



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA DOS SANTOS RODRIGUES

NATHALIA RODRIGUES SOARES

LEVANTAMENTO PRELIMINAR DE FUNGOS FILAMENTOSOS ASSOCIADOS
A DUAS ESPÉCIES DE ABELHAS SEM FERRÃO NA REGIÃO OESTE DO ESTADO DO
PARANÁ, BRASIL.

PALOTINA

2022

AMANDA DOS SANTOS RODRIGUES
NATHALIA RODRIGUES SOARES

LEVANTAMENTO PRELIMINAR DE FUNGOS FILAMENTOSOS ASSOCIADOS
A DUAS ESPÉCIES DE ABELHAS SEM FERRÃO NA REGIÃO OESTE DO ESTADO DO
PARANÁ, BRASIL.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, Setor de Palotina, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado
Coorientador: Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado

PALOTINA
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS

Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-000.

Telefone: 3360-5000 - <http://www.ufpr.br/>

Ata de Reunião

Aos dezesseis dias do mês de setembro do ano de 2022, às dez horas e trinta minutos na Sala 19 do Bloco 4, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Levantamento Preliminar de Fungos Filamentosos Associados a duas Espécies de Abelhas sem Ferrão na Região Oeste do Paraná, Brasil" apresentado pela discente Nathalia Rodrigues Soares, orientada pela Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado e co-orientada pelo Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Defesa Oral, os quais passaram a arguir a discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Defesa Oral, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído à discente as seguintes notas: Profa. Dra. Eliane Hermes, 100 (cem), Prof. Dr. Milton Rönna, 100: (cem), e Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, nota: 100 (cem). A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 100 (cem). Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/09/2022, às 09:14, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **FABIO ROGERIO ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/09/2022, às 09:18, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **MILTON RONNAU, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/09/2022, às 09:38, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ELIANE HERMES, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/09/2022, às 14:55, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4922590** e o código CRC **159CF5B0**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, no qual deposito toda a minha confiança e crença, que iluminou o meu caminho permitindo que eu atingisse esta conquista.

Aos meus pais, Delice Soares e Sadilei Soares, agradeço imensamente que com um amor incondicional se dedicaram e se sacrificaram por minha felicidade e vida profissional, por terem sido meus apoiadores desde minha infância me ofertando uma sólida educação e uma forte disciplina, por nunca medir esforços para me ver bem e sempre acreditar no meu potencial.

Aos meus familiares, agradeço pelo suporte necessário e incentivo, em especial à minha irmã Thais Soares que muitas vezes foi e continua sendo minha grande companheira, que mesmo distante fisicamente, sempre esteve presente me incentivando e hoje faz parte desta história.

Também agradeço ao meu namorado Bruno Barbosa por ter me apoiado e me animado nos momentos difíceis demonstrando um amor verdadeiro que fortalece os nossos laços e a nossa aliança. Que a nossa união seja para toda a vida!

Às amigadas que conquistei em Palotina, em especial ao Acacio Batista, Alexandra Coitinho, Francielli Assis, Giovana Martins, Maria Leite e Pedro Mattiuzzi, por me darem suporte e proporcionarem momentos incríveis. E demais amigos que ao longo desses anos se tornaram especiais em minha vida.

A Amanda Rodrigues, amiga e colega de pesquisa, pelo apoio e colaboração durante a realização das atividades.

Nathalia Rodrigues Soares

Agradecemos à nossa orientadora professora Dra. Adriana Fiorini e co-orientador professor Dr. Fábio Rosado, por consentir a este desafio de pesquisa, pelo saber transmitido, pelas opiniões e críticas, pela colaboração para solucionar dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho e por todas as palavras de incentivo, além de sua amizade. Agradecemos também aos demais professores, técnicos, colaboradores que nos assessoraram até o fim da graduação.

Ao Núcleo de Micologia Aplicada (NEMA) e a Universidade Federal do Paraná (UFPR) por nos amparar e promover um ambiente de pesquisa e ensino.

Agradecemos aos professores Dr. Milton Rönna e Dra. Eliane Hermes, por aceitarem participar da banca e pelas considerações, que serão valiosas para esse trabalho.

Amanda dos Santos Rodrigues

Nathalia Rodrigues Soares

FRASE MOTIVACIONAL

Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade.

(Marie Curie)

RESUMO

As abelhas da tribo Meliponini são importantes agentes polinizadores, evidenciando uma ação fundamental para preservação e manutenção vegetal, além de produzir o mel, um produto muito conceituado. O objetivo deste trabalho foi realizar a identificação da diversidade de fungos que estão associados ao corpo das determinadas espécies de abelhas *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna) e *Tetragonisca angustula* (Jataí), que podem atuar como carreadoras destes fungos. A coleta dessas abelhas foi realizada em duas diferentes colmeias de cada espécie, em quantidade de 10 abelhas por colmeia, sendo um cultivo privado, localizado no endereço rua 21 de abril número 1670, bairro Centro, no município de Palotina, Oeste do Paraná. As abelhas foram coletadas com o apoio de uma alça contendo uma rede na sua extremidade, elas foram armazenadas em tubos falcon estéreis e direcionadas para o laboratório de Microbiologia na Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, onde foram adicionadas ao freezer para melhor manuseio das abelhas e distribuídas em placas de Petri contendo o meio de cultura Sabouraud e mantidas em estufas à temperatura de 28° C. A identificação ocorreu através da macromorfologia, micromorfologia das colônias isoladas e técnicas de biologia molecular. Foram identificados 8 gêneros de fungos da espécie de abelhas *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna) e 11 gêneros de fungos da espécie *Tetragonisca angustula* (Jataí), totalizando 15 gêneros identificados entre as duas espécies de abelhas.

Palavras-chave: Abelhas-sem-ferrão. Fungos. Prospecção.

ABSTRACT

The bees of the Meliponini tribe are important pollinating agents, showing a fundamental action for plant preservation and maintenance, in addition to producing honey, a highly regarded product. The objective of this work was to identify the diversity of fungi that are associated with the body of certain species of bees, *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna) and *Tetragonisca angustula* (Jataí), which can act as carriers of these fungi. The collection of these bees was carried out in two different hives of each species, in an amount of 10 bees per hive, being private cultivation, located at street 21 de April number 1670, Centro district, in the municipality of Palotina, West of Paraná. The bees were collected with the support of a handle containing a net at its end, they were stored in sterile falcon tubes and directed to the Microbiology laboratory at the Federal University of Paraná - Setor Palotina, where they were added to the freezer for better handling of the bees. and distributed in Petri dishes containing the Sabouraud culture medium and kept in ovens at a temperature of 28° C. Identification occurred through macromorphology, micromorphology of isolated colonies and molecular biology techniques. Eight genera of fungi of the species of bees *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna) and 11 genera of fungi of the species *Tetragonisca angustula* (Jataí) were identified, totaling 15 genres identified between the two species of bees.

Keywords: Stingless bees. Fungi. Prospection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - LOCAL 01 - COLMEIAS LOCALIZADAS PRÓXIMAS A PORTA DO IMÓVEL.....	26
FIGURA 2 - LOCAL 02 - COLMEIAS LOCALIZADAS NO FUNDO DO IMÓVEL.....	27
FIGURA 3 - TRANSFERÊNCIA DAS ABELHAS DA ESPÉCIE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> COLETADAS EM DUAS DIFERENTES COLMEIAS (T.P. E T.F.) PARA PLACAS DE PETRI CONTENDO ÁGAR SABOURAUD, NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.....	28
FIGURA 4 - TRANSFERÊNCIA DAS ABELHAS DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> COLETADAS EM DUAS DIFERENTES COLMEIAS (T.P. E T.F.) PARA PLACAS DE PETRI CONTENDO ÁGAR SABOURAUD, NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.....	29
FIGURA 5 - CRESCIMENTO DOS FUNGOS DE TODAS AS AMOSTRAS, DAS DUAS ESPÉCIES.....	30
FIGURA 6 - ASPECTOS MACRO E MICROMORFOLÓGICOS DOS FUNGOS ISOLADOS DA ESPÉCIE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> DO LOCAL 01.....	35
FIGURA 7 - ASPECTOS MACRO E MICROMORFOLÓGICOS DOS FUNGOS ISOLADOS DA ESPÉCIE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> DO LOCAL 02.....	36
FIGURA 8 - ASPECTOS MACRO E MICROMORFOLÓGICOS DOS FUNGOS ISOLADOS DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> DO LOCAL 01.....	37
FIGURA 9 - ASPECTOS MACRO E MICROMORFOLÓGICOS DOS FUNGOS ISOLADOS DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> DO LOCAL 02.....	38
FIGURA 10 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-4.....	39
FIGURA 11 - MORFOLOGIA DO GÊNERO <i>Alternaria</i> , ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.....	46
FIGURA 12 - MORFOLOGIA DA ESPÉCIE <i>Aspergillus flavus</i> ISOLADA DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.....	47

FIGURA 13 - MORFOLOGIA DA ESPÉCIE <i>Aspergillus niger</i> , ISOLADA DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.....	48
FIGURA 14 - MORFOLOGIA DA ESPÉCIE <i>Aspergillus oryzae</i> , ISOLADA DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.....	49
FIGURA 15 - MORFOLOGIA DA ESPÉCIE <i>Beauveria bassiana</i> , ISOLADA DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.....	50
FIGURA 16 - MORFOLOGIA DO GÊNERO <i>Bipolaris</i> , ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR..	51
FIGURA 17 - MORFOLOGIA DO GÊNERO <i>Cladosporium</i> , ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.....	52
FIGURA 18 - MORFOLOGIA DO GÊNERO <i>Cladophialophora</i> , ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.....	53
FIGURA 19 - MORFOLOGIA DO GÊNERO <i>Cunninghamella</i> , ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.	54
FIGURA 20 - MORFOLOGIA DA ESPÉCIE <i>Curvularia lunata</i> , ISOLADA DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.....	55
FIGURA 21 - MORFOLOGIA DO GÊNERO <i>Drechslera</i> , ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR..	56
FIGURA 22 - MORFOLOGIA DO GÊNERO <i>Fusarium</i> , ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.....	57
FIGURA 23 - MORFOLOGIA DO GÊNERO <i>Fusarium</i> , ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.	57
FIGURA 24 - MORFOLOGIA DO GÊNERO <i>Fusarium</i> , ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.	57

FIGURA 25 - MORFOLOGIA DO GÊNERO <i>Penicillium</i> , ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.	59
FIGURA 26 - MORFOLOGIA DA ESPÉCIE <i>Epicoccum nigrum</i> , ISOLADA DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.	60
FIGURA 27 - MORFOLOGIA DO GÊNERO <i>Talaromyces purpurogenum</i> , ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.	61
FIGURA 28 - MORFOLOGIA DO GÊNERO <i>Trichoderma</i> , ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> NO MUNICÍPIO DE PALOTINA-PR.	62

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DOS GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS IDENTIFICADOS DA ESPÉCIE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> NO LOCAL 01.	41
GRÁFICO 2 - PORCENTAGEM DOS GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS IDENTIFICADOS DA ESPÉCIE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> NO LOCAL 02.	42
GRÁFICO 3 - PORCENTAGEM DOS GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS IDENTIFICADOS DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> NO LOCAL 01.	43
GRÁFICO 4 - PORCENTAGEM DOS GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS IDENTIFICADOS DA ESPÉCIE <i>Tetragonisca angustula</i> NO LOCAL 02.	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS ABELHAS DA TRIBO MELIPONINI.....	18
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE DUAS ESPÉCIES DE ABELHAS DA TRIBO MELIPONINI NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA NO TERRITÓRIO BRASILEIRO.	23
TABELA 3: IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS CONFORME A ESPÉCIE DA ABELHA E LOCALIZAÇÃO DAS COLMEIAS.	27
TABELA 4: GÊNEROS DE FUNGOS IDENTIFICADOS ENTRE AS DUAS ESPÉCIES DE MELÍPONAS.....	34
TABELA 5 - IDENTIFICAÇÃO DE 6 ISOLADOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS DO rDNA.....	39
TABELA 6 - IDENTIFICAÇÃO ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO.....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 ABELHAS: AGENTES POLINIZADORES ESSENCIAIS.....	17
3.2 ABELHAS SEM FERRÃO.....	18
3.2.1 <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	21
3.2.2 <i>Tetragonisca angustula</i>	23
3.3 FUNGOS E AS ABELHAS SEM FERRÃO	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 COLETA, INOCULAÇÃO E ISOLAMENTO DOS FUNGOS.....	26
4.2 IDENTIFICAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DOS FUNGOS.....	30
4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS.....	31
4.3.1 Extração do DNA.....	31
4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da região ITS e sequenciamento.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Caracterização macromorfológica e micromorfológica dos fungos identificados.....	45
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	63
7 REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A diversidade de espécies de plantas floríferas depende principalmente do processo de polinização realizado por animais, aproximadamente 87,5% das múltiplas espécies existentes são resultado deste processo (OLLERTON et al., 2011). Estudos sobre a ação das abelhas no meio ambiente evidenciam a extraordinária contribuição desses insetos na preservação da vida vegetal e também na manutenção da variabilidade genética (NOGUEIRA-COUTO, 1998). As abelhas são insetos que sustentam os ecossistemas globais por meio do seu papel como polinizadores de áreas floridas, pomares, plantações, florestas, inclusive vastas áreas nas grandes bacias hidrográficas (GRIMALDI & ENGEL, 2005).

Entre as abelhas sociais, além da conhecida *Apis mellifera*, conhecida popularmente como “abelha européia”, estão as da tribo Meliponini, que agrupa vários gêneros de abelhas sem ferrão, estas possuem o ferrão atrofiado, por esse motivo o nome (LOPES et al, 2005). As abelhas sem ferrão eram as únicas produtoras de mel e as principais polinizadoras da flora nativa até 1838, antes da introdução da abelha européia no Brasil (KERR et al., 2001).

A distribuição das abelhas sem ferrão ocorre principalmente nas regiões tropicais do mundo (MICHENER, 2000). O Brasil apresenta aproximadamente 244 espécies de abelhas sem ferrão (Apidae), dentre elas, a *Tetragonisca Angustula* (Jataí) e a *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna), espécies consideradas nativas do país e utilizadas como objeto de estudo deste trabalho (PEDRO, 2014).

Até o presente momento, quando consultamos a literatura especializada, encontramos poucas informações e conhecimentos sobre a biodiversidade fúngica relacionada às abelhas sem ferrão da tribo Meliponini no território brasileiro (SILVA et al., 2017). As abelhas são naturalmente associadas à microrganismos diversos, no qual os fungos muitas vezes são de ocorrência espontânea (GILLIAM, 1997), em contrapartida o desaparecimento de colônias de abelhas acarretou maiores interesses no conhecimento das comunidades microbiana relacionada a estes importantes polinizadores (MATTILA et al., 2012).

Em razão da importância ambiental, social e econômica, o conhecimento quanto ao comportamento, reprodução e sanidade das abelhas é indispensável para a preservação e manutenção da diversidade vegetal, a produção e comercialização de produtos e consequentemente a distribuição de rendas. O objetivo deste presente trabalho foi realizar

uma avaliação preliminar da microbiota fúngica associada com duas espécies de abelhas sem ferrão na região Oeste do Estado do Paraná. Este trabalho auxiliará na compreensão sobre as interações entre os fungos e as abelhas, tanto no caso de possíveis fungos patogênicos para as abelhas, animais, plantas e/ou humanos, quanto para espécies fúngicas que possam contribuir de maneira simbiótica para estes organismos. Além disso, a variedade dos gêneros e espécies isoladas é uma fonte promissora de prospecção de fungos com potencialidades biotecnológicas, como a produção de enzimas e atividade antimicrobiana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a presença de diferentes grupos de fungos em abelhas das espécies *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna) e *Tetragonisca angustula* (Jataí), que podem atuar como carreadoras de diversas espécies de fungos.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar os fungos coletados nas duas espécies de Meliponíneos;
- Comparar e relacionar entre as duas espécies de abelhas os fungos que foram identificados;
- Comparar e relacionar os fungos obtidos em amostras coletadas de dois locais distintos de uma propriedade, em duas espécies de Meliponíneos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ABELHAS: AGENTES POLINIZADORES ESSENCIAIS

A polinização é um fator fundamental para o sucesso da maioria das culturas agrícolas ao redor do mundo. Essa polinização pode acontecer de duas formas, a primeira é na própria planta, onde o grão de pólen é carregado até o estigma da flor (região onde o grão de pólen inicia a germinação), e a segunda maneira é através da transferência dos grãos de pólen de uma flor para o estigma de outra flor da mesma espécie, mas de pés distintos e por meio de agentes polinizadores, como os insetos (SOUZA, 2007).

Entre os principais polinizadores dos vegetais podemos citar as abelhas, elas são atraídas pelos vegetais para transportar o pólen através de uma substância doce que os mesmos produzem. O pólen é muito importante para o desenvolvimento da colmeia já que é a principal fonte de proteína para as abelhas, portanto, ao garantir o desenvolvimento da família, as abelhas também beneficiam a espécie vegetal (SOUZA, 2007).

A influência recíproca entre as abelhas e as plantas permite que as plantas façam a polinização cruzada com sucesso. Esta é uma importante evolução da adaptação das plantas que aumenta o vigor da espécie resultando em uma nova combinação de fatores genéticos, e conseqüentemente, ocorre o aumento da produção de frutos e sementes, e paralelamente uma maior resistência à pragas e doenças (COUTO & COUTO, 2002).

Além disso, as abelhas apresentam uma grande diversidade em relação às adaptações morfológicas (estruturas para coletar e transportar materiais) (SILVEIRA et al. 2002); fisiológicas (metabolismo) (ROUBIK, 1989); e comportamentais (sincronismo com eventualidades florais e memória temporal), as quais otimizam o local e a pesquisa dos recursos florais (SAUNDERS, 1982; MOORE, 2001). Portanto, acredita-se que as abelhas e as angiospermas tenham co-evoluído umas com as outras no processo de evolução, o qual beneficia ambos os grupos (DEL-CLARO & TOREZAN-SILINGARDI, 2012).

As abelhas pertencem à ordem Hymenoptera e podem ser agrupadas na superfamília Apoidea, que consiste em várias famílias, entre elas, a família Apidae é a que possui hábitos sociais mais desenvolvidos e apresenta 4 subfamílias: Apíneos, Meliponíneos, Bombíneos e Euglossíneos. A maioria das outras Apoidea são abelhas insociáveis ou abelhas com hábitos sociais básicos (NOGUEIRA-NETO, 1997).

3.2 ABELHAS SEM FERRÃO

Na família Apidae, pode-se destacar uma classe de abelhas que possui grande importância devido à sua natureza comportamental e produtiva, essas abelhas são conhecidas como abelhas sem ferrão ou meliponíneos (WIELEWSKI, 2018).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS ABELHAS DA TRIBO MELIPONINI.

Nível	Nome
Classe	Insecta
Ordem	Hymenoptera
Superfamília	Apoidea
Família	Apidae
Subfamília	Apinae
Tribo	Meliponini

FONTE: VILLAS-BÔAS, 2012.

A palavra Meliponini tem origem de duas palavras latinas, *mellis* e *ponere*, que significam *mellis* = mel e *ponere* = pôr, dessa forma, são abelhas que colocam o mel em sua colmeia (HRNCIR et al., 2017).

Durante a evolução, as abelhas sociais locais perderam a habilidade de ferroar à medida que seus ferrões se deterioraram, por esse motivo originou-se seu nome, abelhas sem ferrão (NOGUEIRA-NETO, 1997). Porém, as abelhas não abandonaram a capacidade de defender seus ninhos, exibindo vários mecanismos para isso, como se enrolar em torno de cabelos e pêlos, beliscar a pele do intruso com suas maxilas e em algumas classes podem até provocar feridas, pode-se citar como exemplo o gênero *Oxytrigona*, que adentram as narinas e ouvidos dos invasores, bem como liberam resinas vegetais ou matérias cáusticas em seus pêlos (OLIVEIRA et al., 2013).

De acordo com Kerr et al. (1996) dependendo do ecossistema, as abelhas sem ferrão são responsáveis por 40 a 90 % da polinização de espécies silvestres em ambientes tropicais.

Dessa forma, as abelhas sem ferrão estão entre as principais classes de polinizadores, pois formam o maior grupo de insetos que possuem pólen e néctar em sua alimentação, além disso, estão presentes em diversas áreas tropicais (JOHNSON & HUBBELL, 1974) e podem ser manipuladas com o objetivo de obter a produção de mel, pólen e também para o acréscimo e a conservação da polinização de espécies silvestres e cultivadas.

Além de possuir espécies que podem ser criadas pelo homem, as abelhas também demonstram a sociabilidade como vantagem sobre outros polinizadores, já que muitos indivíduos da mesma colônia participam do forrageamento, normalmente em plantas similares (FREE, 1980). Entre as abelhas, considera-se que os meliponíneos sejam os principais polinizadores em diversas espécies de árvores nativas do Brasil (KERR, 1997). Os mesmos tendem a ter colônias densamente povoadas e perenes. Portanto, o amplo espectro de flores é frequentemente explorado ao longo do ano, dessa forma, é considerada uma espécie generalista (MICHENER, 1979). No entanto, alguns autores afirmam que pode haver uma premissa de que essas abelhas optam pelas flores visando otimizar o custo e a utilidade da coleta (RAMALHO et al. 2007) ao invés de outros recursos nutricionais, com o objetivo de evitar que o alto custo energético usado para colher tais recursos, que pode superar os benefícios nutricionais (MACARTHUR & PIANKA, 1966).

Atualmente, as abelhas da subfamília Meliponinae inclui muitas espécies produtoras de mel que foram criadas ao longo de centenas de anos pelos povos indígenas do continente americano. A maioria das abelhas consome produtos florais, coletam o seu néctar e convertem o mesmo em mel através de desidratação e ação enzimática (CAMPOS & PERUQUETTI, 1999).

Além de visitar flores e os benefícios que agregam aos serviços de polinização, os meliponíneos também produzem produtos e subprodutos de alto valor em relação à economia, como mel, pólen, própolis e geoprópolis. Esses são os principais atrativos que motivam os produtores à manipulação e criação destas espécies. No entanto, a importância dos Meliponíneos excede muito mais do que os benefícios econômicos derivados de seus produtos. Na reconstrução de florestas tropicais e na preservação de remanescentes, essas abelhas podem ser de fundamental importância. Além disso, podem atuar como bioindicadores da qualidade ambiental (PALAZUELOS, 2008). Entretanto, muitas espécies de Meliponíneos estão em acelerado processo de extinção devido à eliminação de *habitats* e ao desmatamento do seu ambiente de preferência, as florestas nativas (LOPES et al., 2005).

As populações das abelhas sem ferrão podem ser afetadas dependendo do nível de perturbação da vegetação. Há alguns grupos de abelhas que vêm principalmente de áreas preservadas e florestas primárias. De acordo com Palazuelos Ballivián (2008), a variedade de espécies de abelhas que normalmente se encontram em uma região retrata a diversidade que elas exploram em um determinado ambiente. Isto ocorre uma vez que, para se reproduzir, os meliponíneos necessitam dos *habitats* que ocupam: locais ou substratos adequados para nidificar; para algumas espécies, materiais característicos para a construção de ninhos para outras, e, por fim, um número suficiente de fontes de alimento, ou seja, plantas com flores específicas para cada grupo distinto de abelha.

Os locais habitados pelas abelhas são diversos, pode-se citar as savanas, matas tropicais, desertos, praias e regiões montanhosas. Tal diversidade de climas e variedades de vegetação têm favorecido a sobrevivência de distintos gêneros de abelhas, bem adaptadas a diferentes ambientes específicos (RAMOS & CARVALHO, 2007). Além disso, as abelhas também possuem diversos locais de nidificação, geralmente elas escolhem caules ocos (ZMITROWICZ, 2001). As fissuras e fendas da colmeia são recobertas por uma matéria resinosa gerada pelas abelhas ao colher metabólitos secundários de um conjunto de espécies vegetais em uma determinada área, conhecido como própolis (BARTH; DUTRA; ACURADO, 1999). Dessa forma, além de oferecer proteção, também é possível manter a temperatura e a umidade dentro do ninho (ZMITROWICZ, 2001). Em geral, a arquitetura da entrada e do interior do ninho ajuda a identificar e reconhecer as espécies, que é uma característica distintiva de um determinado gênero ou espécie (ROUBIK, 2006).

No Brasil, há mais de 300 espécies, subdivididas em 27 gêneros (KERR & FILHO, 1999; SILVEIRA et al., 2002). Porém, estas abelhas são comumente observadas nas regiões Norte e Nordeste, devido a criação de diversas espécies (ALVES et al. 2007). As abelhas sem ferrão possuem uma conduta tipicamente eussocial e costumam se organizar em colônias que geralmente não sofrem alterações, as quais podem ser populosas, ocorrendo uma variação entre meia dúzia de indivíduos a 100.000 ou mais operárias (SILVEIRA et al., 2002; MICHENER, 2007).

Uma característica comum entre os Meliponíneos é que apresentam uma concavidade nas tíbias das patas traseiras, denominada corbícula, onde o pólen ou outro material é acumulado e transportado para o ninho, além disso, é considerada como uma família com elevados hábitos sociais (WIELEWSKI, 2018).

3.2.1 *Scaptotrigona bipunctata*

Uma das abelhas pertencente ao grupo dos Meliponíneos é a abelha *Scaptotrigona bipunctata*, popularmente denominada como abelha-canudo ou Tubuna devido a colmeia destas abelhas ser caracterizada pela entrada em forma de funil composta por cerume escuro (BLOCHTEIN et al., 2008). Suas colônias são superpovoadas e nidificam com facilidade em cavidades já existentes em caules de árvores. Esta espécie tem uma conduta muito defensiva, até mesmo contra abelhas de outras colônias pertencentes à mesma espécie (NOGUEIRA-NETO, 1997).

As abelhas *Scaptotrigona bipunctata* foram confundidas durante um grande período de tempo com abelhas pertencentes à espécie *Trigona spinipes* (Irapuá, arapuá ou abelha-cachorro), pois suas características morfológicas são bastante semelhantes. Como resultado, as colônias de *Scaptotrigona bipunctata* foram frequentemente destruídas por agricultores, já que deduziam que suas culturas estariam ameaçados pelo comportamento das abelhas *Trigona spinipes*, que cortam pétalas de flores das plantações para criar ninhos. *Trigona spinipes* pode atuar como vetor de alguns patógenos e levar a prejuízos na produção de algumas culturas como a banana, por visitarem suas inflorescências e cachos (NOGUEIRA-NETO, 1997). Porém, considera-se que a *Trigona spinipes* é de grande importância para a polinização de diversas espécies de frutas, como a goiaba, melancia, abacate dentre outros (GIANNINI & JAFFÉ, 2015).

A *Scaptotrigona bipunctata* difere da *Trigona spinipes* especialmente por conta das corbículas (estruturas localizadas no terceiro par de pernas, por onde são embarcados os grãos de pólen). A Tubuna tem corbículas bem fundas, pequenas e escuras, já a abelha Irapuá apresenta corbículas largas e vermelhas (NOGUEIRA-NETO, 1997; MICHENER, 2013). Poucos estudos foram executados a respeito da morfologia e conduta da espécie *Scaptotrigona bipunctata* e, portanto, necessitam de maiores investigações sobre as características desta espécie, especialmente em relação à sua microbiota, já que possíveis patógenos podem interferir na conservação da comunidade desses importantes polinizadores.

No gênero *Scaptotrigona*, comportamentos defensivos são normais, mais desenvolvido em comparação com as abelhas do gênero *Melipona*. Elas são chamadas popularmente como “abelhas que enrolam no cabelo” e, portanto, cautelas apropriadas são frequentemente empregadas para manejar essas abelhas (LIMA et al., 2013). Outro comportamento defensivo desta espécie observado por nossa equipe consiste em uma

sinalização química produzida pelas abelhas e depositada no corpo do possível “invasor” que se aproxima demais da colmeia. As abelhas “guardas” ou “vigias” que protegem a região da entrada da colmeia depositam uma substância química com odor característico no invasor, que é imediatamente atacado por várias outras abelhas daquela colmeia (dados não-publicados).

3.2.2 *Tetragonisca angustula*

A outra espécie de abelha que foi objeto de estudo no presente trabalho é a *Tetragonisca angustula*, conhecida popularmente como jataí, é uma abelha social sem ferrão que se adapta facilmente às diferentes condições de nidificação, como troncos ocos de árvores, buracos de muros e pedras, amplamente distribuída por várias regiões do Brasil, possivelmente pela facilidade de seu manejo e excelente qualidade de seu mel, além da beleza estética de suas colmeias (ARAÚJO, 2012). Esta espécie através da produção de mel, cerume e resinas representa importância econômica no Brasil, além do processo de polinização, realizando um papel ecológico de grande importância (OLIVEIRA et al., 2004). As rainhas nascem de células maiores (células reais), que se localizam na borda dos discos de criação no interior da colmeia. As operárias mais novas são mais claras, trabalhando por certo período de tempo apenas no interior da colmeia. Quando amadurecem, a coloração do seu corpo escurece e o trabalho externo à colmeia inicia (ARAÚJO, 2012).

O ninho de jataí é construído em forma de disco contendo uma média de sete favos sobrepostos e ligados entre si por pequenas colunas. Recentemente pesquisas indicaram que esta espécie de abelha possui uma estratégia de defesa interessante, realizada por um grupo se posiciona em pé no tubo de entrada e outro grupo pairando perto da entrada do ninho, estas abelhas consideradas “guardas” possuem pernas relativamente maiores, enquanto a forrageira possui a cabeça maior, as consideradas operárias que realizam a limpeza do ninho possuem tamanho intermediário (GRUTER et al., 2011). Apesar do seu tamanho reduzido quando comparadas com outras abelhas sem ferrão, como a agressiva tubuna, a jataí apresenta estratégias de defesa bastante interessantes. Uma dessas estratégias observadas por nosso grupo durante as coletas das abelhas, consiste em um pequeno grupo de jataís (3 a 4 abelhas) se agarrarem às asas de uma abelha maior, como a tubuna e até mesmo a *Apis mellifera* que estejam eventualmente muito próximas à entrada da colmeia de jataí, impossibilitando o vôo da abelha invasora e levando o invasor à morte (dados não publicados).

Essas abelhas são nativas da Mata Atlântica Brasileira, na Tabela 2 a seguir pode se observar que possuem uma ampla distribuição geográfica.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE DUAS ESPÉCIES DE ABELHAS DA TRIBO MELIPONINI NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA NO TERRITÓRIO BRASILEIRO.

Espécie	Nome popular	Distribuição
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Tubuna, Enrola-Cabelo,	AC, CE, MA, MG, PA,
<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	PR, PB, PA, PE, RJ, RR,

FONTE: VENTURIERI et al. (2012)

3.3 FUNGOS E AS ABELHAS SEM FERRÃO

Os fungos são organismos eucarióticos que estabelecem relações simbióticas ou parasíticas com outros organismos. Conseqüentemente, são de grande importância para a conservação de outras espécies. Quando se trata de mutualismo, podem atuar principalmente na ciclagem de nutrientes, ao realizar o processo de decomposição, ou seja, liberam para o ambiente importantes elementos químicos que estavam presentes e mobilizados nos restos dos seres vivos, atividade que pode ser considerada um papel fundamental no ecossistema (RIBEIRO et al., 2012).

A propagação de diversos fungos depende do ar. Os fungos identificados no ambiente aéreo são denominados como anemófilos, e podem causar diversas doenças alérgicas como asma e rinite, sendo assim, é sempre de grande importância identificar seu aparecimento, já que causam doenças tanto em humanos quanto em animais, como em espécies de abelhas (LACAZ et al., 2002; CASTAGNINO et al., 2006; O'CONNOR et al., 2014).

A identificação de um fungo é geralmente baseada em suas características principais macro e micromorfológicas, no entanto, na maioria dos casos, não há informações suficientes para identificar ou separar duas ou mais espécies que possuem elevada similaridade, tornando o processo padrão de identificação insuficiente quanto à definição do gênero ou espécie desses microrganismos. Com o objetivo de superar essa limitação, ferramentas moleculares começaram a ser implantadas na identificação desses fungos, dessa forma, podem ser reconhecidas uma importante ferramenta para a

caracterização taxonômica das espécies fúngicas (SANDERS et al., 1995; PORTER & GOLDING, 2012).

Recentemente tem sido notado novos estudos em relação a interação entre fungos e insetos com a finalidade de gerar benefícios para a sociedade humana. Novas ferramentas do ramo da biotecnologia estão sendo empregadas com o objetivo de solucionar algumas questões, como o uso de fungos para o controle biológico de pragas e vetores de doenças, proporcionando a geração de substâncias ou moléculas orgânicas que possuem uma ampla diversidade química e efeitos diversos sobre organismos vivos de interesse comercial (SILVA et al., 2012; FONSECA, 2016).

São escassas as informações sobre a maioria das espécies de abelhas sem ferrão, principalmente em relação aos seus hábitos, reprodução e sanidade. Estudar a biologia das abelhas é de grande importância, principalmente em relação a microbiota fúngica, já que a presença desses microrganismos pode ocasionar doenças quando o mecanismo de defesa do organismo do inseto está desprotegido (PANTOJA, 2014)

Há uma diversidade considerável de organismos associados às abelhas sem ferrão, entre eles pode-se citar bactérias (CRUZ, 1996), fungos e leveduras. Geralmente a presença desses microrganismos ocorre naturalmente (GILLIAM, 1997), sendo a maioria ainda desconhecidos (ELTZ et al., 2002). A recente perda de colônias de abelhas ocasionou o aumento do interesse em relação às comunidades microbianas associadas a esses polinizadores de grande importância (MATTILA et al., 2012).

Atualmente o conhecimento e a exploração sobre os fungos associados às abelhas é de grande importância, pois podem representar em uma nova fonte de substâncias de interesse industrial, além disso, os compostos produzidos através de microrganismos provocam menos danos à natureza e apresentam um menor custo (FONSECA, 2016). Há relatos na literatura sobre a presença de fungos em colmeias de abelhas sem ferrão (OLIVEIRA et al. 2013; SOUZA, 2014), porém, por enquanto não têm registros bibliográficos a respeito da identificação da diversidade fúngica associada às abelhas sem ferrão no Estado do Paraná.

Os fungos podem estar aderidos ao corpo da abelha devido à sua atividade de coleta de matérias-primas para atender às necessidades da colmeia. STUART et al. (2004) reconheceram 11 gêneros de fungos associados ao corpo de abelhas do gênero *Trigona* (espécie *Meliponini*). As abelhas foram coletadas durante o forrageamento, dessa forma, foi levantada a possibilidade de que as abelhas pudessem ser disseminadoras de fungos. A identificação dos fungos filamentosos ocorre através da análise de suas estruturas

reprodutivas, pelos métodos de produção de conídios, por meio da sua cor, formato e tamanho (micromorfologia de suas estruturas), assim como pelos tipos de hifas e pela características macroscópicas de suas colônias (CRUZ, 1985).

FERRAZ et al. (2008) isolaram e identificaram fungos associados ao corpo de abelhas mortas da espécie *M. subnitida* Ducke. A coleta ocorreu em torno da colmeia, os fungos identificados foram *Aspergillus* sp.; *Aspergillus niger*; *A. terreus*; *Penicillium* sp.; *Curvularia* sp.; *Monilia* sp.; *Nigrospora* sp.; *Cladosporium* sp. e *Trichoderma* sp. Porém, como não há muitos documentos citando pesquisas similares para comparar dados, afirmar que estes gêneros de fungos estejam presentes unicamente a este grupo de abelha se torna extremamente difícil. Além disso, pelo fato da coleta ter sido realizada a partir de abelhas mortas, difícil se torna a confirmação de os fungos coletados estarem associados às abelhas vivas ou terem colonizado os insetos após sua morte.

Considerando as informações citadas, o estudo a respeito da microbiota fúngica das colmeias é de grande importância principalmente para o conhecimento taxonômico de fungos de fungos associados às abelhas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA, INOCULAÇÃO E ISOLAMENTO DOS FUNGOS

A coleta das abelhas foi realizada no dia 1 de junho de 2022 em colmeias mantidas em uma propriedade localizada no endereço Rua 21 de Abril, número 1670, bairro Centro, no município de Palotina, Oeste do Estado do Paraná. As amostras fúngicas foram obtidas de duas colmeias de duas espécies de abelhas sem ferrão, *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna) e *Tetragonisca angustula* (Jataí). Para cada espécie de abelha, realizou-se dez capturas de cada colmeia para cada espécie, localizadas em dois locais diferentes do terreno para cada uma das espécies. As abelhas coletadas no Local 01 apresentam uma maior proximidade com os moradores, visto que estas colmeias estão localizadas próximas à porta de entrada da casa do terreno (FIGURA 1).

FIGURA 1 - LOCAL 01 - COLMEIAS LOCALIZADAS PRÓXIMAS A PORTA DO IMÓVEL.



Legenda: A - *Scaptotrigona bipunctata*; B - *Tetragonisca angustula*
 FONTE: Os autores (2022).

As abelhas coletadas no Local 02 não possuíam contato frequente com os moradores da casa, em razão de que suas colmeias estão localizadas no fundo do imóvel, a uma distância de 40 metros do Local 01 (FIGURA 2).

FIGURA 2 - LOCAL 02 - COLMEIAS LOCALIZADAS NO FUNDO DO IMÓVEL



Legenda: A - *Scaptotrigona bipunctata*; B - *Tetragonisca angustula*
 FONTE: Os autores (2022).

Realizou-se a identificação das amostras coletadas a partir da espécie da abelha, local da colmeia e numeração de 1 à 10, totalizando vinte abelhas para cada espécie, utilizou-se a letra “T” para a espécie *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna) e “J” para a *Tetragonisca angustula* (Jataí), “P” para as colmeias próximas a porta do imóvel (Local 01) e “F” para as colmeias no fundo do imóvel (Local 02) ambas com a numeração descrita acima (Tabela 3).

TABELA 3 - IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS CONFORME A ESPÉCIE DA ABELHA E LOCALIZAÇÃO DAS COLMEIAS.

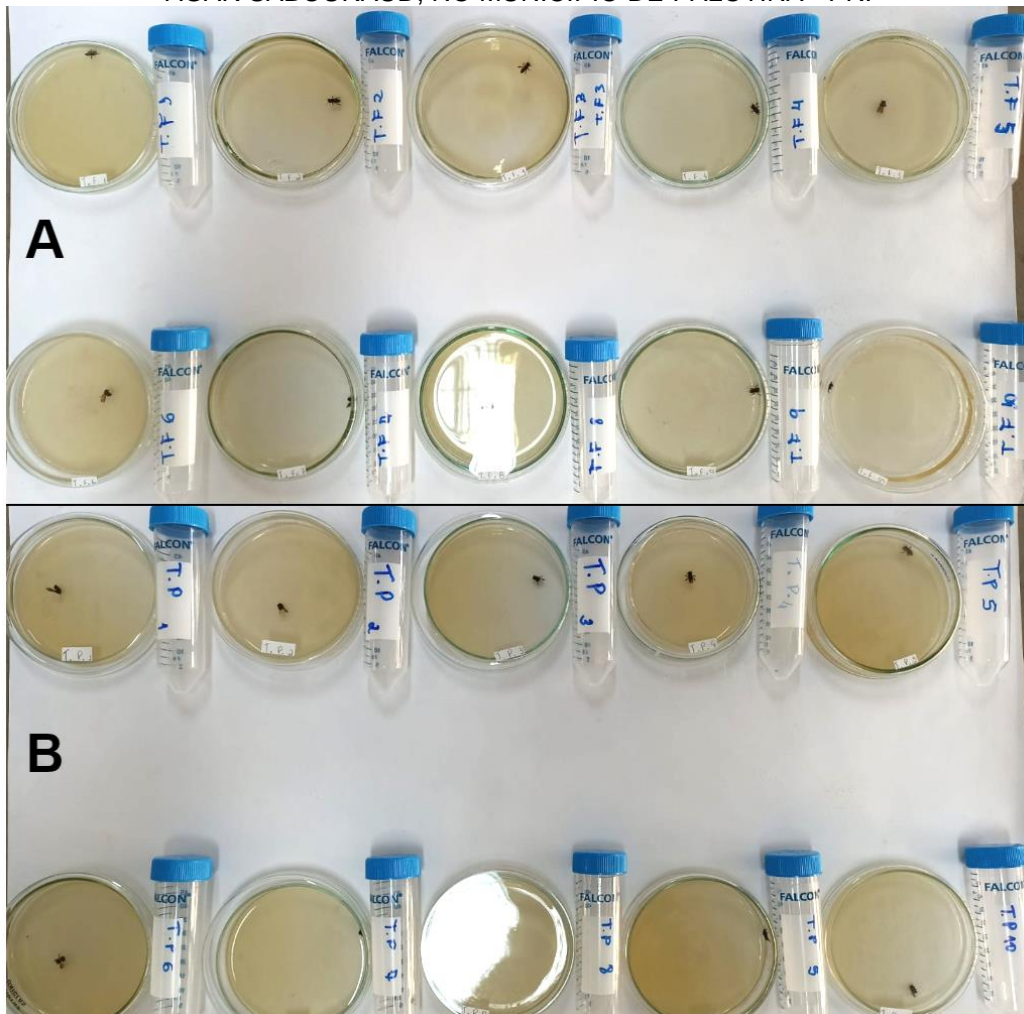
Espécie	Local 01 - colmeias próxima a porta do móvel (P)	Local 02 - colmeias no fundo do imóvel (F)
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	T.P	T.F
<i>Tetragonisca angustula</i> (J)	J.P	J.F

FONTE: Os autores (2022).

Com o auxílio de uma rede de captura de insetos (15 cm de diâmetro) coletou-se as abelhas que saíam das vias de acesso das colmeias, que instantaneamente foram

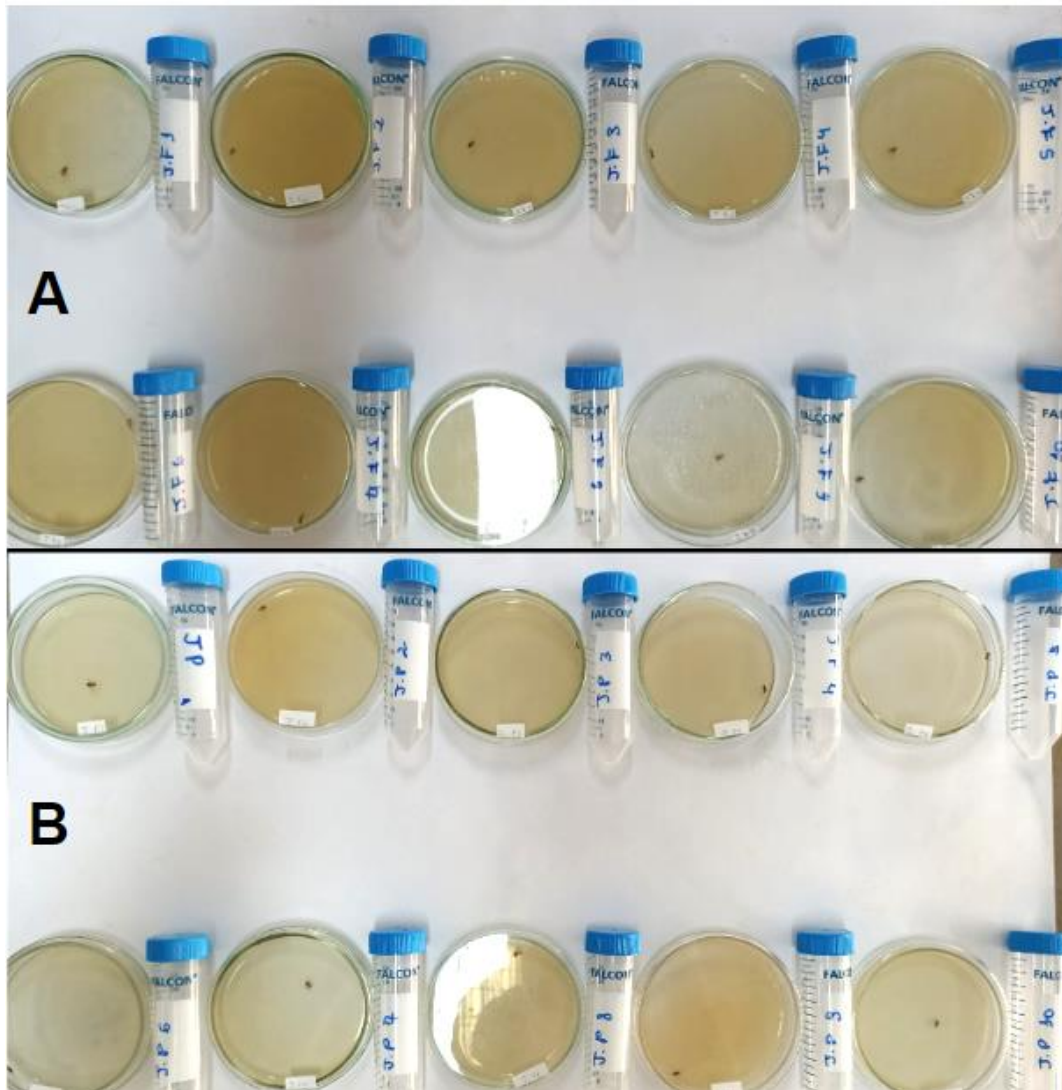
colocadas em tubos cônicos estéreis e identificados, em seguida encaminhou-se as amostras para o laboratório de Microbiologia na Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina. As amostras foram depositadas ao freezer (-20°C) por 5 minutos para facilitar o manuseio das abelhas, em seguida realizou-se a transferência das mesmas durante 30 minutos em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud (FIGURAS 3 e 4).

FIGURA 3 - TRANSFERÊNCIA DAS ABELHAS DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* COLETADAS EM DUAS DIFERENTES COLMEIAS (T.P. E T.F.) PARA PLACAS DE PETRI CONTENDO ÁGAR SABOURAUD, NO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



Legenda: A - *Scaptotrigona bipunctata* coletada no fundo do imóvel (T.F.)
B - *Scaptotrigona bipunctata* coletada próximo a porta da casa dos proprietários do imóvel (T.P.)
FONTE: os autores (2022).

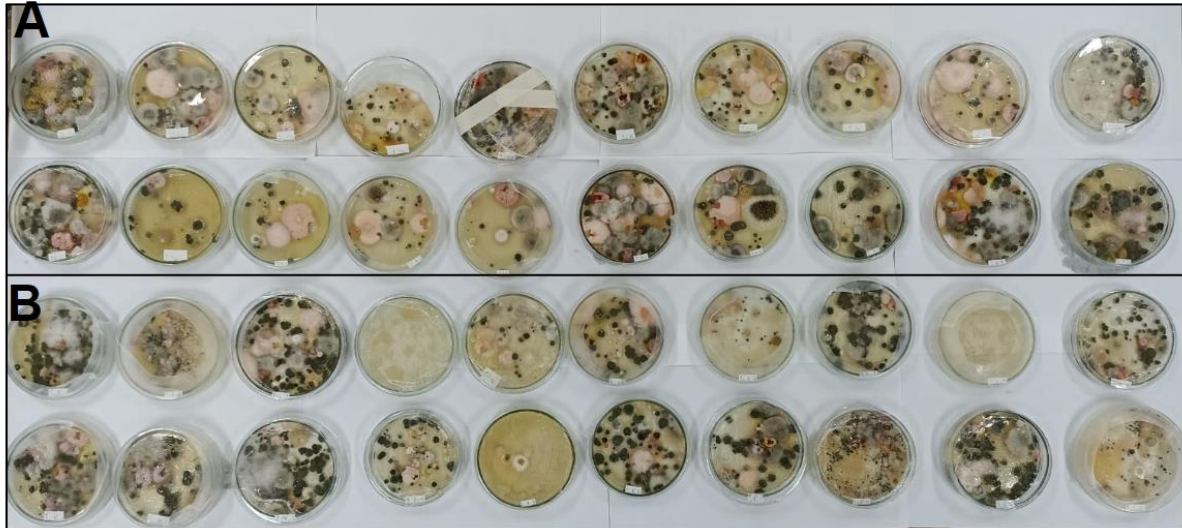
FIGURA 4 - TRANSFERÊNCIA DAS ABELHAS DA ESPÉCIE *Tetragonisca angustula* COLETADAS EM DUAS DIFERENTES COLMEIAS (J.P. E J.F.) PARA PLACAS DE PETRI CONTENDO ÁGAR SABOURAUD, NO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



Legenda: A - *Tetragonisca angustula* coletada no fundo do imóvel (J.F.)
 B - *Tetragonisca angustula* coletada próximo a porta da casa dos proprietários do imóvel (J.P.)
 Fonte: os autores (2022).

Após 30 minutos, as abelhas foram retiradas das placas de petri em condições assépticas. As placas foram incubadas em estufa de crescimento à temperatura de 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) durante 5 dias, condições consideradas ideais para o crescimento de fungos. Após o período de incubação as placas apresentaram crescimento de diversas colônias de microrganismos (FIGURA 5).

FIGURA 5 - CRESCIMENTO DOS FUNGOS DE TODAS AS AMOSTRAS, DAS DUAS ESPÉCIES



Legenda: A - Culturas, em Placas de Petri das amostras de *Tetragonisca angustula* após 5 dias de crescimento e B - das amostras de *Scaptotrigona bipunctata* após 5 dias de crescimento.
 Fonte: os autores (2022)

A partir das colônias presentes nas placas que receberam as abelhas, foi realizado o repique das colônias para placas de Petri esterilizada contendo ágar Sabouraud em condições assépticas, em uma capela de fluxo laminar. Com o auxílio de uma alça de semeadura previamente esterilizada através da flambagem na chama, pequenos fragmentos das colônias de interesse foram retirados e transferidos para placas de Petri esterilizadas, sendo todo o procedimento realizado em torno da chama de um bico de Bunsen. Em seguida, as placas contendo o repique foram mantidas em estufa de crescimento durante 5 dias à temperatura de 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Após o crescimento micelial, as placas que apresentaram contaminação foram repicadas novamente em placas de Petri com ágar Sabouraud até que se obtivessem culturas axênicas. A identificação das amostras repicadas prosseguiu com a inicial de fungo representado por “F” numerado em ordem crescente juntamente a identificação da placa de origem.

4.2 IDENTIFICAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DOS FUNGOS

Após o isolamento das colônias fúngicas em culturas axênicas, analisou-se as suas características macroscópicas como a cor, textura e tamanho. Posteriormente iniciou-se a análise microscópica, em que foram preparadas lâminas para a análise com o auxílio de um microscópio óptico com o objetivo de observar e identificar suas estruturas microscópicas, empregadas para a reprodução sexuais e/ou assexuais em cada espécie fúngica. Na preparação das lâminas para microscopia de luz utilizou-se a técnica com fita

adesiva (durex), em que um pedaço de fita foi estendida sobre a superfície da colônia e em seguida foi removida cuidadosamente e aderida à lâmina contendo corante lactofenol azul de algodão. Após a preparação das lâminas, procedeu-se à observação ao microscópio nas diversas objetivas.

A partir das colônias isoladas em ágar Sabouraud realizou-se também a técnica do microcultivo para algumas das amostras fúngicas, para a observação de algumas características evidenciadas por esta técnica. Na técnica de microcultivo utiliza-se um sistema formado por duas lâminas de microscopia, forradas por um papel filtro dispostas no interior de uma placa de Petri esterilizada em autoclave durante 15 minutos em temperatura de 121°C. Com o auxílio de um bisturi flambado, cortou-se um quadrado de aproximadamente 1 cm² de meio Sabouraud e depositado sobre a lâmina, com uma alça microbiológica, inoculou-se o microrganismo nos quatro cantos do ágar, com o auxílio de uma pinça flambada, transfere-se suavemente uma lamínula estéril na superfície do bloco de ágar, em seguida, adiciona-se um pequeno volume de água destilada estéril na placa de Petri de modo a não tocar a lâmina ou a superfície da lamínula. Após o preparo de todas as placas de microcultivo, as mesmas foram incubadas em uma estufa à 30°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) durante 5 dias. Após o período de incubação, os fungos consumiram os nutrientes contidos no meio e formaram as estruturas de reprodução sobre a superfície das lamínulas. As lamínulas foram transferidas para uma nova lâmina contendo o corante lactofenol azul de algodão. Procedeu-se à análise microscópica em diversas objetivas.

4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS

4.3.1 Extração do DNA

Com a finalidade de identificar a espécie e gênero de 6 amostras isoladas não identificadas através da macromorfologia e micromorfologia, sendo três amostras para a espécie *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna) e 3 da *Tetragonisca angustula* (Jataí), utilizou-se técnicas de biologia molecular para a identificação das mesmas. Para a extração do DNA foi utilizado o kit *Plant/Fungi DNA Isolation* da Norgen Biotek Corporation, conforme protocolo sugerido pelo fabricante. Inicialmente transferiu-se entre 100 mg e 200 mg de micélio da colônia de interesse para um microtubo estéril e em seguida adicionou-se 500 μL de *Lysis Solution* e cinco esferas de vidro, para a homogeneização da solução em agitador vortex durante dez segundos. Posteriormente incubou-se o macerado a 65°C por

dez minutos, em seguida adicionou-se 100 µL de *Binding Buffer I* e depositou-se esta solução em gelo durante cinco minutos. Montou-se uma coluna de filtro para onde transferiu-se o material lisado, em seguida centrifugou-se o material a 14000 rpm por dois minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 100 µL de etanol 70%, em seguida, transferiu-se 600 µL dessa solução para uma coluna de ligação (*Binding Column*) e centrifugou-se a 10000 rpm por um minuto. Descartou-se a solução depositada no tubo sob a coluna e adicionou-se sobre a coluna 500 µL de *Wash Solution* e realizou-se a centrifugação a 10000 rpm por um minuto, por duas vezes. Após lavagem, centrifugou-se a coluna a 14000 rpm por dois minutos para retirar o restante da solução, adicionou-se 50 µL de *Elution Buffer* à coluna e centrifugou-se a 10000 rpm por um minuto. O DNA extraído foi avaliado quanto à sua pureza e concentração em espectrofotômetro 2000® (Thermo Fisher), observando-se a absorbância a 260 e 280 nm, além das relações 260/280 nm e 260/230 nm.

4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da região ITS e sequenciamento

Após a extração, a região do espaçador transcricional interno (ITS1-4) do rDNA ITS1-5.8S-ITS2 (MIRHENDI et al., 2006) foi amplificada, pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), seguindo a recomendação do kit GoTaq Master Mix (Promega), em uma reação de 25 µl contendo aproximadamente 150 ng do DNA genômico, 0,4 µM do iniciador forward ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e do iniciador reverse ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), 0,8 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂ e 1 U de *GoTaq DNA Polimerase* no tampão apropriado da enzima. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; com extensão final a 72°C por 7 minutos, em termociclador.

Um total de 2 µl de cada reação de PCR foi aplicado nos poços de um gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X (Tris-base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8,0) corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio, para confirmação do tamanho, em pares de bases, dos amplicons e viabilidade das amostras. A amplificação da região ITS, com os iniciadores utilizados neste trabalho produziu um amplicon de aproximadamente 600 pb. Foi utilizado o padrão de tamanho molecular 100 pb (Invitrogen TM). Após a corrida eletroforética (corrente constante de 80 mA por cerca de 45 minutos, com o tempo variando conforme o tamanho do gel). O gel foi fotodocumentado utilizando o equipamento Loccus Biotecnologia L.PIX.

Para a realização do sequenciamento molecular, uma alíquota de 5 a 10 µl da reação de PCR foi seca em estufa a 50°C e enviadas para a empresa Ludwig Biotecnologia LTDA, Alvorada-RS, para a realização do sequenciamento. Foi utilizado o sequenciador automático ABI-Prism 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Com as sequências geradas, o eletroferograma foi gerado utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2013) e os resultados do sequenciamento foram comparados com as sequências depositadas no banco de dados GenBank, NCBI (National Center for Biotechnology), através da ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – versão 2.215 do BLAST 2.0). O critério adotado para interpretação foi de que sequências com identidade $\geq 99\%$ são consideradas como pertencentes à mesma espécie e gênero; sequências $\geq 98\%$ pertencem ao mesmo gênero, porém representam variação dentro da espécie; e sequências $\geq 95\%$ e inferiores a 98% pertencem apenas ao mesmo gênero (GODINHO et al., 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

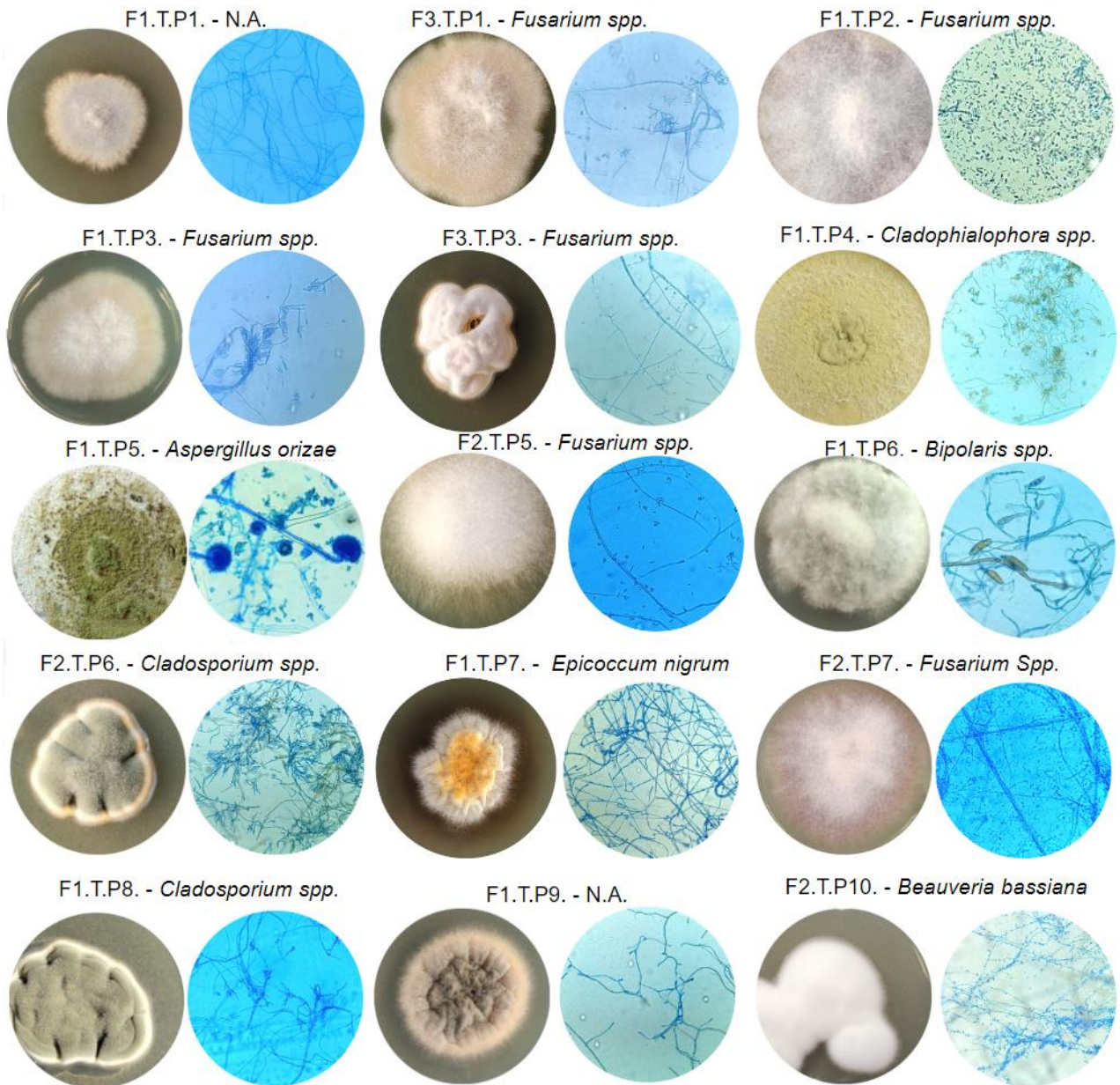
Entre as 30 amostras da *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna), foram identificados 8 gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Beauveria*, *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Bipolares*; em relação às 26 amostras da *Tetragonisca angustula* (Jataí), foram identificados 10 gêneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Talaromyces* e *Trichoderma*.

TABELA 4: GÊNEROS DE FUNGOS IDENTIFICADOS ENTRE AS DUAS ESPÉCIES DE MELÍPONAS.

Gêneros	<i>Scaptotrigona</i>	<i>Tetragonisca angustula</i>
<i>Alternaria</i> sp.	-	X
<i>Aspergillus</i> sp.	X	X
<i>Beauveria</i> sp.	X	-
<i>Bipolares</i> sp.	X	-
<i>Cladosporium</i> sp.	X	X
<i>Cladophialophora</i> sp.	X	-
<i>Cunninghamella</i> sp.	-	X
<i>Curvularia</i> sp.	-	X
<i>Drechslera</i> sp.	-	X
<i>Epicoccum</i> sp.	X	X
<i>Fusarium</i> sp.	X	X
<i>Penicillium</i> sp.	X	-
<i>Talaromyces</i> sp.	-	X
<i>Trichoderma</i> sp.	-	X
Total	8	10

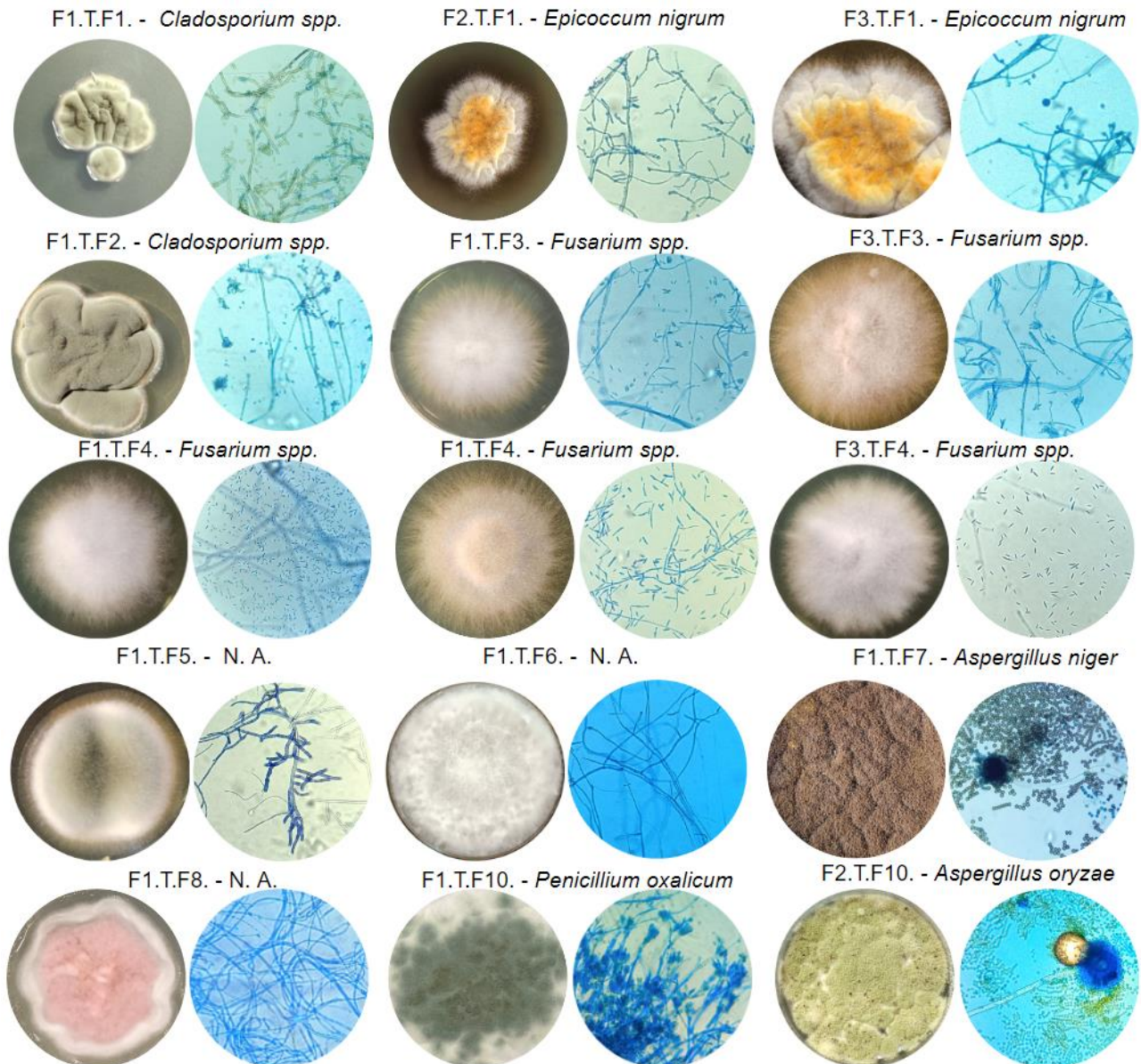
FONTE: Os autores (2022).

FIGURA 6 - ASPECTOS MACRO E MICROMORFOLÓGICOS DOS FUNGOS ISOLADOS DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* DO LOCAL 01.



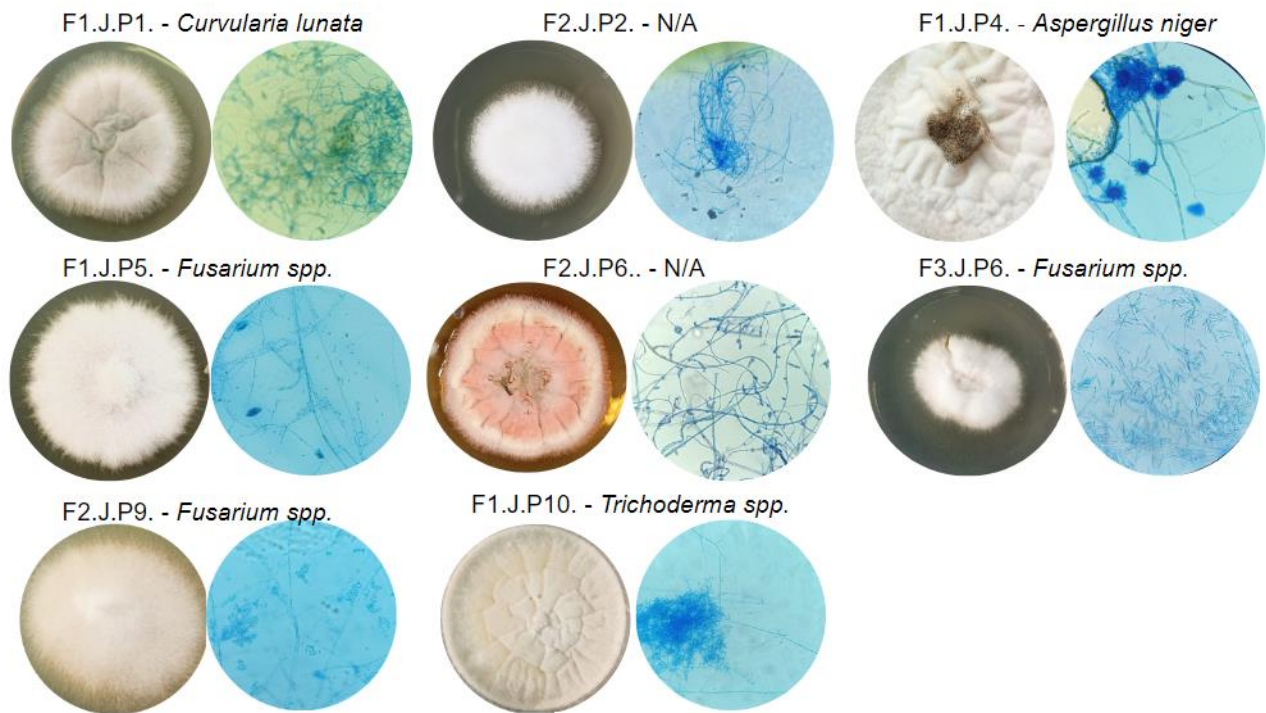
FONTE: Os autores (2022).

FIGURA 7 - ASPECTOS MACRO E MICROMORFOLÓGICOS DOS FUNGOS ISOLADOS DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* DO LOCAL 02.



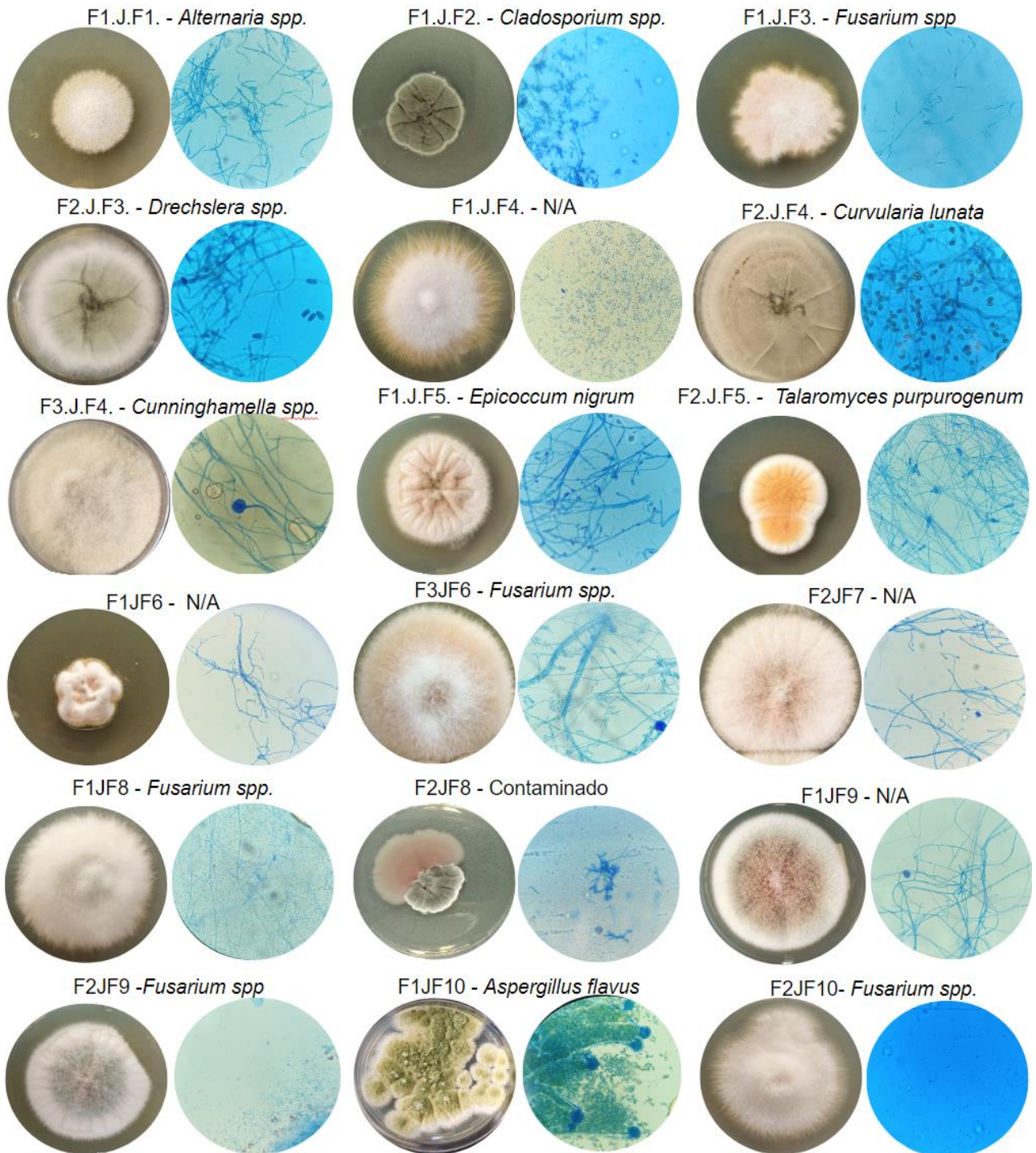
FONTE: Os Autores (2022)

FIGURA 8 - ASPECTOS MACRO E MICROMORFOLÓGICOS DOS FUNGOS ISOLADOS DA ESPÉCIE *Tetragonisca angustula* DO LOCAL 01.



FONTE: Os autores (2022)

FIGURA 9 - ASPECTOS MACRO E MICROMORFOLÓGICOS DOS FUNGOS ISOLADOS DA ESPÉCIE *Tetragonisca angustula* DO LOCAL 02.



FONTE: Os autores (2022).

Não foram identificados, através da observação macro e microscópica, os fungos referentes às amostras F1.J.P1, F1.J.F5, F2.J.F5, F1.T.F10, F3.T.F1, F3.T.P1 devido à ausência de estruturas reprodutivas, portanto foram submetidos ao sequenciamento genético, da região ITS. O DNA extraído foi avaliado quanto à sua pureza e concentração em espectrofotômetro (TABELA 4), observando-se a absorvância a 260 e 280 nm, além das relações 260/280 nm e 260/230 nm.

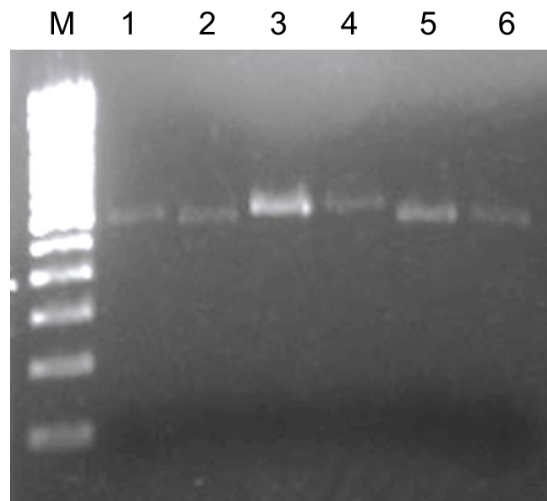
TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO E GRAU DE PUREZA

Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
F1JP1	LAB BMV	09/08/2022 20:35	21,7	ng/µl	0,435	0,204	2,13	0,69	DNA	50,00
F1JF5	LAB BMV	09/08/2022 20:30	27,2	ng/µl	0,544	0,270	2,01	1,24	DNA	50,00
F2JF5	LAB BMV	09/08/2022 20:30	90,5	ng/µl	1,810	0,889	2,04	1,53	DNA	50,00
F1TF10	LAB BMV	09/08/2022 20:31	15,7	ng/µl	0,314	0,156	2,01	1,57	DNA	50,00
F1TP3	LAB BMV	09/08/2022 20:32	38,2	ng/µl	0,765	0,360	2,12	3,78	DNA	50,00
F3TP1	LAB BMV	09/08/2022 20:33	28,0	ng/µl	0,560	0,298	1,88	1,87	DNA	50,00

FONTE: Os autores (2022).

A amplificação, através da PCR, da região ITS1-4 foi positiva para todos os isolados, e gerou um produto de amplificação de aproximadamente 600 pb (FIGURA 10).

FIGURA 10 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-4.



LEGENDA: Amostra 1 - F1.J.P1, amostra 2 - F1.J.F5, amostra 3 - F2.J.F5, amostra 4 - F1.T.F10, amostra 5 - F1.T.P3, amostra 6 - F3.T.P1

FONTE: Os autores (2022).

As sequências obtidas após o sequenciamento da região ITS1-4 foram analisadas através da plataforma de bioinformática *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), do

National Center for Biotechnology Information (NCBI) e os gêneros e espécies identificados estão apresentados na Tabela 5.

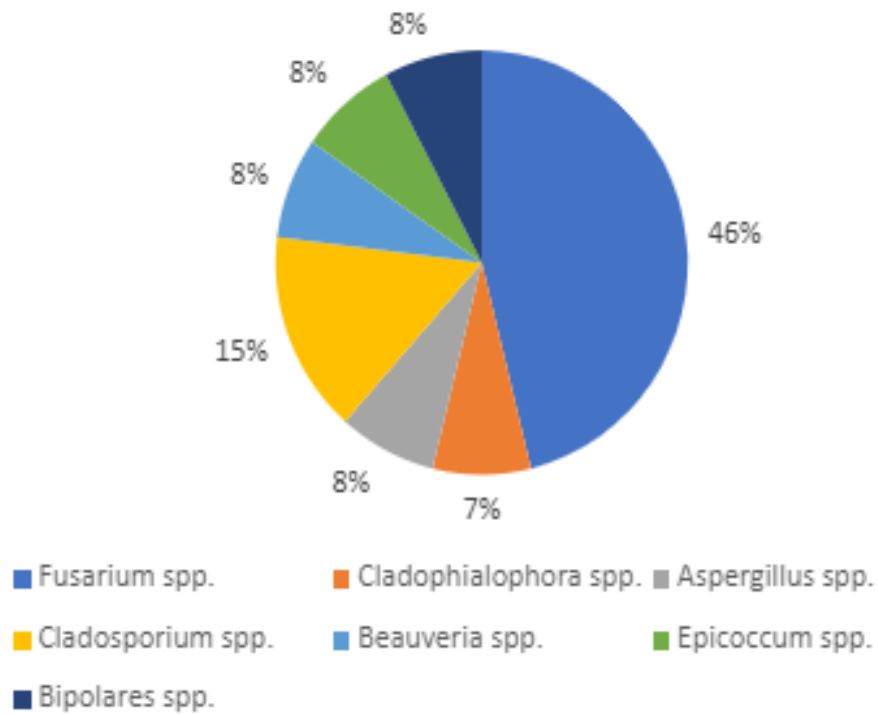
TABELA 6 - IDENTIFICAÇÃO DE 6 ISOLADOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS DO rDNA.

Amostra	Identificação	% de similaridade	Referência do GenBank
F1.J.P1.	<i>Curvularia lunata</i>	99,62	MH183194.1
F1.J.F5.	<i>Epicoccum nigrum</i>	99,80	MN089646.1
F2.J.F5.	<i>Talaromyces</i>	99,82	OP237340.1
F1.T.F10.	<i>Penicillium</i>	99,64	MH367526.1
F3.T.F1.	<i>Epicoccum nigrum</i>	100	MG602536.1
F3.T.P1.	<i>Fusarium sp.</i>	100	MH582450.1

FONTE: Os autores (2022).

A frequência dos gêneros de fungos identificados nas amostras da Tubuna da colmeia do Local 01 foi: 46% *Fusarium*, 15% *Cladosporium*, 7% *Cladophialophora*, 8% *Aspergillus* e 8% *Beauveria* (GRÁFICO 1).

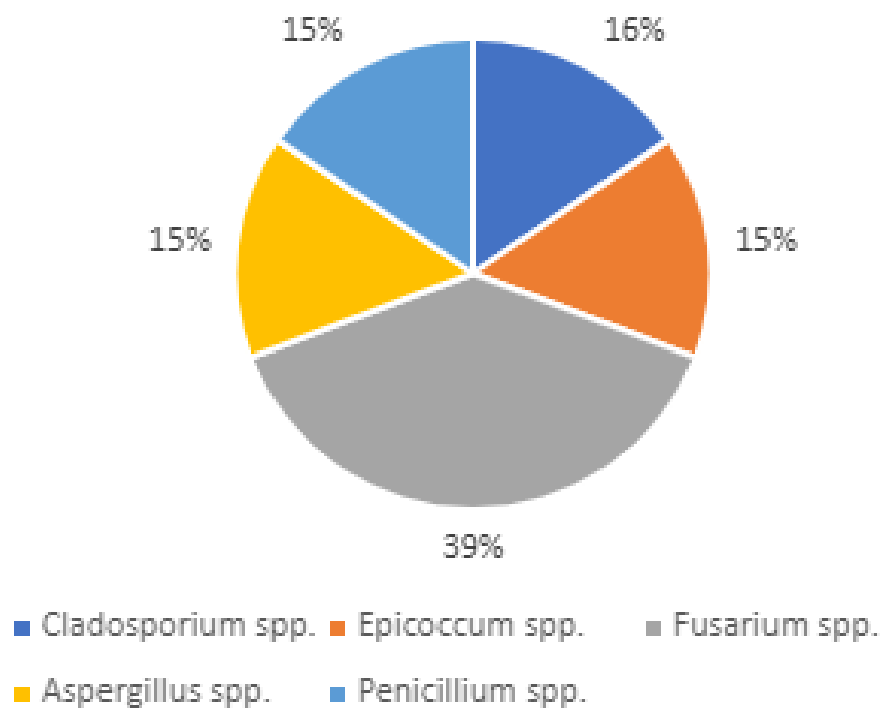
GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DOS GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS IDENTIFICADOS DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* NO LOCAL 01.



FONTE: Os autores (2022).

Das amostras isoladas de Tubuna do Local 02 (colmeia no fundo do imóvel), o gênero *Fusarium* foi o mais frequente (39%), seguido de *Cladosporium* (16%), *Penicillium* (15%), *Aspergillus* (15%) e *Epicoccum spp.* (espécie *nigrum*) (15%) (GRÁFICO 2).

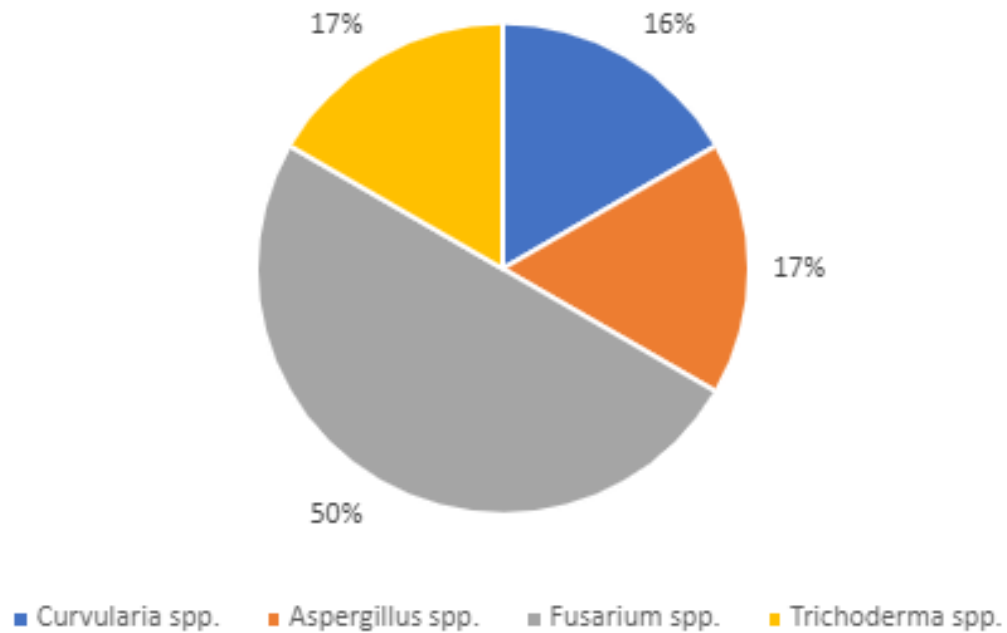
GRÁFICO 2: GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS IDENTIFICADOS DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* NO LOCAL 02.



FONTE: Os autores (2022).

Os fungos identificados da abelha Jataí também apresentaram maior frequência do gênero *Fusarium*, tanto na colmeia próxima a porta quanto na colmeia do fundo do imóvel, equivalente à Tubuna. As porcentagens obtidas dos gêneros de fungos nas abelhas Jataí do Local 01 foram: 60% de *Fusarium*, 17% *Trichoderma*, 17% *Curvularia* e 17% *Aspergillus*. (GRÁFICO 3).

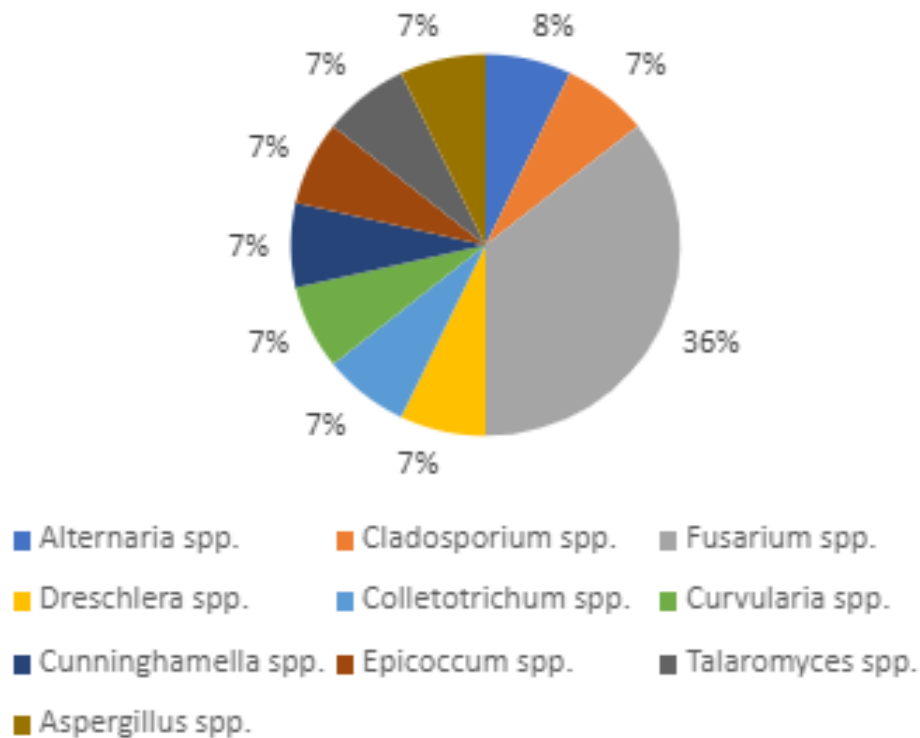
GRÁFICO 3: GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS IDENTIFICADOS DA ESPÉCIE *Tetragonisca angustula* NO LOCAL 01.



FONTE: Os autores (2022).

A colmeia de Jataí localizada no Local 02 (fundos) apresentou possuir maior variação de gêneros e espécies de fungos, com as seguintes porcentagens: 36% de *Fusarium*, 8% de *Alternaria*, 7% de *Curvularia*, 7% de *Aspergillus*, 7% de *Drechslera*, 7% de *Cladosporium*, 9% de *Cunninghamella*, 7% de *Talaromyces purpurogenum*, 7% de *Epicoccum nigrum* e 7% de *Colletotrichum* (GRÁFICO 4).

GRÁFICO 4: GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS IDENTIFICADOS DA ESPÉCIE *Tetragonisca angustula* NO LOCAL 02.



FONTE: Os autores (2022).

A maior variedade de fungos observada nas abelhas da espécie Jataí, do Local 02 (fundos do imóvel) pode estar associada com a maior quantidade de amostras analisadas, em comparação com às abelhas Jataí, da colmeia próxima a porta do imóvel, (Local 01) a qual apresentou leveduras e contaminações durante o processo de isolamento, o que refletiu em uma quantidade menor de amostras. Esta hipótese deve ser confirmada em trabalhos subsequentes por nossa equipe, visto que dados desta natureza não podem ser encontrados na literatura. As abelhas coletadas para o experimento apresentavam características campeiras (forrageiras), as quais realizam a busca de alimentos para suas colmeias, portanto, a distância de deslocamento delas é maior que as demais integrantes trabalhadoras do interior das colmeias. Diferentes estações do ano influenciam na variação dos fungos identificados, como na primavera que ocorre maior número de plantas em floração, e as abelhas não precisam se deslocar a maiores distâncias para fazer a coleta do pólen, influenciando na variedade dos fungos. Assim como comportamentos específicos

de cada espécie também pode contribuir para a variação dos fungos encontrados em cada espécie.

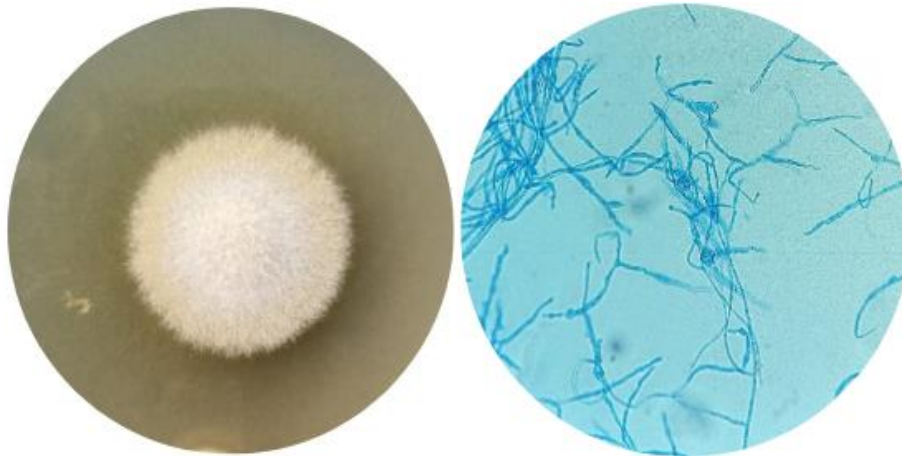
5.1 Caracterização macromorfológica e micromorfológica dos fungos identificados

Alternaria spp.

Os fungos deste gênero produzem um grupo de micotoxinas como os alternarióis, altertoxinas, ácido tenuasônico, etc. Estas substâncias desempenham um papel importante na patogênese e podem ser empregadas como agentes seletivos na seleção *in vitro* no nível celular para resistência a doenças (HAMID & STRANGE, 2000).

As características morfológicas deste fungo considerado um fitopatógeno, baseia-se em parâmetros da colônia com coloração parda (FIGURA 11), presença de alteração da coloração na superfície entre o contorno e as margens, variando de branco para palha. A morfologia microscópica da espécie é principalmente identificada pelos conídios de grandes dimensões, de cor marrom, multicelular. Além disso, também apresentou hifas se proliferando dando origem aos conidióforos, os quais possuem ramificações formando conídios ainda imaturos. Espécies do gênero *Alternaria* podem se comportar como fitopatógenos importantes em muitas plantas cultivadas comercialmente, possuindo uma grande variedade de potenciais hospedeiros. No entanto, muitas linhagens deste gênero associam-se simbioticamente com muitas plantas de forma assintomática, como fungos endofíticos. A definição de “endofítico” tem se alterado com o passar dos anos. Entende-se neste contexto “endofítico” como um microrganismo (normalmente um fungo ou bactéria) que vive no interior de uma planta hospedeira, sem necessariamente causar uma doença para a planta). Em alguns casos, a associação simbiótica assintomática pode se converter em parasitismo, afetando de forma negativa as culturas vegetais. Uma extensa discussão tem se desenvolvido há muitos anos sobre a definição de fungo “cosmopolita” do gênero *Alternaria*. De qualquer forma, se torna importante o conhecimento da associação deste gênero com as abelhas sem ferrão, e a manutenção destas linhagens de *Alternaria* em bancos de germoplasma e coleções de cultura para estudos posteriores (DE MERS, 2022). Todos os isolados fúngicos obtidos neste trabalho foram depositados e fazem parte do Banco de Germoplasma do NEMA - Núcleo Experimental de Micologia Aplicada, UFPR, Setor Palotina.

FIGURA 11 - MORFOLOGIA DO GÊNERO *Alternaria*, ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Tetragonisca angustula* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



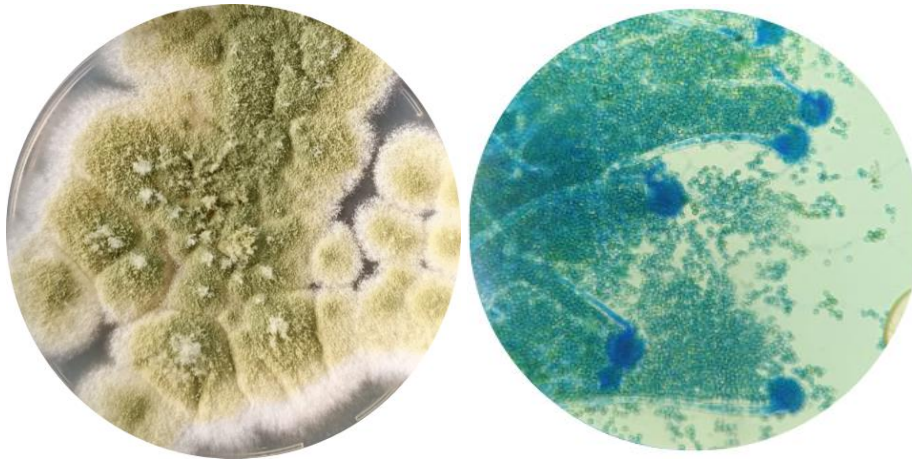
FONTE: Os autores (2022).

Aspergillus flavus

Essa espécie de fungo é conhecida por ser um importante patógeno humano e animal, produtor de compostos alergênicos e grande produtor de diversos metabólitos, como as aflatoxinas produzidas em alguns alimentos como no amendoim, por exemplo (HEDAYATI et al., 2007). Além disso, produz uma série de compostos secundários que podem ser estudados para possível uso farmacêutico (KHATTAK et al, 2021). Tão importante quanto, esta espécie é capaz de degradar numerosos polímeros orgânicos complexos sendo considerado um reciclador eficaz na biosfera. O progresso atual da genômica do *A. flavus* permite visualizar as aplicações biotecnológicas do mesmo no desenvolvimento de drogas farmacêuticas, culturas comerciais resistentes na agricultura e na produção de biocombustíveis por meio da descoberta de enzimas (HEDAYATI et al., 2007).

Esta espécie é cosmopolita, isolada principalmente de plantas e do solo. A análise macroscópica possibilitou características definidas para este fungo, como a textura aveludada, coloração verde na superfície e o reverso amarelado. Em relação às características microscópicas, apresenta cabeças de conídios que irradiam principalmente, com massas de conídios redondos. Os conidióforos possuem paredes ásperas, especialmente perto da vesícula. Suas estruturas de reprodução assexuadas são bem visíveis (GERMAIN & SUMMERBELL, 2003), conforme observado na Figura 12.

FIGURA 12 - MORFOLOGIA DA ESPÉCIE *Aspergillus flavus*, ISOLADA DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Tetragonisca angustula* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



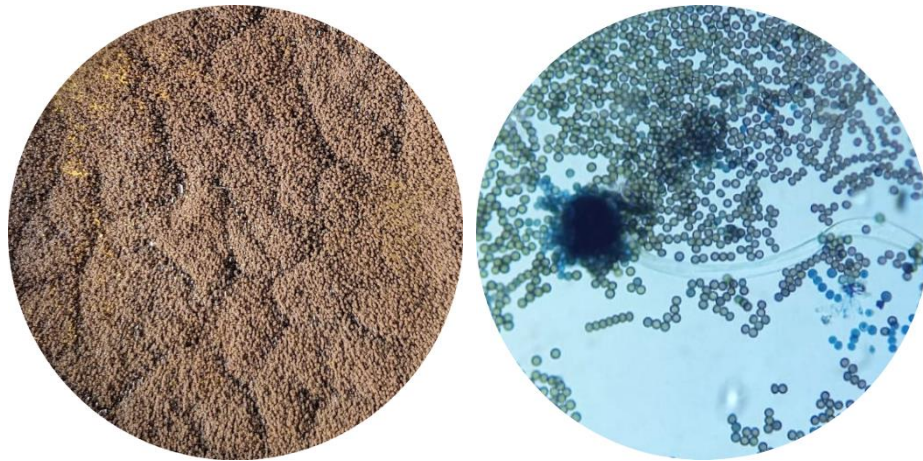
FONTE: Os autores (2022).

Aspergillus niger

Este fungo atua como microrganismo importante no ambiente biotecnológico pois produz um grande número de micotoxinas, é capaz de produzir não apenas proteínas e enzimas em altas concentrações, mas também produtos farmacêuticos que são benéficos para a saúde humana e animal segundo Santos (2007). Esta espécie também pode em alguns casos infectar animais e humanos, especialmente imunocomprometidos. As infecções mais frequentes ocorrem no sistema nervoso, olhos e cavidades orbitais. Recentemente foi relatada uma infecção na cavidade oral que se disseminou para o sistema respiratório em um paciente infectado na epidemia de Covid-19, mostrando que alguns isolados podem se adaptar às condições ambientais se comportando como patógenos oportunistas (FIEMA et al, 2022).

Esta espécie apresenta a macromorfologia com base branca, e uma camada densa de conidióforos de coloração marrom escuro. Na micromorfologia a extremidade da cabeça apresenta forma radiada, composta de cadeias de conídios. Os conidióforos são formados por estípites lisos hialinos, também de coloração marrom. Estas características foram observadas para a identificação deste fungo, conforme pode-se observar na Figura 13.

FIGURA 13 - MORFOLOGIA DA ESPÉCIE *Aspergillus niger*, ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



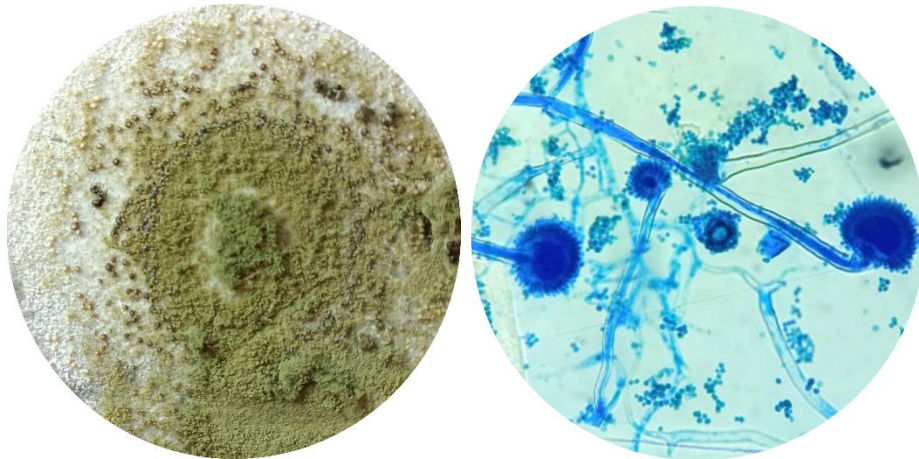
FONTE: Os autores (2022).

Aspergillus oryzae

Esta espécie é utilizada há muito tempo na elaboração de comidas tradicionais fermentadas na culinária japonesa (MACHIDA et al., 2005), além disso, na literatura é descrito como um grande potencial de produzir e secretar um elevado número de proteínas e principalmente enzimas, podendo ser caracterizado como um aliado da biotecnologia (MACHIDA et al., 2008).

A. oryzae normalmente é encontrado no solo e em materiais vegetais em decomposição, em regiões tropicais já que requer temperatura de crescimento relativamente quente. Inicialmente a sua colônia apresenta cor esbranquiçada e depois fica verde ou marrom com a idade, a textura da cultura é macia, conforme pode-se observar na Figura 14. Os conidióforos são hialinos e têm principalmente paredes rugosas. Seus conídios são grandes e lisos ou finamente rugosos e podem ser liberados no ar. Um interessante relato descrito por Wang et al. (2019) trata da obtenção de um isolado de *A. oryzae* a partir de um ácaro vermelho *Dermanyssus gallinae*, inseto hematófago conhecido por atacar galinhas poedeiras. Neste artigo, os autores isolaram uma linhagem de *A. oryzae* que colonizava um ácaro em decomposição, mostrando o potencial desta espécie para a utilização no controle biológico de insetos.

FIGURA 14 - MORFOLOGIA DA ESPÉCIE *Aspergillus oryzae*, ISOLADA DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



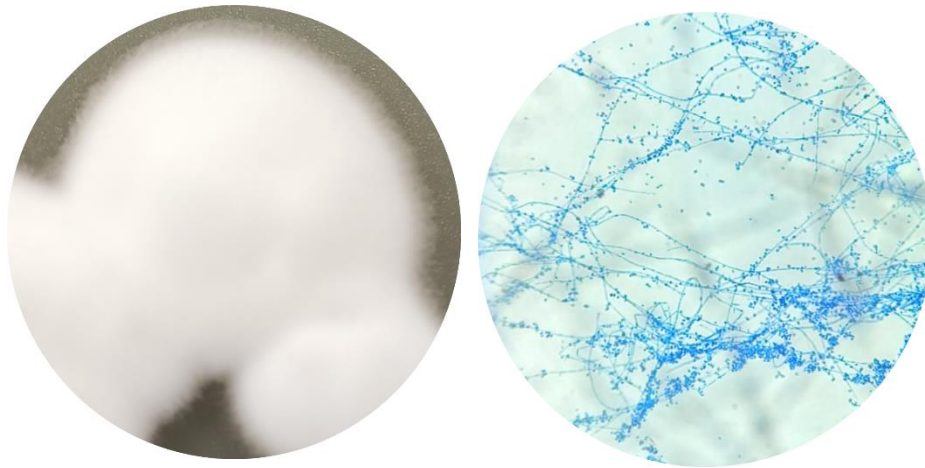
FONTE: Os autores (2022).

Beauveria bassiana

Esta espécie é um importante patógeno de insetos, sendo amplamente pesquisada para a utilização em mecanismos de controle biológico de vários insetos hospedeiros. Pode ser isolada tanto do solo como de insetos parasitados, é bem conhecida como um agente da doença muscardina (doença mortal que resulta do ataque de um fungo parasítico em um inseto) em diferentes insetos, como percevejos, larva-alfinete, lagartas e outros. Geralmente, seus esporos penetram na cutícula de qualquer parte dos insetos, iniciando o processo de colonização. Porém, a infecção também pode ocorrer diretamente por meio do aparelho digestório e respiratório (LIU et al., 2000). Devido seu elevado potencial biológico no controle de pragas, é um entomopatogênico muito estudado e comercializado na agricultura, podendo esta espécie ser caracterizada como um microrganismo fúngico com propriedades biotecnológicas.

A colônia possui coloração branca e textura macia, conforme pode ser visualizado na Figura 15. Em relação a aparência microscópica apresenta hifas septadas, hialina. Possui conídios inflados na base, terminando em um filamento fino e com zigue-zague, essas células normalmente estão agrupadas em massas densas (GERMAIN & SUMMERBELL, 2003).

FIGURA 15 - MORFOLOGIA DA ESPÉCIE *Beauveria bassiana*, ISOLADA DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



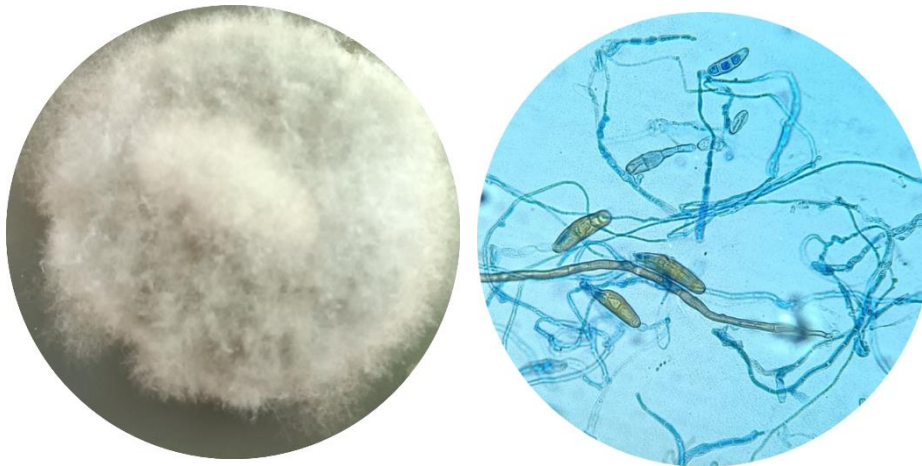
FONTE: Os autores (2022).

Bipolaris spp.

Este gênero é considerado um patógeno de diversas espécies de plantas, possui mais de 100 espécies, a grande maioria está associada a manchas nas folhas ou ferrugem, podridão das raízes, podridão da espiga, praga das plântulas e outras doenças de gramíneas cultivadas e silvestres. Muitas espécies do gênero *Bipolaris* são de considerável importância econômica, como *B. oryzae*, *B. maydis* e *B. sorokiniana*, causando doenças devastadoras em culturas de cereais (MANAMGODA et al., 2014).

A colônia possui coloração clara tornando-se cinza conforme a idade (FIGURA 16), a sua textura é macia. Como características microscópicas pode-se citar: hifas septadas, conidióforos geniculados, os conídios são retos, arredondados em ambas as extremidades, possui um a vários distoseptos (septos que não se estendem até a parede celular com células fechadas dentro de sacos), possui tubos de geração que se desenvolvem a partir das células terminais do conídio, crescendo na direção do seu eixo longitudinal (GERMAIN & SUMMERBELL, 2003). Este isolado fúngico obtido a partir de abelhas sem ferrão na região Oeste do estado do Paraná, assim como outras espécies, representam informações importantes obtidas através de trabalhos científicos na área de prospecção de agentes fúngicos com importância para a agricultura, visto que a região é caracterizada como uma das maiores produtoras de grãos no território nacional.

FIGURA 16 - MORFOLOGIA DO GÊNERO *Bipolaris*, ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



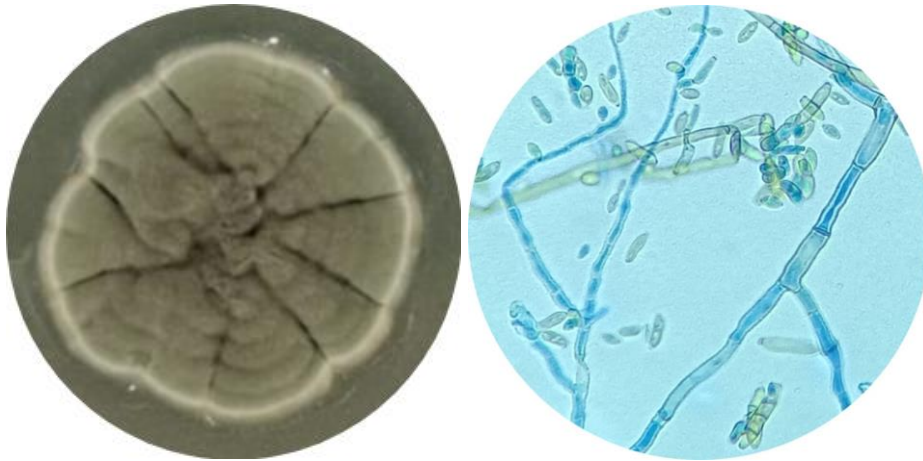
FONTE: Os autores (2022).

Cladosporium spp.

Este gênero possui elevado potencial biotecnológico, já que é capaz de produzir alguns metabólitos secundários, como antibióticos que são inibidores de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (GALLO et al., 2004). Além disso, algumas espécies de *Cladosporium* são inseticidas biológicos eficientes, particularmente contra insetos que desenvolveram resistência a inseticidas químicos (ABDEL-BAKY & ABDEL-SALAM, 2003).

São geralmente não-patogênicos, casos raros de infecções cutâneas e pulmonar foram relatados, mas não foram realmente confirmados. Muitas espécies são cosmopolitas de solo, detritos de plantas e superfícies foliares. Uma nova espécie deste gênero, denominada *C. lebrasie*, foi relatada contaminando alimentos processados como pães-de-leite na França (Razafinarivo et al., 2016). *Cladosporium* é muito frequentemente isolado do ar, especialmente durante as estações em que a umidade do ar é elevada (GERMAIN & SUMMERBELL, 2003). A textura da colônia é aveludada, apresenta crescimento moderadamente rápido, a superfície da colônia possui coloração marrom azeitona e a base preto acastanhado. Em relação às características microscópicas, o gênero possui hifas septadas, conidióforos marrons, geralmente septados e blastoconídios em cadeias ramificadas (FIGURA 17).

FIGURA 17 - MORFOLOGIA DO GÊNERO *Cladosporium*, ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Tetragonisca angustula* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR



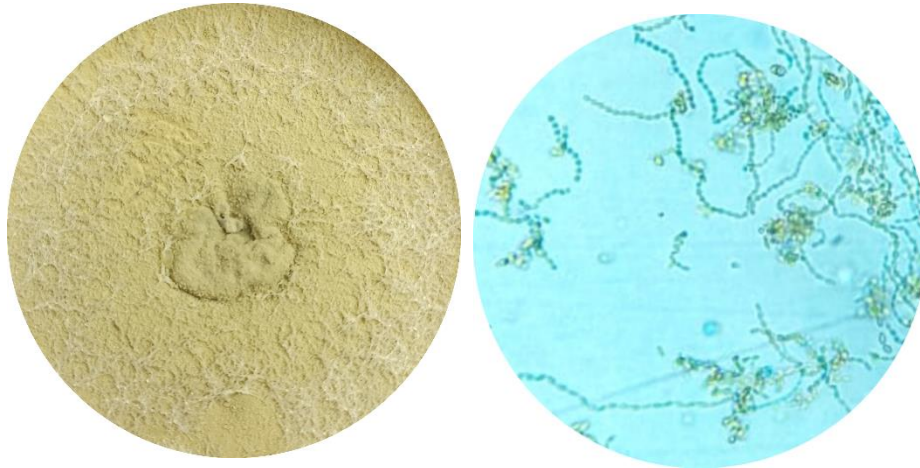
FONTE: Os autores (2022).

Cladophialophora spp.

Este gênero fúngico compreende muitas espécies que causam infecções graves e até fatais em humanos, bem como cepas ambientais capazes de degradar hidrocarbonetos poliaromáticos. *C. immunda* é de especial interesse médico e biotecnológico porque é frequentemente isolado tanto de humanos quanto de solo contaminado e demonstrou crescer em hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) como única fonte de carbono. Por esta razão, essa espécie é um dos candidatos mais importantes para biorremediação (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2001).

Este gênero costuma ser cosmopolita, sapróbio de solo e material vegetal em decomposição. A aparência da colônia apresentou coloração verde azeitona (FIGURA 18), tanto na superfície quanto no verso da colônia, possui textura macia e crescimento moderadamente rápido. Em relação às características microscópicas, apresenta hifas septadas, conidióforos, septo, não diferenciados das hifas vegetativas. Possui conídios unicelulares, elipsoidal, em cadeias moderadamente ramificadas (GERMAIN & SUMMERBELL, 2003).

FIGURA 18 - MORFOLOGIA DO GÊNERO *Cladophialophora*, ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



FONTE: Os autores (2022).

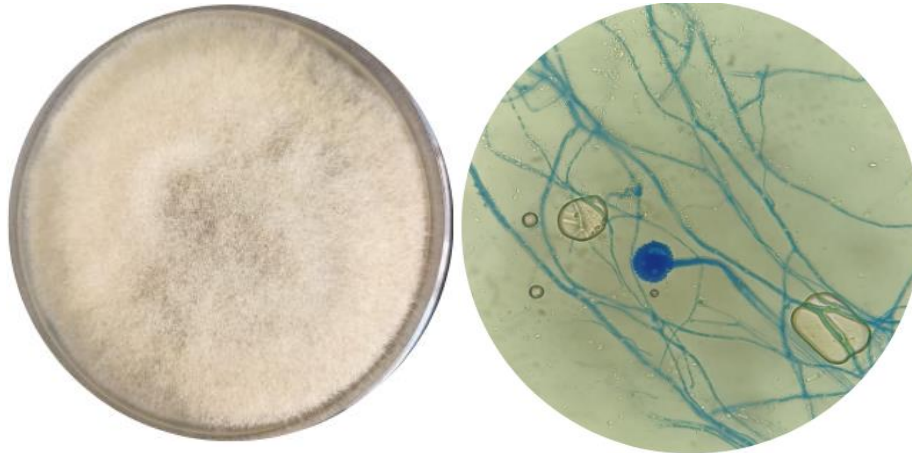
Cunninghamella spp.

Os fungos pertencentes a esse gênero são geralmente encontrados no solo, substratos orgânicos, grãos armazenados, etc. Algumas espécies são relatadas como causadoras de infecções, como a mucormicose humana, no entanto, outras espécies são relatadas como muito úteis no tratamento de diversas doenças (CHA; DOERGE; CERNIGLIA, 2001).

O gênero *Cunninghamella* contém espécies de importância em micologia médica e em processos biotecnológicos. É caracterizado como uma enorme fonte de moléculas com atividades biológicas promissoras. Diferentes espécies de *Cunninghamella* provaram sua capacidade de produzir muitos metabólitos secundários, incluindo ácidos graxos (ácido palmítico, ácido oleico e ácido esteárico), além de dois compostos esteróides; γ -amirina (A4) e γ -sitosterol com várias atividades biológicas, como antifúngica e antibacteriana. Além disso, há espécies capazes de produzir diferentes enzimas que podem realizar biotransformações (MATTAR; HAMMAD; ZAIN, 2011).

A aparência da colônia é algodonosa e possui coloração branca a cinza-amarelada. As espécies deste gênero são caracterizadas pela formação de esporângios uniesporados e pedicelados na superfície da vesícula. O gênero apresenta micélio não septado e hifas largas. Conidióforos eretos, ramificados, irregulares, cada ramo terminando em globos.

FIGURA 19 - MORFOLOGIA DO GÊNERO *Cunninghamella*, ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Tetragonisca angustula* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



FONTE: Os autores (2022).

Curvularia lunata

Diferentes espécies de *Curvularia* impactam significativamente no melhoramento global de cultivos, atuam como catalisadores em reatores em batelada para biossíntese de enzimas industriais e medicamentos, bioengenharia de nanopartículas verdes, agente de biofertilizante, biorremediação e bio-hidrometalurgia, dessa forma, pode-se considerar que este gênero é de grande importância para a biotecnologia e um vetor indispensável de desenvolvimento da bioeconomia (TILLEY & WALKER, 2002).

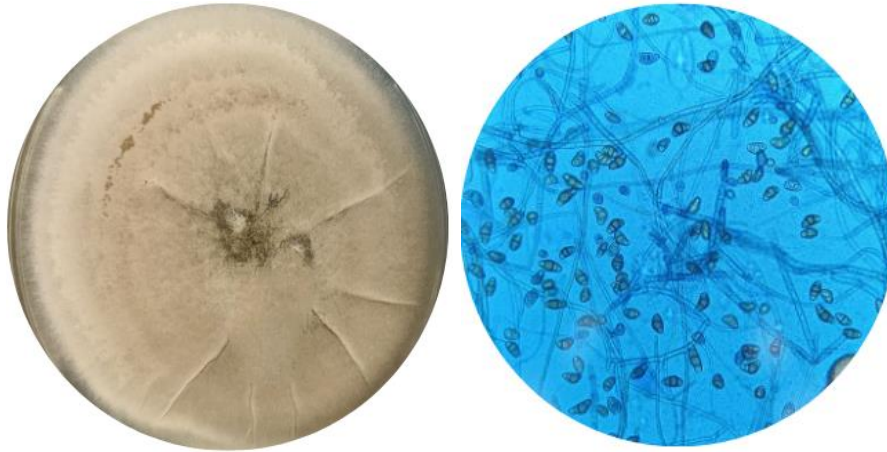
Há estudos relatando o potencial de *Curvularia lunata* em realizar a catálise da síntese de nanopartículas de óxido de cério (CeO₂NPs) que exibem considerável efeito inibitório contra Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Bacillus subtilis*) e Gram-negativos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* e *Klebsiella pneumoniae*) (MUNUSAMY et al., 2014). Além disso, descobriu-se que esta espécie produz um agente emulsificante extracelular em compostos solúveis em água e que a mesma também pode ser utilizada para a produção de hidrocortisona. (PARASZKIEWICS & DYUGOYSKI, 1998).

Geralmente as espécies são patógenos facultativos de plantas tropicais ou subtropicais, mas algumas podem ser isoladas em áreas agrícolas temperadas. Ocasionalmente podem causar infecção humana, incluindo onicomicose, ceratite, sinusite entre outras. A morfologia da colônia apresenta textura de lã, a coloração é branca tornando-se marrom na superfície da colônia e no inverso (FIGURA 20).

Apresenta hifas septadas, conidióforos que podem ser geniculados, simples ou

ramificados. Os conídios são ligeiramente, mas distintamente curvados, transversalmente multiseptados, com uma célula central normalmente expandindo e mais escuro que as outras células (GERMAIN & SUMMERBELL, 2003).

FIGURA 20- MORFOLOGIA DA ESPÉCIE *Curvularia lunata*, ISOLADA DE ABELHA SEM FERRÃO *Tetragonisca angustula* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



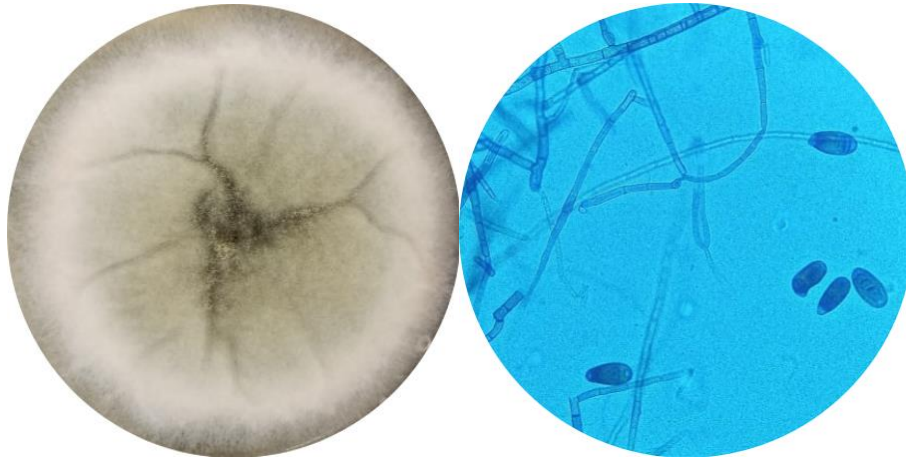
FONTE: Os autores (2022).

Drechslera spp.

Drechslera sp. é utilizada na biorremediação da poluição por óleo cru no Kuwaiti, devido à sua capacidade de crescer e degradar o hidrocarboneto em meios com altas concentrações de NaCl (10 %) e em altas temperaturas, condições estressantes encontradas no deserto do Kuwaiti (OBUEKWE et al., 2005). Além disso, este gênero é capaz de produzir pigmentos amarelo-alaranjados. Algumas espécies já foram estudadas e forneceram bons resultados, incluindo *D. siccans* que fornece herbicida natural para ervas daninhas, portanto, este gênero é um excelente vetor para a biotecnologia (EVIDENTE et al., 2005).

O gênero é cosmopolita, isolado do solo e das plantas. Algumas espécies de *Drechslera* podem ser consideradas patógenos de vegetais, no entanto, não demonstraram causar infecção no homem ou em animais. A aparência na superfície da colônia é branca tornando-se marrom a cinza, sua textura é aveludada e apresenta crescimento rápido. Possui hifas septadas, conidióforos que podem ser simples, geniculados ou ramificados. Apresenta conídios fusóides, distoseptados, sem um hilum protuberante, possui tubo germinativo desenvolvendo perpendicularmente ao eixo longo do conídio (GERMAIN & SUMMERBELL, 2003), pode-se observar tais características citadas na Figura 21.

FIGURA 21 - MORFOLOGIA DO GÊNERO *Drechslera*, ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Tetragonisca angustula* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



FONTE: Os autores (2022).

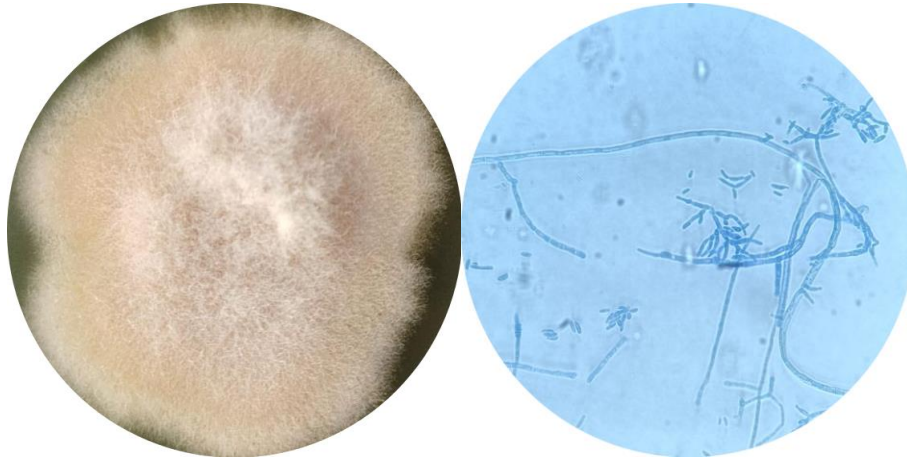
Fusarium spp.

Diversas espécies estão associadas a este gênero, com diversas características morfológicas, fisiológicas e ecológicas, portanto, a taxonomia do gênero *Fusarium* ainda é complexa. Os membros do gênero *Fusarium* são fitopatógenos muito importantes e mais destrutivos comumente encontrados associados à fruticultura. Isso se deve à sua capacidade de produzir diferentes tipos de micotoxinas, responsáveis por causar murcha, ferrugem, podridão radicular e cancras, podendo afetar a saúde humana e animal (EDELHERMANN et al., 2015).

Além das micotoxinas, *Fusarium spp.* produz outros metabólitos que podem ser aplicados como pigmentos ou ter atividades biológicas com importância na área médica (NIRMALADEVI et al., 2014). Além disso, o uso de células inteiras de cepas de *Fusarium* como biocatalisadores pode ser realizado na biotransformação e síntese de compostos aromáticos (BICAS et al., 2010; MOLINA et al., 2015).

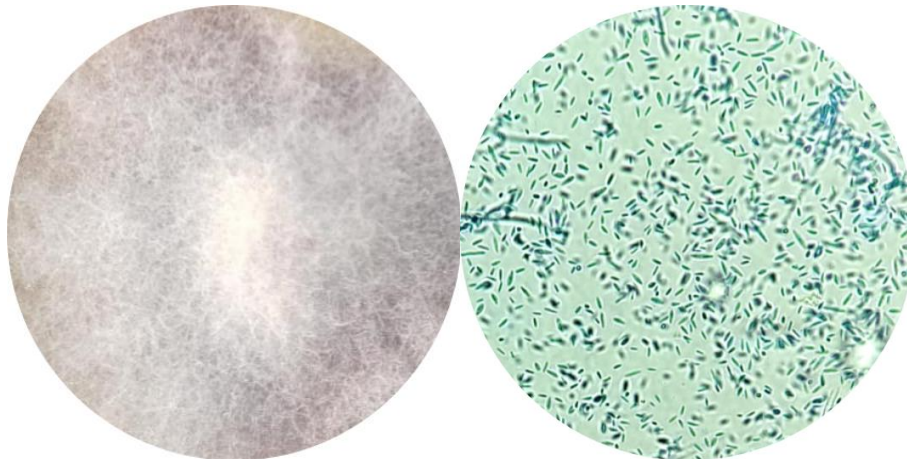
As diferentes espécies de *Fusarium* são caracterizadas por colônias de crescimento rápido com um micélio aéreo feltro ou flocoso. A pigmentação da colônia varia de pálido, rosa, bordô a violeta azulado, dependendo da espécie. Conídios são frequentemente produzidos em esporodóquios que aparecem como pontos viscosos na cultura. Apresentam hifas bem desenvolvidas, septadas e não pigmentadas com bifurcações de ângulo agudo formando macroconídios típicos, os chamados conídios esporodóquiais, variando em forma, tamanho e número de uma espécie para outra, como pode ser observado na Figura 22, 23 e 24.

FIGURA 22 - MORFOLOGIA DO GÊNERO *Fusarium*, ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



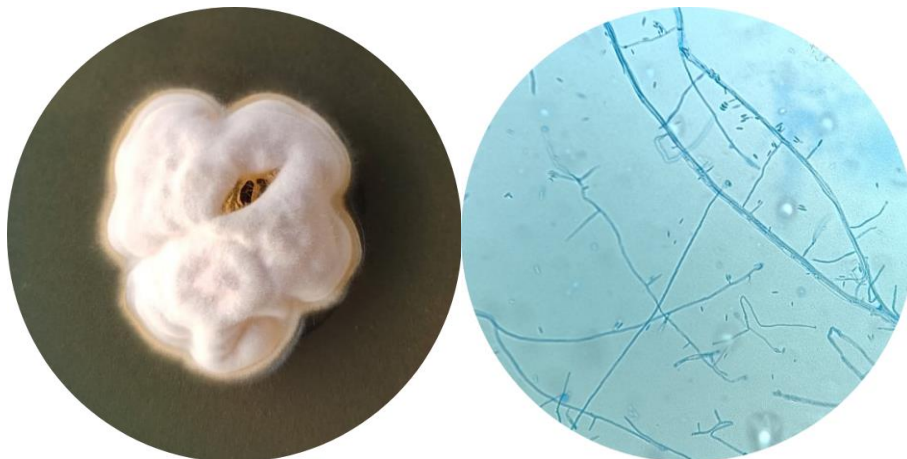
FONTE: Os autores (2022)

FIGURA 23 - MORFOLOGIA DO GÊNERO *Fusarium*, ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



FONTE: Os autores (2022).

FIGURA 24 - MORFOLOGIA DO GÊNERO *Fusarium*, ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



FONTE: Os autores (2022).

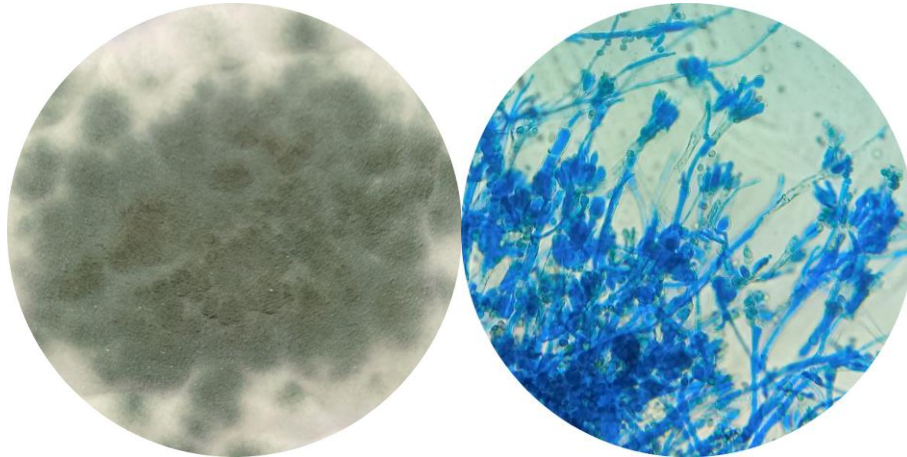
Penicillium spp.

Talvez o gênero *Penicillium* seja o mais famoso dentro da biotecnologia, devido à história da produção da penicilina em 1928 por Alexander Fleming. O trabalho de Barreiro e Estrada (2019) discute em detalhes as vias bioquímicas de produção da penicilina através de análises proteômicas e de espectrometria de massas, para o entendimento da fisiologia dos isolados fúngicos de alta produção de penicilina. Além disso, das cerca de 350 espécies conhecidas no gênero *Penicillium*, muitas são causadoras de deterioração em alimentos pela produção de uma grande variedade de micotoxinas, enquanto outras são consideradas biofábricas de enzimas diversas. O grande número de esporos produzido rapidamente pode afetar significativamente a qualidade do ar, sendo considerados irritantes comuns do ar interno. Poucas vezes são relacionados com a saúde humana, normalmente em pacientes imunocomprometidos, porque dificilmente crescem a 37°C, estando mais associados ao risco de ingestão de alimentos contaminados pelas micotoxinas produzidas por várias espécies deste gênero (PERRONE & SUSCA, 2016). Segundo Terrasan (2007), o gênero *Penicillium* desempenha grande função ecológica, pois decompõe e recicla a matéria orgânica. Atualmente, diversos estudos têm demonstrado seu elevado potencial biotecnológico, já que pode ser fonte de novos fármacos, como a penicilina que implicou um avanço decisivo na medicina, enzimas de interesse industrial, produção e regulação de metabólitos secundários, entre outros.

Na microscopia este fungo possui uma fase assexuada devido à formação de frutificações telemórficas. São caracterizados pela formação de estruturas ramificadas de conídios que terminam nas células conidióginas nomeadas fiálides, com ramificações monoverticilado, biverticilado e triverticilado. As ramificações se dividem em várias microestruturas (ramos, râmulas, métulas, fiálides) e formam conídios esféricos ou elipsoidais (PALLU, 2010).

A característica macroscópica da colônia é circular, no presente trabalho obteve-se colônias verdes, mas em algumas espécies pode ser amarela, laranja, roxo ou marrom, e a superfície da colônia possui textura aveludada, mas também pode ser arenosa ou mucilaginosa (PITT, 1985). Estas estruturas são evidenciadas na Figura 23, a seguir:

FIGURA 25 - MORFOLOGIA DO GÊNERO *Penicillium*, ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



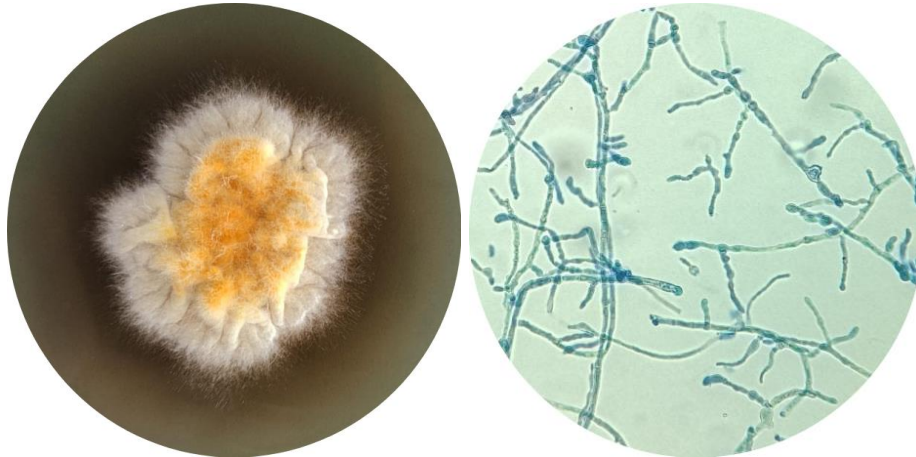
FONTE: Os autores (2022).

Epicoccum nigrum

Recentemente dez novas moléculas denominadas epipolítiodioxopiperazinas (ETPs), a saber, anfiepicocinas A-J (1-10), foram isoladas do fungo *Epicoccum nigrum* derivado de brânquias de peixes (WANG et al., 2022).

A espécie *Epicoccum nigrum*, usualmente caracterizada morfológicamente por coloração próxima do laranja (frente da colônia) e variando o reverso de laranja a vermelho escuro, além da frente de crescimento irregular e da presença de pigmento difundível no meio de cultura (FÁVARO et al., 2011). Na micromorfologia as hifas dão origem aos conidióforos curtos, principalmente em cachos, repetidamente ramificados e terminando em células conidiogênicas mais ou menos isodiamétricas. Cada conidióforo produz um conídio multicelular, globoso a piriforme. Os conídios geralmente estão presentes em massas densas dos aglomerados de conidióforos.

FIGURA 26 - MORFOLOGIA DA ESPÉCIE *Epicoccum nigrum*, ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Scaptotrigona bipunctata* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



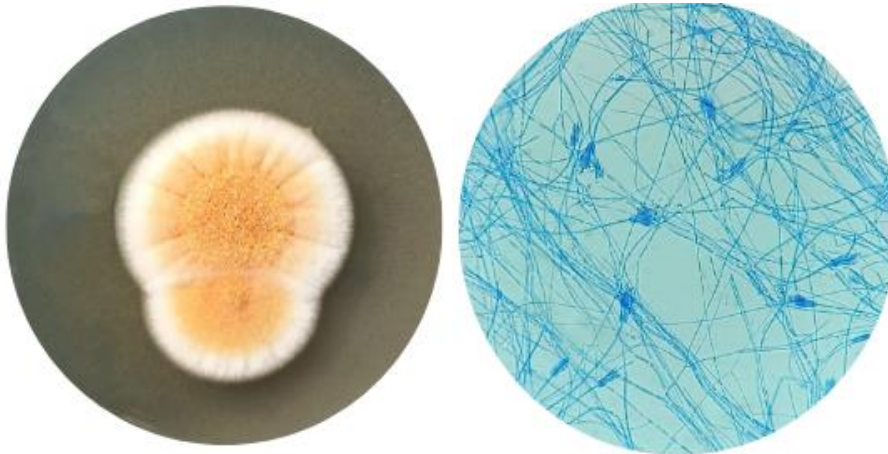
FONTE: Os autores (2022).

Talaromyces purpurogenum

Segundo Yilmaz et al. (2012), *Talaromyces* é um gênero indispensável para a biotecnologia, por ser comum em têxteis, papel, solo, esterco, restos de plantas, milho e etc., tem sido aplicado em biodeterioração de materiais de celulose como têxteis, papel e adesivos. Devido a capacidade de crescer em material vegetal, onde pode produzir micotoxinas como rubratoxina A e B, demonstram atuar como supressores de metástases de câncer. Este gênero produz ácido espiculispórico, o qual pode ser usado como detergente.

A morfologia macroscópica da colônia apresenta micélio predominantemente laranja e branco, com algumas áreas aveludadas, esporulação moderadamente densa, margens largas e inteiras de micélio branco e também com textura aveludada e flocosa. Na micromorfologia, este fungo possui conidióforos estritamente verticilados, ramos subterminais ausentes; estipes de paredes lisas, métulas em verticilos através do ápice, conídios lisos e elipsoidais.

FIGURA 27 - MORFOLOGIA DO GÊNERO *Talaromyces purpurogenum*, ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Tetragonisca angustula* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



FONTE: Os autores (2022).

Trichoderma spp.

Este gênero é encontrado principalmente em solos e raízes, apresentando a capacidade de produzir várias substâncias antibióticas e enzimas. Induz a resistência localizada e sistêmica em uma variedade de plantas e patógenos de plantas, também aumentam a absorção de nutrientes e a eficiência do uso de nitrogênio. Essas associações (raiz-microrganismo) causam mudanças substanciais no proteoma e no metabolismo da planta. *Trichoderma spp.* também frequentemente aumenta o crescimento e desenvolvimento das raízes, a produtividade das culturas, a resistência a estresses abióticos e a absorção. Devido a este conhecimento, o trichoderma é considerado um aliado no controle biológico de pragas, com aplicabilidade biotecnológica.

As colônias do gênero *Trichoderma* possuem um rápido crescimento micelial esbranquiçado, dando origem rapidamente a conidióforos frequentemente agregados, repetidamente ramificados, irregularmente verticilados, muitas vezes irregularmente dobrados, com alongamentos de hifas estéreis, fiálides em forma de balão, obovóide, em cachos terminais pequenos, geralmente facilmente reorganizada pelo seu rápido crescimento, colônias brancas ou branco-verde (HARMAN et al., 2004).

FIGURA 28 - MORFOLOGIA DO GÊNERO *Trichoderma*, ISOLADO DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Tetragonisca angustula* DO MUNICÍPIO DE PALOTINA - PR.



FONTE: Os autores (2022).

O conhecimento das diversas espécies de fungos apresentados acima, isolados a partir de operárias de abelhas sem ferrão de duas espécies (Tubuna e Jataí) fornece rico material para estudos subsequentes envolvendo diversas áreas da biotecnologia. Todas as espécies isoladas associadas com as colmeias apresentam importância em diversos campos, como no contexto agrícola - como nos caso de isolados de *Trichoderma spp.* que se associam simbioticamente com muitas plantas cultivadas, aliados no controle biológico de pragas e coadjuvantes nos processos nutricionais dos vegetais.

Os resultados mostraram uma diferença em alguns gêneros de fungos associados com as duas espécies de abelhas, Tubuna e Jataí. Esta diferença pode estar relacionada com os hábitos alimentares de cada espécie, que naturalmente orienta a visitação de cada espécie a um conjunto de flores distintas. Esta possibilidade baseia-se na hipótese de que parte dos fungos isolados associados a cada espécie de abelha seja oriundo das plantas e estruturas florais visitadas por cada espécie de abelha, em busca de alimento.

As diferenças observadas nos fungos isolados de colmeias da mesma espécie mantidas em locais diferentes (local 01 - próximo à porta de entrada da residência ou local 02 - fundos do imóvel) pode estar relacionada com a variedade de microrganismos em cada local e influência da circulação de animais e humanos, que difere em cada um deles. No local 01 observa-se uma intensa circulação de pessoas, cães e gatos, diferentemente do local 02. A presença mais ou menos intensa de pessoas e animais pode influenciar no carreamento de esporos e estruturas de reprodução dos fungos próximo das colmeias.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os fungos isolados neste trabalho preliminar envolvendo apenas duas espécies de abelhas sem ferrão pertencem a diferentes gêneros, com potencial diversificado para aplicações biotecnológicas. Deste modo, podemos inferir que as abelhas sem ferrão representam uma fonte extremamente importante pouco onerosa para a prospecção de fungos filamentosos diversos com potencial biotecnológico. Uma vantagem do isolamento a partir de colmeias de meliponíneos está relacionada com a adaptação dos isolados fúngicos ao microclima local, o que pode significar em bons desempenhos biotecnológicos. Também possibilita a compreensão de possíveis fitopatógenos, patógenos, ou aqueles que podem influenciar na defesa imunológica das abelhas e na qualidade do mel.

Um trabalho que pretendemos desenvolver futuramente está relacionado com a prospecção do conjunto de fungos miceliais nas colmeias em diferentes épocas do ano. Possivelmente as espécies fúngicas associadas às abelhas irão variar de acordo com a estação do ano, e com o conjunto de espécies vegetais em floração em cada mês do ano. Também iniciaremos um estudo comparativo dos fungos isolados de diferentes partes do interior das colmeias, visto que a compartimentalização de cada ninho destes insetos eussociais é bastante complexa. Possivelmente diferentes locais do interior do ninho abriguem espécies diferentes de fungos (discos de cria, lixeira, melgueiras, entrada, estoques de própolis, ceras e batumes).

7 REFERÊNCIAS

- ABDEL-BAKY, N.; ABDEL-SALAM, A. Natural incidence of *Cladosporium spp.* as a bio-control agent against whiteflies and aphids in Egypt. **Journal of Applied Entomology** p. 228–235, 2003.
- ALVES, R. M. O.; SOUZA B. A.; SODRÉ, G. S.; FONSECA, A. A. O. Desumidificação: uma alternativa para a conservação do mel de abelhas sem ferrão. **Revista Mensagem Doce**, p. 2-8, 2007.
- ARAÚJO, F. D. S. **Aspectos da ecologia química de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*), *Epicoccum nigrum* e *Tetragonisca angustula***. Tese doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP, p. 255, 2012.
- BARREIRO, C.; ESTRADA, C. G. Proteomics and *Penicillium chrysogenum*: Unveiling the secrets behind penicillin production. **Journal of Proteomics**, v. 198, 2019.
- BARTH, O. M.; DUTRA, V. M. L.; JUSTO, R. L. Pollen analysis of some samples of propolis from southern Brazil. **Revista Ciência Rural**, v. 29, n. 4, p. 663-667, 1999.
- BICAS, J. L.; SILVA, C.; DIONÍSIO, A. P.; PASTORE, M. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Revista Ciência e Tecnologia de alimentos**, p. 7–18, 2010.
- BLOCHTEIN, B. et al. **Manual de boas práticas para a criação e manejo racional de abelhas sem ferrão no RS: Guaraipo - *Melipona bicolor schenki*, Manduri - *Melipona marginata obscurior*, Tubuna - *Scaptotrigona bipunctata***. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2008.
- CAMPOS, L. A. O.; PERUQUETTI, R. C. **Biologia e criação de abelhas sem ferrão**. Viçosa: Conselho de Extensão, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- CASTAGNINO, G. L. B. et al. Doença Cria Giz *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive & Spiltoir em abelhas *Apis mellifera* L. na Depressão Central do Rio Grande do Sul. **Revista Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1909–1911, 2006.
- CHA, C. J.; DOERGE, D. R.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of Malachite Green by the Fungus *Cunninghamella elegans*. **Applied and environmental microbiology**, p. 4358-4360, 2001.
- COUTO, R. H. N. e COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, p. 191, 2002.
- CRUZ, L. C. Bacteria Present in the Intestinal Tract of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepageletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Journal of Hymenoptera Research**. v. 5, p. 264-272. 1996.
- CRUZ, L. C. H. **Micologia veterinária**. Itaguaí, Imprensa Universitária UFRRJ, p. 201, 1985.

DEL-CLARO, K.; TOREZAN-SILINGARDI, H. M. **Ecologia das Interações Plantas-Animais: uma abordagem ecológico - evolutiva**. Rio de Janeiro, Technical Books, 2012.

DEMERS, M. *Alternaria alternata* as endophyte and pathogen. **Journal Society Microbiology**, v. 168, n. 3, 2022.

EDEL-HERMANN, V.; GAUTHERON, N.; MOUNIER, A.; STEINBERG, C. *Fusarium* diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach. **Journal Microbiological Methods**, p. 64–71, 2015.

ELTZ, T.; BRUHL, C. A.; GORKE, C. Collection of mold (*Rhizopus sp.*) spores in lieu of pollen by the stingless bee *Trigona collina*. **Journal Insects Sociaux**. v. 49, n. 1, p. 28-30, 2002.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; CIMMINO, A.; VURRO, M.; FRACCHIOLLA, M.; CHARUDATTAN, R.; MOT, A. Drazepinone, a trisubstituted tetrahydronaphthofuroazepinone with herbicidal activity produced by *Drechslera siccans*. **Journal Phytochemistry**, v. 66, n. 6, p. 715-721, 2005.

FÁVARO, L. C. L.; MELO, F. L.; VILDOSO, A. C. I.; ARAÚJO, W. L. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. **Journal ONE**, vol. 6, 2011.

FERRAZ, R. E. et al. Microbiota Fúngica de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera : Apidae). **Journal Neotropical Entomology**, p. 345–346, 2008.

FIEMA, M.; WLODARCZYK, A.; WOJKOWSKA, M. J.; GARLICKI, J.; MAGA, I. G. Atypical Presentation of *Aspergillus niger* Infection in the Oral Cavity as a Prediction of Invasive Pulmonary Aspergillosis in a Patient with COVID-19: Case Report and Literature Review. **Journal Microorganisms**, v. 10, n. 8, 2022.

FONSECA, M. D. P. **Estudo da diversidade e atividade larvicida de Agaricomycetes lignolíticos (Basidiomycota) no Estado do Amazonas**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

FREE, J. B. **A organização social das abelhas (Apis)**. São Paulo, EDUSP-SP, 1980.

GALLO, M. L.; SELDES, A. M.; CABRERA, G. M.; Antibiotic long-chain and a, b-unsaturated aldehydes from the culture of the marine fungus *Cladosporium sp.* **Biochemical Systematics and Ecology**, p. 545–551, 2004.

GERMAIN, G. S.; SUMMERBELL, R. **Identifying filamentous fungi: a clinical laboratory handbook**. 2ª ed., 2003.

GIANNINI, T. C.; JAFFÉ, R. **O papel das abelhas irapuás como polinizadores na agricultura e em habitats degradados**. A.B.E.L.H.A, <http://abelha.org.br/opapeldasabelhasirapuascomopolinizadoresnaagriculturaeemhabitatsdegradados/print>. Data de acesso: 23 de jun. de 2022.

GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. **Journal of the Federation of European Microbiological Societies**. v. 155, n. 1, p. 1-10, 1997.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of the insects**. Cambridge University Press, 2005, p. 454.

GRUTER, C.; KÄRCHER, M. H.; RATNIEKS, F. L. W. The natural history of nest defence in a stingless bee, *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae), with two distinct types of entrance guards. **Neotropical Entomology**, p. 40-61, 2011.
HAMID, K.; STRANGE, R. N. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. p. 235-244, 2000.

HARMAN, G. et al. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, p. 43–56, 2004.
HEDAYATI, M.T. et al. ***Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer**. Microbiology, p. 153, 1677–1692, 2007.

HRNCIR, M. et al. A Jandaíra - Abelha símbolo do sertão In: IMPERATRIZ FONSECA, V. L.; KOEDAM, D.; HRNCIR, M. **A abelha jandaíra: no passado, presente e no futuro**. Mossoró: EdUFERSA, 2017.

JOHNSON, L. K.; HUBBELL, S. P. Aggression and competition among stingless bees: Field studies. **Journal Ecology**, 1974.

KERR, W. E.; CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V.A. **Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação**. Acangaú, Belo Horizonte, 1996.

KERR, W. E. A importância da meliponicultura para o país. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. p. 42-44, 1997. KERR, W. E.; FILHO, A. B. Meliponíneos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 22-23, 1999.

KERR, W.E. et al. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Revista Parcerias Estratégicas**, n. 12, 2001

KHATTAK, S. U. et al. *Aspergillus flavus* originated pure compound as a potential antibacterial. **Journal BMC Microbiology**, 2021.

LACAZ, C. D. S.; PORT, E.; MARTINS, J. E. C. **Tratado de Micologia Médica**. 9ª ed., Savier, São Paulo, 2002.

LIMA, F. V. O.; SILVESTRE, R.; BALERTIERI, J. B. P. Nest entrance types of stingless bees (Hymenoptera: Apidae) in a tropical dry forest of mid-western Brazil. **Journal Sociobiology**, p. 421-428, 2013.

LIU, Y. Q.; FENG, M. G.; LIU, S. S.; ZHANG, B. X. Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* against *Myzus persicae*. **Journal of Biological Control**. v. 16, p. 56-60, 2000.

LOPES, M.; FERREIRA, J. B.; SANTOS, G. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Revista Agriculturas**, p. 7-9, 2005.

MACARTHUR, R. H.; PIANKA, E. R. On optimal use of a patchy environment. **Journal American Naturalist**, p. 603-609, 1966.

- MACHIDA, M.; ASAI, K., SANO, M.; TANAKA, T.; KUMAGAI, T.; TERAJ, G. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Journal Nature**, v. 438, p. 1157- 1161, 2005.
- MACHIDA, M.; YAMADA, O.; GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. **Journal DNA Research**, v.15, p.173-183, 2008.
- MANAMGODA, D. S.; ROSSMAN, A. Y.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; MADRID, H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. The genus *Bipolaris*. **Journal Studies in Mycology**, p. 79, 221–288, 2014.
- MATTAR, E. H.; HAMMAD, L. F.; ZAIN, M. E. Effect of cadmium, cobalt, and chromium on growth of three *Cunninghamella* species. **Journal of Saudi Chemical Society**, p. 357-359, 2011.
- MATTILA, H. R.; RIOS, D.; WALKER-SPERLING, V. E.; ROESELERS, G.; NEWTON, I. L. G. Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. **Journal PLOS ONE**, v. 7, 2012.
- MICHENER, C. D. Biogeography of the bees. **Journal Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 277-347, 1979.
- MICHENER, C. D. **The bees of the world**. John Hopkins University Press, Baltimore, p. 913, 2000.
- MICHENER, C. D. **The bees of the world**. John Hopkins University Press, Baltimore, 2007.
- MICHENER, C. D. **The Meliponini**. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. H. Pot-Honey: um legacy of stingless bees. New York: Springer, p. 3-17, 2013.
- MIRHENDI, Hossein; MAKIMURA, Koichi; KHORAMIZADEH, Mohamadreza; YAMAGUCHI, Hideyo. **A One-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of Six Medically Important *Candida* Species**. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi, [S.L.], v. 47, n. 3, p. 225-229, 2006.
- MOLINA, G.; BUTION, M. L.; BICAS, J. L.; DOLDER, M. A. H.; PASTORE, G. M. Comparative study of the bioconversion process using R-(+)- and S-(-) limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B. **Journal Food Chemistry**, p. 606–613, 2015.
- MOORE, D. Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythm. **Journal of Insects Physiology**, 2001.
- MUNUSAMY, S.; BHAKYARAJ, K.; VIJAYALAKSHMI, L.; STEPHEN, A.; NARAYANAN, V. Synthesis and characterization of cerium oxide nanoparticles using *Curvularia lunata* and their antibacterial properties. **International Journal Innovative Research in Science & Engineering**, p. 318–323, 2014.
- NIRMALADEVI, D.; VENKATARAMANA, M.; CHANDRANAYAKA, S.; RAMESHA, A.; JAMEEL, N. M.; SRINIVAS, C. Neuroprotective effects of bikaverin on H₂O₂-induced oxidative stress mediated neuronal damage in SH-SY5Y cell line. **Journal Cellular and Molecular Neurobiology**, p. 973–985, 2014.

NOGUEIRA-COUTO, R. H. **As abelhas na manutenção da biodiversidade e geração de rendas**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, Salvador-BA, p. 101, 1998.

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

OBUEKWE, C. O.; BADRUDEEN, A.M.; AL-SALEH, E.; MULDER, J. L. Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 56, n. 4, p. 197-205, 2005.

O'CONNOR, D. J. et al. Atmospheric concentrations of *Alternaria*, *Cladosporium*, *Ganoderma* and *Didymella* spores monitored in Cork (Ireland) and Worcester (England) during the summer of 2010. **Journal Aerobiology**, p. 397–411, 2014.

ODA, K.; KAKIZONO, D.; YAMADA, O.; IEFUJI, H.; AKITA, O.; IWASHITA, K. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. **Journal Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3448-3457, 2006.

OLLERTON, J. et al. How many flowering plants are pollinated by animals? **Journal Oikos**, p. 321-326, 2011.

OLIVEIRA, R. C.; NUNES, F. M. F.; CAMPOS, A. P. S.; VASCONCELOS, S. M.; ROUBIK, D.; GOULART, L. R.; KERR, W. E. Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on rapd markers. **Journal Genetics and Molecular Biology**, p. 181-186, 2004.

OLIVEIRA, F.F., RICHERS, B.T.T., SILVA, J.R., FARIAS, R.C., MATOS, T.A.L. **Guia ilustrado das abelhas “Sem-Ferrão” das reservas Amanã e Mamirauá, Brasil (Hymenoptera: Apidae, Meliponini)**. p. 267, 2013.

PALAZUELOS, B. J. M. P. Abelhas nativas sem ferrão - Myg. São Leopoldo, **Journal Oikos**, 2008.

PALLU, A. P. S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana de açúcar**. Tese, Doutorado em Genética e melhoramento de plantas, Piracicaba, p. 130, 2010.

PANTOJA, M. C. **Diversidade de fungos na superfície do corpo de abelhas sem ferrão em meliponicultor de Manaus e Iranduba/AM**. FAPEAN, Universidade Federal do Amazonas, 2014.

PARASZKIEWICS, K.; , DLUGONSKI, D.; Cortisolone 11-hydroxylation in protoplasts of *Curvularia lunata*. **Journal of Biotechnology**, p. 217–224, 1998.

PAULA, G. T. et al. Stingless bees and microbial interactions. **Journal Current Opinion in Insect Science**, v. 44, p. 41-46, 2021.
PEDRO, S.R.M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Journal Sociobiology**, v. 61, p. 348-354, 2014.

PERRONE, G.; SUSCA, A. ***Penicillium* Species and Their Associated Mycotoxins**. Methods in Molecular Biology, 2016.

- PITT, J. I. **A laboratory guide to common Penicillium species**. Commonwealth scientific and industrial research organization division of food research. Australia, p. 6, 1985.
- PORTER, T. M.; GOLDING, G. B. Factors that affect large subunit ribosomal DNA amplicon sequencing studies of fungal communities: Classification method, primer choice, and error. **Journal PLOS ONE**, p. 1–12, 2012.
- PRENAFETA-BOLDÚ, F. X. et al. Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. **Journal Mycological Research**, p. 477–484, 2001.
- RAMALHO, M.; SILVA, M.D.; CARVALHO, C.A.L. Dinâmica de uso de fontes de pólen por *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera, Apidae): uma análise comparativa com *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae), no domínio Tropical Atlântico. **Journal Neotropical Entomology**, p. 38-45, 2007.
- RAMOS, J. S.; CARVALHO, N. C. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, n. 10, p. 1-21, 2007.
- RAZAFINARIVO, J. et al. *Cladosporium lebrasiae*, a new fungal species isolated from milk bread rolls in France. **Journal Fungal Biology**, v. 120, n. 8, 2016.
- RIBEIRO, M. M. R. et al. Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): the activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. **Journal Psyche**, p. 6, 2012.
- ROUBIK D. W. **Ecology and natural history of tropical bees**. New York, Cambridge University Press, 1989.
- ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. **Journal Apidologie**, p. 124-143, 2006.
- SANDERS, I. R. et al. Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Journal New Phytologist**, p. 419–427, 1995.
- SANTOS, S.F.M. **Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de Caju como Substrato**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2007.
- SAUNDERS, D. S. **Insect Clocks**. Oxford, Pergamon Press, 1982.
- SILVA, E. A. R. et al. **Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Leptopharsa hevea* (Hemiptera: Heteroptera, Tingidae)**. Arquivos do Instituto Biológico, p. 549–556, 2012.
- SILVA, M. S., et al. Microorganisms in Honey. In: TOLEDO, V. A. A. Honey Analysis. **Journal IntechOpen**, 2017.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte, Ministério do Meio Ambiente, 2002.
- SOUZA, D. L. **As abelhas como agentes polinizadores**. REDVET, Málaga, España, 2007.

- SOUZA, J. R. S. **Diversidade fúngica associada a abelhas sem ferrão (*Melipona spp.*) em Meliponário na cidade de Manaus e Iranduba, Amazonas, Brasil.** Dissertação, UFAM, p. 65, 2014.
- STUART, R. M.; LAMAS, C.; PIMENTEL, I. C. ***Trigona sp.* como visitante floral e vetor de esporos fúngicos para goiabeira (*Psidium guajava L. - Myrtaceae*).** Estudos Biológicos, v. 26, p. 19-23, 959-970, 2004.
- TERRASAN, C. R. F. **Produção e caracterização do complexo Xilanolítico de *Penicillium janczewskii*.** Dissertação, Mestrado em Microbiologia Aplicada, UNESP, Rio Claro, p. 83, 2007.
- TILLEY, A. M.; WALKER, H. L. Evaluation of *Curvularia intermedia* (*Cochliobolus intermedius*) as a potential microbial herbicide for large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). **Journal of Biological Control**, p.12–21, 2002.
- VENTURIERI, G. C. et al. **Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola.** In: IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. et al. (orgs). **Polinizadores no Brasil: Contribuições e Perspectivas para a Biodiversidade, Uso Sustentável, Conservação e Serviços Ambientais.** São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, p. 213-236, 2012.
- VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico Mel de Abelhas sem Ferrão.** 1ª ed. Brasília: ISPN, p. 100, 2012.
- WANG, C. et al. **First record of *Aspergillus oryzae* as an entomopathogenic fungus against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*.** College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing, 2019.
- WANG, Q. et al. Amphiepilococcins A-J: Epipolythiodioxopiperazines from the Fish-Gill-Derived Fungus *Epicoccum nigrum* HDN17-88. **Journal of Natural Products**, 2022.
- WIELEWSKI, P. **Identidade Taxonômica, notas Bionômicas e sobre o Comportamento Higiênico de *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier, 1836), (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).** Tese (Doutorado) - Curso de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.
- YILMAZ, N.; HOUBRAKEN, J.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; VISAGIE, C.M.; SAMSON, R. A. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. **Journal Persoonia**, v. 29, p. 39-54, 2012.
- ZMITROWICZ, W. **As estruturas territoriais dos insetos.** Estudos Avançados, v. 15, n. 41, p. 193-212, 2001.