da colônia, as fontes vegetais dos quais ele é derivado, o tempo de maturação, as condições edafo-climáticas e a época da colheita (Carvalho et al., 2005). O mel produzido pelas abelhas sem ferrão tem despertado crescente interesse econômico, entretanto, apesar dessa importância a legislação brasileira que regulamenta a padronização do mel para fins comerciais é baseada apenas nas características do mel produzido por *A. mellifera* (Azeredo et al., 2000; Souza et al., 2009). Anacleto et al. (2009) que buscaram determinar as características físico-químicas de 20 amostras de mel da abelha Jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille, 1811), do município de Piracicaba- SP, reforçam a necessidade de um padrão próprio para o mel dos meliponíneos, uma vez que nem todos os padrões referentes ao mel de *A. mellifera*, podem ser aplicados para os méis de meliponíneos.

Entre as abelhas sem ferrão, as uruçus são consideradas boas produtoras de mel, com produção de 3 a 6 litros de mel por ano por ninho (Venturieri et al., 2003). O mel é de boa qualidade e de características intrínsecas. A uruçu do Nordeste juntamente com a mandaçaia (*Melipona quadrifasciata anthidioides* e *M. mandaçaia*) são destaques nas criações nacionais, pela maior produção e aceitação do mel.

Analisando amostras de mel de meliponíneos da Bahia, Souza et al. (2004) encontraram os valores para açúcares totais (67,72 a 84,99%), açúcares redutores (66,00 a 76,20%) e sacarose (1,13 a 8,35%) para amostras de méis de *Melipona asilvai* (Moure, 1971). Alves et al. (2005) obtiveram o valor médio de 74,82% para açúcares redutores em amostras de mel de *M. mandacaia*. Anacleto et al. (2009) em amostras de mel de *T. angustula* encontraram os valores médios de açúcares totais (56,46%), redutores (55,46%) e sacarose aparente (0,95%).

A umidade é o um dos principais parâmetros físico-químicos avaliados para a determinação da qualidade do mel, sendo bastante elevada no mel dos meliponínios (Azeredo et al., 2000). A umidade pode ser alterada após a sua retirada da colmeia em função das

condições de armazenamento depois da extração. Pamplona (1989) trabalhando com amostras de mel brasileiro encontrou valores de umidade de 40 a 20% para o mel de *T. angustula*; 45,0% para *M. quadrifasciata*; 20,0% para *S. postica* e 27,0% para o mel de *Plebeia droryana* (Friese, 1900). Outros autores também verificaram altos valores de umidade para o mel de *Melipona* (Souza et al., 2004; Alves et al., 2005), *Scaptotrigona* (Almeida-Anacleto, 2007) e *Tetragonisca* (Rodrigues et al., 1998; Almeida-Muradian; Barion, 2007), fato que os torna menos densos que o mel das abelhas africanizadas, possibilitando o desencadeamento de processos fermentativos quando associada à presença de levedos (Souza et al., 2009).

De acordo com Alves et al. (2005), a acidez é outro caráter importante na manutenção da estabilidade do mel, reduzindo o risco de desenvolvimento de micro-organismos. As modificações de acidez do mel são oriundas da variação dos ácidos orgânicos causada pelas diferentes fontes de néctares, pela ação das bactérias durante a maturação do mel, pelas quantidades de minerais e pela ação da enzima glicose-oxidase que origina o ácido glucônico (Carvalho et al., 2005). Alves et al. (2005) encontraram para as amostras de mel de *M. mandacaia* o valor médio de acidez de 43,48 meq.kg⁻¹ (miliequivalente). Anacleto et al. (2009) obtiveram o valor de 45,23 meq.kg⁻¹ para acidez no mel de *T. angustula*. Souza et al. (2004) também verificaram o valor de 41,64 meq.kg⁻¹ para o mel de *M. asilvai*.

Em relação ao potencial hidrogeniônico (pH) do mel, Alves et al. (2005) obtiveram o valor médio de $3,27 \pm 0,09$ com variação entre 3,16 e 3,54, para o mel de *M. mandacaia*; Souza et al. (2004), também verificaram o valor de $3,27 \pm 0,09$ com variação de 3,14 - 3,40 para o mel de *M. asilvai*; Anacleto et al. (2009) encontraram o valor de 4,10 com variação de 3,54 a 4,64 para o mel de *T. angustula*.

Segundo Alves et al. (2005) o mel de meliponíneos caracteriza-se pela fluidez, devido a alta umidade que acaba por interferir na viscosidade do produto, uma vez que quanto menos água, mais alta a densidade e a viscosidade. Os referidos autores averiguaram a média de $59,60 \pm 28,25$ mPa.s (viscosidade dinâmica) para a viscosidade em amostras de méis de *M. mandacaia* e Souza et al. (2004) verificaram o valor 66,55 mPa.s no mel de *M. asilvai*.

O mel, além dos parâmetros aqui expostos também possui ácidos orgânicos, enzimas, vitaminas, flavonóides, minerais, proteínas e outros compostos que contribuem para sua cor, odor e sabor (Carvalho et al., 2005).

2.7 ABELHAS E MICRO-ORGANISMOS

As associações entre as abelhas sem ferrão e micro-organismos são aparentemente em sua maioria obrigatórias. Contudo, a maioria dos relatos não considera possíveis relações evolutivas (Bezerra et al., 2000; Peruquetti, 2000). Apesar disso, os pesquisadores têm se interessado por esse tema devido à possibilidade de estudos relacionados à biologia, ecologia e evolução dessas associações (O'Connor, 1982; Roubik e Wheeler, 1982; Roubik, 1989; Bezerra et al., 2000).

A microbiota do mel é constituída por bactérias na forma esporulada, como as do gênero *Bacillus*, e outros micro-organismos ocasionais ou acidentais, como as leveduras e fungos filamentosos, sendo comuns os dos gêneros *Penicillium*, *Mucor* e *Saccharomyces*. Estes fungos são incorporados ao mel pelas próprias abelhas da colônia, durante as operações de coleta, preparo do néctar e pólen, ou de maneira fortuita por manipulações pouco higiênicas, durante as etapas de coleta e processamento do mel (Alves et al., 2009). Estes micro-organismos podem estar envolvidos em atividades de deterioração do produto, produção de enzimas, toxinas, conversão metabólica do alimento, produção de fatores de crescimento (vitaminas e aminoácidos) e de fatores inibidores de micro-organismos competidores (Carvalho et al., 2010). Snowdon e Cliver (1996) classificaram as prováveis fontes de contaminação microbiana do mel em primárias e secundárias. As fontes primárias compreendem o pólen, o trato digestivo das abelhas, poeira, ar, terra e flores. As fontes secundárias incluiriam manipuladores de alimentos, contaminação cruzada e equipamentos.

A Legislação Brasileira que regulamenta a padronização do mel para fins de comercialização se refere somente às características do mel de *Apis mellifera*, sendo que os únicos valores de referência estabelecidos pela RDC nº 12 da ANVISA (Brasil, 2001) são a contagem de bolores e leveduras, e verificação da presença de coliformes totais a 35°C e coliformes termotolerantes a 45°C (Monte et al. 2013). A Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, do Ministério da Agricultura e Abastecimento, estabelece o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de mel, estabelecendo um valor tolerável de $1,0 \times 10^2$ UFC/g, para bolores e leveduras e ausência ($< 3,0$ NMP/g) para coliformes totais (Lieven et al., 2009).

2.8 FUNGOS E INSETOS

As associações entre fungos e insetos estão entre as mais ricas, diversas e complexas em ecossistemas terrestres. As adaptações e habilidades de dispersão desses organismos resultam em uma variedade de tipos de interações (Schigel, 2012). Essas interações podem até ser obrigatórias, como exemplo, mais de 40 espécies de fungos estão associadas com a *Hypothenemus hampei*, inseto causador da broca do café (Pérez et al., 2003). Acredita-se que por volta de 40-60 milhões de anos antes do advento da agricultura humana, três linhagens de insetos (térmitas, formigas e besouros), desenvolveram, independentemente, a capacidade de cultivar fungos para alimentação (Mueller e Gerardo, 2002).

As associações de fungos do filo Ascomycota com insetos são diversas, entre elas as que ocorrem com as leveduras que são comumente encontradas no intestino de insetos como endossimbiontes, atuando no processo de desintoxicação de materiais vegetais ou fornecendo enzimas que vão ajudar a quebrar a parede celular dos tecidos vegetais (Vega e Dowd 2005). Uma das mais conhecidas associações simbióticas envolve as formigas da tribo Attine que cultivam esses fungos simbiontes e em troca asseguram a sua reprodução clonal. Essa sofisticada relação pode ser dividida em cinco sistemas de agricultura distintos, que não são objeto de estudo dessa tese e assim não serão discutidos aqui, contudo é interessante mencionar que o fungo cultivado por certos aténeos possuem adaptações para a vida conjunta, como exemplo, somente o fungo simbiote dessas formigas produz o gongilídio, uma estrutura especializada da hifa que acumula nutrientes e é preferencialmente consumida pelas formigas (Nickele et al., 2013).

Também é conhecida a associação de muitas leveduras com insetos que se alimentam de néctar (Lachance, 2006; Robert et al., 2006). As interações inseto-leveduras do filo Ascomycota são comuns e alguns estudos revelam associações generalizadas entre esses organismos em diferentes habitats especializados, como exemplo, entre leveduras cactofílicas e *Drosophila* (Anderson et al., 2003; Lachance; Starmer, 1998) e leveduras do gênero *Metschnikowia* associadas a determinados visitantes florais, como espécies de *Drosophila* (Lachance; Bowles; Starmer, 2003). *Drosophila* são os principais candidatos para estudos sobre os efeitos de insetos em comunidades de leveduras, porque é conhecido que elas consomem esses fungos e terminam atuando como vetores. As leveduras são uma importante fonte de nutrição para adultos e larvas de *Drosophila* e o crescimento larval e sobrevivência desses insetos pode ser afetado pelas espécies de leveduras disponíveis (Stamps et al., 2012).

Segundo Phaff e Starmer (1987) a associação entre leveduras e insetos pode ser puramente mecânica, em que os insetos apenas servem como vetores para dispersão sem nenhum benefício nutricional, ou uma associação benéfica em que o inseto não somente age como vetor, mas também se beneficia das leveduras como complemento alimentar. Por exemplo, *Drosophila melanogaster* é um importante vetor de dispersão de leveduras, pois essa mosca se alimenta de figo e, conseqüentemente, ingere leveduras presentes nesse fruto. Essas leveduras conseguem superar a passagem pelo intestino e são depositados por meio das fezes juntamente com os ovos na cavidade dos frutos de figueiras (*Calimyrna* sp.) (Miller e Phaff, 1962; Coluccio et al., 2008). Esse mecanismo é mais eficiente quando comparado com o vento ou a água, já que as leveduras são transportadas para ambientes ricos em nutrientes (Coluccio et al., 2008). Com moscas da espécie *Drosophila ampelophila* é diferente, pois utilizam esse micro-organismo como complemento alimentar das larvas, visto que a levedura fornece substâncias, possivelmente por meio da degradação de compostos maiores em compostos mais simples, que são necessárias para o desenvolvimento delas (Northrop, 1917).

Outra interessante relação entre fungos e insetos ocorre entre os fungos que fazem parte dos *Cordyceps*. Os ascomicetos desse gênero são conhecidos por comprovada ação entomopatogênica parasitando diversas ordens da classe Insecta, principalmente Hymenoptera, Hemiptera, Diptera, Lepidoptera e Coleoptera (Sánchez, 2002).

Entre os fungos do filo Basidiomycota um exemplo de interação ocorre com os cídeos, pequenos besouros que são adaptados para viver toda a vida dentro do corpo de frutificação de basidiomicetos, onde consomem todo o talo do fungo, deixando-o apenas quando o substrato é esgotado. Alguns insetos são primariamente fungívoros (micofagia ou fungivoria) como exemplo os besouros das Superfamílias *Elateroidea*, *Staphylinoidea*, *Scirtoidea* entre outras, ou apenas consomem material vegetal modificado por enzimas fúngicas (Lawrence, 1989). A fungivoria também ocorre em outras espécies de formigas, como é o caso de *Euprenolepis procera*, que é especializada em se alimentar de cogumelos (Witte e Maschwitz, 2008). Além disso, vários basidiomicetos são adaptados para dispersão por insetos, por exemplo, *Mutinus* sp. Esse fungo libera odores fétidos que atraem moscas e outros insetos para forragearem o seu basidioma, com isso os esporos aderem ao corpo do inseto e serão depositados em habitats favoráveis à germinação (Blackwell, 2010). A associação com fungos também tem sido particularmente importante para a evolução de certos insetos como os pertencentes a família *Latridiidae* que possuem estruturas especializadas no torax denominadas micangias, onde são carregados os esporos (Costa et al., 1988). Os insetos também podem carregar propágulos do fungo externamente aderidos ao

exoesqueleto. Fungos transportados dentro das micangias tendem a ser mutualistas dos besouros, já os carregados no exoesqueleto são mais propensos a serem patógenos (Malloch; Blackwell, 1993).

O filo Zoopagomycota é constituído por uma linhagem divergente dos zigomicetes com espécies que são principalmente parasitas e patógenos de pequenos animais e outros fungos. A atual classificação inclui três subfilos Entomophthoromycotina e Kickxellomycotina, que incluem parasitas de insetos e Zoopagomycotina que incluem os micoparasitas e predadores ou parasitas de pequenos invertebrados e amebas (Spatafora et al., 2017).

Outro aspecto que merece ser mencionado é o uso dos fungos no controle de insetos. Os fungos são amplamente utilizados para esse fim devido à capacidade de supressão de populações de insetos praga, vasta gama de hospedeiros e possibilidade de produção *in vitro* (Leite et al., 2003). Esse controle visa à manutenção da população de insetos em equilíbrio no ambiente, uma vez que os fungos (patógenos) são utilizados de forma racional como pode ser visto em vários estudos como exemplo os conduzido por Tiago et al. 2014; Santos et al., 2015; Lacey et al., 2015; Parsa et al., 2018.

Em consonância com a perspectiva de controle biológico, os insetos, principalmente os sociais, também podem evitar e combater infecções causadas por fungos através de uma resposta imune social ou comportamental (Shang et al., 2015). O comportamento higiênico desses insetos pode ser observado, por exemplo, nas formigas que atuam por meio da desinfecção química através da emissão de ácido fórmico, o que reduz a viabilidade dos esporos de fungos (Tragust et al., 2013). A profilaxia comportamental também pode ocorrer através da retirada social e da morte isoladamente. Por exemplo, as formigas de jardim (*Lasius neglectus*) infectadas por *Metarhizium anisopliae* ficam longe da câmara de ninhada, cessam o contato social com seus ninhos e os deixam horas ou dias antes da morte (Ugelvig; Cremer, 2007). Assim, com as formigas zumbis manipuladas por *Cordyceps*, morrer longe da colônia é uma resposta ativa e altruísta. Outro exemplo ocorre com os gafanhotos do deserto (*Schistocerca gregaria*) que aumentam ativamente a temperatura corporal para inibir a infecção por *Metarhizium acridum* (Blanford; Thomas, 1999).

Fungos são conhecidos devido a sua grande capacidade de produzir vários compostos. Várias espécies pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Claviceps*, *Fusarium* e *Penicillium* são conhecidos por serem produtoras de micotoxinas (Ruyck et al., 2015). Os insetos podem funcionar como vetores para dispersão dos fungos que potencialmente produzem esses compostos, e algumas vezes eles podem compartilhar um mesmo

microhabitat, como exemplo alguma planta. O inseto facilita o acesso do fungo a essa planta e em troca aproveitam os fungos para proteção contra seus inimigos naturais e para o processamento de constituintes de plantas aumentando a digestibilidade delas pelo inseto. Essa associação trófica pode ter promovido uma co-evolução entre esses fungos e insetos que atacam as mesmas plantas hospedeiras (Niu, 2011).

Há necessidade de mais informações sobre insetos e fungos, contudo alguns fungos são parasitas biotróficos, associados a insetos vivos, e muitos não crescem em cultura o que leva a dificuldades dos estudos desses organismos em laboratório (Blackwell, 2011).

2.9 FUNGOS ASSOCIADOS A ABELHAS

Os fungos constituem um grupo de organismos hiperdiversos, podendo ser encontrados em todos os nichos ecológicos, e quando comparados em termos de diversidade ao reino vegetal e animal, são numericamente superiores a este último (Loguercio-Leite et al., 2006). Baseados em uma compilação de estudos filogenéticos, Hibbett et al. (2007) apresentaram uma classificação dos fungos “verdadeiros”, e nesta nova classificação foram considerados sete filos, 10 subfilos, 35 classes, 12 subclasses e 129 ordens. No mundo estão descritas aproximadamente 99.000 espécies de fungos (Kirk et al., 2008). Contudo, essa estimativa é considerada conservadora, pois não foi computada a diversidade associada a insetos nem a diversidade de fungos endofíticos (Fraga e Pereira, 2012). Na questão da microbiota associada a abelhas sem ferrão, a diversidade e riqueza de espécies permanece praticamente desconhecida, com pouquíssima informação disponível (Menezes et al., 2013).

Grande variedade de organismos pode estar associado a abelhas, e como ocorre em muitos insetos, as bactérias e fungos parecem desempenhar um importante papel para a nutrição e proteção contra organismos nocivos (Anderson et al., 2011). Segundo Olaitan (2007) a sobrevivência de micro-organismos no mel é influenciada por propriedades intrínsecas como o pH baixo, o elevado teor de açúcares e pelo teor de água presente nesse produto. O baixo teor de água inibe, por exemplo, o crescimento de muitas espécies de bactérias, por outro lado os fungos geralmente são mais tolerantes a esse elevado efeito osmótico e, portanto, espera-se que o mel contenha um pequeno número e uma variedade limitada desses seres.

No pólen de meliponíneos também parece ocorrer uma associação com algumas bactérias, pelo menos para algumas espécies de *Melipona*. Acredita-se que, em *A. mellifera*, a associação de pólen armazenado com micro-organismos pode ser responsável pela

fermentação ou pré-digestão de alimentos armazenados; dessa forma, estes processos ajudam na melhoria da digestibilidade de pólen por meio da produção de algumas enzimas pelos micro-organismos. Esta associação também pode contribuir ao agregar ao pólen certas propriedades organolépticas, que são específicas para cada espécie de abelha. Entre outros fatores, tais micro-organismos podem produzir substâncias químicas como os ácidos graxos e antibióticos que inibem organismos concorrentes e contribuem para a melhor preservação deste produto (Silva e Serrão, 2000).

2.9.1 Leveduras associadas a abelhas nativas

Semelhantemente às bactérias, leveduras associadas às abelhas utilizam o pólen como alimento e secretam enzimas que o convertem em subprodutos que auxiliam na integridade da colmeia. Um estudo conduzido por Camargo et al. (1992) na Amazônia com a abelha sem ferrão *Ptilotrigona lurida* evidenciou que leveduras do gênero *Candida* parecem desidratar o pólen armazenado, sendo esse processo importante para evitar a deterioração e prevenir que outros organismos, tais como forídeos (*Phoridae*), consumam o pólen e causem danos à colônia. Ainda, segundo os autores, essa abelha que é conspícua na Amazônia possui algumas peculiaridades como a de estocar grandes quantidades de pólen, com pouca ou nenhuma umidade e associado a fungos.

Entre as leveduras dez gêneros são frequentemente listados, sendo *Candida* e *Starmerella* os que ocorrem com maior frequência no pólen e no mel das abelhas sem ferrão. Outros gêneros também foram reportados em abelhas adultas, própolis, na lixeira da colônia e raramente no mel, e pelo fato de serem encontrados em partes do ninho associados a materiais externos, acredita-se que são “contaminantes” que as abelhas levam para a colmeia (Lachance et al. 2001; Rosa et al. 2003).

Em estudo realizado por Hervatin (2009) concluiu-se que os bolores e leveduras são os parâmetros microbiológicos mais significativos para o pólen apícola, seguido por *Bacillus cereus* e por bactérias coliformes totais, sendo parâmetros que devem ser introduzidos na legislação.

Leveduras já foram registradas em diferentes substratos relacionados as abelhas nativas no Brasil como mostra a Tabela 1. Um exemplo da associação de abelhas com leveduras foi o estudo de Teixeira et al. (2003) que descreveram a levedura *Starmerella meliponinorum* isolada a partir do mel, pólen, própolis e detritos de abelhas sem ferrão das espécies *Melipona quadrifasciata*, *Melipona rufiventris* e *Trigona fulviventrís*, coletadas no

bioma Cerrado no Estado de Minas Gerais-Brasil, e na Costa Rica da espécie *Tetragonisca angustula*. Em outro estudo, Rosa et al. (2003) pesquisaram comunidades de leveduras associadas às abelhas sem ferrão *T. angustula*, *M. quadrifasciata* e *Frieseomelitta varia* coletadas no estado de Minas Gerais (Brasil) e demonstraram que as abelhas *T. angustula* e *F. varia* apresentaram uma forte associação com a levedura *S. meliponinorum*, e a abelha *M. quadrifasciata* com *Candida apicola*.

Durante uma pesquisa para conhecer a diversidade de leveduras associadas a abelhas sem ferrão no Brasil, Rosa e Lachance (2005) descreveram a levedura *Zygosaccharomyces machadoi* isolada de substratos relacionados à abelha *Tetragonisca angustula* coletadas em áreas de Cerrado de Minas Gerais- Brasil. Leveduras pertencentes a esse gênero são conhecidas pela sua tolerância a altas pressões osmóticas e por participarem da deterioração de vários alimentos, principalmente aqueles que possuem altas concentrações de açúcar, como exemplo, em amostras de mel da abelha *Apis mellifera* a espécie *Z. rouxii* já foi reportada fermentando o produto (Snowdon & Cliver, 1996; Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003).

Estudando a associação de leveduras com ninhos de *Melipona quinquefasciata* no Cerrado, uma das florestas tropicais secas brasileira, no Estado de Minas Gerais, Daniel et al. (2013) descreveram uma nova espécie de levedura denominada *Starmerella neotropicalis*. Além da contribuição a respeito da associação de abelhas com micro-organismos, os autores também demonstraram, com base em sequências da região D1/D2 do LSU rRNA, que leveduras identificadas como pertencentes ao clado *Starmerella* pertenciam a dois subclados que agrupavam apenas espécies com ascósporos, inclusive a espécie tipo do gênero *Starmerella bombicola*. Ainda no mesmo estudo, um total de 177 leveduras foram isoladas em associação com essa espécie de abelha: *Aureobasidium pullulans*, *Candida* cf. *etchellsii*, *Candida* cf. *haemulonii*, *Candida parapsilosis*, *Candida* cf. *ranongensis*, *Candida rugosa*, *Cryptococcus flavus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus nemorosus*, *Debaryomyces hansenii*, *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia koreensis*, *Metschnikowia* sp., *Meyerozyma guilliermondii*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Schwanniomyces capriottii*, *Schwanniomyces polymorphus*, *Starmerella bombicola*, *Sympodiomyces* cf. *kandeliae*, *Cutaneotrichosporon cutaneum*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Zygosaccharomyces mellis*.

O estudo de Barbosa et al. (2016) procurou analisar a riqueza de leveduras associadas ao mel obtido das abelhas sem ferrão *Melipona mandacaia*, *M. asilvai*, *Patarmona* sp. e *Scaptotrigona* sp. que habitam outra floresta tropical seca brasileira (Caatinga) no Estado de Pernambuco. Com base nas características morfológicas e fisiológicas, os autores

encontraram um total de 12 espécies de leveduras pertencentes ao filo *Ascomycota*, sendo as espécies mais abundantes as do gênero *Candida*, seguido por *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Pichia* e *Kloeckera africana*. Os autores ainda observaram que houve uma considerável similaridade entre as amostras analisadas em termos de composição da comunidade de leveduras nas amostras de mel de *M. mandacaiá* e *Partamona* sp. (36.36%) e de *M. mandacaiá* e *M. asilvai* (28.57%), o que não foi observado entre *M. asilvai* and *Partamona* sp. O estudo mostrou que o mel de abelhas sem ferrão é uma importante fonte de leveduras, especialmente em ambientes secos tropicais, onde a diversidade de fungos ainda é em grande parte desconhecida.

Além de estudos com abelhas sociais, algumas pesquisas foram conduzidas com abelhas solitárias. Rosa et al. (1999) utilizaram substratos relacionados a *Diadasina distincta* e *Ptilotrix plumata* (Apidae) coletadas em uma Estação Ecológica no Estado de Minas Gerais, e descreveram uma nova espécie de levedura *Candida batistae*. Ainda, de acordo com os autores, essa levedura teve sua ocorrência associada com o fungo filamentoso do gênero *Mucor*, possivelmente participando do processo de maturação do pão de abelha (*beebread*). Outro estudo utilizando diversos substratos dos ninhos das abelhas solitárias *Megachile* sp. e *Centris tarsata* coletadas em área de Mata Atlântica no Parque Estadual do Rio Doce Atlântico e em uma Estação Ecológica no Estado de Minas Gerais foi conduzido por Pimentel et al. (2005) e também foram descritas duas novas espécies de leveduras *Candida riocensensis* e *Candida cellae* pertencentes ao clado *Starmerella*.

Entre as associações que podem ocorrer entre esses organismos, o estudo de Brysch-Herzberg (2004) mostrou que as rainhas da abelha *Bombus* estão associadas a leveduras, particularmente *Metschnikowia gruessii*. Uma característica importante *M. gruessii* é que essa levedura possui uma adaptação morfológica para que suas células possam aderir aos tricomas encontrados na região bucal do inseto e neles permanecer durante o inverno, quando praticamente desaparecem as flores. Nesse estudo, observou-se que *M. gruessii* apresenta dependência dessas abelhas para a sua dispersão, já que sua abundância foi grandemente afetada nos nectários florais nos meses de inverno, voltando a aumentar ao fim da hibernação das rainhas.

Estudos também foram desenvolvidos visando verificar a presença de fungos e bactérias, principalmente do grupo coliforme em diferentes amostras de mel. Um exemplo foi o trabalho realizado por Souza et al. (2009) em que avaliaram a qualidade microbiológica de amostras de mel de abelhas sem ferrão pertencentes à tribo *Trigonini*, provenientes de diferentes localidades do Estado da Bahia, e encontraram fungos associados, mas em

nenhuma das amostras de mel verificaram a presença de bactérias do grupo coliforme. Monte et al. (2013) também realizaram estudo com o mel das abelhas *Melipona compressipes*, *Melipona subnitida* e *Melipona scutellaris*, e observaram a presença de fungos e ausência de bactérias do grupo coliforme e de *Salmonella* spp. Semelhantemente, Oliveira et al. (2013) avaliaram a qualidade microbiológica de amostras de mel das abelhas *Scaptotrigona depilis* e *Tetragonisca angustula* coletados em região do Pantanal mato-grossense e verificaram uma baixa quantidade de bactérias e elevada presença de fungos.

O maior problema relacionado com a presença de leveduras é a fermentação, que resulta do consumo dos açúcares por esses fungos, com produção de numerosos subprodutos que podem alterar o paladar e o aroma natural do mel (Hooper, 1976).

2.9.2 Fungos filamentosos associadas a abelhas nativas

Estudos com fungos filamentosos também foram conduzidos. Um dos primeiros estudos a relatar a presença de fungos filamentosos associados ao mel foi publicado por Melo (1996). Esse autor relatou a ocorrência de um “fungo de cor purpúrea-escuro, septado, com hifas curtas e eretas” crescendo no batume de colônias da abelha *M. capixaba* (uruçu preta) em ambiente de Mata Atlântica no Estado do Espírito Santo.

Egorova (1971) isolou a partir do alimento larval de abelhas os fungos *Aspergillus flavus*, *A. versicolor*, *Mucor albolater*, *Penicillium granulatum*, *P. solitum* e *Sporotrichum olivecum*. Roubik e Wheeler (1982) ao estudarem o estômago de um besouro do gênero *Scotocryptus* que vivia em ninhos da abelha sem ferrão *M. fasciata* Latreille, relataram a ocorrência de fungos identificados como *Stemphylium*. Em 1988 Gilliam e colaboradores mostraram que o fungo *Ascosphaera apis* é responsável por causar uma doença “*chalkbrood disease*”, uma micose das abelhas em que o agente invade a cria em desenvolvimento causando sua morte e posterior mumificação. A ascosferiose que também pode ser conhecida pelos nomes de cria giz ou cria gessificada ocasiona prejuízos inclusive de importância econômica (Flores et al. 2000).

Gilliam et al. (1989) isolaram *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium corylophilum*, *P. crustosum* e *Rhizopus nigricans* (*R. stonolifer*) no pólen de origem não floral e no “pão” de abelha e concluíram que os fungos identificados podem ter sido introduzidos pelas próprias abelhas. Melo (1996) relatou a ocorrência de um fungo de cor purpúrea-escuro crescendo no batume, presente em colônias de uruçu preta (*M. capixaba* Moure & Camargo) no Espírito Santo.

Eltz et al. (2002) relatam o comportamento da abelha *Tetragonula collina* em colher esporos de *Rhizopus* sp. no lugar de pólen. Observações semelhantes também foram divulgadas por Roubik (1989), Burr et al. (1996) e Oliveira e Morato (2000) ao verificarem que as abelhas operárias tem hábito de forrageamento em uma massa mucilaginosa de cogumelos popularmente conhecido por véu-de-noiva.

Importante resultado sobre a questão da relação dos fungos com as abelhas foi publicado Oliveira e Morato (2000) ao verificarem na Amazônia que as abelhas *Trigona crassipes* (Fabricius, 1793) e *Trigona fulviventris* possuíam hábito de forrageamento de duas espécies de stinkhorn, *Diclyophora* sp. and *Phallus* sp., respectivamente. Devido ao processo de formação dos corpos de frutificação dos stinkhorn (*Phallales*) começarem abaixo do solo, os basidiosporos são formados dentro de uma gleba que emerge do perídium e na maturidade se projeta para a superfície do solo. Devido a matriz gelatinosa que se forma na gleba, os basidiosporos não são dispersos naturalmente, sendo necessário que os insetos desempenhem o papel de vetor. Atraídos por meio de substâncias voláteis, os insetos forrageiam o “topo” dos fungos, consomem a matriz gelatinosa dos esporos que posteriormente são dispersos por meio dos excrementos (Oliveira e Morato 2000; Tang et al. 2015). Observações semelhantes também foram divulgadas por Roubik (1989) e Burr et al. (1996).

Ferraz et al. (2006) estudando a ocorrência de fungos na superfície corpórea de abelhas mortas da espécie *Melipona subnita* vivendo no semi-árido da região Nordeste do Brasil, observaram a ocorrência de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Monilia*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Trichoderma*. Segundo os mesmos autores Flechtman e Camargo em 1974 estudaram fungos patogênicos para a espécie de abelha *Scaptotrigona postica* (mandaguari). Fungos como o *Macrocheles* sp., *Tyrophagos putrescentia* e *Hemileius initialis*, componentes da micota normal de Meliponíneos, já haviam sido encontrados por Venturieri (1991).

Ao analisarem amostras de mel de *Melipona scutellaris* em regiões de floresta tropical seca no Estado da Paraíba, Gois et al. (2010) observaram a presença dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus* sp., *Penicilium digitatum*, *Penicilium* sp., e diversas leveduras e bactérias não identificadas. Apesar de não ter sido relatado algum efeito prejudicial desses fungos para sanidade das abelhas nativas, em abelhas *Apis mellifera*, a ocorrência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Ascosphaera* é preocupante pois podem colonizar as colmeias e causar as doenças como a aspergilose, também conhecida como cria pedra, e a cria giz levando à mumificação de larvas e pupas, respectivamente. Outra doença causada por fungo e que tem sido relatada em abelhas é a aspergilose causada por *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger*. Essa

informação é importante e preocupante pelo fato destas espécies de fungos serem potencialmente produtoras de micotoxinas.

Como podemos verificar, os fungos filamentosos que geralmente são encontrados associados as abelhas e/ou seus produtos pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Mucor* e *Penicillium*. Tais fungos podem sobreviver, mas não se reproduzem no mel, dessa forma as contagens elevadas podem ser indicativos de uma introdução recente de esporos desses fungos pelas abelhas ou por outro veículo (Finola et al. 2007; Snowdon e Cliver, 1996). Roberts (1971) ao estudar o alimento larval de *Ptiloglossa guinnae* encontrou leveduras do gênero *Candida* e *Saccharomyces*, e sugeriu que essa ocorrência poderia promover o aumento no teor de aminoácidos, vitaminas e esteóis.

Recentemente um estudo de grande repercussão científica mostrou um registro de simbiose entre uma espécie de abelha social e um fungo cultivado. Menezes et al. (2015) constataram que larvas da abelha *Scaptotrigona postica* se alimentam de filamentos de fungo do gênero *Monascus* (*Eurotiales*) encontrados em seus próprios ninhos e que sem esse micro-organismo poucas larvas conseguem dar continuidade ao seu ciclo de vida. Um panorama sobre quais gêneros e/ou espécies de fungos em substratos relacionados à abelhas nativas no Brasil pode ser visto na Tabela 1.

<i>Geotrigona</i>	aequinoctialis (Ducke, 1925) fulvohirta (Friese, 1900) kwyrakai Camargo & Moure, 1996 mattogrossensis (Ducke, 1925) mombuca (Smith, 1863) subfulva Camargo & Moure, 1996 subgrisea (Cockerell, 1920) subnigra (Schwarz, 1940) subterranea (Friese, 1901) xanthopoda Camargo & Moure, 1996	-	-
<i>Lestrimelitta</i>	ciliata Marchi & Melo, 2006 ehrharti (Friese, 1931) glaberrima Oliveira & Marchi, 2005 glabrata Camargo & Moure, 1996 limao (Smith, 1863) maracaia Marchi & Melo, 2006 monodonta Camargo & Moure, 1989 nana Melo, 2003 rufa (Friese, 1903) rufipes (Friese, 1903) similis Marchi & Melo, 2006 spinosa Marchi & Melo, sulina Marchi & Melo, 2006 tropica Marchi & Melo, 2006	-	-
<i>Leurotrigona</i>	gracilis Pedro & Camargo, 2009 muelleri (Friese, 1900) pusilla Moure & Camargo, in Moure et al., 1988	-	-
<i>Melipona</i>			
<i>M. (Eomelipona)</i>	amazonica Schulz, 1905	-	-
	asilvai Moure, 1971	<i>Dekkera</i>	Barbosa et al. (2016), Caatinga. (Continua)

	bicolor Lepeletier, 1836 bradley Schwarz, 1932 illustris Schwarz, 1932 marginata Lepeletier, 1836 ogilviei Schwarz, 1932 puncticollis Friese, 1902 torrida (= <i>M. obscurior</i>) Friese, 1916; see Melo, 2013 tumupasae Schwarz, 1932	-	-
<i>M. (Melikerria)</i>	compressipes (Fabricius, 1804) fasciculata Smith, 1854 grandis Guérin, 1834 interrupta Latreille, 1811	-	-
	quinquefasciata Lepeletier, 1836	<i>Starmerella</i> , <i>Aureobasidium</i> , <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Kodamaea</i> <i>Metschnikowia</i> , <i>Meyerozyma</i> <i>Rhodospiridium</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Schwanniomyces</i> , <i>Sympodiomyces</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Wickerhamomyces</i> , <i>Zygosaccharomyces</i>	Daniel et al. (2013), Cerrado
<i>M. (Melipona)</i>	favosa (Fabricius, 1798)	-	-
	mandacaia Smith, 1863	<i>Candida</i> , <i>Dekkera</i>	Barbosa et al. (2016), Caatinga.
	orbignyi (Guérin, 1844)	-	-
	quadrifasciata Lepeletier, 1836	<i>Candida</i> , <i>Starmerella</i>	Rosa et al (2003), Texeira et al. (2003), Cerrado.
	subnitida Ducke, 1910	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Monilia</i> , <i>Nigrospora</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Trichoderma</i>	Ferraz et al. (2006), Caatinga.
<i>M. (Michmelia)</i>	brachychaeta Moure, 1950 captiosa Moure, 1962	-	-
	capixaba Moure & Camargo, 1994 cramptoni Cockerell, 1920	Não identificado	Melo (1996), (Continua)

	crinita Moure & Kerr, 1950 dubia Moure & Kerr, 1950 eburnea Friese, 1900 flavolineata Friese, 1900		
	fuliginosa Lepeletier, 1836 fulva Lepeletier, 1836 fuscopilosa Moure & Kerr, 1950 lateralis Erichson, 1848 melanoventer Schwarz, 1932 mondury Smith, 1863 nebulosa Camargo, 1988 paraensis Ducke, 1916	-	-
	rufiventris Lepeletier, 1836	<i>Starmerella</i>	Texeira et al. (2003), Cerrado.
	scutellaris Latreille, 1811	<i>Aspergillus, Penicillium</i> , leveduras não identificadas.	Gois et al. (2010), Caatinga.
	seminigra Friese, 1903 titania (Gribodo, 1893)	-	-
<i>Meliwillea</i>		-	-
<i>Mourella</i>	caerulea (Friese, 1900)	-	-
<i>Nannotrigona</i>	chapadana (Schwarz, 1938) dutrae (Friese, 1901) melanocera (Schwarz, 1938) minuta (Lepeletier, 1836) punctata (Smith, 1854) schultzei (Friese, 1901) testaceicornis (Lepeletier, 1836)	-	-
<i>Nogueirapis</i>	butteli (Friese, 1900) minor (Moure & Camargo, 1982)	-	-
<i>Oxytrigona</i>	flaveola (Friese, 1900) ignis Camargo, 1984 mulfordi (Schwarz, 1948) obscura (Friese, 1900) tataira (Smith, 1863)	-	-
<i>Parapartamona</i>		-	-
<i>Paratrigona</i>	catabolonota Camargo & Moure, 1994	-	- (Continua)

	compsa Camargo & Moure, 1994 crassicornis Camargo & Moure, 1994 euxanthospila Camargo & Moure, 1994 femoralis Camargo & Moure, 1994 haeckeli (Fries, 1900) incerta Camargo & Moure, 1994 lineata (Lepelletier, 1836) lineatifrons (Schwarz, 1938) melanaspis Camargo & Moure, 1994 nuda (Schwarz, 1943) myrmecophila Moure, 1989 pacifica (Schwarz, 1943) pannosa Moure, 1989 peltata (Spinola, 1853) prosopiformis (Gribodo, 1893) subnuda Moure, 1947		
<i>Paratrigonoides</i>		-	-
<i>Partamona</i>	ailyae Camargo, 1980 auripennis Pedro & Camargo, 2003 batesi Pedro & Camargo, 2003 chapadicola Pedro & Camargo, 2003 combinata Pedro & Camargo, 2003 criptica Pedro & Camargo, 2003	-	-
	cupira (Smith, 1863)	<i>Candida, Debaryomyces</i>	Barbosa et al. (2016), Caatinga.
	epiphytophila Pedro & Camargo, 2003 ferreirai Pedro & Camargo, 2003 gregaria Pedro & Camargo, 2003 helleri (Fries, 1900) littoralis Pedro & Camargo, 2003 mourei Camargo, 1980 mulata Moure, in Camargo, 1980 nhambiquara Pedro & Camargo, 2003 nigrior Cockerell, 1925) pearsoni Pedro & Camargo, 2003	-	-

(Continua)

	rustica Pedro & Camargo, 2003 seridoensis Pedro & Camargo, 2003 sooretamae Pedro & Camargo, 2003 subtilis Pedro & Camargo, 2003 testacea (Klug, 1807) vicina Camargo, 1980		
<i>Plebeia</i>	catamarcensis (Holmberg, 1903) droryana (Fries, 1900) emerina (Fries, 1900) flavocincta (Cockerell, 1912) grapiuna Melo & Costa, 2009 julianii Moure, 1962 lucii Moure, 2004 margaritae Moure, 1962 meridionalis (Ducke, 1916) minima (Gribodo, 1893) mosquito (Smith, 1863) nigriceps (Fries, 1901) phrynostoma Moure, 2004 poecilochroa Moure & Camargo, 1993 remota (Holmberg, 1903) saiqui (Fries, 1900) variicolor (Ducke, 1916) wittmanni Moure & Camargo, 1989	-	-
<i>Proplebeia</i>			
<i>Ptilotrigona</i>	lurida (Smith, 1854)	<i>Candida</i>	Camargo et al. (1992), Amazônia
	pereneae (Schwarz, 1943)	-	-
<i>Scaptotrigona</i>	affabra (Moure, 1989) bipunctata (Lepeletier, 1836) depilis (Moure, 1942) fulvicutis (Moure, 1964) polysticta Moure, 1950	-	-
			(Continua)

	postica (Latreille, 1807)	<i>Monascus</i>	Menezes et al. (2015),
		<i>Candida, Pichia, Klöckera</i>	Barbosa et al. (2016), Caatinga.
	tricolorata Camargo, 1988 tubiba (Smith, 1863) xanthotricha Moure, 1950		
<i>Scaura</i>	atlantica Melo, 2004 latitarsis (Fries, 1900) longula (Lepeletier, 1836) tenuis (Ducke, 1916)	-	-
<i>Schwarziana</i>	mourei Melo, 2003 quadripunctata (Lepeletier, 1836)	-	-
<i>Schwarzula</i>	coccidophila Camargo & Pedro, 2002 timida (Silvestre, 1902)	-	-
<i>Tetragona</i>	beebei (Schwarz, 1938) clavipes (Fabricius, 1804) dorsalis (Smith, 1854) elongata Lepeletier & Serville, 1828 essequiboensis (Schwarz, 1940) goettei (Fries, 1900) handlirschii (Fries, 1900) kaieteurensis (Schwarz, 1938) quadrangula truncata Moure, 1971	-	-
<i>Tetragonisca</i>	angustula (Latreille, 1811)	<i>Starmerella</i>	Rosa et al.(2003)
		<i>Zygosaccharomyces</i>	Rosa e Lachance (2005), Cerrado
	fiebrigi (Schwarz, 1938) weyrauchi (Schwarz, 1943)	-	-
<i>Trichotrigona</i>	extranea Camargo & Moure, 1983	-	-
<i>Trigona</i>	albipennis Almeida, 1995 amalthea (Olivier, 1789) amazonensis (Ducke, 1916) branneri Cockerell, 1912 braueri Fries, 1900	-	-

(Continua)

	chanchamayoensis cilipes (Fabricius, 1804) crassipes (Fabricius, 1793) dallatorreana Friese, 1900 dimidiata Smith, 1854 guianae Cockerell, 1910 hyalinata (Lepeletier, 1836) hypogea Silvestri, 1902 lacteipennis Friese, 1900 pallens (Fabricius, 1798) pellucida Cockerell, 1912 recurva Smith, 1863 sesquipedalis Almeida, 1984 spinipes (Fabricius, 1793) truculenta Almeida, 1984 williana Friese, 1900		
<i>Trigonisca</i>	bidentata Albuquerque & Camargo, 2007 ceophloe (Schwarz, 1938) dobzhanskyi (Moure, 1950) duckei (Friese, 1900) extrema Albuquerque & Camargo, 2007 flavicans (Moure, 1950) fraissei (Friese, 1901) graeffei (Friese, 1900) hirticornis Albuquerque & Camargo, 2007 intermedia Moure, 1900 meridionalis Albuquerque & Camargo, 2007 nataliae (Moure, 1950) pediculana (Fabricius, 1804) unidentata Albuquerque & Camargo, 2007 variegatifrons Albuquerque & Camargo, 2007 vitrifrons Albuquerque & Camargo, 2007	-	-

Tabela adaptada de Pedro (2014).

2.10 IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS – ABORDAGEM POLIFÁSICA

A identificação de fungos leva em consideração as características morfológicas das estruturas reprodutivas (sexuada e assexuada) principalmente entre os fungos filamentosos. Parmasto e Parmasto (1992) demonstraram que diferenças morfológicas por mudanças de conformação genética entre espécies iguais surgem lentamente, e espécies ecologicamente distintas apresentam diferenças morfológicas qualitativas e quantitativas sutis. Portanto, para identificação das estruturas, os isolados devem ser cultivados em meios de cultura apropriados e corados com técnicas apropriadas para manutenção e melhor observação das estruturas. Em muitos casos, pode não ocorrer a produção de estruturas reprodutivas, sendo necessário alterar as condições de cultivo.

Nos últimos anos, novas metodologias de trabalho, envolvendo técnicas de biologia molecular e bioinformática, vêm permitindo melhores resultados no rigor taxonômico durante a identificação de micro-organismos. Para fungos, as regiões do DNA ribossomal (rDNA) têm sido bastante estudadas, uma vez que genes de rDNA possuem regiões bem conservadas, como 18S e 28S, ou outras com maior divergência, como ITS e IGS. As regiões 18S e 28S são úteis na diferenciação entre gêneros e espécies, enquanto as regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) e IGS (Intergenic Spacer) são estudadas na discriminação entre espécies e linhagens. Contudo, para garantir estudos mais aprofundados e seguros tem sido recomendado o estudo de múltiplos genes e regiões como LSU, SSU, 5.8S, ITS, β -tubulina, α -tubulina, RPB1, RPB2 e EF1- α . Devido ao imenso suporte dessa ferramenta, várias novas espécies e gêneros de fungos foram propostos, inclusive espécies com potencial biotecnológico (Avio et al., 2009; Jurjević et al., 2012; Matsuzawa et al., 2014).

A região ITS que separa os genes 18S e 28S do rDNA pode ser amplificada com *primers* específicos ancorados nessas duas regiões. Os *primers* universais ITS1 e ITS4 são os mais comumente utilizados na amplificação desta região (White et al. 1990). As regiões ITS dispõem de características interessantes para a identificação dos fungos em nível molecular. Uma delas é que, nos fungos, esta região, que compreende entre 600 e 800 pares de bases pode ser amplificada via PCR utilizando *primers* universais, os quais são complementares às sequências altamente conservadas dos genes que codificam o rRNA (Larena et al. 1999).

Além da região ITS o domínio D1/D2 presente no gene 26S do rDNA têm sido utilizado em reações de sequenciamento para auxiliar na diferenciação microbiana (Kurtzman e Robnett, 2003; Arroyo-López et al. 2006; Bautista-Gallego et al., 2011). A região ITS foi escolhida como o “código de barras (barcode)” para fungos (Schoch et al., 2012). No entanto,

muito antes do conceito de “barcode” ter sido introduzido, a região D1/D2 já tinha sido escolhida para diferenciar leveduras (Kurtzman e Robnett, 1998; Scorzetti et al., 2002; Schoch et al., 2012). Atualmente, ambos os bancos de dados referentes à região D1/D2 e ITS se apresentam como potentes ferramentas para a identificação segura de espécies de leveduras (Kurtzman, 2014; Vu et al. 2016).

Segundo Kurtzman et al. (2008) a região D1/D2 do rDNA possui divergências que permitem a diferenciação de espécies de leveduras do filo Ascomycota sendo que alterações de 1% dos 600 nucleotídeos presentes nessa região pode ser suficiente para distinguir as espécies e, alterações de um a três nucleotídeos seria suficiente para resolver problemas taxonômicos entre espécies correlacionadas. De acordo com o estudo conduzido por Vu et al. (2016) os bancos de sequências de DNA públicas como o NCBI e o banco do CBS-KNAW (www.westerdijkinstituut.nl) são bancos robustos que podem ser utilizados para comparação e identificação de leveduras, seguindo os limiares taxonômicos de 98.41 % e 99.51 % para as regiões ITS e LSU do rDNA, respectivamente, para identificação de espécies, e 96.31 % e 97.11 % para as regiões ITS e LSU do rDNA, respectivamente, na discriminação de gêneros de leveduras.

Apesar de serem consideradas barcodes, as regiões ITS e LSU do rDNA não possuem resolução suficiente para o nível de espécie em vários gêneros como exemplo *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium*, sendo recomendado o sequenciamento de um barcorde secundário, ou seja, diferentes loci devem ser usados para diferentes grupos de fungos, dentre eles sequências parciais do gene para a β -tubulina (Houbraken & Samson, 2017). Esse gene codifica as tubulinas que são as principais proteínas constituintes dos microtúbulos, responsáveis pela formação do citoesqueleto nos eucariotos (Stotz; Long, 1999). Tanto a sequência de nucleotídeos desse gene, quanto a sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene, têm sido extensivamente usadas para estimar as relações filogenéticas em fungos sendo de grande valor para o entendimento de processos evolutivos (Tuszynski et al., 2006).

Os fungos também são capazes de produzir uma enorme e diversa quantidade de metabólitos secundários, muitos dos quais bioativos (Bugni & Ireland, 2004; Gunatilaka, 2006). Seguindo o conceito de taxonomia polifásica, em muitos casos têm se recorrido a esses metabólitos para auxiliar na caracterização e identificação de algumas culturas. Em particular atenção, o perfil de extrólitos é provado como ser específico para determinadas espécies (Larsen et al., 2005). Por exemplo, uma grande quantidade de espécies no gênero *Aspergillus* produz uma combinação única de diferentes tipos de compostos orgânicos pequenos como

policetídeos (peptídeos nao-ribossomais) terpenóides, assim como muitos outros compostos de origem biossintética mista. O fato de os metabólitos secundários serem bons caracteres fenotípicos para o reconhecimento de espécies é suportado por estudos sobre o sequenciamento do genoma completo de espécies de *Aspergillus*, o que leva a se inferir que importantes diferenças genômicas entre as espécies estão frequentemente relacionadas a produção desses metabólitos (Galagan et al., 2005). Como exemplo da importância do perfil de metabólitos para a identificação de espécies de *Aspergillus* na seção *Terrei*, a espécie *A. hortai* é morfologicamente muito semelhante a *A. terreus*, mas essas espécies são diferentes pelo perfil de extrólitos e também filogeneticamente (Samson et al, 2011).

Vários metabólitos secundários produzidos por fungos são potentes micotoxinas que podem causar danos a humanos e animais, por meio de intoxicações agudas ou de efeito acumulativo, induzindo a distúrbios fisiológicos, como o câncer (Bennett; Klich, 2003). Por outro lado, esses metabólitos também podem ter um papel positivo, podendo ser utilizados para o tratamento de enfermidades, ou utilizadas como base para a síntese de fármacos (Misiek; Hoffmeister, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS CAIXAS DE CRIAÇÃO E AMOSTRAS

3.1.1 Área de estudo

As coletas foram realizadas em duas áreas de preservação ambiental de Mata Atlântica: Horto Zoobotânico de Dois Irmãos (8°7'30"S, 34°52'30"W) e Jardim Botânico do Recife (8°4' e 8°5'; 34°59' e 34°57'), Pernambuco, Brasil. O Parque Estadual Dois Irmãos possui uma área de 1.158,51 ha, estando inclusos o fragmento florestal, denominado Mata de Dois Irmãos, com 384,42 ha, onde se insere o zoológico e o fragmento da antiga Fazenda Brejo dos Macacos, com 774,09 ha. O Parque é formado por um remanescente de Mata Atlântica classificada como Floresta Ombrófila Densa (Rodrigues e Silva, 2014). O Jardim Botânico ocupa uma área de 11,23 ha, com 60% sendo cobertura de fragmento de Mata Atlântica, apresentando uma grande diversidade de espécies, tanto da fauna e flora (Oliveira et al., 2015). As coletas realizadas em 2014 foram autorizadas e acompanhadas pela Associação Pernambucana de Apicultores e Meliponicultores (APIME).

3.1.2 Coleta do material

Em cada local de coleta foram utilizadas três caixas de criação racional, em cada caixa foram escolhidos quatro potes de pólen e de mel. Os potes escolhidos estavam fechados e antes de serem abertos tiveram sua superfície desinfestada utilizando álcool 70%. As amostras de mel foram coletadas por sucção utilizando serigas esterilizadas descartáveis e as alíquotas de 25 mL de mel de cada caixa foram acondicionadas em tubos tipo Falcon. As amostras de 25g de pólen foram coletadas com auxílio de espátulas de metal esterilizadas e as amostras armazenadas em potes coletores universais. Swabs também foram friccionados sob a superfície dos potes de pólen, de mel e células de cria. Em seguida, os swabs foram acondiciondos em tubos de ensaio esterilizados. Todo material coletado foi estocado em caixas de isopor até serem processados em laboratório. Seis coletas mensais, sequenciais, foram realizadas.

3.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS

Em laboratório as amostras de mel e pólen foram diluídas/suspensas em água peptonada até a diluição e plaqueadas nos meios DG18 e ágar extrato de malte com cloranfenicol. Os meios foram preparados como descrito em Samson et al. 2010. Os swabs foram transferidos para um novo tubo contendo 9mL de água peptonada e agitados vigorosamente em Vortex por 5 minutos e em seguida foi realizada uma diluição seriada e plaqueada nos meios DG18 e ágar extrato de malte com cloranfenicol. Todas as placas foram incubadas por sete a 14 dias a 35 °C no escuro em estufa para B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand).

3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

4.3.1 Extração de DNA, PCR e sequenciamento.

O DNA genômico dos fungos foi extraído utilizando o Ultra- Clean Microbial DNA kit (MoBio Laboratories, Solana Beach, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Após extração do DNA, todas as amostras oriundas de isolados de fungos filamentosos foram inicialmente submetidas à amplificação via PCR e sequenciamento do fragmento da região ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA utilizando os primers VG9 e LS266 para uma triagem inicial. Posteriormente foram escolhidas outras regiões gênicas adequadas para amplificação e sequenciamento, de acordo com o gênero/grupo de fungos filamentosos. Os primers utilizados e os genes ou regiões gênicas escolhidos para sequenciamento e posterior análise filogenética encontram-se no Quadro 3. Para as leveduras inicialmente foram utilizados os primers LR0R+ LR5 para amplificação e posterior sequenciamento do fragmento amplificado do domínio D1/D2 do gene 26S do rDNA. As condições do mix e detalhes da sequência dos primers são descritas em (Samson et al., 2010; Houbraken et al., 2012). Os produtos de PCR foram sequenciados nas duas direções com os mesmos primers usando o kit BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e foram purificados com Sephadex seguindo as recomendações do fabricante.

Quadro 3. Regiões gênicas e primers utilizados durante o procedimento de identificação por Biologia Molecular dos fungos obtidos no mel, pólen e superfície da colmeia de *Melipona scutellaris*.

Gênero/grupo	Região gênica indicada para estudo	Primers utilizados para identificação e/ou filogenia (respectivamente)*
<i>Aspergillus</i>	ITS, β -tubulina, Calmodulina, RNA polimerase II	VG9+LS226, Bt2a +Bt2b, Cmd5+Cmd6, RPB2-5F + RPB2-7CR
<i>Cladosporium</i>	ITS, β -tubulina	VG9+LS226, Bt2a +Bt2b
<i>Curvularia</i>	ITS, β -tubulina, LSU	VG9+LS226, Bt2a +Bt2b, LR0R+ LR5
<i>Pithomyces</i>	ITS, β -tubulina	VG9+LS226, Bt2a +Bt2b
<i>Fusarium</i>	ITS, β -tubulina, Calmodulina, RNA polimerase II, Tef 1 ^a	VG9+LS226, Bt2a +Bt2b, Cmd5+Cmd6, RPB2-5F + RPB2-7CR
<i>Phyllosticta</i>	ITS, β -tubulina, Tef 1a	VG9+LS226
<i>Lichtheimia</i>	ITS, LSU	VG9+LS226, LR0R+ LR5
<i>Monascus</i>	ITS, β -tubulina, Calmodulina, RNA polimerase II, LSU	VG9+LS226, Bt2a +Bt2b, Cmd5+Cmd6, RPB2-5F + RPB2-7CR, LR0R+LR5
<i>Paecilomyces</i>	ITS, β -tubulina, Calmodulina	VG9+LS226, Bt2a +Bt2b, Cmd5+Cmd6
<i>Penicillium</i>	ITS, β -tubulina, Calmodulina, RNA polimerase II	VG9+LS226, Cmd5+Cmd6, Bt2a +Bt2b, RPB2-5F + RPB2-7CR
<i>Pestalotiopsis</i>	ITS, β -tubulina, Calmodulina	VG9+LS226, Bt2a +Bt2b, Cmd5+Cmd6
<i>Talaromyces</i>	ITS, β -tubulina, Calmodulina, RNA polimerase II	VG9+LS226, Cmd5+Cmd6, RPB2-5F + RPB2-7CR
<i>Xylaria</i>	ITS, β -tubulina, LSU	VG9+LS226, Bt2a +Bt2b, LR0R+ LR5
Levedeuras	IST, LSU	LR0R+ LR5, VG9+LS226

*Consultar Samson et al. (2010) e Houbraken et al. (2012) para referências, sequências dos primers, e condições da PCR.

3.3.2 Identificação e análises filogenéticas

As sequências de nucleotídeos, de ambos os sentidos, foram editadas e montadas, usando o programa SeqMan v.10.0.1. e analisadas no software Biolomics® utilizando o banco de dados do Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (anteriormente conhecido por CBS-KNAW). O programa Biolomics permite uma identificação confiável uma vez que utiliza apenas sequências oriundas de material **tipo** e outras cepas de referência depositadas no Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (www.westerdijkinstitute.nl). Os isolados que não foram possíveis de serem identificados pela análise do Biolomics foram considerados como possível nova taxa e foram submetidos a análise no programa BLASTn na plataforma do banco de dados NCBI. O banco de sequências de cada gênero foi gerado utilizando sequências de material **tipo** previamente publicadas no NCBI. As sequências obtidas neste estudo foram alinhadas utilizando o programa MAFFT (Katoh et al. 2005) e os alinhamentos foram manualmente otimizados com o programa MEGA 5 (Tamura et al. 2011). Os modelos de substituição nucleotídica foram determinados usando o FindModel (Posada & Crandall 1998). Análise filogenética de máxima verossimilhança (ML) foram realizadas usando o programa RAxML-VI-HPC v. 7.0.3 (Stamatakis, 2006) e a análise de Bayesian (BI) no programa MrBayes v.3.2.1 (Ronquist et al. 2012). As árvores filogenéticas foram visualizadas usando o programa FigTree v. 1.1.2 (Rambaut, 2009) e editadas no Adobe Illustrator v.CS5.1. Para análises combinadas, os alinhamentos individuais foram concatenados usando o programa Mesquite v3.04 (Maddison; Maddison, 2016).

3.3.3 Caracterização macro e micromorfológica

Para a descrição das novidades taxonômicas foram observadas as características macroscópicas das colônias (cor, aspecto, consistência, presença de pigmento, etc.), características microscópicas (morfologia de estruturas somáticas e reprodutivas), fisiologia e bioquímica utilizando-se metodologia e literatura específica (Morton & Smith, 1963; Ellis, 1971, 1976; Kreger-van Rij (1984); Barnett et al. (2000); Samson; Frisvad, 2004; Crous et al., 2007; Kurtzman, Fell, Boekhout (2011); Samson, Varga, Frisvad, 2011).

Observações microscópicas do estágio assexuado e sexuado foram conduzidas por meio de lâminas preparadas das colônias cultivadas no meio de cultivo adequado para cada gênero segundo as literaturas específicas. Para confecção das lâminas foi utilizado o ácido láctico (60%) como fluido de montagem e etanol 96% foi usado para remover o excesso de conídios. As observações e imagens foram conduzidas em microscópio de luz Zeiss AX10

Imager A2 equipado com câmeras Nikon DS-Ri2 e software NISElements Dv4.50 para capturar imagens digitais. Para as novidades taxonômicas, os nomes das espécies e informações associadas foram depositados no banco MycoBank, as sequências no GenBank, as culturas depositadas na Coleção de Culturas da Micoteca URM e um representante (isolado) de cada novidade também foi depositado na Coleção de Cultura do Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (formalmente conhecido por Centraalbureau voor Schimmelcultures - CBS), sob o termo de transferência de material MTA No. 01/2016/Micoteca URM.

3.3.4 Análise de extrólitos totais

Apenas isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Monascus* foram submetidos a essa análise. Para extração dos extrólitos, os isolados foram cultivados em condições específicas para cada gênero (Tabela 2). Após o crescimento, três plugs de cada colônia crescida em cada meio foram retiradas e acondicionadas em frascos de penicilina cor âmbar, em seguida foi acrescentado etilacetato-isopropanol (3:1) com 1% de ácido fórmico até que todos os plugs ficassem submersos. Em seguida o material foi sonicado por 60 min como recomendado em Smedsgaard 1997 e Houbraken et al., 2012. Posteriormente, o líquido obtido foi transferido para um novo frasco e submetido à evaporação até secagem. O extrato seco foi redissolvido em metanol e filtrado em membrana de 0.45 µm e então as diluições foram injetadas no aparelho de cromatografia líquida de alto desempenho acoplada à detecção de matriz de diodos (UHPLC-DAD). Os compostos detectados foram identificados pela comparação do tempo de retenção e espectro de luz UV mensurado a 200-600nm. O espectro da luz UV foi comparado com dados da literatura disponível.

Tabela 2. Meios e condições de cultivo utilizados para crescimento dos fungos a serem submetidos a análise de extrólitos.

Gênero	Meios e condições de cultivo
<i>Aspergillus</i>	CYA, YES e MEA a 25 °C por 7 dias.
<i>Penicillium</i>	CYA, YES e MEA a 25 °C por 7 dias.
<i>Talaromyces</i>	CYA, YES, MEA e OA a 25 °C por 14 dias
<i>Monascus</i>	CYA, YES, MEA, OA a 25 °C por 14 dias. PDA e DG18 a 25 °C por 20 dias.

Fonte: O autor, 2018.

3.4 ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DOS ISOLADOS

A frequência relativa de cada espécie foi calculada para cada substrato pela fórmula: $F = (N_i/N) \times 100$, onde N_i = distribuição de cada espécie i ; N = número de unidades formadoras de colônia (UFC) de cada espécie i ; N = número total de UFC, sendo consideradas as seguintes classes de frequência: $0,5 < F \leq 1,5\%$ - rara, $1,5 < F \leq 5\%$ - ocasional, $5 < F \leq 10\%$ - frequente e $F > 10\%$ - abundante (Schnittler; Stephenson, 2000). Para o cálculo dos índices ecológicos (Riqueza de Espécies, Diversidade de Shannon-Wiener, Equitabilidade de Pielou e Dominância de Berger-Parker) utilizou-se o software PAST 1.7

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi obtido um total de 1623 isolados, sendo 1375 leveduras e 248 fungos filamentosos. Dentre as leveduras foram obtidos isolados pertencentes aos gêneros *Aureobasidium*, *Blastobotrys*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kodamaea*, *Metschnikowia*, *Starmerella*, *Priceomyces*, *Meyerozyma*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces*, *Pseudozyma* e *Cutaneotrichosporon* (Tabela 3). Dentre os fungos filamentosos, as amostras purificadas foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Pithomyces*, *Fusarium*, *Phyllosticta*, *Lichtheimia*, *Monascus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Pithomyces*, *Talaromyces* e *Xylaria* (Tabela 3).

Segundo a classificação da frequência relativa dentre as 35 espécies que ocorreram nas amostras de mel 16 tiveram sua ocorrência registrada como raras, 13 abundantes, 5 ocasionais e 1 comum. Na superfície da colmeia ocorreram 59 espécies, destas 33 foram consideradas como raras, 9 abundantes, 10 ocasionais e 7 comuns. No pólen foi registrado 39 espécies, dos quais 13 são consideradas raras, 8 abundantes, 14 ocasionais e 4 comuns (Tabela 3, Figura 4). Segundo Sarma e Hyde (2001) a importância de calcular a frequência de ocorrência está relacionada com o estabelecimento de quais fungos são mais comuns em uma determinada área, ou substrato. Das centenas de espécies presentes em uma comunidade, relativamente poucas exercem uma grande influência de controle em virtude de seu tamanho, números ou atividades (Krebs, 1985). As espécies dominantes são aquelas que são altamente bem sucedidas ecologicamente e determinam em grande medida as condições em que as espécies associadas devem crescer. Em comunidades ricas em espécies, a maioria das espécies provavelmente terá uma distribuição escassa (Rabinowitz, 1981). Normalmente, alguns fungos dominarão uma determinada área, enquanto os outros fungos raramente serão encontrados (Cooke; Rayner, 1984).

Tabela 3: Espécies de fungos isolados a partir de amostras de mel, pólen e na superfície das colmeias de *Melipona scutellaris* utilizadas no presente estudo. Frequência absoluta (fa), frequência relativa (fr%) e classificação da frequência em cada substrato analisado.

	MEL			PÓLEN			COLMEIA			TOTAL
	fa	fr%	Class	fa	fr%	Class	fa	fr%	Class	
<i>Aspergillus alabamensis</i>	0	-	-	1	0,36	R	1	0,17	R	2
<i>A.amoenus</i>	0	-	-	0	-	-	4	0,68	R	4
<i>A.chevalieri</i>	0	-	-	3	1,07	O	2	0,34	R	5
<i>A.fumigatus</i>	0	-	-	0	-	-	2	0,34	R	2
<i>A.neoniger</i>	0	-	-	0	-	-	1	0,17	R	1
<i>A.niger</i>	3	0,40	R	7	2,49	C	9	1,52	O	19
<i>A.persii</i>	0	-	-	0	-	-	1	0,17	R	1
<i>A.pseudocaelatus</i>	1	0,13	R	5	1,78	C	16	2,71	C	22
<i>A.pseudoglaucus</i>	1	0,13	R	3	1,07	O	0	-	-	4
<i>A.sclerotiorum</i>	0	-	-	1	0,36	R	3	0,51	R	4
<i>A.subramanianii</i>	1	0,13	R	0	-	-	6	1,02	O	7
<i>A.subversicolor</i>	1	0,13	R	4	1,42	O	1	0,17	R	6
<i>A.sydowii</i>	0	-	-	0	-	-	3	0,51	R	3
<i>A.versicolor</i>	1	0,13	R	0	-	-	0	-	-	1
<i>A.welwitschiae</i>	0	-	-	2	0,71	O	1	0,17	R	3
<i>Cladosporium silenes</i>	0	-	-	3	1,07	O	0	-	-	3
<i>Curvularia malina</i>	0	-	-	0	-	-	2	0,34	R	2
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	0	-	-	2	0,71	O	4	0,68	O	6
<i>Lichtheimia hyalospora</i>	0	-	-	3	1,07	O	10	1,69	C	13
<i>Monascus mellicola</i>	10	1,33	O	1	0,36	R	5	0,85	O	16
<i>M. recifensis</i>	0	-	-	2	0,71	O	0	-	-	2
<i>M. ruber</i>	0	-	-	0	-	-	9	1,52	O	9
<i>M.flavipigmentosus</i>	0	-	-	1	0,36	R	2	0,34	R	3
<i>Paecilomyces formosus</i>	1	0,13	R	0	-	-	2	0,34	R	3
<i>Penicillium apimeii</i>	1	0,13	R	0	-	-	0	-	-	1

(Continua)

<i>P. brocae</i>	9	1,20	O	0	-	-	13	2,20	C	22
<i>P. chermesinum</i>	0	-	-	0	-	-	1	0,17	R	1
<i>P. citreosulfuratum</i>	0	-	-	1	0,36	R	0	-	-	1
<i>P. citrinum</i>	4	0,53	R	2	0,71	O	10	1,69	C	16
<i>P. echinulonalgiovense</i>	0	-	-	1	0,36	R	2	0,34	R	3
<i>P. fernandesiae</i>	0	-	-	0	-	-	1	0,17	R	1
<i>P. mallochii</i>	0	-	-	0	-	-	3	0,51	R	3
<i>P. meliponae</i>	1	0,13	R	0	-	-	0	-	-	1
<i>P. mellis</i>	2	0,27	R	0	-	-	4	0,68	O	6
<i>P. multicolor</i>	0	-	-	0	-	-	2	0,34	R	2
<i>P. paxilli</i>	0	-	-	0	-	-	2	0,34	R	2
<i>P. rubens</i>	0	-	-	0	-	-	6	1,02	O	6
<i>P. sanshaense</i>	0	-	-	1	0,36	R	0	-	-	1
<i>P. sclerotiorum</i>	1	0,13	R	1	0,36	R	2	0,34	R	4
<i>P. shearii</i>	0	-	-	0	-	-	3	0,51	R	3
<i>P. singorense</i>	0	-	-	1	0,36	R	0	-	-	1
<i>P. steckii</i>	0	-	-	0	-	-	4	0,68	O	4
<i>P. sumatraense</i>	0	-	-	0	-	-	1	0,17	R	1
<i>P. wotroi</i>	1	0,13	R	0	-	-	1	0,17	R	2
<i>Penicillium</i> sp.	0	-	-	1	0,36	R	0	-	-	1
<i>Pestalotiopsis</i> cf. <i>knightiae</i>	0	-	-	0	-	-	2	0,34	R	2
<i>Phyllosticta</i> cf. <i>capitalensis</i>	0	-	-	0	-	-	1	0,17	R	1
<i>Pithomyces chartarum</i>	0	-	-	0	-	-	1	0,17	R	1
<i>Talaromyces brasiliensis</i>	1	0,13	R	0	-	-	2	0,34	R	3
<i>T. calidicanus</i>	0	-	-	1	0,36	R	0	-	-	1
<i>T. mycothecae</i>	0	-	-	0	-	-	4	0,68	O	4
<i>T. pigmentosus</i>	0	-	-	2	0,71	O	3	0,51	R	5

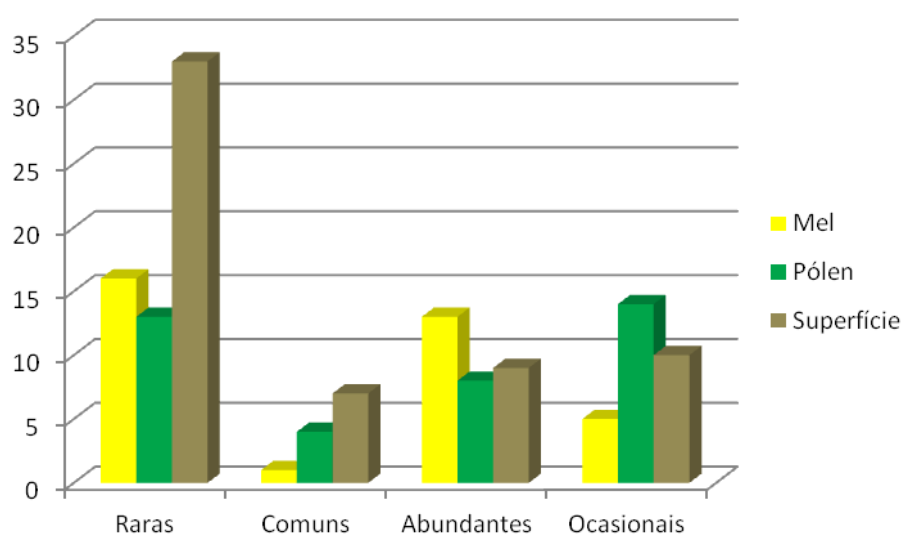
(Continua)

<i>T. scorteus</i>	3	0,40	R	0	-	-	1	0,17	R	4
<i>T. wortmanii</i>	0	-	-	0	-	-	1	0,17	R	1
<i>Xylaria cf. hypoxylon</i>	0	-	-	0	-	-	3	0,51	R	3
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	-	-	2	0,71	O	1	0,17	R	3
<i>Blastobotrys chiropterorum</i>	74	9,85	A	39	13,88	A	42	7,11	A	155
<i>Blastobotrys terrestris</i>	46	6,13	A	28	9,96	A	16	2,71	C	90
<i>Blastobotrys meliponae</i>	9	1,20	C	0	-	-	0	-	-	9
<i>Candida etchellsii</i>	31	4,13	A	16	5,69	A	17	2,88	C	64
<i>Candida intermédia</i>	73	9,72	A	20	7,12	A	50	8,46	A	143
<i>Debaryomyces hansenii</i>	76	10,12	A	6	2,14	C	52	8,80	A	134
<i>Kodamaea ohmeri</i>	42	5,59	A	0	-	-	6	1,02	O	48
<i>Metschnikowia koreensis</i>	64	8,52	A	27	9,61	A	56	9,48	A	147
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	67	8,92	A	34	12,10	A	55	9,31	A	156
<i>Priceomyces melissophilus</i>	63	8,39	A	30	10,68	A	26	4,40	A	119
<i>Starmerella bombicola</i>	45	5,99	A	7	2,49	C	25	4,23	A	77
<i>Starmerella sp.nov.</i>	6	0,80	O	3	1,07	O	1	0,17	R	10
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	29	3,86	A	1	0,36	R	36	6,09	A	66
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	21	2,80	A	0	-	-	0	-	-	21
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	53	7,06	A	13	4,63	A	39	6,60	A	105
<i>Cutaneotrichosporon cutaneum</i>	0	-	-	3	1,07	O	12	2,03	C	15
<i>Moniliella carnis</i>	5	0,67	O	0	-	-	0	-	-	5
<i>Moniliella sp.nov.</i>	4	0,53	O	1	0,36	R	0	-	-	5
<i>Sakaguchia sp.nov.</i>	1	0,13	R	2	0,71	O	0	-	-	3
TOTAL	751			281			591			1623

Siglas: A:Abundantes, C:Comuns; O:Ocasionais; R: Raras

O fato da grande maioria das espécies obtidas no presente estudo serem consideradas raras (Figura 4) pode estar relacionado com a biologia das abelhas. Sabe-se que a organização de insetos sociais pode reduzir a possibilidade de transmissão de parasitas, diminuindo a possibilidade de possíveis patógenos estabelecerem-se nas colônias (Wilson 1971; Lacerda 2009).

Figura 4. Quantitativo da classificação das espécies de fungos em raras, comuns, abundantes e ocasionais, a partir dos isolados de amostras de mel, pólen e na superfície das colmeias de *Melipona scutellaris* utilizadas no presente estudo.



Fonte: O autor, 2018.

Segundo Odum (1969) um aspecto consistente das comunidades é conterem comparativamente poucas espécies categorizadas como comuns, ou seja, possuírem um número maior de espécies raras em um dado tempo e espaço. As espécies abundantes são consideradas como conservacionistas, podendo ser dominantes numericamente, mas não necessariamente em termos de biomassa na comunidade.

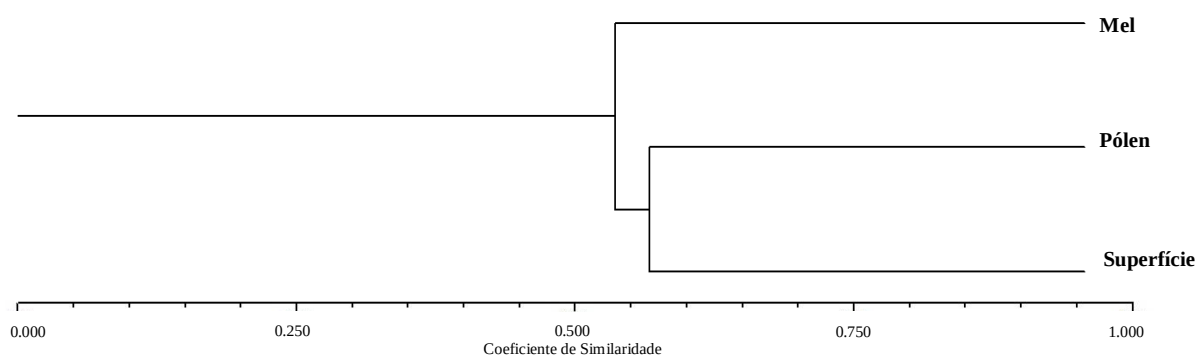
Uma maior densidade, dada pela contagem do número de indivíduos, foi obtida no mel (751 isolados, 709 leveduras e 42 filamentosos), seguido pela superfície das colmeias (591 isolados, 434 leveduras e 157 filamentosos) e por último o pólen (281 isolados, 232 leveduras e 49 filamentosos) (Tabela 4). Um dendograma representando a similaridade da comunidade fúngica entre os substratos analisados pode ser visto na figura 5.

Tabela 4. Taxa, Densidade, Diversidade de Shannon-Wiener (H'), Equitabilidade de Pielou (e) e Dominância de Berger-Parker dos fungos isolados a partir de amostras de mel, pólen e na superfície das colmeias de *Melipona scutellaris* utilizadas no presente estudo.

	Filamentosos			Leveduras		
	Mel	Pólen	Superfície	Mel	Pólen	Superfície
Taxa_S	17	23	44	18	16	15
Densidade	42	49	157	709	232	434
Dominância	0.13	0.07	0.04	0,08	0,11	0,10
Shannon-Wiener (H')	2,5	3	3,5	2,62	2,35	2,45
Equitabilidade de Pielou	0,85	0,93	0,91	0,91	0,85	0,90
Berger-Parker	0,24	0,14	0,10	0,11	0,17	0,13

Fonte: O autor, 2018.

Figura 5. Dendrograma de similaridade representativos das comunidades de fungos filamentosos e leveduras isoladas do mel, pólen e da superfície das colmeias de *Melipona scutellaris* utilizadas no presente estudo.



Fonte: O autor, 2018.

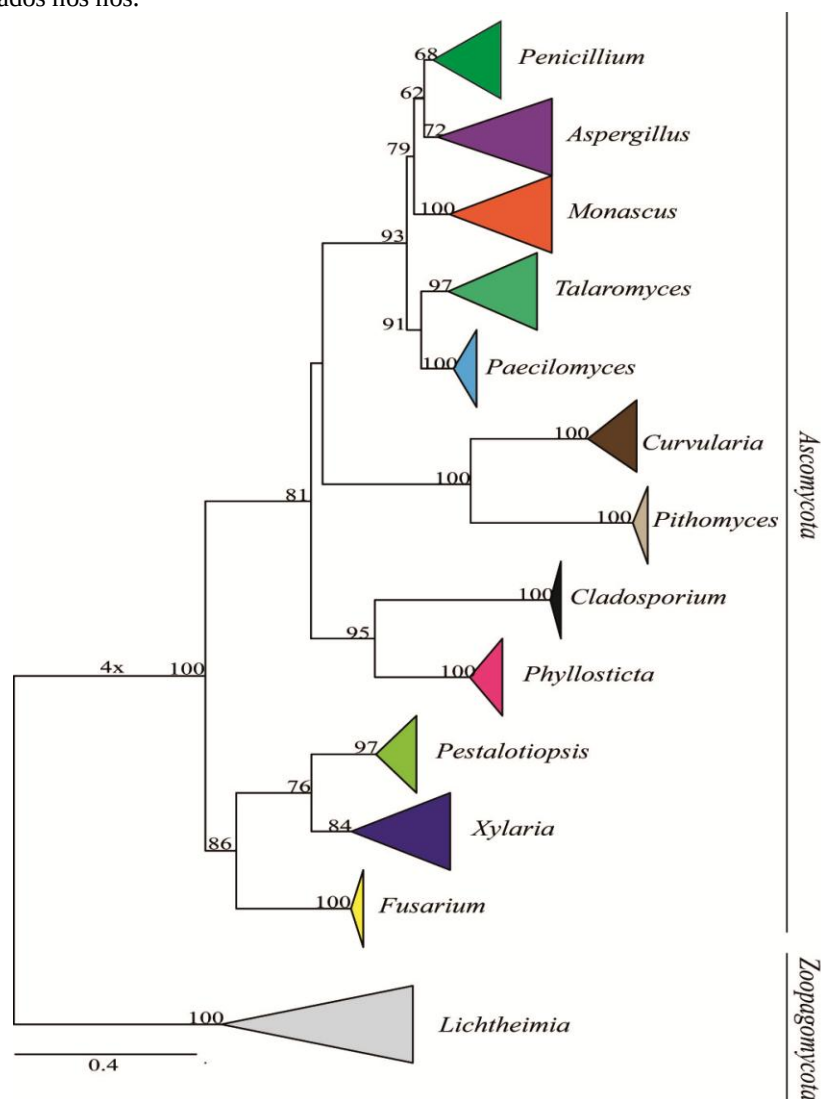
Os índices ecológicos estimados indicaram que os valores da diversidade (H') e riqueza de espécies são próximos ou iguais entre os substratos analisados para cada grupo de fungo (filamentosos e leveduras) (Tabela 4). Quanto à equitabilidade (J') apesar dos valores obtidos serem muito próximos, foi observado que para os fungos filamentosos o pólen e a superfície das colmeias tendem a serem mais equitativos em relação a distribuição das espécies. Já para as leveduras isso pode ser observado para o mel e para superfície. A equitabilidade possui intervalo de zero a um $[0,1]$, onde 1 representa a máxima diversidade, ou seja, todas as espécies são igualmente distribuídas. No presente estudo os valores obtidos para diversidade (H') são maiores do que os encontrados para dominância de Berger-Parker (Tabela 4), corroborando a afirmação de Brower e Zar (1984) de que uma comunidade com alta diversidade terá baixa dominância. A diversidade e dominância da população de fungos

dependem da ocorrência de habitats específicos para determinadas espécies (Christesen et al. 2000).

A escassez de estudos sobre fungos em substratos relacionados às abelhas nativas torna inviável, no momento, o desenvolvimento de uma profunda argumentação comparativa. Deste modo, optamos por tentar compreender a ocorrência dos principais grupos de fungos isolados, de uma forma mais abrangente com outras espécies de abelhas, além de descrever novas espécies de fungos e resolver alguns problemas taxonômicos em grupos conhecidos utilizando uma abordagem polifásica.

Para fins didáticos apresentamos aqui a reconstrução filogenética global com apenas a região ITS para os fungos filamentosos, pois esse é o barcorde comum para todos nesse grupo de isolados (Figura 6).

Figura6. 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 na superfície das colmeias de *Melipona scutellaris* coletadas no presente estudo. Valores de bootstrap a partir de 1000 repetições são indicados nos nós.



Dentre os 13 gêneros de fungos filamentosos isolados, o gênero *Aspergillus* foi representado por 15 espécies pertencentes a sete seções: *Aspergillus* (*A.chevalieri*, *A. pseudoglaucus*); *Circumdati* (*A.persii*, *A. sclerotiorum*, *A.subramanianii*); *Fumigati* (*A. fumigatus*); *Flavi* (*A. pseudocaelatus*); *Nigri* (*A. niger*, *A. welwitschiae*); *Terrei* (*A. alabamensis*, *A. terreus*); *Versicolores* (*A. amoneus*, *A. subversicolor*, *A. sydowii*, *A. versicolor*).

Ao realizarem um estudo com várias amostras de mel, pólen e intestino de abelhas adultas da espécie *A. mellifera* em diferentes regiões da Eslováquia, Kacániová et al. (2009) encontraram nas amostras de pólen as espécies *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A.niger*, *A.ochraceus*, *Aspergillus* sp., *A.terreus*, *A. versicolor* e nas amostras de mel uma micota muito semelhante formada pelas espécies de *A. candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A.terreus*, *A.versicolor*. Muitas dessas espécies também foram reportadas nas amostras analisadas no presente estudo.

Neste estudo foram encontradas 21 espécies de *Penicillium* ditribuídas entre as seções: *Sclerotiora* (*P. brocae*, *P. mallochii*, *P. sclerotiorum*, *P. sanshaense*); *Citrina* (*P. citrinum*, *P. paxilli*, *P. shearii*, *P. steckii*, *P. sumatraense*); *Charlesia* (*P. chermesinum*, *P. multicolor*); *Exilicaulis* (*P. citreosulfuratum*); *Lanata-divaricata* (*P. echinulonalgiovense*, *P. singorense*, *P. wotroi*); *Chrysogena* (*P. rubens*). Dentre esse total, cinco espécies de *Penicillium* exibiram caracteres únicos que se desviam de espécies conhecidas e são descritos como novos nas seções *Sclerotiora* e *Gracilenta*. Na seção *Lanata-divaricata*, a espécie *Penicillium echinulonalgiovense* foi descrita em 1956 por Abe sem um diagnóstico em latim e por isso teve seu nome invalidado (Art. 39.1. Código de Melbourne), além do mais é considerada por muitos como sinônimo de *P. simplicissimum*. Nosso estudo mostra que *P. echinulonalgiovense* é filogeneticamente única e diferente de *P. simplicissimum*, e dessa forma para validar essa espécie, uma nova diagnose em inglês é fornecida em nosso estudo e a espécie passa a ser válida, sendo novamente considerada como nova (*Penicillium echinulonalgiovense* S. Abe ex Houbraken & R.N. Barbosa sp. nov.) (Apêndice 1).

No gênero *Talaromyces* foram identificadas espécies pertencentes à seção *Talaromyces* (*T. calidicanus*) e *Islandici* (*T. scorteus* e *T. wortmanii*). Neste gênero, três grupos de isolados exibiram caracteres únicos que se desviam de espécies conhecidas e são descritos como novos nas seções *Trachyspermi*, *Helici* e *Talaromyces*. O manuscrito referente a descrição de todas as novas espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* encontra-se publicado na revista *Antonie van Leeuwenhoek* (Apêndice 1). A maior diversidade de

espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* foi observada neste trabalho nas amostras coletadas na superfície dos potes e células de cria no interior dos ninhos.

As espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* são cosmopolitas bem conhecidas e que desempenham vários papéis em ecossistemas naturais, agricultura e biotecnologia. Ambos os gêneros possuem um sistema de classificação infragênico. Atualmente, 26 seções são aceitas em *Penicillium* (Houbraken; Samson 2011, Houbraken et al., 2016) e sete seções em *Talaromyces* (Yilmaz et al., 2014). Entre os isolados do gênero *Penicillium*, espécies da seção *Sclerotiora* foram mais frequentemente isoladas durante este estudo. Curiosamente, *P. brocae* foi predominante entre espécies desse gênero. Esta espécie foi originalmente descrita em insetos causadores da broca de café no México (Peterson et al., 2003) e mais recentemente também foi detectada em fezes de outras espécies de besouro (*Eufallia* sp.) (Wang; Chan 2015). Juntamente com a descrição de *P. brocae*, Peterson et al. (2003) sugeriram que esta espécie produz esteróis exógenos necessários para o desenvolvimento do inseto causador da broca no cafeeiro e, portanto, estaria associada ao inseto. Uma hipótese ecológica semelhante pode ser feita para abelhas sem ferrão, mas isso será um assunto para estudo futuro. Além de *P. brocae*, as espécies *P. mallochii* e *P. guanacastense* também estão associados ao trato digestivo e fezes de lagartas (Rivera et al., 2012) sugerindo uma associação de outros membros da seção *Sclerotiora* com insetos.

Monascus foi outro gênero bem representado, com 30 isolados. Dentre estes, nove foram identificados como *M. ruber* e 21 apresentaram características distintas das outras espécies que tinham descrição taxonômica válida e foram descritas como novas. O uso combinado de ferramentas morfológicas, moleculares e metabólicas aplicadas no presente estudo, permitiu que a taxonomia desse gênero fosse revisitada, e ele foi então resolvido em nove espécies, sendo seis aceitas como válidas (*M. argentinensis*, *M. lunisporas*, *M. pallens*, *M. purpureus*, *M. ruber*, *M. sanguineus*) e três novas obtidas no presente estudo (*Monascus flavipigmentosus* R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken, *Monascus mellicola* R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken, *Monascus recifensis* R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken). As análises conduzidas no estudo possibilitaram, ainda, a segregação do gênero em duas novas seções (*Monascus* section *Floridani* R.N. Barbosa & Houbraken, *Monascus* section *Rubri* R.N. Barbosa & Houbraken). O estudo referente a descrição das novas espécies e uma revisão atual para *Monascus* encontra-se publicado no Periódico *Studies in Mycology* (DOI: 10.1016/j.simyco.2017.04.001)(Apêndice 2) e desta forma as descrições taxonômicas não serão reproduzidas no corpo da tese. É importante mencionar que o referido estudo aplica

pela primeira vez para esse gênero o conceito de reconhecimento de espécies filogenéticas em concordância genealógica (GCPSR – *Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition*). O GCPSR é uma ferramenta que pode ser usada como análise complementar ao conceito de espécies morfológicas. É necessário que seja realizada a análise comparativa de várias árvores filogenéticas para vários genes, e a posição filogenética da espécie deve ser concordante na maioria das análises.

Um caso de mutualismo entre fungos e a abelha social *Scaptotrigona postica* foi relatado (Menezes et al., 2015). As larvas de *S. postica* têm maior taxa de sobrevivência quando alimentadas com alimentos cultivados com micélio de *Monascus*. Durante a nossa investigação a espécie *M. ruber* foi frequentemente isolada no interior dos ninhos. Isso indica que também outras espécies de abelhas, como *M. scutellaris*, também podem ter uma relação com *M. ruber*, sendo os substratos relacionados as abelhas um novo nicho ecológico ainda pouco explorado, de espécies de *Monascus*. Dentre as novas espécies descritas *M. recifensis* e *M. flavipigmentosus* não apresentaram produção de ascomata nas condições de incubação deste estudo. Stchigel & Guarro (2007) estudaram vários ascomicetos cleistoteciais e concluíram que o critério da produção de ascomata fechado sem abertura predefinida é de pouco valor sistemático. Essa informação somada ao recente estudo sobre fungos que vivem com associação com abelhas solitárias coletadas na Dinamarca sugere uma evolução e redução dos corpos de frutificação de algumas espécies em Pezizomycotina para uma adaptação à dispersão pelas abelhas (Wynns, 2015). Interessante observar neste contexto é que geralmente *Monascus* forma cleistotécios menores do que os observados nos gêneros relacionados como *Aspergillus* e *Penicillium*.

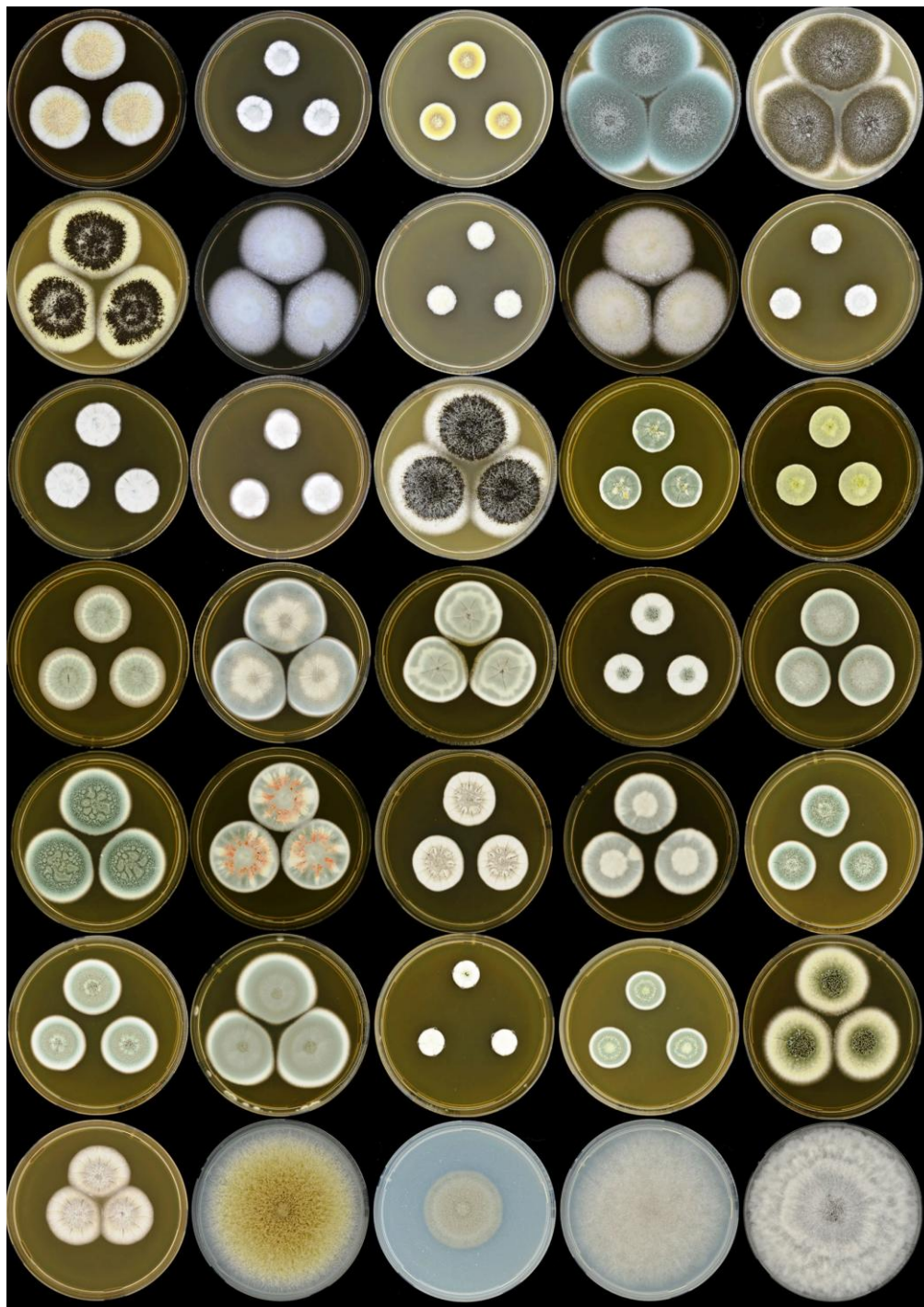
Espécies pertencentes aos gêneros *Cladosporium*, *Curvularia*, *Lichtheimia*, *Phyllosticta*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Pestalotiopsis*, *Pithomyces* e *Xylaria* também foram isoladas, embora com poucos representantes (Tabela 3). A Figura 7 ilustra representantes de algumas espécies de fungos filamentosos isoladas e identificadas no presente estudo.

De acordo com Stevenson (1974) *Cladosporium* é geralmente associado a pulgões, uma vez que esses insetos liberam uma secreção “honeydew” que é importante para o desenvolvimento desses fungos. Modro et al. (2009) analisaram isolados *Cladosporium* coletados por abelhas *A. mellifera* durante um período de escassez de recursos alimentares convencionais (pólen e néctar). Segundo os autores a composição nutricional das bolotas de fungos apresentou alto valor protéico, extrato etéreo e matéria orgânica. Não se sabe ao certo se as abelhas possuem alguma preferência por coletar pólen com fungos, provavelmente esse fato deve estar relacionado à palatabilidade ou valor nutricional agregado. Wingfield et al

(1989) observaram que *A. mellifera* aparentemente prefere recolher pólen sempre quando o fungo *Melampsora ricini* está sobre o mesmo. Outro fator que pode ter influenciado a ocorrência dos fungos no presente estudo são os diversos tipos de plantas que estavam em floração durante as coletas.

Kacániová et al. (2009) realizaram uma exaustiva análise microbiológica do mel, do trato gastro intestinal de abelhas adultas e do pólen coletado por *A. mellifera* em diferentes regiões da Eslováquia e encontraram além de bactérias nas amostras de pólen, os fungos *Acremonium* sp., *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Aspergillus* sp., *A. terreus*, *A. versicolor*, *Botrytis* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium* sp., *Mucor circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. racemosus*, *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichoderma* sp., *Mycelia sterilia* e leveduras. Nas amostras de mel os pesquisadores também observaram os fungos *Acremonium* sp., *Alternaria alternata*, *Aspergillus candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium* sp., *Mucor hiemalis*, *M. racemosus*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium* sp., *Rhizopus stolonifer* e *Mycelia sterilia*. No trato intestinal foram observados *Aspergillus flavus*, *Mucor* sp., *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium* sp. A semelhança entre as espécies de fungos obtidas entre substratos levou aos autores a acreditarem que o pólen é provavelmente a fonte de certos fungos presentes no mel, mas não de todos eles. Essa conclusão de Kacániová et al. (2009) vai ao encontro dos dados observados no presente estudo, um total de 21 espécies co-ocorreram no mel e no pólen analisados e apenas 14 ocorreram apenas nas amostras de mel.

Figura 7. Ilustração de algumas das culturas de espécies fungos obtidas em substratos relacionados a abelha *Melipona scutellaris*. Cultivos em meio ágar Malte por 7 dias a 25 °C, Primeira linha (da esquerda para a direita): *Aspergillus alabamensis*, *A. amoenus*, *A. chevalieri*, *A. fumigatus*, *A. neoniger*, Segunda linha: *A. niger*, *A. persii*, *A. pseudoglaucus*, *A. sclerotiorum*, *A. subversicolor*, Terceira linha: *A. sydowii*, *A. versicolor*, *A. welwitschiae*, *Penicillium brocae*, *P. citreosulfuratum*, Quarta linha: *P. citrinum*, *P. echinulonalgiovense*, *P. mallochii*, *P. multicolor*, *P. paxilli*, Quinta linha: *P. rubens*, *P. sclerotiorum*, *P. shearii*, *P. singorense*, *P. steckii*, Sexta linha: *P. sumatraense*, *P. wotroi*, *Talaromyces scorteus*, *T. wortmanii*, *T. calidicanus*, Sétima linha (cultivos em meio BDA por 7 dias a 25 °C): *M. ruber*, *Paecilomyces formosus*, *Cladosporium*, *Lichtheimia*, *Pestalotiopsis*.



Fonte: O autor, 2018.

González et. al. (2005) ao estudarem amostras de pólen de *Apis mellifera* obtidas de diferentes fontes em diversos países relatam a identificação de fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* em 80% das amostras com predominância de espécies na seção *Nigri*, seguido por espécies de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Penicillium verrucosum*, *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Botrytis* spp, *Epicoccum* spp. e leveduras. Algumas das espécies ou gêneros acima mencionados também foram reportadas nas amostras de pólen coletadas no presente estudo. Segundo Pandey et al. (1983) os grãos de pólen secretam substâncias que podem inibir a germinação de esporos microbianos, e além do mais o pólen da abelha quando processado tem valores de atividade de água (aW) normalmente baixos, dessa forma a ocorrência desses fungos pode ser tida como contaminante durante o período em que as abelhas transportam esse material para colmeia.

No presente estudo também foi isolado um fungo pertencente aos zygomycetes, da espécie *Lichtheimia hyalospora*. O estudo de Eltz et al. (2002) os autores observaram que abelhas da espécie *Trigona collina* coletavam esporos de *Rhizopus* ao invés de pólen, e também que esse fungo era cultivado para a manutenção do pH interno do ninho, sendo este um caso característico de associação entre organismos. Stuart et al. também (2004) encontraram *Rhizopus* associado ao corpo de abelhas do gênero *Trigona*.

Segundo Moraes et al. (2013) a ocorrência de micro-organismos no mel, pólen, larvas e abelhas adultas é indicativo de uma relação funcional com esses insetos, com a possibilidade de uma relação simbiótica entre esses organismos. Para Oliveira et al. (1996 e 1999) as resinas usadas pelas abelhas para construção e proteção de seus ninhos possui atividade inibidora contra alguns micro-organismos como bactérias e fungos, contudo Marsaioli et al. (1998) isolaram fungos filamentosos simbiontes na superfície corpórea de abelhas sem ferrão, esses fungos apresentaram resistência à atividade antimicrobiana do ninho. No presente estudo não foi investigado a ocorrência dos fungos no corpo das abelhas, sendo essa mais uma janela para projetos futuros.

A análise de extrólitos, realizada no presente estudo, apenas para os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Monascus* mostraram que os isolados analisados são produtores de vários compostos, incluindo micotoxinas como citrinina e outros ainda desconhecidos. Uma lista geral dos extrólitos detectados é apresentada no Quadro 4.

Sabe-se que os fungos podem ser introduzidos no mel através de poeira, da água, de correntes de ar, pelas abelhas através do pólen e até mesmo pelo homem quando esse produto é manipulado. Esses organismos, pelo fato de geralmente serem encontrados em baixas quantidades, principalmente no mel, podem não representar perigo para o ser humano que não

esteja debilitado. Mesmo para espécies como *A. flavus*, que é reconhecido por ser produtor de toxinas, não há condições favoráveis para a produção de aflatoxinas nesse substrato (Kacániová et al., 2012).

González et al. (2005) ao estudarem amostras de pólen de *Apis mellifera* relatam a identificação de micobiota bastante diversificada. Os autores analisaram por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) a capacidade de produção de toxinas dos isolados obtidos e observaram que os isolados de *Aspergillus carbonarius*, *A. ochraceus*, *Penicillium verrucosum* produziram ocratoxina A (OTA), isolados de *A. flavus* e *A. parasiticus* conseguiram produzir aflatoxina B1 e B2.

Uma característica importante das espécies *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* é a produção de extrólitos bioativos. A combinação de extrólitos produzidos é muitas vezes espécie-específica e pode potencialmente desempenhar um papel na interação entre diferentes organismos (Frisvad, 2008). Nossos resultados demonstram que as espécies identificadas são capazes de produzir vários extrólitos, incluindo a micotoxina citrinina. A presença desta micotoxina em algum substrato é indesejada, no entanto, sua atividade depende da sua interação ecológica. Normalmente, as micotoxinas co-ocorrem com outros extrólitos para os quais nenhuma função ainda é conhecida. É possível presumir que estes extrólitos fúngicos que ocorrem em simultâneo possam sinergizar (ou antagonizar) a toxicidade de micotoxinas co-ocorrentes (Dowd, 1992).

Na natureza, os metabólitos fúngicos podem fornecer várias vantagens ecológicas que incluem a proteção à concorrência com outros micróbios para garantir o nicho (Rohlf s e Churchill, 2011). Um fato interessante é a produção da família biossintética de geodina por novas espécies de *Penicillium* e *Monascus* obtidas no presente estudo, o que pode indicar que este grupo de metabólitos tem uma função particular no habitat da abelha. Ainda é interessante mencionar que a atividade antibiótica e antifúngica de algumas cepas de *Monascus* pode desempenhar um papel na proteção dos alimentos das larvas de contaminações microbianas (Jůzlova et al., 1996, Menezes; Vollet-Neto et al., 2015).

É importante frisar que os perfis de extrólitos obtidos neste estudo foram utilizados para a delimitação de espécies, e mais pesquisas devem ser realizadas para estudar a presença de micotoxinas nos substratos onde cada espécie foi isolada. Vários compostos não puderam ser caracterizados em nossas condições de estudo e podem representar novos compostos bioativos, uma vez que nunca foram detectados em milhares de perfis de extrólitos analisados para várias espécies pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Trichoderma* (informação

peçoal do JC Frisvad). Durante este estudo, a qualidade dos ninhos e a saúde das abelhas foram seguidas durante um longo período de tempo e nenhuma doença foi observada. Se algum desses (novos) compostos fosse segregado no pólen de abelha ou ninhos, esses compostos provavelmente não tiveram um efeito (grande) nas abelhas.

Quadro 4. Extrólitos detectados em isolados das espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Monascus* obtidas de mel, pólen e superfície das colmeias da abelha *Melipona scutellaris*.

Espécie	Extrólitos
<i>Aspergillus alabamensis</i>	Terreina; Citrinina; Asperamida
<i>Aspergillus amoneus</i>	Sterigmatocistina; Ácido norsolorínico
<i>Aspergillus chevalieri</i>	Emodina; Equinulina; Isoquinolina; Flavoglaucina; Dihidroglaucina
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigaclavina C; Ácido hevólico; Fumitremorgina A,B,C; Fumiquinazoline A-E, Fumagilina
<i>Aspergillus niger</i>	Nigragilina; Tensidol B; Funalenona, derivados de pirona
<i>Aspergillus persii</i>	Ácido penicílico; sclerotiotides; Ácido neoaspergilico
<i>Aspergillus pseudocaelatus</i>	Ácido kójico; Ácido tenuazonico; Aspirochlorina
<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	Equinulinas; Flavoglaucina; Auroglaucina
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	Ácido penicílico; Ácido neoaspergilico
<i>Aspergillus subramanianii</i>	Ocratoxina A e B; Ácido neoaspergilico; Sclerotiotide ; Ácido penicílico
<i>Aspergillus subversicolor</i>	Phycion; Patulodina
<i>Aspergillus sydowii</i>	Violaceol; Ácido sidónico; Indol alcaloides
<i>Aspergillus terreus</i>	Terreina; Citreoviridina; a-terriquinona; Mevinoliona; Citreoviridina
<i>Aspergillus versicolor</i>	tryptoquivaline; tryptoquivalone; sterigmatocystin; versicodorsins; norsolorinic acid; violaceol
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	pyranonigrin A; tensidol B; funalenone; naphtho- γ -pyrones; malformin c; fonsecin
<i>Monascus flavipigmentosus</i>	Indol alcaloides; metabolitos da biossintética família M
<i>Monascus mellicola</i>	Indol alcaloides; "GULLA"
<i>Monascus recifensis</i>	Ácido secalónico, ácido astérico, sulochrin, phycion, geodin, geodoxin, atrochrysone, questin e orthosporin
<i>Monascus ruber</i>	Ácido glucónico X; Indol alcaloides; Mevinolinas; Monascin; PP-V; PP-R; Rubropunctamine
<i>Penicillium apimei</i>	Ácido astérico; Geodina; Spinulosina X
<i>Penicillium brocae</i>	Brocaenol; Spinulosina X
<i>Penicillium chermesinum</i>	Extrólitos com absorção final
<i>Penicillium citreosulfuratum</i>	Citreoviridina; pyrenocins
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinina; quinolactacin
<i>Penicillium echinulonalgiovense</i>	Andrastin A, xanthoepocin

(Continua...)

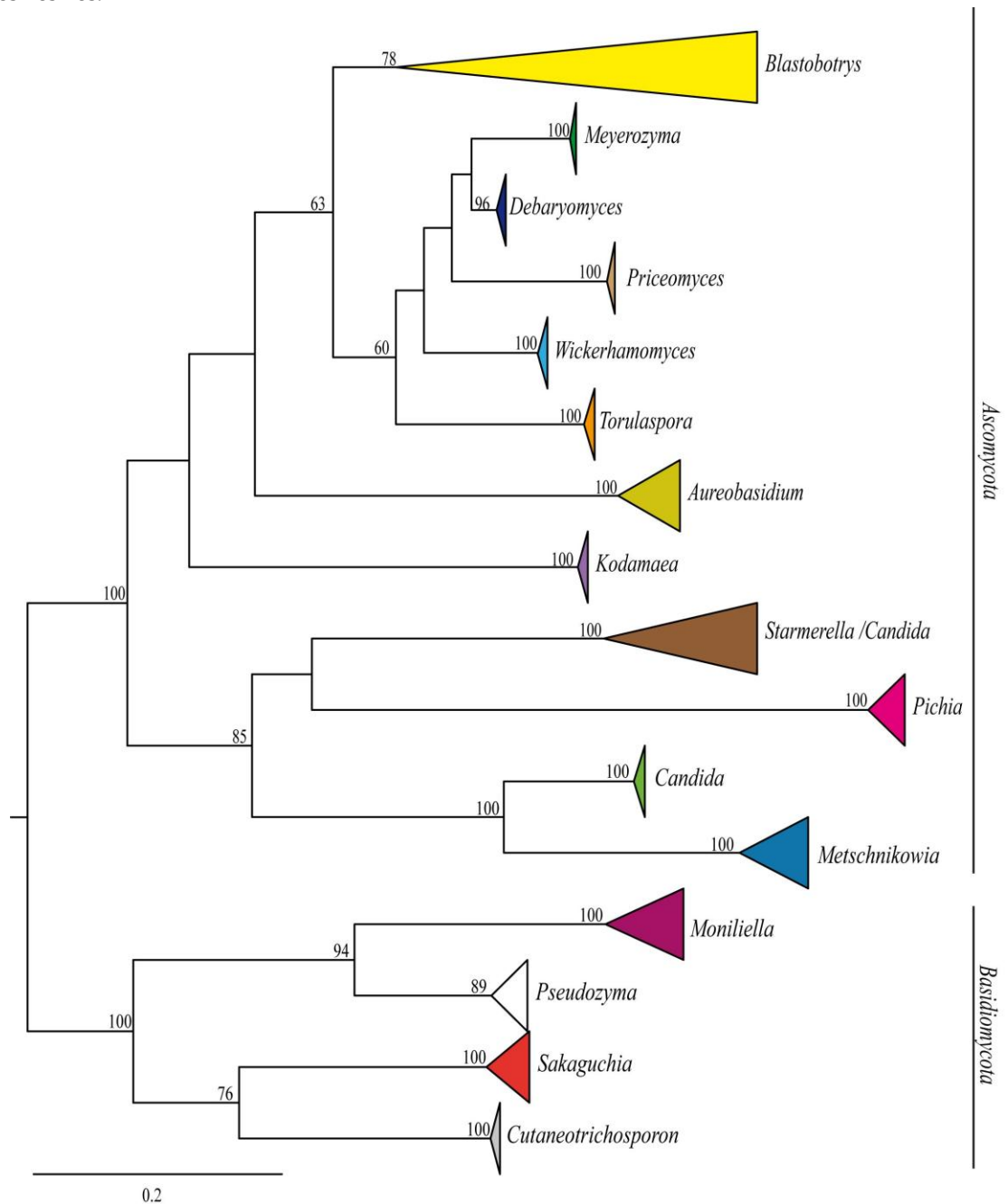
Quadro 4. Extrólitos detectados em isolados das espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Monascus* obtidas de mel, pólen e superfície das colmeias da abelha *Melipona scutellaris*

<i>Penicillium fernandesiae</i>	Rotiorina, Esclerotiorina e outros membros da família biossintética
<i>Penicillium mallochii</i>	Atlantinone A
<i>Penicillium meliponae</i>	Rotiorina; Esclerotiorina e outros membros da família biossintética
<i>Penicillium mellis</i>	Ácido kójico; Esclerotiorina
<i>Penicillium multicolor</i>	Extrólitos com absorção final
<i>Penicillium paxilli</i>	Paxillina; Paspaline; paspalinine
<i>Penicillium pollinum</i>	Atrovenetina; emodina; membros da família biossintética herqueinone
<i>Penicillium rubens</i>	Andrastina A; Glandicolins; Roquefortina C
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	Rotiorina; Esclerotiorina
<i>Penicillium shearii</i>	Indol alcaloides; Paxilina
<i>Penicillium singorense</i>	Paspaline?
<i>Penicillium</i> sp.	Atlantinone A, fumitremorgin A, B & C, verruculogen
<i>Penicillium steckii</i>	Isochromantoxina; Quinolactacina
<i>Penicillium sumatrense</i>	Curvularina; daldinins
<i>Penicillium wotroi</i>	Indol alcaloides
<i>Talaromyces brasiliensis</i>	Muitos extrólitos detectados, nenhum deles pode ser identificado, e nenhum deles foi visto em outros <i>Talaromyces</i> spp.
<i>Talaromyces calidicanus</i>	Duclauxina
<i>Talaromyces mycothecae</i>	Duclauxina e muitos outros desconhecidos
<i>Talaromyces pigmentosus</i>	Muitos extrólitos detectados, nenhum deles pode ser identificado, e nenhum deles foi visto em outros <i>Talaromyces</i> spp.
<i>Talaromyces scorteus</i>	Rugulosina e muitos outros desconhecidos
<i>Talaromyces wortmannii</i>	Rugulovasine A; Rugulosina

Fonte: O autor, 2018.

No tocante às leveduras foram obtidos 1375 isolados, 709 no mel, 434 na superfície das colmeias e 232 no pólen coletado pela abelha *M. scutellaris*. Por fins didáticos apresentamos aqui a reconstrução filogenética global com apenas a região LSU para as leveduras, pois esse é o barcorde comum para todos nesse grupo de isolados (Figura 8).

Figura 8. Agrupamento dos isolados por gênero usando análise de máxima verossimilhança (ML) para o domínio D1/D2 do gen 26S do rDNA leveduras isoladas a partir de amostras de mel, pólen e na superfície das colmeias de *Melipona scutellaris* coletadas no presente estudo. Valores de bootstrap a partir de 1000 repetições são indicados nos nós.



Fonte: O autor, 2018.

Um total de 20 espécies foram identificadas, sendo a maioria pertencente ao filo Ascomycota. Uma nova espécie *Blastobotrys meliponae* R.N. Barbosa, Boekhout, G.A. Silva, Souza-Motta & N. Oliveira, encontra-se descrita na Fungal Planet description sheets: 400–468 publicada no Periódico Persoonia - Molecular phylogeny and evolution of fungi (DOI: /10.3767/003158516X692185) (Apêndice 3) e outras três novas também serão publicadas posteriormente. A Figura 9 ilustra representantes de algumas espécies de leveduras isoladas e identificadas no presente estudo.

Figura 9. Ilustração de algumas das culturas espécies de leveduras obtidas em substratos relacionados a abelha *Melipona scutellaris* no presente estudo. Cultivos em meio ágar Malte por 7 dias a 25 °C, Primeira linha (da esquerda para a direita): *Aureobasidium pullulans*, *Candida intermedia*, *Kodamaea ohmeri*, *Moniliella carnis*, Segunda linha: *Meyerozyma guilliermondii*, *Sakaguchia* sp.nov., *Starmerella* sp.nov., *Wickerhamomyces anomalus*.



Fonte: O autor, 2018.

No que se refere as frequências relativas, a espécie *Blastobotrys chiropterorum* foi considerada abundante nos três substratos analisados (mel, pólen e superfície), a espécie *B. terrestris* foi abundante no mel e no pólen e comum na superfície, e *B. meliponae* comum no mel. Apesar de outras leveduras também terem sido abundantes, o gênero *Blastobotrys* chamou atenção por ter mais de uma espécie ocorrente com um considerável número de isolados. Ao estudarem os micro-organismos presentes em mel de várias abelhas, Snowden e Cliver (1996) demonstraram que os gêneros de leveduras que podem ser encontradas no mel são: *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Wickerhamomyces* (= *Pichia*), *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Trichosporon*, *Zygosaccharomyces*.

entre outros. No presente estudo, no mel das abelhas *M. scutellaris*, também foram reportados os gêneros de leveduras *Candida*, *Cutaneotrichosporon*, *Debaryomyces* e *Wickerhamomyces*.

As leveduras podem se desenvolver em condições de baixo pH e não são inibidas pela sacarose, assim, a sua presença no mel pode ter seu crescimento limitado pela quantidade de água disponível (Snowdon e Cliver, 1996). Neste estudo um maior número de isolados de leveduras foi registrado no mel (709 distribuídos em 18 espécies), números superiores aos registrados na superfície da colmeia (434 isolados e 15 espécies) e no pólen (232 isolados e 16 espécies). Este fato pode estar relacionado aos níveis de umidade, como sugerido por Moreira e Siqueira (2002) que verificaram mudanças nas populações de fungos em função dos níveis de umidade, sendo que quanto maior a umidade do substrato maior o tamanho das populações. Sete espécies foram comuns aos três substratos analisados *Blastobotrys chiropterorum*, *B. terrestres*, *Candida intermedia*, *Pseudozyma hubeiensis*, *Metschnikowia koreensis*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Priceomyces melissophilus* (Tabela 3). *Candida etchellsii*, *Debaryomyces hansenii*, *Kodamaea ohmeri*, *Starmerella bombicola*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Torulaspora delbrueckii* não ocorreram nas amostras de pólen analisadas e *Kodamaea ohmeri* e *Wickerhamomyces anomalus* não foram isoladas a partir da superfície das colmeias. *Cutaneotrichosporon cutaneum* não foi observado nas amostras de mel enquanto *Kodamaea ohmeri* e *Wickerhamomyces anomalus* ocorreram apenas nesse substrato (Tabela 3). Possivelmente essa discrepância na ocorrência pode ser devido ao fato de que as leveduras que são introduzidas pelas abelhas podem não sobreviver nesses substratos durante as transformações que eles sofrem no interior da colmeia, bem como algumas podem ser contaminantes sendo que, o solo e as flores podem ser fontes desta contaminação de leveduras no mel (Snowdon e Cliver, 1996).

Os insetos dependem de leveduras para várias funções metabólicas, incluindo a síntese de aminoácidos, vitaminas, lipídios, esteróis e ferormônios, degradação de substratos nutricionais e desintoxicação de compostos (Suh et al 2003; Starmer & Lachance, 2011). Suh et al. (2005) sugerem que a presença desses fungos permite a sobrevivência de insetos quando a quantidade de nutrientes está limitada. O autor sugere ainda que o mel é adequado para leveduras com características osmotolerantes por ser um substrato rico em açúcares.

O pólen utilizado neste estudo também apresentou um pequeno número de isolados, este fato pode estar relacionado a características intrínsecas do substrato, como o pH que é considerado um importante fator antimicrobiano, pois a maioria dos micro-organismos necessita de um pH ótimo na faixa de 7,2 a 7,4 para seu crescimento (Nogueira-Neto, 1997). Segundo Camargo et al. (1992) as leveduras do gênero *Candida* parecem desidratar o pólen

que a abelha sem ferrão *Ptilotrigona lurida* armazena, e este processo é importante para evitar deterioração e prevenir que os forídeos (pequenas mosquinhas) consumam o pólen e causem danos para a colônia. Nas colmeias dessa abelha o pólen armazenado é muito seco e sempre associado a fungos. No pólen também parece ocorrer uma associação com algumas bactérias que além de ajudarem na melhoria da digestibilidade de pólen podem produzir substâncias químicas como os ácidos graxos e antibióticos que inibem organismos concorrentes e contribuem para a melhor preservação deste produto (Silva e Serrão, 2000).

O gênero *Starmerella* que foi descrito para acomodar o estado sexual de *Candida bombicola* compreende poucas espécies descritas, contudo mais de 40 espécies do gênero *Candida* são reconhecidas como membros deste clado. Espécies de leveduras do clado *Starmerella* (Ascomycota) estão associadas com abelhas e outros Hymenoptera, além de substratos com alta concentração de açúcar (Rosa et al., 2003). *Starmerella bombicola* foi relatada associada com *Apis florea* e com plantas em período de floração e insetos polinizadores (Brysch-Herzberg, 2004; Golonka, 2002; Rosa e Lachance, 1998; Rosa et al., 2003). Outra espécie, *S. meliponinorum* foi isolada em meliponíneos tropicais em diferentes países (Lachance, 2011). *Candida etchellsii* também pertencente ao clado *Starmerella* foi observada em abelhas adultas e pelotas de lixo de *Tetragonisca angustula* (Rosa et al. 2003).

Diversas outras espécies de leveduras têm sido relatadas em abelhas e no mel, tais como *Priceomyces mellissophilus*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii* (Fleet 2011, Kurtzman 2011, Rosa et al. 2002), e que também ocorreram no presente estudo. Essas leveduras são consideradas osmotolerantes e halotolerantes generalistas frequentemente isoladas em alimentos e causando deterioração do mel de *Apis mellifera* (Snowdon e Cliver 1996). *Kodamaea ohmeri* que no presente estudo ocorreu apenas em amostras de mel, já teve sua ocorrência registrada no besouro *Aethina tumida* que infestava ninhos de *A. mellifera* (Benda et al. 2008; Torto et al., 2007). Leveduras do gênero *Metschnikowia* também são reconhecidas por terem associação com insetos, o que reforça a hipótese de co-especiação dessas leveduras com os insetos (Lachance et al., 2005; Lachance, 2006). Brysch-Herzberg (2004) observou uma característica importante na espécie *M. gruessii*, que é uma adaptação morfológica para que suas células possam aderir aos tricomas encontrados na região bucal das rainhas da abelha *Bombus*.

O gênero *Pichia* tem sido frequentemente observado em associação com insetos, podendo ser encontrado no interior do corpo e no intestino de moscas (*Drosophila* sp. e *Suilla* sp.), tesourinhas (*Labidura* sp.), abelhas (*Andrena* sp.) e formigas (*Iridomyrmex humilis*) (Zacchi; Vaughan-Martini, 2002). No presente estudo, *Meyerozyma guilliermondii* foi

considerada abundante nos três substratos analisados, sendo considerada uma espécie ubíqua, não havendo relação de associação com um inseto hospedeiro (Zacchi e Vaughan-Martini, 2002). *Wickerhamomyces anomalus* (= *Hansenula anomala*, *Pichia anomala*), que foi isolada apenas nas amostras de mel, é membro do clado *Wickerhamomyces* e é uma espécie frequentemente encontrada em ambientes naturais (plantas, solo, frutas, animais) (Huang et al. 2012).

No presente estudo vários isolados não permaneceram viáveis por mais de uma geração em condições de preservação em laboratório, não sendo possível o total estudo taxonômico. Fato similar foi observado por Morais et al. (2013) que sugeriram a possibilidade de que a associação com as abelhas seja importante para a sobrevivência dessas leveduras, contudo ainda se faz necessário investigações posteriores para chegar a qualquer conclusão sobre as relações ecológicas entre abelhas e leveduras. Fisiologicamente as leveduras conseguem se adaptar a sobrecargas de açúcares mais severas que a maioria dos micro-organismos, podendo crescer em substratos com concentrações de açúcares intoleráveis para as bactérias, já que não são tão sensíveis as pressões osmóticas. Podem também tolerar e crescer em concentrações altas de ácidos, suportando variações de pH entre 2 e 9, embora o pH ótimo para a maioria das espécies esteja situado em torno de 5,6 (Lacaz-Ruiz, 2000).

Há uma grande necessidade de se obter mais informações sobre associações entre insetos e fungos (Blackwell, 2011). Apesar da grande contribuição para o nosso ecossistema, há poucos estudos sobre as abelhas sem ferrão, sendo a maioria deles sobre a criação, análise e tipificação do mel. Além do mais, muitas das informações estão publicadas na forma de resumos em anais de eventos e reuniões científicas, e poucas são as publicações em periódicos científicos (Souza, 2008). Segundo Morais et al. (2013) esses insetos apresentam uma microbiota associada, que é suspeita de ser responsável por transformar o pólen de abelha para a formação de mel. Segundo este autor estes micro-organismos também podem desempenhar um papel na maturação ou modificação bioquímica do mel armazenado. Leão et al. (2012) citaram que colônias de abelhas sem ferrão são habitadas por uma grande diversidade de micro-organismos, mas a maioria deles ainda são desconhecidos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das condições experimentais estabelecidas, os resultados obtidos no presente estudo trazem significativas adições ao conhecimento da micota pernambucana e brasileira relacionada à abelhas nativas em ambiente de Mata Atlântica. Todas as espécies foram identificadas utilizando o sequenciamento de pelo menos a região ITS ou LSU, junto com caracteres taxonômicos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos (para as leveduras) e para os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Monascus* o perfil de extrólitos também foi determinado, sendo essa uma combinação de ferramentas importante para identificação de fungos.

A grande maioria dos táxons identificados pertencem ao filo Ascomycota, grupo mais expressivo em diversidade no reino Fungi.

Não houve o objetivo de correlacionar a composição de espécies entre os substratos, com características físico-químicas, dessa forma a continuidade dos estudos propiciará, indubitavelmente, além de novas descobertas de táxons, um melhor entendimento sobre a ocorrência dos fungos e do papel desempenhado por eles nos substratos aqui analisados.

6 CONCLUSÕES

- Fungos filamentosos e leveduras de várias espécies foram isolados dos substratos mel, pólen e superfície da colmeia da abelha *M. scutellaris*;
- A comunidade dos fungos mostrou-se mais similar entre o pólen e a superfície da colmeia;
- O padrão da frequência observado é característico de comunidades onde as espécies mais competitivas dominam o substrato, refletindo na ocorrência de muitas espécies raras.
- Novas espécies de fungos foram obtidas a partir de substratos relacionados à abelha *M. scutellaris*;
- Os fungos isolados em substratos relacionados a *M. scutellaris* produzem uma grande diversidade de metabólitos, muitos ainda não caracterizados quimicamente;
- A abordagem polifásica permitiu uma identificação mais precisa dos isolados de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Monascus* obtidos.

REFERÊNCIAS

- A ABELHA URUÇU. **Uruçu A abelha do litoral Baiano e Nordeste**. Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/urucu/>>. Acesso em 04 novembro 2015.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 869p.
- ALMEIDA, Miracema Gurgel de. **Aspectos bionômicos, ecológicos e genéticos da abelha *Melipona scutellaris scutellaris* Latreille (1811)**. 1974. 128f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1974.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; BARION, F. Physicochemical evaluation of Brazilian honey from Jataí bee (*Tetragonisca angustula*). In: APIMONDIA INTERNATIONAL APICULTURAL CONGRESS, 40, 2007, Melbourne, Austrália. **Anais...** Melbourne, Austrália, 2007. p. 90-91.
- ALVES, E. M. et al. Presença de coliformes, bolores e leveduras em amostras de mel orgânico de abelhas africanizadas das ilhas do alto rio Paraná. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p.2222-2224, out. 2009.
- ALVES, R. M. O. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 644-650, out. 2005.
- ALVES, R. R. N. et al. Commercialization of animal-derived remedies as complementary medicine in the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 600-608, jul. 2009.
- ALVES, R. R. N. et al. Animal-based remedies as complementary medicines in Santa Cruz do Capibaribe, Brazil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, n. 44, jul. 2008.
- ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. Zootherapy goes to town: The use of animal-based remedies in urban areas of NE and N Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 541-555, set. 2007.
- ALVES, R. M. O. et al. Areas of natural occurrence of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) in the state of Bahia, Brazil. **An. Acad. Bras. Ciênc.** vol. 84, n. 3, pp. 679-688, set. 2012.
- AMARAL, I. M. R. **Sistema imune inato em *Melipona scutellaros* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2009.
- ANACLETO, D. A. **Recursos alimentares, desenvolvimento das colônias e características físico químicas, microbiológicas e polínicas de mel e cargas de pólen de meliponíneos, do município de Piracicaba, Estado de São Paulo**. 2007. 133 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ANACLETO, D. A et al. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula* latreille, 1811). **Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, v.29, n.3, p. 535-541, jul-set 2009.

ANDERSON K. E. et al. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). **Insectes Sociaux**, v. 58, n. 4, 431–444, nov. 2011.

ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I. Diversity of fungi in inorganic soils under a moorland–Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 1121-1132, 2003.

ARROYO-LÓPEZ, F. N. et al. Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. **Food Microbiology**. v. 23, n.8, p. 791-796, dez. 2006.

AVIO, L. et al. Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 55, n. 3, p. 242-253, mar. 2009.

AZEREDO, L. C. et al. Características físico-químicas de amostras de méis de melíponas coletadas no Estado de Tocantins. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 13, 2000, Florianópolis, Santa Catarina. **Anais...** Florianópolis: Confederação Brasileira de Apicultura, 2000. 1 CD-ROM.

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, set. 2016.

BATALHA FILHO, H. et al. Inventário da fauna de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em uma área de Caatinga da região de Jequié, BA. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, Suplemento 1, p. 24-29, nov. 2007.

BAUTISTA-GALLEGO, J. et al. Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. **International Journal of Food Microbiology**. v. 147, n.2, p. 89-96, mai. 2011.

BEIJERINCK, M. W. **De infusies en de ontdekking der bacteriën**. ed. MÜLLER, W. Amsterdam: The Netherlands, 1913.

BENDA, N. et al. Detection and characterization of *Kodamaea ohmeri* associated with small hive beetle *Aethina tumida* infesting honeybee hives. **J Apic Res** v. 47, p. 193-200, 2008.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BEZERRA, J. M. D.; PERUQUETTI, R. C.; KERR, W. E. Adaptative behavior of *Scotocryptus melitophilus* Reitter (Coleoptera: Leiodidae) to live with its host *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenopetra: Apidae). **Rev. Brasil. Zool.**; v. 17, p. 199-203, 2000.

BLACKWELL, M. Fungal evolution and taxonomy. **BioControl**, v. 55, p. 7–16, 2010.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? **American Journal of Botany** v. 98, p. 426–438, 2011.

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

BUGNI, T.S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Products Reports**, v. 21, p. 143 - 163, 2004.

CAMARGO, J. M. F.; GARCIA, M. M. B.; CASTRILLON, A. Notas prévias sobre a bionomia de *Ptilotrigona lurida* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): Associação de leveduras em pólen estocado. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Série Zoologia**, v. 2, p. 391-395, 1992.

CANO, R. J. et al. Bacillus DNA in fossil bees: an ancient symbiosis? **Applied and Environmental Microbiology** v. 60, p. 2164–2167, 1994.

CARVALHO, C. A. L. et al. **Mel de abelha sem ferrão**: contribuição para a caracterização físico-química. 1. ed. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA, 2005. 32 f.

CARVALHO, C. M. et al. Yeast species associated with honey: different identification methods. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n.225, p. 103-113, 2010.

CARVALHO, M. D. F. **Temperatura da superfície corpórea e perda de calor por convecção em abelhas (*Apis mellifera*) em uma região semi-árida**. 2009. 47f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2009.

COLUCCIO, A. E. et al. The yeast spore wall enables spores to survive passage through the digestive tract of *Drosophila*. **Public Library of Science One**, San Francisco, v.3, n.3, p.1-7, ago. 2008.

CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL. Mapa síntese das prioridades para conservação da biodiversidade da Mata Atlântica do Nordeste. In: **Áreas Prioritárias para Conservação da Biodiversidade da Mata Atlântica do Nordeste**. Brasil: Ministério do Meio Ambiente, 1993.

COOKE, R. C.; RAYNER, A. D. M. **Ecology of Saprophytic Fungi**. New York: Longman, London, 1984.

CORREIA-OLIVEIRA, M. E. et al. Atividade de Água (Aw) em Amostras de Pólen Apícola Desidratado e Mel do Estado de Sergipe. **Revista da Fapese**, Sergipe, v.4, n. 2, p. 27-36, jul./dez. 2008.

COSTA-NETO, E. M. The Use of Insects in Folk Medicine in the State of Bahia, Northeastern Brazil, With Notes on Insects Reported Elsewhere in Brazilian Folk Medicine. **Human Ecology**, v. 30, n. 2, p. 245-263, 2002.

EGOROVA A.I. Preservative microflora in stored pollen. **Veterinariya**, v. 8, p. 40-41, 1971.

ELTZ, T.; BRUHL, C.A.; GORKE, C. Collection of mold (*Rhizopus* sp.) spores in lieu of pollen by the stingless bee *Trigona collina*. **Journal of Tropical Ecology**, v. 12, p. 441-445, 1996.

FERREIRA, F. S. et al. Zootherapeutics utilized by residents of the community Poço Dantas, Crato-CE, Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, n. 21, 2009.

FERREIRA-CALIMAN, M. J. **Caracterização do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de operárias, rainhas virgens e rainhas fisogástricas de *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2008. 56f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2008.

FLEET, G. H. Yeast Spoilage of foods and beverages. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds.) **The yeasts: a taxonomic study**. 5 ed. San Diego: Elsevier, 2011. p. 53-64.

FLORES, J. M. et al. Ascosferiose (*Ascosphaera apis*): causas predisponentes, medidas de controle e prevenção. **Boletim de Indústria Animal**. v. 57, n 2, p. 201-209, 2000.

FRAGA, M. E.; PEREIRA, M. G. Diversidade de *Trichocomaceae* Isolada de Solo e Serrapilheira de Floresta Atlântica. **Floresta e Ambiente**, v. 19, p. 405-413, 2012.

FREIRE, M.S.B. Levantamento florístico do Parque Estadual Dunas do Natal. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, n. 2, p. 41-59, 1990.

FUNKE, G. et al. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods. **J. Clin. Microbiol**, v. 36, p. 1948-1952, 1998.

GALAGAN, J. E. et al. Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. **Genome Research, Cold Spring Harbor**, v.15, n.12, p. 1620-1631, dez. 2005.

GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. **FEMS Microbiology Letters**, v.155, n.1, p. 1-10, out. 1997.

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

GILLIAM, M.; PREST, D. B.; LORENZ, B. J. Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds*. **Apidologie, Springer Verlag**, v. 20, n. 1, p. 53-68, 1989.

GIMENES, M. Interactions between bees and *Ludwigia elegans* (Camb.) Hara (Onagraceae) flowers at different altitudes in São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v.19, n. 3, p.681-689, 2002.

GOLONKA, A. M. **Nectar-inhabiting microorganisms (NIMs) and the dioecious plant species *Silene latifolia***. 2002. 138 p. Tese (Doutorado) – Duke University, Durham, NC, 2002.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.72, n.4, p.455-459, out./dez.; 2005.

GONÇALVES, R. B.; BRANDAO, C. R. F. Diversidade de abelhas (Hymenoptera, Apidae) ao longo de um gradiente latitudinal na Mata Atlântica. **Biota Neotrop.** vol.8, n.4, p. 51-61, 2008.

GONZÁLEZ, G.; HINOJO, M. J.; MATEO, R.; MEDINA, A.; JIMÉNEZ, M. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. **Int J Food Microbiol**, v 105, p. 1-9, 2005.

GRAF, B. et al. Evaluation of the VITEK 2 System for Rapid Identification of Yeasts and Yeast-Like Organisms. **J Clin Microbiol** v. 38, n. 5, p. 1782–1785, 2000.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509 - 526, 2006.

HEINRICH, B. **The Hot-Blooded Insects: Strategies and Mechanisms of Thermoregulation**. Cambridge-MA: Harvard University, 1993. 601 p.

HERVATIN, H. L. **Avaliação microbiológica e físico-química do polen apícola in natura e desidratado sob diferentes temperaturas**. 2009. 83 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2009.

HIBBETT, D. S. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycol Res** v. 111, p. 509-547, 2007.

HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 488-492, 1980.

HOUBRAKEN, J.; A SAMSON, R. Current taxonomy and identification of foodborne fungi. **Current Opinion In Food Science**, v. 17, p.84-88, out. 2017. Elsevier BV.

HUANG, C.; CHANG, M.; HUANG, L. Species identification of *Wickerhamomyces anomalus* and related taxa using β -tubulin (β -tub) DNA barcode marker. **Yeast**, v. 29, n. 12, p.531-535, nov. 2012.

HUGHES, K. W.; PETERSEN, R. H.; LICKY, E. B. Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. **New Phytologist**. v. 182, n.4, p. 795-798, 2009.

ICMBIO. **Espécies Ameaçadas - LISTA 2014**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies/6007especie-6007.html>>. Acesso em 04 de nov. 2015.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. et al. **A distribuição geográfica da abelha urucu (*Melipona scutellaris*, Latreille, 1881), (Apidae – Meliponinae)**. Disponível em <<http://www.webbee.org.br>>. Acesso em: 02 de out. 2015.

JAIN, N. et al. Rapid Identification of Yeast Isolates from Clinical Specimens in Critically Ill Trauma ICU Patients. **J Lab Physicians**, v. 4, n. 1, p. 30–34, 2012.

JARAU, S. et al. Workers make the queens in *Melipona* bees: identification of geraniol as a caste determining compound from labial glands of nurse bees. **J. Chem. Ecol.** v. 36, p. 565-569, 2010.

JURJEVIĆ, Z. et al. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air. **IMA Fungus**, v. 3, p. 159-173, 2012.

KAČÁNIOVÁ, M. et al. Mycobiota and mycotoxins in bee pollen collected from different areas of Slovakia. **Journal Of Environmental Science And Health, Part B**, v. 46, n. 7, p.623-629, 12 jul. 2011.

KAČÁNIOVÁ, M. et al. Microscopic fungi recovered from honey and their toxinogenity. **J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng**, v. 47, n.11, p. 1659-64, 2012.

KERR, E. W.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha uruçú**: Biologia, manejo e conservação. 1 ed. Belo Horizonte, MG: Acangaú, 1996. 145 p.

KERR, W. E. **Biologia e manejo da tíuba**: a abelha do Maranhão. São Luís, MA: EDUFMA, 1996. 156 p.

KERR, W. E. Importância de serem estudadas as abelhas autóctones. In: **XII Encontro de Zoologia do Nordeste**, Feira de Santana, 1999.

KIRK, P. M. et al. **Dictionary of Fungi**. 10 ed. UK: CABI Publishing, Surrey, 2008. 771p.

KLEINERT-GIOVANNINI, A. A vida das abelhas “sem ferrão”. **Apicultura no Brasil** v. 32 p. 38-40, 1989.

KREBS, C. L. **Ecology**: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance. Ed. 3. New York: Harper and Row, Publishers, 1985. 680 p.

KURTZMAN, C. P. *Priceomyces* M. Suzuki & Kurtzman. In: KURTZMAN, C. P.; FELL J. W.; BOEUKHOUT, T. (eds) **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, 2011. p. 719–724.

KURTZMAN, C. P. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 64, p. 325-332. 2014.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; BASEHOAR-POWERS, E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov.; *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. **FEMS Yeast Res** v. 8, p. 939–954, 2008.

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, n. 4, p. 331-71, 1998.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. **FEMS Yeast Res.** v. 3, n.4, p. 417-432, 2003.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **J. Invertebr. Pathol.** v. 132, p. 1-41, 2015.

LACHANCE, M-A. Yeast diversity: how many and how much? In: ROSA, C. A.; PETER, G. (Ed.) **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, The Yeast Handbook**. Heidelberg: Springer, p. 1-10, 2006.

LACHANCE, M. A. *Starmerella* Rosa and Lachance (1998). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEUKHOUT, T. (eds) **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, 2011. p 811–815.

LACHANCE, M-A. et al. *Metschnikowia hamakuensis* sp. nov.; *Metschnikowia kamakouana* sp. nov. and *Metschnikowia mauinuiana* sp. nov.; three endemic yeasts from Hawaiian nitidulid beetles. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 55, p. 1369–1377, 2005.

LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M.; STARMER, W. T. *Metschnikowia santaceciliae*, *Candida hawaiiiana*, and *Candida kipukae*, three new yeast species associated with insects of tropical morning glory. **FEMS Yeast Research**, London, v. 3, p. 97–103, 2003.

LACHANCE, M.-A. Yeast biodiversity: How many and how much? In: ROSA, C. A.; GÁBOR, P. (eds.), **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2006. p. 1 – 9.

LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M.; DÍAZ, M. M. C.; JANZEN, D. H. *Candida cleridarum*, *Candida tilneyi* and *Candida powellii*, three new yeast species isolated from insects associated with flowers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v. 51, p. 1201–1207, 2001.

LACHANCE, M.-A.; STARMER, W. T. Ecology and yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J. W. (eds). **The yeasts: a taxonomic study**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 21-34.

LARENA, I. et al. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**. v.75, p. 187-194, 1999.

LARSEN, T. et al. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. **Natural Product Reports**, London, v. 22, n. 6, p. 675-695, dez. 2005.

LAWRENCE, J. F. Mycophagy in the Coleoptera: Feeding Strategies and Morphological Adaptations. In: **Insect-Fungus Interactions. 14th Symposium of Royal Entomological Society London** (ed. by N. Wilding, N.M. Collins, P.M. Hammond and J.F. Webber), London: Academic Press, 1989. p.1-23.

LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Livroceres, 2003. 59 p.

LEONG, W. F.; TAN, T. X.; JONES, E. B. G. Fungal colonization of submerged *Bruguiera cylindrica* and *Rhizophora apiculata* wood. **Botanica Marina**, v. 34, p. 69-76, 1991.

LIMA, D. A. Estudos fitogeográficos de Pernambuco. In: **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife-PE, v. 4, 2007. p.243-274.

LOGUERCIO-LEITE, C. et al. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. **Biotemas**, v.19, n.2, p. 17-27, 2006.

LORENZON, M. C. A.; MORGADO, L. N. Mel com biodiversidade. **Ciência hoje**, v.42, n.249, p. 65-67, 2008.

MACHADO, J. O. Simbiose entre as abelhas sociais brasileiras (Meliponinae, Apidae) e uma espécie de bactéria. **Ciência e Cultura** v. 23, n. 5, p. 625-633, 1971.

MALLOCH, D.; BLACKWELL, M. Dispersal biology of the ophiostomatoid fungi. In: WINGFIELD, M. J.; SEIFERT, K. A.; WEBBER, J. F. (eds). **Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology and pathogenicity**. Saint Paul: APS Press, 1993. p. 195-206.

MARINHO, I. V. et al. Preservação de Abelhas sem Ferrão no Semi-Árido através da Criação Racional. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA**, 1, 2002, João Pessoa. Anais. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2002.

MATSUZAWA, T. et al. Two new species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from caatinga soil in the State of Pernambuco, Brazil. **Mycoscience**, v. 55, n. 2, p. 79–88, 2014.

MEL E ABELHAS BRASILEIRAS. Disponível em: <
http://www.emoleza.hpg.ig.com.br/dv_get/9495/biologia/biologia/mel_e_abelhas/MEL_ABE.htm > Acesso em 08 de novembro de 2015.

MELLO, G.A.R. Notes on the nesting biology of *Melipona capixaba* (Hymenoptera, Apidae). **J. Kansas Entomol. Soc.**, v. 69, p. 207-210, 1996.

MENDES, C. G. et al. As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.22, n.2, p.07-14, 2009.

MENEZES, C. et al. The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. **Pot-honey**, p.153-171, 19 nov. 2012. Springer New York.
http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_10.

MENEZES, C. et al. A Brazilian Social Bee Must Cultivate Fungus to Survive. **Current Biology**, v. 25, n. 21, p. 2851-2855, nov. 2015.

MICHENER, C. D. **The Bees of the World**. Baltimore: The Johns Hopkins, 2007. 913p.

MICHENER, C. D.; The Meliponini, in: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. (Eds.) **Pot-Honey**. New York: Springer, 2013. p. 3–17.

MILLER, M. W.; PHAFF, H. J. Successive Microbial Populations in Calimyrna Figs. **Applied Microbiology**, Washington, v. 10, p. 394-400, 1962.

MISIEK, M.; HOFFMEISTER, D. Fungal genetics, genomics, and secondary metabolites in pharmaceutical sciences. **Planta Medica**, v. 73, n. 2, p. 103 - 115, 2007.

MODRO, A. F. H. et al. Saprophytic fungus collection by africanized bees in Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 3, p. 434-436, 2009.

MONDELLI, A. L. et al. *Candida* spp.: manual identification (reference method) and automated identification (Vitek system platform). **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**, v. 18, n. 3, p. 335-339, 2012.

MORAIS, P. B. de; CALAÇA, P. S. S. T.; ROSA, C. Microorganisms associated with stingless bees. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. (Org.). **Pot honey: A legacy of stingless bees**. 1ed. Springer, 2013. v. 1, p. 173-186.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 626 p.

MOYES, C. D.; SCHULTE, P. M. **Princípios da fisiologia animal**. ed. 2. Porto Alegre-RS: Artmed, 2010. 757p.

MUELLER, U.G.; GERARDO, N. Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. **PNAS**, v. 99, p.15247–15249, 2002.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p.853-858, 2002.

NIU, G. **Toxicity of mycotoxins to insects and underlying molecular and biochemical mechanisms**. 2011. 145 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – University of Illinois, Illinois 2011.

NOGUEIRA-NETO, P.; SAKAGAMI, S. F. Nest structure of a subterranean stingless bee - *Geotrigona mombuca* Smith (Meliponinae, Hymenoptera: Apoidea). **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 38, p. 187-194, 1966.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997. 445 p.

NORTHROP, J. H. The role of yeast in the nutrition of an insect (*Drosophila*). **Journal of Biological Chemistry**, v.30, n. 181, p. 181-187, 1917.

O'CONNOR, B. M. Evolutionary ecology of astigmatid mites. **Ann. Rev. Entomol.** v. 27, p. 385-409, 1982.

O'DONNELL, K. *Fusarium* and its near relatives. In: REYNOLDS, D. R. AND TAYLOR, J. W. (eds) **The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics**. Wallingford: CAB International, 1993. Pp 225-233.

OLAITAN, P. B.; ADELEKE, O. E.; OLA, I. O. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **African Health Sciences**, v. 7, p. 159-165, 2007.

OLIVEIRA, B. T. et al. Experiências de conservação no fragmento de mata atlântica do Jardim Botânico do Recife. **Arrudea**, Recife, v. 1, n.1, p. 001 – 005, 2015.

PAGNOCCA, F. C. et al. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek Int J Gen & Molec Microbiol**, v. 94, p. 517-526, 2008.

PALAZUELOS BALLIVIÁN, J. M. (Org.). **Abelhas Nativas sem Ferrão: Mýg Pê**. São Leopoldo: Oikos, 2008. 128 p.

PAMPLONA, B. C. Exame dos elementos químicos inorgânicos encontrados em méis brasileiros de *Apis mellifera* e suas relações físico-biológicas. 1989. 131 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1989.

PANDEY, D. K. et al. Fungitoxicity in pollen grains. **Grana**, v. 22, p. 31 – 32, 1983.

PARMASTO, E.; PARMASTO, I.; Size and shape of basidiospores in the Hymenomycetes. **Mycologia Helvética**, v. 5, p. 47-78, 1992.

PARSA, S. et al. Root environment is a key determinant of fungal entomopathogen endophytism following seed treatment in the common bean, *Phaseolus vulgaris*. **Biological Control**, v. 116, p. 74-81, 2018.

PEREIRA, D. S. et al. Abelhas nativas encontradas em meliponários no oeste Potiguar- RN e proposições de seu desaparecimento na natureza. **Revista Verde** v.1, n.2, p.54-65, 2006.

PÉREZ, J. et al. Mycobiota associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera, Scolytidae) in Chiapas, Mexico. **Mycological Research**, v.107, p. 879–887, 2003.

PERUQUETTI, R. C. Contribuição ao estudo dos microrganismos e artrópodes associados a abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae), 2000. Disponível em: <<http://www.ufv.br/DBG/Apiario/inquilinos.pdf>>. Acesso em: 28 outubro. 2015.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts**, 2.ed. London: Academic Press, 1987. v.1, p.123-180.

PUCCIARELLI, A. B. et al. Microbiological and physicochemical analysis of yateí (*Tetragonisca angustula*) honey for assessing quality standards and commercialization. **Rev. argent. microbiol.** v. 46, n. 4, p. 325-332, 2014.

RABINOWITZ, D. Seven forms of rarity. In: SYNGE, H. (ed.) **The Biological Aspects of Rare Plant Conservation**, New York: Wiley, 1981. p. 205-217.

RAMALHO, M. Stingless bees mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. **Acta Botânica Bras**, v. 18, p. 37-47, 2003.

RIBEIRO, M.C. et al. Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, 2009.

ROBERT, V. et al. Yeast biodiversity and culture collections. In: ROSA, C. A.; GABOR, P. (eds.) **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**, Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2006. p. 31 – 44.

RODRIGUES, M. F.; SILVA, S. P. V. Plano de manejo – parque estadual de dois irmãos. 2014. Recife, SEMAS.
http://www.cprh.pe.gov.br/ARQUIVOS_ANEXO/1%20PLANO%20DE%20MANEJO%20com%20lei%2011%20622.pdf;10;20151015.pdf Acesso em: 28 outubro. 2014.

RODRIGUES, A. C. L.; MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. de. Análises de mel de *Apis mellifera* L.; 1758 e *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) coletado em Piracicaba-SP. **Revista de Agricultura**, v. 73, n. 3, p. 255-262, 1998.

RODRIGUES, A. E.; et al. Fontes de alimentação para abelhas nativas: 1. estudos preliminares da *cayaponia cabocla* como planta alimentar para *Melipona scutellaris*, *Biofar*. v. 4, n. 1, p. 1983-4209, 2010.

RODRIGUES, A. E.; et al. Estudo de plantas visitadas por abelhas *Melipona scutellaris* na microrregião do brejo no Estado da Paraíba. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. v. 25, n. 2, p. 229-234, 2003.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M-A. The yeast genus *Starmerellagen*. nov. and *Starmerella bombicolasp*. nov.; the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. **Int J Syst Bacterio**. v. 148, p. 1413–1417, 1998.

ROSA, C.A.; LACHANCE, M-A.; SILVA, J.O.C.; TEIXEIRA, A.C.P.; MARINI, M.M.; ANTONINI, Y.; MARTINS R.P. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 271-275, 2003.

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

ROUBIK, D.W. **Nesting and reproductive biology, ecology and natural history of tropical bees**. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1989. 514 p.

ROUBIK, D.W.; WHEELER, Q. D. Flightless beetles and stingless bees: phoresy of *Scotocryptine beetles* (Leiodidae) on their meliponinae hosts (Apidae). **J. Kansas Entomol. Soc.**, v. 5, p. 125- 135, 1982.

SAKAGAMI, S. F. Stingless bees. In: HERMAN, H. R. **Social insects**. London: Academic Press, 1982. v. 3, 361-423 p.

SALES, M. F.; MAYO, S. J.; RODAL, M. J. N. **Plantas vasculares das florestas serranas de Pernambuco: um checklist da flora ameaçada dos Brejos de Altitude, Pernambuco, Brasil**. Recife: Imprensa Universitária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1998. 130 p.

- SANTOS, A. C. S. et al. Controlling *Dactylopius opuntiae* with *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex and extracts of *Ricinus communis* and *Poincianella pyramidalis*. **Journal of Pest Science**, v. 89, p. 539-547, 2015.
- SARMA, V. V.; HYDE, K. D. A review on frequently occurring fungi in mangroves. **Fungal Diversity**, v. 8, p. 1-34, 2001.
- SCHIGEL, D.S. Fungivory and host associations of Coleoptera: a bibliography and review of research approaches. **Mycology**, v. 3, n. 4, p. 258-272, 2012.
- SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.
- SCORZETTI, G. et al. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Research**., v. 2, n.4, p. 495-517, 2002.
- SILVA, J. C. S.; LAGES, V. N. A meliponicultura como fator de desenvolvimento na área de proteção ambiental da Ilha de Santa Rita, Alagoas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 1, n. 3, 2001.
- SILVA, M. C.; CASTELETI, C. H. M. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. (eds). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2005. p.43-59.
- SILVA, M. D.; RAMALHO, M.; ROSA, J. F. Por que *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae) forrageia sob alta umidade relativa do ar? **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 101, n. 1-2, p. 131-137, 2011.
- SILVA, P. G. F.; SERRÃO, J. E. Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 39-45, 2000.
- SILVA, P. G. F.; ZUCOLOTO, F. S. Influência de microrganismos no valor nutritivo do pólen para *Scaptotrigona depilis*, Moure (Hymenoptera, Apidae). In: **1º Encontro sobre abelhas em Ribeirão Preto**. 1994. **Anais**. Ribeirão Preto - SP. 1994. p.232-242.
- SILVA, P. G. F.; SERRÃO, J. E.; Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 39-45, 2000.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras. Sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Fundação Araucária, 2002. 253 p.
- SNOWDON, J. A.; CLIVER, D. O. Microorganisms in honey, Review article, **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 1-26, 1996.
- SOS Mata Atlântica. Mata Atlântica. Disponível: <<https://www.sosma.org.br/nossas-causas/mata-atlantica/>>. Acesso em: 28 outubro. 2015.

SOUZA, B. A. **Caracterização físico-química e microbiológica de amostras de mel de abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponinae) do Estado da Bahia, com ênfase em *Melipona Illinger*, 1806**. 2008. 107f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

SOUZA, B. A. et al. Características físico-químicas de amostras de méis de *Melipona asilvai* (Hymenoptera:Apidae). **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1623-1624, 2004.

SOUZA, B. A. et al. Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 798-802, 2009.

STAMPS, J. A. et al. Drosophila Regulate Yeast Density and Increase Yeast Community Similarity in a Natural Substrate. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e42238, 2012.

STARMER, W. T.; LACHANCE, M-A. Yeast Ecology. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts A Taxonomic Study**. ed. 5. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 65-86.

STEVENSON, G. B. **Biologia dos fungos, bactérias e vírus**. São Paulo: Polígono, 1974. 267p.

STOTZ, H. U.; LONG, S. R. Expression of the pea (*Pisum sativum* L) alpha-tubulin gene is correlated with cell division activity. **Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 1-14, 1999.

SUH, S-O.; BLACKWELL, M. Beetles as hosts for undescribed yeasts. In: VEGA, F.E.; BLACKWELL, M. (eds.). **Insect-fungal associations: ecology and evolution**. Oxford: Oxford University Press, 2005. p. 244–256.

SUH, S-O. et al. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose fermenting gut yeasts. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3137–3145, 2003.

TIAGO, P. V.; OLIVEIRA, N. T.; LIMA, E. Á. L. A. Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects. **Ciência Rural**, v.44, n. 4, p. 645-651, 2014.

TORTO, B. et al. A. Multitrophic interaction facilitates parasite-host relationship between an invasive beetle and the honey bee. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 8374–8378, 2007

TUSZYNSKI, J. A. et al. The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. **Developmental Biology**, v. 50, p. 341-358, 2006.

VENTURIERI, G. C.; RAIOL, V. F. O.; PEREIRA, C. A. B. Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona fasciata* (APIDAE: MELIPONINA), entre os agricultores familiares de Bragança-PA, Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 3, n. 2, 2003.

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

VU, D.; GROENEWALD, M.; SZÖKE, S. DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. **Stud Mycol**, v. 85, p. 91–105, 2016.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In: INNIS, M. A. et al. (Org). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WINGFIELD M. J.; WYK, P. S. VAN; VIVIERS, M. Rust-spores, bees and pollen. **Mycologist** v. 3, p. 31-32, 1989.

ZACCHI, L.; VAUGHAN-MARTINI, A. Yeasts associated with insects in agricultural areas of Perugia, Italy. **Annals of Microbiology**, v. 244, p. 237–244, 2002.

SÁNCHEZ, P. et al. Detección de hongos entomopatógenos del género *Cordyceps* ((Fr.) Link), 1833 (Ascomycotina: Pyrenomycetes) sobre hormigas del género *Camponotus* Mayr, 1861 (Hymenoptera: Formicidae) en plantaciones de cacao de Barlovento, estado Miranda, Venezuela. **Entomotropica**, p. 191-195, 2002.

SPATAFORA, J. W. et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data, **Mycologia**, v. 108, p. 1028-1046, 2016.

RUYCK, K. et al. Dietary mycotoxins, coexposure, and carcinogenesis in humans: Short review. **Mutat Res.**, v. 766, p. 32-41, 2015.

TRAGUST, S. et al. Ants disinfect fungus-exposed brood by oral uptake and spread of their poison. **Curr Biol**, v. 23, p. 76–82, 2013.

UGELVIG, L. V.; CREMER, S. Social prophylaxis: group interaction promotes collective immunity in ant colonies. **Curr Biol**, v. 17, p. 1967–1971, 2007.

BLANFORD, S.; THOMAS, M. B. Host thermal biology: the key to understanding host–pathogen interactions and microbial pest control? **Agric For Entomol**, v. 1, p. 195–202, 1999.

SHANG, Y.; FENG, P.; WANG, C. Fungi That Infect Insects: Altering Host Behavior and Beyond. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 8, p. e1005037, 2015.

WITTE, V.; MASCHWITZ, U. Mushroom harvesting ants in the tropical rain forest. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 95, p. 1049- 1054, 2008.

NICKELE, M. A. et al. Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 73, p. 53-72, mar. 2013.

LACERDA, F. G. Mecanismos de defesa em insetos sociais contra patógenos. **Revista Educação, Meio Ambiente e Saúde**, v. 4, p. 31-50, 2009.

WILSON, E. O. **The insect societies**. Cambridge: Harvard University Press, 1971. 548 p.

APÊNDICE A - NEW *PENICILLIUM* AND *TALAROMYCES* SPECIES FROM HONEY, POLLEN AND NESTS OF STINGLESS BEES

Antonie van Leeuwenhoek
https://doi.org/10.1007/s10482-018-1081-1



ORIGINAL PAPER

New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees

Renan N. Barbosa · Jadson D. P. Bezerra · Cristina M. Souza-Motta ·
Jens C. Frisvad · Robert A. Samson · Neiva T. Oliveira · Jos Houbraken

Received: 15 January 2018 / Accepted: 31 March 2018
© The Author(s) 2018

Abstract *Penicillium* and *Talaromyces* species have a worldwide distribution and are isolated from various materials and hosts, including insects and their substrates. The aim of this study was to characterize the *Penicillium* and *Talaromyces* species obtained during a survey of honey, pollen and the inside of nests of *Melipona scutellaris*. A total of 100 isolates were obtained during the survey and 82% of those strains belonged to *Penicillium* and 18% to *Talaromyces*. Identification of these isolates was performed based on phenotypic characters and β -tubulin and ITS sequencing. Twenty-one species were identified in *Penicillium*

and six in *Talaromyces*, including seven new species. These new species were studied in detail using a polyphasic approach combining phenotypic, molecular and extrolite data. The four new *Penicillium* species belong to sections *Sclerotiora* (*Penicillium fernandesiae* sp. nov., *Penicillium mellis* sp. nov., *Penicillium meliponae* sp. nov.) and *Gracilentia* (*Penicillium apimei* sp. nov.) and the three new *Talaromyces* species to sections *Helici* (*Talaromyces pigmentosus* sp. nov.), *Talaromyces* (*Talaromyces mycothecae* sp. nov.) and *Trachyspermi* (*Talaromyces brasiliensis* sp. nov.). The invalidly described species *Penicillium echinulonalgiovense* sp. nov. was also isolated during the survey and this species is validated here.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10482-018-1081-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. N. Barbosa · R. A. Samson · J. Houbraken (✉)
Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Uppsalalaan 8,
3584 CT Utrecht, The Netherlands
e-mail: j.houbraken@westerdijkinstitut.nl

R. N. Barbosa · J. D. P. Bezerra · C. M. Souza-Motta ·
N. T. Oliveira
Departamento de Micologia Prof. Chaves Batista,
Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes
Rego, s/n, Centro de Biociências, Cidade Universitária,
CEP: 50670-901 Recife, PE, Brazil

J. C. Frisvad
Department of Biotechnology and Biomedicine,
Technical University of Denmark, 2800 Kongens Lyngby,
Denmark

Keywords 8 new taxa · *Aspergillaceae* · Fungal ecology · Polyphasic approach · Taxonomy · *Trichocomaceae*

Introduction

Stingless bees comprise a diverse group of highly eusocial insects occurring throughout the tropical regions in the world. They are important honey producers and pollinators of several plants (Ramírez et al. 2010; Brown and Oliveira 2014). An example of a stingless bee species is *Melipona scutellaris*

Published online: 13 April 2018

Springer

(Hymenoptera: Apidae: Meliponini), an indigenous species occurring in the North-eastern part of Brazil and considered to be one of the first species to be domesticated in the Americas (Kerr 1996; Silva et al. 2013). In this part of Brazil, *M. scutellaris* is the main bee species in meliponiculture (stingless beekeeping). Meliponiculture in the rural areas is a sustainable activity and the honey from these bees is widely appreciated as a food source. The composition of the honey of the stingless bees differs from that of bees of the genus *Apis* (honey bees) (Vit et al. 2004). The honey of stingless bees contains, in comparison to honey of honey bees, a more complex mixture of carbohydrates and contains other types of organic acids, proteins, minerals, vitamins, pollen grains and enzymes (Almeida-Muradian et al. 2013). Recently, the interest in honey produced by stingless bees increased. Besides being a food source, also several other functionalities are linked to this type of honey, such as antiseptic, antimicrobial, anti-inflammatory and wound-healing properties (Silva et al. 2013; Rao et al. 2016).

Penicillium and *Talaromyces* are fungal genera classified in the order *Eurotiales*. In the dual nomenclature era (pre 2012), *Talaromyces* was known as a sexual genus related to *Penicillium* and other genera. In the last decade, the genera *Talaromyces* and *Penicillium* were re-defined due to new taxonomic insights and the introduction of single name nomenclature (Houbraken and Samson 2011; Samson et al. 2011; McNeill et al. 2012; Yilmaz et al. 2014). Currently, *Penicillium* and *Talaromyces* are separate genera that contain both sexual and asexual species. Visagie et al. (2014) accepted 354 *Penicillium* species and Yilmaz et al. (2014) 88 *Talaromyces* species, and these numbers are rapidly increasing (Houbraken et al. 2016a). Several of the new species that are being discovered are found during ecology and biodiversity studies of specific substrates or habitats (Houbraken et al. 2016a). Describing new species from poorly explored substrates and habitats, like those related to meliponiculture, will add to our knowledge on biodiversity. With this information, future studies will also be able to better understand the ecology of fungi in these type of environments.

Fungi, such as *Penicillium* and *Talaromyces*, can have a strong association to a specific substrate (Peterson et al. 2003; Kobayashi et al. 2008; Visagie 2012; Li et al. 2012; Rivera et al. 2012; Yilmaz et al.

2014). The genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monascus* and *Mucor* are commonly associated with bees or their products (Egorova 1971; Gilliam et al. 1989; Eltz et al. 2002; Ferraz et al. 2008; Barbosa et al. 2017). Most fungi associated with bees and nests have a saprophytic lifestyle, but fungi can also have a mutualistic relationship with bees (Menezes et al. 2015). On the other hand, fungi are also reported to be pathogenic to many bee species and cause serious problems in honey bee (*Apis mellifera*) brood. *Aspergillus flavus* is the primary species responsible for stonebrood, a disease where dead and mummified larvae are present in the brood cells, but also other *Aspergilli* such as *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* are reported as aetiological agents of this disease (Gilliam and Vandenberg 1988; Foley et al. 2014; Lopes et al. 2015; Sarwar 2016). Though it is generally accepted that infection only occurs in weakened colonies, the specific conditions predisposing the onset of disease are not fully understood (Shoreit and Bagy 1995).

Fungi play an important role in many ecosystems; however, only a limited number of studies dealt with the association between stingless bees in Brazil and filamentous fungi (e.g. Oliveira and Morato 2000; Ferraz et al. 2008; Góis et al. 2010) and yeasts (e.g. Teixeira et al. 2003; Rosa et al. 2003; Daniel et al. 2013; Barbosa et al. 2016). In the present study, we analysed three different substrates associated with *M. scutellaris* bees: bee pollen, nests and honey. In nature, the *M. scutellaris* bee nests are mainly located in tree hollows, and they are kept by beekeepers in artificial wooden hives. The bees use cerumen (a mixture of wax and floral resins) for the construction of their nests and this material is also used inside nests in storage pots, brood cells and entrance openings (Cortopassi-Laurino et al. 2006; Pianaro et al. 2007). The floral pollen is collected, packed into pollen pellets, and subsequently stored inside the nest by worker bees. This stored pollen is referred to as 'bee bread'. The pollen spectrum has been studied in the past to get insight in the bee colony's food requirements, pollinating functions and the plant species visited by the bees (Cortopassi-Laurino et al. 2007).

In this paper, we focus on the identification of *Penicillium* and *Talaromyces* species isolated from three different substrates (bee pollen, nests and honey) associated to *M. scutellaris* in the Atlantic Rainforest

in Brazil. Phenotypic characters, combined with ITS and partial β -tubulin (*BenA*) sequences were applied to identify the isolates. Four *Penicillium* and three *Talaromyces* species could not be assigned to any known species and are described here as new. Those species are described using a polyphasic approach including morphology, ITS, *BenA*, calmodulin (*CaM*) and/or RNA polymerase II second largest subunit (*RPB2*) sequences and extrolites profiles.

Materials and methods

Strains

Six collections were performed between January and June 2014 in the tropical forest in Pernambuco, Brazil (8°7'30"S, 34°52'30"W and 8°4'36"S, 34°57'34"W). During each collection, four hives were sampled. Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots. Per hive, four samples of the honey pots and four of the pollen pots were collected and combined, resulting in one mixed sample of each substrate. In the same hives, also the surface of brood cells and the pollen and honey pots were sampled using sterile cotton swabs (in total 48 swabs). Analysis of the samples was performed using dichloran 18% glycerol agar (DG18) and malt extract agar supplemented with chloramphenicol as described in Barbosa et al. (2017). The isolates were subsequently deposited in the Micoteca URM culture collection (Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil) and ex-type strains in the CBS culture collection, housed at the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands (under Material Transfer Agreement—MTA No. 01/2016/Micoteca URM) (Tables 1, 2). Holotype material (slide preparation) is deposited at Herbário Pe. Camille Torrend (Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil). New species names and associated information were deposited in MycoBank.

Morphological analyses

For morphological analysis, the strains were three-point inoculated onto creatine agar (CREA), Czapek yeast extract agar (CYA), CYA supplemented with 5% NaCl (CYAS), dichloran 18% glycerol agar (DG18), malt extract agar (MEA, Oxoid), oatmeal agar (OA) and yeast extract sucrose agar (YES). All

Petri dishes were incubated at 25 °C for 7 days and additional CYA and MEA plates were incubated at 15, 30 and 37 °C. Media preparation, inoculation and incubation were performed as described in Samson et al. (2010). Colony diameters were measured after 7 days of incubation and colony characteristics recorded (e.g. presence of soluble pigments, exudates, obverse and reverse colony colours, colour of mycelium). Microscopic observations of the asexual stage were made from colonies grown on MEA. The presence of a sexual stage was determined from cultures incubated on CYA, MEA and OA for at least 40 days at 25 °C. Lactic acid (60%) was used as mounting fluid and 96% ethanol was used to remove excess conidia. A Zeiss Stereo Discovery V20 dissecting microscope and a Zeiss AX10 Imager A2 light microscope, both equipped with Nikon DS-Ri2 cameras, were used to capture digital images using the software NIS-Elements D v4.50. The size, shape and pigmentation of microscopic features were recorded.

DNA isolation, PCR and sequencing

Genomic DNA extractions were made from 7 days old colonies grown on MEA using the UltraClean Microbial DNA kit (MoBio Laboratories, Solana Beach, CA, USA). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the ITS barcode (ITS1, 5.8S rDNA and ITS2), *BenA*, *CaM* and *RPB2* gene regions were performed using methods described by Samson et al. (2010) and Houbraken et al. (2012). The PCR products were sequenced in both directions with the same primers using the BigDye[®] Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and purified with Sephadex, according to the manufacturers' recommendations. Contigs were assembled in the SeqMan (v.10.0.1; Madison, WI, USA) program using the forward and reverse sequence. Newly generated sequences were deposited in the NCBI nucleotide database (GenBank) and the European Nucleotide Archive (Table 1).

Phylogenetic analysis

Sequence datasets were generated by combining the newly generated sequences with reference (preferably ex-type) sequences from NCBI (Visagie et al. 2014; Yilmaz et al. 2014; Taniwaki et al. 2015; Visagie et al. 2015; Chen et al. 2016; Laich and Andrade 2016; Luo

Table 1 Details of strains isolated in this study and used in the phylogenetic analyses

Species	Strain numbers	Substrate; location	Sequence accession numbers			
			ITS	<i>BenA</i>	<i>CaM</i>	<i>RPB2</i>
<i>Penicillium apimei</i>	URM 7591 T = CBS 142502	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278310	LT854641	LT882717	LT854650
<i>Penicillium echinulonalgioense</i>	URM 7599	Bee pollen of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278311	LT882667	LT882670	LT882673
<i>Penicillium echinulonalgioense</i>	RB 217	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278312	LT882668	LT882671	LT882674
<i>Penicillium echinulonalgioense</i>	RB 218	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278313	LT882669	LT882672	LT882675
<i>Penicillium fernandesiae</i>	URM 7600 T = CBS 142500	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278314	LT854645	LT854649	LT854654
<i>Penicillium meliponae</i>	URM 7602 T = CBS 142495	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278315	LT854644	LT854648	LT854653
<i>Penicillium mellis</i>	URM 7605 T = CBS 142499	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278316	LT854643	LT854647	LT854652
<i>Penicillium mellis</i>	URM 7611	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278317	LT882629	LT882634	LT882634
<i>Penicillium mellis</i>	RB 9	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278318	LT882625	LT882630	LT882635
<i>Penicillium mellis</i>	RB 69	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278319	LT882626	LT882631	LT882636
<i>Penicillium mellis</i>	RB 85	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278320	LT882627	LT882632	LT882637
<i>Penicillium mellis</i>	RB 110	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278321	LT882628	LT882633	LT882638
<i>Penicillium</i> sp.	URM 7610 = CBS 142497	Bee pollen of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278322	LT882642	LT882646	LT882651
<i>Talaromyces brasiliensis</i>	URM 7618 T = CBS 142493	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278323	LT855560	LT855563	LT855566
<i>Talaromyces brasiliensis</i>	URM 7619	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278324	LT882640	LT882642	LT882644
<i>Talaromyces brasiliensis</i>	URM 7620	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278325	LT882641	LT882643	LT882645
<i>Talaromyces mycothecae</i>	URM 7622 T = CBS 142494	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278326	LT855561	LT855564	LT855567
<i>Talaromyces mycothecae</i>	URM 7623	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278327	LT882646	LT882649	LT882652
<i>Talaromyces mycothecae</i>	RB 95	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278328	LT882647	LT882650	LT882653
<i>Talaromyces mycothecae</i>	RB 171	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278329	LT882648	LT882651	LT882654
<i>Talaromyces pigmentosus</i>	URM 7624 T = CBS 142805	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278330	LT855562	LT855565	LT855568
<i>Talaromyces pigmentosus</i>	URM 7625	Bee pollen of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278331	LT882655	LT882659	LT882663
<i>Talaromyces pigmentosus</i>	RB 30	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278332	LT882656	LT882660	LT882664

Table 1 continued

Species	Strain numbers	Substrate; location	Sequence accession numbers			
			ITS	<i>BenA</i>	<i>CaM</i>	<i>RPB2</i>
<i>Talaromyces pigmentosus</i>	RB 96	Bee pollen of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278333	LT882657	LT882661	LT882665
<i>Talaromyces pigmentosus</i>	RB 100	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	MF278334	LT882658	LT882662	LT882666

T ex-type strain, URM URM Culture Collection (www.ufpe.br/micoteca), Brazil, RB personal working collection of Renan Barbosa, CBS culture collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, The Netherlands

et al. 2016; Romero et al. 2016; Rong et al. 2016; Visagie et al. 2016; Yilmaz et al. 2016; Guevara-Suarez et al. 2017; Wang et al. 2017a, b). The sequences were aligned using MAFFT v.7 (Katoh and Standley 2013) and manually optimized using MEGA v. 6.06 (Tamura et al. 2013). Individual alignments were concatenated by using Mesquite v. 3.04 (Maddison and Maddison 2016). The most suitable substitution model was determined using jModelTest v. 2.1.7 (Posada 2008). Phylogenetic trees were constructed using Maximum likelihood analyses (ML) using RAxML-HPC v. 8.2.8 (Stamatakis 2014) BlackBox with 1 000 rapid bootstrap inferences via the CIPRES science gateway (<http://www.phylo.org/>) (Miller et al. 2010), while Bayesian inference (BI) analysis was performed in MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al. 2012). In the Bayesian analyses, every 1 000 generations was sampled and the first 25% of the samples were discarded. Trees were visualized in FigTree v. 1.1.2 (Rambaut 2009) and edited in Adobe Illustrator v. 5.1. Bayesian inference (BI) posterior probabilities (pp) values and bootstrap (bs) values are labelled at the nodes. Values less than 0.95 pp and 70% bootstrap support are not shown. Branches with full support in Bayesian and RAxML analyses are thickened. Values below 0.95 pp and 70% are not shown and indicated with a hyphen. Aligned datasets and trees were uploaded to TreeBase (www.treebase.org) under submission number 21965.

Extrolite analysis

Extrolites were extracted from the *Penicillium* strains after growing them on CYA, YES and MEA at 25 °C for 7 days. The *Talaromyces* strains were inoculated on CYA, YES, MEA and OA, and incubated at 25 °C for 14 days. Three agar plugs of each medium were extracted as previously described (Smedsgaard 1997; Houbraken et al. 2012). After extraction, the liquid

was transferred to a clean screw-cap vial and evaporated to dryness. The dried extracts were re-dissolved in methanol by ultrasonication and filtered through a 0.45 µm filter. The extracts were analysed by ultra-high performance liquid chromatography with diode-array detection (UHPLC-DAD) (Houbraken et al. 2012). The detected eluted compounds were identified by comparison of the retention time, retention index and the UV spectrum measured at 200–600 nm against UV spectra from made from standards and data from literature (Nielsen et al. 2011; Klitgaard et al. 2014).

Results

Isolation and identification

During this study on the fungal diversity of substrates related to stingless bees, isolates belonging to various genera [e.g. *Aspergillus*, *Fusarium*, *Monascus* (Barbosa et al. 2017), *Penicillium*, *Talaromyces*] were isolated. This study focusses on the identification of the detected *Penicillium* and *Talaromyces* diversity. The number of *Talaromyces* species (and isolates) detected during this study is low compared to *Penicillium*. Eighty-two *Penicillium* and 18 *Talaromyces* isolates were obtained during the survey on fungi present in honey, bee pollen and inside the nests of *Melipona scutellaris* bees. Phenotypic characters, combined with ITS and partial *BenA* sequences were used to identify isolates. In total, 21 *Penicillium* and six *Talaromyces* species were present among the investigated isolates. Among those, five *Penicillium* and three *Talaromyces* species displayed unique characters deviating from known species. Seven of those eight species are described here as new (see Taxonomy section), and one isolate (RB115), belonging to section *Lanata-Divaricata*, will be described

Table 2 Overview of isolated species from honey, bee pollen and nests

Species	Section	Isolate numbers	Honey	Pollen	Nests	Total
<i>Penicillium apimei</i> sp. nov.	<i>Gracilentia</i>	URM 7591 T= CBS 142502	1			1
<i>Penicillium brocae</i>	<i>Sclerotiora</i>	RB 001; RB 036; RB 035; RB 036; RB 046; RB 064; RB 075; RB 079; RB 082; RB 090; RB 093; RB 101; RB 116; RB 123; RB 124; RB 125; RB 181; RB 182; RB 184; RB 186; RB 193; RB 225	9		13	22
<i>Penicillium chermesinum</i>	<i>Charlesia</i>	RB 114			1	1
<i>Penicillium citreosulfuratum</i>	<i>Exilicaulis</i>	RB 094		1		1
<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Citrina</i>	RB 006; RB 028; RB 032; RB 047; RB 068; RB 250; RB 086; RB 104; RB 109; RB 119; RB 134; RB 185; RB 187; RB 192; RB 198; RB 206	4	2	10	16
<i>Penicillium echinulonalgiovense</i> sp. nov.	<i>Lanata-Divaricata</i>	RB 201; RB 217; RB 218		1	2	3
<i>Penicillium fellutanum</i>	<i>Charlesia</i>	RB 112; RB 113			2	2
<i>Penicillium fernandesiae</i> sp. nov.	<i>Sclerotiora</i>	URM 7600 T = CBS 142500			1	1
<i>Penicillium mallochii</i>	<i>Sclerotiora</i>	RB 138; RB 151; RB 152			3	3
<i>Penicillium meliponae</i> sp. nov.	<i>Sclerotiora</i>	URM 7602 T = CBS 142495	1			1
<i>Penicillium mellis</i> sp. nov.	<i>Sclerotiora</i>	URM 7605 T= CBS 142499; URM 7611; RB 09; RB 69; RB 85; RB 110	2		4	6
<i>Penicillium paxilli</i>	<i>Citrina</i>	RB 127; RB 128			2	2
<i>Penicillium rubens</i>	<i>Chrysogena</i>	RB 014; RB 153; RB 161; RB 192 RB 210; RB 235			6	6
<i>Penicillium sanshaense</i>	<i>Sclerotiora</i>	URM 7617 T = CBS 142496		1		1
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	<i>Sclerotiora</i>	RB 056; RB 121; RB 129; RB 237	1	1	2	4
<i>Penicillium shearii</i>	<i>Citrina</i>	RB 034; RB 073; RB 248			3	3
<i>Penicillium singorense</i>	<i>Lanata-Divaricata</i>	RB 202		1		1
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Lanata-Divaricata</i>	URM 7610 = CBS 142497		1		1
<i>Penicillium steckii</i>	<i>Citrina</i>	RB 065; RB 088; RB 089; RB 137			4	4
<i>Penicillium sumatraense</i>	<i>Citrina</i>	RB 149			1	1
<i>Penicillium wotroi</i>	<i>Lanata-Divaricata</i>	RB 010; RB 158	1		1	2
<i>Talaromyces brasiliensis</i> sp. nov.	<i>Trachyspermi</i>	URM 7618 T = CBS 142493; URM 7619; URM 7620	1		2	3
<i>Talaromyces calidicanus</i>	<i>Talaromyces</i>	RB 183		1		1
<i>Talaromyces mycothecae</i> sp. nov.	<i>Talaromyces</i>	URM 7622 T = CBS 142494; URM 7623; RB 95; RB 171			4	4
<i>Talaromyces pigmentosus</i> sp. nov.	<i>Helici</i>	URM 7624 T= CBS 142805; URM 7625; RB 30; RB 96; RB 100		2	3	5
<i>Talaromyces scoreus</i>	<i>Islandici</i>	RB 072; RB 114; RB 148; RB 167	3		1	4

Table 2 continued

Species	Section	Isolate numbers	Honey	Pollen	Nests	Total
<i>Talaromyces wortmanii</i>	<i>Islandici</i>	RB 130			1	1
Total			23	11	66	100

T ex-type strain, URM URM Culture Collection (www.ufpe.br/micoteca), Brazil, *RB* personal working collection of Renan Barbosa, *CBS* culture collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, The Netherlands

elsewhere. Three new *Penicillium* species belong to section *Sclerotiora* and one to section *Gracilentia*; the three new *Talaromyces* are classified in sections *Helici*, *Talaromyces* and *Trachyspermi*. An overview of the species isolated during this study is given in Table 2. The highest *Penicillium* and *Talaromyces* occurrence frequency was observed in the samples collected from the inside of nests (66%). The majority of the isolated *Penicillium* species belonged to sections *Sclerotiora* (46%) and *Citrina* (30%). *Penicillium brocae* was most frequently isolated (22%), followed by *Penicillium citrinum* (16%), *Penicillium rubens* (6%) and *Penicillium mellis* sp. nov. (6%).

Phylogeny

The phylogenetic relationship of the new *Penicillium* and *Talaromyces* species with accepted species was determined by analysis of single and concatenated sequence datasets of three or four loci (ITS, *BenA*, *CaM* and/or *RPB2*). An overview of the length of each dataset and the most optimal substitution model is given Table 3. The multigene phylograms are shown in the manuscript and the single gene trees in Supplementary data.

Penicillium section *Gracilentia*

Section *Gracilentia* contains four species, *P. angustiporcatum*, *P. estinogenum*, *P. gracilentum* and *P. macrosclerotiorum*. *Penicillium apimei* sp. nov. is in all phylogenies, with high statistical support (> 0.95 pp, > 70% bs), related to *P. macrosclerotiorum* (Fig. 1). ITS, *BenA* and *CaM* sequences can distinguish all species in this section.

Penicillium section *Lanata-Divaricata*

Isolates URM 7599, RB 217 and RB 218 cluster together in all phylograms, and always close to *P. echinulonalgiovense* CBS 328.59. The *BenA* phylogeny shows that these three isolates and *P. echinulonalgiovense* CBS 328.59 are related with full support to *P. cataractum* DAOMC 250534. The *CaM*, ITS, *RPB2* and combined phylogenies could not resolve the phylogenetic relationship of these isolates (Fig. 2, Suppl. Figures 2, 3).

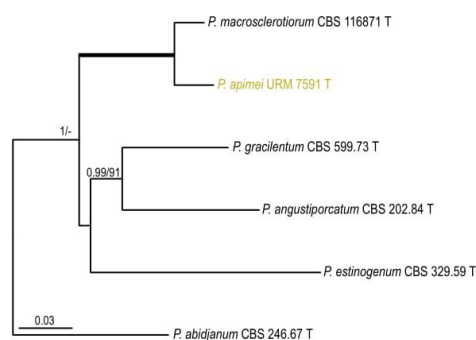
Penicillium section *Sclerotiora*

Isolate URM 7602^T (*Penicillium meliponae* sp. nov.) resides in a well-supported clade with *P. maximae* NRRL 2060^T and *P. austrosinicum* HMAS 248734^T (ITS: 0.99 pp, 99% bs; *BenA*: 1.00 pp, 100% bs; *CaM*: 1.00 pp, 93% bs). *Penicillium fernandesiae* sp. nov. (URM 7600^T) clusters with *P. hirayamae* CBS 229.60^T in our ITS (< 0.95 pp, 91% bs) phylogram. Analysis of the *BenA*, ITS and combined dataset shows that this species belongs to a large clade containing e.g. *P. sclerotiorum*, *P. maximae* and *P. hirayamae*, the so-called *P. sclerotiorum*-clade. Isolates URM 7605^T, URM 7611, RB 9, RB 69, RB 85 and RB 110 resolved in all analyses in a single, distinct, well-supported branch and are described here as *P. mellis* sp. nov. Analysis of *BenA* and ITS sequences could not resolve the phylogenetic position of *P. mellis* sp. nov. in section *Sclerotiora*. This species has, in the *CaM* phylogram, a basal position to a clade containing e.g. *P. bilaiae*, *P. brocae* and *P. admetzioides*. *Penicillium mellis* sp. nov. takes a basal position to *P. bilaiae* and related species in the phylogeny based on a combined dataset of ITS, *BenA* and *CaM* sequences (Fig. 3). This relationship is

Table 3 Sequence data sets and models used in the phylogenetic analyses

Section	ITS (bp)	Substitution model	<i>BenA</i> (bp)	Substitution model	<i>CaM</i> (bp)	Substitution model	<i>RPB2</i> (bp)	Substitution model
<i>Penicillium</i> sect. <i>Gracilentia</i>	493	TrN+G	444	GTR+G	570	K80+G	895	TrN+G
<i>Penicillium</i> sect. <i>Lanata-Divariata</i>	500	GTR+G	443	GTR+G	499	GTR+G	755	GTR+G
<i>Penicillium</i> sect. <i>Sclerotiora</i>	536	GTR+G	406	GTR+G	456	TrN+G	n/a	n/a
<i>Talaromyces</i> sect. <i>Helici</i>	464	HKY+G	432	HKY+G	564	TrN+G	852	TrN+G
<i>Talaromyces</i> sect. <i>Talaromyces</i>	459	TrN+G	397	HKY+G	515	TrN+G	706	HKY+G
<i>Talaromyces</i> sect. <i>Trachyspermi</i>	472	GTR+G	394	TrN+G	515	K80+G	517	GTR+G

n/a not available

**Fig. 1** Phylogeny based on the combined ITS, *BenA*, *CaM* and *RPB2* data set for species classified in *Penicillium* section *Gracilentia*. *Penicillium abidjanum* CBS 246.67 was chosen as outgroup

supported with a high posterior probability value (0.99), but a low bootstrap percentage (< 70%). A limited number of *RPB2* sequences are available for section *Sclerotiora* and therefore no phylogenetic analysis was performed for this locus.

Talaromyces section *Helici*

Nine species are currently accepted in section *Helici*. The combined phylogenetic analysis (Fig. 4) revealed the presence of two well supported clades. One clade contained the species *T. reverso-olivaceus*, *T. helicus*, *T. georgiensis*, *T. boninensis* and *T. varians* (clade 1) and the other *T. aerugineus*, *T. diversiformis*, *T. bohemicus*

and *T. cinnabarinus* (clade 2). Five strains isolated during this study clustered together in all (single gene) phylogenies and are here described as a new species named *Talaromyces pigmentosus*. *Talaromyces pigmentosus* sp. nov. clusters in clade 1 with *T. reverso-olivaceus*, *T. helicus*, *T. boninensis* and *T. varians*. The combined analysis showed, with high statistical support, that the *T. pigmentosus* sp. nov. isolates have a basal position to these clade 1 members (Fig. 4).

Talaromyces section *Talaromyces*

The phylogenetic relationship of *T. mycothecae* sp. nov. is difficult to determine based on the single gene phylogenies (Suppl. Figures 7, 8). In the *BenA* analysis, the species is close to *T. neofusisporus*, *T. amestolkiae*, *T. ruber*, *T. stollii* (0.99 pp, < 70% bs) and the species is in the *CaM* and *RPB2* phylogenies close to *T. ruber*, *T. amestolkiae* and *T. stollii*, though with poor or no support (*CaM* < 0.95 pp, < 70% bs; *RPB2* 1.00 pp, < 70% bs). The phylogenetic relationship based on the BI analysis of the combined dataset indicated a relationship with *T. neofusisporus*, *T. amestolkiae*, *T. ruber* and *T. stollii* (1.00 pp); however, no statistical support in the ML analysis was found (< 70% bs) (Fig. 5).

Talaromyces section *Trachyspermi*

Isolates URM 7618^T, URM 7619 and URM 7620 formed a clade together in all analyses. This set of isolates is described here as a new species named

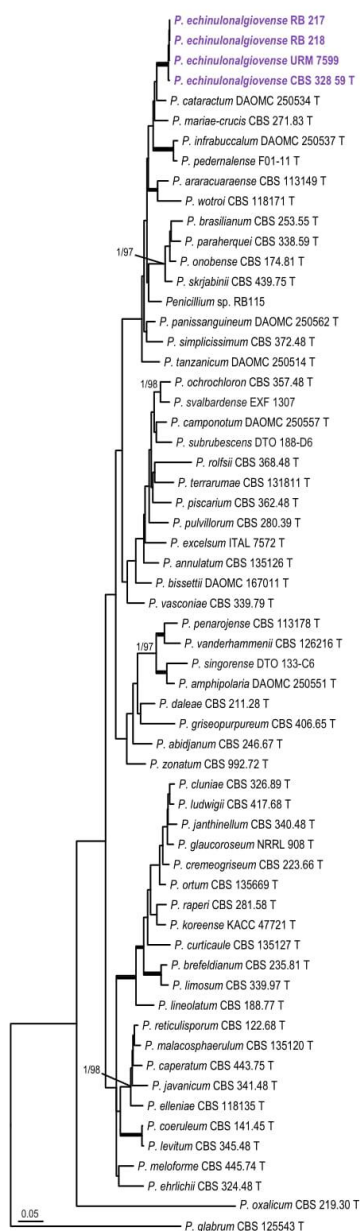


Fig. 2 Phylogeny based on the combined ITS, *BenA* and *CaM* data set for species classified in *Penicillium* section *Lanata-Divariata*. *Penicillium glabrum* CBS 125543 was chosen as outgroup

T. brasiliensis. The phylogenetic relationship of this species with other members of this section is unknown. The analysis of the combined dataset indicates that this species is basal to *T. assistuensis*, *T. atroseus*, *T. minioluteus*, *T. systylus*, *T. trachyspermus*, *T. ucrainicus* and *T. udagawae*, but statistical support is lacking (< 0.95 pp, $< 70\%$ bs) (Fig. 6).

Extrolites

The majority of investigated *Penicillium* and *Talaromyces* species were producers of different kinds of extrolites. An overview of results is given in Table 4. *Penicillium apimeii* sp. nov. produced spinulosin, four members of the geodin biosynthetic family (asteric acid, erdin, geodin, sulochrins) and an uncharacterized compound belonging to “biosynthetic family G”. The new species in section *Sclerotiora* produced sclerotiorins, patulodin (or similar) and kojic acid. Our fresh isolate of *P. echinulonalgiovense* (sect. *Lanata-Divariata*) produced xanthoepocin and andrastin A. *Talaromyces mycothecae* produced duclauxin, a compound with a rubropunctatin chromophore and various extrolites also produced by other members of section *Talaromyces*. The new species *T. pigmentosus* (sect. *Helici*) and *T. brasiliensis* (sect. *Trachyspermi*) produced several uncharacterized extrolites that appear to be unique for the species.

Taxonomy

Penicillium apimeii R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken sp. nov. (Figure 7)

MycoBank: MB 822208

Etymology: *apimeii* refers to APIME, the stingless beekeeping association in Pernambuco, Brazil, which gave support for collecting samples used for this study.

Diagnosis: *Penicillium apimeii* sp. nov. belongs to section *Gracilentia* and is phylogenetically unique. The species is strictly monoverticillate, grows well on MEA and CYA at 25 °C and is able to grow 37 °C.

Type: BRAZIL: Pernambuco: Recife, from honey of *Melipona scutellaris*, April 2014, R.N. Barbosa. Holotype (slide preparation) is deposited in the URM Mycology Herbarium (Recife, Brazil): URM 90489; ex-type strains URM 7591 = CBS 142502.

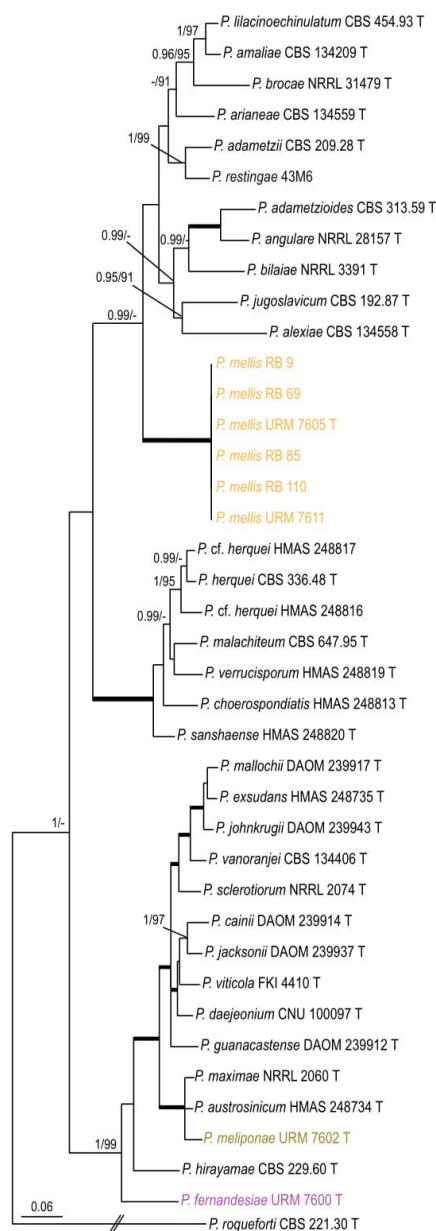


Fig. 3 Phylogeny based on the combined ITS, *BenA*, and *CaM* data set for species classified in *Penicillium* section *Sclerotiora*. *Penicillium glabrum* CBS 125543 was chosen as outgroup

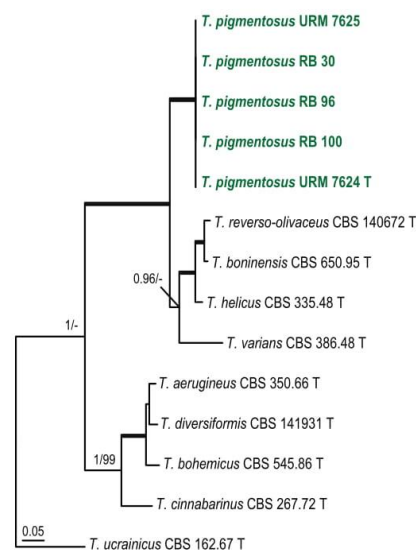


Fig. 4 Phylogeny based on the combined ITS, *BenA*, *CaM* and *RPB2* data set for species classified in *Talaromyces* section *Helici*. *Talaromyces ucrainicus* CBS 162.67 was chosen as outgroup

ITS barcode: MF278310. Alternative markers: *BenA* = LT854641; *CaM* = LT882717; *RPB2* = LT854650.

Colony diam, 7 days (in mm): CYA 29–31; CYA 15 °C 10–12; CYA 30 °C 40–41; CYA 37 °C 7–9; MEA 25–27; MEA 15 °C 14–15; MEA 30 °C 39–40; MEA 37 °C 6–8; DG18 22–23; CYAS 20–23; OA 29–30; YES 38–40; CREA 22–23.

Colony characters: CYA, 25 °C, 7 days: Colonies moderately deep, radially sulcate; margins entire, low, narrow; mycelium white; colony texture velvety; sporulation moderate; conidial colour *en masse* greyish green; exudate clear to yellowish; soluble pigment yellow amber to brownish; reverse brown. MEA, 25 °C, 7 days: Colonies plane, slightly raised at centre, radially sulcate; margins entire, low, narrow; mycelium white sometimes inconspicuously grey; colony texture velvety to floccose; sporulation moderate to strong; conidial colour *en masse* greyish green; exudate present as small clear droplets; soluble pigment absent, reverse brownish. YES, 25 °C, 7 days: Colonies moderately deep, radially and concentrically sulcate; margins low, narrow, entire;

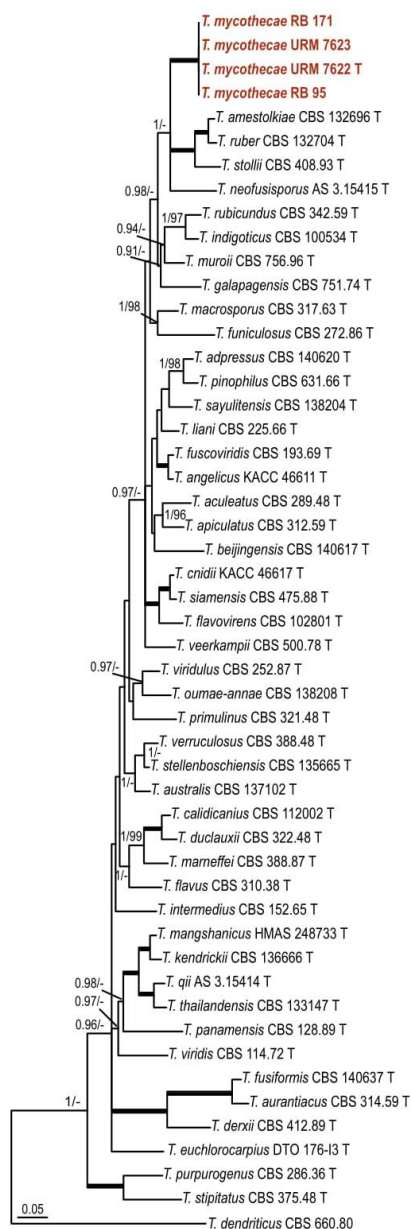


Fig. 5 Phylogeny based on the combined ITS, *BenA*, *CaM* and *RPB2* data set for species classified in *Talaromyces* section *Talaromyces*. *Talaromyces dendriticus* CBS 660.80 was chosen as outgroup

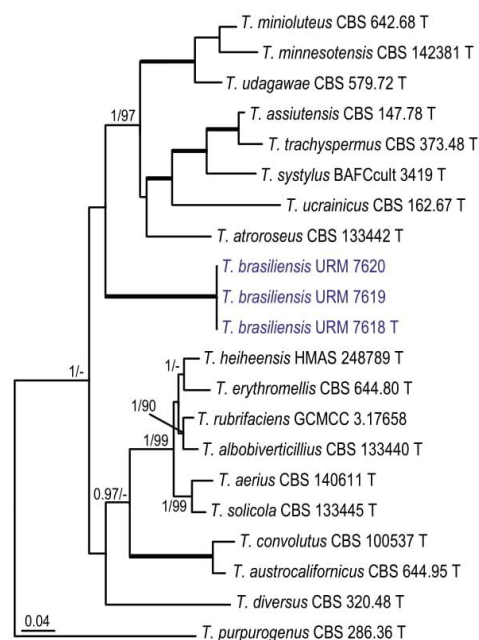


Fig. 6 Phylogeny based on the combined ITS, *BenA*, *CaM* and *RPB2* data set for species classified in *Talaromyces* section *Trachyspermi*. *Talaromyces purpurogenus* CBS 286.36 was chosen as outgroup

mycelium white to grey; colony texture velvety; sporulation moderate to strong, conidia *en masse* greyish green; exudate absent; soluble pigment yellow; reverse yellow to brownish elsewhere. DG18, 25 °C, 7 days: Colonies plane, raised at centre; margins low, entire; mycelium white; colony texture velvety; sporulation moderate; conidial colour *en masse* greyish green; exudate absent; soluble pigment absent; reverse yellow, sometimes inconspicuously greenish. OA, 25 °C, 7 days: Colonies flat, entire; margins regular; mycelium white to inconspicuously yellow; colony texture velvety; sporulation sparse; conidial colour *en masse* greyish green; exudate absent; soluble pigment yellow; reverse yellowish to cream. CYAS 25 °C, 7 days: Colonies plane, raised at centre, radially and concentrically sulcate; margins low, narrow, entire; mycelium white; colony texture velvety; sporulation sparse, conidial colour *en masse* greyish; exudate absent; soluble pigment brownish; reverse

Table 4 Extrolites detected in the investigated *Penicillium* and *Talaromyces* species

Species	Strain examined	Extrolites
<i>Penicillium apimei</i>	URM 7591 T = CBS 142502	Asterric acid, (–)-bisdechlorogeodin, erdin, geodin, spinulosin X, sulochrin
<i>Penicillium brocae</i>	RB 075; RB 125	Brocaenol, pyranonigrin F, spinulosin X
<i>Penicillium chermesinum</i>	RB 144	Extrolites with end-absorbtion
<i>Penicillium citreosulfuratum</i>	RB 094	Citroviridin; pyrenocins
<i>Penicillium citrinum</i>	RB 028; RB 059	Citrinin; quinolactacin; citrinadin
<i>Penicillium echinulonalgiovense</i>	RB 201	Andrastin A, xanthoepocin
<i>Penicillium fernandesiae</i>	URM 7600 T = CBS 142500	Rotiorin, sclerotiorin and other members of the sclerotiorin biosynthetic family
<i>Penicillium mallochii</i>	RB 151; RB 152	Atlantinone A
<i>Penicillium meliponae</i>	URM 7602 T = CBS 142495	Rotiorin, sclerotiorin and other members of the sclerotiorin biosynthetic family
<i>Penicillium mellis</i>	URM 7605 T = CBS 142499; URM 7611	Kojic acid; Kojic acid and sclerotiorin
<i>Penicillium fellutanum</i>	RB 112; RB 113	Many extrolites with end absorbtion
<i>Penicillium paxilli</i>	RB 127; RB 128	Pyrenocine; paxillin; paspaline; paspalinine
<i>Penicillium</i> sp.	RB 115	Atlantinone A, fumitremorgin A, B & C, verruculogen
<i>Penicillium rubens</i>	RB 014; RB 153	Andrastin A; glandicolins; roquefortine C; meleagrin; chrysogine, meleagrin, roquefortine C, sorbicillins
<i>Penicillium sanshaense</i>	URM 7617 T = CBS 142496	Atrovenetin, emodin, an emodin bisanthron, naphthalic anhydride, members of the herqueinone biosynthetic family
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	RB 056; RB 237	Extrolite with orthosporin chromophore, rotiorin, sclerotiorin and other related extrolites
<i>Penicillium shearii</i>	RB 034; RB 073	Indole alkaloids; paspaline; paxillin; shearinins with an extended chromophore
<i>Penicillium singorense</i>	RB 202	Special shearinins, paspaline or paspaline-like
<i>Penicillium steckii</i>	RB 065; RB 088	Isochromantoxin; quinolactacin
<i>Penicillium sumatrense</i>	RB 149	Curvularin; daldinins
<i>Penicillium wotroi</i>	RB 010	Xanthoepocin
<i>Talaromyces brasiliensis</i>	URM 7618 T = CBS 142493; URM 7619	Many extrolites detected, none of them could be identified, and none of them have been observed in other <i>Talaromyces</i> or <i>Penicillium</i> species before.
<i>Talaromyces calidicanus</i>	RB 183	duclauxin and other members of the duclauxin biosynthetic family
<i>Talaromyces mycothecae</i>	URM 7622 T = CBS 142494; URM 7623	Duclauxin and other duclauxins, compound with a rubropunctatin chromophore, many further extrolites detected, none of them could be identified, and none of them have observed in other <i>Talaromyces</i> or <i>Penicillium</i> species before.
<i>Talaromyces pigmentosus</i>	URM 7624 T = CBS 142805; URM 7625	Many extrolites detected, none of them could be identified, and none of them have been observed in other <i>Talaromyces</i> or <i>Penicillium</i> species before.
<i>Talaromyces scorteus</i>	RB 072; RB 114	Rugulosin and skyrin detected in, several unknown extrolites
<i>Talaromyces wortmannii</i>	RB 130	Rugulovasine A; rugulosin; skyrin; ukulactones

T ex-type strain, URM URM Culture Collection (www.ufpe.br/micoteca), Brazil, RB personal working collection of Renan Barbosa, CBS culture collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, The Netherlands

brown. CREA, 25 °C, 7 days: good growth, acid production absent.

Micromorphology: Conidiophores strictly monoverticillate. Stipes smooth walled, 25–90 × 1–4.5 µm, vesiculate, up to 4 µm in diam. Phialides 4–10 per stipe, ampulliform, 6.5–9.5 × 2.0–3.0 µm. Conidia smooth walled, globose, 2.0–3.0 × 2.0–3.0 µm. Sclerotia or ascomata not observed.

Notes: Houbraken and Samson (2011) did not report any significant similarities shared between species belonging to section *Gracilentia*, except that all species weren't able to grow at 37 °C and had brown reverses on Czapek agar or CYA. The reverse colony colour of *P. apimei* on CYA and YES is also in shades of brown, but the species is unique in for its ability to grow at 37 °C. This species is phylogenetically most closely related to *P. macrosclerotium*. Besides its ability to grow at 37 °C, it can further be differentiated from this species by the absence of sclerotia and slower growth on YES (38–40 vs 54–56 mm).

Penicillium echinulonalgioense S. Abe ex Houbraken & R.N. Barbosa sp. nov.

MycoBank: MB822213

= *Penicillium echinulonalgioense* S. Abe, Journal of General and Applied Microbiology 2: 80. 1956. [MB536546]. (nom. inval., Art. 39.1.).

Diagnosis: *Penicillium echinulonalgioense* sp. nov. is phylogenetically unique. Colonies on CYA incubated at 25 °C for 7 days attain a diameter of 33–37 mm and on CYA 37 °C 8–12 mm. The growth on CREA is weak, the colony diameter 23–27 mm, and no acid compounds are produced. The conidiophore stipes are rough walled, and conidia are globose to subglobose and echinulate.

Type: JAPAN: unrecorded source, S. Abe. Holotype: CBS H-23172; ex-type strains CBS 328.59 = ATCC 18314 = FAT 907 = FRR 638 = IFO 6229 = IMI 068213 = QM 7301.

ITS barcode: GU981587. Alternative markers: *BenA* = GU981631; *CaM* = KX961269; *RPB2* = KX961301.

Additional material examined. Australia, Atherton Tableland, Queensland, soil, R. van Leeuwen & J. Houbraken, DTO 030-D8; China, Hong Kong, soil, isol. by W. Gams & A. Aptroot, CBS 102417; Indonesia, Yogyakarta, storage room, DTO 232-C6; Netherlands, industrial installation, J. Houbraken,

CBS 115322; Madagascar, Ifaty, forest soil, coll. F. Hagen, isol. J. Houbraken, DTO 088-A2; Malaysia, Langkawi, soil of rainforest, coll. R.A. Samson, isol. J. Houbraken, DTO 054-A1; USA, Florida, soil from citrus grove, R.A. Samson, DTO 010-A5. Brazil, Bee pollen of *Melipona scutellaris* URM 7599; inside of nests of *Melipona scutellaris* RB 217; RB 218 coll. R.N. Barbosa.

Notes: *Penicillium echinulonalgioense* was described without a Latin diagnosis. To validate the species, an English diagnosis is given above, with the name of the original author maintained. The ITS and partial *BenA* and *CaM* sequence data had sufficient discriminatory power to differentiate *P. echinulonalgioense* (CBS 328.59^T) from *P. simplicissimum* and other described species in section *Lanata-Divariata*. In the *BenA* analysis (Suppl. Figure 2), *P. echinulonalgioense* is related to *P. cataractum* DAOMC 250534^T and *P. mariae-crucis* (CBS 271.83^T). *Penicillium echinulonalgioense* can be differentiated from those species by its ability to grow on CYA incubated at 37 °C (8–12 mm). Furthermore, *P. cataractum* grows moderately well on CREA and produces high levels of acid compounds on this medium. Both *P. echinulonalgioense* and *P. mariae-crucis* grow poorly on CREA and do not produce acid compounds. In addition, the reverse colours on CYA differ. The reverse colour of *P. echinulonalgioense* on CYA is dark brown in the centre and beige towards the margins, the reverse colour of *P. mariae-crucis* is blackish brown and those of *P. cataractum* greyish yellow to greyish orange (Visagie et al. 2016).

Penicillium fernandesiae R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken sp. nov. (Figure 8)

MycoBank: MB822209

Etymology: Named in honour of prof. Maria José Fernandes, mycologist working with *Aspergillus* and *Penicillium* in the former Institute of Mycology of the University of Recife (IMUR), Pernambuco, Brazil.

Diagnosis: Red soluble pigments produced on CYA, no growth on MEA and CYA at 37 °C, restricted growth on CYA, MEA, YES, CYAS and no acid production on CREA.

Type: BRAZIL: Pernambuco: Recife, inside nests of *Melipona scutellaris*, May 2014, R.N. Barbosa. Holotype (slide preparation) is deposited in the

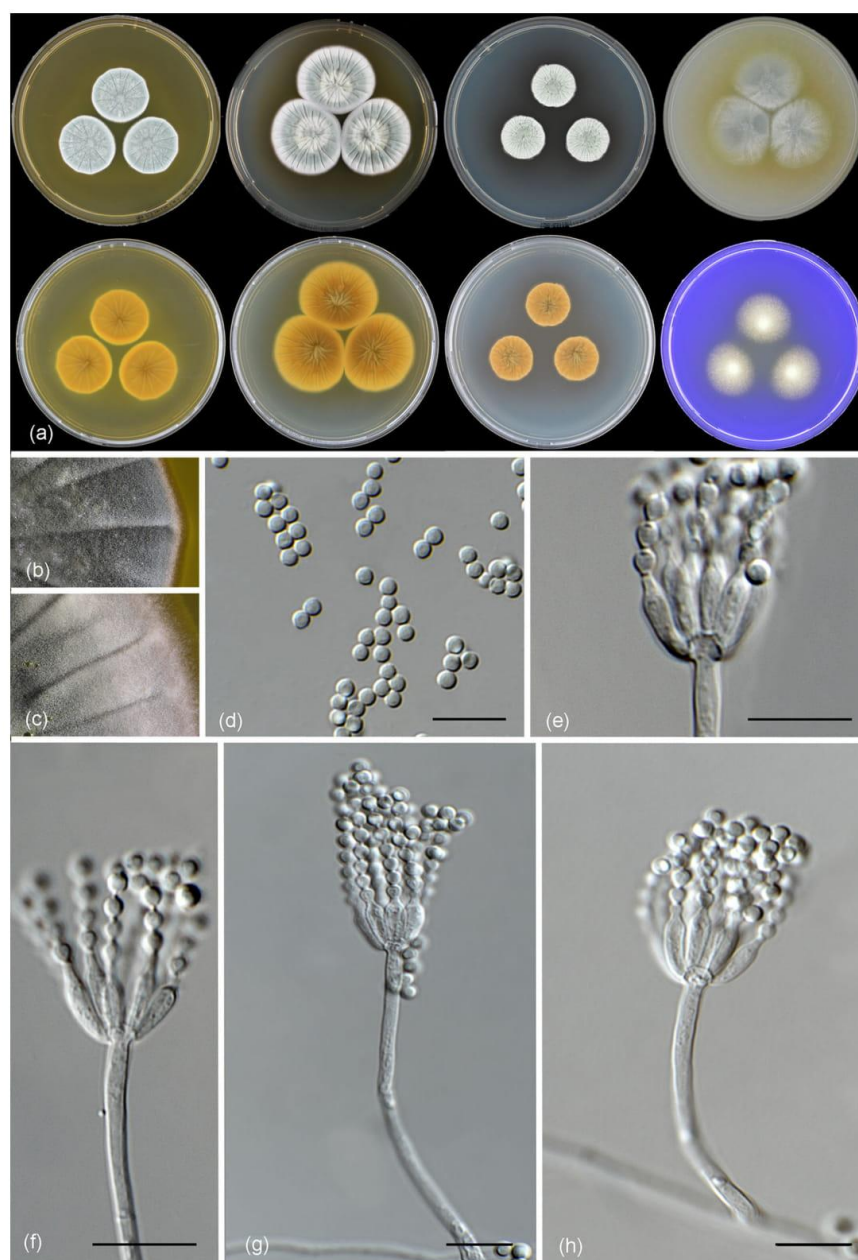


Fig. 7 Morphological characters of *Penicillium apimei* CBS 142502. **a** Colonies from left to right (top row) MEA, CYA, YES and OA; (bottom row) CYA reverse, MEA reverse, YES reverse and CREA. **b** Texture on CYA. **c** Texture on MEA. **d** Conidia. **e–h** Conidiophores. Scale bars 10 μ m

URM Mycology Herbarium (Recife, Brazil): URM 90490; ex-type strains URM 7600 = CBS 142500.

ITS barcode: MF278314. Alternative markers: *BenA* = LT854645; *CaM* = LT854649; *RPB2* = LT854654.

Colony diam, 7 days (in mm): CYA 15–18; CYA15 °C 5–6; CYA30 °C 20–22; CYA37 °C no growth; MEA 15–17; MEA 15 °C 4–5; MEA 30 °C 20–22; MEA 37 °C no growth; DG18 17–18; CYAS 15–17; OA 6–8; YES 21–22; CREA 3–4.

Colony characters: CYA, 25 °C, 7 days: Colonies moderately deep, gently radially sulcate; margins low, undulate, entire; mycelium yellow; colony texture velvety to floccose; sporulation absent; conidial colour *en masse* indeterminable; exudate orange; soluble pigment in shades of red; reverse orange to brownish at centre. MEA, 25 °C, 7 days: Colonies convex; margins low, narrow, entire; mycelium white, sometimes inconspicuously yellow; colony texture floccose; sporulation absent; conidial colour *en masse* indeterminable; exudate clear at centre and sometimes orange close the margins; soluble pigment absent; reverse orange. YES, 25 °C, 7 days: Colonies moderately deep, radially and concentrically sulcate; margins low, narrow, entire; mycelium white to slightly inconspicuously yellow; colony texture floccose; sporulation absent; conidial colour *en masse* indeterminable; exudate orange; soluble pigment absent; reverse brownish to orange. DG18, 25 °C, 7 days: Colonies moderately deep, gently radially sulcate; margins low, narrow, entire; mycelium yellow, texture velvety to floccose; sporulation absent; conidial colour *en masse* indeterminable; exudate orange; soluble pigment absent; reverse orange. OA, 25 °C, 7 days: Colonies flat, margins irregular; mycelium yellow; sporulation absent, conidial colour *en masse* indeterminable; exudate clear orange; soluble pigment absent; reverse orange. CYAS 25 °C, 7 days: Colonies moderately deep, radially and concentrically sulcate; margins low, narrow, entire; mycelium white; colony texture floccose; sporulation absent; conidial colour *en masse* indeterminable; exudate orange; soluble pigment absent; reverse brownish orange. CREA, 25 °C, 7 days: Very weak growth, acid production absent.

Micromorphology: Conidiophores strictly monoverticillate. Stipes smooth walled, 7.5–20 × 1.5–2.0 µm, non-vesiculate. Phialides 4–7 per stipe, ampulliform, 6–11 × 2.0–3.0 µm. Conidia smooth

walled, globose, 2–3 µm. Sclerotia or ascomata not observed.

Notes: *Penicillium fernandesiae* sp. nov. belongs to the *P. sclerotiorum*-clade. The species produces sclerotiorins and these compounds are shared with *P. hirayamae*, *P. meliponae* and *P. sclerotiorum* and other species in the *P. sclerotiorum*-clade, which is in line with its phylogenetic placement. *Penicillium fernandesiae* produces red soluble pigments on CYA and these are not produced by the closely related species *P. hirayamae*. Red soluble pigment production is shared with *P. adametzoides*, a phylogenetically distant species (Visagie et al. 2013).

Penicillium meliponae R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken sp. nov. (Figure 9)

Mycobank: MB822210

Etymology: *meliponae*, refers to *Melipona scutellaris*, the stingless bee species investigated in this study.

Diagnosis: *Penicillium meliponae* sp. nov. have colony diameter on CYA, MEA, DG18, CYAS and CREA generally below to 32 mm. The species grows moderately well on CREA and has a strong acid production.

Type: BRAZIL: Pernambuco: Recife, honey of *Melipona scutellaris*, June 2014, R.N. Barbosa. Holotype (slide preparation) is deposited in the URM Mycology Herbarium (Recife, Brazil): URM 90491; ex-type strains URM 7602 = CBS 142495.

ITS barcode: MF278315. Alternative markers: *BenA* = LT854644; *CaM* = LT854648; *RPB2* = LT854653.

Colony diam, 7 days (in mm): CYA 30–32; CYA15 °C 15–16; CYA30 °C 25–28; CYA37 °C no growth; MEA 30–31; MEA 15 °C 9–10; MEA 30 °C 24–25; MEA 37 °C no growth; DG18 25–26; CYAS 23–25; OA 26–28; YES 40–43; CREA 17–18.

Colony characters: CYA, 25 °C, 7 days: Colonies radially sulcate, slightly raised at centre; margins low, narrow, entire; mycelium white; colony texture floccose; sporulation absent at margin, strong in centre; conidial colour *en masse* greyish green; exudate orange; soluble pigment orange; reverse brown at centre, orange at the margins and yellow at the borders. MEA, 25 °C, 7 days: Colonies plane, moderately deep, lightly radially sulcate; margins entire, low, narrow, entire; mycelium white and slightly orange; colony texture floccose at centre somewhat

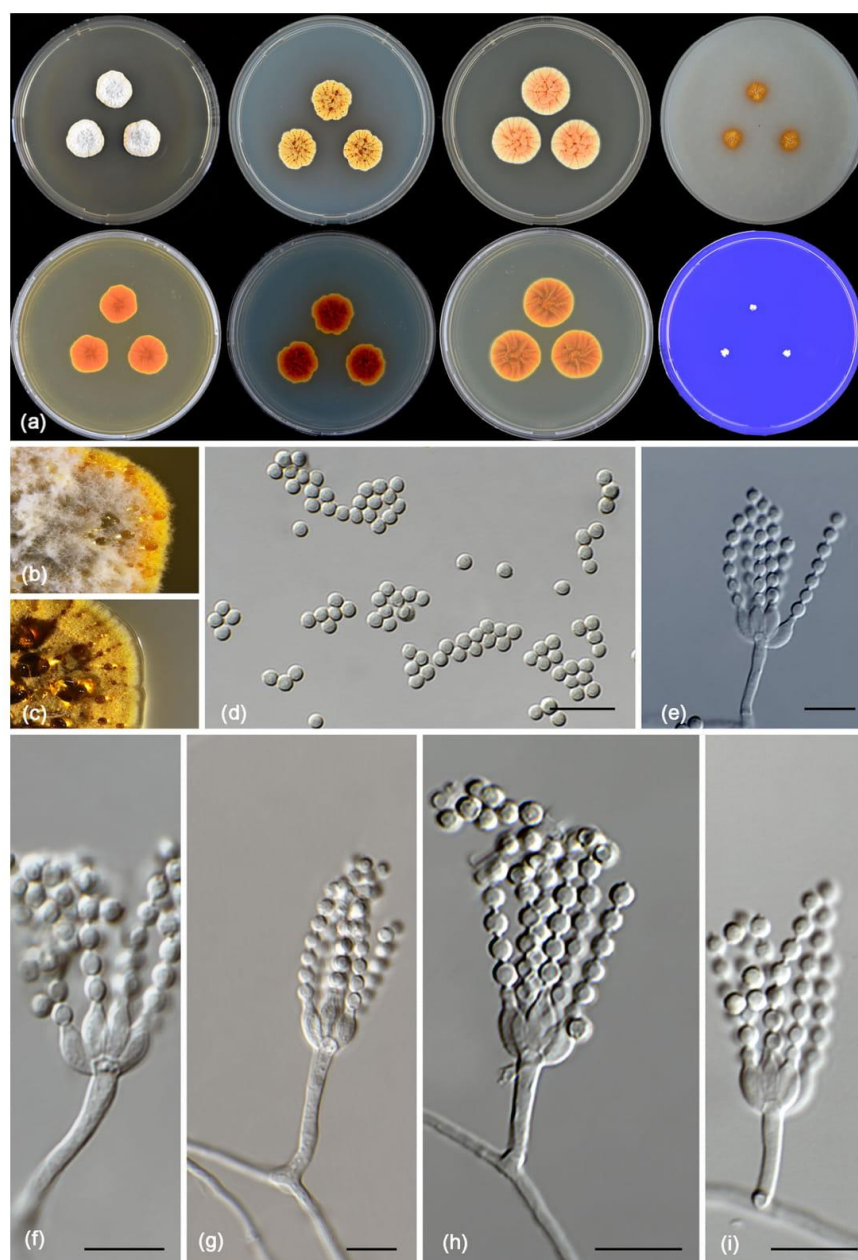


Fig. 8 Morphological characters of *Penicillium fernandesiae* CBS 142500. **a** Colonies from left to right (top row) MEA, CYA, YES and OA; (bottom row) CYA reverse, MEA reverse, YES reverse and CREA. **b** Texture on CYA. **c** Texture on MEA. **d** Conidia **e–i** Conidiophores. Scale bars 10 μ m

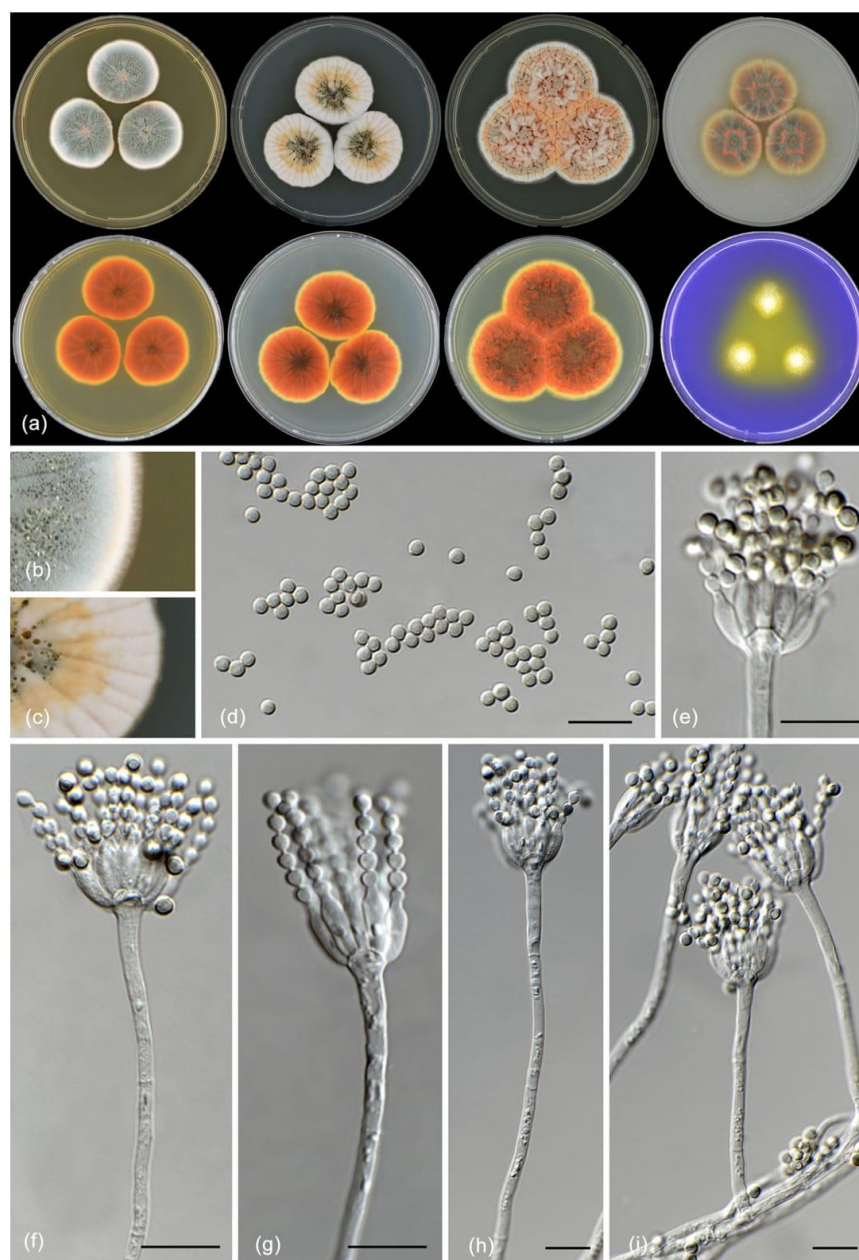


Fig. 9 Morphological characters of *Penicillium meliponae* CBS 142495. **a** Colonies from left to right (top row) MEA, CYA, YES and OA; (bottom row) CYA reverse, MEA reverse, YES reverse and CREA. **b** Texture on CYA. **c** Texture on MEA. **d** Conidia. **e–i** Conidiophores. Scale bars 10 μ m

velvety in some areas close the margins; sporulation strong in centre, weak at margins; conidial colour *en masse* greyish; exudate hyaline to pale orange; soluble pigment absent; reverse dull orange. YES, 25 °C, 7 days: Colonies moderately deep, raised at centre, randomly sulcate; margins low, narrow, entire; mycelium white, sometimes inconspicuously orange; colony texture floccose; sporulation sparse; conidial colour *en masse* greyish in some areas; exudate orange; soluble pigment absent; reverse reddish brown at centre fading to orange close to margin and yellow in the borders. DG18, 25 °C, 7 days: Colonies moderately deep, lightly sulcate; margins entire; mycelium white; colony texture floccose to velvety; sporulation sparse; conidial colour *en masse* indeterminate; exudate orange; soluble pigment absent; reverse orange at centre to yellow in the margins. OA, 25 °C, 7 days: Colonies plane, not sulcate; margins entire; mycelium yellow, sometimes white; colony texture velvety, sporulation sparse, conidial colour somewhat greyish, exudate orange, in small droplets; soluble pigment absent; reverse orange at centre to yellow at the margins. CYAS, 25 °C, 7 days: Colonies slightly raised, radially and concentrically sulcate; margins low, narrow, entire; mycelium white; colony texture floccose; sporulation absent to moderate at centre; conidial colour *en masse* greyish; exudate orange, soluble pigment absent; reverse reddish brown at centre fading to orange close to margin and yellow at the borders. CREA, 25 °C, 7 days: Moderate growth; acid produced.

Micromorphology: Conidiophores strictly monoverticillate. Stipes smooth walled 22.0–45 × 2.5–3.5 µm, vesiculate 4.0–6.5 µm. Phialides 4–12 per stipe, ampulliform, 6.0–9.0 × 2.5–4.0 µm. Conidia smooth walled, subglobose, 2.0–3.0 µm. Sclerotia not observed produced.

Notes: *Penicillium meliponae* sp. nov. is phylogenetically most closely related to *P. maximae* and *P. austrosinicum*. *Penicillium meliponae* sp. nov. produces smaller colonies on CYA, MEA, CYAS and CREA after 7 days incubation at 25 °C than *P. austrosinicum* and *P. maximae*. Furthermore, *P. meliponae* sp. nov. has a strong acid production on CREA, while *P. maximae* lacks acid production on CREA (Visagie et al. 2013). *Penicillium austrosinicum* produces subglobose, rough walled conidia, the conidia of *P. meliponae* sp. nov. are subglobose and smooth and those of *P. maximae* are

ellipsoidal and smooth. Additionally, *P. meliponae* sp. nov. and *P. maximae* do not produce sclerotia, while *P. austrosinicum* does (Wang et al. 2017a).

Penicillium mellis R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houben sp. nov. (Figure 10)

Mycobank: MB822211

Etymology: the species name refers to honey, the substrate from which the type species was isolated.

Diagnosis: This species is phylogenetically distinct from other sect. *Sclerotiora* members. The conidiophores are monoverticillate, stipes vesiculate, pale to brownish coloured sclerotia are produced and no acid production on CREA is observed.

Type: BRAZIL: Pernambuco: Recife, honey of *Melipona scutellaris*, May 2014, R.N. Barbosa. Holotype (slide preparation) is deposited in the URM Mycology Herbarium (Recife, Brazil): URM 90492; ex-type strain: URM 7605 = CBS 142499.

ITS barcode: MF278316. Alternative markers: *BenA* = LT854643; *CaM* = LT854647; *RPB2* = LT854652.

Colony diam, 7 days (in mm): CYA 29–30; CYA15 °C 7–8; CYA30 °C 33–35; CYA37 °C 2–4; MEA 28–30; MEA 15 °C 9–10; MEA 30 °C 33–35; MEA 37 °C no growth; DG18 24–25; CYAS 26–27; OA 24–25; YES 34–36; CREA 10–11.

Colony characters: CYA, 25 °C, 7 days: Colony radially sulcate; margin entire, low; mycelium white sometimes inconspicuously green; colony texture velvety; sporulation absent at centre and sparse at margins; conidial colour *en masse* greyish green; exudates present as clear droplets; soluble pigment absent; reverse brown to pale. MEA, 25 °C, 7 days: Colonies low, plane; margins low, wide, entire; mycelium white; colony texture velvety; sporulation sparse, conidial colour *en masse* greyish green; sclerotia produced, inconspicuously brown, exudate present as clear droplets; soluble pigment absent; reverse cream. YES, 25 °C, 7 days: Colonies moderately deep, radially and concentrically sulcate; margins low, narrow, entire; mycelium white, inconspicuously grey; colony texture velvety; sporulation sparse to absent, conidial colour *en masse* indeterminate; exudate absent; soluble pigment absent; reverse pale yellow. DG18, 25 °C, 7 days: Colonies plane; margins low, entire; mycelium white; colony texture velvety; sporulation strong; conidial colour *en masse* greyish green; exudate absent; soluble

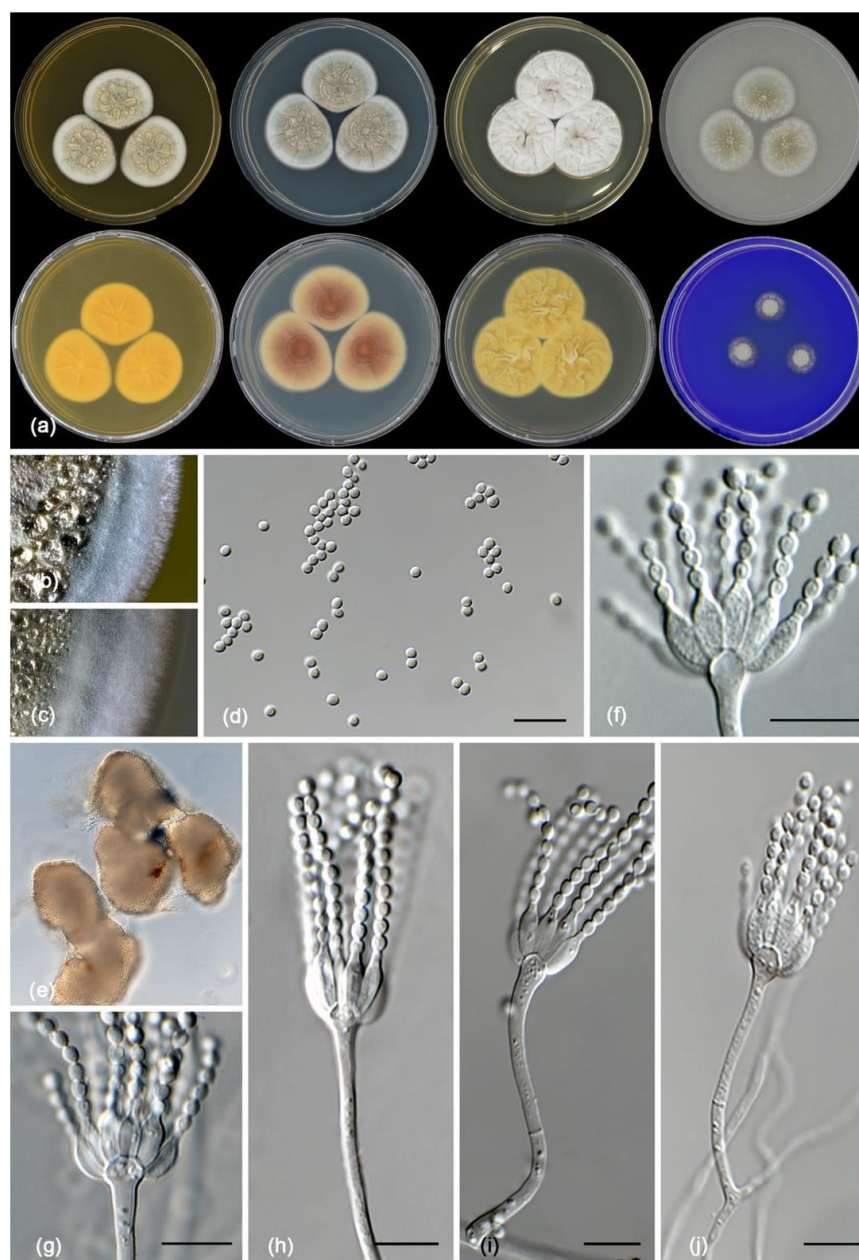


Fig. 10 Morphological characters of *Penicillium mellis* CBS 142499. **a** Colonies from left to right (top row) MEA, CYA, YES and OA; (bottom row) CYA reverse, MEA reverse, YES reverse and CREA. **b** Texture on CYA. **c** Texture on MEA. **d** Conidia. **e** Sclerotia. **f–j** Conidiophores. Scale bars 10 μ m

pigment absent; reverse pale. OA, 25 °C, 7 days: Colonies flat, margins regular; mycelium white; colony texture velvety, sporulation dense, conidial colour *en masse* greyish; exudate present as clear droplets; soluble pigment absent; reverse white to pale. CYAS 25 °C, 7 days: Colonies radially and concentrically sulcate; margins low, entire; mycelium white; colony texture velvety; sporulation moderate to strong; conidial colour *en masse* greyish green; exudate absent; soluble pigment absent; reverse brownish. CREA, 25 °C, 7 days: moderate growth, no acid production.

Micromorphology: Conidiophores strictly monoverticillate. Stipes smooth walled, 25–40 × 2.0–3.5 µm, vesiculate 4.0–5.0 µm. Phialides 5–12 per stipe, ampulliform, 6.5–9.0 × 2.0–3.0 µm. Conidia smooth walled, globose to subglobose, 2.0–3.0 µm. Sclerotia present, 150–250 µm.

Additional material examined. Brazil, Pernambuco, Recife, Inside nest of *Melipona scutellaris*, R.N. Barbosa, URM 7611; RB 9; RB 85; RB 110; honey of *Melipona scutellaris*, R.N. Barbosa, RB 69.

Notes: *Penicillium mellis* sp. nov. is phylogenetically unique. It can be distinguished from other members in section *Sclerotiora* by its ability to produce pale to brownish coloured sclerotia on MEA, CYA and OA.

Talaromyces brasiliensis R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken sp. nov. (Figure 11)

Mycobank: MB822214

Etymology: Named after Brazil, the country of origin of the type strain.

Diagnosis: *Talaromyces brasiliensis* sp. nov. is phylogenetically unique. This species grows restricted on CYA and MEA at 25 °C and growth is absent to poor at 37 °C. The phialides of *T. brasiliensis* are ampulliform and the conidia globose and finely roughened.

Type: BRAZIL: Pernambuco: Recife, honey of *Melipona scutellaris*, June 2014, R.N. Barbosa. Holotype (slide preparation) is deposited in the URM Mycology Herbarium (Recife, Brazil): URM 90494; ex-type strains URM 7618 = CBS 142493.

ITS barcode: MF278323. Alternative markers: *BenA* = LT855560; *CaM* = LT855563; *RPB2* = LT855566.

Colony diam, 7 days (in mm): CYA 5–6; CYA15 °C 3–4; CYA30 °C 5–6; CYA37 °C no

growth; MEA 14–15; MEA 15 °C 6–7; MEA 30 °C 14–15; MEA 37 °C 4–5; DG18 10–11; CYAS no growth; OA 12–13; YES 6–8; CREA no growth.

Colony characters: CYA, 25 °C, 7 days: Colonies plane; margins entire; mycelium white; colony texture loosely floccose; sporulation poor; conidia *en masse* greyish green; exudates absent; soluble pigments absent; reverse cream to brownish. MEA, 25 °C, 7 days: Colonies plane; margins entire; mycelium white; colony texture loosely funiculose to floccose; sporulation strong; conidia *en masse* greyish; exudates absent; soluble pigments absent; reverse cream to yellow. YES, 25 °C, 7 days: Colonies loosely deep; margins entire; mycelium white; colony texture floccose; sporulation absent; conidia *en masse* indeterminate; exudates absent; soluble pigments absent; reverse cream to yellow. DG18, 25 °C, 7 days: Colonies raised at centre; margins entire, deep; mycelium white, occasionally inconspicuously grey; colony texture floccose; sporulation poor at centre, conidia *en masse* greyish; exudates absent; soluble pigments absent; reverse brown to pale. OA, 25 °C, 7 days: Colonies plane; margins entire; mycelium white, occasionally light yellow; colony texture velvety; sporulation strong at centre, weak at margin; conidia *en masse* dull green; exudates present as small hyaline droplets; soluble pigments absent; reverse white to inconspicuously black. CREA 25 °C, 7 days: no growth.

Micromorphology: Conidiophores biverticillate, stipes smooth walled, 20–50 × 2.5–4 µm. Metulae 5–6, 8–11 × 2.5–3.5 µm. Phialides 3–4 per stipe, ampulliform tapering to very fine necks, 7–11 (–14) × 2.0–3 µm; conidia globose, finely roughened, 2–3 µm. Ascomata not observed.

Additional material examined. Brazil, Pernambuco, Recife, Inside nest of *Melipona scutellaris*, R.N. Barbosa, URM 7619; URM 7620.

Notes: Section *Trachyspermi* comprise species that normally grow slowly on CYA and slightly faster on MEA. *Talaromyces brasiliensis* sp. nov. also grows restricted on CYA (5–6 mm) and better on MEA (14–15 mm), confirming the phylogenetic results. *Talaromyces brasiliensis* sp. nov. is phylogenetically distinct (Fig. 6).

Talaromyces mycothecae R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken sp. nov. (Figure 12)

Mycobank: MB822215

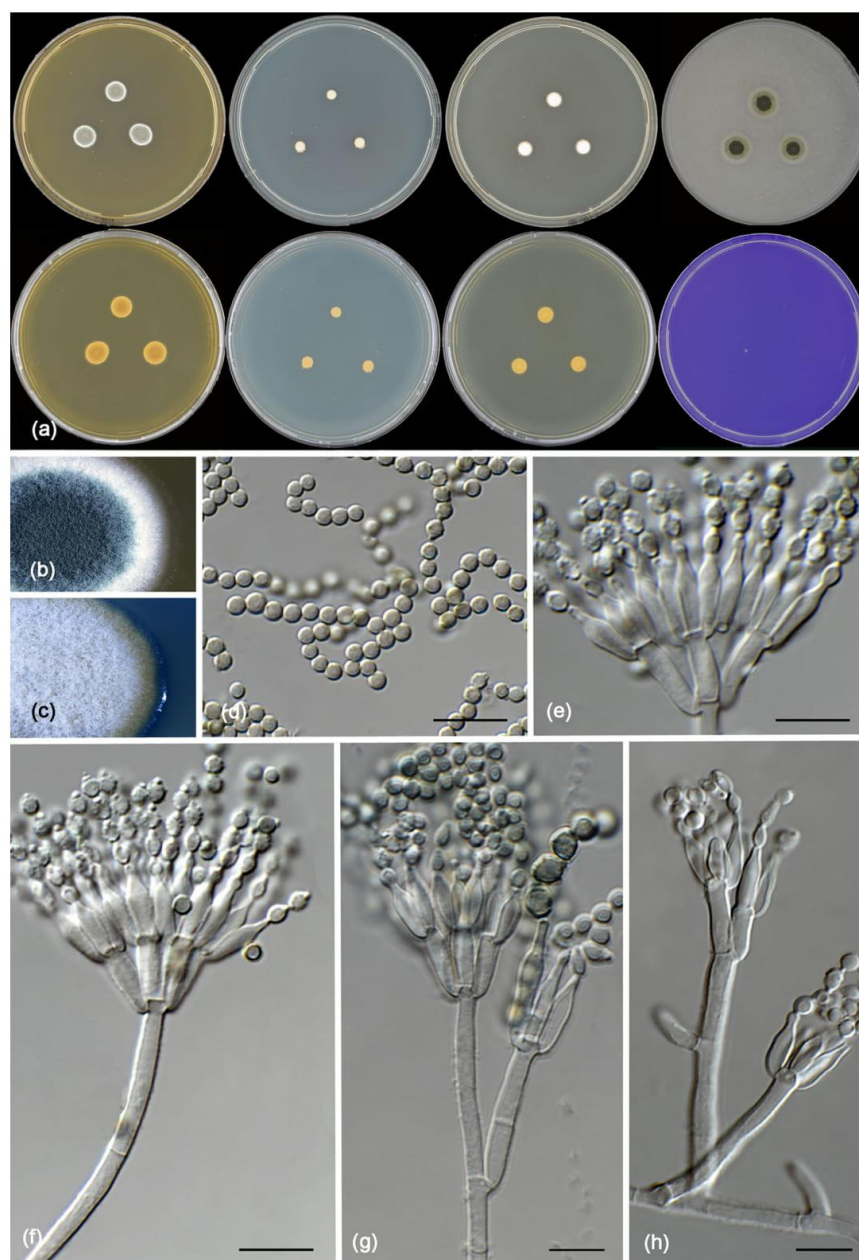


Fig. 11 Morphological characters of *Talaromyces brasiliensis* CBS 142493. **a** Colonies from left to right (top row) MEA, CYA, YES and OA; (bottom row) CYA reverse, MEA reverse, YES reverse and CREA. **b** Texture on CYA. **c** Texture on MEA. **d** Conidia. **e–h** Conidiophores. Scale bars 10 μ m

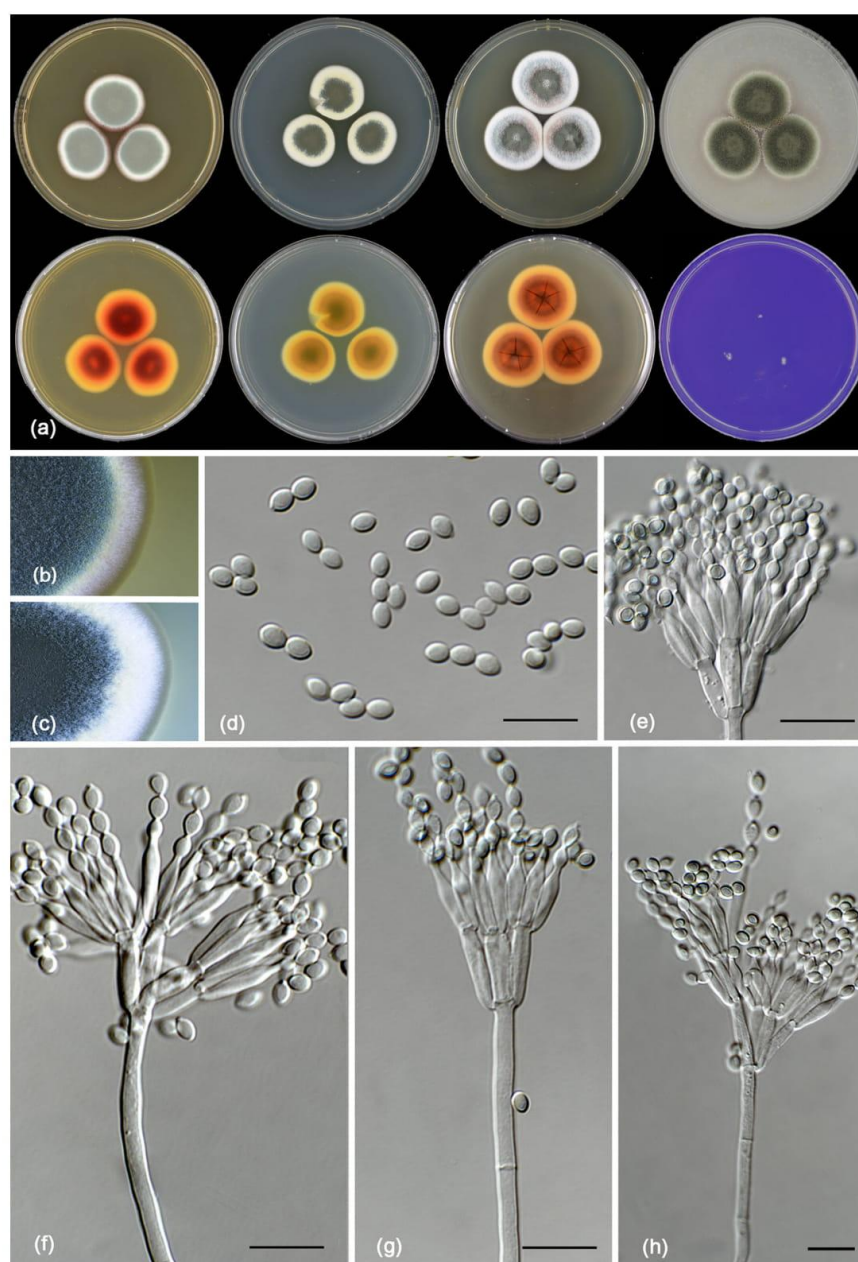


Fig. 12 Morphological characters of *Talaromyces mycothecae* CBS 142494. **a** Colonies from left to right (top row) MEA, CYA, YES and OA; (bottom row) CYA reverse, MEA reverse, YES reverse and CREA. **b** Texture on CYA. **c** Texture on MEA. **d** Conidia. **e–h** Conidiophores. Scale bars 10 μ m

Etymology: In honour of Micoteca URM (URM, University Recife Mycology), an important Latin-American Fungal Culture Collection founded by mycologist Augusto Chaves Batista.

Diagnosis: The reverse colour on MEA and OA is wine red. The species produces red coloured exudate droplets on YES and no acid compounds are produced on CREA. Furthermore, *T. mycothecae* sp. nov. grows well on CYA 37 °C and produces smooth walled, fusiform to ellipsoidal shaped conidia.

Type: BRAZIL: Pernambuco: Recife, inside nests of *Melipona scutellaris*, Feb 2014, R.N. Barbosa. Holotype (slide preparation) is deposited in the URM Mycology Herbarium (Recife, Brazil): URM 90495; ex-type strains URM 7622 = CBS 142494.

ITS barcode: MF278326. Alternative markers: *BenA* = LT855561; *CaM* = LT855564; *RPB2* = LT855567.

Colony diam, 7 days (in mm): CYA 20–23; CYA15 °C 2–5; CYA 30 °C 28–30; CYA 37 °C 18–20; MEA 29–30; MEA 15 °C 3–6; MEA 30 °C 38–40; MEA 37 °C 20–22; DG18 10–12; CYAS no growth; OA 24–25; YES 25–26; CREA 4–5.

Colony characters: CYA, 25 °C, 7 days: Colonies plane, margins entire; mycelium white occasionally inconspicuously yellow; colony texture velvety to floccose; sporulation strong, conidia *en masse* greyish to dull green; exudates present as small clear droplets; soluble pigments absent; reverse yellow amber to dark brown at centre. MEA, 25 °C, 7 days: Colonies plane; margin entire, mycelium white; colony texture velvety; sporulation strong; conidia *en masse* greyish; exudates absent; soluble pigments absent; reverse yellow amber to wine-reddish. YES, 25 °C, 7 days: Colonies crateriform; margins entire; mycelium white; colony texture floccose; sporulation strong; conidia *en masse* greyish to dull green; exudates present as small red droplets; soluble pigments absent; reverse red near margins to wine-reddish in centre. DG18, 25 °C, 7 days: Colonies plane; margins entire; mycelium white; colony texture floccose; sporulation sparse; conidia *en masse* green; exudates present as small red droplets; soluble pigments absent; reverse cream at margins to reddish at centre. OA, 25 °C, 7 days: Colonies plane; margins low; mycelium white occasionally inconspicuously greenish; colony texture velvety to granular; sporulation abundant, conidia *en masse* dull green; exudates present as small clear droplets; soluble pigments absent; reverse reddish.

CREA 25 °C, 7 days: Very weak growth, acid production absent.

Micromorphology: Conidiophores biverticillate; stipes smooth, 55–105 × 2–3 µm; metulae 3–4, 11.5–15.5 × 2.5–4 µm. Phialides 3–5 per stipe, acrose, 9.5–12.5 × 2.5–3.5 µm. Conidia smooth, fusiform to ellipsoidal, 2.5–4 × 3–3.5 µm. Ascospores not observed.

Additional material examined. Brazil, Pernambuco, Recife, isolated from inside nest of *Melipona scutellaris*, R.N. Barbosa, URM 7623; RB 95; RB 171.

Notes: Although the relationship if *Talaromyces mycothecae* sp. nov. is difficult to determine, the species seems to be phylogenetically most closely related to *T. neofusisporus*, *T. stollii*, *T. amestolkiae* and *T. ruber*. *Talaromyces neofusisporus* produces synnemata on CYA and YES, and grows poorly at 37 °C (2–3 mm, CYA, 7 days) (Wang et al. 2016). In contrast, no synnemata and good growth at 37 °C (18–20 mm, CYA, 7 days) is observed for *T. mycothecae*. Yilmaz et al. (2012) used various characters, such as the ability to grow at 37 °C, the colony texture on MEA and CYA and the production of acid compounds on CREA to differentiate *T. amestolkiae*, *T. ruber* and *T. stollii*. No acid is produced on CREA by *T. mycothecae* and this is shared with *T. ruber* (*T. amestolkiae* and *T. stollii* are poor acid producers). *Talaromyces mycothecae* sp. nov. attains a diameter of 18–20 mm after 7 days on CYA at 37 °C and this is faster than *T. amestolkiae* (8–15 mm) and *T. ruber* (14–18 mm), but slower than *T. stollii* (25–35 mm) (Yilmaz et al. 2014). Based on the data above, *T. mycothecae* phenotypically resembles *T. ruber*. The characteristic yellow and red pigmented mycelium on YES of *T. ruber* is not observed in the *T. mycothecae* sp. nov. cultures.

Talaromyces pigmentosus R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken sp. nov. (Figure 13)

MycoBank: MB822216

Etymology: Referring to the brownish green pigmented conidiophores of the species.

Diagnosis: *Talaromyces pigmentosus* sp. nov. is phylogenetically unique. This species produces pigmented conidiophores and grows well on CYA and MEA at 37 °C. No sexual state is observed and the species has a cream reverse on MEA and cream (margins) to brownish (centre) reverse on CYA.

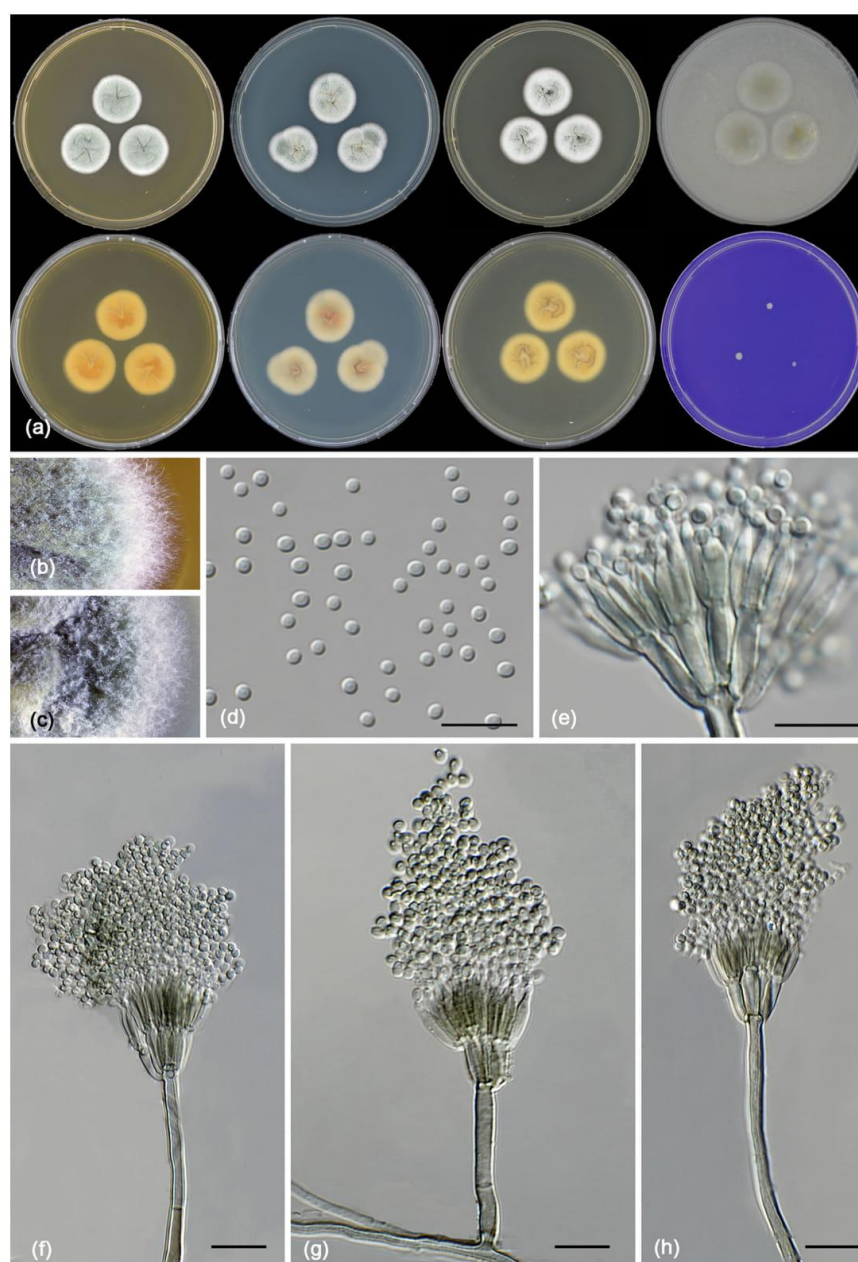


Fig. 13 Morphological characters of *Talaromyces pigmentosus* CBS 142805. **a** Colonies from left to right (top row) MEA, CYA, YES and OA; (bottom row) CYA reverse, MEA reverse, YES reverse and CREA. **b** Texture on CYA. **c** Texture on MEA. **d** Conidia. **e–h** Conidiophores. Scale bars 10 μ m

Type: BRAZIL: *Pernambuco*: Recife, inside nests of *Melipona scutellaris*, June 2014, *R.N. Barbosa*. Holotype (slide preparation) is deposited in the URM Mycology Herbarium (Recife, Brazil): URM 90496; ex-type strains URM 7624 = CBS 142805.

ITS barcode: MF278330. Alternative markers: *BenA* = LT855562; *CaM* = LT855565; *RPB2* = LT855568.

Colony diam, 7 days (in mm): CYA 23–24; CYA 15 °C 5–7; CYA 30 °C 34–35; CYA 37 °C 35–36; MEA 23–24; MEA 15 °C 6–8; MEA 30 °C 34–35; MEA 37 °C 33–34; DG18 7–9; CYAS 2–3; OA 24–25; YES 23–24; CREA 2–4.

Colony characters: CYA, 25 °C, 7 days: Colonies moderately deep; margins entire; mycelium white sometimes inconspicuously green; colony texture velvety; sporulation absent; conidial colour *en masse* cannot be determinate; exudates absent; soluble pigments absent; reverse white to cream at margins to brownish in centre. MEA, 25 °C, 7 days: Colonies moderately deep, sunken at centre; margin entire; mycelium white; colony texture velvety; sporulation sparse; conidia *en masse* greyish; exudates present as small hyaline droplets; soluble pigments absent; reverse cream. YES, 25 °C, 7 days: Colonies moderately deep, sunken, raised at centre; margins entire; mycelium white; colony texture floccose; sporulation sparse to absent, conidia *en masse* greyish; soluble pigments absent; exudates absent; reverse cream to yellow. DG18, 25 °C, 7 days: Colonies raised at centre; margins low, plane; mycelium white; colony texture floccose; sporulation absent, conidia *en masse* indeterminate; exudates absent; soluble pigments absent; reverse brown at centre, light cream to white at margin. OA, 25 °C, 7 days: Colonies low, plane; margins low, plane; mycelium white; colony texture velvety; sporulation absent; conidia *en masse* indeterminate; exudates absent; soluble pigments absent; reverse light cream. CYAS, 25 °C, 7 days: Colonies low, plane; margins low, plane; mycelium white; colony texture velvety; sporulation absent; conidia *en masse* indeterminate; exudates absent; soluble pigments absent; reverse white. CREA 25 °C, 7 days: Very weak growth, acid production absent.

Micromorphology: Conidiophores biverticillate, brownish green pigmented. Stipes smooth walled, 17–65 × 2–4 µm. Metulae 3–4, divergent, 7–11 × 2–2.5 µm. Phialides, 3–6 per stipe, acerose,

7–11 × 2–3 µm; conidia smooth walled, globose to subglobose, 2.0 × 3.0 µm. Ascomata not observed.

Additional material examined. Brazil, Pernambuco, Recife, from bee pollen of *Melipona scutellaris*, *R.N. Barbosa*, URM 7625; RB 96, RB 171; from inside nest of *Melipona scutellaris* RB 30; RB 100.

Notes: *Talaromyces pigmentosus* sp. nov. is phylogenetically closely related to *T. helicus*, *T. boninensis* and *T. reverso-olivaceus* and shares the ability to grow well on CYA incubated at 37 °C (10–34 mm, 7 days). *Talaromyces boninensis* and *T. helicus* produce a sexual state and this is not observed *T. reverso-olivaceus* and *T. pigmentosus* sp. nov.. The new species can also be differentiated from *T. reverso-olivaceus* by its ability to produce brownish green pigmented stipes. The production of pigmented stipes is also shared with the phylogenetically more distant species *T. varians* (also in sect. *Helici*) and *T. ptychoconidium* (sect. *Purpurei*) (Yilmaz et al. 2014).

Discussion

Penicillium and *Talaromyces* species are well-known cosmopolitan filamentous fungi that play various roles in natural ecosystems, agriculture and biotechnology. Both genera have a sectional infrageneric classification system. Currently, 26 sections are accepted in *Penicillium* (Houbraken and Samson 2011; Houbraken et al. 2016b) and seven in *Talaromyces* (Yilmaz et al. 2014). A current monograph on *Penicillium* is lacking, but many *Penicillium* sections are studied using a polyphasic approach or multigene phylogenies (e.g. Houbraken et al. 2014; Peterson et al. 2015; Visagie et al. 2015; Houbraken et al. 2016b) and all *Talaromyces* sections were treated in detail in the monograph of Yilmaz et al. (2014). ITS and *BenA* sequences are proposed identification markers for *Penicillium* and *Talaromyces* and often are generated in taxonomic studies. In many of those studies it is shown that ITS sequencing is insufficient for *Penicillium* identifications as closely related species often share similar or identical sequences. On the other hand, this locus works relatively well to assign species to sections. Besides ITS sequences, we also generated *BenA* sequences of all isolated *Penicillium* and *Talaromyces* species. The *BenA* sequences are used for identification of *Penicillium* and *Talaromyces* species, as this is the recommended identification

marker (Visagie et al. 2014; Yilmaz et al. 2014). With exception of the new species, all other isolates obtained during our survey could be reliably identified using *BenA* sequences.

Among the *Penicillia*, section *Sclerotiora* (46%) isolates were most frequently detected during this study. *Penicillium brocae* (27%) was predominantly present among the isolates belonging to section *Sclerotiora*, followed by *P. mellis* sp. nov. (7%), *P. sclerotiorum* (5%), *P. mallochii* (4%), *P. sanshaense* (1%), *P. fernandesiae* sp. nov. (1%) and *P. meliponae* sp. nov. (1%). Section *Sclerotiora* species generally produce monoverticillate conidiophores and exceptions are the biverticillate conidiophores observed in *P. choerospondiatis*, *P. herquei*, *P. malachiteum*, *P. sanshaense* and *P. verrucisporum*. They also have bright yellow or orange pigments, which may occur in the mycelium, sclerotia, ascocarps, soluble pigments and/or colony reverse pigmentation (Houbraken and Samson 2011; Rivera and Seifert 2011; Visagie et al. 2013). The species isolated during our survey also produced monoverticillate conidiophores, bright coloured colonies, sclerotia and/or mycelium, and none of the strains produced a sexual state. Interestingly, *P. brocae* was the most predominant *Penicillium* present in our study. This species was originally described from coffee berry borers (galleries, cuticle, feces and guts) in Mexico (Peterson et al. 2003), and more recently detected in faeces of another, unrelated beetle, *Eufallia* sp. (Wang and Chan 2015). Along with the description of *P. brocae*, Peterson et al. (2003) suggested that this species produces exogenous sterols necessary for the coffee berry borer's development and thus is mutualistically associated with the insect. Similar to other insects, bees are unable to synthesize sterols and, thus, exogenous sterol is required (Ferreira-Caliman et al. 2012). A recent study showed that essential steroid precursors, needed for the development of *Scaptotrigona depilis* bees, are provided by a *Zygosaccharomyces* species (Paludo et al. 2018). Whether a symbiosis exists between steroids produced by *Penicillium* and *Talaromyces* species and *Melipona scutellaris* bees needs to be further investigated. Also *P. mallochii* and *P. guanacastense*, two species related to *P. brocae*, are associated with guts and faeces of leaf-eating caterpillars (Rivera et al. 2012) suggesting an association of other section *Sclerotiora* members with insects as well.

Isolates belonging to section *Citrina* made up for 30% of all *Penicillia*. *Penicillium citrinum* was most frequently detected (20%), followed by *P. steckii* (5%), *P. shaerii* (4%), *P. paxilli* (2%), and *P. sumatrense* (1%). These species are characterised by symmetrically biverticillate conidiophores, flask shaped phialides, small-sized conidia, and some species like *P. shaerii* produce greyish brown cleistothecia. These species are common in soils and have a preference for (sub)tropical soils. It's unknown whether these species are saprotrophs or if they are associated with stingless bees. Section *Citrina* species produce various bioactive extrolites (mycotoxins, antibiotics) such as citrinin, curvularin, paspaline, paspalinine and paxillin (Houbraken et al. 2011a). The presence of these extrolites in honey and pollen samples wasn't subject of this study; however, if present, they can affect the quality of the honey and pollen. How insects cope with mycotoxins has rarely been investigated (Gliński and Jarosz 2000; Traniello et al. 2001; Keller et al. 2014).

Another group of isolates obtained in this study belong to *Lanata-Divaricata*, a section re-established by Houbraken and Samson (2011). Most of the section *Lanata-Divaricata* species grow rapidly in culture. The conidiophores of these species are often strongly divaricate and have metulae that are born terminally, subterminally and in intercalary positions. Useful characters for identification are the shape and ornamentation of the conidia, growth on CYA incubated at 37 °C, colony diameters and morphology (e.g. reverse colours on CYA, YES), and growth rate on CREA. Three *Lanata-Divaricata* species were isolated: *P. singorense*, *P. wotroi* and *P. echinulonalgiovense*. One isolate (RB 115) represents a novel species in sect. *Lanata-Divaricata*, and this species will be described elsewhere (Y-Z Diao et al., in progress). *Penicillium singorense* and *P. wotroi* are known species and the former was originally described from house dust in Thailand. Recent collections show that *P. singorense* has a worldwide distribution and this species is isolated in USA (Florida), Korea and China (J. Houbraken, pers. observations). The distribution of *P. wotroi* seems to be restricted to South-America (Brazil, Argentina) (Houbraken et al. 2011b). The name *P. echinulonalgiovense* was invalidly published because it was described without a Latin description or diagnosis (Art. 39.1.; Melbourne Code). In subsequent treatments using morphological characters, this

species was placed in synonymy with *P. janthinellum* (Smith 1963) and/or *P. simplicissimum* (Pitt 1979; Stolk and Samson 1983). However, molecular data shows that this species is distinct (Houbraken et al. 2011b) and we therefore reinstate this species as distinct. A search in the DTO and CBS collection shows that this species has a worldwide distribution (J. Houbraken, unpubl. results). Section *Lanata-Divari-cata* species are usually found in soil and (decaying) leaves (Houbraken et al. 2011b), but various other substrates are listed in literature. These species probably have a broad ecological niche. For example *P. excelsum* was isolated from bees and ants, but also from other substrates such as flowers, leaves, Brazil nut kernels and shells (Taniwaki et al. 2015).

Insects are adapted to different ecosystems and have symbiotic and/or pathogenic associations with fungi and other microorganisms (Bode 2011; Mello et al. 2016). Studies investigating the fungi associated with bees (*sensu lato*) revealed that some fungi are common saprophytes in the environment of the beehive. Bees collect plant pollen and nectar from different kinds of plants and inevitably, also fungal fragments will be introduced to the bee pollen (e.g. Eltz et al. 2002; Barbosa et al. 2017; Paludo et al. 2018). The nutritional value of a fungal spore is lower than that of pollen; however, it is speculated that fungal spores can serve as a complement to the bee diet since the availability is high and harvest is relatively easy (Oliveira and Morato 2000; Eltz et al. 2002). Only a limited number of reports about fungi associated with stingless bees are found in literature, and the reports related to *Penicillium* and *Talaromyces* are even rarer (Ferraz et al. 2008). According to Pandey et al. (1983), pollen grains can secrete substances that inhibit microbial spore germination. After collection, the pollen grains are processed by bees into bee bread and this product normally has low water activity. Many different fungal species can be found in honey, but these are probably latently present and will not grow due to the low water activity of the product. The natural introduction of fungi in the bee environment most likely occurs in the period between collection of the plant pollen, formation of bee pollen and drying and storage of the pollen in the nests.

An important characteristic of *Penicillium* and *Talaromyces* species is the production of a diverse range of bioactive extrolites (Nielsen et al. 2017). The extrolite production of the species that were isolated

during this study was investigated. The (combination of) detected extrolites can potentially play a role in the interaction between different organisms (Frisvad 2008). Our results demonstrate that the detected species are able to produce several extrolites, including the mycotoxin citrinin. The occurrence of mycotoxins and mycotoxigenic fungi has been recorded in bee pollen (*sensu lato*) around the world (e.g. González et al. 2005; Kačániová et al. 2011; Rodríguez-Carrasco et al. 2013). Logically, the presence of these mycotoxins (e.g. citrinin) is unwanted and can negatively affect the quality of the bee pollen for human consumption. Extrolite function depends on their ecological interaction. Insects are well adapted to feed on plants that contain a broad spectrum of (chemical) compounds (Dowd 1992). They have a long evolutionary history of interacting with fungi and it is known that some insects can use fungi as feed (Dowd 1992). Often, mycotoxins co-occur with other fungal extrolites for which no function is known. Following the analogy with the situation in higher plants, it is possible that these co-occurring fungal extrolites can synergize (or antagonize) the toxicity of co-occurring mycotoxins (Dowd 1992). In nature, fungal metabolites can provide various fitness advantages ranging from protection to competition with other microbes for niche securement (Rohlf and Churchill 2011). *Penicillium apimei* sp. nov. and *Monascus* are both isolated from stingless bees and are both producers of compounds belonging to the geodin biosynthetic family (Barbosa et al. 2017). It is tempting to speculate that this group of metabolites might have particular function in the bee habitat. Various extrolites could not be identified in our experimental conditions and could represent novel bioactive compounds. During this study, the quality of the nests and the health of the bees was followed over a long time and no disease was observed. If any of these (novel) compounds were secreted in the bee pollen or nests, then these compounds probably didn't have an (large) effect on the bees health.

Data on the functional relationship between fungi and stingless bees are scarce. Further studies on fungi from honey, inside nests, bee body, stored pollen and native plants are needed to understand the relationships between these organisms in tropical ecosystems, and the benefits that such fungi can possibly confer on their hosts. This study could serve as the first step for more detailed studies on ecological interactions

between stingless bees, fungi and their bioactive extrolites.

Acknowledgements We would like to thank National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Process 201478/2015-3—SWE) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support and scholarship for Renan N. Barbosa and Associação Pernambucana de Apicultores e Meliponicultores (APIME) is thanked for their help in collecting the honey/pollen samples. We would like to acknowledge the URM Culture Collection staff; Martin Meijer and Bart Kraak from the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute for their support and Konstanze Bench for nomenclatural assistance. Renan N. Barbosa received scholarship and financial support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Process 201478/2015-3—SWE) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Conflict of interest All authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Almeida-Muradian LB, Stramm KM, Horita A et al (2013) Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. IFST 48:1698–1706
- Barbosa RN, Bezerra JDP, Souza-Motta CM, Gomes BS, Costa CMC, Melo HF (2016) Prospection on yeasts from stingless bees honey in Brazilian Tropical Dry Forest (Caatinga). Gaia Scientia 10:151–159
- Barbosa RN, Leong S-L, Vinnere-Pettersson O et al (2017) Phylogenetic analysis of *Monascus* and new species from honey, pollen and nests of stingless bees. Stud Mycol 86:29–51
- Bode HB (2011) Insect-associated microorganisms as a source for novel secondary metabolites with therapeutic potential. In: Vilcinskis A (ed) Insect Biotechnology, vol 2. Springer, Netherlands, pp 77–93
- Brown JC, Oliveira ML (2014) The impact of agricultural colonization and deforestation on stingless bee (Apidae: Meliponini) composition and richness in Rondônia, Brazil. Apidologie 42:172–188
- Chen AJ, Sun BD, Houben J et al (2016) New *Talaromyces* species from indoor environments in China. Stud Mycol 84:119–144
- Cortopassi-Laurino M, Imperatriz-Fonseca VL, Roubik DW et al (2006) Global meliponiculture: challenges and opportunities. Apidologie 37:275–292
- Cortopassi-Laurino M, Velthuis HHW, Nogueira-Neto P (2007) Diversity of stingless bees from the Amazon forest in Xapuri (Acre), Brazil. Exp Appl Entomol 18:105–114
- Daniel HM, São Thiago-Calaça PS, Rosa CA et al (2013) *Starmerella neotropicalis* f.a., sp. nov., a new yeast species found in bees and pollen from Brazil and Cuba. Int J Syst Evol Microbiol 63:3896–3903
- Dowd PF (1992) Insect interactions with mycotoxin-producing fungi and their hosts. In: Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK (eds) Handbook of Applied Mycology, vol 5. Mycotoxins in Ecological Systems. Marcel Dekker, New York, pp 137–155
- Egorova AI (1971) Preservative microflora in stored pollen. Veterinariya 8:40–41
- Eltz T, Bruhl CA, Gorko C (2002) Collection of mold (*Rhizopus* sp.) spores in lieu of pollen by the stingless bee *Trigona collina*. J Trop Ecol 12:441–445
- Ferraz RE, Lima PM, Pereira DS, Freitas CCO, Feijó FMC (2008) Microbiota fúngica de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). Neotrop Entomol 37:345–346
- Ferreira-Caliman F, Silva CI, Mateus S, Zucchi R, Nascimento FS (2012) Neutral sterols of cephalic glands of stingless bees and their correlation with sterols from pollen. Psyche 2012:ID 982802. <https://doi.org/10.1155/2012/982802>
- Foley K, Fazio G, Jensen AB, Hughes WO (2014) Nutritional limitation and resistance to opportunistic *Aspergillus* parasites in honey bee larvae. J Invertebr Pathol 111:68–73
- Frisvad JC (2008) Fungi in cold ecosystems. In: Margesin R, Schinner F, Marx JC, Gerday C (eds) Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Gilliam M, Vandenberg JD (1988) Fungi. In: Morse RA, Nowogrodzki R (eds) Honey Bee Pests, Predators, and Diseases. Cornell University Press, Ithaca, NY
- Gilliam M, Prest DB, Lorenz BJ (1989) Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. Apidologie 20:53–68
- Gliński Z, Jarosz J (2000) The honeybee defense in mycotic diseases. Honeybee Sci 21:69–70
- Góis GC, Carneiro GG, Rodrigues AE et al (2010) Qualidade microbiológica do mel de abelhas *Melipona scutellaris*. PUBVET 4: 769
- González G, Hinojo MJ, Mateo R, Medina A, Jiménez M (2005) Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. Int J Food Microbiol 105:1–9
- Guevara-Suarez M, Sutton DA, Gené J (2017) Four new species of *Talaromyces* from clinical sources. Mycoses. <https://doi.org/10.1111/myc.12640>
- Houben J, Samson RA (2011) Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. Stud Mycol 70:1–51
- Houben J, Frisvad JC, Samson RA (2011a) Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*. Stud Mycol 70:53–138
- Houben J, Lopez-Quintero CA, Frisvad JC et al (2011b) *Penicillium araracuarensense* sp. nov., *Penicillium elleniae* sp. nov., *Penicillium penarajense* sp. nov., *Penicillium vanderhammenii* sp. nov. and *Penicillium wotroi* sp. nov.,

- isolated from leaf litter. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1462–1475
- Houbraken J, Spierenburg H, Frisvad JC (2012) *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101:403–421
- Houbraken J, Visagie CM, Meijer M et al (2014) A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Stud Mycol* 78:373–451
- Houbraken J, Samson RA, Yilmaz N (2016a) Taxonomy of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* and its significance for biotechnology. In: de Vries RP, Gelber IB, Andersen MR (eds) *Aspergillus* and *Penicillium* in the Post-Genomic Era. Caister Academic Press, Norfolk, pp 1–15
- Houbraken J, Wang L, Lee HB, Frisvad JC (2016b) New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. *Persoonia* 36:299–314
- Kačániová M, Juraček M, Chlebo R et al (2011) Mycobiota and mycotoxins in bee pollen collected from different areas of Slovakia. *J Environ Sci Health B* 46:623–629
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780
- Keller KM, Devesa MV, Koshiyama AS et al (2014) Fungi infection in honeybee hives in regions affected by Brazilian sac brood. *Arq Bras Med Vet Zootec* 66:1471–1478
- Kerr WE (1996) Tiuba: a Abelha do Maranhão. EDUFMA, São Luís
- Klitgaard A, Iversen A, Andersen MR (2014) Aggressive dereplication using UHPLC-DAD-QTOF—screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. *Anal Bioanal Chem* 406:1933–1943
- Kobayashi C, Fukasawa Y, Hirose D et al (2008) Contribution of symbiotic mycangial fungi to larval nutrition of a leaf-rolling weevil. *Evol Ecol* 22:711–722
- Laich F, Andrade J (2016) *Penicillium pederalense* sp. nov., isolated from whiteleg shrimp heads waste compost. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:4382–4388
- Li X, Guo W, Ding J (2012) Mycangial fungus benefits the development of a leaf-rolling weevil, *Euops chinensis*. *J Insect Physiol* 58:867–873
- Lopes LQS, Quattrin PM, De Souza ME, De Almeida Vaucher R, Vianna Santos RC (2015) Fungal infections in honey bees. *Fungal Genomics Biol* 4:118. <https://doi.org/10.4172/2165-8056.1000118>
- Luo Y, Lu X, Bi W, Liu F, Gao W (2016) *Talaromyces rubri-faciens*, a new species discovered from heating, ventilation and air conditioning systems in China. *Mycologia* 108:773–779
- Maddison WP, Maddison DR (2016) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis, version 3.11. <http://mesquiteproject.org>
- McNeill J, Barrie FF, Buck WR (eds) (2012) International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) Koeltz Scientific Books, Königstein (Regnum vegetabile no. 154)
- Mello AP, Corrêa EB, Barbosa-Silva AM, Bezerra-Gusmão MA (2016) Fungi associated with nests of *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera: Nasutitermitinae) in a semiarid region of Brazil. *Entomotropica* 31:302–310
- Menezes C, Vollet-Neto A, Marsaioli AJ et al (2015) A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Curr Biol* 25:2851–2855
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: IEEE Gateway Computing Environments workshop (GCE), pp 1–8
- Nielsen KF, Månsson M, Rank C (2011) Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *J Nat Prod* 74:2338–2348
- Nielsen JC, Grijseels S, Prigent S et al (2017) Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. *Nat Microbiol* 2:17044. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.44>
- Oliveira ML, Morato EF (2000) Stingless bees (Hymenoptera, Meliponini) feeding on stinkhorn spores (Fungi, Phallales): robbery or dispersal? *Rev Bras Zool* 17:881–884
- Paludo CR, Menezes C, Silva-Junior EA et al (2018) Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. *Sci Rep* 8:1122. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19583-9>
- Pandey DK, Tripathi PM, Tripathi RD, Dixit SN (1983) Fungitoxicity in pollen grains. *Grana* 22:31–32
- Peterson SW, Pérez J, Vega F et al (2003) *Penicillium brocae*, a new species associated with the coffee berry borer in Chiapas, Mexico. *Mycologia* 95:141–147
- Peterson SW, Jurjević Ž, Frisvad JC (2015) Expanding the species and chemical diversity of *Penicillium* section *Cinnamopurpurea*. *PLoS ONE* 10:e0121987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121987>
- Pianaro A, Flach A, Patricio EFLRA, Nogueira-Neto P, Marsaioli AJ (2007) Chemical Changes Associated with the invasion of a *Melipona scutellaris* colony by *Melipona rufiventris* workers. *J Chem Ecol* 33:971–984
- Pitt JI (1979) The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London
- Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25:1253–1256
- Rambaut A (2009) FigTree v.1.3.1. Computer program and documentation distributed by the author. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>
- Ramírez SR, Nieh JC, Quental TB et al (2010) A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Mol Phylogenet Evol* 56:519–525
- Rao PV, Krishnan KT, Salleh N, Gan SH (2016) Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. *Rev Bras Farmacogn* 26:657–664
- Rivera KG, Seifert KA (2011) A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. *Stud Mycol* 70:139–158
- Rivera KG, Díaz J, Chavarría-Díaz F et al (2012) *Penicillium mallochii* and *P. guanacastense*, two new species isolated from Costa Rican caterpillars. *Mycotaxon* 119:315–328
- Rodríguez-Carrasco Y, Font G, Mañes J, Berrada H (2013) Determination of mycotoxins in bee pollen by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 61:1999–2005

- Rohlf M, Churchill AC (2011) Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genet Biol* 48:23–34
- Romero SM, Romero AI, Barrera V, Comerio R (2016) *Talaromyces systylus*, a new synnematus species from Argentinean semi-arid soil. *Nova Hedwigia* 102:24–256
- Rong C, Yuanwei M, Shouxian W et al (2016) *Penicillium chroogomphum*, a new species in *Penicillium* section *Ramosa* isolated from fruiting bodies of *Chroogomphus rutilus* in China. *Mycoscience* 57:79–84
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P et al (2012) MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61:539–542
- Rosa CA, Lachance M-A, Silva JOC et al (2003) Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Res* 4:271–275
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U et al (2010) Food and indoor fungi. CBS Laboratory Manual Series 2. Centraalbureau voor Schimmelfcultures, Utrecht, The Netherlands
- Samson RA, Yilmaz N, Houbraken J et al (2011) Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Stud Mycol* 70:159–183
- Sarwar M (2016) Challenges due to bacterial infections of the honey bees and contributions to manage pest problems. *IJER* 1:4–10
- Shoreit MN, Bagy HM (1995) Mycoflora associated with stonebrood disease in honey bee colonies in Egypt. *Microbiol Res* 150:207–211
- Silva TMS, Santos FP, Evangelista-Rodrigues A et al (2013) Phenolic compounds, melissopalynological, physico-chemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *J Food Compos Anal* 29:10–18
- Smedsgaard J (1997) Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *J Chromatogr A* 760:264–270
- Stamatakis A (2014) RAxML Version 8: a tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312–1313
- Stolk AC, Samson RA (1983) The ascomycete genus *Eupenicillium* and related *Penicillium* anamorphs. *Stud Mycol* 23:1–149
- Tamura K, Stecher G, Peterson D et al (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
- Taniwaki MH, Pitt JI, Iamanaka BT et al (2015) *Penicillium excelsum* sp. nov. from the Brazil nut tree ecosystem in the Amazon basin. *PLoS ONE* 10:e0143189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143189>
- Teixeira ACP, Marini MM, Nicoli JR et al (2003) *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:339–343
- Traniello JFA, Rosengaus RB, Savoie K (2001) The development of immunity in a social insect: evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6838–6842
- Visagie CM (2012) The polyphasic taxonomy of *Penicillium* and *Talaromyces* spp. isolated from the diverse fynbos biome. PhD Thesis, Stellenbosch University
- Visagie CM, Houbraken J, Rodrigues C et al (2013) Five new *Penicillium* species in section *Sclerotiora*: a tribute to the Dutch Royal family. *Persoonia* 31:42–62
- Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC et al (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol* 78:343–372
- Visagie CM, Houbraken J, Seifert KA, Samson RA, Jacobs K (2015) Four new *Penicillium* species isolated from the fynbos biome in South Africa, including a multigene phylogeny of section *Lanata-Divariata*. *Mycol Prog* 14:96. <https://doi.org/10.1007/s11557-015-1118-z>
- Visagie CM, Renaud JB, Burgess KMN, Malloch DW, Clark D, Ketch L, Urb M, Louis-Seize G, Assabgui R, Sumarah MW, Seifert KA (2016) Fifteen new species of *Penicillium*. *Persoonia* 36:247–280
- Vit P, Medina M, Enriquez ME (2004) Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World* 85:2–5
- Wang Y-Z, Chan M-L (2015) A *Penicillium* and a *Talaromyces* new to Taiwan. *Coll Res* 28:1–4
- Wang Q-M, Zhang Y-H, Wang B, Wang L (2016) *Talaromyces neofusisporus* and *T. qii*, two new species of section *Talaromyces* isolated from plant leaves in Tibet, China. *Sci Rep* 6:18622. <https://doi.org/10.1038/srep18622>
- Wang X-C, Chen K, Zeng Z-Q, Zhuang W-Y (2017a) Phylogeny and morphological analyses of *Penicillium* section *Sclerotiora* (Fungi) lead to the discovery of five new species. *Sci Rep* 7:8233. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08697-1>
- Wang X-C, Chen X, Qin W-T, Zhuang W-Y (2017b) *Talaromyces heiheensis* and *T. mangshanicus*, two new species from China. *Mycol Prog* 16:73–81
- Yilmaz N, Houbraken J, Hoekstra ES et al (2012) Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. *Persoonia* 29:39–54
- Yilmaz N, Visagie CM, Houbraken J (2014) Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Stud Mycol* 78:175–342
- Yilmaz N, Visagie CM, Frisvad JC et al (2016) Taxonomic re-evaluation of species in *Talaromyces* section *Islandici*, using a polyphasic approach. *Persoonia* 36:37–56

APÊNDICE B - PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *MONASCUS* AND NEW SPECIES FROM HONEY, POLLEN AND NESTS OF STINGLESS BEES

available online at www.studiesinmycology.org

STUDIES IN MYCOLOGY 86: 29–51 (2017).



Phylogenetic analysis of *Monascus* and new species from honey, pollen and nests of stingless bees

R.N. Barbosa^{1,2}, S.L. Leong³, O. Vinnere-Petersson^{3,4}, A.J. Chen^{1,5}, C.M. Souza-Motta², J.C. Frisvad⁶, R.A. Samson¹, N.T. Oliveira², and J. Houbraken^{1*}

¹Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands; ²Departamento de Micologia Prof. Chaves Batista, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Centro de Biociências, Cidade Universitária, CEP: 50670-901 Recife, PE, Brazil; ³Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Molecular Sciences, Box 7015, SE-750 07 Uppsala, Sweden; ⁴National Genomics Infrastructure-Sweden, Science for Life Laboratory, Department of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University, BMC, Box 815, SE-752 37 Uppsala, Sweden; ⁵Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, PR China; ⁶Department of Biotechnology and Biomedicine, Technical University of Denmark, 2800 Kongens Lyngby, Denmark

*Correspondence: J. Houbraken, j.houbraken@westerdijkinstitute.nl

Abstract: The genus *Monascus* was described by van Tieghem (1884) to accommodate *M. ruber* and *M. mucoroides*, two species with non-ostiolate ascomata. Species delimitation in the genus is still mainly based on phenotypic characters, and taxonomic studies that include sequence data are limited. The genus is of economic importance. Species are used in fermented Asian foods as food colourants (e.g. 'red rice' (ang-kak, angka)) and found as spoilage organisms, and recently *Monascus* was found to be essential in the lifecycle of stingless bees. In this study, a polyphasic approach was applied combining morphological characters, ITS, LSU, β -tubulin, calmodulin and RNA polymerase II second largest subunit sequences and extrolite data, to delimit species and to study phylogenetic relationships in *Monascus*. Furthermore, 30 *Monascus* isolates from honey, pollen and nests of stingless bees in Brazil were included. Based on this polyphasic approach, the genus *Monascus* is resolved in nine species, including three new species associated with stingless bees (*M. flavipigmentosus* sp. nov., *M. mellicola* sp. nov., *M. recifensis* sp. nov., *M. argentinensis*, *M. floridanus*, *M. lunisporas*, *M. pallens*, *M. purpureus*, *M. ruber*), and split in two new sections (section *Floridani* sect. nov., section *Rubri* sect. nov.). Phylogenetic analysis showed that the xerophile *Monascus eremophilus* does not belong in *Monascus* and monophyly in *Monascus* is restored with the transfer of *M. eremophilus* to *Penicillium* (*P. eremophilum* comb. nov.). A list of accepted and excluded *Monascus* and *Basipetospora* species is given, together with information on (ex-)types cultures and barcode sequence data.

Key words: Aspergillaceae, Extrolites, Fungal ecology, Phylogeny, Taxonomy.

Taxonomic novelties: New sections: *Monascus* section *Floridani* R.N. Barbosa & Houbraken, *Monascus* section *Rubri* R.N. Barbosa & Houbraken; **New species:** *Monascus flavipigmentosus* R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken, *Monascus mellicola* R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken, *Monascus recifensis* R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken; **New combination:** *Penicillium eremophilum* (A.D. Hocking & Pitt) Houbraken, Leong & Vinnere-Petersson.

Available online 12 April 2017; <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.001>.

INTRODUCTION

Van Tieghem (1884) introduced the genus *Monascus* for species that produce non-ostiolate ascomata and introduced two species, *M. ruber* and *M. mucoroides*. The position of *Monascus* (and the *Monascaceae*) has been the subject of discussion in various papers and it was often placed outside the order *Eurotiales* (Benny & Kimbrough 1980, von Arx 1987, Stchigel & Guarro 2007), but phylogenetic analyses confidentially places this genus in *Aspergillaceae* (*Eurotiales*) (Berbee *et al.* 1995, Ogawa *et al.* 1997, Ogawa & Sugiyama 2000, Peterson 2008, Houbraken & Samson 2011, Vinnere-Petersson *et al.* 2011). The genus *Basipetospora* was found to be the anamorph of *Monascus* and is characterized by the production of aleurioconidia in a basipetal manner from undifferentiated conidiogenous cells that progressively shorten (retrogression, Cole & Samson 1979). The conidia have a truncated base and resemble chlamydospores. These features set this genus apart from the phylogenetically related genera *Aspergillus* and *Penicillium*.

After the description of the genus, more than 20 species have been introduced and many of them are considered to be synonyms (Shao *et al.* 2011). Classification of *Monascus* has primary

been based on macro- and microscopic features, such as the pigmentation of the cleistothecial walls and conidia and growth rates on agar media. Hawksworth & Pitt (1983) revised the genus based on physiological and morphological characteristics and reduced the number of accepted species to three: *M. pilosus*, *M. ruber* and *M. purpureus*. Since that study, ten new species were introduced: *M. albidulus*, *M. argentinensis*, *M. aurantiacus*, *M. eremophilus*, *M. floridanus*, *M. fumeus*, *M. lunisporas*, *M. pallens*, *M. rutilus* and *M. sanguineus* (Barnard & Cannon 1987, Hocking & Pitt 1988, Cannon *et al.* 1995, Udagawa & Baba 1998, Stchigel *et al.* 2004, Li & Guo 2004). With the description of those species, the genus became morphologically and physiologically more diverse, suggesting a large genetic diversity. For example, *Monascus ruber* grows rapidly on agar media, *M. lunisporas* and *M. pallens* grow restrictedly and *M. eremophilus* is a strict xerophile and only grows on low water activity media. The phenotype-based identification schemes in *Monascus* were difficult to match with the results obtained by ITS, partial LSU and/or β -tubulin gene sequencing (Park & Jong 2003, Park *et al.* 2004). Nowadays, species can be delimited on the genotype, for example based on the Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSPR) concept. The

Peer review under responsibility of Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.

© 2017 Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. Production and hosting by ELSEVIER B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

application of this concept in *Monascus* has yet not been performed and the results of such an analysis will give insight on the species boundaries.

The genus *Monascus* has economic importance in several areas, and several species have been widely used for over years in the production of yellow and red food colourants and Asian fermented foods, particularly red rice (ang-kak, angka, 'red kojic rice'). Red rice is of particular interest because of its health promoting effects (Lee & Pan 2011, 2012, Hsu & Pan 2012, Shi & Pan 2012) and indeed, production of compounds with antibacterial properties and cholesterol-lowering statins of the monacolin K-type (= mevinolin = lovastatin) are reported in the species *M. pilosus*, *M. pubigerus*, *M. purpureus*, *M. ruber* and *M. vitreus* (Negishi et al. 1986, Jůzlova et al. 1996, Vendruscolo et al. 2014). However, *Monascus* species such as *M. anka*, *M. aurantiacus*, *M. kaoliang*, *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber* and *M. sanguineus* have been reported to produce the mycotoxin citrinin (Blanc et al. 1995, Dietrich et al. 1999, Wang et al. 2003, Wang et al. 2005, Pisareva et al. 2005, Shimizu et al. 2005, Huang et al. 2007, Pattangul et al. 2008, Kim et al. 2010, Li et al. 2012, Li et al. 2015), and the presence of this mycotoxin in food, including red rice, should be avoided. Among these reports on citrinin production by *Monascus* species, Wang et al. (2005) also reported on citrinin production by *M. floricidans*, *M. lunisporas* and *M. pallens*, but this has not been confirmed by any other authors working on citrinin and *Monascus*. Besides their beneficial properties for human, *Monascus* species can also cause spoilage, for example of silage, bakery (tortillas), pasteurized products (olives) and dried prunes (*M. eremophilus*). Species are also rarely associated with human infections, and an invasive gastric infection case was linked to the consumption of *Monascus* contaminated dried and salted fish (Moreau 1971, Iriart et al. 2010, Samson et al. 2010).

Specific fungi and other micro-organisms live in close association with social and solitary bees. This association is mandatory, and investigations on the biology, ecology and evolution have been undertaken (Wynns 2015). Recently, a study described a symbiosis between *Scaptotrigona postica* bees and a fungus (Menezes et al. 2015). The fungus was identified by morphology and ITS sequencing as being closely related to *M. ruber* and *M. pilosus*. The study showed that the *Monascus* biomass on the food inside the brood cells is essential for the larvae of the *S. postica* bees, and without the consumption of this biomass, only a few larvae can continue their life cycle.

Monascus was one of the predominant genera during the study of fungi associated with honey, pollen and nests of *Melipona scutellaris* bees living in the Atlantic Forest in Pernambuco, Brazil. The phylogenetic relationship of those strains with other species of the genus was determined by the analysis of ITS, LSU, β -tubulin (*BenA*), calmodulin (*CaM*) and RNA polymerase II second largest subunit (*RPB2*) sequences. Furthermore, three new species from honey, pollen and the inside of the nest are described based on a polyphasic approach combining sequence data, macro- and microscopic characters and extrolites.

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolation

Samples were collected from honey, pollen and inside nests of *Melipona scutellaris* bees in the Brazilian Tropical Forest in

Pernambuco state (8°7'30"S, 34°52'30"W and 8°4'36"S, 34°57'34"W) between January and June 2014. For the honey and pollen samples, 25 g of each specimen was suspended in 225 mL peptone water (0.1 %) and decimal dilutions were made until 10⁻³. Subsequently, 0.1 mL of each dilution was spread plated on the agar media dichloran 18 % glycerol agar (DG18) and malt extract agar supplemented with chloramphenicol. The plates were incubated at 25 °C for 7–14 d in darkness. For collection of the samples inside nests, a sterile cotton swab was used to sample the surface of the pollen and honey pots, and brood cells. The swab was soaked in 3 mL peptone water (0.1 %) and vortexed vigorously. The samples were subsequently analysed as described above. All fungal colonies were isolated and purified prior identification.

Cultivation and morphological analyses

Thirty *Monascus* strains were obtained from honey, pollen and inside nests of *Melipona scutellaris* bees (Table 1). The colony characteristics of these strains were compared with representative and type cultures of currently accepted *Monascus* species. For this purpose, the strains were cultivated in three points in creatine agar (CREA), cornmeal agar (CMA), Czapek yeast extract agar (CYA), CYA supplemented with 5 % NaCl (CYAS), dichloran 18 % glycerol agar (DG18), malt extract agar (MEA, Oxoid), oatmeal agar (OA), potato dextrose agar (PDA) and yeast extract sucrose agar (YES) incubated at 25 °C for 7 d. Additional CYA and MEA plates were incubated at 30 and 37 °C. *Monascus eremophilus* was inoculated on the malt agar 20 % sucrose (MA20S) and malt yeast extract 50 % glucose agar (MY50G). All media were prepared according to Samson et al. (2010). Colony diameters were measured after 7 d of incubation and colony characteristics (e.g. presence of soluble pigments, exudates, obverse and reverse colony colours, colour of mycelium) were recorded. Microscopic observations of the asexual stage were made from colonies grown on MEA. The presence of a sexual stage was determined on MEA, CMA, PDA and OA, and PDA was used for illustrations and measurements. Lactic acid (60 %) was used as mounting fluid and 96 % ethanol was used to remove the excess of conidia. The size, shape and pigmentation of conidia, conidiophores, ascomata, asci and ascospores were recorded. A Zeiss Stereo Discovery V20 dissecting microscope and Zeiss AX10 Imager A2 light microscope equipped with Nikon DS-Ri2 cameras and software NIS-Elements D v4.50 were used to capture digital images. New species names and associated information were deposited in MycoBank. All strains were deposited in the culture collection of Micoteca URM (Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil) and the ex-type strains were also deposited in the CBS culture collection housed at the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (formerly known as Centraalbureau voor Schimmelfcultures), Utrecht, The Netherlands (under Material Transfer Agreement – MTA No. 01/2016/Micoteca URM).

Molecular characterization

Genomic DNA of 7 d old cultures was extracted using the Ultra-Clean Microbial DNA kit (MoBio Laboratories, Solana Beach, CA, USA) and processed according to the manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the ITS region (ITS1, 5.8S rDNA and ITS2) was performed using the primers

Table 1. Strains and sequences used in the morphological and molecular study.

Species	Strain numbers	Substrate; location	GenBank accession no.				
			ITS	BenA	LSU	CaM	RPB2
<i>Leiothecium ellipsoideum</i>	CBS 607.74 ^T = ATCC 32453	Soil, between rocks; Peloponnesos, Greece	KF732839	KY709178	FJ358285	KY611939	JN121541
<i>Monascus argentinensis</i>	CBS 109402 ^T = DTO 138-C5 = FMR 7393	Soil sample; Tucumán province, Argentina	JF922046	KY709174	KY645974	KY611935	JN121423
<i>M. eremophilus</i>	CBS 123361 ^T = DTO 122-C7 = FRR 3338	Mouldy prunes; New South Wales, Australia	GU733347	KY709170	KY645973	KY611931	KY611970
<i>M. flavigigmentosus</i>	URM 7536 ^T = CBS 142366	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511751	KY709168	KY511781	KY611929	KY611968
<i>M. flavigigmentosus</i>	URM 7535	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511752	KY709169	KY511782	KY611930	KY611969
<i>M. flavigigmentosus</i>	URM 7534	Pollen of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511750	KY709167	KY511780	KY611928	KY611967
<i>M. floridanus</i>	CBS 142228 ^T = DTO 360-E7 = CGMCC 3.5843 = IMI 282587 = UAMH 4180	Sand pine roots; USA	KY635848	KY709172	KY635856	KY611933	KY611972
<i>M. lunisporas</i>	CBS 142230 ^T = DTO 360-E9 = CGMCC 3.7951 = ATCC 204397	Mouldy feed for race horses; Japan	KY635847	KY709171	KY635855	KY611932	KY611971
<i>M. mellicola</i>	URM 7510 ^T = CBS 142364	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511726	KY709143	KY511756	KY611904	KY611943
<i>M. mellicola</i>	URM 7507	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511723	KY709140	KY511753	KY611901	KY611940
<i>M. mellicola</i>	URM 7508	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511724	KY709141	KY511754	KY611902	KY611941
<i>M. mellicola</i>	URM 7509	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511725	KY709142	KY511755	KY611903	KY611942
<i>M. mellicola</i>	URM 7511	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511727	KY709144	KY511757	KY611905	KY611944
<i>M. mellicola</i>	URM 7512	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511728	KY709145	KY511758	KY611906	KY611945
<i>M. mellicola</i>	URM 7513	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511729	KY709146	KY511759	KY611907	KY611946
<i>M. mellicola</i>	URM 7514	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511730	KY709147	KY511760	KY611908	KY611947
<i>M. mellicola</i>	URM 7515	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511731	KY709148	KY511761	KY611909	KY611948
<i>M. mellicola</i>	URM 7516	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511732	KY709149	KY511762	KY611910	KY611949
<i>M. mellicola</i>	URM 7517	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511733	KY709150	KY511763	KY611911	KY611950
<i>M. mellicola</i>	URM 7518	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511734	KY709151	KY511764	KY611912	KY611951
<i>M. mellicola</i>	URM 7519	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511735	KY709152	KY511765	KY611913	KY611952
<i>M. mellicola</i>	URM 7520	Pollen; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511736	KY709153	KY511766	KY611914	KY611953
<i>M. mellicola</i>	URM 7521	Honey of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511737	KY709154	KY511767	KY611915	KY611954
<i>M. mellicola</i>	URM 7522	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511738	KY709155	KY511768	KY611916	KY611955

(continued on next page)

Table 1. (Continued).

Species	Strain numbers	Substrate; location	GenBank accession no.				
			ITS	BenA	LSU	CaM	RPB2
<i>M. pallens</i>	CBS 142229 ^T = DTO 360-E8 = CGMCC 3.5844 = ATCC 200612 = IMI 356820	River sediment; Iraq	KY635849	KY709173	KY635857	KY611934	KY611973
<i>M. pilosus</i>	CBS 286.34 ^T = DTO 165-B1 = ATCC 16363 = FRR 2194 = IFO 4480	Fermented grain, <i>Sorghum vulgare</i> ; Japan	KY635852	JF922085	KY635860	KY849968	KY849967
<i>M. purpureus</i>	CBS 109.07 ^T = DTO 364-D8 = ATCC 16365 = IFO 4513 = IMI 210765 = NRRL 1596	Fermented rice grain ('ang-quac'); Java, Indonesia	KY635851	KY709176	KY635859	KY611937	JN121422
<i>M. recifensis</i>	URM 7524 ^T = CBS 142365	Pollen of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511740	KY709157	KY511770	KY611918	KY611957
<i>M. recifensis</i>	URM 7523	Pollen of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511739	KY709156	KY511769	KY611917	KY611956
<i>M. ruber</i>	URM 7525	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511741	KY709158	KY511771	KY611919	KY611958
<i>M. ruber</i>	URM 7526	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511742	KY709159	KY511772	KY611920	KY611959
<i>M. ruber</i>	URM 7527	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511743	KY709160	KY511773	KY611921	KY611960
<i>M. ruber</i>	URM 7528	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511744	KY709161	KY511774	KY611922	KY611961
<i>M. ruber</i>	URM 7529	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511745	KY709162	KY511775	KY611923	KY611962
<i>M. ruber</i>	URM 7530	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511746	KY709163	KY511776	KY611924	KY611963
<i>M. ruber</i>	URM 7531	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511747	KY709164	KY511777	KY611925	KY611964
<i>M. ruber</i>	URM 7532	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511748	KY709165	KY511778	KY611926	KY611965
<i>M. ruber</i>	URM 7533	Inside nest of <i>Melipona scutellaris</i> ; Recife, Pernambuco, Brazil	KY511749	KY709166	KY511779	KY611927	KY611966
<i>M. ruber</i>	CBS 135.60 ^{NT} = DTO 359-E8 = ATCC 15670 = IFO 8451 = IMI 081596	Soil; India	KY635850	KY709175	KY635858	KY611936	KY611974
<i>M. sanguineus</i>	IMI 356821 ^T = ATCC 200613	River sediment; Iraq	JF922055	JF922088	AF364968	KY611938	n/a
<i>Penicillium polonicum</i>	CBS 222.28 ^T = IBT 12821 = IMI 291194 = NRRL 995	Soil, Poland	AF033475	AF001206	JN939272	KU896848	JN985417
<i>P. verrucosum</i>	CBS 603.74 ^{NT} = IMI 200310 = ATCC 48957 = FRR 965 = IBT 4733 = NRRL 965	Unknown source, Belgium	AB479317	AF001205	AB479285	DQ911138	JN121539
<i>Talaromyces purpurogenus</i>	CBS 286.36 = IMI 091926	Unknown source; Japan	JX315671	JX315639	KY635863	KF741947	JX315709
<i>T. ruber</i>	CBS 132704 = IBT 10703	Aircraft fuel tank; UK	NR111780	JX315629	KY635864	KF741938	JX315700
<i>Xerochrysium dermatitidis</i>	CBS 132.31 ^T = IMI 096729 = UAMH 802	Skin, man; Italy	KY635853	n/a	KY635861	n/a	JN121443
<i>Xeromyces bisporus</i>	CBS 236.71 ^T = IMI 063718	Mouldy stick of liquorice; New South Wales, Australia	KY635854	JF922089	KY635862	741987712 ¹	JN121612

Abbreviations: T = type strain; NT = neotype strain; URM, URM Culture Collection (www.ufpe.br/micoteca), Brazil; CBS, Culture collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (formerly known as Centraalbureau voor Schimmelcultures), The Netherlands; DTO, Internal culture collection at Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.

¹ Sequence from genome sequenced strain; n/a: no sequence available.

V9G and LS266 and a part of the Large SubUnit (LSU) rDNA was amplified using the primers LR0R and LR5. Partial β -tubulin fragments were generated using the primer combination Bt2a and Bt2b, for calmodulin the primers Cmd5 and Cmd6 were used and for *RPB2* the primers RPB2-5F and RPB2-7CR. Details on the primer sequences, PCR mixtures and conditions are previously described (Samson *et al.* 2010, Houbaken *et al.* 2012).

The PCR products were sequenced in both directions with the same primers using the BigDye[®] Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and were purified with Sephadex, according to the manufacturers' recommendations. Contigs were assembled using the forward and reverse sequence with the SeqMan v. 10.0.1 program. Newly generated sequences were deposited in GenBank. Sequence datasets were generated by combining the newly generated sequences with sequences from GenBank (Table 1). The sequences were aligned using MAFFT (Katoh *et al.* 2005) and were manually optimized using MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011). The most suitable substitution model was determined using FindModel (Posada & Crandall 1998). Phylogenetic trees were constructed using maximum likelihood (ML) analysis in RAXML-VI-HPC v. 7.0.3 (Stamatakis 2006) using the GTRGAMMA substitution model and 1000 bootstrap replicates. Bayesian inference (BI) in MrBayes v.3.2.1 (Ronquist *et al.* 2012) was performed using Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algorithm and the best scoring substitution model is indicated in the results section. Trees were visualized in FigTree v. 1.1.2 (Rambaut 2009) and edited in Adobe Illustrator v.CS5.1. Individual alignments were concatenated by using Mesquite v3.04 (Maddison & Maddison 2016). The quality of final alignment was evaluated using Transitive Consistency Score (TCS) by the T-Coffee web server (Chang *et al.* 2015).

Extrolite analysis

Extrolites were extracted from fungal strains grown on CYA, YES, MEA, OA at 25 °C for 14 d and PDA and DG18 at 25 °C for 20 d. Three agar plugs of each culture were extracted as previously described (Smedsgaard 1997, Houbaken *et al.* 2012). After extraction, the liquid was transferred to a clean screw-cap vial and evaporated to dryness. Prior analysis, the dried extracts were re-dissolved in methanol by ultrasonication and filtered through a 0.45 μ m filter. The extracts were analysed by ultra-high performance liquid chromatography with diode-array detection (UHPLC-DAD) (Houbaken *et al.* 2012). The detected eluted compounds were identified by comparing the retention time, retention index and UV spectra measured at 200–600 nm. The UV spectra were compared to a database of UV spectra and data from literature (Nielsen *et al.* 2011, Klitgaard *et al.* 2014).

RESULTS

Phylogeny and GCPSR

The phylogenetic relationship of the commonly accepted *Monascus* species and the isolates obtained from honey, pollen and nests of *Melipona scutellaris* bees were studied using concatenated five-gene data set (ITS, *BenA*, *CaM*, LSU and *RPB2*). The Transitive Consistency Score (TCS) evaluated the robustness of the five-gene with the high score of 929. The total length of the aligned

data set was 2930 characters (ITS, 583 bp; *BenA*, 505 bp; *CaM*, 490 bp; *RPB2*, 784 bp; LSU, 568 bp) including alignment gaps. The GTR+G model was the most optimal and selected for the ITS and LSU data sets, the HKY+G model for *BenA* and K80+G for the *CaM* and *RPB2* data sets. A similar topology was observed in the five single gene phylogenies and no significant incongruence were found (Fig. 2A–E). A total of 1692 trees were generated during the Bayesian inference from which 422 trees were discarded after 25 per cent of the generations in 'burn-in phase' and posterior probabilities were calculated from the remaining 1270 trees. The results of the Bayesian analysis were similar to the results of the ML analysis, and differences were only in the degree of support for some branches. The Bayesian consensus tree is presented here with the relevant bootstrap percentages (>70 %) and posterior probability values (>0.95) (Fig. 1).

Monascus eremophilus is positioned outside the main *Monascus* clade and proved to be related to *Penicillium* species (100 % bs, 1.00 pp) (Fig. 1). Our analysis revealed two well-supported groups in *Monascus*, referred here to as the *M. floricidus*- and *M. ruber*-clades. Seven well-supported lineages are present in the *M. floricidus*-clade and these lineages are treated as separate species. Four are known species (*M. lunisporas*, *M. argentinensis*, *M. floricidus*, *M. pallens*), and three are proposed as newly described below (*Monascus mellicola*, *M. recifensis* and *M. flavipigmentosus*). *Monascus mellicola* is phylogenetically distinct and is with moderate bootstrap and posterior probability support (82 % bs, 0.96 pp) related to *M. argentinensis*, *M. lunisporas*, *M. recifensis* and *M. flavipigmentosus*. The latter three species are resolved as close relatives in a distinct, well-supported clade. In our concatenate phylogenetic analysis these species are separated in three well-supported groups, with *M. lunisporas* and *M. flavipigmentosus* being sister species and *M. recifensis* taking a basal position. Similar clustering was obtained in the single gene analyses; however, the species were unresolved in the LSU phylogram (Fig. 2).

The (neo)type strains of *M. pilosus* (CBS 286.34^T), *M. purpureus* (CBS 109.07^T), *M. ruber* (CBS 135.60^{NT}) and *M. sanguineus* (ATCC 200613^T) are located in the *M. ruber*-clade. Two lineages are present within the *M. ruber*-clade (Fig. 1). The (neo)type strains of *M. pilosus* (CBS 286.34^T) and *M. ruber* (CBS 135.60^{NT}) are together on a well-supported branch (97 % bs; 1.00 pp), and the branch containing the types of *M. purpureus* (CBS 109.07^T) and *M. sanguineus* (ATCC 200613^T) has weak statistical support (78 % bs; <0.95 pp). In our single gene analyses, *M. pilosus* (CBS 286.34^T) and *M. ruber* (CBS 135.60^{NT}) always cluster together with high (ITS: 99 % bs, 1.00 pp; LSU: 98 % bs, 1.00 pp; *CaM*: 88 % bs, 0.98 pp) or moderate (*RPB2*: 96 % bs, <0.95 pp, *BenA* 89 % bs, <0.95 pp) statistical support. The branch with *M. purpureus* (CBS 109.07^T) and *M. sanguineus* (ATCC 200613^T) is well supported in the ITS phylogram (87 % bs, 0.99 pp), and no support was found in the *BenA*, *CaM* and LSU analyses (<70 %, <0.95 pp). Following the GCPSR concept, we keep two lineages in the *M. ruber*-clade. *Monascus pilosus* and *M. sanguineus* are treated here as synonym of *M. ruber* and *M. purpureus*, respectively.

Morphology

Monascus can also be split into two groups based on morphological characters. The majority of the species belonging to the

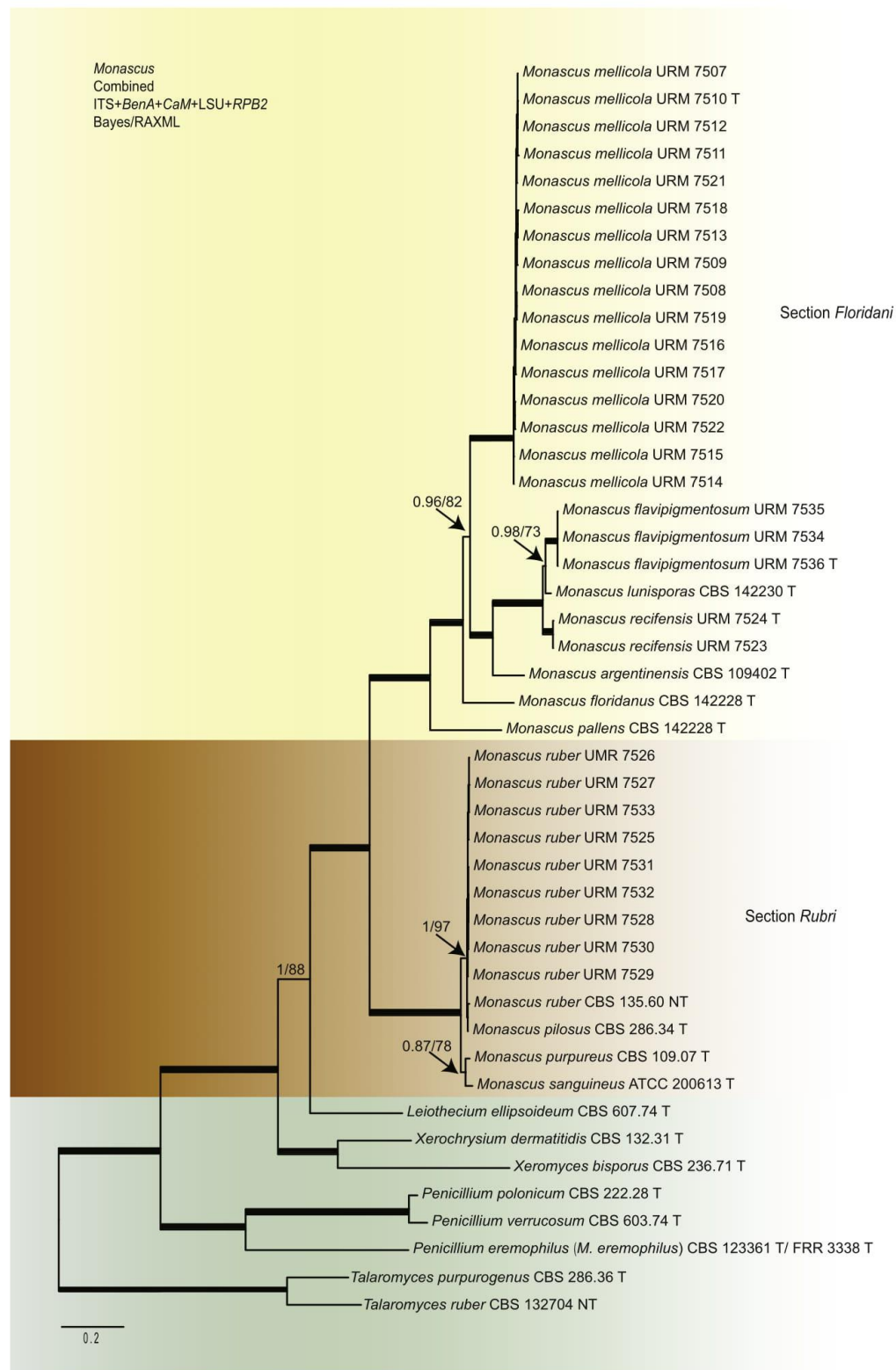


Fig. 1. Concatenated phylogeny of the ITS, BenA, CaM, LSU and RPB2 gene regions showing the relationship in *Monascus*. Branches with posterior probability values of 1.00 and >95 % are thickened.

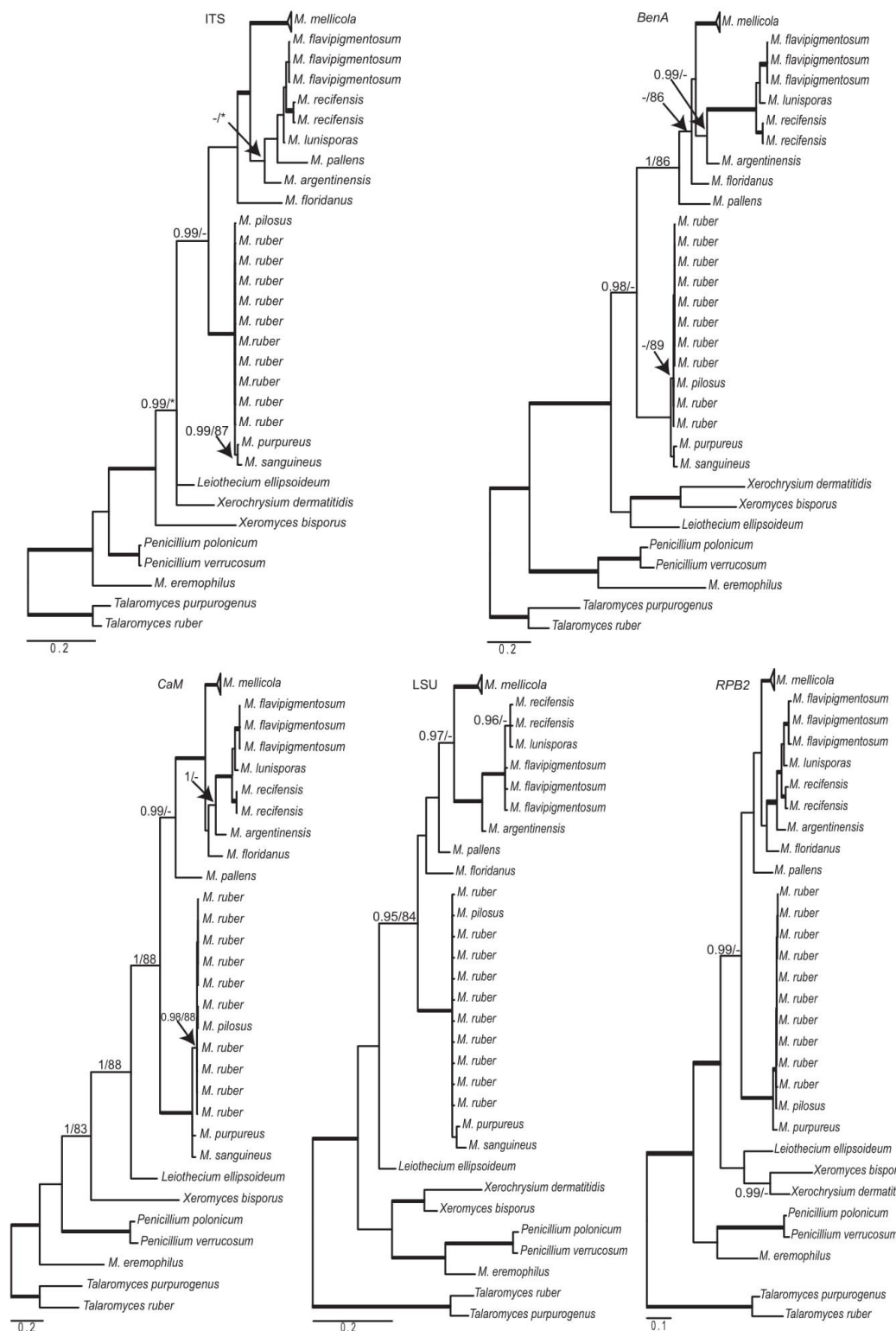


Fig. 2. Single gene phylogenetic trees of the ITS, BenA, CaM, LSU and RPB2 gene regions of species from *Monascus*. Branches with posterior probability values of 1.00 and >95 % are thickened.

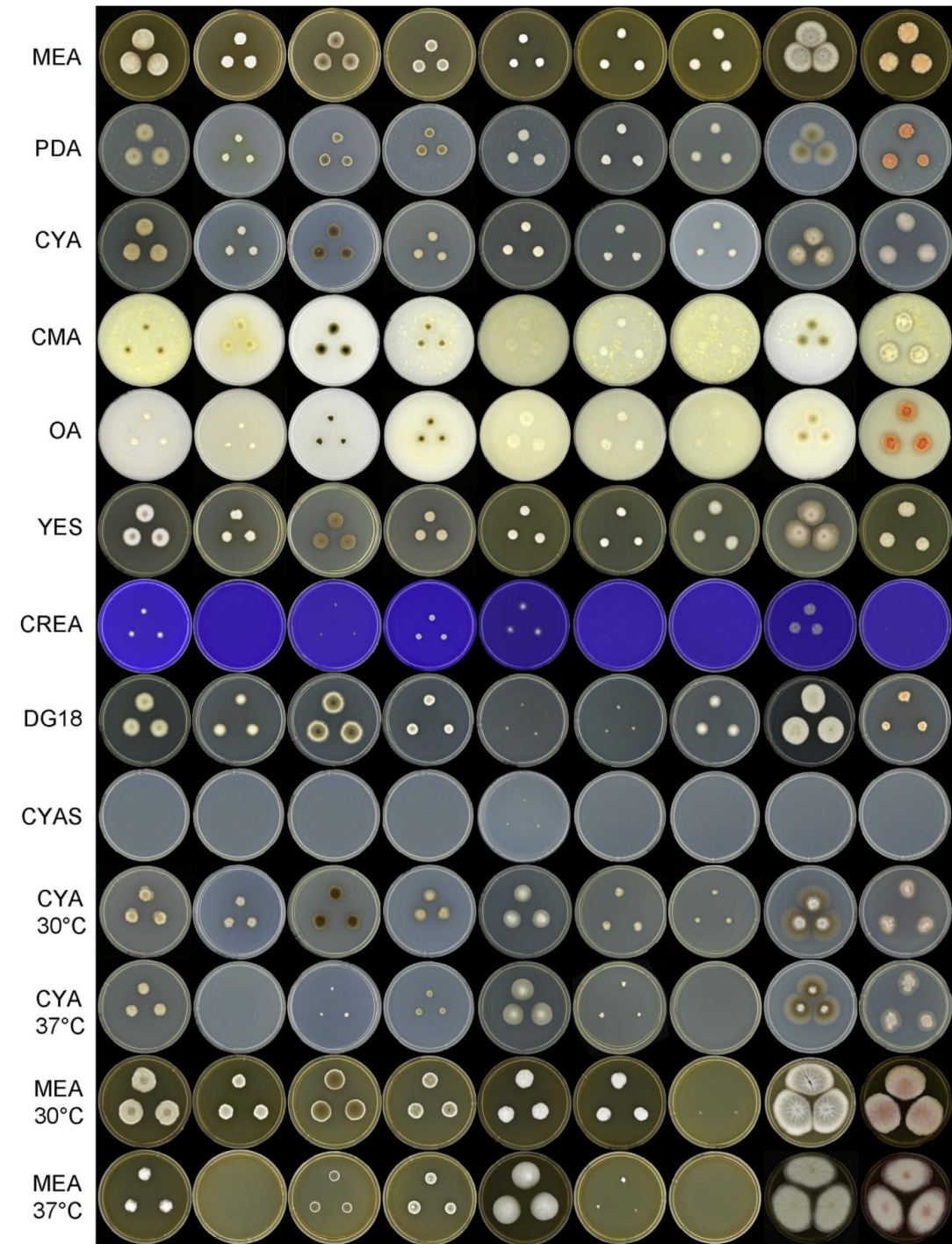


Fig. 3. Cultural characters of *Monascus* species on different agar media and incubation conditions. Left to right: *M. lunisporas*, *M. flavipigmentosus*, *M. recifensis*, *M. mellicola*, *M. pallens*, *M. floriclanus*, *M. argentinensis*, *M. ruber* and *M. purpureus*.

M. floriclanus-clade grow restricted on MEA, PDA, CYA, CMA, OA and YES and have no or restricted growth on CYA incubated at 37 °C. Furthermore, the colonies are in shades of brown, the conidia are brown pigmented and the mycelium is white to

olivaceous-brown (Fig. 3). The isolates belonging to the *M. ruber*-clade can be differentiated from the *M. floriclanus*-clade species by their faster growth on MEA, PDA, CYA, CMA, OA and YES at 25 °C and CYA incubated at 37 °C. The colonies of

M. ruber-clade species are in shades of white when young, and turn to shades of brownish-red, orange to red after 7–10 d incubation (Fig. 3). The species can be differentiated using phenotypic characters; however, for most species only the type strain or a representative was available and examined. The most important macro- and microscopic characters are given in Tables 2, 3 and Fig. 4.

Extrolites

Monascus species are good producers of known and uncharacterized extrolites and an overview is given in Table 4. The majority of the species produced a species specific profile of extrolites. *Monascus recifensis* produced asterric acid, methylasterrate, secalonic acid, (–)-bisdechlorogedoin, questin, secalonic acid D and a compound with an orthosporin-chromophore (orthosporin-like), *M. argentinensis* produced rubratoxin A and B or similar nonadrides (rubratoxin-like extrolites) and *M. flavipigmentosus* produced a series of extrolites that are to our knowledge never detected in any other filamentous fungus until now. *Monascus floridanus* produced an orthosporin and other extrolites only found in this species. The extrolite called "GULLA" is produced by *M. mellicola* and *M. recifensis*, while *M. pallens* produces curvularin and dehydrocurvularin (Tables 4 and 5). It is interesting that a series of extrolites with characteristic chromophores (metabolite families M, N, O, Y) (see Supplementary material for UV spectra) have only been found in *Monascus* species so far. In the examination of thousands of extrolite extracts from species in *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paeicilomyces*, *Talaromyces*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Chaetomium* and other genera, those compounds have never been detected (JC Frisvad, personal observations). These extrolites are unique for *Monascus* species may have ecological roles in the interaction with bees.

Identification of *Monascus* isolates associated with *Melipona scutellaris*

Thirty isolates were obtained from honey, pollen and the inside of the nest of *Melipona scutellaris*, representing three new (*M. flavipigmentosus*, *M. mellicola* and *M. recifensis*) and one described species (*M. ruber*). *Monascus mellicola* was predominantly present (16 isolates), followed by *M. ruber* (9), *M. flavipigmentosus* (3) and *M. recifensis* (2). Nine *M. mellicola* isolates were isolated from honey, five from the inside of the nest and two from pollen. Sequence variation is observed among the investigated *M. mellicola* isolates, showing that the isolates don't have a clonal distribution. The *M. ruber* isolates were all from the inside of the nest and their identity was in agreement with the results of the morphological examination (Fig. 5). *Monascus flavipigmentosus* was isolated from inside nests (2 isolates) and pollen (1 isolate) and both *M. recifensis* isolates were from pollen.

DISCUSSION

Monascus belongs to the order Eurotiales, and this genus is characterized by the production of stalked cleistothecial ascogmata that are non-ostiolate and have hyaline to brown walls. The ascogmata cavity is filled with unicellular ascospores. Asexual reproduction takes place on basipetospore-type

Table 2. Growth rate comparison of *Monascus* species after 7 d (in mm) and most important colony characters.

Species	CYA	MEA	DG18	CYAS	OA	CREA	YES	CMA	PDA	MEA 30 °C	CYA 30 °C	MEA 37 °C	CYA 37 °C	Colour mycelium on MEA	Soluble pigments
<i>Monascus argentinensis</i>	8–9	11–13	13–15	ng	10–11	ng	14–15	9–10	10–11	ng	5–6	ng	ng	White	Absent
<i>M. flavipigmentosus</i>	7–10	10–12	8–10	ng	4–5	ng	10–11	10–12	6–8	10–11	9–10	0–2	0–3	White	Yellow
<i>M. floridanus</i>	9–10	9–10	3–5	ng	10–11	ng	9–10	9–10	10–11	10–11	8–10	2–4	3–4	White	Absent
<i>M. lunisporus</i>	15–17	24–25	20–22	ng	14–15	3–5	20–23	19–20	18–20	24–25	15–17	9–10	12–13	Brownish	Absent
<i>M. mellicola</i>	8–10	11–12	7–10	ng	9–10	5–7	10–11	9–10	9–10	21–22	11–12	11–12	5–7	White	Absent
<i>M. pallens</i>	10–11	8–10	3–4	3–4	14–15	9–10	10–11	9–11	12–13	11–15	17–18	26–30	21–22	White	Absent
<i>M. purpureus</i>	19–20	20–22	3–5	ng	16–20	ng	13–18	18–20	11–15	39–40	20–21	52–55	20–21	Red to orange	Orange
<i>M. recifensis</i>	12–14	16–18	20–21	ng	3–5	1–2	14–15	10–12	10–11	19–20	10–11	9–10	3–4	White to brownish	Absent
<i>M. ruber</i>	17–19	25–26	18–20	ng	18–20	8–10	17–28	15–20	26–30	47–48	35–37	49–50	35–40	White	Absent



Table 3. Most important micromorphological characters for species recognition.

Species	Colour and size (μm) ascomata on PDA	Shape ascospores on PDA	Size ascospores (μm)	Shape and colour conidia	Size of conidia (μm)	Number of conidia per phialide
<i>Monascus argentinensis</i> *	Dark olivaceous-brown, 20–75	Ellipsoidal to subglobose	3–4 $\times$ 2.5–3	Globose to obovoid or obpyriform	Globose, 5–15; obpyriform, 7–15 $\times$ 5–9	Single or formed in short chains
<i>M. flavipigmentosus</i>	Hyaline to brown, 40–60	Lunate	4–5 $\times$ 1.7–2.5	Globose to subglobose, hyaline to brown	5.5–7.5	Single or formed in short chains
<i>M. floridanus</i> *	Dark brown, 22–58	Ellipsoidal	3.5–4.5 $\times$ 2–3	Globose to obovoid or obpyriform, pale brown	4–9 $\times$ 3.5–9	Single or formed in short chains (up to 6?)
<i>M. lunisporas</i> *	Brown, 25–60	Lunate	6–7 $\times$ 2–2.5	Globose to obpyriform, hyaline to brown	Globose, 6–11; obpyriform, 5–7 $\times$ 7–10	Single or formed in short chains
<i>M. mellicola</i>	–	–	–	Globose to subglobose, hyaline to brown	2.5–5.0 $\times$ 3.5–5.0	Single or up to 17 conidia
<i>M. pallens</i> *	Hyaline, 23–38	Ellipsoidal	3.5–4 $\times$ 2.5–3	Usually pyriform, hyaline	3.5–10 (–13) $\times$ 2.5–8	Short terminal or intercalary basipetal
<i>M. purpureus</i> **	Hyaline, (25–) 45 $\times$ 60 (–70)	Ellipsoidal	(5.5–) 6–7 $\times$ 4–5	Globose to obpyriform	8–11 $\times$ 8–10	Single or in short chains
<i>M. recifensis</i>	–	–	–	Globose to subglobose, hyaline to brown	4.0–7.0	Single or in short chains
<i>M. ruber</i> **	Brown, 30–50 (–60)	Ellipsoidal	5–6 (–7.5) $\times$ (3.5–) 4–5	Globose to obpyriform	10–18 $\times$ 8–14	Single or up to 10 conidia

Abbreviations: *Data from original description; **Data from Hawksworth & Pitt (1983); –: not observed.

conidiophores. These conidiophores are erect, variable in length, and the conidia are hyaline to brown and produced singly or in short basipetal chains (up to 15–20 conidia). Phenotypic identification of *Monascus* species largely depends on shape, size and pigmentation of the cleistothecia and ascospores (Hawksworth & Pitt 1983). No cleistothecia and only the basipetospore-state was observed in the two newly described species *M. mellicola* and *M. recifensis*; however, these species do phylogenetically belong to the *Monascus* clade. They produce a basipetospore-state, which is the characteristic asexual stage of this genus. Following the latest International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (McNeill et al. 2012), in respect to the principle of priority, and that nomenclature has economic and social implications, particularly for old, important genera, we give priority to *Monascus* over *Basipetospora*, even when no sexual state is observed in those species. This is in line with the recommendations of Rossman et al. (2016), who also recommended giving priority to the name *Monascus* over *Basipetospora*.

In the last years numerous new genera have been proposed primarily based on phylogenetic data and sometimes with only a few distinctive morphological features. Phenotypic and phylogenetic analysis revealed two well-supported clades in *Monascus*. Following the guidelines proposed by Vellinga et al. (2015), these differences would justify splitting *Monascus* into two separate genera. On the other hand, *Monascus* species do share various characters, such as similar basipetospore-type conidiophores and stalked cleistothecia. The majority of *Monascus* species produce indole alkaloids (possibly gypsetins) and this study shows that various *Monascus* species are also associated with stingless bees, indicating that they are also ecologically related. We therefore give preference to introduce two new sections instead of two small genera. A sectional classification system is commonly applied in genera related to *Monascus*, such as *Penicillium*, *Aspergillus* and *Talaromyces*

and this is in line with that approach (Gams et al. 1985, Houbraken & Samson 2011, Yilmaz et al. 2014). The two sections have few extrolites in common (Table 5). The *Rubri* section contains species that produce mevinolins, citrinin and other yellow and red azaphilone pigments, including the red pigments (rubropunctamine, PP-V, PP-R etc.) that are colouring red rice, while the species in section *Floridani* do not produce any of these bioactive extrolites at all. Isolates in each species in section *Floridani* produce species specific combinations of extrolites, and few are in common between those species. One example is the red compound “GULLA”, which was detected in both *M. mellicola* and *M. recifensis*, but the latter species produce several extrolites that are not produced by *M. mellicola*, including secalonin acid D, asteric acid, questin, (–)-bisdechlorogedonin and some red anthraquinone extrolites not related to the azaphilones produced by *M. purpureus* and *M. ruber*. Strains of *M. flavipigmentosus* produce a high number of unique as yet not structure elucidated extrolites, including some yellow coloured extrolites (Y1 and Y2) and an anthraquinone (Table 5). The red extrolite “GULLA” has previously been found in *Penicillium* species, including *Penicillium oxalicum* and *P. mononematousum* (Frisvad, personal communication).

Several morphological features are shared between *Monascus* species; however, there are also various characters that can be used for identification (Tables 2 and 3). For example, the conidial size can differ between species. All species except two (*M. mellicola*, *M. recifensis*) produce a sexual state and the size and shape of the ascospores can differ among species. The species also differ in their growth rates, and for example *M. flavipigmentosus*, *M. pallens* and *M. floridanus* grow more restrictedly on agar media than *M. ruber* and *M. purpureus*. Most species do not produce soluble pigments; however, the production of red (soluble) pigments is a character of *M. purpureus* and *M. ruber* (Hawksworth & Pitt 1983) and *M. flavipigmentosus* produces yellow pigments on CMA and PDA (and old cultures on

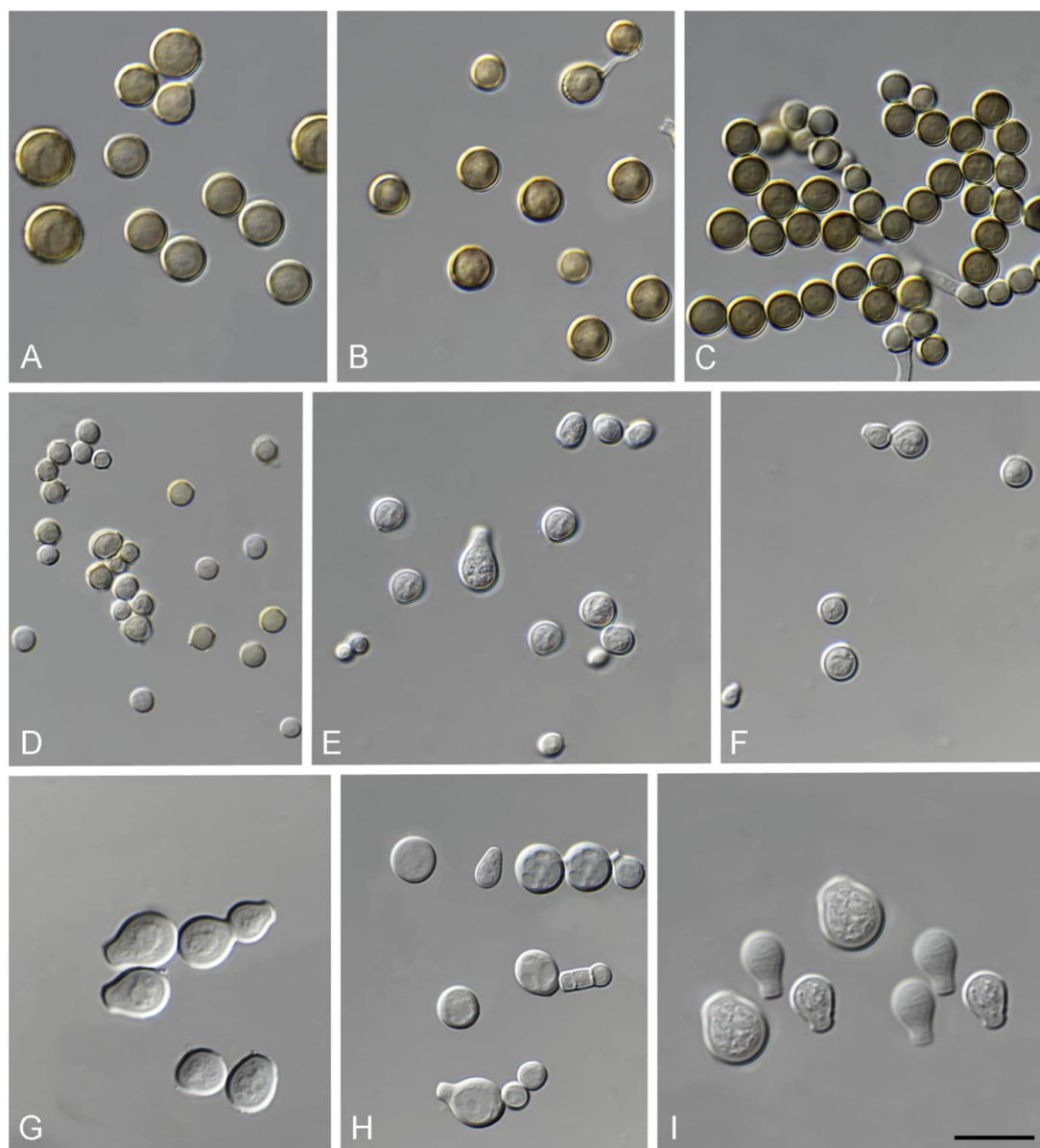


Fig. 4. Conidial shapes and colours of *Monascus* species. A. *M. lunisporas*. B. *M. flavipigmentosus*. C. *M. recifensis*. D. *M. mellicola*. E. *M. pallens*. F. *M. floridanus*. G. *M. argentinensis*. H. *M. ruber*. I. *M. purpureus*. Scale bars = 10 µm.

DG18). Also the growth rate at 37 °C is diagnostic. *M. pallens*, *M. ruber* and *M. purpureus* grow equally or even faster at 37 °C than at 30 °C. On the other hand, *M. floridanus* and *M. mellicola* and *M. recifensis* grow slowly at 37 °C, and *M. argentinensis* and *M. flavipigmentosus* did not grow at this temperature at all.

All species except *M. floridanus* produced a species-specific series of extrolites, consistent with the phenotypic classification and the results obtained in the phylogenetic study. *Monascus lunisporas*, *M. recifensis* and *M. flavipigmentosus* are phylogenetically closely related. Their extrolite profiles are distinct. *Monascus flavipigmentosus* produces metabolites of biosynthetic family M and *M. recifensis* secalonin acid, asteric acid,

sulochrin, questin and an anthraquinone with the same UV spectrum as physcion (physcion-like in Table 4). None of these extrolites were found in the closely related species *M. lunisporas* (CBS 142230^T). An indole alkaloid (probably gypsetin) was produced by 6 of the 9 species (Table 4) and was the only metabolite found in section *Floridani* and *Rubri*. The metabolites mevinolins and xanthomonasin A were only detected in *M. ruber*-clade species. An important characteristic of *Monascus ruber* is its ability to produce citrinin, a compound with both antibiotic and toxic activity. According literature, this extrolite is also produced by *M. purpureus*, *M. pallens*, *M. lunisporas* and *M. floridanus* (Wang *et al.* 2005). In our study, citrinin was detected only in the

Table 4. Extrolites detected in *Monascus*.

Species	Extrolites
<i>Monascus argentinensis</i>	Antraquinone Z, indole alkaloid (possibly gypsetin), rubratxin-like
<i>M. flavipigmentosus</i>	Antraquinone X (possibly atrochryson), indole alkaloid (possibly gypsetin), unknown and unique metabolite biosynthetic family M and Y (Y1 and Y2)
<i>M. floridanus</i>	"ENDI", orthosporin-like, "JOPS"
<i>M. lunisporas</i>	Citrinadin-like, indole alkaloid (possibly gypsetin), metabolite N series, metabolite O series, shamixanthone-like
<i>M. mellicola</i>	Indole alkaloid (possibly gypsetin), "GULLA"
<i>M. pallens</i>	Curvularin, dehydrocurvularin, indole alkaloid (possibly gypsetin)
<i>M. purpureus</i>	Citrinin, mevinolins, monascin, PP-V, PP-R, rubropunctamine, rubropunctatin, xanthomonasin A
<i>M. recifensis</i>	Antraquinone X (= atrochryson?), asteric acid, (-)-bisdechlorogedon, "GULLA", orthosporin-like, antraquinone W (physcion-like), questin, red antraquinone pigments, secalonic acid D, sulochrin
<i>M. ruber</i>	Indole alkaloid (possibly gypsetin), mevinolins, monascin, PP-V, PP-R, xanthomonasin A, rubropunctamine, rubropunctatin, rubratxin-like

type of *M. purpureus*. More strains in addition to other culture conditions stimulating citrinin production should be investigated to find out if other species besides *M. purpureus* can produce citrinin.

Based on the results of our study combined with data from previous studies, we accept nine species in *Monascus*: *M. argentinensis*, *M. floridanus*, *M. lunisporas*, *M. mellicola*, *M. pallens*, *M. purpureus*, *M. ruber*, *M. recifensis* and *M. flavipigmentosus* (Hawksworth & Pitt 1983, Park et al. 2004). *Monascus pilosus*, *M. sanguineus* are also often mentioned in literature as accepted species in *Monascus*. Phenotypically, *M. pilosus* is very similar to *M. ruber* and according literature, Hawksworth & Pitt (1983) indicated that they can be differentiated by the size of ascospores (25–55 vs 30–50 (–60) µm), ascospores (5–7 (–8.5) × 3–3.5 (–4) vs 5–6.5 (–7.5) × (3.5–) 4–4.5 µm) and the presence of a brownish pigment in the cleistothecial walls and conidia. These sizes and colours are overlapping and during the study of the *M. ruber* isolates associated with bees, we also found considerable variation in pigmentation among the studied strains. Previous studies showed that *M. pilosus* shares ITS and partial LSU and β-tubulin sequences with *M. ruber* (Park & Jong 2003, Park et al. 2004), suggesting that these are conspecific. *Monascus pilosus* clusters together with *M. ruber* in all of our single gene phylogenies, confirming these results. Additionally, *M. ruber* and *M. pilosus* are similar also in their metabolite profiles and share the production of mevinolins, rubropunctamine and xanthomonasin. Subsequently, there is no basis to accept *M. pilosus* as a separate species. Based on sequence data, *M. sanguineus* is treated here as a synonym of *M. purpureus*. Analysis of partial β-tubulin sequences (another part of the gene than used in this study) showed that *M. sanguineus* and *M. purpureus* are phylogenetically closely related and distinct from *M. ruber* (Park et al. 2004). These results are confirmed in our *BenA*, *CaM*, ITS

and LSU phylograms, though statistical support was only found in the ITS phylogram. Based on the GCPSR concept, these species are treated as separate species. Phenotypically, *M. sanguineus* is differentiated from *M. purpureus* by its inability to grow on G25N and colour of ascospores and conidia; however, these characters might not be stable among a larger set of isolates, and this needs further investigation.

Many other species are described in *Monascus*: *M. albidulus* (= *M. albidus* nom. inval.), *M. araneosus*, *M. aurantiacus*, *M. fumeus* (= *M. fuliginosus* nom. inval.), *M. kaoliang*, *M. major*, *M. paxii*, *M. pilosus* nom. inval., *M. pubigerus*, *M. rubiginosus*, *M. rutilus* (= *M. anka* nom. inval.), *M. rubropunctatus*, *M. serorubescens*, *M. vitreus*. All these species belong to the *M. ruber*-clade (Hawksworth & Pitt 1983, Park & Jong 2003). A detailed study is needed to determine the species diversity within the *M. ruber*-clade and to resolve the placement of the *M. ruber*/*M. purpureus* synonyms. Six *Basipetospora* species (*B. chlamydospora*, *B. denticola*, *B. halophila*, *B. rubra*, *B. variabilis*, *B. vesicarium*) are described and those might compete with the new species that are described here, especially those that lack a sexual state. However, *Basipetospora rubra* was described as the asexual state of *M. ruber* and is in the single name nomenclature system regarded as a synonym of this species. *Basipetospora halophila* phylogenetically belongs to *Aspergillus* and was recently transferred to this genus (Samson et al. 2014, Kocsubé et al. 2016). *Basipetospora chlamydospora*, *B. variabilis* and *B. denticola* represented by CBS 228.84 (16S rRNA, AB024045), CBS 995.87 (16S rRNA, AF437892) and CBS 132.78 (ITS, LN850801), respectively, belong to *Microascales*. The first two species might represent a novel genus in this order (J. Woudenberg, pers. comm.) and the latter is a synonym of *Scopulariopsis candida* (Jagielski et al. 2016). *Basipetospora vesicarium* can be considered a synonym of *M. ruber*. This species was introduced based on examination of the type specimen of *Sporotrichum vesicarium* and analysis of this specimen revealed the presence of the *Basipetospora* anamorph of *M. ruber* (Stalpers 1984).

When *Monascus eremophilus* was described, Hocking & Pitt (1988) noted the unique features of this species. Based on colony colour and the mode of ascospore production they decided that the species could best be classified in *Monascus*. After its description, *Monascus eremophilus* was included in various phylogenetic studies; however, results concerning its placement inferred from different DNA regions were inconclusive. Park & Jong (2003) evaluated the use of D1/D2 sequences of the LSU rRNA for species differentiation in *Monascus*, and simultaneously performed a phylogenetic analysis. In their study, *M. eremophilus* was found in the clade containing the type of *M. ruber*; however, the bootstrap support of that clade was low (61 %). In 2004, Park et al. studied the genus *Monascus* by using ITS and partial β-tubulin gene sequences. The position of *M. eremophilus* was unresolved in their ITS phylogram, and the species grouped together with *M. lunisporas* and *M. pallens* with less than 50 % bootstrap support. Moreover, when the β-tubulin sequences were used, *M. eremophilus* was placed outside the ingroup. The authors commented that such an inconclusive placement of *M. eremophilus* might indicate: '... a unique and unpredictable genetic combination for this species. It might reflect enormous and extreme environmental stress and subsequent drastic genetic changes to adapt to extremely dry conditions' (Park et al. 2004). More recently, based on D1/D2 sequence data, Vinnere-Pettersson et al. (2011) showed that *M. eremophilus* does not

Table 5. Retention index and absorption maxima for extrolites detected in *Monascus* (the UV spectra of the unknown compounds are shown in the [Supplementary data](#)).

Extrolite	Retention index	Absorption maxima (nm)	Extrolite by section
Anthraquinone X (= atrochrysone?)	1207	220, 261, 282sh, 427	Floridani
Anthraquinone Z	948	223, 271, 298, 433	Floridani
Asterric acid	921	207, 220sh, 252, 317	Floridani
Asterric acid derivative	825	207, 220sh, 252, 317	Floridani
(-)-bisdechlorogeodin	868	203, 224sh, 278, 336sh	Floridani
Citrinadin-like	783, 821, 830	200, 227sh, 246, 265sh, 325	Floridani
Citrinin	907	221, 242sh, 328, 415sh	Rubri
Curvularin	881	200, 223, 270, 301	Floridani
Dehydrocurvularin	861	202, 225, 283, 334sh	Floridani
ENDI	745	End-absorption	Floridani
GULLA	1007	202, 258, 286, 328, 369, 428	Floridani
Indole alkaloid (= gypsetin-like)	967	224, 278, 288, 295	Floridani, Rubri
JOPS	1098	208, 248, 275, 353	Floridani
Metabolite M series	845, 854, 865, 881, 906, 946	291, 242sh, 283, 318	Floridani
Metabolite N series	917, 1048	203, 236, 251sh, 326, 381	Floridani
Metabolite O series	905, 982, 993	202, 226sh, 254, 272sh, 335	Floridani
Metabolite Y series	1097 (Y1), 1273 (Y2)	200, 228sh, 274, 375	Floridani
Methyl asterrate	934	200, 227sh, 246, 265sh, 325	Floridani
Mevinolin	1232	230sh, 240, 250sh	Rubri
Mevinolin, open acid form	1121	230sh, 240, 250sh	Rubri
Monascin	1251	230, 282, 397	Rubri
Rubratoxin-like (Nonadrides, provisionally identified as rubratoxins)	1033, 1066	215sh, 263	Floridani
Orthosporin-like	721	241sh, 248273, 282, 324	Floridani
Physcion-like (anthraquinone W)	1079	221, 250sh, 264, 282, 331, 440	Floridani
PP-V	943	250, 296, 420, 524	Rubri
PP-R	981	252, 306, 417, 524	Rubri
Questin	958	223, 247sh, 280, 428	Floridani
Red anthraquinone series	1316, 1326, 1387, 1412, 1422	227, 268, 330, 442	Floridani
Rubratoxin-like	1198	202, 251	Floridani, Rubri
Rubropunctamine	1417	218, 250, 279, 298sh, 447sh, 475, 512sh	Rubri
Rubropunctatin	1252	218sh, 235, 279, 394475sh, 521	Rubri
Secalonic acid D	1104	200, 215sh, 258, 331, 388sh	Floridani
Shamixanthone-like	1121	201, 228, 263, 301, 366	Floridani
Sulochrin	873	203, 224sh, 278, 324sh	Floridani
Xanthomonascin A	1143	230, 282, 397	Rubri

Asterric acid, methyl asterrate and (-)-bisdechlorogeodin are all part of the geodin biosynthetic family; sh: shoulder.

belong to *Monascus*, and appears to be related to *Penicillium*. In order to clarify the difference placements of *M. eremophilus* in literature, we re-analysed the LSU data set of [Park & Jong \(2003\)](#) and [Vinnere-Pettersson et al. \(2011\)](#) together with the data set generated in this study (data not shown). These results show that the sequence (AF365023) used in the study of [Park et al. \(2004\)](#) does not match with the other sequences generated from *M. eremophilus*, explaining the various phylogenetic placements of this species. Based on a 4-gene phylogeny, [Houbraken et al. \(2014\)](#) confirmed its placement in *Penicillium*. They confidently place the species on a branch together with members of section *Charlesia* (*P. charlesii* CBS 304.48^T, *P. fellutanum* CBS 229.81), though there is sufficient genetic distance that would warrant

placement of this species in a new section. Based on this literature review and additional (sequence) data generated in this study, we propose to transfer *M. eremophilus* in *Penicillium*. The placement of this species in *Penicillium* is unexpected. *Penicillium eremophilum* is, unlike any other *Penicillium* (and *Monascus*) species, an obligate xerophile. The species is not known to produce an asexual state and there were until now no strictly sexually reproducing species within *Penicillium*, though conidiophores can sometimes be sparsely produced in sexually reproducing *Penicillium* species. The formation of two-spored asci is also not shared with other *Penicillium* species. This feature, together with its xerophily, is shared with the phylogenetically distant species *Xeromyces bisporus*.

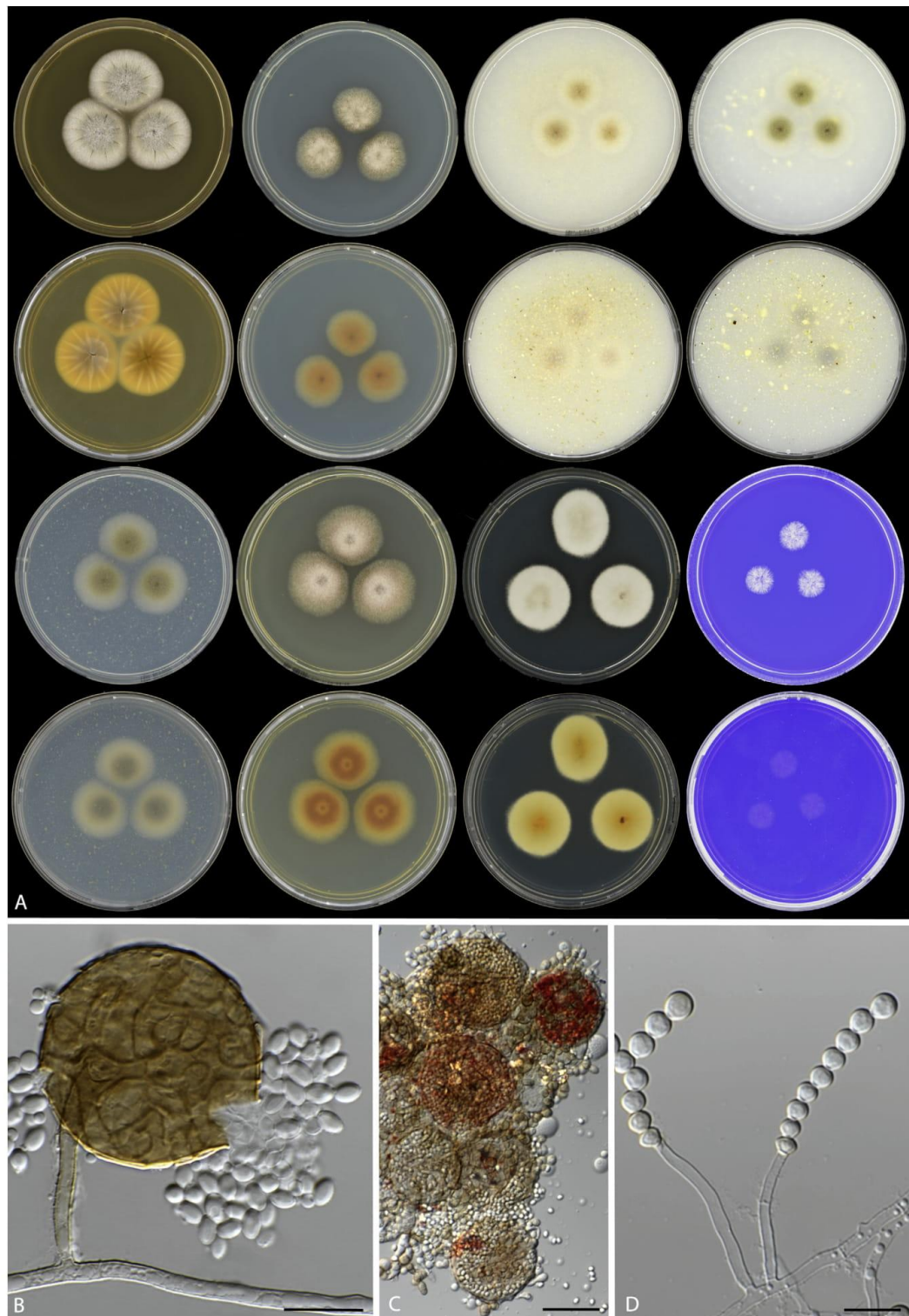


Fig. 5. *Monascus ruber* URM 7525 isolated during the course of this study. **A.** Colonies from left to right (first row) MEA, CYA, OA, CMA; (second row) MEA reverse, CYA reverse, OA reverse, CMA reverse; (third row) PDA, YES, DG18, CREA; (forth row) PDA reverse, YES reverse, DG18 reverse, CREA reverse. **B–C.** Typical ascoma and ascospores. **D.** Conidiophores with conidia chain. Scale bars = 10 µm.

The ITS region is the official DNA barcode for fungi, and is good practice to include ITS sequences whenever new species are described (Schoch *et al.* 2012). However, not all species can be identified using this marker because certain species share identical ITS sequences (e.g. Houbraken *et al.* 2014, Chen *et al.* 2016). All *Monascus* species can be recognized on their ITS sequence only, even though the interspecific differences are low, especially between *M. ruber* and *M. purpureus*. Whether these barcode gaps remain present when a larger set of isolates is investigated remains unknown. A larger sequence variation was observed in the *BenA* gene. This gene is used as secondary barcode for the related genera *Penicillium* and *Talaromyces* and we propose the same for *Monascus* (Visagie *et al.* 2014, Yilmaz *et al.* 2014). The *BenA* gene is easy to amplify in *Monascus* and can distinguish all species. LSU has limited resolving power and *RPB2* is more difficult to amplify and is therefore only recommended in phylogenetic studies.

Stingless beekeeping, or meliponiculture, is an ancient activity and many species of stingless bees are managed in the Americas, Africa, Asia and Australia; however, it remains a largely under-exploited business and technical knowledge is scarce. Much practical and academic work is being done about the best ways of keeping these bees, multiplying their colonies, and exploring the honey they produce (Cortopassi-Laurino *et al.* 2006, Villanueva-Gutiérrez *et al.* 2013, Jaffé *et al.* 2015). *Melipona scutellaris* is most known in the Northeast of Brazil. Furthermore, these bees are important pollinators in agricultural and natural ecosystems. Recently, a fungus cultivation mutualism in a social bee (*Scaptotrigona postica*) was reported for the first time (Menezes *et al.* 2015). The larvae of *S. postica* have a higher survival rate when they were fed with food grown with *Monascus* mycelium. The symbiotic relationships between microorganisms and stingless bees have been poorly explored, and during our investigation of fungi associated with *Melipona scutellaris* bees, we frequently isolated *M. ruber* from the inside of nests. This indicates that also other bee species, like *Melipona scutellaris*, might also have an (obligatory) relationship with *M. ruber*. Besides *M. ruber*, also *M. mellicola* was frequently isolated from honey, pollen and the inside of nests, followed *M. recifensis* and *M. flavipigmentosus*. This association with bees might be a novel unexplored ecological niche of *Monascus* species and can be the subject of future studies. The antibiotic and antifungal activity of some *Monascus* strains might play a role in the protection of the larvae food from microbial contaminations (Jůzlová *et al.* 1996, Menezes *et al.* 2015) and our discovery of many *Monascus*-unique extrolites in these species (metabolite families M, N, O, and Y) invites structure elucidation and bioactivity testing of those compounds. Stchigel & Guarro (2007) studied several cleistothecial ascomycetes and they concluded that the criterion of the production of closed ascumata without a predefined opening and with an irregular arrangement of asci at the centre is of little systematic value. A recent study about fungi living with association with solitary bees collected in Denmark suggest the convergent evolution of reduced fruiting bodies in Pezizomycotina is adaptive for spore dispersal to the bee habitat (Wynns 2015). Interesting to note in this context is that *Monascus* forms smaller cleistothecia than those produced in the related genera *Aspergillus* and *Penicillium*.

In the past, taxonomic studies on *Monascus* were solely based on phenotypic characters, or when sequence data was used, these were mostly applied for identification purposes. With the transfer of *M. eremophilus* to *Penicillium*, monophyly in *Monascus* is restored. The presented 5-gene phylogeny is a good robust starting point for future taxonomic studies in *Monascus*. Furthermore, a list of accepted species is provided, including information on (ex-)type strains and molecular markers (see Taxonomy section).

TAXONOMY

Phylogenetically, two well-supported clades (*M. floridanus*-clade and *M. ruber*-clade) are present in *Monascus* and these groups can also be differentiated on phenotypic characters. Two sectional names are introduced for these clades and information on this taxonomic decision can be found in the Discussion. Our polyphasic approach revealed the presence of three new species and these are described below. Furthermore, a new combination for *Monascus eremophilus* is proposed.

Section **Floridani** R.N. Barbosa & Houbraken **sect. nov.** MycoBank MB820076.

Typus: *Monascus floridanus* P.F. Cannon & E.L. Barnard, Mycologia 79: 480. 1987. MycoBank MB132123.

Diagnosis: Colony diameter on MEA, PDA, CYA, CMA, OA, YES generally below 20 mm, no or restricted growth (<10 mm) on CREA and CYAS, and colony diameter less than 30 mm on MEA incubated at 30 and 37 °C. Colonies in shades of brown; conidia brown pigmented; mycelium white or in shades of brown.

Section **Rubri** R.N. Barbosa & Houbraken **sect. nov.** MycoBank MB820077.

Typus: *Monascus ruber* Tiegh., Bulletin de la Société Botanique de France 31: 227. 1884. MycoBank MB234876.

Diagnosis: Colony diameter on MEA, PDA, CYA, CMA, OA, YES generally above 15 mm, no or restricted growth on CREA and CYAS, good growth (>30 mm) on MEA incubated at 30 and 37 °C. Colonies in shades of brown to red; conidia brown pigmented; mycelium white or in shades of red or orange.

Monascus flavipigmentosus R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken **sp. nov.** MycoBank MB820072. Fig. 6.

Etymology: *flavipigmentosus* is referring to yellow pigment produced on CMA and PDA.

Diagnosis: *Monascus flavipigmentosus* is phylogenetically distinct by *BenA*, *CaM* and ITS sequencing and characterized by the absence of growth on CREA 25 °C, and MEA and CYA incubated at 37 °C. Yellow soluble pigments present on CMA and PDA (and old cultures on DG18).

In: *Monascus* section *Floridani*

Typus: **Brazil**, Recife, isolate inside nests of *Melipona scutellaris* Jun 2014, isolated by R.N. Barbosa (**holotype** URM 90064; culture ex-type URM 7536 = CBS 142366 = DTO 353-A2).

Barcodes: ITS barcode: KY511751 (alternative markers: *BenA* = KY709168; *CaM* = KY611929; *RPB2* = KY611968).

Colony diam, 7 d (mm): MEA 10–12; CYA 7–10; CMA 10–12; PDA 6–8; YES 10–11; OA 4–5; DG18 8–10; CYAS No growth; CREA No growth; CYA 30 °C 7–9; CYA 37 °C 0–2; MEA 30 °C 10–12; MEA 37 °C 0–3.

Description: Colonies characters after 7 d. MEA, 25 °C: colony texture velvety to floccose, pulvinate, mycelium white; sporulation absent; exudates absent; soluble pigments absent; reverse yellow. CYA, 25 °C: colony texture floccose low, mycelium white; sporulation absent; exudates absent; soluble pigments absent; reverse white to cream. CMA, 25 °C: colony texture lanose, low, mycelium inconspicuously white at the margin; sporulation weak at centre, conidia *en masse* dull brown; exudate absent; soluble pigments present, yellow; reverse yellow; ascumata abundantly produced, brown. PDA, 25 °C: colony texture floccose to lanose, low, mycelium white; sporulation absent; exudates absent; soluble pigments present, light yellow; colony reverse yellow. YES, 25 °C: colony texture floccose, low, mycelium white; sporulation absent; exudates absent; soluble absent; colony reverse yellow to brownish. OA, 25 °C: colony texture not determinate, mycelium white; sporulation absent, exudates absent; soluble pigments absent; colony reverse white to cream. DG18, 25 °C: colony texture velvety to floccose, low, mycelium white; sporulation absent; exudates absent; soluble pigments absent; reverse white to light yellow. CYAS, 25 °C: no growth. CREA, 25 °C: no growth. MEA, 30 °C: colony texture velvety, umbonate, mycelium white, sporulation absent, exudates absent; soluble pigments absent; reverse light brownish. CYA, 30 °C: mycelium brownish, sporulation weak, conidia *en masse* brownish; ascumata sparsely produced, brown; exudates absent; soluble pigments absent; reverse brownish. MEA, 37 °C: no growth. CYA, 37 °C: no growth.

Mycelium abundant, hyphae irregularly branched, hyaline to pale brown when old, smooth-walled, 1.8–3 µm wide. **Conidiophores** variable in length, smooth, 3–30 × 1.5–2.5 µm. **Conidia** single or formed in short basipetal chains, usually terminal, rarely intercalary, 5.5–7.5 × 5.5–7.5 µm diam, at first hyaline and pale brown to brown with age. **Ascumata**, stalked when young, non-ostiolate, globose to subglobose, 40–60 µm diam, initially light brown and dark brown in the age; peridium brown, developing irregularly polygonal plates, surrounded by short hyaline areas, in time filled with a compact mass of ascospores. **Asci** evanescent or no observed. **Ascospores** hyaline, 1-celled, reniform or allantoid, 4–5 × 1.7–2.5 µm, smooth-walled.

Notes: This species shares morphological features with *M. lunisporas*, but can be distinguished by the production of yellow soluble pigments on CMA and PDA, shorter conidiophores (3–28.5 × 1.5–2.5 µm vs 5–500 × 3–5 µm), smaller conidia (5.5–7.5 × 5.5–7.5 µm vs 6–11 µm) and ascospores (4–5 × 1.7–2.5 µm vs 6–7 × 2–2.5 µm).

Monascus mellicola R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken **sp. nov.** MycoBank MB820073. Fig. 7.

Etymology: *mellicola* refers to honey, the substrate from which the type species was isolated.

Diagnosis: *Monascus mellicola* is phylogenetically distinct by *BenA*, *CaM* and ITS sequencing, a sexual state is not observed in culture, and the species grows restricted on CREA incubated at 25 °C. No exudates and soluble pigments are produced on the agar media used in this study.

In: *Monascus* section *Floridani*

Typus: **Brazil**, Recife, honey from *Melipona scutellaris* Jun 2014, isolated by R.N. Barbosa (**holotype** URM 90065, culture ex-type URM 7510 = CBS 142364 = DTO 350-E6).

Barcodes: ITS barcode: KY511726 (alternative markers: *BenA* = KY709143; *CaM* = KY611904; *RPB2* = KY611943).

Colony diam, 7 d (mm): MEA 11–12; CYA 8–10; CMA 9–10; PDA 9–10; YES 10–11; OA 9–10; DG18 7–10; CYAS No growth; CREA 5–7; CYA 30 °C 10–11; CYA 37 °C 6–8; MEA 30 °C 14–15; MEA 37 °C 5–6.

Description: Colonies characters after 7 d. MEA, 25 °C: colony texture floccose, raised in centre; mycelium white; sporulation strong, conidia *en masse* brown; exudates absent; soluble pigments absent, reverse brown. CYA, 25 °C: colony texture velvety, low; mycelium white, sometimes inconspicuously brown; sporulation weak, conidia *en masse* brown; exudates absent; soluble pigments absent, reverse dark brown at centre to brownish at margins. CMA, 25 °C: colony texture velvety, low; mycelium white sometimes inconspicuously greyish olive, sporulation moderate, conidia *en masse* brown; exudates absent; soluble pigments absent; reverse dark brown. PDA, 25 °C: colony texture velvety, low; mycelium white sometimes inconspicuously brown; sporulation strong, conidia *en masse* brown; exudates absent; soluble pigments absent; reverse brownish. YES, 25 °C: colony texture velvety to floccose, low; mycelium white; sporulation strong, conidia *en masse* brownish; exudates absent; soluble pigments absent; reverse dark brown. OA, 25 °C: colony texture velvety, low; mycelium white, sporulation weak, conidia *en masse* brown; exudates absent; soluble pigments absent, reverse brown. DG18, 25 °C: colony texture velvety to floccose, low, mycelium white; sporulation absent; exudates absent; soluble pigments absent; reverse white in the margins and dark brown at centre. CYAS, 25 °C: no growth. CREA, 25 °C: mycelium white, sporulation absent; no acid production. CYA, 30 °C: colony texture velvety to floccose, low; mycelium brown, sporulation weak, conidia *en masse* brownish; exudates absent; soluble pigments absent; reverse brown. CYA, 37 °C: mycelium white, sporulation absent; exudates absent; soluble pigments absent, reverse brown. MEA 30 °C: mycelium white, sporulation moderate to strong, conidia *en masse* in shades of brown; exudates absent; soluble pigments absent; reverse brownish. MEA, 37 °C: mycelium white, sporulation in centre, weak, conidia *en masse* in shades of brown; exudates absent; soluble pigments absent; reverse yellow-brownish.

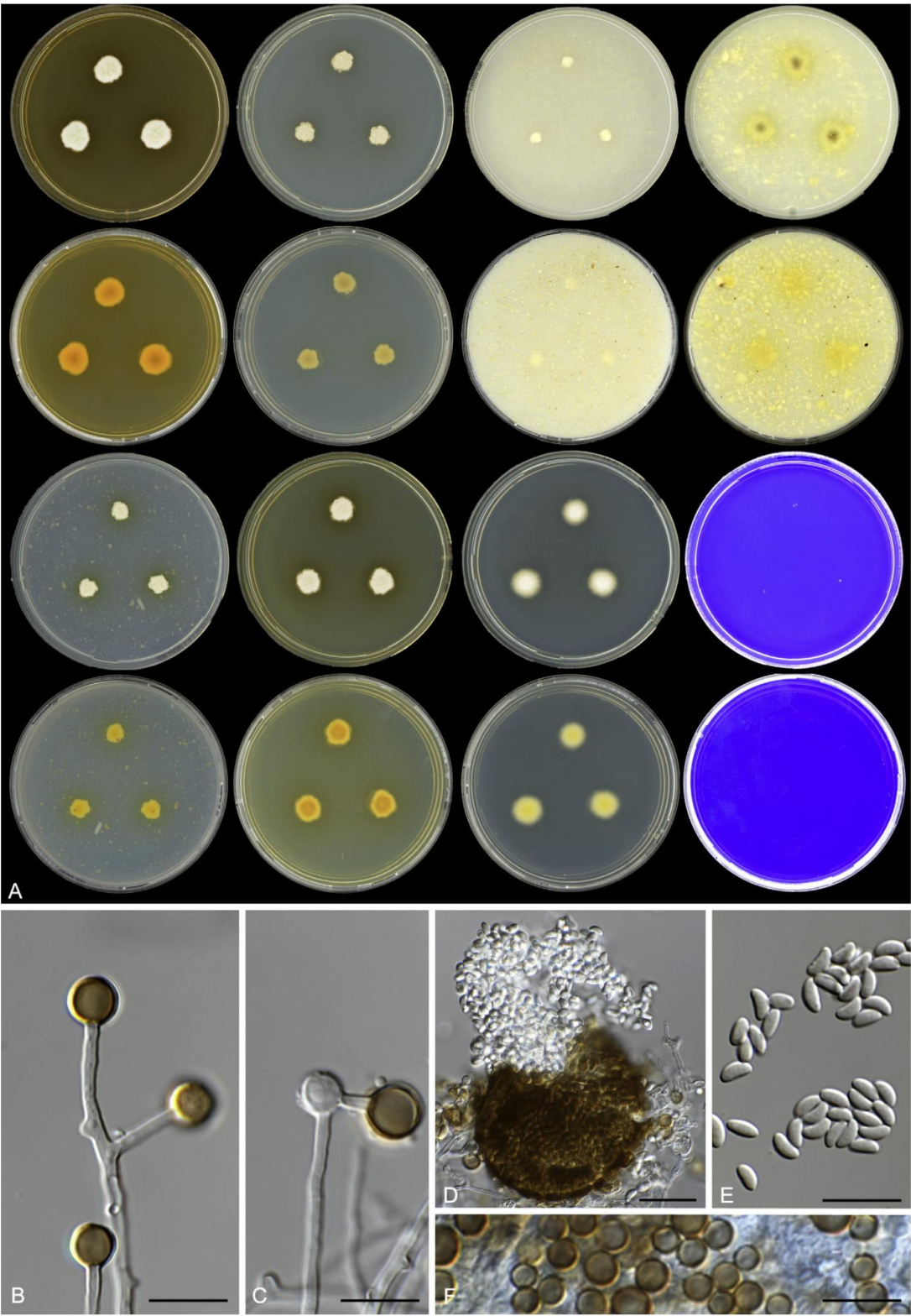


Fig. 6. *Monascus flavigimentosus*, URM 7536. **A.** Colonies from left to right (first row) MEA, CYA, OA, CMA; (second row) MEA reverse, CYA reverse, OA reverse, CMA reverse; (third row) PDA, YES, DG18, CREA; (forth row) PDA reverse, YES reverse, DG18 reverse, CREA reverse. **B–C.** Conidiophores. **D.** Ascoma. **E.** Ascospores. **F.** Conidia. Scale bars = 10 μm.



Fig. 7. *Monascus mellicola*, URM 7510. **A.** Colonies from left to right (first row) MEA, CYA, OA, CMA; (second row) MEA reverse, CYA reverse, OA reverse, CMA reverse; (third row) PDA, YES, DG18, CREA; (forth row) PDA reverse, YES reverse, DG18 reverse, CREA reverse. **B–E.** Conidiophores with conidia chain. **D.** Conidia. Scale bars = 10 μ m.

Mycelium abundant, hyphae irregularly branched, hyaline to pale brown when old, smooth-walled, 2.5–3 µm wide. *Conidiophores* basipetiospora-type, variable in length, smooth, 16–32 × 1.5–2.0 µm. *Conidia* formed basipetally, in long chains, up to 17 conidia, globose to subglobose, smooth-walled, 2.5–5.0 × 3.5–5.0 µm diam, hyaline when young, becoming pale brown to brown with age. Agglomeration of conidia with variable size observed, 45–65 × 55–65 µm diam. Sexual *morph* not observed.

Monascus recifensis R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken **sp. nov.** MycoBank MB820074. Fig. 8.

Etymology: *recifensis* refers to the Brazilian city Recife, the location of the type strain of this species.

Diagnosis: *Monascus recifensis* is phylogenetically distinct by *BenA*, *CaM* and ITS sequencing. The species is characterized by restricted growth on agar media, a sexual state is not observed, and the species doesn't produce exudates and soluble pigments on the agar media used in this study.

In: *Monascus* section *Floridani*

Typus: Brazil, Recife, isolated from pollen inside nests of *Melipona scutellaris* Jun 2014, isolated by R.N. Barbosa, (**holotype** URM 90066; culture ex-type URM 7524 = CBS 142365 = DTO 350-G6).

Barcodes: ITS barcode: KY511740 (alternative markers: *BenA* = KY709157; *CaM* = KY611918; *RPB2* = KY611957).

Colony diam, 7 d (mm): MEA 16–18; CYA 12–14; CMA 10–12; PDA 10–11; YES 14–15; OA 3–5; DG18 20–21; CYAS not growth; CREA 1–2; CYA 30 °C 13–15; CYA 37 °C 7–8; MEA 30 °C 17–20; MEA 37 °C 3–4.

Description: Colonies characters after 7 d. MEA, 25 °C: colony texture floccose to lanose, pulvinate, mycelium white, sporulation strong, conidia *en masse* brown; exudates absent; soluble pigments absent; reverse brownish. CYA, 25 °C: colony texture lanose, pulvinate; mycelium white sometimes inconspicuously brown; sporulation weak to moderate, conidia *en masse* brownish; exudates absent; soluble pigments absent; reverse dark brown to light brown close at margins. CMA, 25 °C: colony texture velvety, low; mycelium brown; sporulation moderate to strong at centre, conidia *en masse* dark brown; exudates absent; soluble pigments absent; reverse black. PDA, 25 °C: colony texture velvety to floccose; mycelium white; sporulation strong, *en masse* brownish; exudates absent; soluble pigments absent; reverse white to cream close at margins, dark brown at centre. YES, 25 °C: colony texture velvety, mycelium white sometimes inconspicuously brownish; sporulation strong, conidia *en masse* in shades of brown; exudates absent; soluble pigments present after 10 d. incubation, in shades of brown; reverse dark brown to light brown close at margins. OA, 25 °C: colony texture velvety; mycelium white; sporulation weak, conidia *en masse* dark brown; exudates absent; soluble pigments absent; reverse dark brown. DG18, 25 °C: colony floccose, mycelium white; sporulation weak to moderate, conidia *en masse* brownish; exudates absent; soluble pigments absent; reverse white close to margins and dark brownish at centre. CYAS, 25 °C: no growth. CREA, 25 °C:

growth very poor. MEA, 30 °C: colony texture velvety; mycelium white; sporulation moderate to strong, conidia *en masse* brown; exudates absent; soluble pigments absent; reverse brownish. CYA, 30 °C: colony texture velvety, mycelium brownish; sporulation moderate, conidia *en masse* brown; exudates absent; soluble pigments absent; reverse dark brown, white at margins. MEA, 37 °C: colony texture velvety; mycelium white; sporulation absent; exudates absent; soluble pigments absent; reverse cream. CYA, 37 °C: colony texture velvety to floccose; mycelium brownish; sporulation moderate, conidia *en masse* in shades of brown; exudates absent; soluble pigments absent; reverse dark brown.

Mycelium abundant, hyphae irregularly branched, hyaline to pale brown when old, smooth-walled, 1.8–2.5 µm wide. *Conidiophores* variable in length, smooth, 4.5–21.0 × 1.8–2.5 µm, sometimes with additional branch, *Conidia* single, globose, 4.0–7.0 × 4.0–7.0 µm diam, at first hyaline, pale brown to brown with age. Sexual *morph* not observed after 60 d incubation.

Notes: *Monascus lunisporas* and *M. flavipigmentosus* are phylogenetically closely related to *M. recifensis* and the latter species doesn't produce ascumata, exudates and soluble pigments. These species can also be differentiated by their unique extrolite profiles (Table 4).

Penicillium eremophilum (A.D. Hocking & Pitt) Houbraken, Leong & Vinnere-Pettersson **comb. nov.** MycoBank MB820075.

Basionym: *Monascus eremophilus* A.D. Hocking & Pitt, Mycologia 80: 84. 1988. MycoBank MB132383.

Typus: Australia, New South Wales, Sydney, isolated from mouldy prunes, isolated by A.D. Hocking, 1986 (Herb.: FRR 3338; Ex-type: IMI 313774 = CBS 123361 = ATCC 62925).

Barcodes: ITS barcode: GU733347 (alternative markers: *BenA* = KY709170; *CaM* = KY611931; *RPB2* = KY611970).

Notes: The colony morphology was identical to that described by Hocking and Pitt in 1998. *Monascus eremophilus* is indeed an obligate xerophile. No growth was observed on either MEA or MA20S at any temperature after incubation of one year. *Monascus eremophilus* grew well on MY50G within the range 10–25 °C. Good growth at 30 °C and absence of growth at 37 °C has been previously reported (Leong *et al.* 2011). Upon microscopy, ascumatal initials were observed after approximately a month of cultivation. However, these cleistothecia never matured and thus no ascospores were observed. No anamorph was observed during the time of cultivation or mentioned in the original description. The fact that we did not observe any fertile cleistothecia may indicate that the type strain (FRR 3338) is deteriorating. Molecular data shows that this species is related to *Penicillium* (Park *et al.* 2004, Vinnere-Pettersson *et al.* 2011, Houbraken *et al.* 2014) and is transferred to *Penicillium* (this study).

List of accepted species in *Monascus*

Monascus argentinensis Stchigel & Guarro, Stud. Mycol. 50: 301. 2004. [MB500076]. — Herb.: FMR 6778. Ex-type: CBS 109402 = FMR 6778. Section *Floridani*. ITS barcode: JF922046 (Alternative markers: *BenA* = KY709174; *CaM* = KY611935; *RPB2* = JN121423).

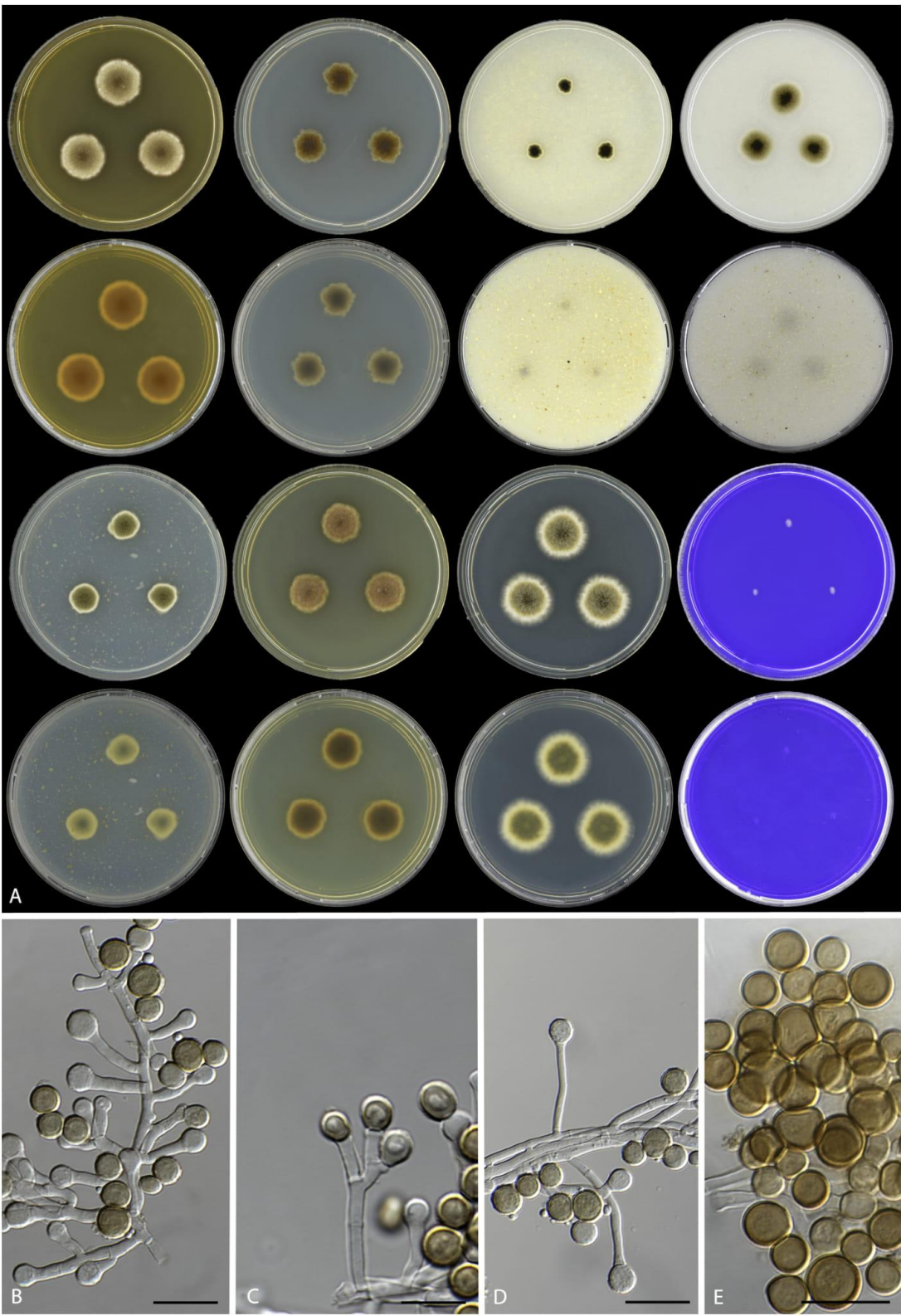


Fig. 8. *Monascus recifensis*, URM 7524. **A.** Colonies from left to right (first row) MEA, CYA, OA, CMA; (second row) MEA reverse, CYA reverse, OA reverse, CMA reverse; (third row) PDA, YES, DG18, CREA; (forth row) PDA reverse, YES reverse, DG18 reverse, CREA reverse. **B–D.** Conidiophores. **E.** Conidia. Scale bars = 10 μ m.

- Monascus flavipigmentosus* R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken (this study). [MB820072]. — Herb.: URM 90064. Ex-type: URM 7536 = CBS 142366 = DTO 353-A2. Section *Floridani*. ITS barcode: KY511751 (Alternative markers: *BenA* = KY709168; *CaM* = KY611929; *RPB2* = KY611968).
- Monascus floridanus* P.F. Cannon & E.L. Barnard, Mycologia 79: 480. 1987. [MB132123]. — Herb.: IMI 282587. Ex-type: FLAS F54662 = CBS 142228 = CGMCC 3.5843 = BCRC 33310 = UAMH 4180. Section *Floridani*. ITS barcode: KY635848 (Alternative markers: *BenA* = KY709172; *CaM* = KY611933; *RPB2* = KY611972).
- Monascus lunisporas* Udagawa & H. Baba, Cryptogamie Mycol 19: 270. 1998. [MB446999]. — Herb.: SUM 3116. Ex-type: CBS: 142230 = CGMCC 3.7951 = ATCC 204397 = NBRC 33241 = BCRC 33640. Section *Floridani*. ITS barcode: KY635847 (Alternative markers: *BenA* = KY709171; *CaM* = KY611932; *RPB2* = KY611971).
- Monascus mellicola* R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken (this study). [MB820073]. — Herb.: URM 90065. Ex-type: URM 7510 = CBS 142364 = DTO 350-E6. Section *Floridani*. ITS barcode: KY511726 (Alternative markers: *BenA* = KY709143; *CaM* = KY611904; *RPB2* = KY611943).
- Monascus pallens* P.F. Cannon, Abdullah & B.A. Abbas, Mycol. Res. 99: 659. 1995. [MB413476]. — Herb.: IMI 356820. Ex-type: BSRA 10266 = CBS 142229 = CGMCC 3.5844 = ATCC 200612 = BCRC 33641. Section *Floridani*. ITS barcode: KY635849 (Alternative markers: *BenA* = KY709173; *CaM* = KY611934; *RPB2* = KY611973).
- Monascus purpureus* Went, Ann. Sci. Nat., Bot. Ser. 8, 1, 1–18. 1895. [MB235390]. — Herb.: IMI 210765. Ex-type: CBS 109.07 = IFO 45 13 = ATCC 16426 = NRRL 1596 = FRR 1596. Section *Rubri*. ITS barcode: KY635851 (Alternative markers: *BenA* = KY709176; *CaM* = KY611937; *RPB2* = JN121422).
- Monascus recifensis* R.N. Barbosa, Souza-Motta, N.T. Oliveira & Houbraken (this study). [MB820074]. — Herb.: URM 90066. Ex-type: URM 7524 = CBS 142365 = DTO 350-G6. Section *Floridani*. ITS barcode: KY511740 (Alternative markers: *BenA* = KY709157; *CaM* = KY611918; *RPB2* = KY611957).
- Monascus ruber* Tiegh, Bull. Soc. Bot. France. 31: 227. 1884. [MB234876]. — Herb.: IMI 81596. Ex-type: CBS 135.60 = IFO 8451 = ATCC 15670. Section *Rubri*. ITS barcode: KY635850 (Alternative markers: *BenA* = KY709175; *CaM* = KY611936; *RPB2* = KY611974).

Overview and status of *Basipetospora* species

Basipetospora chlamydospora Matsush., Icones Microfungorum a Matsushima lectorum 13. 1975. [MB309463]. — Herb.: MFC 2307. Ex-type: CBS 228.84 = MFC 2409. 18S rDNA: AB024045. Note: BLAST analysis of the 18S rDNA sequences shows that this species belongs to *Microascales*.

Basipetospora denticola (C. Moreau) C. Moreau, Bull. Soc. Mycol. France 87: 43. 1971. nom. inval., (Art. 6.10, 41.1 & 41.5) [MB309464]. Basionym: *Chrysosporium keratinophilum* var. *denticola* C. Moreau [as 'denticolum'], Mycopathologia et Mycologia Applicata. 37: 37. 1969. nom. inval., (Art. 39.1 & 40.1) [MB353354]. — Herb.: n/a. Representative culture: CBS 132.78. ITS barcode: LN850801. Note: *Basipetospora denticola* is based on the invalidly described species *C. keratinophilum* var. *denticola*. A representative culture of *B. denticola* (CBS 132.78) belongs to *Microascales* and is a synonym of *Scopulariopsis candida* (Jagielski *et al.* 2016).

Basipetospora halophila (J.F.H. Beyma) Pitt & A.D. Hocking, Mycotaxon 22: 198. 1985. [MB105087]. Basionym: *Oospora halophila* J.F.H. van Beyma Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde Abteilung, Abt. II 88: 134. 1933. [MB266778]. — Herb.: n/a. Representative culture: CBS 232.32 = VKM F-204. Note: This species was formerly described as *Oospora halophila* by van Beyma (1933) and was recently transferred to *Aspergillus* under the new name *A. baamensis* (Samson *et al.* 2014, Kocsu *et al.* 2016).

Basipetospora rubra G.T. Cole & W.B. Kendr., Canadian Journal of Botany 46: 991. 1968. [MB326938]. — Herb.: ATCC 18199. Ex-type: FRR 2452. Note: The herbarium and ex-type culture of *B. rubra* and *M. ruber* differ. *Basipetospora rubra* was

described as the asexual state of *M. ruber* and is in the single name nomenclature system regarded as a synonym of this species.

Basipetospora variabilis Matsush., Icones Microfungorum a Matsushima lectorum 13. 1975. [MB309465]. — Herb.: MFC 2428. Ex-type: CBS 995.87. 18S rDNA: AF437892. Note: Comparison of the publically available 18S rDNA sequence on GenBank shows that this species belongs to *Microascales*.

Basipetospora vesicarium (Link) Stalpers, Studies in Mycology 24: 91. 1984. [MB106627]. — Herb.: n/a. Ex-type: n/a. Note: This fungus was originally described as *Sporotrichum vesicarium* by Link (Sprengel *et al.* 1818). Stalpers (1984) examined a herbarium specimen from B and this specimen contained the anamorph of *M. ruber*, which he named *B. vesicarium*. This species is tentatively placed in synonymy with *M. ruber*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Process 201478/2015-3 – SWE) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support and scholarship for R.N. Barbosa and Associação Pernambucana de Apicultores e Meliponicultores (APIME) is thanked for their help in collecting the honey/pollen samples. We would like to acknowledge Martin Meijer, Xuewei Wang and Jadsom Bezerra for their support and Konstanze Bench for nomenclatural assistance.

APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.001>.

REFERENCES

- Arx JA von (1987). A re-evaluation of the Eurotiales. *Persoonia* 13: 273–300.
- Barnard EL, Cannon PF (1987). A new species of *Monascus* from pine tissues in Florida. *Mycologia* 79: 479–484.
- Benny GL, Kimbrough JW (1980). Synopsis of the orders and families of Plectomycetes with keys to genera. *Mycotaxon* 12: 1–91.
- Berbee ML, Yoshimura A, Sugiyama J, *et al.* (1995). Is *Penicillium* monophyletic? An evaluation of phylogeny in the family Trichomycetaceae from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequence data. *Mycologia* 87: 210–222.
- Beyma FH van (1933). Beschreibung einiger neuer Pilzarten aus dem Centralbureau voor Schimmelfcultures – Baarn (Holland). *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde Abteilung* 88: 132–141.
- Blanc PJ, Loret MO, Goma G (1995). Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnology Letters* 17: 291–294.
- Cannon PF, Abdullah SK, Abbas BA (1995). Two new species of *Monascus* from Iraq, with a key to known species of the genus. *Mycological Research* 99: 659–662.
- Chang JM, Di Tommaso P, Lefort V, *et al.* (2015). TCS: a web server for multiple sequence alignment evaluation and phylogenetic reconstruction. *Nucleic Acids Research* 43: W3–W6.
- Chen AJ, Sun BD, Houbraken J, *et al.* (2016). New *Talaromyces* species from indoor environments in China. *Studies in Mycology* 84: 119–144.
- Cole GT, Samson RA (1979). *Patterns of development in conidial fungi*. Pitman, London.
- Cortopassi-Laurino M, Imperatriz-Fonseca VL, Roubik DW, *et al.* (2006). Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie* 37: 275–292.
- Dietrich R, Ueberschär E, Martlbauer E, *et al.* (1999). Detection of the nephrotoxic mycotoxin citrinin in foods and food colorants derived from *Monascus* spp. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 50: 17–21.
- Gams W, Christensen M, Onions AH, *et al.* (1985). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics* (Samson RA, Pitt JI, eds). Plenum Press, New York: 55–62.
- Hawksworth DL, Pitt JI (1983). A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters. *Australian Journal of Botany* 31: 51–61.



- Hocking AD, Pitt JI (1988). Two new species of xerophilic fungi and a further record of *Eurotium halophilicum*. *Mycologia* **80**: 82–88.
- Houbraken J, de Vries RP, Samson RA (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in Applied Microbiology* **86**: 199–249.
- Houbraken J, Samson RA (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology* **70**: 1–51.
- Houbraken J, Spierenburg H, Frisvad JC (2012). *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* **101**: 403–421.
- Hsu W-H, Pan T-M (2012). *Monascus purpureus*-fermented products and oral cancer: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**: 1831–1842.
- Huang Z-B, Li Y-P, Wang Y-H, et al. (2007). Studies on citrinin and pigments in fermented rice of *Monascus aurantiacus* (As3.4384) and its mutant strains by high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **35**: 474–478.
- Iriart X, Fior A, Blanchet D, et al. (2010). *Monascus ruber*: invasive gastric infection caused by dried and salted fish consumption. *Journal of Clinical Microbiology* **48**: 3800–3802.
- Jaffé R, Pope N, Carvalho AT, et al. (2015). Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. *PLoS ONE* **10**: e0121157.
- Jagielski T, Sandoval-Denis M, Yu J, et al. (2016). Molecular taxonomy of scopulariopsis-like fungi with description of new clinical and environmental species. *Fungal Biology* **120**: 586–602.
- Jůzlova P, Martinková L, Kren V (1996). Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *Journal of Industrial Microbiology* **16**: 163–170.
- Katoh K, Kuma K, Toh H, et al. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* **33**: 511–518.
- Kim JY, Kim H-J, Oh J-H, et al. (2010). Characteristics of *Monascus* sp. isolated from *Monascus* fermentation products. *Food Science and Biotechnology* **19**: 1151–1157.
- Klitgaard A, Iversen A, Andersen MR, et al. (2014). Aggressive dereplication using UHPLC-DAD-QTOF – screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**: 1933–1943.
- Kocsubé S, Perrone G, Magistà D, et al. (2016). *Aspergillus* is monophyletic: evidence from multiple gene phylogenies and exolites profiles. *Studies in Mycology* **85**: 199–213.
- Lee C-L, Pan T-M (2011). Red mold fermented products and Alzheimer's disease: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**: 461–469.
- Lee C-L, Pan T-M (2012). Benefit of *Monascus*-fermented products for hypertension prevention: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **94**: 1151–1161.
- Leong SL, Vinnere-Petersson O, Rice T, et al. (2011). The extreme xerophilic mould *Xeromyces bisporus* – growth and competition at various water activities. *International Journal of Food Microbiology* **145**: 57–63.
- Li Y, Zhou Y-C, Yang M-H, et al. (2012). Natural occurrence of citrinin in widely consumed traditional Chinese food red yeast rice, medicinal plants and their related products. *Food Chemistry* **132**: 1040–1045.
- Li Y-P, Tang XC, Wu W, et al. (2015). The ctnG gene encodes carbonic anhydrase involved in mycotoxin citrinin biosynthesis from *Monascus aurantiacus*. *Food Additives & Contaminants: Part A* **32**: 577–583.
- Li ZQ, Guo F (2004). A further studies on the species of *Monascus*. *Mycosystema* **23**: 1–6.
- Maddison WP, Maddison DR (2016). *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 3.11. <http://mesquiteproject.org>.
- McNeill J, Barrie FR, Buck WR, et al. (eds) (2012). *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)*. *Regnum Vegetabile* **154**. Koeltz Scientific Books, Königstein.
- Menezes C, Vollet-Neto A, Marsaioli AJ, et al. (2015). A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Current Biology* **25**: 2851–2855.
- Moreau C (1971). Presence du *Monascus purpureus* Went dans du maïs ensilé. Remarques sur la forme imparfaite *Basipetospora* Cole et Kendrick. *Bulletin trimestriel de la Société mycologique de France* **87**: 39–44.
- Negishi S, Huang Z-C, Hasumi K, et al. (1986). Productivity of monacolin K (mevinolin) in the genus *Monascus*. *Hakko Kogaku Kaishi* **64**: 584–590 (in Japanese).
- Nielsen KF, Månsson M, Rank C, et al. (2011). Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *Journal of Natural Products* **74**: 2338–2348.
- Ogawa H, Sugiyama J (2000). Evolutionary relationships of the cleistothelial genera with *Penicillium*, *Geosmithia*, *Merimbla* and *Sarophorum* anamorphs as inferred from 18S rDNA sequence divergence. In: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification* (Samson RA, Pitt JI, eds). Plenum Press, New York: 149–161.
- Ogawa H, Yoshimura A, Sugiyama J (1997). Polyphyletic origins of species of the anamorphic genus *Geosmithia* and the relationships of the cleistothelial genera: evidence from 18S, 5S and 28S rDNA sequence analyses. *Mycologia* **89**: 756–771.
- Park HG, Jong SC (2003). Molecular characterization of *Monascus* strains based on the D1/D2 regions of LSU rRNA genes. *Mycoscience* **44**: 25–32.
- Park HG, Stamenova EK, Jong SC (2004). Phylogenetic relationships of *Monascus* species inferred from the ITS and the partial beta-tubulin gene. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **45**: 325–330.
- Pattangul P, Pinthong R, Phianmongkol, et al. (2008). Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. *International Journal of Food Microbiology* **126**: 20–23.
- Peterson SW (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* **100**: 205–226.
- Pisareva E, Savov V, Kujumdzieva A (2005). Pigments and citrinin biosynthesis of fungi belonging to genus *Monascus*. *Zeitschrift für Naturforschung* **60c**: 116–120.
- Posada D, Randall KA (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817–818.
- Rambaut A (2009). *FigTree v. 1.3.1. Computer program and documentation distributed by the author at* <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>.
- Ronquist F, Teslenko M, van derMark P, et al. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**: 539–542.
- Rossman AY, Allen WC, Braun U, et al. (2016). Overlooked competing asexual and sexually typified generic names of Ascomycota with recommendations for their use or protection. *IMA Fungus* **7**: 289–308.
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, et al. (2010). *Food and indoor fungi*. In: *CBS Laboratory manual series; No. 2*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, et al. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* **78**: 141–173.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 6241–6246.
- Shao Y, Xu L, Chen F (2011). Genetic diversity analysis of *Monascus* strains using SRAP and ISSR markers. *Mycoscience* **52**: 224–233.
- Shi Y-C, Pan T-M (2012). Red mold, diabetes, and oxidative stress: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **94**: 47–55.
- Shimizu T, Kinoshita H, Ishihara S, et al. (2005). Polyketide synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3453–3457.
- Smedsgaard J (1997). Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *Journal of Chromatography A* **760**: 264–270.
- Sprengel K, Schrader AH, Link HF (1818). *Jahrbücher der Gewäskunde* **1**. G.C. Nauck's Buchhandlung, Berlin und Leipzig, Germany.
- Stalpers JA (1984). A revision of the genus *Sporotrichum*. *Studies in Mycology* **24**: 1–105.
- Stamatakis A (2006). RAxML-VI-HP: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688–2690.
- Stchigel AM, Cano JF, Abdullah SK (2004). New and interesting species of *Monascus* from soil, with a key to the known species. *Studies in Mycology* **50**: 299–306.
- Stchigel AM, Guarro J (2007). A reassessment of cleistothecia as a taxonomic character. *Mycological Research* **111**: 1100–1115.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731–2739.
- Tieghem P van (1884). *Monascus*, genre nouveau de l'ordre des Ascomycètes. *Bulletin De La Société Botanique De France* **31**: 226–231.
- Udagawa S, Baba H (1998). *Monascus lunisporas*, a new species isolated from mouldy feeds. *Cryptogamie Mycologie* **19**: 269–276.
- Vellinga EC, Kuyper TW, Ammirati J, et al. (2015). Six simple guidelines for introducing new genera of fungi. *IMA Fungus* **6**: 65–68.
- Vendruscolo F, Schmidell W, Ninow JL, et al. (2014). Antimicrobial activity of *Monascus* pigments produced in submerged fermentation. *Journal of Food Processing and Preservation* **38**: 1860–1865.
- Villanueva-Gutiérrez R, Roubik DW, Colli-Ucán W, et al. (2013). A critical view of colony losses in managed Mayan honey-making bees (Apidae: Meliponini) in the heart of Zona Maya. *Journal of the Kansas Entomological Society* **86**: 352–362.

- Vinnere-Pettersson O, Leong SL, Lantz H, *et al.* (2011). Phylogeny and intra-specific variation of the extreme xerophile, *Xeromyces bisporus*. *Fungal Biology* **115**: 1100–1111.
- Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, *et al.* (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* **78**: 343–371.
- Wang JJ, Lee CL, Pan TM (2003). Improvement of monacolin K, γ -aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU 601. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **30**: 669–676.
- Wang YZ, Ju XL, Zhou YG (2005). The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. *Food Microbiology* **22**: 145–148.
- Wynns AA (2015). Convergent evolution of highly reduced fruiting bodies in *Pezizomycotina* suggests key adaptations to the bee habitat. *BMC Evolutionary Biology* **15**: 145.
- Yilmaz N, Visagie CM, Houbraken J, *et al.* (2014). Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology* **78**: 175–341.

APÊNDICE C - FUNGAL PLANET DESCRIPTION SHEETS: 400-468.

442

Persoonia – Volume 36, 2016



Fungal Planet 462 – 4 July 2016

Blastobotrys meliponae R.N. Barbosa, Boekhout, G.A. Silva, Souza-Motta & N. Oliveira, *sp. nov.*

Etymology. me.li.po'nae. N.L. gen. n. *meliponae*, of the bee genus *Melipona*.

Classification — *Trichomonascaceae*, *Saccharomycetales*, *Saccharomycetes*.

Hyphae thin, 1–1.5 µm wide, septate, branched, hyaline. *Chlamydospores* globose or subglobose, terminal or intercalary, up to 5.5 µm diam. *Conidiophores* erect, sympodially branched, 130–260 µm long or more, 2.0–2.6 µm wide, simple or branched, tapering upwards, producing 1–2 joint conidiogenous cells. *Conidiogenous cells* are discrete, shortly pedicellate, globose to subglobose, (1.6–)2.5–3(–4) µm, with one seta. The conidiogenous cells separate easily from the conidiophores and are densely covered with conidia (up to 15 conidia, but mostly 6–13). *Setae* straight, sometimes slightly curved, narrowing towards the apex, 1-septate, not deciduous, 55–124 µm long or more (260 µm after 18 d of growth). *Conidia* holoblastic, globose, smooth, sessile, 1–1.5 (can be up to 2) µm diam; may form directly on 1–2 µm diam hyphae and below the tip of conidiophores. In yeast-like colonies, growth with budding observed on hyphae. Glucose, galactose and sucrose are fermented, and maltose, raffinose and xylose are not fermented. L-Arabinose, D-xylose, acetate, glucuronate, erythritol, D-galactose, D-glucose, lactose, D-maltose, L-sorbose and L-rhamnose are assimilated. D-glucosamine, glycerol, raffinose, and melibiose are not assimilated. Nitrate and citrate are not assimilated. Does not hydrolyse urea.

Culture characteristics — Colonies on 5 % malt extract agar (5 % ME) at 25 °C grow slowly, white with irregular margins, delicately downy, cerebriform, opaque, with light brownish reverse; 8 mm after 7 d. Colonies on yeast malt agar (YM) similar to those on 5 % ME but with light yellowish reverse; 11 mm in 7 d. Colonies on restricted growth agar (RG) similar to those on 5 % ME, but differ by plane colonies, and a colourless reverse; 5 mm in 7 d. Colonies at 27 °C, 28 °C, 30 °C and 37 °C were similar to colonies at 25 °C. At 10 °C no growth was observed.

Typus. BRAZIL, Recife, Pernambuco, isolated from honey of the bee *Melipona scutellaris* collected in Atlantic Forest (S8°7'30" W34°52'30") (metabolically inactive culture, holotype URM 7224, isotype CBS 14100, ITS sequences GenBank KT448719, KT448720, KT448721, LSU sequences GenBank KR779215, KR779216, KR779217, MycoBank MB812601).

Colour illustrations. Bees and pot honey in the nest of *Melipona scutellaris*; chlamydospores, hyaline conidia on hyphae and conidiophores on YM agar for 7 d at 28 °C. Scale bars = 10 µm.

Notes — Based on phylogenetic analyses using only sequences of the D1/D2 domains, the three isolates formed a clade with *B. proliferans*, but the sequences showed only 91 % identity with the LSU sequences of that species in a BLASTn analysis, indicating that these isolates represented a new yeast species of *Blastobotrys*. Members of *Blastobotrys* with a high similarity of the LSU rDNA D1/D2 domains to the new species were: *B. attinorum* (GenBank GU373758; 92 %), *B. proliferans* (GenBank EF584541; 91 %) and *B. nivea* (GenBank DQ442690; 90 %). *Blastobotrys meliponae* differs from *B. nivea* in having sympodially branched conidiophores, lacking budding cells and chlamydospores, but with lateral conidia forming directly on the hyphae. The species can be distinguished from *B. aristata* by the size of the conidiogenous cells (3–8 × 4.5–9 µm), conidiophore branching, number and size (100 µm) of setae, absence of lateral conidia formed directly on the hyphae, absence of chlamydospores and growth at 37 °C. *Blastobotrys proliferans* has a different branching of the conidiophores, conidiogenous cell size (3–4.5 × 4.5–7 µm), setae with a spatulate apex in older cultures and presence of distinct refraction bodies in the conidiogenous cells.

