

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,
CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA – PPG GCBEV

Abelhas Melipona: fungos cultiváveis do alimento larval e sua participação
na destinação das castas

LUANA EVILLYN VINENTE DE QUEIROZ

Manaus,
Amazonas
Outubro/2023

Luana Evillyn Vinente de Queiroz

Abelhas Melipona: fungos cultiváveis do alimento larval e sua participação
na destinação das castas

Orientadora: Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse

Coorientador: Dr. João Vicente Braga de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Financiamento do Projeto: PPI-INPA/MCTI; PRJ-016/2018

Bolsa: CNPq

Manaus,
Amazonas
Outubro/2023

Abelhas Melipona: fungos cultiváveis do alimento larval e sua participação
na destinação das castas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira - UFU

Profa. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes - FIOCRUZ

Prof. Dr. Waldir Heinrichs Caldas - INPA



Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação



ATA DA DEFESA PÚBLICA DE MESTRADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA - PPG GCBEv

No dia 25 de outubro de 2023, às 14h00 (Horário Manaus), reuniu-se de modo online, a banca examinadora da DEFESA PÚBLICA DE MESTRADO, composta pelos seguintes doutores, membros titulares: Carlos Ueira; Ormezinda Celeste Cristo Fernandes e Waldir Heinrichs Caldas, tendo como membros suplentes: Italo Thiago Silveira Rocha Matos e Gemilson Soares Pontes, a fim de proceder à arguição da defesa pública de mestrado da estudante Luana Evillyn Vinente de Queiroz, intitulada: **"Abelhas *Melipona*: fungos cultiváveis do alimento larval e sua participação na destinação das castas"**. O estudo foi conduzido sob a orientação da Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse e coorientação do Dr. João Vicente Braga de Souza, ambos do INPA.

Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da banca julgadora, tendo recebido o conceito final:

() Aprovada por maioria () Reprovado
(X) Aprovada por unanimidade

Menção:

() Aprovada com "Distinção" (X) Aprovada com "Distinção e Louvor"

A ata foi lavrada e assinada pelos Doutores, membros presentes da Banca Julgadora.

BANCA JULGADORA

TITULARES	ASSINATURAS
Carlos Ueira-Vieira - UFU	Documento assinado digitalmente  CARLOS UEIRA VIEIRA Data: 20/10/2023 06:23:02-0500 Verifique em https://validar.br.gov.br/
Ormezinda Celeste Cristo Fernandes - FIOCRUZ	Documento assinado digitalmente  ORMEZINDA CELESTE CRISTO FERNANDES Data: 25/10/2023 14:02:19-0100 Verifique em https://validar.br.gov.br/
Waldir Heinrichs Caldas - INPA	Documento assinado digitalmente  WALDIR HEINRICHS CALDAS Data: 25/10/2023 14:05:19-0100 Verifique em https://validar.br.gov.br/
SUPLENTES	
Italo Thiago Silveira Rocha Matos - UFAM	
Gemilson Soares Pontes - INPA	



ELIANA FELDBERG, Dra.

Coord. Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e
Biologia Evolutiva - PPG GCBEv.
PO, Nº 162 - 23.08.2021 - INPA/MCTI



Esta Ata não tem efeito de conclusão de curso ou diplomação do estudante. Conforme Regulamento PPG GCBEv Art. 62 "Será conferido ao discente o título de MESTRE ou DOUTOR em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, desde que cumpridas as exigências das Agências de fomento, dos regulamentos do PPG-INPA e do PPG GCBEv. Para obtenção do título, o estudante deve cumprir, ainda, o exigido nos Arts. 62 ao 65 do Regulamento Geral do INPA e Arts. 61 e 64 do Regulamento PPG GCBEv.

Catalogação na Publicação (CIP-Brasil)

Q3a Queiroz, Luana ▼

Abelhas Melipona: fungos cultiváveis do alimento larval e sua participação na destinação das castas / Luana Evillyn Vinente de Queiroz; orientadora Gislene Almeida Carvalho-Zilse; coorientador João Vicente Braga de Souza. - Manaus: [s.l.], 2023.

18,2 MB

62p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2023.

1. Abelhas melipona. 2. Fungos. 3. Alimento larval. I. Carvalho-Zilse, Gislene Almeida. II. Souza, João Vicente Braga de. III. Título

CDD 595.799

DEDICATÓRIA

Aos **meus Pais**, que se dedicaram e se sacrificaram por minha vida profissional, por terem sido meus apoiadores desde a infância, me orientando através de uma sólida educação e uma forte disciplina. Aos **meus irmãos** que amo incondicionalmente, e muitas vezes foram os meus grandes companheiros durante toda a minha trajetória de vida e hoje fazem parte desta história.

Ao **meu companheiro Rinne**, por ser o meu maior apoiador no âmbito científico, sempre me ajudando ao máximo, compartilhando das minhas conquistas com fervor e me animando nos momentos difíceis, demonstrando um amor verdadeiro que fortalece os nossos laços e a nossa aliança a cada dia. Que a nossa união seja para todo sempre. Amo muito você!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse, por sua clareza científica e por todos os ensinamentos que contribuíram significativamente para a conclusão desde Mestrado.

Ao meu coorientador Dr. João Vicente Braga de Souza, que foi imensamente generoso em disponibilizar a infraestrutura necessária para o desenvolvimento do trabalho além de suas contribuições científicas.

Agradeço também a todos os colegas do laboratório de Micologia que me ajudaram da forma como lhes foi possível, principalmente ao Juan Diego por toda a sua calma e disponibilidade.

Aos meus caros colegas do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA) que ao longo desta jornada me apoiaram e ajudaram fortemente. Ao colega Gabriel Garcês por nunca me deixar na mão. Ao técnico Diego Albuquerque, que me acompanhou em todas as coletas no Meliponário e sempre foi uma pessoa acessível e disposta para ajudar. Ao colega Michael Rubem que compartilhou de seus recursos e sempre contribuiu cientificamente para a melhora do trabalho. Ao colega Douglas Campos, pela grande amizade que sempre geram boas discussões e incentivos. A todos os demais que compõem o GPA que sempre foram muito solícitos, me tratando com respeito e simpatia.

Ao meu grande amigo Esteban Koch a qual a amizade floresceu durante o mestrado e a qual levarei para o resto da vida, amo você amigo.

Ao INPA e PPG GCBEv pelo apoio estrutural e logístico.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) – POSGRAD.

“Só o conhecimento liberta.”
(Karen Soarele, A Deusa no Labirinto)

RESUMO

A abelha amazônica *Melipona interrupta* da tribo Meliponini possui destacada importância no ecossistema como polinizadora e produtora de mel e está associada a uma grande variedade de microrganismos, uma vez que as colmeias fornecem microambientes adequados para o pleno desenvolvimento destes. A presente pesquisa investigou a presença e identificou, morfológica e molecularmente, os fungos cultiváveis mais frequentes isolados do alimento larval de células naturais de cria e testou sua influência na produção de rainhas após sua inoculação no alimento larval em células artificiais de criação de abelhas *Melipona (Melikerria) interrupta* Latreille, 1811. Para isso foram monitoradas diariamente 1656 células naturais de cria (distribuídas em 20 discos de cria de 20 colmeias), por detecção visual e sob estereomicroscópio, quanto ao completo desenvolvimento dos imaturos e segregação das castas que demonstrou uma massiva produção de rainhas (> 22%) em todos os meses do ano, no entanto, sem ultrapassar o limite genético esperado de 25%. Foi observada a presença de micélios fúngicos sobre o conteúdo alimentar em todas as células de cria os quais são consumidos pelos imaturos em desenvolvimento. A partir de diluição decimal seriada do conteúdo larval de células de cria naturais com 1, 8 e 15 dias após postura da rainha foi realizado o isolamento dos fungos estabelecendo as frequências de Unidades Formadoras de Colônias. Com base em análise morfológica de 10 morfotipos fúngicos encontrados foi possível distinguir quatro gêneros sendo *Oidiodendron* sp. e *Cladosporium* sp. menos frequentes e outros dois gêneros mais frequentes confirmados por identificação molecular das sequências das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e D1/D2 26S do rRNA, *Fomitopsis* sp. (FAB = 95; FRE% = 58) e *Zygosaccharomyces* sp. (FAB = 35; FRE% = 21), cujas sequências confirmaram proximidade filogenética com sequências destas taxa disponíveis em bancos de dados. Os fungos mais frequentes foram inoculados no alimento larval de 360 larvas, em condições de criação artificial, gerando uma segregação esperada de até 25%, mostrando serem importantes fontes de alimento para as larvas e sua sobrevivência. Especialmente *Zygosaccharomyces* sp. se mostrou valioso para a viabilidade do desenvolvimento larval, diminuindo a mortalidade e produzindo rainhas em níveis equivalentes às condições naturais.

Palavras-chave: Rainha, segregação, *Zygosaccharomyces*, alimento larval, *Melipona interrupta*.

ABSTRACT

The Amazonian bee *Melipona interrupta* from the tribe Meliponini holds a prominent role in the ecosystem as a pollinator and honey producer, being associated with a wide range of microorganisms, as the hives provide suitable microenvironments for their full development. This research investigated the presence and identified, morphologically and molecularly, the most frequently isolated cultivable fungi from the larval food of natural brood cells and tested their influence on queen production after inoculation into the larval food in artificial brood cells of *Melipona (Melikerria) interrupta* Latreille, 1811. To achieve this, 1656 natural brood cells were daily monitored, through visual detection and under a stereomicroscope, regarding the complete development of the immatures and caste segregation, which demonstrated a massive queen production in all months of the year, however, without exceeding the expected genetic limit of 25%. The presence of fungal mycelium was observed on the food content in all brood cells, which are consumed by the developing immatures. Through decimal serial dilution of the larval content from natural brood cells with 1, 8, and 15 days after queen oviposition, fungi isolation was performed, establishing the frequencies of Colony-Forming Units. Based on morphological analysis of 10 fungal morphotypes, it was possible to distinguish four genera, with *Oidiodendron* sp. and *Cladosporium* sp. being less frequent, and another two more frequent genera confirmed by molecular identification of sequences from the ITS1-5.8S-ITS2 of rDNA and D1/D2 26S of rRNA, *Fomitopsis* sp. (FAB = 95; FRE% = 58) and *Zygosaccharomyces* sp. (FAB = 35; FRE% = 21), whose sequences confirmed phylogenetic proximity with sequences of these taxa available in databases. The most frequent fungi were inoculated into the larval food of 360 larvae, under artificial breeding conditions, generating an expected segregation of up to 25%, proving to be important food sources for the larvae and their survival. Especially, *Zygosaccharomyces* sp. proved to be valuable for the viability of larval development, reducing mortality and producing queens at levels equivalent to natural conditions.

Keywords: Queen, segregation, *Zygosaccharomyces*, larval food, *Melipona interrupta*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
OBJETIVOS	21
Geral.....	21
Específicos	21
MATERIAL E MÉTODOS	22
Monitoramento da segregação de castas em células de cria naturais de abelhas <i>M. interrupta</i>	24
Isolamento e cultivo dos fungos do conteúdo alimentar das larvas	24
Identificação macro e micromorfológica dos fungos do conteúdo alimentar	27
Identificação molecular dos fungos do conteúdo alimentar das larvas	27
Criação de larvas <i>M. interrupta</i> com conteúdo alimentar inoculado com fungo	28
Análise de dados	31
RESULTADOS	33
Monitoramento da segregação de castas em células de cria naturais de abelhas <i>M. interrupta</i>	33
Identificação morfológica e molecular dos isolados fúngicos a partir do conteúdo alimentar das células naturais de cria	37
Segregação de castas a partir de larvas de <i>M. interrupta</i> tratadas com inóculos de fungos adicionados ao conteúdo alimentar	44
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequências absoluta (FBA) e relativa (FRE%) de morfotipos de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (FF – Fungo filamentoso; LV - Levedura) cultivadas em meio BDA a partir do conteúdo alimentar de células naturais de cria de *Melipona interrupta* com 1, 8 e 15 dias após postura da rainha.....35

Tabela 2. Inferência taxonômica dos morfotipos fúngicos cultivados em meio BDA a partir do conteúdo alimentar de células naturais de cria de *Melipona interrupta* com 1, 8 e 15 dias após postura da rainha.....36

Tabela 3. Proporção de operárias e rainhas oriundas da criação em células artificiais, sob condições de laboratório, de larvas de *Melipona interrupta* nos grupos Controle (C1: alimento esterilizado sem inóculo e C2: alimento não esterilizado sem inóculo) e Tratamento (T1 - FO: alimento esterilizado + *Fomitopsis* sp.; T2 - FO: alimento não esterilizado + *Fomitopsis* sp.; T1 - ZS: alimento esterilizado + *Zygosaccharomyces* sp.; T2 - ZS: alimento não esterilizado + *Zygosaccharomyces* sp.)..... 45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Vista geral do Meliponário Científico do INPA, Campus I, Manaus-AM à esquerda, e estrutura interna de colmeia de *Melipona interrupta* com bom desenvolvimento e população, contendo disco de cria em postura ao centro.20
- Figura 2.** Fluxograma das etapas experimentais realizadas para cada objetivo específico... 21
- Figura 3.** Diluição decimal seriada do conteúdo alimentar (CA) de *Melipona interrupta* de células de cria após 1, 8 e 15 dias de postura da rainha, isolamento e sequenciamento das regiões ITS e D1/D2 dos fungos mais frequentes. C1, C2, C3 = colmeias 1, 2 e 3. 24
- Figura 4.** Esquematização experimental dos testes de criação de larvas *Melipona interrupta* com inóculos dos fungos cultiváveis mais frequentes isolados do conteúdo alimentar da célula de cria natural.28
- Gráfico 1.** Segregação de castas rainha e operária registradas em discos naturais de cria de *Melipona interrupta* mantidos em condições de laboratório durante o período de maio/2021 a junho/2022 oriundos de vinte colmeias do Meliponário Científico do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brasil.32
- Gráfico 2.** Mortalidade observada por estágio do desenvolvimento de abelhas *Melipona interrupta* em células naturais de cria mantidas em condições de laboratório. 32
- Figura 5.** Presença de micélios fúngicos (massa fúngica esbranquiçada) nas bordas internas de cada célula e sobre o alimento larval (indicada pelas setas vermelhas) observada em todas as células naturais de cria de *Melipona interrupta* desoperculadas, em condições de criação em laboratório. 33
- Figura 6.** Proliferação de massa fúngica, por detecção visual sob estereomicroscópio (4X), ao longo do desenvolvimento da cria de *Melipona interrupta*. (A) Ovo recém posto; (B) Ovo prestes a eclodir; (C) Larva L1; (D e E) Larva L2 (início / final); (F) Larva L3.34

Figura 7. *Oidiodendron* sp. isolado do conteúdo larval de *Melipona interrupta* do Meliponário GPA-INPA, Manaus-AM. À esquerda, estrutura filamentosa à vista ocular (A, B e C). À direita, oidióforos e hifas septadas, sob microscopia (D, E e F) (objetiva 1000X). 37

Figura 8. *Cladosporium* sp. isolado do conteúdo larval de *Melipona interrupta* do Meliponário GPA-INPA, Manaus-AM. À esquerda, estrutura filamentosa à vista ocular. À direita, estruturas microscópicas de hifas e conídios (objetiva 1000X). 38

Figura 9. Aparência morfológica do isolado mais frequente posteriormente identificado como *Fomitopsis* sp. (FF2) no conteúdo alimentar oriundo de células naturais de cria de colmeias de *Melipona interrupta* do Meliponário GPA-INPA/Manaus-AM, mantidas sob condições de laboratório. À esquerda, estrutura filamentosa à vista ocular. À direita, basidiósporo e hifas septadas, sob microscopia (objetiva 1000X). 38

Figura 10. Aparência morfológica da levedura *Zygosaccharomyces* sp. (LV9) isolada do conteúdo alimentar de células naturais de cria *Melipona interrupta* coletadas do Meliponário GPA-INPA/Manaus-AM e mantidas sob condições de laboratório. À esquerda, colônias em meio de cultura BDA, à vista ocular. À direita, pseudo-hifas, sob microscopia (objetiva 1000X). 39

Figura 11. Perfil de amplificação das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e D1/D2 do rRNA extraído dos isolados *Fomitopsis* sp. (FO) e *Zygosaccharomyces* sp. (ZS) a partir do conteúdo alimentar coletado de células de cria de *Melipona interrupta* do Meliponário GPA-INPA, Manaus-AM. Controle negativo, sem DNA (C-). Controle positivo com DNA de *Cryptococcus neoformans* (C+). M = Marcador Ladder 100pb (Invitrogen). 40

Figura 12. Árvore gerada pelo método neighbor-joining (NJ) construída para o marcador molecular espaçador transcrito interno (ITS) no software MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). As amostras dos fungos selecionados LV9 e FF2 (em vermelho) foram comparadas com sequências disponíveis no NCBI (em azul). *Rhizopus arrhizus* (NR.103595.1) foi usado como grupo externo. 41

Figura 13. Perfil morfológico, sob microscopia de crescimento de isolados fúngicos a partir do conteúdo alimentar de células naturais de cria de *Melipona interrupta* com 1 dia (A, B – objetiva 1000X), 8 dias (C, D – 1000X) e 15 dias (E, F – 400X) após postura da rainha. ... 42

Figura 14. Células artificiais de criação artificial (em microplaca tipo Elisa), em condições de laboratório contendo abelhas *Melipona interrupta* em estágio de pupa. M – macho; O – Operária; R – Rainha. 43

Gráfico 3. Proporção de operárias e rainhas nascidas (A) e número de mortes (B) a partir da criação em células artificiais, sob condições de laboratório, de larvas de *Melipona interrupta* nos grupos Controle (C1: alimento exposto à UV e sem inóculo e C2: alimento não exposto à UV o sem inóculo) e Tratamento (T1 - FO: alimento exposto à UV + *Fomitopsis* sp; T1 - ZS: alimento exposto à UV + *Zygosaccharomyces* sp.; T2 - FO: alimento não exposto à UV + *Fomitopsis* sp.; T2 - ZS: alimento não exposto à UV + *Zygosaccharomyces* sp.)..... 44

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

°C – Grau Celsius

μL – Microlitro

AL – Alimento larval

BDA – Agar Batata Dextrose

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

GPA – Grupo de Pesquisas em Abelhas

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

ITS – Internal Transcribed Spacer

L1–Larva de primeiro estágio

mL – Mililitro

NaCl – Cloreto de sódio

rDNA – DNA ribossomal

rpm – Rotações por minuto

rRNA – RNA ribossomal

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UFC/mL – Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

UR – Umidade relativa do ar

UV – Ultravioleta

INTRODUÇÃO

As abelhas são artrópodes da ordem Hymenoptera, em conjunto com as formigas e as vespas (Camargo e Pedro, 2013) e possuem como característica o costume de coletar pólen e néctar para produzir seus alimentos. Estas matérias primas são obtidas nas flores, o que promove a polinização das plantas tornando estes insetos essenciais para os ecossistemas (Carvalho-Zilse e Nunes-Silva, 2012). Dentre as abelhas, destacam-se as “sem ferrão”, que estão inseridas na subfamília Apinae, compondo a tribo Meliponini com 516 espécies (Rasmussen e Cameron, 2010). O gênero *Melipona* é o mais diverso possuindo 259 espécies presentes no Brasil das quais 128 ocorrem na Amazônia e possuem uma profunda relação com a vegetação nativa deste bioma (Moure e Kerr, 1950; Camargo e Pedro, 2013; Pedro 2014, Nogueira 2023).

As abelhas *Melipona* se destacam como boas produtoras de mel sendo comumente cultivadas na atividade de Meliponicultura (Carvalho-Zilse e Nunes-Silva, 2012, Carvalho-Zilse, 2013). Elas produzem o seu próprio alimento e armazenam em suas colmeias como fonte nutricional para imaturos e adultos. Os requisitos nutricionais necessários para que estes indivíduos se desenvolvam, cresçam e se reproduzam estão em torno de uma alimentação que contenha vitaminas, carboidratos, proteínas, minerais e água (Machado, 1971). Estes compostos são adquiridos no néctar (fonte de carboidratos) e no pólen (fonte de proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais), que proporcionam uma dieta equilibrada para esses seres (Penedo et al., 1976; Gilliam 1979; Hartfelder & Engels, 1989; Zerbo et al., 2001).

A coleta da matéria prima para a fabricação dos alimentos mel e pólen é feita diretamente das flores, sendo que as abelhas sugam o néctar com sua língua até o “papo”, se tratando de uma dilatação do intestino anterior do trato digestório da abelha, onde o néctar é guardado e transportado para a colmeia. Na colmeia, o néctar é entregue às outras operárias que promovem sua desidratação e o acumulam em potes de cerume. A desidratação se prolonga até atingir a concentração desejada de açúcar, se tornando o mel propriamente dito (Kerr et al., 1996; Nogueira-neto, 1997; Vit et al., 2012). Os grãos de pólen são coletados e transportados na tibia da perna posterior da abelha (corbícula) até a colmeia, onde são postos nos potes de cerume. A compactação do pólen é feita por meio de um procedimento onde a abelha o amassa com a cabeça e o manipula com as mandíbulas. Nesse processo são adicionadas as secreções das glândulas hipofaríngeas e mandibulares e, além disso, o próprio néctar pode ser regurgitado sobre o pólen manipulado (Nogueira-Neto, 1997). Uma

vez que o pote tem o seu volume completo, ele é fechado e armazenado por dias ou até semanas, garantindo uma fermentação adequada até formar uma pasta (pólen meliponícola), que é popularmente chamada de “saburá” (pólen maturado) nas regiões norte e nordeste do Brasil. O pólen maturado serve como alimento para as abelhas e tem grande importância como base do alimento larval (composta por pólen, néctar e secreções glandulares), garantindo a continuidade das gerações (Kerr et al., 1996; Nogueira-neto, 1997; Rebelo et al., 2016).

Além da qualidade nutricional disponível nestes alimentos, recentes pesquisas sugerem que as abelhas podem requerer ajuda para seu pleno desenvolvimento metabólico por meio de um possível mutualismo com fungos. Os fungos são seres vivos eucariontes que vivem em simbiose ou em vida parasitária com outros organismos. São, por isso, importantes para a sobrevivência de muitas espécies (Ribeiro et al. 2012). Portanto, durante as atividades de coleta de matéria prima e produção de alimentos para as necessidades da colmeia, fungos são transportados e mantidos pelas abelhas a ponto de promover benefícios às colmeias (Stuart et al. 2004; Tiago 2018; Souza et al. 2018).

Menezes (2010) sugere a possibilidade de indução *in vitro* do desenvolvimento de abelhas rainhas de *Scaptotrigona depilis* com a inoculação de fungos (não identificados) no alimento larval de imaturos, obtendo uma taxa de sucesso superior a 92%. Menezes et al. (2015) demonstraram que o desenvolvimento das abelhas sociais *Scaptotrigona depilis* pode ser influenciado pelo mutualismo com o fungo *Monascus ruber*, o qual foi encontrado no interior das células de cria com larvas que consumiam os micélios fúngicos antes de começarem a ingerir o alimento larval. Estes autores confirmaram tal mutualismo, em criação de larvas *in vitro*, onde a presença do fungo (identificado por morfologia e pela região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA nuclear 18S) elevou a taxa de sobrevivência dos indivíduos nestas condições para até 76%, colocando em perspectiva que os fungos podem fornecer às abelhas imaturas nutrientes e proteção contra patógenos.

As leveduras, por sua vez, possuem um papel metabolicamente ativo no processamento do pólen, contribuindo com a biodisponibilização de nutrientes do substrato vegetal através da secreção enzimática, atribuindo grande qualidade nutricional ao alimento das abelhas (Meireles, 2018). Seguindo esta abordagem, Paludo e colaboradores (2018) descobriram que o fungo que as larvas ingeriam, inicialmente identificado como *Monascus ruber*, era *Zygosaccharomyces* sp. (identificado por morfologia e pela região D1/D2 do RNA ribossomal 26S) que proporciona fontes de esteroides para a *S. depilis*, possuindo características osmofílicas e se desenvolvendo em meio de cultura específico, onde podem

ser identificados. Este fungo identificado como *Zygosaccharomyces* sp. foi encontrado também em ninhos de *Tetragona elongata* por Castro (2019). Este autor detectou fungos contendo vesículas lipídicas sendo consumidas pelas larvas das abelhas, dando ênfase a essa associação simbiótica e demonstrando a importância desse gênero de levedura associado às abelhas.

Uma diversidade de fungos, identificados tanto por técnicas moleculares quanto cultivo em meios de cultura, provenientes do alimento larval em células de cria foi registrada para as espécies de abelhas “sem-ferrão” *Melipona quadrifasciata*, *Melipona scutellaris*, *Tetragonisca angustula* e *Frieseomelitta varia* (Santos 2023). Não encontrando nenhuma cepa em comum para as quatro espécies de abelhas “sem-ferrão”.

Perante a possibilidade de indução do desenvolvimento de rainhas de abelhas sociais “sem-ferrão” na presença de fungos, em condições *in vitro*, reabre-se a linha de investigação sobre as abelhas sociais “sem-ferrão” do gênero *Melipona*. Isto porque o mecanismo de diferenciação das castas é diferentemente nos Meliponini. Enquanto na maioria dos demais gêneros (inclusive em *S. depilis*) existem células de cria especiais – denominadas realeiras, de onde nascem as rainhas – que recebem pelo menos o dobro da quantidade de alimento comparado às demais células de cria do ninho das quais nascerão operárias, em *Melipona*, todas as células possuem o mesmo tamanho e recebem quantidade e qualidade equivalentes de alimento. Portanto, para nascer rainha, estas devem possuir uma predisposição genética (Kerr 1950). Abelhas *Melipona* passam por três instares larvais: L1 (início da alimentação), L2 e L3 (final da alimentação), sendo que a diferenciação entre rainhas e operárias se dá no último instar larval (L3) após a finalização do consumo do alimento disponível na célula de cria (Bonetti, 2008). Kerr (1950) propôs que a diferenciação das castas em *Melipona* ocorre devido a um sistema genético-alimentar que depende de dois genes *xa* e *xb*. Quando estes genes apresentarem dupla heterozigosidade (xa^1xa^2/xb^1xb^2) as larvas se desenvolverão em rainhas se tiverem recebido alimentação suficiente, resultando na segregação de até 25% de rainhas. As larvas, mesmo duplo heterozigotas, que não receberem alimentação suficiente darão origem a operárias. Larvas homozigotas para um ou ambos os genes, mesmo suficientemente alimentadas, se tornarão operárias. Esta proposta foi confirmada por vários autores como Campos e Coelho (1993), Carvalho (2001), Hartfelder et al. (2006), Menezes et al. (2007), Bonetti (2008), Brito et al. (2015) e Schumann et al. (2019).

O destino das castas nas abelhas *Melipona*, portanto, é determinado geneticamente, mas a cascata gênica é influenciada por fatores ambientais, no caso, o alimento. Especialistas demonstram que as abelhas *Melipona* produzem rainhas quase o ano todo, contudo, havendo

uma pequena influência da disponibilidade de fontes de alimento devido à baixa floração – o que altera a porcentagem de produção de rainhas entre as larvas femininas - a segregação fenotípica favorece operárias, mas não se altera a condição genotípica entre as fêmeas, causando o efeito fenocópia - “rainha insuficientemente nutrida com fenótipo de operária” (Kerr et al., 1966; Maciel-Silva e Kerr, 1991; Hartfelder et al., 2006; Brito et al., 2013). Para *Melipona (Melikerria) interrupta* Latreille, 1811, Brito et al. (2013) registraram a produção de rainhas em todos os meses do ano, cuja segregação variou entre 2 a 16,8% de rainhas (média=10.3, desvio padrão = ± 4.07). A alta expressão do gene feminizante (*Mi-fem*) em associação com aplicação de hormônio juvenil (HJ) em larvas L3 de *Melipona interrupta* induz até 100% de rainhas (Brito et al. 2015). Além disso os níveis de transcritos *Mi-fem* em pupas e adultos recém-emergidos foram mais altos em rainhas do que em operárias e machos, acrescentando entendimento à diferenciação dos sexos e das castas neste gênero de abelhas.

Com base nestas prerrogativas, levanta-se a questão sobre a possível interferência de fungos na destinação das castas, uma vez que as colmeias fornecem microambientes adequados para o pleno desenvolvimento dos microrganismos. Tiago (2018) caracterizou a associação entre microrganismos e abelhas *Melipona*. Seus dados indicam a presença do fungo *Monascus* sobre alimento larval de *Melipona interrupta* em Manaus (AM), possibilitando novas perspectivas na pesquisa de interações microbianas e sua interferência na produção de rainhas destas abelhas.

O conhecimento da microbiota associada ao alimento larval de abelhas *Melipona* além de auxiliar no entendimento do processo de desenvolvimento de imaturos de abelhas, é essencial para esclarecer aspectos da manutenção populacional e crescimento das colmeias e, conseqüentemente, com implicações na sobrevivência e conservação dessas abelhas. Todas estas informações permitirão também o aprimoramento da produção e manipulação de rainhas de maneira a incrementar as técnicas de produtividade na Meliponicultura, entre outras colaborações científicas. Um estudo mais aprofundado de fungos associados a abelhas pode desencadear a prospecção de compostos biotecnológicos e de várias fontes de substâncias de interesse industrial, o conhecimento e aproveitamento desta possibilidade têm grande relevância, uma vez que compostos produzidos e derivados de microrganismos são menos danosos à natureza e possuem um custo menor (Fonseca, 2016).

Diante deste contexto e na perspectiva de estabelecer bases para o entendimento da microbiota associada a abelhas *Melipona* e, possivelmente à casta rainha, propusemos aqui investigar sobre a microbiota fúngica associada a abelha *Melipona interrupta* e sua relação genético-fisiológica às castas.

OBJETIVOS

Geral

Verificar a presença e identificar, morfológica e molecularmente, os fungos cultiváveis mais frequentes isolados do alimento larval de células naturais de cria e testar sua influência na produção de rainhas após sua inoculação no alimento larval em células artificiais de criação de abelhas *Melipona (Melikerria) interrupta* Latreille, 1811.

Específicos

- Monitorar a segregação das castas e a presença de massa fúngica em células naturais de cria ao longo do tempo de desenvolvimento dos imaturos;
- Isolar e identificar, morfológica e molecularmente, os fungos cultiváveis mais frequentes presentes no alimento larval das células naturais de cria em diferentes dias após postura;
- Analisar a segregação de castas a partir de larvas criadas *in vitro* com alimento larval inoculado com os fungos isolados mais frequentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados com material biológico (alimento larval de células contendo ovos ou larvas) obtido de trinta e quatro colmeias de *Melipona interrupta* (Figura 1) saudáveis, com bom desenvolvimento e número populacional, mantidas em caixas padronizadas INPA no Meliponário Científico do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brasil.



Figura 1. Vista geral do Meliponário Científico do INPA, Campus I, Manaus-AM à esquerda, e estrutura interna de colmeia de *Melipona interrupta* com bom desenvolvimento e população, contendo disco de cria em postura ao centro.

As principais etapas experimentais deste estudo estão sumarizadas no fluxograma que se segue (Figura 2).

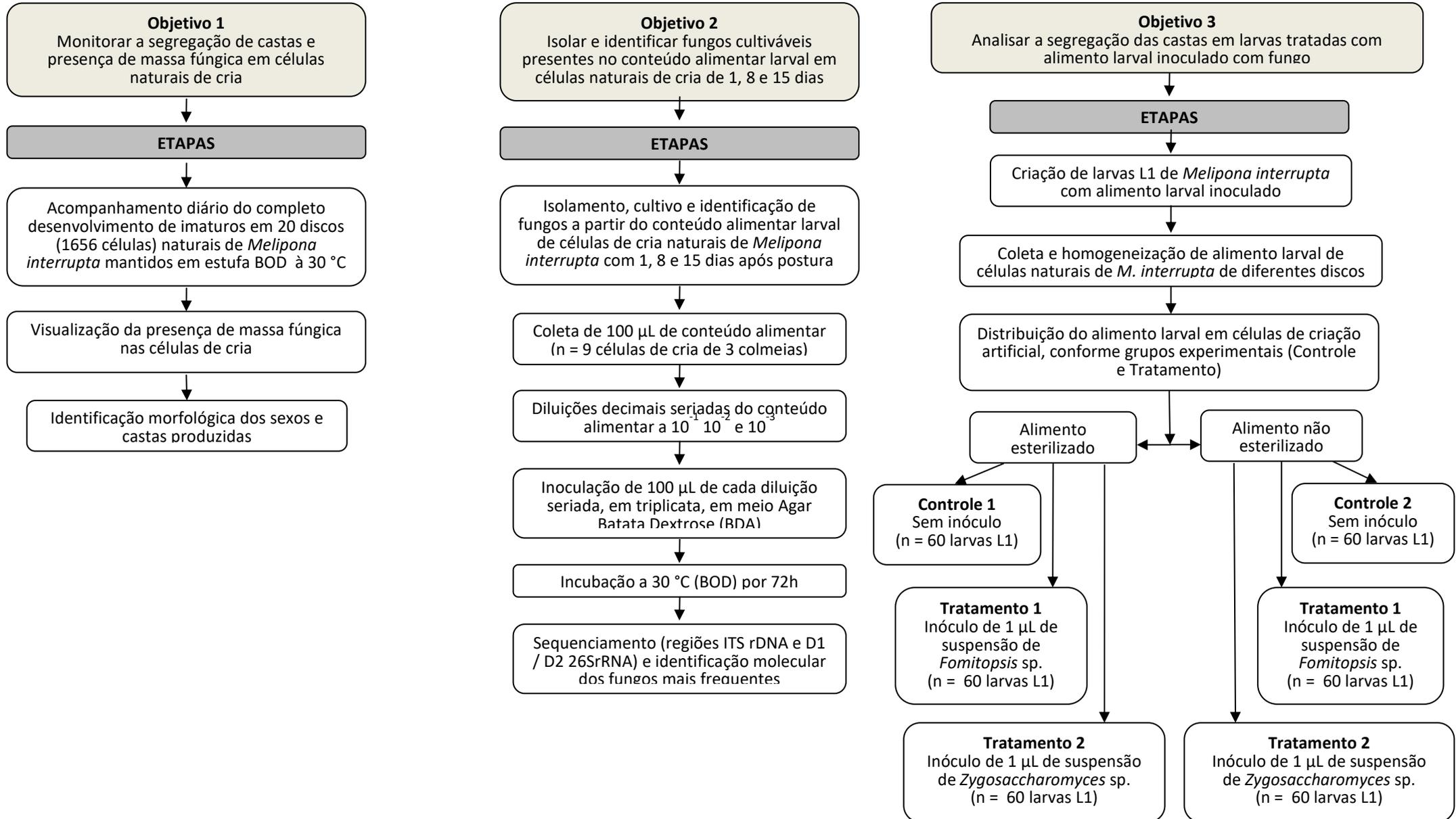


Figura 2. Fluxograma das etapas experimentais realizadas para cada objetivo específico.

Monitoramento da segregação de castas em células de cria naturais de abelhas *M. interrupta*

Para analisar as castas produzidas foram monitoradas 1656 células naturais de cria dispostas em 20 discos (com 33 a 124 células/disco) coletados no período de maio/2021 a junho/2022, aleatoriamente, de 20 colmeias diferentes. Os discos foram monitorados diariamente durante todo o ciclo de desenvolvimento dos imaturos (desde ovo até adulto recém-emergido). Foram usadas as metodologias de Winston e Bates (1960) e Menezes (2010) para os procedimentos de manutenção dos discos de cria em estufa. Assim, os discos foram previamente expostos à luz ultravioleta em cabine de segurança biológica durante 15 minutos para reduzir a possível microbiota externa dos discos de cria. Posteriormente, as células de cria foram desoperculadas, para verificar sob estereomicroscópio Zeiss (aumento de 4X), diariamente, a presença ou não de micélios fúngicos (massa fúngica esbranquiçada sobre o alimento larval) em todo o período de desenvolvimento. Os discos foram mantidos em placas de Petri alojadas em vasilhames plásticos, hermeticamente fechados, e com lâmina de água no fundo para a obtenção de 100% de umidade relativa do ar (UR) nos três primeiros dias de desenvolvimento larval. Em seguida, para acompanhar o desenvolvimento das larvas e registrar a segregação das castas, as placas de Petri foram transferidas para um novo recipiente, contendo um becker com 50 mL de solução saturada KCl para manter 85%UR nos próximos cinco dias de larva. Posteriormente, o becker foi trocado por outro contendo 50 mL solução saturada NaCl para manter 75% UR até o final do desenvolvimento (aproximadamente 39 dias). A incubação foi realizada em estufa BOD a 30°C. O acompanhamento do desenvolvimento larval e pupal das abelhas foi feito diariamente, sendo cada célula de cria representada e organizada em planilha.

Isolamento e cultivo dos fungos do conteúdo alimentar das larvas

A fim de analisar os fungos cultiváveis presentes no conteúdo alimentar (massa fúngica + alimento larval), realizou-se a análise quantitativa e qualitativa de fungos presentes no conteúdo alimentar após um, oito e quinze dias da realização da postura da rainha. Três colmeias saudáveis, foram acompanhadas diariamente durante 15 dias registrando-se as células e seus respectivos tempos a partir da postura da rainha de modo a mapear e amostrar células de cria (em triplicata) com respectivamente, 1, 8 e 15 dias de postura. Tais tempos foram estabelecidos a fim de monitorar, especialmente, os estágios iniciais de alimentação dos imaturos (Larva 1 e Larva 2) em decorrência do período estimado de desenvolvimento

de imaturos de *M. interrupta*: $6,3 \pm 2,7$ dias para ovo; $5,0 \pm 1,1$ para Larva 1; $7,0 \pm 1,1$ para Larva 2; $14,4 \pm 3,7$ para Larva 3 (Nunes, 2008). Ao 15º dia, os três discos foram coletados e expostos à luz ultravioleta em cabine de segurança biológica durante 15 minutos para minimizar a possível microbiota presente na superfície do disco de cria. Em seguida, as células foram desoperculadas e retirados o ovo ou a larva L1 usando pinça esterilizada. A massa fúngica e o alimento larval (conteúdo alimentar) foram homogeneizados com pipeta, através de pipetagem retirou-se um volume de 100 µL do conteúdo alimentar de cada célula de cria, conforme tempos após postura (1, 8 ou 15 dias), diluiu-se em microtubo individual contendo 900 µL de água destilada estéril, sequencialmente, a fim de obter as diluições decimais seriadas de 10^{-1} 10^{-2} e 10^{-3} (Figura 3). Os microtubos foram agitados em vortex e, seguidamente, 100 µL de cada diluição foi semeado em placas de petri contendo meio Agar Batata Dextrose (BDA) resultando em um total de nove (09) placas para cada disco estudado (triplicata por diluição). As placas inoculadas foram incubadas a 30 °C em estufa BOD e acompanhadas durante o crescimento microbiano por 72h. Após o crescimento das colônias, os morfotipos foram analisados e contados de acordo com as suas características. Em seguida, procedeu-se a purificação das colônias por esgotamento, onde a amostra é depositada na superfície do ágar já solidificado e, a seguir, uniformemente espalhada. As colônias isoladas foram mantidas em meio de cultura Agar Batata Dextrose (BDA) durante todo o estudo.

Toda a manipulação experimental foi realizada sob condições de assepsia em câmara de fluxo laminar. Para fins de preservação, os fungos foram mantidos em água destilada para o devido estoque conforme método de Castellani (Rodrigues et al.1992).

Paralelamente, a fim de analisar as características das células fúngicas presentes no conteúdo alimentar 10 µL do conteúdo de cada uma das células de cria foram pipetadas em lâmina para serem observadas sob microscópio Axios Kop 40 (Zeiss, Germany).

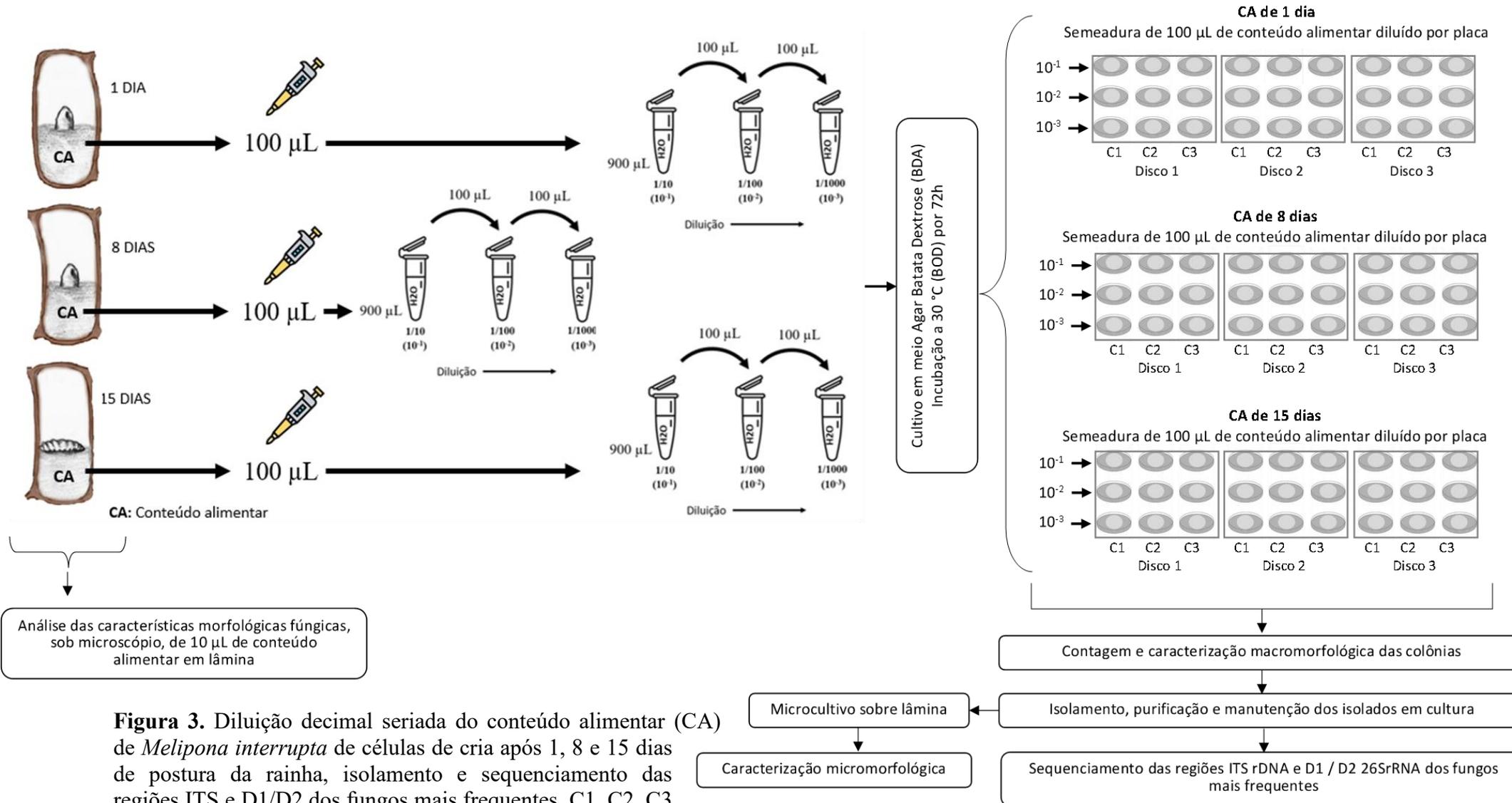


Figura 3. Diluição decimal seriada do conteúdo alimentar (CA) de *Melipona interrupta* de células de cria após 1, 8 e 15 dias de postura da rainha, isolamento e sequenciamento das regiões ITS e D1/D2 dos fungos mais frequentes. C1, C2, C3 = colmeias 1, 2 e 3.

Identificação macro e micromorfológica dos fungos do conteúdo alimentar

As colônias isoladas e purificadas, foram submetidas ao microcultivo sobre lâmina, de acordo com o método de Riddell (1950), que consiste em transferir um fragmento da colônia fúngica para um bloco de meio sólido, que se encontra sobre uma lâmina de microscopia dentro de uma placa de petri, em seguida, o bloco de meio foi coberto com uma lamínula e incubado por sete dias (Corabi-Adell et al. 2003). Após este período as estruturas fúngicas foram coradas com azul de lactofenol e submetidas à análise microscópica em microscópio AxiosKop 40 (Zeiss, Germany). Para identificação dos fungos quanto à macromorfologia foram considerados aspectos de coloração e formado das colônias com base em avaliação a olho nu das amostras presentes em placas de petri. Para ambas as análises micro e macromorfológicas foram utilizadas as chaves de identificação de Banertt e Hunter (1972) e Seifert et al. (2011).

Identificação molecular dos fungos do conteúdo alimentar das larvas

Para identificação microbiana dos isolados do conteúdo alimentar foram utilizadas as regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA correspondente ao ITS1 - 5.8S - ITS2 e D1 / D2 do 26SrRNA.

Inicialmente, realizou-se a extração de DNA fúngico seguindo o protocolo de Ferrer et al. (2011), com modificações, a saber: fragmentos dos fungos crescidos em placas de Petri após 72 horas à 30 °C (Lacaz et al. 2002) foram transferidos com auxílio de alça microbiológica para microtubos (2 mL) contendo 300 µL de tampão de lise e mantidos à -70 °C por 30 minutos, em seguida, aquecidos a 100 °C por 15 minutos. Adicionou-se 20 µL de Proteinase K a cada microtubo, os quais foram agitados em termobloco por 30 minutos a 56°C. Foram adicionados 500µL de fenol:clorofórmio:álcoolisoamílico, procedeu-se a agitação em vórtex por 1 minuto para a homogeneização da suspensão, seguida de 30 minutos em agitador orbital à 100 rpm e centrifugação à 13.500 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo (1,5 mL) e, para fins de precipitação do DNA, adicionou-se 500 µL de álcool isopropílico (isopropanol) à -20°C com homogeneização delicada por inversão do microtubo. Seguidamente, realizou-se centrifugação à 13.500 rpm por 5 minutos com sequente descarte do isopropanol, passando por duas lavagens com etanol 70%, sendo centrifugado a 13.500 rpm por 5 minutos para precipitação do pellet, e o restante do etanol retirado por evaporação condicionados a termobloco por 30 minutos a 56°C. Para ressuspensão do pellet, 100 µL do tampão de eluição foram adicionados aos tubos, os quais foram agitados ligeiramente em vortex e,

finalmente, mantidos em freezer a -20°C.

A região ITS do rDNA foi amplificada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase – PCR utilizando-se os primers ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') incluindo o gene 5,8S, conforme protocolo de White et al. (1990) nas seguintes condições: para um volume final de 30 µL usou-se 20ng de DNA fúngico, 0,5 µM de cada primer, 1,5 U *Taq* DNA polimerase, 200 µM de dNTPs, 2mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), tampão da enzima Taq 1X e o volume completado com água ultrapura (miliQ). As amostras foram levadas ao termociclador programado para um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação do DNA a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 53 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto; seguidos de 1 ciclo de extensão final a 72 °C durante 10 minutos, concluindo a PCR.

Para amplificação da região D1/D2 do gene 28S foram usados os primers universais NL1GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') e LS2 (5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3' (Invitrogen®) conforme protocolo de Cocolin-Bisson e Mills (2000), nas seguintes condições: o volume final de cada reação de amplificação foi de 30 µL, onde foram adicionados 20ng de DNA fúngico, 0,5 µM de cada primer, 1,5 U *Taq* DNA polimerase, 200 µM de dNTPs, 2mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), tampão da enzima Taq 1X e o volume completado com água ultrapura (miliQ). As amostras foram levadas ao termociclador com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, 30 ciclos a 94 °C por 35 segundos, 60 °C por 60 segundos e 72 °C por 75 segundos, seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1.0 % em tampão TEB 1X, a 100 V por cerca de 20 minutos. O gel foi corado com solução de SyberGreen® 3µL/100 mL e visualizado em transiluminador (Kasvi) sob luz ultravioleta. Para a purificação foi usada uma solução de polietilenoglicol-PEG de acordo com o descrito por Dunn e Blattner (1987).

Os fragmentos amplificados foram enviados para sequenciamento pelo método de Sanger junto a empresa ACTGene (Rio Grande do Sul, Brasil). As sequencias recebidas foram analisadas por ferramentas de bioinformática.

Criação de larvas *M. interrupta* com conteúdo alimentar inoculado com fungo

Com as duas espécies de fungos cultiváveis mais frequentes no conteúdo alimentar larval em células de cria natural, isoladas de células de cria com 1, 8 e 15 dias e identificadas

com base nas sequencias ITS e D1/D2, a saber Fungo 1 - *Fomitopsis* sp. e Fungo 2 – *Zygosaccharomyces* sp., iniciou-se os testes de inoculação destes para criação em laboratório de larvas L1 de abelhas *M. interrupta* a fim de verificar a segregação de castas decorrente. Para isto, foram preparados grupos controle e tratamento para cada um dos fungos (Figura 4), a saber:

- Grupo controle 1: formado com 60 larvas L1 que receberam 156µL de alimento larval homogeneizado e, previamente, exposto à luz UV durante 30 minutos;
- Grupo controle 2: formado com 60 larvas L1 que receberam 156µL de alimento larval homogeneizado (sem prévia exposição à luz UV);
- Grupo tratamento 1: formado com 60 larvas L1 que receberam 156µL de alimento larval homogeneizado e, previamente, exposto à luz UV durante 30 minutos, inoculado com 1µL (aproximadamente 1×10^6 UFC/mL⁻¹) da suspensão do Fungo 1 – *Fomitopsis* sp.;
- Grupo tratamento 2: formado com 60 larvas L1 que receberam 156µL de alimento larval homogeneizado e, previamente, exposto à luz UV durante 30 minutos, inoculado com 1µL (aproximadamente 1×10^6 UFC/mL⁻¹) da suspensão do Fungo 2 – *Zygosaccharomyces* sp.

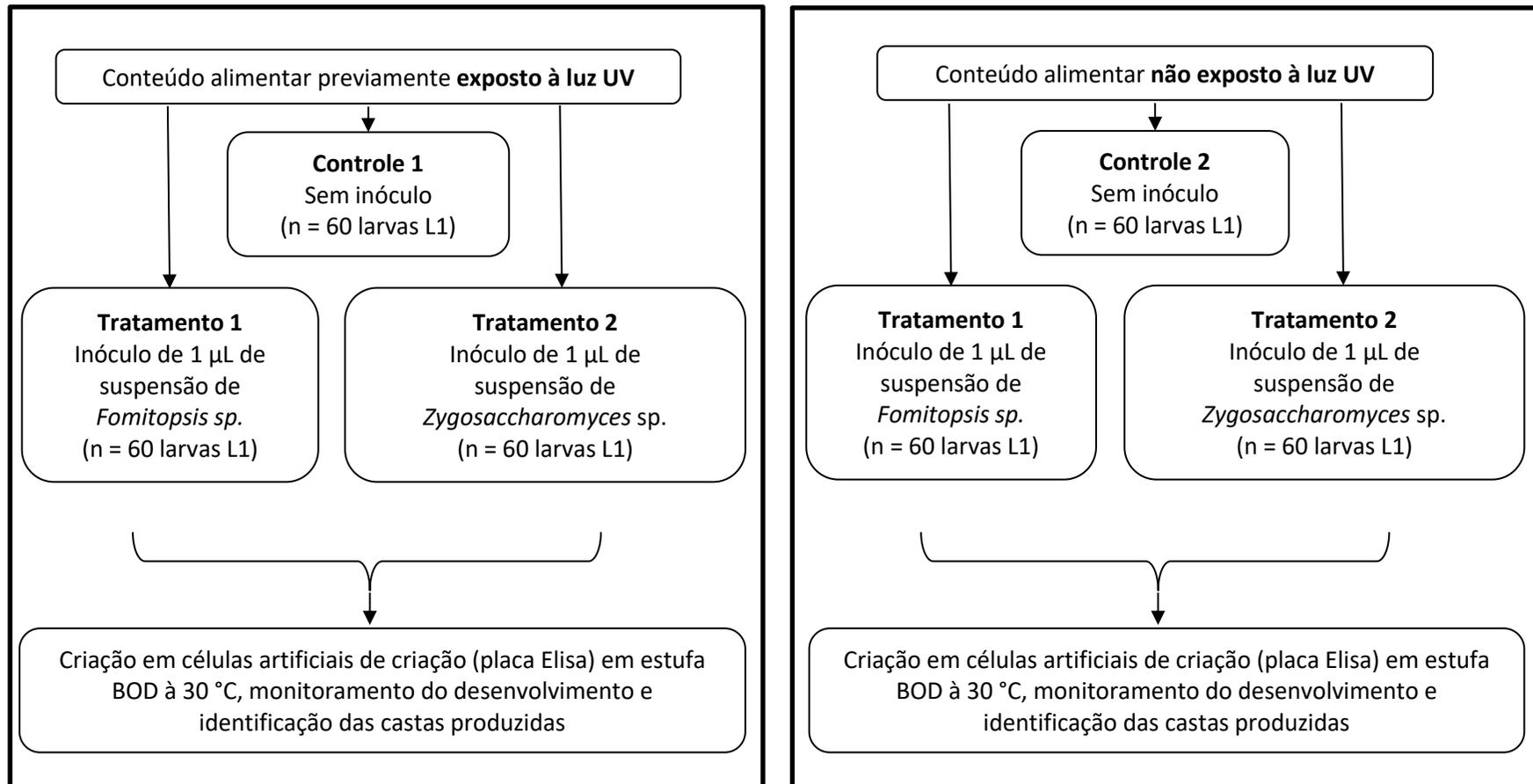


Figura 4. Esquemática experimental dos testes de criação de larvas *Melipona interrupta* com inóculos dos fungos cultiváveis mais frequentes isolados do conteúdo alimentar da célula de cria natural.

A criação das larvas *in vitro* baseou-se nos métodos de Camargo (1972), Menezes (2010) e Paludo et al. (2018). Previamente, em cabine de fluxo laminar, foram preparadas microplacas tipo Elisa esterilizadas, usadas como células artificiais de criação. Foram coletados discos de cria, com postura recente, de diferentes colmeias do GPA, em dias alternados, totalizando 11 discos dos quais foram obtidos o conteúdo alimentar larval e as larvas L1 usadas nos experimentos. Após coleta e antes da desoperculação das células de cria, cada disco foi exposto à luz UV por 15 minutos. As células de cria foram desoperculadas e os ovos retirados. O alimento larval foi, assepticamente, coletado das células de cria com auxílio de pipeta automática e ponteira estéril e transferido para tubo Falcon. Após homogeneização, foram distribuídos 156µL do alimento (quantidade média de alimento nas células naturais de cria de *M. interrupta*) por célula artificial de criação (poço da microplaca tipo Elisa) e seguiu-se a montagem dos grupos experimentais conforme descrito anteriormente.

Em seguida, larvas L1 obtidas de células naturais de cria foram transferidas para cada célula artificial de criação sendo cuidadosamente colocadas sobre o alimento larval com o auxílio de um alfinete estéril entomológico (dobrado na ponta). As células de criação artificial foram acondicionadas em pote plástico, hermeticamente fechado, armazenado em BOD à 30 °C até o desenvolvimento completo dos indivíduos. Tomou-se o cuidado de armazenar isoladamente as placas de cada grupo experimental. Para o controle da UR uma lâmina de água foi colocada no fundo do pote para a obtenção de 100% de umidade relativa do ar (UR) nos três primeiros dias de desenvolvimento larval. Em seguida, as células foram transferidas para um novo recipiente, contendo um becker com 50 mL de solução saturada KCl para manter 85% UR nos próximos cinco dias de larva. Posteriormente, o becker foi trocado por outro contendo 50 mL solução saturada NaCl para manter 75% UR até o estágio de Pupa. Diariamente foi realizado o acompanhamento visual do desenvolvimento das larvas para se verificar a casta produzida.

Análise de dados

Os dados relativos à segregação das castas produzidas em células naturais de cria foram organizados em tabelas. Posteriormente, a segregação de castas observada foi submetida à análise estatística pelo teste Qui-quadrado (Pearson, 1900), onde $X^2 = \sum \frac{(fo-fe)^2}{fe}$, usando-se como Frequência Esperada o nascimento de até 25% de rainhas,

conforme hipótese Kerr (1950).

Os morfotipos fúngicos observados após coleta do conteúdo alimentar correspondente a um, oito e quinze dias após a postura foram registrados em tabelas e as frequências absoluta e relativa (em porcentagem) de cada morfotipo foram estimadas.

As sequências de DNA dos fungos mais frequentes foram recebidas da empresa ACTGene (Rio Grande do Sul, Brasil) e analisadas com auxílio do programa Chromas para conferir a sua qualidade. Em seguida, por meio da ferramenta Blast, foram comparadas com a base de dados existentes no GenBank para inferência da identificação molecular dos fungos. Após edição das sequências, as espécies identificadas e sequenciadas com o primer Internal Transcribed Spacer (ITS), serviram de base para a construção da árvore filogenética.

RESULTADOS

Monitoramento da segregação de castas em células de cria naturais de abelhas *M. interrupta*

Do total de 1656 células de cria monitoradas 1117 abelhas fêmeas (76,14%) e 350 machos (23,86%) atingiram a estágio de pupa, a partir do qual é possível a identificação dos sexos e castas produzidas, e todos completaram o seu desenvolvimento até adulto recém-emergido.

O tempo estimado de desenvolvimento dos indivíduos em suas células naturais de cria mantidas em laboratório foi de 39 dias sendo ± 5 dias para ovo, ± 2 dias para L1, ± 2 dias para L2, ± 3 dias para L3, ± 4 dias para LPD, ± 7 dias para LD e ± 8 dias para pupa.

O número de machos variou entre 20 a 26% dos nascimentos, o número de fêmeas ficou entre 74 e 80%, dentre as quais o máximo de produção de rainhas foi de 25% e o mínimo de 22% (Gráfico 1). Registrou-se a produção expressiva de rainhas em todos os meses do período analisado e em todas as colmeias dentro da proporção esperada de 3 operárias: 1 rainha proposta por Kerr (1950), nenhum valor de χ^2 foi significativo.

A mortalidade observada foi distribuída ao longo do desenvolvimento dos indivíduos nos estágios de ovo, larva (L1 – larva de 1º instar; L2 – 2º instar; L3 – 3º instar, que se subdivide os estádios L3.3 – 3º instar em final de alimentação, LPD – 3º instar pré-defecante/fiação de casulo e LD – 3º instar defecante) e pupa (Brito et al. 2015), com maiores índices registrados para larva (L1 a LD), pupa e ovo, respectivamente (Gráfico 2).

Os maiores índices de mortalidade de indivíduos se deram nos meses de junho (18,07%), julho (17,89%) e agosto (19,39%) de 2022 e maio (18,33%) de 2023. No entanto, todos os valores foram menores do que a porcentagem esperada de até 25% de rainhas, validando os resultados.

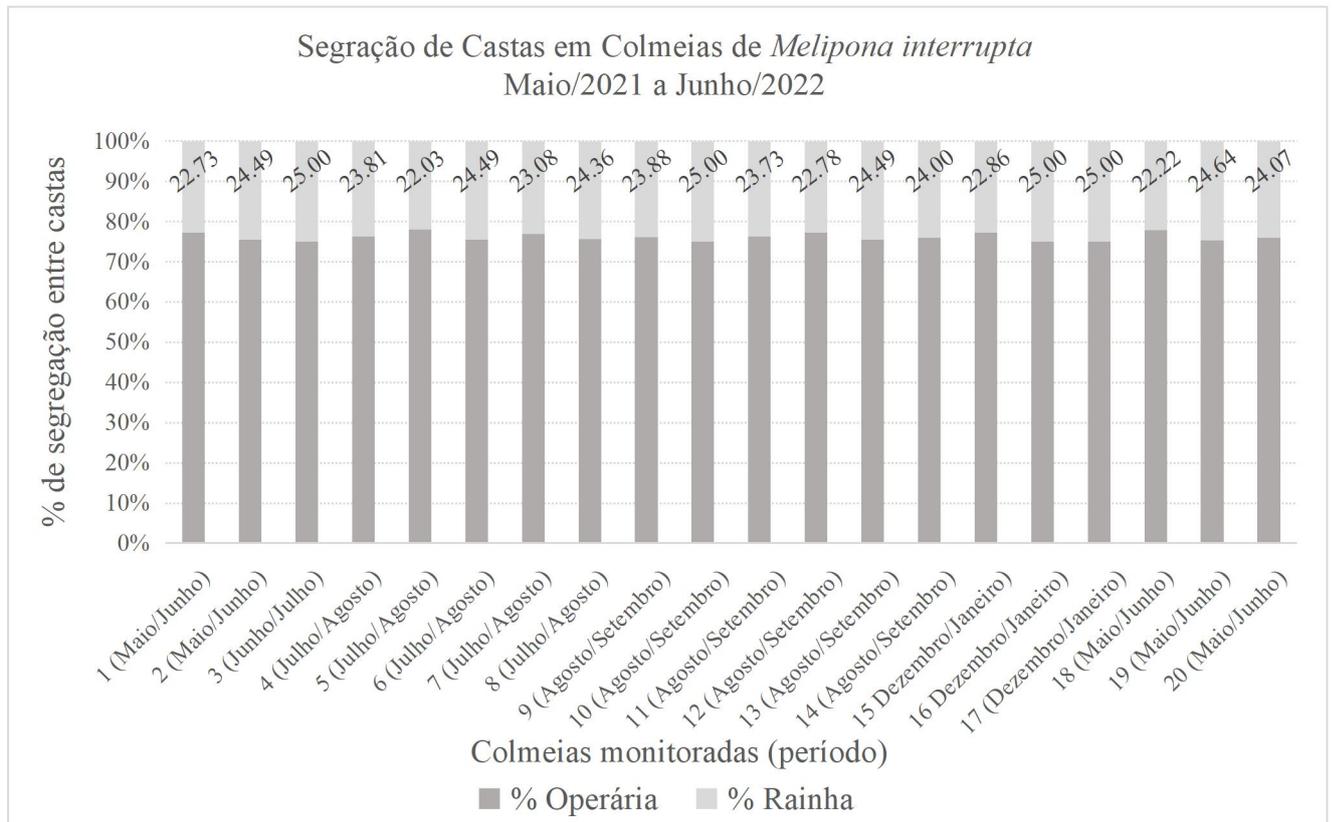


Gráfico 1. Segregação de castas rainha e operária registradas em discos naturais de cria de *Melipona interrupta* mantidos em condições de laboratório durante o período de maio/2021 a junho/2022 oriundos de vinte colmeias do Meliponário Científico do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brasil.

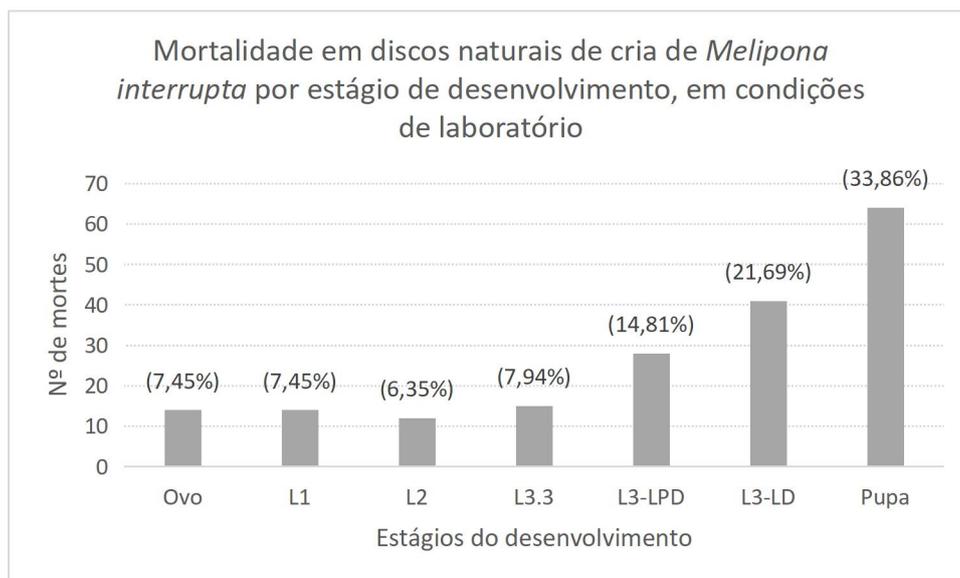


Gráfico 2. Mortalidade observada por estágio do desenvolvimento de abelhas *Melipona interrupta* em células naturais de cria mantidas em condições de laboratório.

Apesar das células naturais de cria estarem desoperculadas e sob condições de criação em laboratório, o que pode ter implicado na possível contaminação do seu interior, foi notório o crescimento de uma massa fúngica sobre o alimento larval em todas as células analisadas (Figura 5).



Figura 5. Presença de micélios fúngicos (massa fúngica esbranquiçada) nas bordas internas de cada célula e sobre o alimento larval (indicada pelas setas vermelhas) observada em todas as células naturais de cria de *Melipona interrupta* desoperculadas, em condições de criação em laboratório.

Tal massa fúngica foi consumida pelas larvas concomitante ao consumo do alimento larval. Foi possível registrar o processo de surgimento e desenvolvimento da massa fúngica, a olho nu e sob estereomicroscópio, que ocorreu a partir de quatro a cinco dias após postura da rainha (dois ou três dias antes da eclosão do ovo) e se intensificou em células com ovos prestes a eclodir (~ cinco a seis após postura) e com larvas recém eclodidas (~ seis a sete dias após postura). Inicialmente, observou-se o aparecimento dos fungos na região periférica da célula, sobre a superfície do alimento larval. Seguidamente, o crescimento progrediu para o centro da célula, ao redor das larvas e, principalmente, para as paredes das células de cria. À medida que as larvas avançaram em idade e no processo de alimentação da massa fúngica, a quantidade desta sobre o alimento larval diminuiu consideravelmente até não ser mais possível sua visualização ao redor da larva, mas concentrou-se predominantemente nas paredes das células (Figura 6).

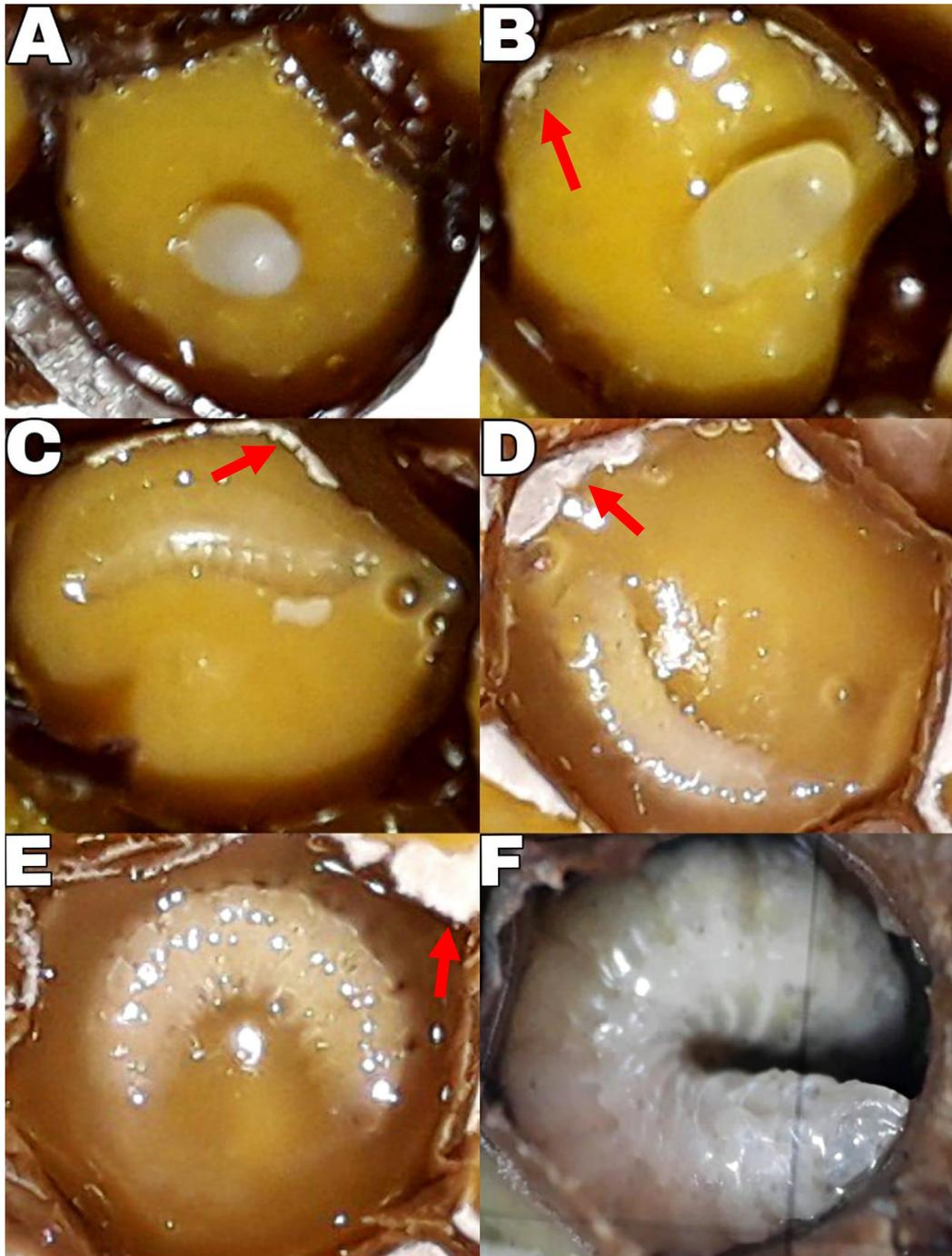


Figura 6. Proliferação de massa fúngica (indicada pelas setas vermelhas), por detecção visual sob estereomicroscópio (4X), ao longo do desenvolvimento da cria de *Melipona interrupta*. (A) Ovo recém posto; (B) Ovo prestes a eclodir; (C) Larva L1; (D e E) Larva L2 (início / final); (F) Larva L3.

Observou-se desde larvas de um dia (L1) que estas se alimentaram da massa fungica fazendo movimentos circulares ao redor de si, a fim de consumir a massa fúngica presente entre a larva (ao centro) e as paredes da célula de cria. Todas as larvas comeram toda a massa fúngica visualmente presente na célula de cria (vídeo disponível em:

(https://drive.google.com/drive/folders/1WPUj93hLgOwzTA3KYo_VPqssJwxTI4w?usp=sharing).

Identificação morfológica e molecular dos isolados fúngicos a partir do conteúdo alimentar das células naturais de cria

A partir da homogeneização da massa fúngica e alimento larval (conteúdo alimentar), realizou-se diluições decimais seriadas dos conteúdos larvais oriundos, separadamente, de células naturais de cria de *M. interrupta* dos dias 1, 8 e 15 após postura, foi possível o isolamento e cultivo, em meio BDA, de 163 isolados fúngicos (Unidades Formadoras de Colônias – UFC) que, por classificação visual, foram agrupados em nove fungos filamentosos e uma levedura (Tabela 1).

Tabela 1. Frequências absoluta (FBA) e relativa (FRE%) de morfotipos de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (FF – Fungo filamentoso; LV - Levedura) cultivadas em meio BDA a partir do conteúdo alimentar de células naturais de cria de *Melipona interrupta* com 1, 8 e 15 dias após postura da rainha.

Morfotipos UFC	1 dia (estágio de ovo)		8 dias (estágio de ovo)		15 dias (estágio de larva)		Total	
	FAB	FRE %	FAB	FRE%	FAB	FRE %	FA B	FRE %
FF1	2	5	5	8	2	3	9	6
FF2	19	46	35	56	41	68	95	58
FF3	0	0	2	3	2	3	4	2
FF4	1	2	0	0	0	0	1	1
FF5	0	0	0	0	1	2	1	1
FF6	2	5	2	3	1	2	5	3
FF7	5	12	2	3	2	3	9	6
FF8	0	0	1	2	1	2	2	1
LV9	10	24	15	24	10	17	35	21
FF10	2	5	0	0	0	0	2	1
Total	41		62		60		163	

A análise morfológica permitiu separar 4 fungos isolados (FF4, FF5, FF6, FF8) de acordo com suas características morfológicas, classificados em fungos filamentosos. Dentre eles, foi possível identificar dois gêneros como base na macro e micromorfologia, não sendo possível identificar os outros quatro fungos filamentosos restantes (FF1, FF3, FF7, FF10) com base nas características morfológicas. Os gêneros identificados pela macro e

micromorfologia foram *Oidiodendron* sp. e *Cladosporium* sp. (Tabela 2).

Tabela 2. Inferência taxonômica dos morfotipos fúngicos cultivados em meio BDA a partir do conteúdo alimentar de células naturais de cria de *Melipona interrupta* com 1, 8 e 15 dias após postura da rainha.

Código de isolamento	Filo	Gênero
FF1	-	<i>Mycelia sterilia</i>
FF3	-	<i>Mycelia sterilia</i>
FF4	Hyphomycetes	<i>Oidiodendron</i> sp.
FF5	Hyphomycetes	<i>Oidiodendron</i> sp.
FF6	Ascomycota	<i>Cladosporium</i> sp.
FF7	-	<i>Mycelia sterilia</i>
FF8	Hyphomycetes	<i>Oidiodendron</i> sp.
FF10	-	<i>Mycelia sterilia</i>

O gênero identificado como *Oidiodendron* (FF4, FF5, FF8) apresentou cor característica única comum para todas as colônias isoladas, demonstrando uma coloração esbranquiçada, com hifas septadas e oidióforos nas extremidades das hifas (Figura 7).

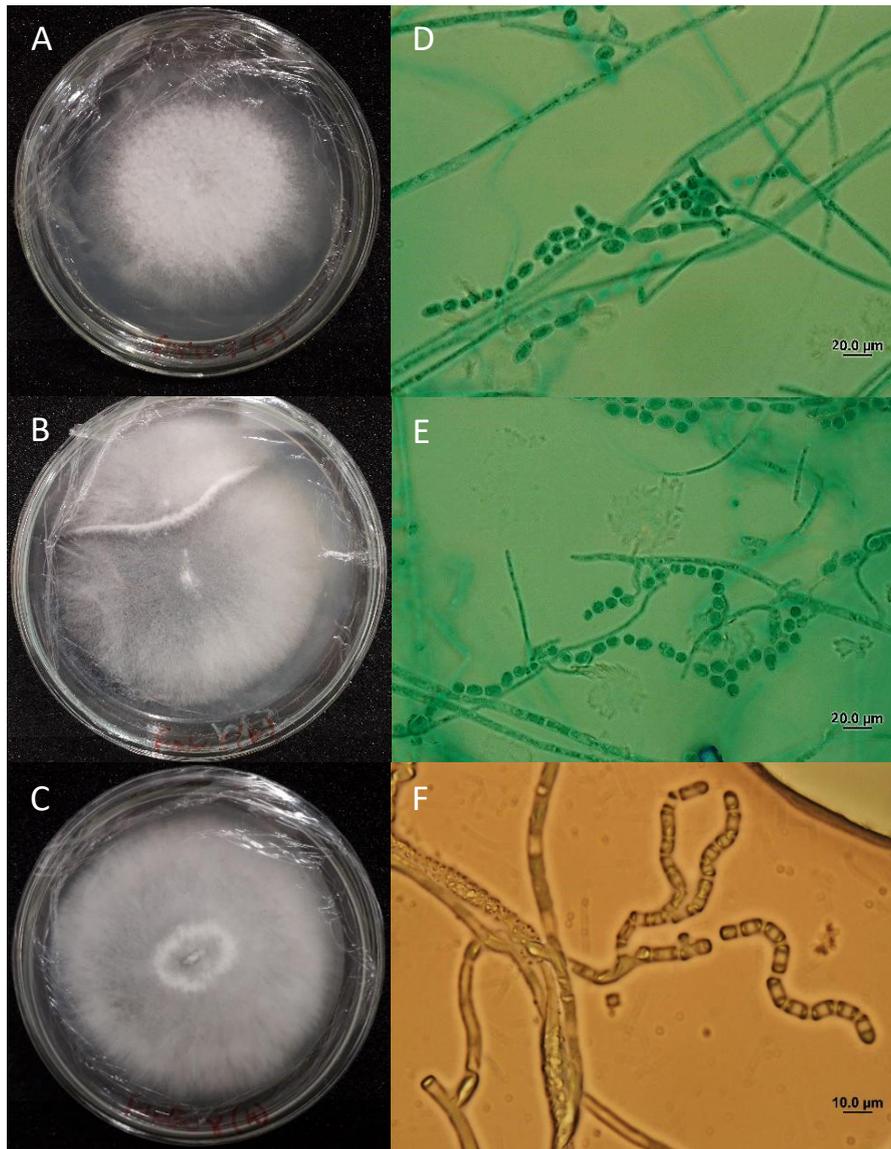


Figura 7. *Oidiiodendron* sp. isolado do conteúdo larval de *Melipona interrupta* do Meliponário GPA-INPA, Manaus-AM. À esquerda, estrutura filamentosa à vista ocular (A, B e C). À direita, oidióforos e hifas septadas, sob microscopia (D, E e F) (objetiva 1000X).

O gênero identificado como *Cladosporium* (FF6) apresentou cor característica única dentre todas as colônias isoladas, contendo coloração verde escuro no centro, banca nas bordas e entre eles uma coloração verde claro, com hifas e conídios evidentes (Figura 8).

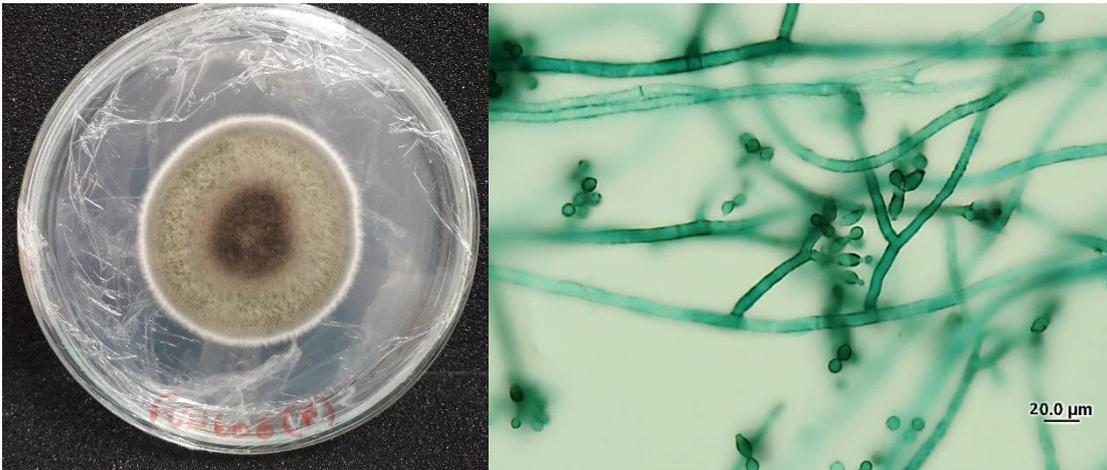


Figura 8. *Cladosporium* sp. isolado do conteúdo larval de *Melipona interrupta* do Meliponário GPA-INPA, Manaus-AM. À esquerda, estrutura filamentosa à vista ocular. À direita, estruturas microscópicas de hifas e conídios (objetiva 1000X).

A aparência morfológica do fungo mais frequente, identificado posteriormente por análises moleculares como *Fomitopsis* sp. (FF2), demonstrou-se hialina, contendo hifas septadas e, sob microscopia, foi possível notar a presença de basidiósporo (Figura 9).

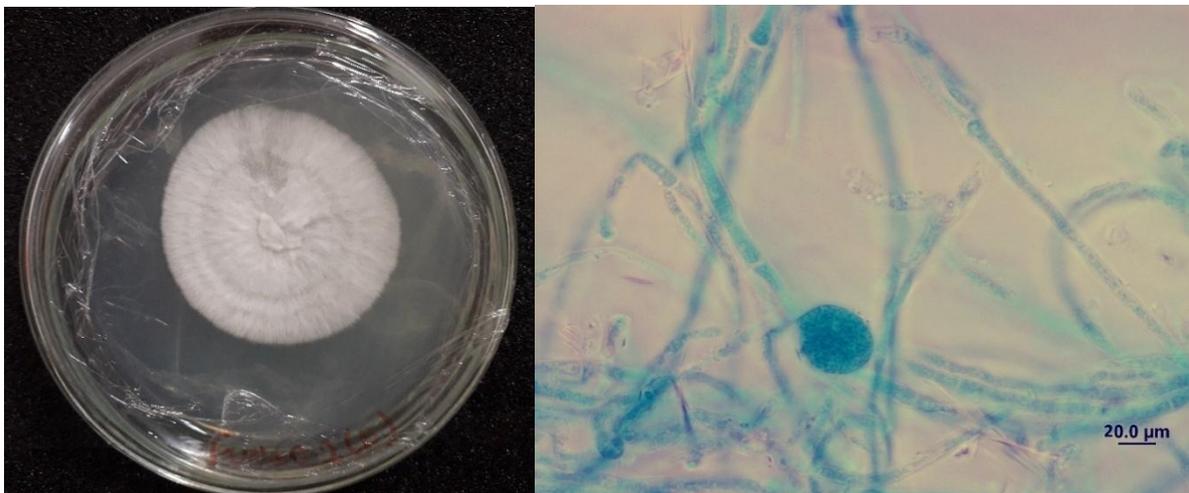


Figura 9. Aparência morfológica do isolado mais frequente posteriormente identificado como *Fomitopsis* sp. (FF2) no conteúdo alimentar oriundo de células naturais de cria de colmeias de *Melipona interrupta* do Meliponário GPA-INPA/Manaus-AM, mantidas sob condições de laboratório. À esquerda, estrutura filamentosa à vista ocular. À direita, basidiósporo e hifas septadas, sob microscopia (objetiva 1000X).

A segunda maior frequência de UFC foi da LV9, posteriormente identificada por análise molecular como *Zygosaccharomyces* sp., uma levedura que sob microscopia (objetiva de 1000X) demonstrou uma parede celular espessa e pseudo-hifas. Em meio de cultura este fungo mostrou uma característica enrugada irregular, com colônias de cor branca que desprendiam facilmente do meio sólido (Figura 10).

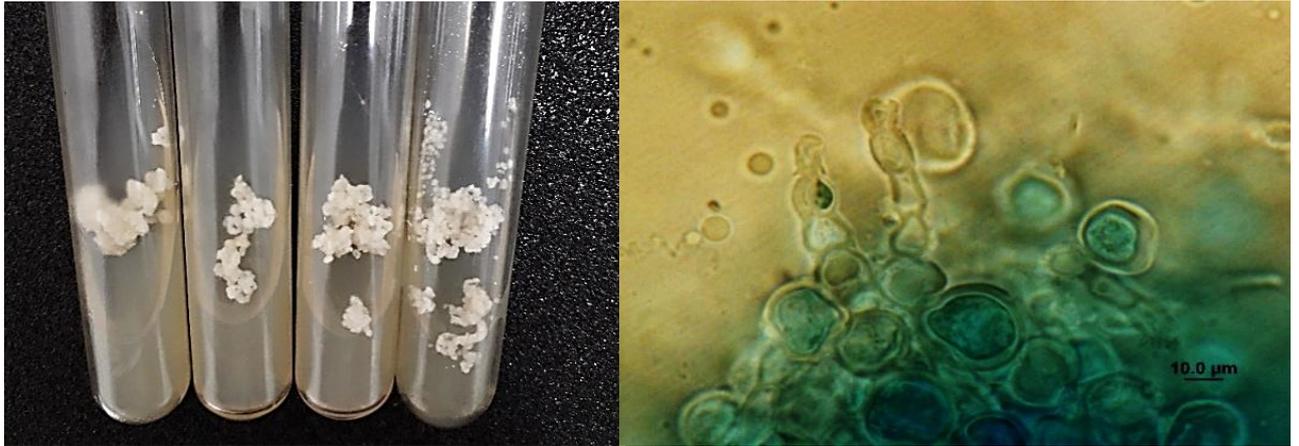


Figura 10. Aparência morfológica da levedura *Zygosaccharomyces* sp. (LV9) isolada do conteúdo alimentar de células naturais de cria *Melipona interrupta* coletadas do Meliponário GPA-INPA/Manaus-AM e mantidas sob condições de laboratório. À esquerda, colônias em meio de cultura BDA, à vista ocular. À direita, pseudo-hifas, sob microscopia (objetiva 1000X).

Registrou-se boa qualidade de extração de DNA e amplificação positiva das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e D1/D2 do rRNA dos dois isolados mais frequentes (FF2 e LV9), com banda de aproximadamente 600 pares de bases (Figura 11).

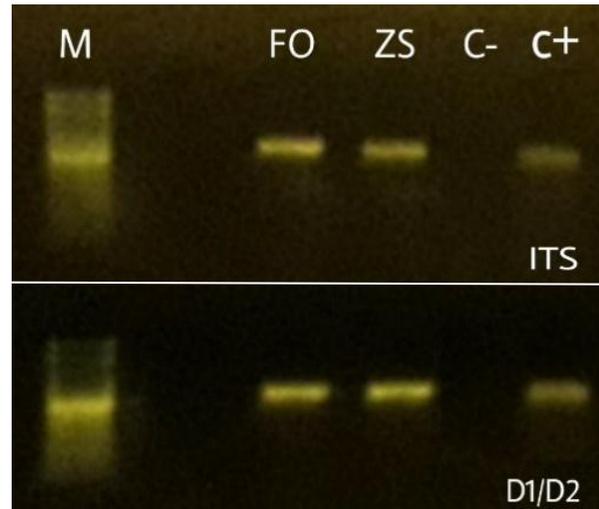


Figura 11. Perfil de amplificação das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e D1/D2 do rRNA extraído dos isolados *Fomitopsis* sp. (FO) e *Zygosaccharomyces* sp. (ZS) a partir do conteúdo alimentar coletado de células de cria de *Melipona interrupta* do Meliponário GPA-INPA, Manaus-AM. Controle negativo, sem DNA (C-). Controle positivo com DNA de *Cryptococcus neoformans* (C+). M = Marcador Ladder 100pb (Invitrogen).

As sequências de DNA dos fungos mais frequentes foram analisadas com o programa Chromas para conferir a qualidade e com a ferramenta BLASTN para comparar com a base de dados existentes no GenBank, considerando valores acima de 97% de similaridade. A árvore de distância genética foi gerada usando o método de agrupamento de vizinhos (NJ - *Neighbor Joining*) com o auxílio do programa MEGA X. As porcentagens de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste *bootstrap* (1000 réplicas) também foram determinadas (Figura 12).

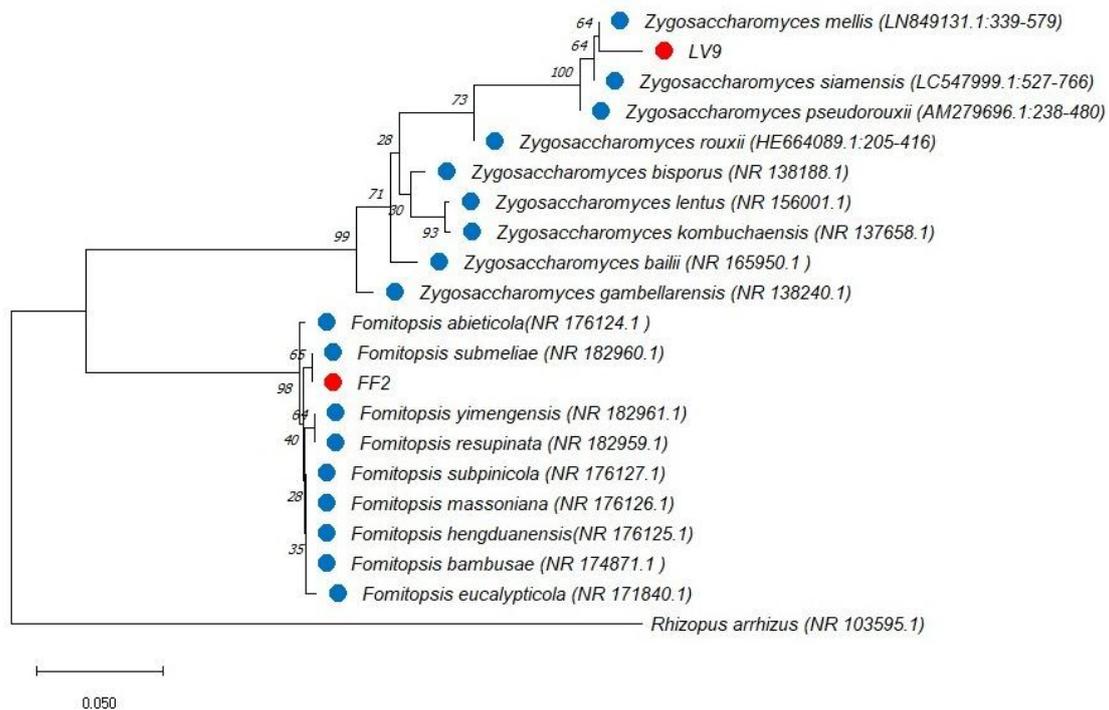


Figura 12. Árvore gerada pelo método neighbor-joining (NJ) construída para o marcador molecular espaçador transcrito interno (ITS) no software MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). As amostras dos fungos selecionados LV9 e FF2 (em vermelho) foram comparadas com sequências disponíveis no NCBI (em azul). *Rhizopus arrhizus* (NR.103595.1) foi usado como grupo externo.

Analisando as características das células fúngicas presentes em 10 μ L de conteúdo alimentar de células naturais de cria de *M. interrupta* foi possível observar características filamentosas e leveduriformes presentes no conteúdo alimentar oriundo das três células amostradas em cada um dos tempos analisados (1, 8 e 15 dias após postura), além de estruturas bacterianas (Figura 13).

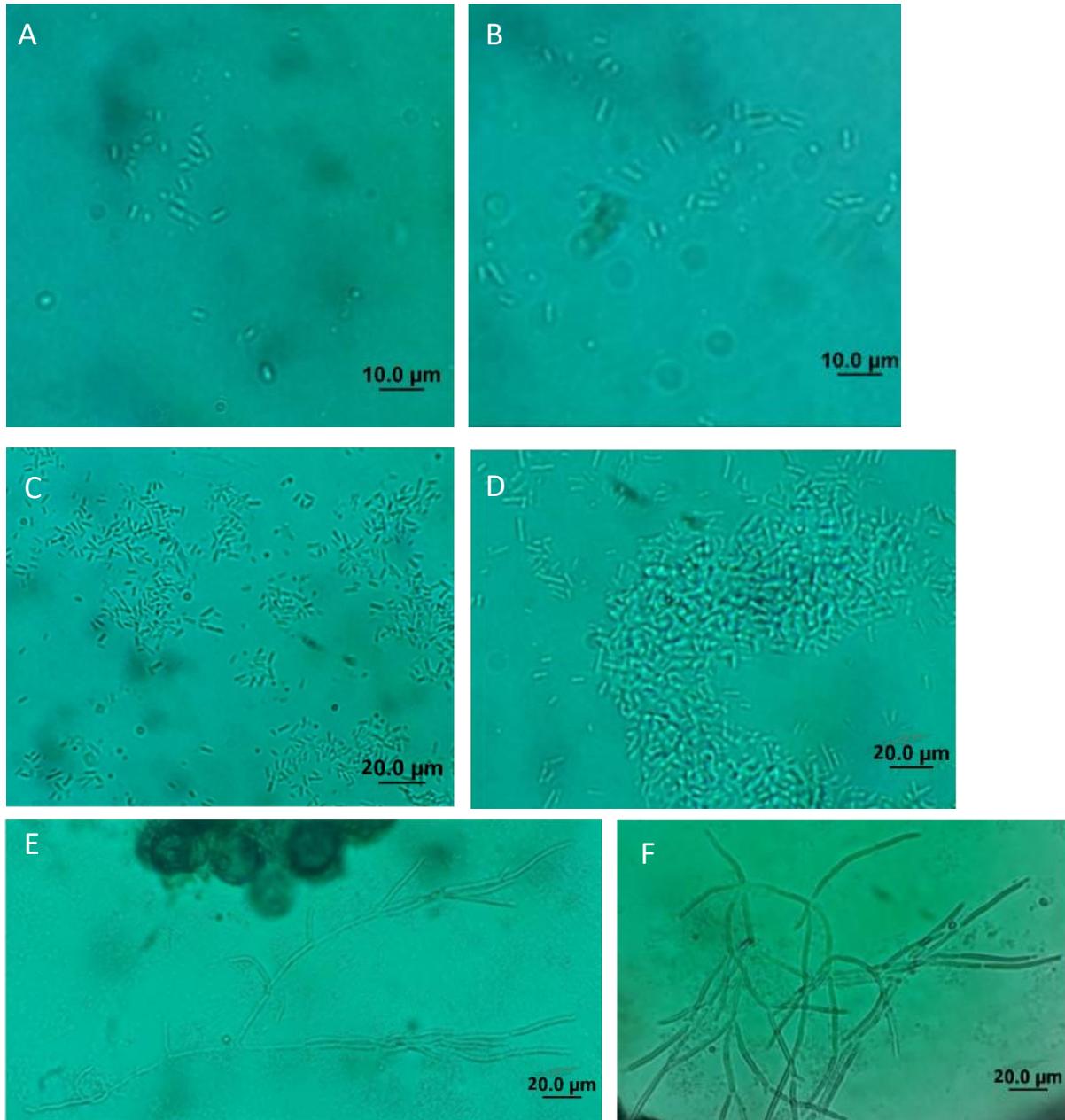


Figura 13. Perfil morfológico, sob microscopia de crescimento de isolados fúngicos a partir do conteúdo alimentar de células naturais de cria de *Melipona interrupta* com 1 dia (A, B – objetiva 1000X), 8 dias (C, D – 1000X) e 15 dias (E, F – 400X) após postura da rainha.

Segregação de castas a partir de larvas de *M. interrupta* tratadas com inóculos de fungos adicionados ao conteúdo alimentar

A criação de larvas de *M. interrupta* em células artificiais de criação (microplacas tipo Elisa) obteve êxito. As abelhas tiveram desenvolvimento completo e, quando atingiram a estágio de pupa foram identificadas quanto aos sexos e castas (Figura 14).



Figura 14. Células artificiais de criação artificial (em microplaca tipo Elisa), em condições de laboratório contendo abelhas *Melipona interrupta* em estágio de pupa. **M** – macho; **O** – Operária; **R** – Rainha.

De um total de 360 indivíduos submetidos à criação em células artificiais 197 fêmeas e 55 machos, distribuídos nos grupos controle e tratamento estabelecidos, completaram o desenvolvimento.

Foram observados expressivos índices de mortalidade (28 a 65%) entre os indivíduos nas células de criação artificial (microplaca tipo Elisa) comparativamente aos índices de mortalidade alcançados nos discos naturais de cria (8,33 a 19,39% mortes) ambos mantidos sob as mesmas condições laboratoriais. Os maiores índices de mortalidade nas células artificiais de criação foram observados para indivíduos tratados com conteúdo alimentar previamente exposto à luz UV (Controle: C1 e Tratamentos: T1 – FO e T1 - ZS) comparativamente aos tratados sem previa exposição do conteúdo alimentar à luz UV (C2; T2 – FO e T2 - ZS) enquanto que a menor mortalidade se deu nos tratamentos na presença de *Zygosaccharomyces* sp. independente da prévia exposição ou não à luz UV (Gráfico 3).

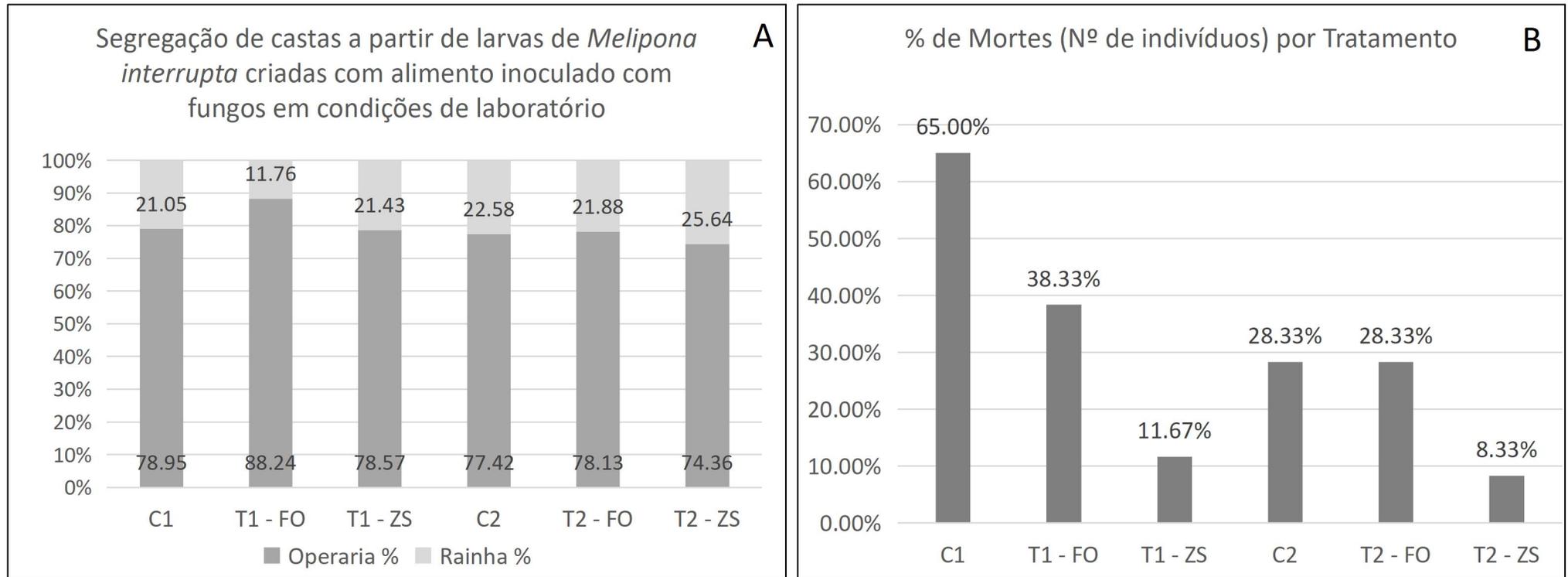


Gráfico 3. Proporção de operárias e rainhas nascidas (**A**) e número de mortes (**B**) a partir da criação em células artificiais, sob condições de laboratório, de larvas de *Melipona interrupta* nos grupos Controle (**C1**: alimento exposto à UV e sem inóculo e **C2**: alimento não exposto à UV o sem inóculo) e Tratamento (**T1 - FO**: alimento exposto à UV + *Fomitopsis* sp.; **T1 - ZS**: alimento exposto à UV + *Zygosaccharomyces* sp.; **T2 - FO**: alimento não exposto à UV + *Fomitopsis* sp.; **T2 - ZS**: alimento não exposto à UV + *Zygosaccharomyces* sp.).

Apesar da mortalidade, a proporção de operárias e rainhas sobreviventes tanto nos grupos Controle (C1 e C2) quanto nos Tratamentos (T1 e T2, para ambos os fungos inoculados) obedeceu ao esperado de 3:1 demonstrado pelas estimativas não significativas de χ^2 (Tabela 3), com maiores índices de nascimentos de rainhas nos tratamentos na presença de *Zygosaccharomyces* sp., mas sem ultrapassar o limite proposto por Kerr (1950) de até 25% (Gráfico 3).

Tabela 3. Proporção de operárias e rainhas oriundas da criação em células artificiais, sob condições de laboratório, de larvas de *Melipona interrupta* nos grupos Controle (C1: alimento esterilizado sem inóculo e C2: alimento não esterilizado sem inóculo) e Tratamento (T1 - FO: alimento esterilizado + *Fomitopsis* sp.; T2 - FO: alimento não esterilizado + *Fomitopsis* sp.; T1 - ZS: alimento esterilizado + *Zygosaccharomyces* sp.; T2 - ZS: alimento não esterilizado + *Zygosaccharomyces* sp.).

Tratamentos	Nº de Operárias	Nº de Rainhas	χ^2 (castas)
C1	15	4	0,16
C2	24	7	0,21
T1 - FO	30	4	3,18
T2 - FO	25	7	0,17
T1 - ZS	33	9	0,32
T2 - ZS	29	10	0,01

DISCUSSÃO

Neste estudo foram registrados dados biológicos inéditos relativos à produção de rainhas de *Melipona interrupta* em células naturais e artificiais de criação, mantidas em condições de laboratório, na presença ou não de inóculos de dois mais frequentes fungos encontrados no conteúdo alimentar provisionado nas células de cria.

Foi observada a produção massiva de rainhas, acima de 22% e máximo de 25%, em todas as 20 colmeias de *M. interrupta* cujos discos naturais de cria foram monitorados em condições de laboratório. Registrou-se a presença de massa fúngica sobre o alimento em todas as células naturais de cria que foi consumida pelas larvas concomitante ao alimento larval.

No conteúdo alimentar de células naturais de cria com 1, 8 e 15 dias após postura da rainha foi registrada a presença de nove tipos cultiváveis de fungos filamentosos e uma levedura. A frequência relativa dos fungos filamentosos variou de zero a 68% e da levedura de 10 a 24%. Os dois mais frequentes fungos apresentaram FRE% total de 21% para filamentoso FF2 (*Fomitopsis* sp.) e 58% para LV9 (*Zygosaccharomyces* sp.).

O experimento demonstrou que o alimento larval com os inóculos apresentou mortalidade equivalente (*Fomitopsis* sp. - 38,33 e 28,33%) ou menor mortalidade (*Zygosaccharomyces* sp. - 11,67 e 8,33%) comparativamente aos Controles sem inóculos (65,00 e 28,33%), destacando-se que na presença de *Zygosaccharomyces* sp. os índices de mortalidade foram equivalentes (11,67% quando o alimento foi previamente exposto à luz UV e 8,33% sem exposição previa à luz UV) aos observados nas células naturais de cria (8,33 a 19,39%). Ainda, houve maior porcentagem de produção de rainhas na presença *Zygosaccharomyces* sp. comparativamente aos controles experimentais, sem extrapolar o máximo esperado de 25%.

A produção de rainhas acima de 22% ao longo de todos os meses do ano em colmeias de *M. interrupta* de certa forma contrapõe os achados de Brito et al. (2015) que para além do sistema genético-alimentar da diferenciação das castas observaram correlação negativa da precipitação na produção de rainhas desta espécie. Tomados em conjunto, estes resultados abrem novas perspectivas de abordagem quanto a elementos do microambiente que podem estar relacionados à destinação das castas.

Aqui, detectamos a presença de nove fungos filamentosos e uma levedura no conteúdo alimentar ao longo do período de desenvolvimento e alimentação das larvas desde 1 a 15 dias após a postura da rainha. Ao todo, se destacaram quatro tipos de gêneros, dois

identificados como *Oidiodendron* sp. e *Cladosporium* sp. por meio das análises macro e micromorfológicas e os outros dois, *Fomitopsis* sp. e *Zygosaccharomyces* sp., identificados por molecular.

O gênero *Oidiodendron* sp., isolado neste trabalho, já foi encontrado anteriormente presente no pólen da abelha *M. scutellaris* (Santos, 2019). Todavia, o gênero *Cladosporium* sp. demonstra uma participação mais frequente em colmeias de abelhas, sendo encontrado em polén e mel de abelhas *M. scutellaris*, *M. interrupta*, *M. seminigra*, *Apis mellifera* L., *Tetragonisca angustula* (Santos, 2019; Tiago, 2018; Souza, 2014; Modro et al., 2009; Rodrigues et al., 2008).

Este é o primeiro registro da presença do fungo *Fomitopsis* sp. associado a abelhas. Este fungo juntamente com *Zygosaccharomyces* sp. foram os dois principais fungos isolados no conteúdo alimentar e demonstraram ser importantes fontes de alimento para as larvas sob condições de criação artificial. Tais achados sugerem haver uma relação mutualística abelha-fungos que tem sido observada em outras espécies de abelhas “sem-ferrão” e diferentes insetos (Menezes et al., 2015; Van Arnem et al., 2018). Os dados registrados para *M. interrupta* corroboram resultados semelhantes aos obtidos para abelhas *Scaptotrigona* aff. *depilis* indicando a relação da presença e proliferação de fungos em células de cria dessa espécie (Menezes, 2010). Ambos os trabalhos destacam que os fungos estão amplamente presentes nas células de cria e têm seu desenvolvimento associado a estágios específicos do desenvolvimento embrionário e larval e que as crias de ambas espécies se alimentam desses micélios fúngicos.

O isolado FF2 identificado pela molecular como *Fomitopsis* sp., quando analisado a partir da árvore gerada pelo marcador ITS, se mostrou mais próximo da espécie *F. submeliae* (Figura 12). Liu e colaboradores (2022) relatam que este fungo é encontrado em troncos caídos de angiospermas encontradas na Malásia, considerado como um fungo que causa podridão parda em material vegetal. Até o momento, nenhum registro havia sido encontrado sobre a associação desse fungo com abelhas. Esse gênero demonstrou aspecto aveludado ou cotonoso e coloração predominantemente branca, com raros pigmentos visíveis. Trata-se de um macrofungo descrito por P. Karst em 1881, da classe Agaricomycetes (Kirk et al., 2008) sendo considerados cosmopolitas. Uma das particularidades do *Fomitopsis* reside na produção de compostos com diversas propriedades biológicas apresentando atividades antioxidantes, antitumorais (Choi et al., 2007), anti-inflamatórias (Lee et al., 2007) e antimicrobianas (Guler et al., 2009) que despertam interesse para setores da indústria farmacêutica e cosmética também por produzirem enzimas tais como celulases e amilases

(Yoon et al., 2006; Chaves, 2017). Portanto, seu inédito registro associado a abelhas *Melipona* abrem novos caminhos de investigação científica.

Os dados derivados da análise filogenética do isolado LV9 a partir da árvore gerada com o marcador ITS colocou essa levedura com proximidade da espécie *Zygosaccharomyces mellis* (Figura 12). Em registros, *Z. mellis* já foi isolado a partir do mel de *T. angustula* (Matos, 2020) e identificado também no mel de abelha “sem-ferrão” *Melipona mondury* (Silva et al 2023). Silva e colaboradores (2023) comentam que a região geográfica pode afetar a biodiversidade de leveduras presentes no mel produzido pela mesma espécie de abelha.

Registros de *Zygosaccharomyces* sp. mostram sua associação com abelhas *Apis mellifera*, *Melipona interrupta*, *Apis dorsata* e *T. pagdenin* (Castillo, 2021; Carrascal, 2016; Meireles, 2018; Saksinchai et al., 2012). Outras espécies de abelhas como *M. quadrifasciata*, *T. angustula* e *S. depilis* também foram encontradas em associação com fungos do gênero *Zygosaccharomyces* (Rosa et al., 2003; Teixeira, 2019; Paula, 2020). As espécies desse gênero foram encontradas em diversos locais dentro da colmeia com mel, estômago, pólen e pelotas de lixo (Gilliam et al. 1997; Cadez et al. 2015). Néctares de plantas são possíveis pontos de encontro para esta levedura (Wolfe, 2013) e, por serem tolerantes a altas concentrações de açúcares e ao etanol, sua presença nas colmeias está relacionada com a deterioração do alimento rico em carboidratos (Pimentel et al. 2005) e pelo fornecimento de esteroides essenciais para a metamorfose da pupa, por meio da alimentação (Paludo et al. 2018). Espécies de *Zygosaccharomyces* demonstram crescimento em alimentos com disponibilidade de água incrivelmente baixa (Wolfe, 2013; Sá-Correia, 2014).

No presente estudo foi demonstrado que larvas de *M. interrupta* tratadas com alimento larval previamente exposto à luz UV e que recebeu inóculos de *Fomitopsis* sp. ou de *Zygosaccharomyces* sp. apresentaram menor mortalidade e, a presença de *Zygosaccharomyces* sp. resultou em igual ou maior número ($\geq 21,43\%$) de rainhas que os controles (com alimento larval exposto e não exposto previamente à luz UV e sem inóculos). Estes resultados demonstram a viabilidade do desenvolvimento dos imaturos de *M. interrupta* na presença de *Zygosaccharomyces* sp. e colocam em perspectiva a possibilidade de os produtos desse fungo fornecerem nutrientes importantes no desenvolvimento das larvas e sua pupação, como foi sugerido por Paludo e colaboradores (2018). Estes autores descobriram que larvas de *S. depilis* precisam se alimentar do fungo *Zygosaccharomyces* sp. para que consigam continuar o desenvolvimento e se transformar em pupa.

Outros estudos revelam que é possível que fungos atuem de maneira benéfica,

auxiliando na digestão do alimento larval, fornecendo nutrientes adicionais, protegendo contra patógenos prejudiciais e até mesmo regulando a ação de outros microorganismos por meio da produção de pequenas moléculas (Paludo et al., 2018; Paludo et al., 2019; Paula, 2020). Aqui, observamos que as larvas de todas as 1656 células naturais de cria monitoradas consumiram a massa fúngica e todo o conteúdo alimentar disponível em todas elas, demonstrando provavelmente a mesma necessidade nutricional. Essa similaridade entre os resultados obtidos com a abelha *M. interrupta* e a proposição de 95% de sucesso para criação *in vitro* nos estudos de Menezes (2010) para abelhas rainhas de *Scaptotrigona depilis* é notável e sugere uma tendência consistente de sucesso na indução *in vitro* do desenvolvimento de abelhas por meio da inoculação de fungos. O primeiro exemplo de benefício nutricional foi da levedura *Zygosaccharomyces* sp. com a abelha *Scaptotrigona depilis*, sendo relatado por Menezes et al. (2015) e Paludo et al. (2018), indicando que o fungo acumula ergosterol, que é utilizado pelo inseto em desenvolvimento como precursor da biossíntese de ecdisteróides em modulação da metamorfose dos insetos. O mesmo tem sido descoberto em outras espécies de abelhas “sem-ferrão”, inclusive nas espécies *Melipona quadrifasciata*, *M. fasciculata*, *M. bicolor* (Paula et al. 2023).

A via da biossíntese do esterol, a partir do Acetil-CoA tem uma origem sintética inicial comum em plantas, animais e fungos, sendo que o produto final da via dos esteróis difere nestes reinos (Dupont et al. 2012). Em abelhas *Apis mellifera*, a síntese do Hormônio Juvenil (HJ) se dá pela transformação do acetil-CoA em farnesil-pirofosfato, denominada via do mevalonato que é conservada em insetos (Bellés et al. 2005, Santos, 2008). É sabido que o desenvolvimento de imaturos de insetos é regulado por dois hormônios: os ecdisteroides e o hormônio juvenil (HJ). Em abelhas *Melipona*, os níveis de HJ circulantes na hemolinfa é determinante da destinação das castas levando à produção de rainhas (Hartfelder e Engels, 1988, Bonetti et al., 1995). Kerr (1950) e Bonetti et al. (1995) indicaram que a cascata gênica de diferenciação das rainhas em abelhas do gênero *Melipona* se dá efetivamente numa “janela temporal” em larvas L3-LPD (larvas que finalizaram o consumo do conteúdo alimentar), portanto, momento essencial para o desenvolvimento e definição das castas neste gênero de abelhas e também para a pupação. Desta forma, a presença e os produtos gerados por *Zygosaccharomyces* no conteúdo larval de *M. interrupta* podem potencialmente contribuir e influenciar a cascata metabólica relacionada à via de metabolismo do hormônio juvenil, cuja titulação é determinante da ativação da cascata gênica responsável pelas características secundárias de rainhas em abelhas *Melipona*, e especificamente em *M. interrupta*, como inferido por Brito et al. (2015), abrindo nova perspectiva de abordagem

sobre a destinação das castas nas abelhas desse gênero.

Muitos microrganismos podem ser extremamente delicados e exigirem condições de cultivo específicas que não podem ser replicadas facilmente em laboratório. Portanto, métodos convencionais podem subestimar significativamente a diversidade real dos fungos nas colmeias. O metagenoma, por exemplo, pode oferecer uma vantagem crítica ao permitir a detecção de DNA fúngico diretamente nas amostras ambientais, sem a necessidade de cultivo. Isso possibilita a identificação de uma gama muito mais ampla de fungos, incluindo aqueles que são essenciais para o funcionamento das colônias, mas que não podem ser isolados em cultura.

Os achados aqui apresentados confirmam que a produção de rainhas em abelhas *M. interrupta* segue a proposição de segregação genética de até 25% (3 operárias : 1 rainha) mas revelam uma potencial contribuição nutricional da presença de *Zygosaccharomyces* no conteúdo alimentar de larvas em prol da diminuição da mortalidade de imaturos e na destinação de rainhas nestas abelhas e, conseqüentemente, em benefício da saúde e reprodução dos indivíduos e suas colmeias, constituindo um passo relevante para avanço do entendimento das complexas relações simbióticas entre fungos e abelhas, contribuindo, assim, para o conhecimento científico no âmbito da ecologia microbiana e da biologia de insetos sociais. Compreender aspectos importantes para o desenvolvimento e metamorfose de imaturos, a fim de que alcancem o completo ciclo de vida, bem como informações peculiares acerca da produção de rainhas, indivíduo chave para geração de novas abelhas, é essencial para a gestão de colmeias e para garantir a saúde e reprodução adequada desses importantes polinizadores.

A diversidade de fungos presentes no alimento larval traz à tona um amplo campo investigativo não apenas para avanço do conhecimento científico acerca da microbiota associada às abelhas “sem-ferrão” e suas interações como também às suas aplicações para além da vida da colmeia. Para entender mais profundamente o complexo ecossistema das colmeias de abelhas “sem-ferrão” e sua relação com os fungos é essencial adotar abordagens dinâmicas e integrativas. Isso envolve a combinação de métodos tradicionais de cultivo e análise de metagenoma, criando uma visão holística da microbiota e sua influência no desenvolvimento dos indivíduos, na formação das castas e na continuidade das próprias colmeias.

CONCLUSÃO

Abelhas *Melipona interrupta* produzem rainhas mensalmente ao longo do ano com índices acima de 20% e seguem a segregação esperada de no máximo 25% de rainhas.

Este estudo revelou que fungos estão presentes nas células naturais de cria e no conteúdo alimentar de abelhas *Melipona interrupta* fazendo parte da dieta das larvas até sua pupação.

Dois fungos cultiváveis se mostraram predominantes no conteúdo alimentar de células naturais de cria dessas abelhas, *Fomitopsis* sp. e *Zygosaccharomyces* sp., os quais quando inoculados no alimento larval, em condições de criação artificial, mostraram ser importantes fontes de alimento para as larvas e sua sobrevivência. Especialmente *Zygosaccharomyces* sp. se mostrou valioso para a diminuição da mortalidade e produção de rainhas em níveis equivalentes às condições naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Banertt, H. L.; Hunter, B. B. 1972. *Illustrated general of imperfect fungi*. 3o ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company.
- Bellés, X.; Martin, D. & Piulachs, M. D. 2005. The mevalonate pathway and te synthesis of juvenile hormone in insects. *Annual Rev. Entomology* 50:181-199.
- Becker, T. 2014. Desenvolvimento de colmeias de abelhas *Melipona interrupta* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Meliponini) sob diferentes temperaturas em condições de laboratório. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 82p.
- Bonetti, A. M. 2008. Genética da determinação de castas em *Melipona*: expressão de genes casta-específicos. *Relatório Final de Pós-doutorado*, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil. 147 pp.
- Bonetti, A.M. Kerr, W.E.; Matusita, S. H. 1995. Effects of juvnile hormones I, II and III in single and fractionated dosage in *Melipona* bees. *Rev. Bras. Biologia* 55:113-120.
- Brito, D. V.; da Silva Nunes, R. A.; Pequeno, P. A. C. L.; Nunes-Silva, C. G.; Carvalho-Zilse, G. A. 2013. Differential environmental effects on caste location in two Amazonian *Melipona* bees. *Apidologie*, 44(6), 666-672.
- Brito, D. V.; Silva, C. G. N.; Hasselmann, M.; Viana, L. S.; Astolfi-Filho, S.; Carvalho-Zilse, G. A. 2015. Molecular characterization of the gene feminizer in the stingless bee *Melipona interrupta* (Hymenoptera: Apidae) reveals association to sex and caste development. *Insect biochemistry and molecular biology*, 66, 24-30.
- Cadez, N.; Fülöp, Z.; Dlačny, D.; Péter, G. 2015. *Zygosaccharomyces favi* sp. nov., an obligate osmophilic yeast species from bee bread and honey. *Antonie van Leeuwenhoek* 107 (3): 645–654.
- Camargo, C.A. 1972. Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latreille

(Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 32: 133-138.

Camargo, J. M. F.; Pedro, S. R. M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. *In*: Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. (<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>). Acesso em 10/07/23

Campos, L. A. D. O.; Coelho, C. D. P. 1993. Determinação de sexo em abelhas: XXX. Influência da quantidade de alimento e do hormônio juvenil na determinação das castas em *Partamona cupira helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Rev. Bras. Zool.*, 449-452.

Carrascal, C. Y. 2016. Identificación de levaduras presentes en el proceso de transformación de polen corbicular a pan de abejas por métodos tradicionales y moleculares. Tese de Doutorado, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. 109p.

Carvalho, G. A. 2001. The number of sex alleles (CSD) in a bee population and its practical importance (Hymenoptera, Apidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 10(1): 10 -15.

Carvalho-Zilse, G. A.; Nunes-Silva, C. G. 2012. Threats to the Stingless Bees in the Brazilian Amazon: How to Deal with Scarce Biological Data and an Increasing Rate of Destruction. *In*: Florio, RM (Ed), Bees: Biology, Threats and Colonies. Nova Science Publishers, Chapter 4: 147-168p.

Carvalho-Zilse, G.A. 2013. Produção de polinizadores para a agricultura na Amazônia. *In*: Noda, H.; Souza, L.A.G.; Filho, D.F.S. (Ed.). Pesquisas Agronômicas para a Agricultura Sustentável na Amazônia Central. Ed. Wegs. 19-26.

Castillo, D. F. J. 2021. Análisis comparativo de la comunidad bacteriana y fúngica de lamiel de *Apis mellifera* y de *Melipona* bee cheien colonias que comparten la misma área de forrajeo. *Doctoral Dissertation*, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Castro, Ivan de. 2019. Caracterização populacional da abelha *Tetragona elongata* (Apidae, Meliponini) e de seu fungo simbiote *Zygosaccharomyces* sp. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo.

- Chaves, J. V. 2017. Atividades antimicrobiana e enzimática do fungo *Formitopsis* sp. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas. 58p.
- Cardoso-Júnior, C. A. M.; Silva, R. P.; Borges, N. A.; de Carvalho, W. J.; Walter, S. L.; Simões, Z. L. P.; et al. 2017. Methyl farnesoate epoxidase (mfe) gene expression and juvenil e hormone titers in the lifecycle of a highly eusocial stingless bee, *Melipona scutellaris*. *Journal of Insect Physiology*, 101, 185-194.
- Choi D., Park S.S., Ding J.L., Cha W.S. 2007. Effects of *Fomitopsis* Pinicola Extracts On Antioxidant And Antitumor Activities. *Biotechnol Bioprocess Eng.*, 12: 516–524.
- Cocolin, L.; Bisson, L. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 189: 81–87.
- Corabi-Adell, C.; Lucon, C. M. M.; Ichikawa, A. 2003. Uma técnica simples para observação microscópica de *Trichoderma* spp. (Hypocreales) em cultura de lâminas. *Arq. Inst. Biol.*, 70: 92–95.
- Dunn, I. S.; Blattner, F. R. 1987. Charons 36 to 40: multienzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with poly linker and poly stuffers. *Nucleic Acids Research*, 15(6): 2677–2698.
- Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., & Beney, L. 2012. Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution*, 66(9), 2961-2968.
- Ferrer, A.; Miller, A. N.; Shearer, C. A. 2011. *Minutis phaera* and *Natipusilla*: two new genera of freshwater Dothideomycetes. *Mycologia*, 103(2): 411–23.
- Fonseca, M.D.P. 2016. Estudo da diversidade e a tividade larvicida de Agaricomycetes lognolíticos (Basidiomycota) no Estado do Amazonas. Tese de Doutorado, Universidad Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 95p.
- Gilliam, M. 1979. Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie*, 10, 43-53.

Gilliam, M. 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol. Lett.* 155, 1-10.

Hartfelder, K.; Engels, W. 1988. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honey bee. *In: Pedersen, R.A. Schatten, G.P. (ed.). Current Topic in Developmental Biology* 40:45-77.

Hartfelder, K.; Engels, W. 1989. The Composition of Larval Food in Stingless Bees: Evaluating Nutricional Balance by Chemo Systematic Methods. *Insectes Sociaux*, 36, 1-14.

Hartfelder, K.; Makert, G.R.; Judice, C.C.; Pereira, G.A.G.; Santana, W.C.; Dallacqua, R.; et al. 2006. Physiological and genetic mechanism sunderlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie* 37, 144-163

Kerr, W. E. 1950. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics*, 35(2): 143

Kerr, W.E.; Nielsen, R.A. 1966. Evidence that genetically determined *Melipona* queen scan be come workers. *Genetics* 54(3), 859–866

Kerr, W. E.; Carvalho, G. A.; Nascimento, V. A. 1996. Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte: Acangaú.144p.

Kirk P.M., Cannon P. F., Minter D.W., Stalpers J.A. 2008. Dictionary of the Fungi. 10º ed, CABI Publishing, Reino Unido, pp. 771.

Lacaz, C. D. S.; Port, E.; Martins, J. E. C. 2002. *Tratado de Micologia Médica*. 9o ed, Savier, São Paulo.

Lee S.I., Oh S.H., Kim S.D., Lee H.G. 2007. Extract With High Antioxidant Ability From *Fomitopsis Pinicola* and its Application. *KR Patent* 2007078911.

Liu, S., Song, C. G., Xu, T. M., Ji, X., Wu, D. M., & Cui, B. K. 2022. Species diversity, molecular phylogeny, and ecological habits of *Fomitopsis* (Polyporales,

Basidiomycota). *Frontiers in Microbiology*, 13, 859411.

Marchini LC, Moreti ACCC, Otsuk IP. 2005. Análise de agrupamento, com base na composição físico-química de amostras de méis produzidos por *Apis mellifera* L. no Estado de São Paulo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*; 25(1):8-17.

Machado, J.O. 1971. Simbiose entre abelhas sociais brasileiras (Meliponinae, Apidae) e uma espécie de bactéria. *Ciência e Cultura*, 23, 625-633.

Marciel-Silva, V.L.; Kerr, W. E. 1991. Sex determination in bees. XXVII. Castes obtained from larvae fed homogenized food in *Melipona compressipes* (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*. v. 2, n. 1, p. 15-19.

Matos, T. T. S. 2020. *Kluyveromyces osmophilus* is not a synonym of *Zygosaccharomyces mellis*; reinstatement as *Zygosaccharomyces osmophilus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 3374–3378

Meireles, Sabrina da Fonseca .2018. Leveduras associadas ao ninho das abelhas sem ferrão *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata* (Apidae: Meliponini): identificação e aspectos biotecnológicos. Dissertação de Mestrado, Universidad Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 80p.

Menezes, C. 2010. A produção de rainhas e a multiplicação de colônias em *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Doctoral Dissertation*, University of Sao Paulo, Brazil.

Menezes, C.; Bonetti, A. M.; Amaral, I. M. R.; Kerr, W. E. 2007. Alimentação larval de *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): estudo individual das células de cria. *Bioscience Journal*, 23.

Menezes, C.; Vollet-Neto, A.; Marsaioli, A. J.; Zampieri, D.; Fontoura, I. C.; Luchessi, A. D.; et al. 2015. A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Current Biology*, 25(21), 2851-2855.

- Modro, A. F., Silva, I. C., & Luz, C. F. 2009. Coleta de fungos saprofiticos por abelhas africanizadas no Brasil. *Neotropical Entomology*, 38, 434-436.
- Moure, J. S.; Kerr, W. E. 1950. Sugestões para modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera - Apoidea). *Dusenian*, 1: 105-929.
- Nogueira, D. S. 2023. Overview of Stingless Bees in Brazil (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *EntomoBrasilis*, 16, e1041-e1041.
- Nogueira Neto, P.; Neto, N.; Carvalho, P.; Filho, H. A. 1997. *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo (Brasil).
- Nunes, R. A. S. 2008. Caracterização do desenvolvimento embrionário e pós embrionário das abelhas *Melipona seminigra* e *Melipona compressipes* (Hymenoptera, Apidae). *Monografia*, Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.
- Paludo, Camila R.; Menezes, Cristiano; Silva-Junior, Eduardo A.; Vollet-Neto, Ayrton; Andrade-Dominguez, Andres; Pishchany; *et al.* 2018. Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1-10.
- Paula, G. T. D., Paixão Melo, W. G. D., Castro, I. D., Menezes, C., Paludo, C. R., Rosa, C. A., & Pupo, M. T. 2023. Further evidences of an emerging stingless bee-yeast symbiosis. *Frontiers in Microbiology*, 14.
- Paula, G. T. D. 2020. Análises filogenética, morfológica e química de *Zygosaccharomyces* associados a abelhas sem ferrão. *Doctoral Dissertation*, Universidade de São Paulo.
- Pearson, K. 1900. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Philosophical Magazine Series*, 5, 50 (302): 157–175.
- Pedro, S.R.M. 2014. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 61: 348-354.

- Penedo, M.C.T.; Testa, P.R.; Zucoloto, F.S. 1976. Valor Nutritivo do Gevral e do Levedo de Cerveja em Diferentes Misturas com Pólen para *Scaptotrigona* (*Scaptotrigona*) postica (Hymenoptera, Apidae). *Ciência & Cultura*, 28, 536-538.
- Pimentel, M.R.C.; Antonini, Y.; Martins, R.P.; Lachance, M.A.; Rosa, C.A. 2005. *Candida riocensis* and *Candida cellae*, two new yeast species from the *Starmerella* clade associated with solitary bees in the Atlantic rain forest of Brazil. *FEMS Yeast Research*. 5, 875–879.
- Rasmussen, C.; e Cameron, S.A. 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long-distance dispersal. *Biol. J. Linnean Soc.*, 99: 206-232.
- Rebelo, K. S.; Ferreira, A. G.; Carvalho-Zilse, G. A. 2016. Physico chemical characteristics of pollen collected by Amazonian stinglessbees. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.46, n.5, p.927-932. DOI: 10.1590/0103-8478cr20150999
- Ribeiro, M. M. R. et al. 2012. Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): the activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. *Psyche*, p. 6.
- Rodrigues, M.A.A.; Keller, K.M.; Keller, L.A.M.; Oliveira, A.A.; Almeida, T.X.; Marassi, A.C.; et al. 2008. Avaliação Micológica e Micotoxicológica do Pólen da Abelha Jataí (*Tetragonisca Angustula*) Proveniente de Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 30(4):249-253.
- Rodrigues, E. G.; Lírio, V. S.; Lacaz, C. D. S. 1992. Preservação fungos interesse médico em água destilada. *Revista Inst. Med. Tropical*, p. 159–165.
- Rosa, C. A.; Lachance, M. A.; Silva, J. O. C.; Teixeira, A. C. P.; Marini, M. M.; Antonini, Y.; Martins, R. P. 2003. Yeast communities associated with stingless bees. *Fems Yeast Research*, v. 4, n. 3, p. 271–275.
- Riddell, R.W. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*, v.42, p.265-270.

- Sá-Correia, I., Guerreiro, J. F., Loureiro-Dias, M. C., Leão, C., & Côrte-Real, M. 2014. *Zygosaccharomyces*. *Encyclopedia of food microbiology*, 3, 849-855.
- Saksinchai, S.; Suzuki, M.; Chantawannakul, P.; Ohkuma, M.; Lumyong, S. 2012. A novel ascosporeogenous yeasts species, *Zygosaccharomyces siamensis*, and the sugar tolerant yeasts associated with raw honey collected in Thailand. *Fungal Diversity*, v. 52, p. 123–139.
- Santos, J. E. F. D. 2019. Fungos isolados de colmeias de *Melipona scutellaris* e avaliação da capacidade de produção de lipases. *Master's thesis*, Universidade Federal de Pernambuco.
- Santos, Ana Carolina Costa et al. 2023. Bacteria, yeasts, and fungi associated with larval food of Brazilian native stingless bees. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 5147.
- Santos, A.M. 2008. Biologia molecular dos genes envolvidos no metabolismo do hormônio juvenil em *Apis mellifera*. *Tese de Doutorado*. FMRP / USP – Ribeirão Preto/SP.
- Schumann, N. A. B.; Cardoso-Junior, C. A. M.; Silva, E. H.; Ueira-Vieira, C.; Beletti, M. E.; Franco, M. B.; et al. 2019. Three-dimensional reconstruction of corpora allatanucleus reveals insights into epigenetic mechanisms of caste differentiation in *Melipona scutellaris* stingless bees. *Apidologie*, 50(3), 330-339.
- Seifert, K. A.; Gams, W. 2011. The genera of Hyphomycetes. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 27, 119.
- Silva, J. R., Henrique-Bana, F. C., Villas-Bôas, J. K., Pimentel, T. C., Spinosa, W. A., & Prudencio, S. H. 2023. Maturation of honey from Uruçú-Amarela (*Melipona mondury*): Metagenomics, metabolomics by NMR 1H, physicochemical and antioxidant properties. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 6, 100157.
- Souza, J. R. S. D. 2014. Diversidade fúngica associada a abelhas sem ferrão (*Melipona* spp.) em meliponários na cidade de Manaus e Iranduba, Amazonas, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidad Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 66p.

Souza, J. R. S., Sarquis, M. I. M., Pantoja, M. C., Neto, P. Q. C., Pereira, J. O., Galvão, R. M. S., & Silva, M. I. L. 2018. Occurrence of filamentous fungi associated with stingless bees *Melipona* in meliponaries at the metropolitan region of Manaus, Amazonas. *Rev. da Biol*, 18, 1-5.

Stuart, R. M.; Lamas, C.; Pimentel, I. C. 2004. *Trigona* sp. como visitante floral e vetor de esporos fúngicos para goiabeira (*Psidiumguajava* L. – Myrtaceae). *Ecology*, 73(3): 959–970.

Teixeira, J. F. 2019. Comunidades de leveduras associadas a abelhas sem ferrão na região de Mata Seca em Minas Gerais. Dissertação de Mestrado, Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 70p.

Tiago, M. R. M. 2018. Microbiota fúngica cultivável associada às colmeias e castas de *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra* (Apidae, Meliponini). Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas do Amazonas, Manaus, Amazonas. 55p.

Van Arnam, E. B., Currie, C. R. & Clardy, J. 2018. Defense contracts: molecular protection in insect-microbesymbioses. *Chem. Soc. Rev.*, <https://doi.org/10.1039/c7cs00340d>.

Vit, P.; Roubik, D. W.; Pedro, S. R. M. 2012. *Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees*. June 2015, p. 1–654.

White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. J. W. T.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

Winston, P.W.; Bates, D.H. 1960. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology*, 41(1): 232-237.

Wolfe, B. 2013. *Tales from the Yeast*. World of Fine Wines 41^a Ed.

Yoon J-J., Igarashi K., Kajisa T., Samejima M. 2006. Purification, identification and molecular cloning of glycosidehydrolase family 15- glucoamylase from the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *FEMS Microbiol Lett*, 259: 288–294.

Zerbo, A.C.; Moraes, R.L.M.S.; Braga, M.R.B. 2001. Protein requirements in larvae and adults of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae): mid gut proteolytic activity and pollen digestion. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 129, 139-147.