



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE FUNGOS E ABELHAS SEM FERRÃO DO  
SEMIÁRIDO DE PERNAMBUCO**

**APARECIDA CLÉBIA DA SILVA**

**Serra Talhada - PE**

**2021**

**APARECIDA CLÉBIA DA SILVA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE FUNGOS E ABELHAS-SEM-FERRÃO DO  
SEMIÁRIDO DE PERNAMBUCO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Prof. Dr. Airton Torres Carvalho**

Orientador

**Serra Talhada - PE**

**2021**

## Ficha catalográfica - Biblioteca

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S586a SILVA, APARECIDA CLÉBIA DA  
ASSOCIAÇÃO ENTRE FUNGOS E ABELHAS SEM FERRÃO DO SEMIÁRIDO DE PERNAMBUCO /  
APARECIDA CLÉBIA DA SILVA. - 2021.  
44 f. : il.

Orientador: AIRTON TORRES CARVALHO.  
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Serra Talhada, 2021.

1. ALIMENTO LARVAL. 2. FUNGOS FILAMENTOSOS. 3. CÉLULA DE CRIA. I. CARVALHO, AIRTON TORRES, orient. II. Título

CDD 574

---

## **Associação entre fungos e abelhas-sem-ferrão do Semiárido de Pernambuco**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Airton Torres Carvalho (Presidente/Orientador)

Universidade Federal Rural do Semi-Árido - URFESA

---

Dr. Renan do Nascimento Barbosa

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Profª Drª Viviane Martha Santos de Moraes

Faculdade de Ciências Médicas Aggeu Magalhães - FAMA

---

SERRA TALHADA - PE

2021

*Dedico este trabalho a todos os jovens que buscam a partir da ciência, transmitir conhecimento com intenção de progresso em meio a todas as adversidades.*

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus e a Nossa Senhora de Aparecida, pois são eles que me entregam forças para que eu siga resiliente diante de qualquer desafio.

A minha Mãe Cecília Silva de Carvalho, por sempre acreditar em mim, em minhas decisões e em meus sonhos. A senhora é o maior exemplo de mulher que venho tentando me tornar.

A meu Pai Joaquim José da Silva, que mesmo frente a todas as dificuldades de nossa família, nunca deixou de mostrar seu amor incondicional por suas duas netas e seus seis filhos.

Aos meus cinco irmãos por todo incentivo e amor que me transpassam, desejo um lindo futuro, cheio de sonhos e conquistas. Que eu possa ser um bom exemplo para vocês em nossa “grande família”.

A minha família argentina, a que desde sempre contribuiu de forma significativa em meu aprendizado, ajudando tornar meus sonhos realidade. Obrigada a minha irmã Camila Sasia e aos meus pais Andrea Fessia e Gabriel Sasia, vocês são minha família do coração.

Aos meus avós e bisavós que sempre estiveram presentes em corpo ou alma comigo, espero que estejam orgulhosos dessa neta que sempre os amará.

Agradeço a minha tia Nalva e a meu primo Felipe por todo apoio, conselhos e motivação durante todo este período, vocês são meu melhor abrigo.

Ao meu orientador Airton Carvalho, que aceitou traçar comigo esse projeto, pois sem o senhor, com certeza nada seria possível. Tem toda minha admiração e carinho.

A professora Virginia Medeiros que esteve comigo desde o início, me apoiando e dando subsídio para minhas pesquisas. Um espelho de pesquisadora para mim.

Agradeço aos meus amigos de curso: Maria Luíza, Maria da Saúde, José Augusto, Alanna Karyne, Marcos Vinícius, Maria Amanda, Amanda Letícia, Fernanda e Rubém Simões por todo apoio e companheirismo durante esses anos na graduação.

Agradeço a meus amigos: Higor Simões, Millena Souza, Kamila Nascimento, Francileide Melo, Brígida Leal, Breno Pereira, Luanna Cavalcanti e Lara Cavalcanti por todo incentivo e cuidado durante cada nova etapa que venho objetivando.

A todos os integrantes do grupo PET Biologia/UAST, em especial ao tutor André Lima, que sempre me aconselhou da melhor forma, me mostrando o quanto sou capaz de conseguir aquilo que pretendo. Um símbolo de profissionalismo e humanidade.

A todos os que participaram e participam dos grupos de pesquisa LAPEMI (Laboratório de Pesquisa e Extensão em Microbiologia) e GEEP (Grupo de Estudos em Ecologia e Polinização), obrigada por todas as contribuições e aprendizado.

Por fim, agradeço a universidade pública de qualidade, a qual faço parte e me dedico. Obrigada a todos aqueles que como eu, dedicam suas pesquisas em prol da ciência e educação no país.

Grata.

## RESUMO

Ao longo da evolução das espécies, insetos e fungos desenvolveram importantes interações mutualísticas, nas quais ambos se beneficiam. Um interessante exemplo são as abelhas do gênero *Scaptotrigona* spp. (Hymenoptera: Apidae, Meliponini), nas quais espécie de fungo, como *Zygosaccharomyces* sp. se desenvolvem e produzem metabólitos importantes para o crescimento dos imaturos, sendo imprescindíveis para que o inseto complete seu ciclo de vida. Neste contexto, objetivou-se investigar a presença fungos filamentosos, associados ao alimento larval, em células de cria com larvas em estágios distintos de desenvolvimento em colônias de *Scaptotrigona* sp. grupo *tubiba*, em áreas de Caatinga do estado de Pernambuco. As coletas foram realizadas em cinco colônias em 10 células de cria, sendo enumeradas de 1 a 10, nas quais de 1 a 5 foram coletadas nas células com larvas em desenvolvimento, de 6 a 7 apenas com o alimento larval e ovo e de 8 a 10 larvas desenvolvidas. As amostras foram solubilizadas em água esterilizada e semeadas sobre três meios de cultura para isolamento Agar Sabouraud (SAB), Agar Batata Dextrose (BDA) e Agar Batata Dextrose acrescido com 15% de glicose (BDA 15%). Após cinco dias de incubação a 28 °C, foram selecionados 19 isolados com base em morfotipos. Destes, foram identificados 3 em nível de gênero, sendo um *Fusarium*, um *Cladosporium* e um *Arcopilus*, que foi submetido à caracterização macro e micromorfológica por apresentar características semelhantes a uma espécie descrita na literatura. Posteriormente foi testada a capacidade de crescimento de *Arcopilus* sp. em quatro diferentes condições: alimento larval puro, alimento larval mais água destilada (1:1; v/v), caldo Sabouraud e água destilada acrescida com 1% de glicose em poços de placas de ELIZA. O maior crescimento foi observado em poços que foram semeados com o alimento larval diluído em água destilada. Não foi observada a presença de *Monascus* sp. nas amostras de alimento larval de *Scaptotrigona* sp. estudada. Os demais isolados foram armazenados para posterior identificação das espécies e espera-se que estes fungos possam ser de fato essenciais nos ninhos de abelha dessa espécie.

**Palavras-chave:** Alimento larval, fungos filamentosos, Células de cria.

## ABSTRACT

Throughout the evolution of species, insects and fungi have developed important mutualistic interactions, in which both benefit. An interesting example is the bee of the genus *Scaptotrigona* spp. (Hymenoptera: Apidae, Meliponini), in which a species of fungus *Zygosaccharomyces* sp. develop and produce important metabolites for the growth of immatures, being essential for the insect to complete its life cycle. In this context, the objective was to investigate the presence of filamentous fungi, associated with larval food, in brood cells with larvae at different stages of development in colonies of *Scaptotrigona* sp. tubiba group, in Caatinga areas of the state of Pernambuco. The collections were carried out in five colonies in 10 brood cells, being numbered from 1 to 10, in which 1 to 5 were collected in cells with developing larvae, from 6 to 7 only with larval food and egg and from 8 to 10 developed larvae. The samples were solubilized in sterile water and seeded on three culture media for isolation Sabouraud Agar (SAB), Potato Dextrose Agar (PDA) and Potato Dextrose Agar with an additional 15% of glucose (15% PDA). After five days of incubation at 28 °C, 19 isolates were selected based on morphotypes. Amongst these, 3 were identified at the genus level, being a *Fusarium*, a *Cladosporium* and an *Arcopilus*, which was submitted to macro and micromorphological characterization for presenting characteristics similar to a species described in the literature. Subsequently, the growth capacity of *Arcopilus* sp. in four different conditions: pure larval feed, larval feed plus distilled water (1:1; v/v), Sabouraud broth and distilled water plus 1% glucose in wells of ELIZA plates. The greatest growth was observed in wells that were seeded with larval feed diluted in distilled water. The presence of *Monascus* sp. in larval food samples of *Scaptotrigona* sp. studied. The other isolates were stored for later identification of the species and it is expected that these fungi may actually be essential in the bee nests of this species.

**Keywords:** Larval food, filamentous fungi, brood cells.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> - (A) Rainha de <i>Scaptotrigona</i> sp. grupo <i>tubiba</i> ; (B) Interior do ninho de <i>Scaptotrigona</i> sp. grupo <i>tubiba</i> ; (C) Ninhos de abelhas sem ferrão.....	19
<b>Figura 02</b> - <i>Fusarium</i> sp. (isolado 1) em meio de cultura BDA (A) Colônia algodonosa (B) Conídios em forma de meia lua.....	28
<b>Figura 03</b> - <i>Fusarium</i> sp. (isolado 1) em meio de cultura CZ. (A) Colônia algodonosa e alaranjada (B) Conídios em forma de meia lua.....	28
<b>Figura 04</b> - <i>Arcopilus</i> sp. (isolado 9) em meio de cultura ME (A) Colônia branca e pigmento extracelular avermelhado, hifas demáceas (B) e setas (C) Presença de ascostroma do tipo cleistotécio (D) Ascos e ascósporos. .....	29
<b>Figura 05</b> - (A) <i>Cladosporium</i> sp. (isolado 16) em meio de cultura CZ (A) Colônia demácia (B) presença de fiálides e conídios pigmentados. .....	29
<b>Figura 06</b> - (A) Verso e (B) reverso da colônia de <i>Arcopilus</i> sp. em meio de cultura BDA.....	30
<b>Figura 07</b> - (A) Verso e (B) reverso de <i>Arcopilus</i> sp. em meio de cultura CZ.....	30
<b>Figura 08</b> - (A) Verso e (B) reverso da colônia de <i>Arcopilus</i> sp. em meio de cultura ME.....	31
<b>Figura 09</b> - (A) Verso e (B) reverso da colônia de <i>Arcopilus</i> sp. em meio de cultura SAB.....	31
<b>Figura 10</b> - (A) e (B) Microscopia em lâmina de <i>Arcopilus</i> sp. em meio de cultura ME.....	31
<b>Figura 11</b> - Segundo dia de monitoramento do crescimento de <i>Arcopilus</i> sp. sob os diferentes tratamentos em (A) alimento larval, (B) alimento larval mais água destilada (1:1; v/v), caldo Sabouraud (C) e água destilada acrescida com 1% de glicose (D).....	32
<b>Figura 12</b> - Terceiro dia de monitoramento do crescimento de <i>Arcopilus</i> sp. sob os diferentes tratamentos em (A) alimento larval, (B) alimento larval mais água destilada (1:1; v/v), caldo Sabouraud (C) e água destilada acrescida com 1% de glicose (D).....	32
<b>Figura 13</b> - Oitavo dia de monitoramento do crescimento de <i>Arcopilus</i> sp. de (A) a (D) nos poços 1A, 7A, 2C e 1E contendo (A) alimento larval, (B) alimento larval mais água destilada (1:1; v/v), caldo Sabouraud (C) e água destilada acrescida com 1% de glicose (D).....	33

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Enumeração das amostras conforme célula de cria dos três ninhos de <i>Scaptotrigona</i> sp. localizados no meliponário da “Trilha dos Polinizadores” da UFRPE/UAST.....	24
<b>Tabela 2</b> Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC) fúngicas isoladas de células de cria de <i>Scaptotrigona</i> sp. nos três meios de cultura utilizados.....	26
<b>Tabela 3</b> Identificações realizadas.....	27

## SIGLAS E ABREVIATURAS

AA – Alimento Larval mais Água Destilada

AG – Água Destilada e Glicose

AL – Alimento Larval

BDA – Agar Batata Dextrose

CS – Caldo Sabouraud

CZ – Agar Czapek

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ITS – Espaços Internos Transcritos

ME – Agar Extrato de Malte

°C – Graus Celsius

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

rDNA – DNA Ribossômico

SAB – Agar Sabouraud

UFC – Unidade Formadora de Colônias

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
SIGLAS E ABREVIATURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. OBJETIVO GERAL .....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. HIPÓTESE .....	18
4. REFERENCIAL TEÓRICO .....	18
4.1. ABELHAS SEM FERRÃO: ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DOS NINHOS .....	18
4.2. MICRORGANISMOS QUE INTERAGEM COM AS ABELHAS SEM FERRÃO.....	19
4.3. FUNGOS EM NINHOS DE SCAPTOTRIGONA.....	22
5. METODOLOGIA.....	23
5.1. COLETA DE MATERIAL.....	23
5.2. ISOLAMENTO DOS FUNGOS.....	24
5.3. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS.....	24
5.4. CARACTERIZAÇÃO MICRO E MACROMORFOLÓGICA DOS ISOLADOS.....	24
5.5. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO EM ALIMENTO LARVAL.....	25
5.6. CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS.....	25
5.7. MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS POR CRIOPRESERVAÇÃO.....	26
6. RESULTADOS .....	26
6.1. ISOLAMENTO, QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS.....	26
6.2. MACROMORFOLOGIA E MICROMORFOLOGIA ( <i>ARCOPILUS</i> SP.) .....	30
.....	

6.3. CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DE <i>ARCOPILUS</i> SP. EM DIFERENTES CONDIÇÕES	31
7. DISCUSSÃO .....	33
8. CONCLUSÃO.....	35
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

## 1. Introdução

As abelhas-sem-ferrão pertencem à ordem Hymenoptera, família Apidae, tribo Meliponini. Possuem aproximadamente 400 espécies, com centro de distribuição na região Neotropical (MICHENER, 2007; ASCHER & PICKERING, 2020). Essas abelhas vivem dentro de ninhos constituídos com diferentes materiais (cera, própolis, potes de pólen e de mel, etc.) e que possuem umidade e temperatura controlados, constituindo microambientes propícios para o desenvolvimento e subsistência de microrganismos e, devido suas especificidades únicas, permitiu o surgimento de interações coevolutivas específicas (ROUBIK, 1992)

Bactérias e fungos são comuns em ambientes com essa natureza, e tem demonstrado muitas interações ecológicas com outros seres vivos (CONTI, GUIMARÃES, PUPO, 2012). Embora ainda seja pouco conhecido o papel desses microrganismos na vida das abelhas, foi descoberto que algumas espécies de fungos são simbioses mutualísticas de abelhas do gênero *Scaptotrigona* Moure, 1942. Nessa interação, os fungos crescem no alimento larval e as larvas somente desenvolvem se alimentando do micélio fúngico. Provavelmente essas interações são semelhantes para outras espécies de Meliponini (MENEZES *et al.*, 2015). Nesse caso as abelhas dependem dos fungos para sobreviver, mesmo que de forma involuntária. Esta circunstância é semelhante ao que acontece com as formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae, Attini) que se alimentam de fungos, mas diferencia-se por que nas formigas o fungo é cultivado intencionalmente (BASS & CHERRETT, 1995), e nas abelhas, aparentemente não.

Em *Scaptotrigona*, o fungo *Monascus* spp. está especialmente ligado à cera dos ninhos, que ao ser reutilizada pelas abelhas na construção das células de cria, infestam o alimento larval, crescem e então servem de alimento para as larvas (MENEZES *et al.*, 2015). Paludo *et al.* (2018) demonstram que as larvas de *Scaptotrigona depillis* (MOURE, 1942) apresentam associação com três diferentes espécies dentro das células de cria, promovendo a produção de percussores de hormônios (esteroides). Destaca, também a possibilidade de cada espécie de abelha possuir seus tipos específicos de fungos mutualistas.

Embora o número de estudos neste sentido ainda seja pequeno (MENEZES *et al.*, 2015, BARBOSA *et al.*, 2017, PALUDO *et al.*, 2018), a possibilidade de encontrar novas

interações e novas espécies com interesse ecológico ou biotecnológico enfatizam a importância dessas investigações (ABREU, 2018; VIANA *et al.*, 2015).

Estudos em biologia de fungos tem demonstrado potencial dos fungos não somente como produtores de biomoléculas ativas contra uma gama de bactérias (PEREIRA & PITA, 2005) e outros fungos (PEDEZZI, 2019), mas também, como patógenos de abelhas-sem-ferrão (FERRAZ *et al.*, 2008) e em outros grupos animais (LARSSON, 2011) e vegetais (MICHEREFF, *et al.*, 2005). Tornam-se então necessárias pesquisas voltadas a preservação, prospecção e relações destes organismos que habitam o interior dos ninhos de abelhas, sabendo que estes são agentes potenciais nos estudos de taxonomia, de ecologia, de diversidade, de aplicações biotecnológicas, e outros afins (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Escolhemos como nosso objeto de estudo, uma espécie de abelha-sem-ferrão amplamente criada em áreas de Caatinga no semiárido brasileiro. *Scaptotrigona* sp. grupo *tubiba*, apesar de não descrita formalmente ocorre entre os estados do Ceará a Bahia, em áreas de Caatinga. É uma espécie defensiva e muito produtiva de mel, própolis e pólen meliponícola (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2009). As interações dessa espécie com os fungos que habitam seus ninhos não são conhecidas em área de caatinga. Estudar os fungos que ocorrem nos ninhos dessa espécie podem trazer à tona novas descobertas importantes para a criação e conservação dessa e de outras espécies do grupo.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar a presença de fungos filamentosos em células de cria em estágios distintos de desenvolvimento em colônias de *Scaptotrigona* sp. grupo *tubiba* manejadas em áreas de Caatinga.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Quantificar, isolar e identificar fungos isolados a partir das células de cria por meio de taxonomia morfológica;
- Realizar Macromorfologia e micromorfologia dos isolados identificados.
- Caracterizar o crescimento de isolados no alimento larval em condições controladas;

### 3. Hipótese

A microbiota fúngica cultivável presente nas células de cria de *Scaptotrigona* sp. grupo *tubiba* diversa, e as espécies que a compõe são diferentes durante os estágios do desenvolvimento dos imaturos.

### 4. Referencial teórico

#### 4.1. Abelhas sem ferrão: estrutura e composição dos ninhos

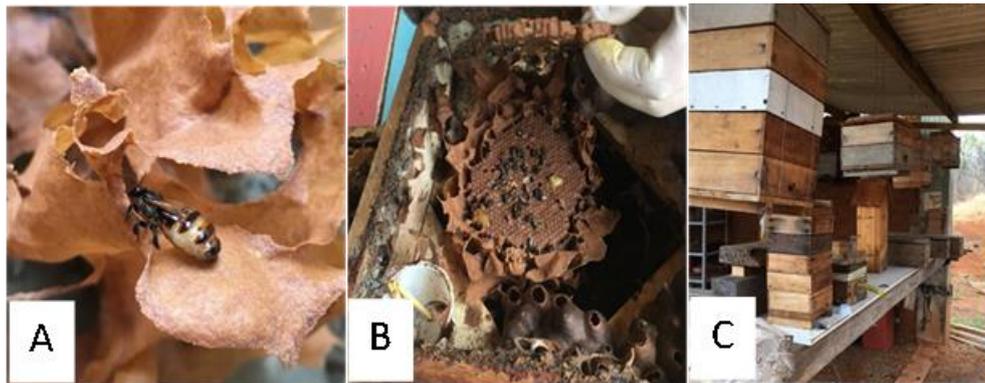
As abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) são designadas desta maneira, pois têm como uma de suas características o ferrão atrofiado, sendo incapazes de realizar a ferroada (MICHENER, 2007). Estes insetos são abundantes em regiões tropicais e subtropicais do mundo e ocorrem em todo Brasil, com cerca de 400 espécies descritas (MICHENER, 2007; ASCHER & PICKERING, 2021). Vivem em colônias perenes e estocam alimento em potes de cera para épocas de escassez (MICHENER, 2000). Os ninhos são estruturados a partir da utilização de cera, e há uma fenomenal diversidade de hábitos e habitats (VILLAS-BÔAS, 2012). Seus ninhos são construídos principalmente em cavidades em troncos de árvores, em solos e em construções humanas (Figura 1C) (HUBBELL & JOHNSON, 1977).

A estrutura de entrada dos ninhos pode estar relacionada a sua defesa, normalmente são feitas a base de cera, barro ou resina, ocorrendo fechamento ou não da passagem durante a noite (SOUZA, ALVES & CARVALHO, 2007). Algumas espécies de meliponíneos vivem em coexistência dentro de outros ninhos, pois constroem suas colônias no interior de formigueiros e cupinzeiros, por exemplo, mantendo uma relação de parabiose com os demais hospedeiros (LAROCA & ALMEIDA, 1989; WHEELER, 1910; DE OLIVEIRA, DA SILVA, L. L., & HRNCIR, M. 2016).

Na maioria das vezes os ninhos são constituídos por cera e resina, que quando misturadas formam o cerume, utilizado na construção do invólucro (fina camada de cera), que recobre os discos de cria, e potes de alimento (CAVALCANTE, OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2000). Realizam também o uso da própolis (resina e cera) e do geoprópolis (resina mesclada com barro) para impermeabilização e proteção do local (SANTOS *et al.*, 2009). Materiais como barro, restos vegetais e até mesmo fezes podem

ser utilizados no processo construção dos ninhos a depender da espécie (SILVA & PAZ, 2012).

O local de desenvolvimento e maturidade larval das abelhas fica localizado em estruturas denominadas células de cria, que normalmente se agrupam em discos de cria, geralmente revestidas pelo invólucro que ajuda na manutenção de sua temperatura (ROLDÃO, 2011). A forma dos discos é encontrada de distintas maneiras, mais comumente dispersas na horizontal (favos), em cachos ou mesmo dispostas em espiral como no caso das abelhas do gênero *Scaptotrigona* (Figura 1B) (VENTURIERI, 2008).



**Figura 1.** (A) Rainha de *Scaptotrigona* sp. grupo *tubiba*; (B) Interior do ninho de *Scaptotrigona* sp. grupo *tubiba*; (C) Ninhos de abelhas sem ferrão.

Esse microambiente especial, com todos os materiais, substâncias e interações encontradas nas colônias, proporcionam também, local adequado para a vida de uma diversidade de outros organismos (GONÇALVES & MARQUES, 2012). Entre eles algumas ordens de insetos e determinadas comunidades microbianas, as quais grande parte destes se encontram associados ajudando e garantindo a sobrevivência das abelhas por meio de relações mutualísticas (SOUZA *et al.*, 2009; MENEGATTI, 2016).

#### **4.2. Microrganismos que interagem com as abelhas sem ferrão**

As abelhas sem ferrão possuem ampla distribuição e seus ninhos são constituídos de diversas maneiras, formando microambientes, os quais, a depender de sua localização, poderão proporcionar relações simbióticas com outros organismos (KWONG *et al.*, 2017).

Para os meliponíneos é imprescindível que os materiais e substâncias produzidos e armazenados dentro do ninho estejam devidamente livres de patógenos e contaminantes externos (PEREIRA, DE CAMARGO & LOPES, 2007). Para isso, uma gama de microrganismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras mantém interações que colaboram de forma direta ou indiretamente na nutrição, proteção e equilíbrio da colônia (ROZEN, 2017). Há então, associações importantes com suas hospedeiras, as quais dependem de um microbioma específico e apropriado para sua sobrevivência e reprodução (GILLIAM, ROUBIK, LORENZ, 1990; ROSA, 2003).

Há uma contínua troca de benefícios entre as abelhas e os microrganismos que interagem, pois o trabalho social realizado por elas em cada setor do ninho, permite a estabilidade e proliferação das comunidades microbianas presentes (STRASSMANN & QUELLER, 2010). O comportamento das abelhas sem ferrão, de acordo a sua forma de coletar, de se alimentar, de construir o ninho e higienizá-lo, funcionam também como métodos necessários para a propagação e adaptação de organismos simbioses no interior da colônia (OSTER & WILSON, 1978).

Segundo Brand (2011) bactérias podem ser encontradas desempenhando papel importante na secreção de enzimas que auxiliam na pré-digestão, fermentação, conversão e alteração do pólen estocado. Fazem com que este seja menos suscetível à proliferação de microrganismos prejudiciais (MARTINS, MELO & RENNER, 2014). Para algumas espécies como *Melipona (Melipona) subnitida* Ducke, 1910, *Melipona (Michmelia) scutellaris* Latreille, 1811, *Melipona (Melipona) mandacaia* Smith, 1863 e *Scaptotrigona* sp. o pólen apresenta composição físico-química distinta, facilitando a proliferação de bactérias benéficas que produzem substâncias essenciais na quebra de açúcares (Barbara *et al.*, 2018).

Outras bactérias ainda pouco estudadas, são as que habitam no trato gastrointestinal das abelhas, ajudando em diversos processos metabólicos (SMITH *et al.*, 2020). Algumas destas, são tidas como bactérias produtoras de ácido acético, que também, estabelecem relações simbióticas com outras ordens de insetos (CROTTI *et al.*, 2009). Representantes dessa família são bactérias do gênero *Gluconobacter*, presentes no mel das abelhas sem ferrão e muito utilizada nas indústrias (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Outros estudos realizados com abelhas *Apis mellifera* demonstram que sua comunidade bacteriana intestinal tem grande importância no que diz respeito a saúde e nutrição (quebra do grão de pólen) de seus hospedeiros (ENGEL, MARTINSON & MORAN, 2012). Essa

microbiota é transmitida através das fezes dessas abelhas e da trofolaxia ajudando na proteção contra patógenos (KOCH & SCHMID-HEMPEL, 2011) e colaborando na degradação de compostos tóxicos encontrados no alimento e no ambiente (BARKER, 1977).

Em adição, as leveduras também são conhecidas por habitar ninhos de abelhas sem ferrão, ocorrem com maior frequência no mel e no pólen (DANIEL *et al.*, 2013). Atuam como organismos potenciais dentro das colônias, com funções semelhantes às exercidas pelas bactérias, pois secretam enzimas que transformam o alimento armazenado (LACHANCE *et al.*, 2001). Estudos como o de Meireles (2018) demonstram que *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata* (Smith, 1854), abelhas nativas da região amazônica, estabelecem relação com ao menos 15 linhagens de leveduras, incluindo gêneros como *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Trichosporon* e *Aureobasidium*, as quais são capazes de fermentar o pólen e outros materiais de origem vegetal estocados por estas abelhas.

Fungos filamentosos também têm despertado o interesse, como o estudo de Tiago (2017) que isolou representantes dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Monascus* a partir das células do disco de cria de *Melipona (Melikerria) interrupta* Latreille, 1811 e *Melipona (Michmelia) seminigra seminigra* Friese, 1903, sinalizando serem importantes para o desenvolvimento e manutenção da colônia. Observações importantes dentre outras espécies do mesmo gênero tal como *Melipona subnitida* é de que fungos filamentosos também foram isolados a partir de seus cadáveres, aumentando a possibilidade desses organismos se oportunizarem de suas carcaças (FERRAZ *et al.*, 2008).

Algo também intrigante e pouco conhecido foi demonstrado no estudo de Oliveira & Morato (2000) que observaram operárias de abelhas sem ferrão lambendo (ou colhendo) uma massa mucilaginosa nos cogumelos “véu-de-noiva” (Fungi, Phallales). Suspeita-se que os esporos desse fungo tenham valor nutritivo para as abelhas, complementando sua dieta a partir de substâncias produzidas por estes fungos.

Convém então, saber que os benefícios da associação desses insetos com estes fungos, lhes oferece os principais serviços, os quais estão relacionados à proteção, nutrição e propagação de esporos (MASSI *et al.*, 2015). Com isso, ainda não se sabe tamanha diversidade de microrganismos que podem residir em diferentes formas nos

ninhos e abelhas, entretanto, de uma forma geral, são fundamentais para a vida dessas espécies.

#### **4.3. Fungos em ninhos de *Scaptotrigona***

As abelhas sem ferrão desempenham importante papel ecológico, pois, além de serem insetos polinizadores, proporcionam dentro de seus ninhos habitat para uma gama de espécies que podem ser importantes na constituição e manutenção destes ecossistemas (ROUBIK, 1992).

Roubik (1992) explica a existência de uma íntima relação coevolutiva e simbiótica entre abelhas e fungos presentes no interior de alguns ninhos, onde estes se localizavam principalmente no intestino de abelhas adultas, nas provisões larvais e em várias outras porções, fornecendo muitos dos nutrientes necessários na dieta e alimentação dessas abelhas. Posterior a isso, muitas pesquisas puderam ser desenvolvidas e descobriu-se a partir de testes realizados, que um fungo do gênero *Monascus* (Ascomycota), o qual é a muito tempo usado na indústria alimentícia e para fabricação de corantes, mantinha uma estreita relação com abelhas *Scaptotrigona depilis* (MENEZES *et al.*, 2015).

No caso entre *Zygosaccharomyces* sp. e *Scaptotrigona* a proliferação desse fungo ocorre antes do ovo eclodir, crescendo intensivamente até o terceiro dia de desenvolvimento larval (PALUDO *et al.*, 2018). Assim que sai do ovo a larva da abelha come o fungo conforme ele se desenvolve. A partir disso, a possibilidade de que um fornecesse ao outro uma espécie de microambiente foi confirmada e os ninhos dessas abelhas oferecem condições estáveis adequadas para o desenvolvimento do fungo (BARBOSA *et al.*, 2017; MENEZES *et al.*, 2015; ZANELLA & MARTINS, 2003). Essa situação é semelhante para espécies de formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae, Attini) os quais realizam a coleta de material vegetal para utilizar como substrato no desenvolvimento de fungos que possuem feixes nas extremidades de suas hifas, denominados de staphylae, ricos em proteínas necessárias na alimentação larval e adulta dessas formigas (BASS & CHERRETT, 1995).

Em abelhas sem ferrão, o desenvolvimento de cada indivíduo ocorre de maneira isolada no interior das células de cria, orientadas verticalmente (KOEDAM & IMPERATRIZ-FONSECA, 2012). Estas células são preenchidas a partir do alimento larval depositado pelas operárias (VELTHUIS, KOEDAM, & IMPERATRIZ-FONSECA, 2005). Sobre esse alimento, é realizada a postura do ovo e a célula é fechada

com uma tampa constituída de cera (KISTNER, 1982). O fungo então, cresce sobre a superfície do alimento larval e em seguida é ingerido pela larva através do movimento de sua maxila (de cima para baixo) capaz de cortar o micélio do fungo (MENEZES *et al.*, 2015). Nesse momento, o fungo proporciona diversos precursores de esteroides necessários para o processo de ecdise das larvas, os quais não são produzidos pelo organismo das abelhas (PALUDO *et al.*, 2018)

Após a ingestão do fungo e desenvolvimento larval, a larva constrói um casulo (pré-pupa) que reveste a célula de cria internamente, no qual depois de formado, as abelhas adultas retiram o cerume que o envolve (MENEZES, 2010). Nessa fase, os favos de cria ficam com um tom mais claro e amarelado, e dentro do casulo, a pré-pupa metamorfoseia em pupa, e depois emerge o adulto (BEIG, 1971). Posteriormente a eclosão da larva, seu desenvolvimento continua com a ingestão do pólen e mel provisionado (VENTURIERI, 2008). O tempo total de desenvolvimento de uma abelha, da fase de ovo até o momento de eclosão de sua célula, varia muito, de acordo com a espécie e o tipo de casta, portanto a proliferação dos filamentos do fungo ocorreria então pelo transporte e reciclagem de seu material dentro da colônia, especialmente a cera (MENEZES *et al.*, 2015).

## **5. Metodologia**

A metodologia utilizada para coleta das amostras e isolamento dos fungos foi baseada em metodologias descritas por Menezes *et al.* (2015), Barbosa *et al.* (2017) e Paludo *et al.* (2018), com adaptações descritas em seguida.

### **5.1. Coleta de material**

A coleta foi realizada em cinco ninhos de *Scaptotrigona* sp. grupo *tubiba* no “Trilha dos Polinizadores” próximo a um fragmento de Caatinga da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Serra Talhada, PE. Para tal, o ninho foi aberto e as coletas foram feitas utilizando material previamente esterilizado (palitos, ponteiras e tubos de Ependorffs®) em 10 células dos discos de cria do ninho e enumeradas de 1 a 10. As mesmas foram selecionadas aleatoriamente para garantir a representatividade das amostras (Tabela 1).

**Tabela 01.** Enumeração das amostras conforme célula de cria dos três ninhos de *Scaptotrigona* sp. localizados no meliponário da “Trilha dos Polinizadores” da UFRPE/UAST.

Nº da amostra	Célula de cria
01	
02	
03	Com larva em desenvolvimento
04	(Caracterização 1)
05	
06	Apenas com alimento larval
07	(Caracterização 2)
08	
09	Com larva desenvolvida
10	(Caracterização 3)

Todas as amostras foram transferidas com um micropipetador estéril para tubos tipo Ependorffe® e em seguida levadas para análise no laboratório de microbiologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Serra Talhada, PE

## 5.2. Isolamento dos fungos

Em laboratório cada uma das amostras foi solubilizada em 0,5 ml de água destilada esterilizada, e agitadas em vórtex para homogeneização. De cada amostra, pipetamos 0,1 ml na superfície dos meios de cultura Agar Sabouraud (SAB), Agar Batata Dextrose (BDA) e Agar Batata Dextrose acrescido com 15% de glicose (BDA 15%), espalhadas com ajuda de uma alça de Drigalski e incubadas em estufa a 28 °C por cinco dias.

## 5.3. Identificação dos isolados fúngicos

Os isolados fúngicos foram submetidos à identificação taxonômica por meio de análise morfológica. Cada isolado foi repicado para os meios de cultura Agar Batata Dextrose (BDA), Agar Extrato de Malte (ME) e Agar Czapek (CZ) em placas de Petri e incubados a 28 °C e a partir do décimo dia de crescimento, foram feitas lâminas das amostras e observadas microscopicamente suas estruturas somáticas e reprodutivas. A visualização macroscópica também foi feita, levando em consideração características das colônias como textura, coloração, produção de pigmentos, produção de exsudatos, etc. A identificação foi realizada utilizando literatura específica (BUTTON 1980 & HANLIN 2000).

## 5.4. Caracterização micro e macromorfológica dos isolados

Para análise macro e microscópica das colônias foram utilizados os meios de culturas Agar Sabouraud (SAB), Agar Batata Dextrose (BDA), Agar Malte (ME), Agar Czapek (CZ) e de Agar Sabouraud acrescido de 18% glicose (SAB 18%). Após 7 dias de crescimento, foi realizada microscopia em lâmina com observação das microestruturas. A caracterização macromorfológica foi feita levando em consideração a textura, coloração, produção de pigmentos e produção de exsudato. (CHIVERS, 1915), com registro fotográfico

### **5.5. Avaliação do crescimento fúngico em alimento larval**

Para avaliar o crescimento de *Arcopilus* sp. no alimento larval, amostras de alimento larval foram coletadas em dois dos ninhos do mesmo meliponário. Os ninhos foram abertos e a coleta foi feita utilizando material previamente esterilizado (espátulas e placas de Petri). Foram retiradas pequenas porções dos discos de cria e posteriormente colocadas em placas de Petri rapidamente levadas ao laboratório. O alimento foi retirado em laboratório com o uso de uma pipeta, bem como espremido com auxílio das próprias mãos. Após sua obtenção, o mesmo foi esterilizado em cabine com luz ultra-violeta.

Para avaliação do crescimento fúngico, utilizou-se uma placa multipoços para ELISA esterilizada, na qual foram testadas quatro condições, adicionando-se em cada poço 200 µl e em triplicatas:

- Alimento larval (AL);
- Alimento larval mais água destilada (1:1; v/v) (AA);
- Água destilada acrescida com 1% de glicose (AG);
- Caldo Sabouraud (CS).

Após adição dos substratos citados acima, cada poço recebeu filamentos do micélio do “isolado nove” previamente crescido em ME por 7 dias em placas de Petri. Em seguida o material foi levado a estufa a temperatura de 30 °C por 8 dias, durante os quais foi observado diariamente o desenvolvimento do fungo e suas características a partir de análise.

### **5.6. Preservação dos isolados fúngicos**

Inicialmente, os fungos que haviam sido repicados em tubos contendo Agar Sabouraud (SAB), foram repassados de volta aos meios de cultura em que haviam sido isolados originalmente (SAB, BDA ou BDA 15% de glicose).

Os isolados que não cresceram nos meios sólidos mencionados, foram inoculados em tubos contendo caldo glicosado (15 ml de água destilada esterilizada com adição de 1% de glicose). O crescimento foi observado após 10 dias a uma temperatura ambiente de 28 °C.

### 5.7. Manutenção dos isolados por criopreservação

Os 19 isolados foram mantidos a partir do método da criopreservação com algumas adaptações baseadas na literatura de WOLFE & BRYANT (2001). Pequenos fragmentos das colônias fúngicas foram adicionadas a tubos criogênicos de 1ml esterilizados e em seguida preenchidos com uma solução de glicerol a 30%. Posteriormente os tubos foram tampados e estão sendo mantidos a uma temperatura de no máximo -70 °C em um freezer do Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal da UAST/UFRPE. As amostras serão avaliadas posteriormente.

## 6. Resultados

### 6.1. Isolamento, quantificação e identificação dos isolados fúngicos

Foram observadas um total de 270 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de fungos nos diferentes meios de cultura utilizados.

O meio de cultura com maior número de UFC foi o BDA acrescido de 15% de glicose, com um total de 129 colônias, seguido pelo Agar Batata Dextrose (BDA) com 89 colônias e posteriormente o Agar Sabouraud (SAB) com um total de 52 colônias. Também foi observado um maior número de UFC isoladas a partir das amostras obtidas das células de cria com larva em desenvolvimento (Tabela 2), apesar de terem sido analisadas cinco amostras (50% do total) deste tipo de substrato, porém, a amostras 4 e 5 foram aquelas com maior número de colônias fúngicas, com 63 e 69 UFCs, respectivamente.

**Tabela 2.** Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC) fúngicas isoladas de células de cria de *Scaptotrigona tubiba* (Smith, 1863) nos três meios de cultura utilizados

Amostras	Célula de cria	Agar SAB	Agar BDA	Agar BDA 15% de glicose	Total de UFC por amostra
Amostra 1	Com larva em desenvolvimento	2	6	29	37
Amostra 2	Com larva em desenvolvimento	2	4	7	13

Amostra 3	Com larva em desenvolvimento	0	3	9	12
Amostra 4	Com larva em desenvolvimento	25	19	19	63
Amostra 5	Com larva em desenvolvimento	13	25	31	69
Amostra 6	Apenas com alimento larval	1	11	9	21
Amostra 7	Apenas com alimento larval	1	3	8	12
Amostra 8	Com larva desenvolvida	7	8	3	18
Amostra 9	Com larva desenvolvida	0	4	9	13
Amostra 10	Com larva desenvolvida	1	6	5	12
Total de UFC por meio de cultivo		52	89	129	270

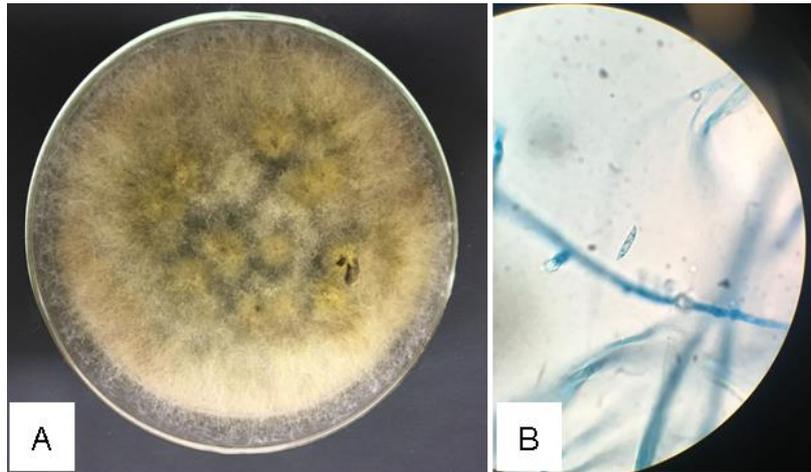
Entre os isolados foram selecionadas um total de 19 baseando-se em sua morfologia, sendo 11 provenientes das células de cria com larvas em desenvolvimento, cinco provenientes do alimento larval apenas e quatro do alimento com a larva já desenvolvida. Estas colônias foram cultivadas em Agar SAB e preservadas sob refrigeração.

Apenas *Arcopilus sp.* desenvolveu estruturas de reprodução sexuada, e por estar relacionado à amostra da célula de cria com a larva em desenvolvimento, foi selecionado para estudos mais detalhados, conforme os itens 6.2 e 6.3.

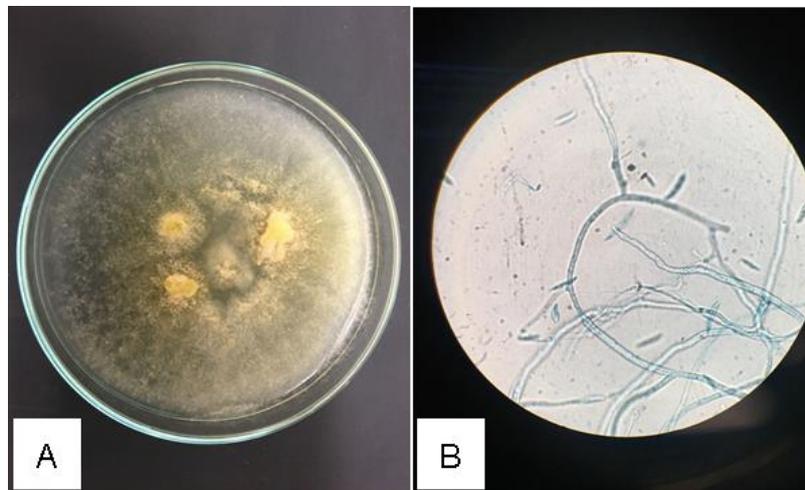
**Tabela 03.** Identificações morfológicas realizadas

Célula de cria	Nº do isolado	Meio de cultivo de isolamento	Identificação	Características morfológicas
Com larva em desenvolvimento	1	BDA	<i>Fusarium</i>	Colônia algodonosa e Conídios em forma de meia lua
	9	BDA	<i>Arcopilus</i>	Colônia branca, pigmento extracelular avermelhado, hifas demáceas, setas presença de ascostroma do tipo cleistotécio com ascos e ascósporos.
Alimento larval e ovo	16	BDA 15% de glicose	<i>Cladosporium</i>	Colônia demácia, presença de fiálides e conídios pigmentados

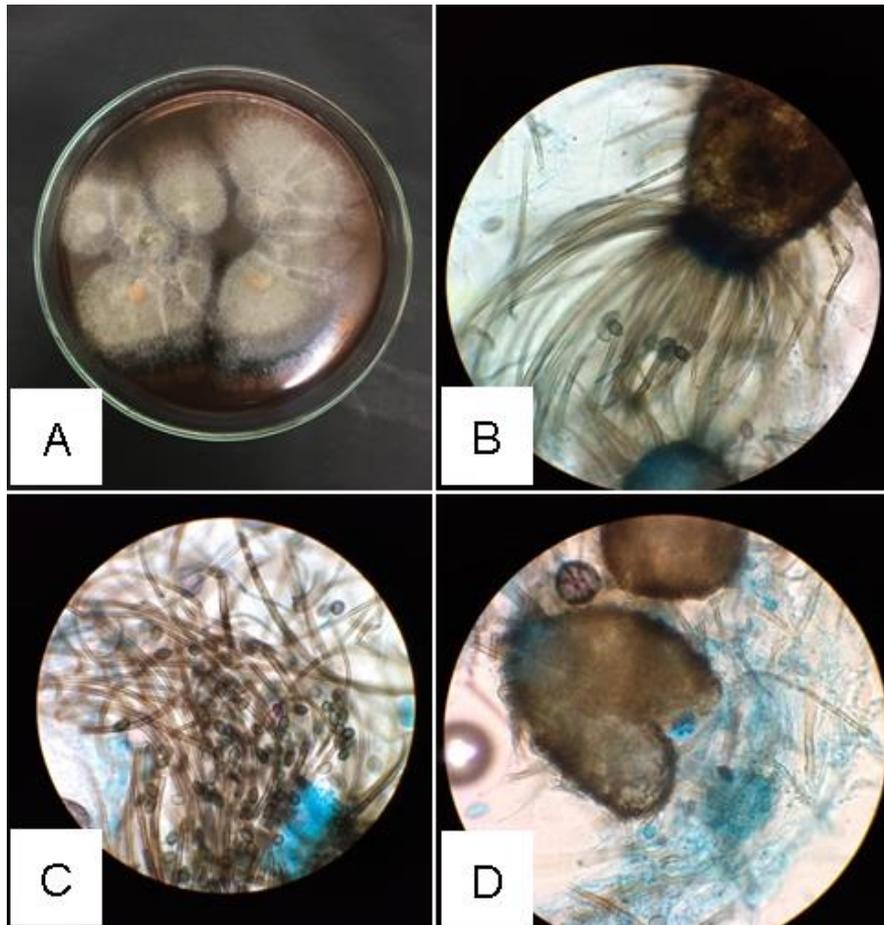
As figuras de 02 a 05 ilustram características macro e microscópicas dos isolados.



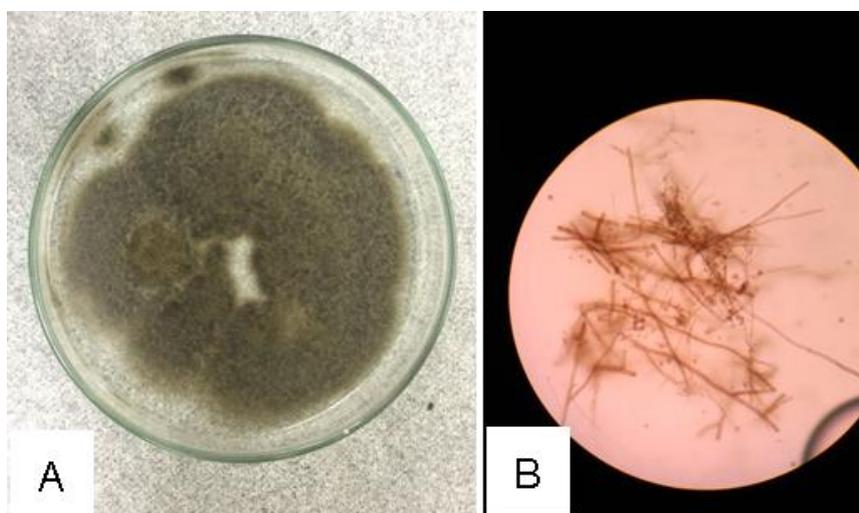
**Figura 02.** *Fusarium* sp. (isolado 1) em meio de cultura BDA (A) Colônia algodosa (B) Conídios em forma de meia lua. **Fonte:** Autora, 2018.



**Figura 03.** *Fusarium* sp. (isolado 1) em meio de cultura CZ. (A) Colônia algodosa e alaranjada (B) Conídios em forma de meia lua. **Fonte:** Autora, 2018.



**Figura 04.** *Arcopilus* sp. (isolado 9) em meio de cultura ME (A) Colônia branca e pigmento extracelular avermelhado, hifas demáceas (B) e setas (C) Presença de ascostroma do tipo cleistotécio (D) Ascus e ascósporos. **Fonte:** Siqueira e Autora, 2018.

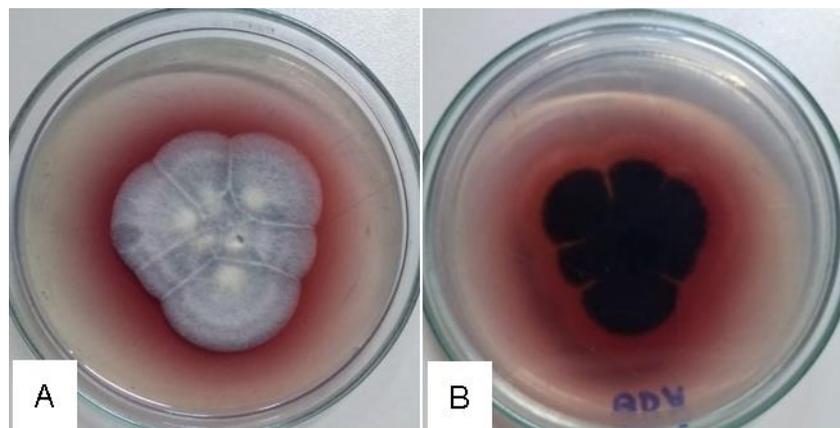


**Figura 05.** (A) *Cladosporium* sp. (isolado 16) em meio de cultura CZ (A) Colônia demácia (B) presença de fiálides e conídios pigmentados. **Fonte:** Siqueira e Autora, 2018.

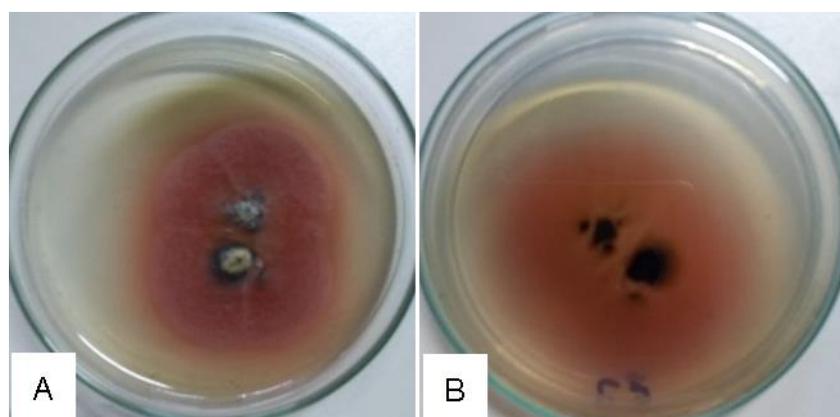
## 6.2. Macromorfologia e micromorfologia (*Arcopilus sp.*)

Após sete dias de crescimento, a cultura de *Arcopilus sp.* que melhor desenvolveu estruturas macro e microscopicamente em BDA (Figura 12), CZ (Figura 13) e ME (Figura 14), foram selecionadas para observar as estruturas de reprodução. O meio SAB (Figura 15) mostrou-se menos favorável ao desenvolvimento desse fungo e em SAB 18% de glicerol não houve crescimento algum (Figura 16).

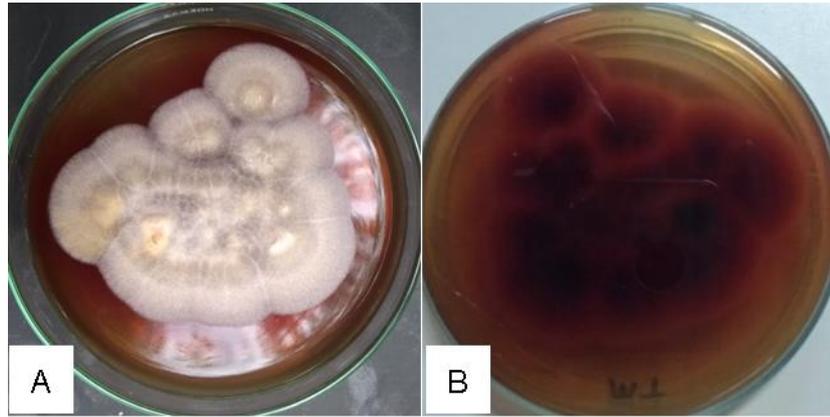
Foi possível observar o micélio vegetativo de coloração branca, bem como o pigmento de coloração avermelhada extracelular. O verso da colônia apresentou coloração branca e o reverso coloração vermelho escura.



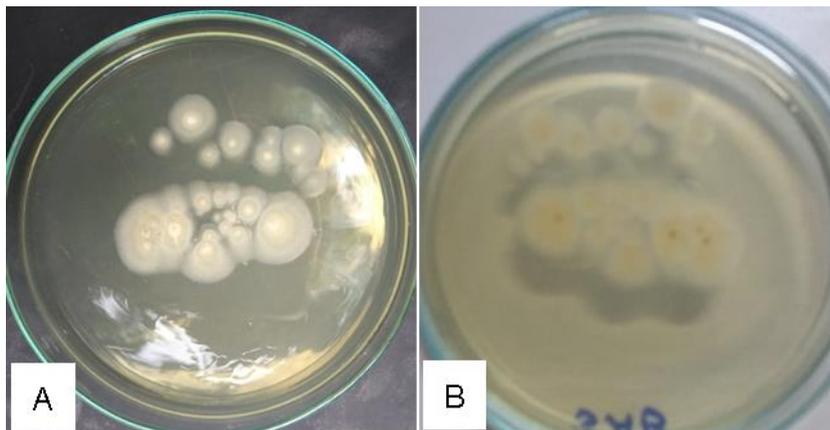
**Figura 06.** (A) Verso e (B) reverso da colônia de *Arcopilus sp.* em meio de cultura BDA.



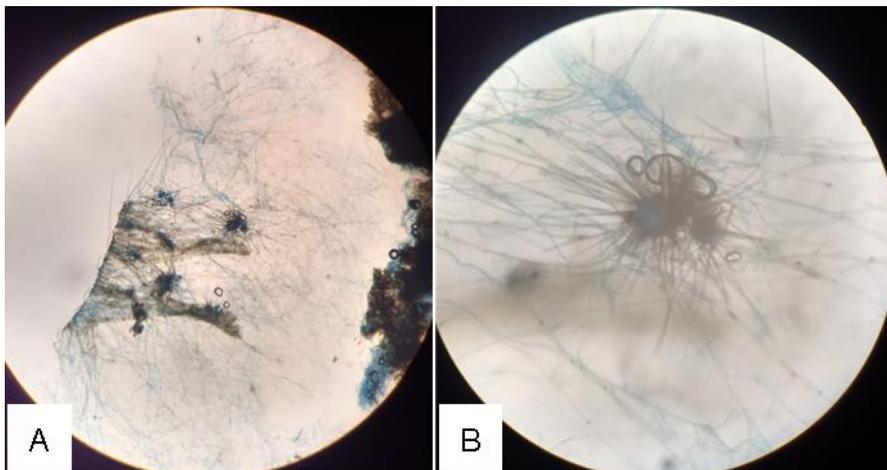
**Figura 07.** (A) Verso e (B) reverso de *Arcopilus sp.* em meio de cultura CZ.



**Figura 08.** (A) Verso e (B) reverso da colônia de *Arcopilus sp.* em meio de cultura ME.



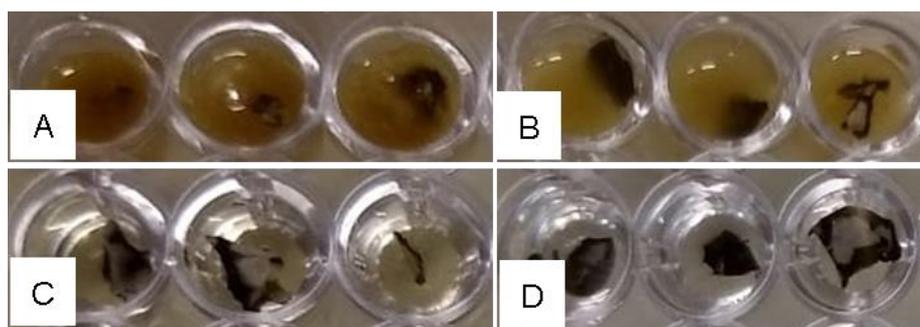
**Figura 09.** (A) Verso e (B) reverso da colônia de *Arcopilus sp.* em meio de cultura SAB.



**Figura 10.** (A) e (B) Microscopia em lâmina de *Arcopilus sp.* em meio de cultura ME.

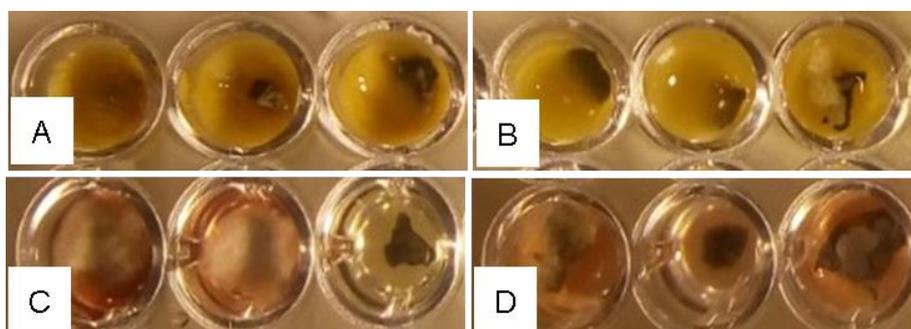
### 6.3. Capacidade de crescimento de *Arcopilus sp.* em diferentes condições

Observou-se que *A. sp.* permaneceu em latência durante os dois primeiros dias, não havendo crescimento (Figura 11).



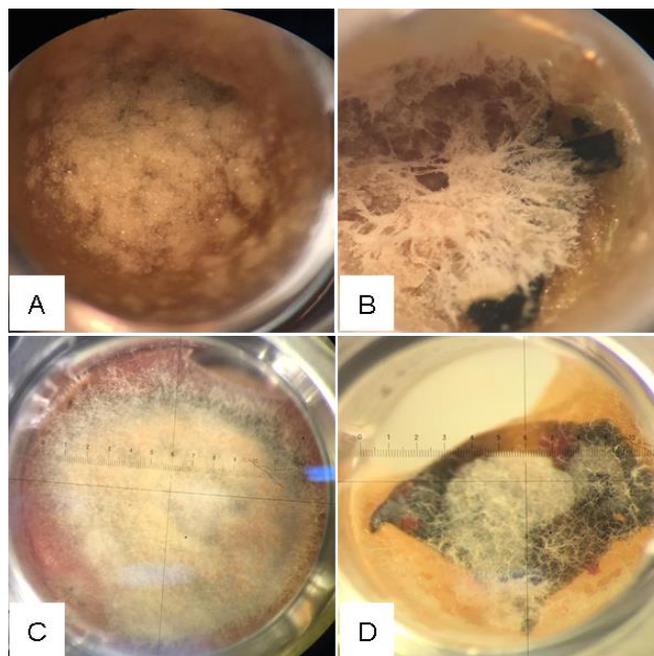
**Figura 11.** Segundo dia de monitoramento do crescimento de *Arcopilus sp.* sob os diferentes tratamentos em (A) alimento larval, (B) alimento larval mais água destilada (1:1; v/v), caldo Sabouraud (C) e água destilada acrescida com 1% de glicose (D).

A partir do terceiro dia houve o crescimento inicial do micélio, apresentando maior crescimento nos poços com água e menor para os com apenas o alimento larval (Figura 12).



**Figura 12.** Terceiro dia de monitoramento do crescimento de *Arcopilus sp.* sob os diferentes tratamentos em (A) alimento larval, (B) alimento larval mais água destilada (1:1; v/v), caldo Sabouraud (C) e água destilada acrescida com 1% de glicose (D).

De modo crescente até o oitavo dia de monitoramento o fungo desenvolveu-se melhor e mais rápido no AA, seguido por CS, AG e AL no qual apenas um dos poços mostrou desenvolvimento significativo do fungo sob a superfície do substrato. Foi visto que no alimento acrescido de água (AA) que o fungo se desenvolveu em todos os poços, espalhando-se principalmente a partir de suas bordas, com leves ramificações do micélio e produção de pigmento extracelular vermelho (Figura 13).



**Figura 13.** Oitavo dia de monitoramento do crescimento de *Arcopilus sp.* de (A) a (D) nos poços 1A, 7A, 2C e 1E contendo (A) alimento larval, (B) alimento larval mais água destilada (1:1; v/v), caldo Sabouraud (C) e água destilada acrescida com 1% de glicose (D).

No restante dos tratamentos, o fungo se espalhou de maneira uniforme, partindo do local onde o inóculo foi depositado na placa, sendo que tanto em CS, quanto em AG, houve produção de exsudato e pigmento avermelhado no reverso.

## 7. Discussão

Os resultados desse estudo revelam que os diferentes estágios larvais de abelhas *Scaptotrigona sp.* interferem nas espécies de fungos filamentosos cultiváveis no alimento larval. Vários outros estudos comprovam a existência de fungos filamentosos nos ninhos de abelhas-sem-ferrão, como por exemplo em *Melipona scutellaris* a qual foram obtidas várias linhagens de *Monascus*, não somente nas células de cria, mas também no pólen e mel estocados no ninho (BARBOSA *et al.* 2017; BARBOSA *et al.*, 2018).

O possível motivo das amostras das células de cria com larva em desenvolvimento terem apresentado maior quantidade de colônias possivelmente está associado ao fato de que as operárias depositam o alimento larval na célula de cria antes da postura da rainha (SERRA, 2016), assim os fungos não tiveram tempo suficiente para se desenvolver no alimento recém depositado. A concentração de fungos nas células de cria com larvas desenvolvida (8 a 10) foi menor do que em células com larva em desenvolvimento, porém

foi maior do que nas células que continham apenas alimento estocado. Isso, pode estar relacionado ao consumo de fungos pelas larvas durante seu crescimento. Paludo *et al.* (2018) também observaram maiores taxas de crescimento fúngico durante os três primeiros dias do desenvolvimento larval, corroborando os dados obtidos no presente estudo.

O fato do Ágar BDA 15% de glicose ter sido o mais representativo entre as culturas *in vitro* está relacionado a natureza nutritiva do meio que possui uma quantidade significativa de açúcares simples, de fácil absorção e digestão, provenientes da batata (DENARDI *et al.*, 2005). Ficou evidente que a adição de 15% de glicose no meio de cultura BDA favoreceu o crescimento de colônias fúngicas, provavelmente porque esta concentração de açúcares seja similar à encontrada nas células de cria (SILVA *et al.*, 2017). Meneses *et al.* (2015) utilizaram Agar Malte para o isolamento de *Monascus* sp. em células de cria de abelhas *S. depilis*, as quais pertencem ao mesmo gênero relatado nesse trabalho. Barbosa *et al.* (2017) também isolaram várias linhagens do gênero *Monascus* em *Melipona scutellaris*, entretanto utilizando agar extrato de malte e agar dicloran glicerol acrescido em 18% de glicose. Mesmo que *Arcopilus* sp. não tenha apresentado estruturas reprodutivas totalmente desenvolvidas em Agar SAB, o mesmo demonstrou um micélio com hifas septadas, que se ramificavam a partir do início da formação dos ascos. Sabendo disso, seriam necessários apenas alguns dias para o surgimento de outras estruturas de reprodução, como a formação completa do asco com os ascósporos, além da produção de pigmento.

Os isolados encontrados nesse estudo podem ser de fato provenientes da interação existente entre a abelha e os fungos que habitam, podendo ser importantes na microbiota do ninho. Exemplo disso, temos o Segundo o estudo de Paludo *et al.* (2018) que observaram mais de uma espécie de fungo habitando os ninhos, produzindo naquele ambiente os esteroides necessários ao desenvolvimento larval das abelhas. Mesmo sabendo da existência desses fungos nas células de cria, faz-se necessárias mais análises, que possam de fato definir a relação desses fungos com as abelhas.

*Fusarium* e *Cladosporium* fazem parte do Filo Ascomycota e possuem uma grande variedade de espécies de hábito generalista (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004). *Arcopilus* sp. é uma espécie pouco comum e ainda não relatada em ninhos de abelhas-sem-ferrão, faz parte dos ascomicetos miceliais, sobrevivendo principalmente em locais de temperatura adequada e umidade relativa estável, sendo capazes de colonizar vários

substratos, degradando a celulose, e produzir uma variedade de metabólitos bioativos (WANG *et al.*, 2016).

Embora *Arcopilus* sp. tenha apresentado crescimento sob todos os substratos nos testes com alimento larval que lhes foram fornecidos, se desenvolveu melhor na presença de água, resultando no melhor crescimento. As abelhas-sem-ferrão sempre mantêm os níveis de umidade maior no interior do ninho, e as características desse fungo, frente ao alimento larval, mostram que quando submetido a grande disponibilidade de água, obtém um melhor desempenho em seu crescimento. Isso pode ser atribuído a temperatura e umidade existente no ninho, já que internamente a umidade dos ninhos varia entre 50% e 95%, com média de 82% de umidade relativa e temperatura variando de 21°C à 33 °C, com média de 29 °C (Carvalho *et. al.*, dados não publicados). No mesmo período a umidade do ar foi bem menor (média de 35%), medida a partir de termohigrômetro interno a colônia, ou seja, as abelhas mantem a umidade dentro do ninho.

As características observadas neste gênero também demonstraram importante subsídio de informações quanto à produção de exsudato e pigmento avermelhado no reverso da placa de Petri (JANECZKO *et al.*, 2009). Porém, isso de fato pode ocorrer para espécie, pois suas estruturas tais como, ascocarpo do tipo cleistotécio, conteúdo ascos e ascósporos possibilitam esse metabolismo (AGGARWAL, SHARMA & KHARBIKAR, 2008). Nestas circunstâncias assemelham-se macromorfológicamente a recente descoberta do gênero *Monascus* realizada por Menezes *et al.*, (2015) em ninhos de *S. depilis*, no qual o fungo também foi cultivado em laboratório e apresentou semelhantes estruturas reprodutivas. Vários parâmetros ainda devem ser testados, a fim de averiguar a existência dos fungos que podem fazer parte da microbiota dos ninhos de abelhas-sem-ferrão e buscar analisar as relações existentes entre as espécies, já que a literatura é de certa maneira escarça principalmente para região do semiárido pernambucano.

## 8. Conclusão

O alimento larval de abelhas *Scaptotrigona* sp. possui espécies cultiváveis de fungos filamentosos. Esse estudo traz informações relevantes sob a ótica da criação de abelhas-sem-ferrão, buscando um conhecimento necessário a preservação das espécies de fungos encontradas no interior de seus ninhos. Os dados apresentados aqui, enfatizam a

importância ambiental e taxonômica dos fungos em substratos relacionados a abelhas nativas, destacando a ocorrência da espécie *Arcopillus* sp. em ninhos de *Scaptotrigona* sp. Apesar de ter sido possível o isolamento dos fungos, não é descartada a possibilidade de haver mais espécies, que por ventura não cresceram nos meios de cultivo usados. Desta forma, uma investigação mais apurada da população microbiana associada às larvas de abelhas-sem-ferrão deve ser feita através de técnicas mais sensíveis como a análise metagenômica.

## 9. Referências bibliográficas

ABREU, J.A.S.; ROVIDA, A.F.S.; PAMPHILE, J.A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. Revista UNINGÁ Review, Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1613>. 21(1). Maringá, 2018.

AGGARWAL, R.; SHARMA, V.; & KHARBIKAR, L. L. Molecular characterization of *Chaetomium* species using URP-PCR. Genetics and Molecular Biology, 3(4): p.943-946. São Paulo, 2008.

AMES, L. M. New cellulose destroying fungi isolated from military material and equipment. Mycologia, 41(6): p.637-648. 1949.

BÁRBARA, M. F. S.; MACHADO, C. S.; SODRÉ, G. D. S.; SILVA, F. D. L.; CARVALHO, C. A. L. D. Caracterizações microbiológica e físico-química de pólenes armazenados por abelhas sem ferrão. Brazilian Journal of Food Technology, 21. Campinas, 2018.

BARBOSA, R.N.; LEONG, S.L.; VINNERE-PETTERSSON, O.; CHEN, A.J.; SOUZA-MOTTA, C. M.; FRISVAD, J.C.; HOUBRAKEN, J. Phylogenetic analysis of *Monascus* and new species from honey, pollen and nests of stingless bees. Studies in mycology. 86: p.29-51. 2017.

BARKER, R. J. Some carbohydrates found in pollen and pollen substitutes are toxic to honey bees. The Journal of Nutrition, 107(10): p.1859-1862. Tucson, 1977.

BASS, M.; CHERRETT J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. Physiological Entomology, 20(1): p.1-6. 1995.

BEIG, D. Desenvolvimento embrionário de abelhas operárias de *Trigona (Scaptotrigona) Postica Llatreille* (Hymenoptera, Meliponinae). *Arquivos de Zoologia*, 21(4): p.179-234. Local, 1971.

BRAND, H. O pólen coletado pelas abelhas sem ferrão (*Anthophila, Meliponinae*). *Acta Biológica Paranaense*, 40(3-4): p.129-133. Curitiba, 2011.

CAMARGO J. M. F. & PEDRO S.R.M., Meliponini Lepeletier, In Moure. 1836. URBAN, J.S.; MELO, D.; G.A.R. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region online version. 2013. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>

Campos, F. S., Gois, G. C., & Carneiro, G. G. Termorregulação colonial em abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Pubvet*, 4, Art-872. 2010.

CAVALCANTE, V. M.; OLIVEIRA, V. T. P. D.; CRUZ-LANDIM, C. D.; Comparative study of wax glands in four Meliponini bees (Hymenoptera, Apidae) producing different quantities of wax. *Iheringia. Série Zoologia*, (89): p.193-198. Porto Alegre, 2000.

CHIVERS, A. H. A monograph of the genera *Chaetomium* and *Ascotricha*. *Torrey Botanical Society*, 14(3): p.155-240, 1915.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D.O.; PUPO, M.T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. *Ciência e Cultura*, 64 (3): p.43-47. São Paulo, 2012.

CORTOPASSI-LAURINO, M., ALVES, D. A. E., & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Árvores neotropicais, recursos importantes para a nidificação de abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponini). *Mensagem doce*, 100, p.21-28. 2009.

Cortopassi-Laurino, M., Alves, D. A. E., & Imperatriz-Fonseca, V. L. Árvores neotropicais, recursos importantes para a nidificação de abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponini). *Mensagem doce*, 100 p.21-28. 2009.

CROTTI, E.; DAMIANI, C.; PAJORO, M.; GONELLA, E.; RIZZI, A.; RICCI, I.; NEGRI, I. SCUPPA, P.; ROSSI, P.; BALLARINI, P.; RADDADI, N.; MARZORATI, M.; SACCHI, L.; CLEMENTI, E.; GENCHI, M.; MANDRIOLI, M.; BANDI, C.; FAVIA, G.; ALMA, A.; & DAFFONCHIO, D. Asaia, a versatile acetic acid bacterial

symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. *Environmental Microbiology*, 11(12): p.3252-3264. local, 2009.

DANIEL, H.; ROSA, C. A.; SÃO THIAGO-CALAÇA, P. S.; ANTONINI, Y.; BASTOS, E. M. A. F.; EVRARD, P.; HURET, S.; FIDALGO-JIMÉNEZ, A.; LACHANCE, M.A. *Starmerella neotropicalis* f. a., sp. nov., a yeast species found in bees and pollen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, p. 3896–3903, local, 2013.

DE OLIVEIRA, T. F. F. N.; DA SILVA, L. L.; & HRNCIR, M. Opportunistic Occupation of Nests of *Microcerotermes* spp. Silvestri (Termitidae, Termitinae) by *Partamona seridoensis* Camargo & Pedro (Apidae, Meliponini) in the Brazilian Tropical Dry Forest. *Sociobiology*, 63(1): p.731-734. Mossoró, 2016.

DENARDI, C. A. S.; NISHIMOTO, E. J.; BALIAN, S. C.; TELLES E. O. Avaliação da atividade de água e da contaminação por bolores e leveduras em mel comercializado na cidade de São Paulo - SP, Brasil. *Revista Instituto Adolfo Lutz (Impr.)*. 64(2): p.219-222. São Paulo, 2005.

ENGEL, P.; MARTINSON, V. G.; MORAN, N. A. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27): p.11002-11007. 2012.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.D. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Educ. Ed. 2, p.510. Caxias do Sul: 2004.

FERRAZ, R. E.; LIMA, P.M.; PEREIRA, D. S.; FREITAS, C. C.; FEIJÓ, F. Fungi microbiot of *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). *Neotropical entomology*, 37 (3): p.345-346. Londrina, 2008.

GILLIAM, M; ROUBIK, D. W; LORENZ, B. J. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologiep*. 21(2): p.89-97.1990.

GONÇALVES, R. C.; MARQUES, M. D. Ritmos de populações: o caso das abelhas sem ferrão. *Revista da Biologia*, 9(3): p.53-57. São Paulo, 2012.

- HUBBELL, S. P.; JOHNSON, L. K. Competition and nest spacing in a tropical stingless bee community. *Ecology*, 58 (5): p.949-963. Iowa, 1977.
- Janeczko, T., Dmochowska-Gładysz, J., Kostrzewa-Susłow, E., Białońska, A., & Ciunik, Z. Biotransformations of steroid compounds by *Chaetomium* sp. KCH 6651. *Steroids*, 74(8), p.657-661. 2009.
- KISTNER, D. H. The social insects' bestiary. *Social insects*, 3(1-244): p.373-375. Georgia, 1982.
- KOCH, H., SCHMID-HEMPEL, P. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48): p.19288-19292, 2011.
- KOEDAM, D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Cell-sealing efficiency and reproductive workers in the species *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Meliponini): double standard and possible rogue conduct. *Apidologie*, 43(4): p.371-383. Local, 2012.
- KWONG W. K.; MEDINA, L. A.; KOCH, H.; SING, KONG-WAH; SOH E. J. Y.; ASCHER, J. S.; JAFFÉ, R.; MORAN, N. A. Dynamic microbiome evolution in social bees. *Science Advances*, 3(3): e1600513. Local, 2017.
- LACHANCE, M. A.; STARMER, W. T.; ROSA, C. A.; BOWLES, J. M.; BARKER, J. S. F.; JANZEN, D. H. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS yeast research*, 1(1): p. 1-82001. 2001.
- LAROCA, S.; ALMEIDA, M. C. D. Coexistência entre abelhas sem ferrão e formigas: ninho de *Paratrigona myrmecophila* (Apidae) construído em ninho de *Camponotus senex* (Formicidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 6(4): p.671-680. Curitiba, 1989.
- LARSSON, C. E. Esporotricose. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 48(3): p.250-259. São Paulo, 2011.
- LIU, D.; PATERSON, R. R. M. *Chaetomium*. Molecular Detection of Human Fungal Pathogens. p.389-392. 2011.
- LOECK, A. E.; PIEROBOM, C.R.; GUSMÃO, L. G. D.; AFONSO, A. P. Crescimento de fungos simbiote de algumas formigas *Attine* superiores em meio mineral. *Ciência Rural*, 34 (1): p.79-82. Santa Maria, 2004.

MARTINS, A. C.; MELO, G. A.; RENNER, S. S. The corbiculate bees arose from New World oil-collecting bees: Implications for the origin of pollen baskets. *Molecular phylogenetics and evolution*, 80: p.88-94. Local, 2014.

MASSI, F. P.; PENHA, R. E. S.; CAVALCANTE, M. C.; VIARO, H. P.; DA SILVA, J. J.; DE SOUZA FERRANTI, L.; FUNGARO, M. H. P. Identification of *Aspergillus nomius* in Bees Visiting Brazil Nut Flowers. *Microbes and environments*, 30(3): p.273-275. Local, 2015.

MEIRELES, S. D. F. Leveduras associadas ao ninho das abelhas sem ferrão *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata* (Apidae: Meliponini): identificação e aspectos biotecnológicos. Universidade Federal do Amazonas (Dissertação de mestrado), 2018.

MENEGATTI, C. Bactérias simbiotes associadas à abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* como fontes de produtos naturais bioativos. Universidade de São Paulo (Dissertação de doutorado). Ribeirão Preto, 2016.

MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; MARSAIOLI, A. J.; ZAMPIERI, D.; FONTOURA, I. C.; LUCHESSI, A. D.; IMPERATRIZ-FONSECA; V. L. A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Current Biology*, 25 (21): p.2851-2855. São Paulo, 2015.

MICHENER, C. D. The bees of the world. Johns Hopkins University Press Ed. (1). Kansas, 2000.

MICHENER, C. D. The bees of the world. p.809. Kansas, 2007.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A.; MENEZES, M. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*, v. 1, p.1-18. Recife: UFRPE, 2005.

OLIVEIRA, A. L. D. D.; SANTOS JUNIOR, V.; LIOTTI, R. G.; ZILIOLI, E.; SPINOSA, W. A.; & RIBEIRO-PAES, J. T. Estudo de bactérias do gênero *Gluconobacter*: isolamento, purificação, identificação fenotípica e molecular. *Food Science and Technology*, 30(1): p.106-112. Campinas, 2010.

OLIVEIRA, M. L.; MORATO, E. F. Stingless bees (Hymenoptera, Meliponini) feeding on stinkhorn spores (Fungi, Phallales): robbery or dispersal?. *Revista Brasileira de Zoologia*, 17 (3): p. 881-884. Londrina, 2000.

OSTER, GEORGE F.; WILSON, EDWARD O. *Caste and ecology in the social insects*. Princeton University Press, p.347. Princeton, 1978.

PALUDO, C. R.; MENEZES, C.; SILVA-JUNIOR, E. A.; VOLLET-imperatriz, A.; ANDRADE-DOMINGUEZ, A.; PISHCHANY, G.; CLARDY, J.; PUPO, M.T. Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate. *Scientific reports*, 8 (1): p.1122. local, 2018.

PEDEZZI, R. Prospecção de enzimas no fungo *Purpureocillium lilacinum* utilizando as técnicas de proteoma: produção recombinante de enzimas com potencial biotecnológico e avaliação de antifúngicos. Universidade de São Paulo (Dissertação de doutorado), 2019.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955), da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). *Revista da Faculdade de Letras: História Porto*, 6(3):p.129-151. Porto, 2005. Disponível em: <https://ojs.letras.up.pt/index.php/historia/article/view/3787>.

PEREIRA, F. D. M.; CAMARGO, R. C. R., LOPES, M. D. R. Contaminação do mel por presença de *Clostridium botulinum*. Embrapa Meio-Norte-Documentos (INFOTECA-E). Teresina, 2007.

ROLDÃO, Y. S. Termorregulação colonial e a influência da temperatura no desenvolvimento da cria em abelhas sem ferrão, *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2011.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M. A.; SILVA, J. O.; TEIXEIRA, A. C. P.; MARINI, M. M.; ANTONINI, Y.; MARTINS, R. P. Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research*, 4(3): p.271-275p. local, 2003.

ROUBIK, D. W. *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge University Press, p.514. Cambridge, 1992.

- ROZEN, D. E. The bee microbiota as a barrier against disease. *Journal of Experimental Biology*, 220(13): p.2299-2299, 2017.
- SANTOS, C. G. D.; SANTOS, K. C. D.; TIRELLI, F. P.; & BLOCHTEIN, B. Caracterização sazonal de acúmulos isolados de própolis em colônias de *Plebeia emerina* (Hymenoptera, Apidae) no sul do Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, 99(2): p.200-203. Porto Alegre, 2009.
- SILVA, A. G. M. D. Efeito do aumento da temperatura sobre a atividade colonial de abelhas sem ferrão na Caatinga (*Melipona subnitida*). Mossoró, 2017.
- SILVA, W. P.; PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. *Natureza online*, 10(3): p.146-152. local 2012. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br>
- SIQUEIRA, E. L.; MARTINES, R. B.; & NOQUEIRA-FERREIRA, F. H. Ninhos de abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Meliponina) em uma região do Rio Araguari, Araguari-MG. *Bioscience Journal*, 23. Local, 2007.
- SLAA, E. J.; CHAVES, L. A. S.; MALAGODI-BRAGA, K. S.; HOFSTEDE, F. E. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37 (2): p.293-315. Local, 2006.
- SMITH, E.A.; VUONG, H.Q; MILLER, D.L.; PARÓQUIA, A.J.; MCFREDERICK, Q.S.; NEWTON, I.L. Sequências genômicas preliminares de quatro *Saccharibacter* sp. Estirpes isoladas de abelhas nativas. *Anúncios de Recursos de Microbiologia*, 9(10). Local, 2020.
- SOUZA, B. D. A.; ALVES, R. M. D. O. & CARVALHO, C. A. L. D. Diagnóstico da arquitetura de ninho de *Oxytrigona tataira* (Smith, 1863) (Hymenoptera: Meliponinae). *Biota Neotropica*, 7(2). Campinas, 2007.
- SOUZA, B.D.A.; MARCHINI, L. C.; DIAS, C.T.D.S.; ODA-SOUZA, M.; CARVALHO, C.A.L.D.; ALVES, R.M.D.O. Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(4): 798-802. Campinas, 2009.

STRASSMANN, J. E.; QUELLER, D. C. The social organism: congresses, parties, and committees. *Evolution: International Journal of Organic*, 64(3): p.605-616. Local, 2010.

TIAGO, M. R. M. Microbiota fúngica cultivável associada às colmeias e castas de *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra* (Apidae, Meliponini). Universidade Federal do Amazonas (Dissertação de mestrado), 2017.

VELTHUIS, H. H.; KOEDAM, D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The males of *Melipona* and other stingless bees, and their mothers. *Apidologie*, 36(2): p.169-185. Local, 2005.

VENTURIERI, G. C. Criação de abelhas indígenas sem ferrão. Embrapa Amazônia Oriental, Ed. 2, p.62. Belém, 2008.

VIANA, J. L.; SOUSA, H. D. A. C.; ALVES, R. M. D. O.; PEREIRA, D. G.; SILVA JR, J. C.; PAIXÃO, J. F. D.; WALDSCHMIDT, A. M. Bionomics of *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) in relation to its nesting behavior. *Biota Neotropica*, 15(3): e20140097. Campinas, 2015.

VILLAS-BÔAS, J. Manual tecnológico: mel de abelhas sem ferrão. Ed. 1, p.100, ISPN. Brasília, 2012.

WANG, X. W.; HOUBRAKEN, J.; GROENEWALD, J. Z.; MEIJER, M.; ANDERSEN, B.; NIELSEN, K. F. & SAMSON, R. A. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and *Chaetomium*-like fungi from indoor environments. *Studies in Mycology*, 84, p.145-224. local, 2016.

WHEELER, W. M. Colonies of ants (*Lasius neoniger* Emery) infested with *Laboulbenia formicarum* Thaxter. *Psyche: A Journal of Entomology*, 17(3): p.83-86. Harvard University, 1910.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration*, 24(5): p.438-450. Local, 2001.

X.W. Wang, J. Houbraken, J.Z. Groenewald, M. Meijer, B. Andersen, K.F. Nielsen, P.W. Crous, R.A. Samson. (2016). Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and chaetomium-like fungi from indoor environments. *Studies in Mycology*, 84, p.145-224.

ZANELLA, F.C.V.; MARTINS, C.F. Abelhas da Caatinga: biogeografia, ecologia e conservação. *Ecologia e conservação da Caatinga*, p.75-134. Local, 2003.

ZHANG, Q.; LI, H. Q.; ZONG, S. C.; GAO, J. M.; & ZHANG, A. L. Chemical and bioactive diversities of the genus *Chaetomium* secondary metabolites. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12(2): p.127-148. Local, 2012.